UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFECTO ANTIMICROBIANO DE ESTERES DE α- AMIRINA Y DEL ÁCIDO BETULÍNICO CONTRA BACTERIAS DE LA CAVIDAD ORAL.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GRISELDA VÁZQUEZ AGUILAR

MÉXICO, D.F. **2013**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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: QFB. Adriana Guadalupe Mejía Chávez

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Gloria Díaz Ruiz

1er SUPLENTE: M. en C. Beatriz Ruiz Villafan

2do SUPLENTE: Dr. Arturo Navarro Ocaña

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Laboratorio 324, Edifico E

Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA

_____

Dra. Gloria Díaz Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO

_____

Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUSTENTANTE

_____

Griselda Vázquez Aguilar

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la gran oportunidad de formar parte de esta institución, por dejar crecer mis sueños, por las lecciones, experiencias, amigos y por formar la profesionista que hoy soy.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por su confianza al permitirme ser parte de este proyecto, por su tiempo en la revisión de este escrito, así como su asesoría, paciencia y apoyo durante todo el desarrollo del mismo, siempre lo agradeceré.

A la Dra. María del Carmen Wacher Rodarte por la oportunidad que me dio de integrarme a su grupo de laboratorio.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña, por las asesorías y compuestos proporcionados, para la exitosa culminación de este proyecto.

A la Biol. Ma. Teresa Flores Espinoza por su paciencia, comprensión, ayuda, enseñanza y sobre todo la maravillosa amistad que hoy me jacto de decir que gozamos a la par.

A los miembros del jurado, QFB Adriana Guadalupe Mejía Chávez y al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por el tiempo empleado en la revisión de este trabajo y las recomendaciones hechas.

A mis profesores de licenciatura, por todo el conocimiento compartido y sus buenas intenciones al aportar su experiencia para formar cada día más y mejores profesionistas.

A PAPIT por el financiamiento parcial para el desarrollo de este trabajo, proyecto PAPIT-IN 223611.

Dedicatorias

A mamá Celia, porque lo más valioso que tengo en mi son sus enseñanzas, infinitas gracias, por hacerme ver que el esfuerzo, constancia y honradez son la base donde los sueños cristalizan, mi mayor motivación y ejemplo de vida, gracias por dejarme ser, entender mi ser complejo, y formarme como el ser humano que hoy soy.

A papá José, ya que sin saberlo, cultivo en mi esa curiosidad e interés por conocer sobre nuestro mundo, ahora sé que a pesar de los duros tropiezos siempre se puede comenzar de nuevo, sobre todas las cosas siempre sentí tu apoyo, gracias papá.

A mis hermanos, Araceli, Gustavo, Mauricio, por ser la mayor luz en mi camino, mi mayor fé, entusiasmo y esperanza, su risa mi mayor alegría, su bienestar mi mayor anhelo. Hermosa compañía que la vida me regalo y sobre todo hermosos seres humanos.

Mis queridos César y Marcela, agradecida con la vida estoy por la fortuna que me dio de conocerlos en mi paso por este mundo, hermoso es ver que a diario me regalan sus sonrisas. Gracias por compartir conmigo. Lo cierto es que aún en momentos de silencio sentía como su sola presencia me llenaba de tranquilidad, su compañía me dio alientos en momentos de debilidad, maravillosos seres de luz… gracias.

A Cari que fue como mi segunda mamá y Berenice una hermana más, siempre cuidando de mi, de mi desempeño, gracias por abrirme las puertas de su casa, por compartir su espacio y techo aún sin conocerme tanto, su nobleza, amabilidad y entereza las hacen ser de los mejores seres humanos que conozco. Nunca olvidare todo lo que hicieron por mí.

A las personas más humanas que conocí en la universidad, que siempre tuvieron un momento para mi, con quien siempre pude contar, con los que aprendí más allá de lo académico, me enseñaron el valor de la amistad, porque se convirtieron en más que compañeros, ahora no me queda más que agradecerles todo lo bueno que dejaron en mi, los quiero muchísimo, Carlos Paz, Carolina Pérez, Cruz Ginez, Oscar Vera, Sandra Nava, Paola Romero, Karina Sandoval.

A mis amigos del laboratorio 324, donde se desarrollo gran parte de mi vida académica, donde conocí a las personas más agradables, divertidas y amenas, la fortuna estuvo de mi lado desde el momento en que llegue, gracias por las enseñanzas, risas, regaños, comidas, y por lo agradable que fue todo, Ana, Anita, Bety, Bárbara, Marisol, Lila, Caro, Israel, Karina, Ricardo y como olvidar a David Hernández, quien me dio sus recomendaciones y asesorías para poder iniciar con este trabajo, mil gracias a todos, si de algo estoy segura es que nunca los olvidare.

A la gran banda 15, con ustedes que viví tantas experiencias, que hoy en día el sólo recordarlas me pinta una sonrisa en el rostro, donde quiera que ahora se encuentren gracias por todos esos maravillosos momentos.

A las amigas QA, que poco a poco fueron compartiendo conmigo y regalándome lo más bonito de ustedes, de las mejores etapas de mi vida las recordaré a su lado Susana, Mariana, Gema, Verónica.

Porque a ambos los conocí por circunstancias especiales, en momentos especiales y ha sido todo un placer y gusto para mí, ver como nuestra amistad crece cada día, son parte importante de mi presente, Ulises y Víctor, gracias por los hermosos momentos.

De manera sucinta les digo que toda la esencia, corazón, ilusiones y anhelos que hoy me conforman como ser humano, están construidos a base de todo el amor que me dan, seres de luz que han alumbrado mi camino, ustedes fueron y serán parte de esta historia aún inconclusa llamada vida.

Griselda Vázquez Aguilar

índice

1. Introducción……1

2. Antecedentes……...4

2.0. Cavidad oral……..4

2.1. Microorganismos presentes en la cavidad oral……5

2.1.1. Factores fisico-químicos que afectan el desarrollo de los microorganismos en la cavidad oral……..……..…6

2.1.2. Principales géneros de bacterias patógenas que afectan la salud de la cavidad oral……...……..8

2.1.3. Generalidades de *Streptococcus mutans*……..9

2.2. Enfermedades causadas por patógenos orales……11

2.2.1. Tratamiento contra enfermedades periodontales……15

2.3. Triterpenos……..……..……19

2.3.1. Fuentes de triterpenos de plantas mexicanas……21

2.3.2. Propiedades biológicas de los triterpenos……..……23

2.4. Uso de esteres de α- y β- amirina (triterpenos) como anticariogénicos…25

2.5. Modificación estructural de moléculas de triterpenos……..28

2.5.1. Introducción de grupo cinamiol y derivados de acetato y cinamato….29

2.5.2. Efecto de los grupos donadores de hidrógeno (HBD)……...35

2.5.3. Efecto del impedimento estérico de la molécula……39

3. Justificación……..41

4. Hipótesis……43

5. Objetivos……44

5.1. Generales……44
5.2. Particulares……..44

6. Materiales y métodos……..47

6.1. Materiales……47
6.1.1. Cepas utilizadas…….....47
6.1.2. Compuestos modificados estructuralmente y no modificados…....47

6.2. Métodos……48
6.2.1. Determinación de la pureza de las cepas de *Streptococcus*…….....49
6.2.2. Conservación de las cepas……49
6.2.3. Estandarización de las células viables a una cuenta de 10^6 UFC/mL……....49
6.2.4. Solubilizacion de los compuestos antimicrobianos……..……50
6.2.4.1. Formación de la emulsión con Tween ®80……50
6.2.5. Determinación de las concentraciones a evaluar con ácido betulínico……..51
6.2.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana, con la prueba de macrodilución, de los compuestos triterpenoides modificados y no modificados, a una concentración de 10^6 UFC/mL……..……...53

6.2.7. Prueba de difusión en agar……56
6.2.7.1. Ensayo para determinar la cantidad de inóculo a utilizar en la prueba de difusión en agar……..58
6.2.7.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los compuestos triterpenoides modificados y los no modificados, sobre las cepas de *Streptococcus*, mediante la prueba de difusión en agar……..60

7. Resultados y discusión……..60

7.1. Resultados……...60
7.1.1. Selección de cepas del género *Streptococcus*……..60
7.1.2. Estandarización del inóculo……...…62
7.1.3. Determinación de las concentraciones a evaluar en los compuestos control y modificados sobre las cepas de *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL……..…62
7.1.4. Efecto de los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α- amirina sobre las cepas de *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL……..64
7.1.4.1. Pruebas de macrodilución sobre los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α- amirina, sobre las cepas *S. mutans, S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración 10^6 UFC/mL……..65
7.1.4.2. Determinación de la cantidad de inóculo a utilizar, de las cepas de *Streptococcus* a una concentración de 10^6 UFC/mL, para la prueba de difusión en agar……..70
7.1.4.3. Pruebas de difusión en agar sobre los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α- amirina, sobre las cepas *S. mutans, S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración 10^6 UFC/mL……..72
7.1.5. Efecto de los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α- amirina y metil éster del ácido betulínico sobre *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL……..77

7.1.5.1. Pruebas de macrodilución de los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α- amirina y metil éster del ácido betulínico sobre *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL……79

7.1.5.2. Pruebas de difusión en agar sobre los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α- amirina y metil éster del ácido betulínico sobre *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL……86

8. Conclusiones……91

9. Perspectivas……..93

10. Anexos……96

Anexo A. Medios, reactivos y equipo ……94

Anexo B. Tinción de Gram……96

Anexo C. Tablas completas de cuentas microbianas……..97

Anexo D. Análisis estadístico……102

11. Bibliografía……..120

Índice de tablas

1. Factores que influyen en la distribución de la microbiota de la cavidad oral….5

2. Especies del género *Streptococcus*, aislados de humanos y presentes en la cavidad oral……9

3. Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido betulínico……..31

4. Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido oleanólico……32

5. Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido ursólico……33

6. Cepas utilizadas y procedencia de las mismas……47

7. Preparación de emulsiones……..51

8. Preparación de micromedios……52

9. Preparación de emulsiones de los compuestos a evaluar……..54

10. Preparación de micromedios con los compuestos a evaluar……...55

11. Características al microscopio de las cepas de *Streptococcus*……...61

12. Pruebas de crecimiento con cantidades diferentes de inóculo……71

13. Efecto de los compuestos control ácido betulínico y fenilacetato de α- amirina sobre las especies de *Streptococcus*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, para la prueba de difusión en agar……..73

14. Efecto de los compuestos cinamato de α- amirina y metil éster del ácido betulínico sobre las especies de *Streptococcus*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, para la prueba de difusión en agar……87

Índice de figuras

1. Representación del rango de pH para el crecimiento de una cierta especie oral bacteriana……..7

2. Representación esquemática de las diferentes etapas de la formación de la placa dental…….14

3. Síntesis de la molécula ácido betulínico con base de cinamato…….29

4. Síntesis de la molécula ácido oleanólico con base de cinamato…….29

5. Síntesis de la molécula ácido ursólico con base de cinamáto…….29

6. Diterpenos aislados de *Vigueria arenaria*, que no mostraron capacidad antimicrobiana contra bacterias del género *Bacillus, Staphylococcus* y *Streptococcus*, donde se puede observar los grupos HBD y su influencia en la capacidad antimicrobiana del compuesto……..36

7. Diterpenos aislados de *Vigueria arenaria*, que si mostraron capacidad antimicrobiana contra bacterias del género *Bacillus, Staphylococcus* y *Streptococcus*, donde se puede observar los grupos HBD y su influencia en la capacidad antimicrobiana del compuesto……..37

8. La estructura a, con el sustituyente cumaroil en posición *trans*, muestra un mayor efecto antimicrobiano, respecto a la molécula con el sustituyente cumaroil en posición *cis*…….39

9. Diagrama general de metodología general empleada…….50

10. Metodología empleada para buscar la posible actividad antimicrobiana de los compuestos triterpenoides sobre las cepas de *Streptococcus spp*, por medio del método de difusión en agar……..57

11. Efecto del ácido betulínico sobre la cepa *Streptococcus mutans*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, expresado en % de células viables……..63

12. Efecto del compuesto control ácido betulínico sobre especies de *Streptococcus spp*……..66

13. Efecto del compuesto control fenilacetato de α- amirina sobre especies de *Streptococcus spp*……..67

14. Efecto del compuesto control ácido betulínico sobre la cepa *S. mutans*…..74

15. Estructuras de los compuestos modificados, cinamáto de α-amirina y metil éster del ácido betulínico……..78

16. Efecto del compuesto modificado cinamato de α- amirina sobre especies de *Streptococcus spp*……..80

17. Efecto del compuesto modificado metil éster del ácido betulínico sobre especies de *Streptococcus spp*……81

18. Efecto del compuesto modificado cinamato de α- amirina sobre la cepa S. mutans. Prueba de difusión en agar……88

I. INTRODUCCIÓN

Algunos microorganismos del género *Streptococcus* como *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus, S. mutans, S. mitis, S. sangunis y* otras bacterias, como *Lactobacillus casei*, se encuentran poblando tejidos en los seres humanos como por ejemplo, la cavidad oral, dichos microorganismos ocasionan patologías dentales tales como placa, gingivitis y en general problemas periodontales u otros como la caries dental (Porto y cols., 2009). *Streptococcus mutans* ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries, porque su cuenta es relativamente alta en la placa dentobacteriana y en las lesiones ocasionadas por la caries (Deng y cols., 2007).

Las enfermedades periodontales y la caries dental son las dos patologías dentales más comunes que afectan a la humanidad (Marsh y Martin; 1992). Dichas enfermedades son un problema a nivel mundial, algunas como la caries están a punto de ser considerados epidemias (Porto y cols., 2009).

Además, la caries se concentra principalmente entre gente de bajo nivel socio económico, en grupos de México y de todo el mundo (Casanova-Rosado y cols., 2005; Segovia-Villanueva y cols., 2006). Por ejemplo; la caries dental ha sido reportada como la más común enfermedad crónica infantil en Estados Unidos, cinco veces más común que el asma y siete veces más común que la fiebre (US, DHHS. 2000).

Los patógenos orales pueden producir enfermedades sistémicas y son conocidos como agentes causantes de endocarditis, diversos estudios han revelado que las enfermedades periodontales, significan factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Meyer y Fives-Taylor; 1998).

El tratamiento dental usualmente es caro y poco accesible, especialmente en países subdesarrollados, entre algunos remedios utilizados está el uso de antisépticos de amonio cuaternario y antisépticos fenólicos (More y cols., 2008). La penicilina y otros antibióticos, también se han utilizado en el tratamiento de infecciones orales (Warnke y cols., 2008).

Dentro de los efectos secundarios comunes por el uso de dichos antisépticos esta la tinción de los dientes, cambio en el sabor de los alimentos o sensación de picor ó ardor en la punta de la lengua (More y cols., 2008). Otro aspecto a considerar es la resistencia a antibióticos que se va incrementando a una velocidad alarmante, a pesar de esto, el uso de antibióticos es muy común, sin embargo estos no tendrán la misma eficacia después de cierto tiempo, lo anterior es de interés considerable, especialmente en la investigación de nuevos compuestos antibacteriales (Wolska y cols., 2010).

Lo anterior es una situación de riesgo y por lo tanto es urgente su resolución, con el descubrimiento de nuevas drogas que puedan contrarrestar la resistencia de antibióticos (Heinemann y cols., 2001). Por lo que se ha propuesto el uso de sustancias de origen natural, ya que las plantas proveen de una fuente abundante de compuestos antimicrobianos y han sido utilizadas por siglos para inhibir el crecimiento microbiano (Johann y cols., 2007). Históricamente, han sido una rica fuente proveedora de agentes anti-infecciosos, que contribuyen a la salud humana (León y cols., 2009), tal es el caso de los triterpenos pentacíclicos (Wolska y cols., 2010).

Los compuestos triterpenoides derivados de plantas, en general son conocidos porque poseen un amplio espectro de actividad farmacológica, incluyendo anti inflamatorio. Un ejemplo de estos compuestos son α- y β-amirinas (Oliveira y cols., 2005). La modificación estructural de productos naturales es una estrategia potencial para el desarrollo de nuevas drogas las cuales serían diferentes de las usadas comúnmente. En este contexto, los derivados de triterpenos son de particular interés (Tanachatchairatana y cols., 2008).

Un gran avance durante los últimos años fue la síntesis de derivados provenientes de triterpenos como α – y β-amirina (Liu y cols., 2005). La modificación producida por la introducción de grupos sustitutos puede llegar a modificar propiedades fisicoquímicas de la molécula, como hidrofobicidad, densidad electrónica, de manera que, a través de este camino se podrían encontrar análogos más efectivos, selectivos y menos tóxicos (Johann y cols., 2007).

Con base en lo anterior, se planteó la evaluación de dos compuestos triterpenoides modificados vía enzimática, el cinamato de α-amirina y el metil éster del ácido betulínico, tomando como control dos moléculas no modificadas, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina, cuya obtención fue de las plantas *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, con el objetivo de observar las posibles ventajas en la capacidad antimicrobiana de los compuestos modificados, en comparación con los no modificados, frente a cepas patógenas de la cavidad oral, causantes de enfermedades periodontales, entre ellas, la caries.

II. ANTECEDENTES

2.0. Cavidad oral

La boca es una parte del cuerpo fácilmente accesible, y enfermedades localizadas en otra parte del cuerpo pueden ser reflejadas en la boca. Los factores de riesgo para la salud general, tal como habito de tabaco, abuso de alcohol y una dieta inadecuada, pueden también tener un efecto nocivo para la salud oral.

La boca es una de las claves que relaciona el cuerpo y el ambiente exterior, y puede actuar como sitio de entrada para algunos patógenos microbianos, especialmente del aire o mediante la ingesta por la dieta (Philip y cols., 2010).

Las bacterias con el potencial para causar enfermedades se llaman patógenos oportunistas, y muchos microorganismos locales tienen la capacidad de comportarse de esta manera. De hecho, la mayoría de los individuos sufren en ciertas épocas de su vida de episodios localizadas de enfermedad en la boca causadas por desequilibrios en la composición de su microbiota oral residente. Las manifestaciones clínicas más comunes de tales desequilibrios son la caries dental y las enfermedades periodontales.

Las características de la boca la hacen ecológicamente distinta del resto de las otras superficies del cuerpo e impone los tipos de microbios capaces de persistir, de modo que no todos los microorganismos que entran en la boca son capaces de colonizar.

Por otra parte, distintos hábitats existen incluso dentro de la boca. Los hábitats que proporcionan condiciones ecológicas diferentes incluyen las superficies mucosas y los dientes. Las fluctuaciones transitorias en la estabilidad del ecosistema oral pueden ser inducidas por la frecuencia y tipo de alimento ingerido, así como la ingesta de ciertos medicamentos (Philip y cols., 2010).

2.1. Microorganismos presentes en la cavidad oral

La microbiota oral está constituida por microorganismos que suelen estar presentes en la saliva y en las superficies de la cavidad oral. En las personas sanas la microbiota normal consta de especies aerobias, como cocos Gram-positivos (principalmente *Streptococcus*), bacterias anaerobias y especies de *Candida*. Habitualmente estos microorganismos no causan ningún daño, excepto cuando se permite su excesiva acumulación, formando la placa dental o cuando se desplazan desde la boca a tejidos más profundos como a la pulpa dental o a otras zonas del organismo, por ejemplo la corriente sanguínea.

La microbiota de la cavidad oral es compleja, hasta el 2001 se conocían 500 especies, actualmente se calcula que serían unas 700 las que habitan (Negroni 2009). Los primeros y más numerosos microorganismos en instalarse son los estreptococos *(Streptococcus* del grupo *salivarius*) en la lengua, las mucosas y otros microorganismos presentes en la saliva (Negroni 2009). La microbiota presente al completarse la dentición primaria y más tarde la dentición permanente conforma la comunidad microbiana total. La calidad y la cantidad de microorganismos que componen la comunidad clímax varían durante la vida de los individuos de acuerdo con los factores que influyen en su distribución, promoviendo o limitando su desarrollo (Tabla 1).

Tabla 1.- Factores que influyen en la distribución de la microbiota de la cavidad bucal.

Causas que promueven el desarrollo microbiano	**Causas que limitan el desarrollo microbiano**
Temperatura	Disponibilidad limitada de nutrientes
Humedad	Factores antimicrobianos salivales
Potencial redox	Aumento de pH
Disminución de pH	Exfoliación de células epiteliales

2.1.1. Factores físico-químicos que afectan el desarrollo de los microorganismos en la cavidad oral.

- Temperatura

La temperatura de la cavidad bucal es más baja que la temperatura normal del cuerpo (oscila entre 35 y 36°C). Esta temperatura resulta óptima para el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos. Los lugares de la boca con enfermedades activas (inflamación) tienen una temperatura más alta (más de 39°C), comparado con los sitios sanos. Incluso tales aumentos relativamente pequeños de la temperatura pueden alterar significativamente la expresión de genes bacterianos, y posiblemente la competitividad de la especie individual (Philip y cols., 2010). Los factores que pueden ser influidos por la temperatura incluyen pH, actividad iónica, solubilidad de los gases y agregación de macromoléculas.

- Potencial óxido – reducción

La cavidad bucal es rica en oxígeno y puede ser colonizada por una variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y aun anaerobios, si no hubiera presencia de oxígeno. Además hay algunas especies capnofílicas (requieren CO_2) y microaerofílicas (que requieren concentraciones bajas de oxígeno para su crecimiento). La anaerobiosis se describe con frecuencia en términos rígidos, y los microorganismos orales son separados en aerobios y anaerobios, según su capacidad de crecer en la presencia o la ausencia de oxígeno. Sin embargo, una amplia gama de tolerancia de oxígeno existe entre estos organismos (Philip y cols., 2010).

Los niveles de óxido reducción suelen estar expresados como potencial redox (Eh). En la cavidad bucal y especialmente en la biopelícula dental hay diversos gradientes de concentración de oxígeno. Los microorganismos con gran capacidad de tolerancia al oxígeno pueden sobrevivir en la biopelícula durante más tiempo.

- Concentración de iones hidrógeno (pH)

La mayoría de los microorganismos presentes en la cavidad bucal requieren un pH cercano a la neutralidad, y son sensibles a los extremos ácidos o alcalinos (Philip y cols., 2010). El pH está regulado por la saliva, el pH salival normal oscila entre 6.5 y 7. Los niveles de acidez de la placa dental pueden diferir notablemente y dependen de la cantidad de ácido producido por los microorganismos presentes en cada sector de la placa. Los cambios en las proporciones de las bacterias dentro de la placa dental pueden ocurrir después de las fluctuaciones en el pH ambiental. Después del consumo de azúcar, el pH en la placa puede bajar rápidamente por debajo de 5, por la producción de ácidos (principalmente ácido láctico) por el metabolismo bacteriano (Philip y cols., 2010).

Muchas de las bacterias predominantes de la placa que se asocian a los sitios sanos pueden tolerar breves condiciones de pH bajo, pero son inhibidas por exposiciones más frecuentes o prolongadas a las condiciones ácidas. Esto puede dar lugar al crecimiento incrementado o colonización por especies acidúricas, tolerantes al ácido, especialmente *Streptococcus mutans* y las especies de *Lactobacillus* (Figura 1) (Aframian y cols., 2006).

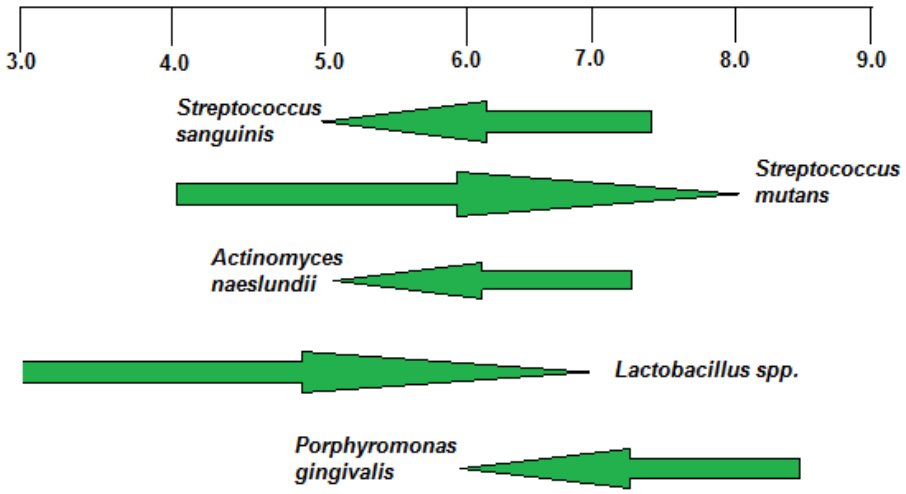


Figura 1.- Representación del rango de pH para el crecimiento de un cierto género en la cavidad oral (Aframian y cols., 2006).

2.1.2. Principales géneros de bacterias patógenas que afectan la salud de la cavidad oral.

La microbiota oral es muy compleja, con aproximadamente 30 géneros de bacterias, sin embargo no todas las personas presentan estos géneros. Cada género puede estar representado por varias especies, lo que supone un grupo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas extremadamente complejo (Miller y John 2000). La diversidad de microorganismos que ha sido detectada en la cavidad oral es más grande que en otras partes del cuerpo humano (Kolenbrander y cols., 2009).

Entre los géneros bacterianos Gram-positivos más importantes localizados en la cavidad oral, están los *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*. Mientras que entre los grupos bacterianos Gram- negativos están, *Bacteroides*, *Porphyromonas* y *Prevotella* (Miller y John, 2000).

Esta diversidad se debe al hecho que la boca está compuesta de diversos hábitats, abastecidos con diferentes nutrientes. En las biopelículas, tal como la placa dental, los gradientes se desarrollan respecto a parámetros tales como, tensión de oxígeno y pH, suministrando condiciones convenientes para el crecimiento y la supervivencia de microorganismos. La placa también funciona como una comunidad microbiana verdadera y numerosos ejemplos de interacciones metabólicas sinérgicas se han descrito (Philip y cols., 2010).

La población dentro de una comunidad microbiana es dependiente exclusivamente, en el hábitat de los nutrientes esenciales para su crecimiento. Por lo tanto, la asociación de un organismo con un hábitat particular es la evidencia de que todos los nutrientes necesarios están presentes. La persistencia y la diversidad de la microbiota oral residente es debida sobre todo al metabolismo de los nutrientes endógenos proporcionados por el huésped, en vez de factores exógenos por la dieta. La fuente principal de los nutrientes endógenos es la saliva, la cual contiene aminoácidos, péptidos, proteínas y glicoproteínas, vitaminas y gases (Devine y cols., 2003).

2.1.3. Generalidades de *Streptococcus mutans*.

Los estreptococos, han sido aislados de todos los sitios de la boca y abarcan una gran proporción de la microbiota oral cultivable residente (Tabla 2). La mayoría es alfa hemolítico (hemolisis parcial) en agar sangre (Philip y cols., 2009).

Tabla 2.- Especies del género *Streptococcus* aisladas de humanos y presentes en la cavidad oral (Sakamoto y cols., 2005).

Grupos de estreptococos	**Bacterias**	**Serotipos**
mutans	*S. mutans* *S. sobrinus* *S. criceti* *S. ratti*	Serotipos c, e, f, k Serotipos d, g Serotipos a Serotipos b
salivarius	*S. salivarius* *S. vestibularis*	
anginosus	*S. constelatus* *S. intermedius* *S. anginosus*	
mitis	*S. sanguinis* *S. gordoni* *S. oralis* *S. mitis* *S. infantis*	

Algunos estreptococos son capaces de producir ácidos (acidogénesis), crecen en ambientes con un pH ácido (acidofília), producen ácido a valores bajos pH (capacidad acidúrica) y sintetizan polisacáridos intra y extra celulares (Carlsson y cols., 1986). Debido a estas propiedades que no son compartidas por todos los estreptococos orales, el potencial cariogénico varía entre las especies (Liébana y cols., 1985). 2005).

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 la especie endógena en la boca a distintas edades es fundamental.

En un estudio realizado en 20 diferentes escuelas de niños entre 6 y 7 años de edad, se obtuvo que *S. mutans* fue identificado en 19 de 20 muestras de saliva, en 20 de 20 muestras tomadas de la superficie de la placa dental y en 13 de 20 de las muestras tomadas en las fisuras dentales (Baca y cols., 2008).

Streptococcus mutans, es una de las especies bacterianas encontradas con mayor frecuencia en humanos, siendo las cepas de serotipo c las más frecuentemente aisladas, seguidas por la d y la e. *S. mutans* es conocida como una de las principales causas en la formación de la placa dental y de la caries (Abdus Salam y cols., 2004).

Tanto *S. mutans* como *S. sobrinus* (bacteria que también es perteneciente al grupo de mutans), son capaces de producir enzimas llamadas glucosiltransferasas cuya función es romper los enlaces de sacarosa. Respecto a la actividad de la glucosiltransferasa (GTFasa), esta sintetiza glucanos insolubles en agua, cuya función es servir de matriz para que se unan otras bacterias (Yu Hyeon – Hee y cols., 2007). *S. mutans* es bien conocido por sus propiedades acidogénicas y acidúricas, más que otras bacterias orales (Takahashi y Nyvad, 2011).

La habilidad de *S. mutans* para adherirse y acumularse en la superficie del diente, por la síntesis de polisacárido extracelular, junto con la sacarosa, le confieren las propiedades acidogénicas y acidúricas, que son claves en los factores de virulencia, que involucran el desarrollo de la placa dental y de la caries (Yatsuda y cols., 2005). La adherencia específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos adherentes e insolubles juega un papel importante en el desarrollo de la placa dental.

2.2. Enfermedades causadas por patógenos orales.

La mayoría de las patologías ocasionadas por bacterias de la cavidad oral son la caries y la periodontitis (Kolenbrander y cols., 2009). Es bien sabido que estas enfermedades, son las 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).

Acerca de los países considerados en vías de desarrollo, se ha sugerido que presentan un dramático incremento en los índices de la caries, lo cual según algunos autores, se asocia al aumento del consumo de azúcar (Rivera y cols., 2006; Velásquez y cols., 2003).

Estas patologías son causadas por la placa, bacterias y levaduras, las cuales residen en la cavidad oral (More y cols., 2008). Las enfermedades periodontales son mayormente asociadas con *Actinomyces*, *Actinobacillus*, *Streptococcus* y especies de *Candida* (More y cols., 2008). *Candida albicans* es no cariogénico, pero es un microorganismo patógeno que ocasiona abscesos orales. Además es común que esta levadura colonice las lesiones cariosas en niños y adultos, también tiene la habilidad de formar ácido a partir de la fermentación de azúcares como la sacarosa (Shen y cols., 2005).

Los microorganismos orales que son conocidos por ser patógenos y dañinos para los dientes, son los que decaen en gingivitis, periodontitis y que causan la pérdida de los mismos (Samaranayake y cols., 2000).

La caries dental es una patología bacteriana oral muy común, provocada por una placa constituida por microorganismos presentes en la superficie dental y que involucra un desbalance en las interacciones entre la superficie del diente y la microbiota adyacente. Entre los microorganismos responsables de la caries dental se encuentran: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans, S. mitis, S. sanguinis* y *Lactobacillus casei* (Porto y cols., 2009; Pitts y cols., 2004).

La ocurrencia de la caries dental es principalmente asociada con patógenos orales, especialmente cariogénicos como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* que han sido aislados de la placa dental y son conocidos como bacterias cariogénicas (Chung y cols., 2006).

Streptococcus mutans es conocida como una de las principales bacterias que causa la formación de placa y caries dental. El primer paso de la caries dental es la adhesión y la colonización de *S. mutans* en la superficie del diente (Yu – Hee y cols., 2007). Está en una bacteria que ha sido relacionada como el principal agente etiológico de la caries, porque el número de esta es relativamente alto en la placa, antes de la aparición de las lesiones causadas por la caries, y puede inducir la tolerancia a pH bajo en el medio ambiente (Deng y cols., 2007).

S. mutans es bien conocido que metaboliza los carbohidratos contenidos en los alimentos y la posterior liberación de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico, propiónico, fórmico y butírico (Kohler y cols., 1995), los cuales desmineralizan la superficie del diente y resulta en la caries dental (Yu – Hee y cols., 2007). Sólo una pequeña parte de la sacarosa es utilizada para la formación de polisacáridos extra e intracelulares, la mayor parte se utiliza como fuente energética para el crecimiento bacteriano.

La ingestión frecuente de azúcar, contenida en alimentos, se ha encontrado que está relacionado con el desarrollo de la caries (Gudkina y Brinkmane., 2010). En este contexto, la sacarosa es considerada el azúcar más cariogénico, en comparación con otros azúcares fermentables. Se ha reportado que la restricción de sacarosa de algunos alimentos, resulta en la reducción de caries dental (Moynihan y cols., 2005).

Streptococcus sanguinis indirectamente afecta el proceso de la caries a través de la competencia con *Streptococcus mutans* para habitar los nichos orales existentes, durante la formación de la placa dental, a diferencia de S. *mutans* que frecuentemente es asociado con la caries dental, S. *sanguinis* se cree, tiene un bajo potencial cariogénico, sin embargo esta ha sido implicada en casos de endocarditis bacteriana sub-aguda y reporta resistencia a fármacos (Yim y cols., 2010).

El costo social de la caries dental en niños de preescolar y primara es considerable, numerosos autores, han indicado que la caries es un problema de salud pública, de elevada incidencia y prevalencia. Además esta se concentra principalmente entre personas de bajo nivel socio económico, en grupos de México y del mundo (Petersen y cols., 2005; Segovia- Villanueva y cols., 2006).

Por ejemplo; la caries dental ha sido reportada como la enfermedad crónica infantil más común en Estados Unidos, cinco veces más común que el asma y siete veces más común que la fiebre (US, DHHS. 2000).

Estudios han confirmado que tener caries en la dentición primaria, es un predictor de que habrá caries en la dentición permanente (Vanderas y cols., 2004). Sin embargo, esta tendencia no ha sido confirmada en niños de la población mexicana (Sánchez-Pérez., 1998; Irigoyen- Camacho y cols., 2001).

En un estudio realizado por Vallejo – Sánchez (2005), en el que se estudió a la población menor de 15 años, con problemas aparentes de caries en la dentición permanente, se pudo observar un incremento en la caries del año de 1999 a 2001. Sin embargo se observó que la caries dental afectaba principalmente a la dentición primaria en niños de alrededor de 9 años, la prevalencia de caries en la dentición permanente fue del 14.2%, mientras que en la dentición primaria fue del 49.2% (Vallejo- Sánchez y cols., 2006).

La caries dental es considerada una enfermedad eludible. La prevención requiere disminuir la frecuencia con la que se ingieren bebidas y alimentos con una alta cantidad de carbohidratos, regular la higiene bucal, así como la remoción mecánica de la placa dental (Yim y cols., 2010). La placa dental juega un papel muy importante en el desarrollo de la caries dental, que resulta en la disfunción del diente y la pérdida (Chung y cols., 2006). La placa dental es formada principalmente en dos etapas, la inicial y el apego reversible de varias bacterias orales a la superficie del diente, siguiendo la actividad de la glucosiltransferasa que sintetiza una capa insoluble de glucano y forma una adhesión irreversible con *Streptococcus mutans*. La formación de placa se esquematiza en la figura 2.

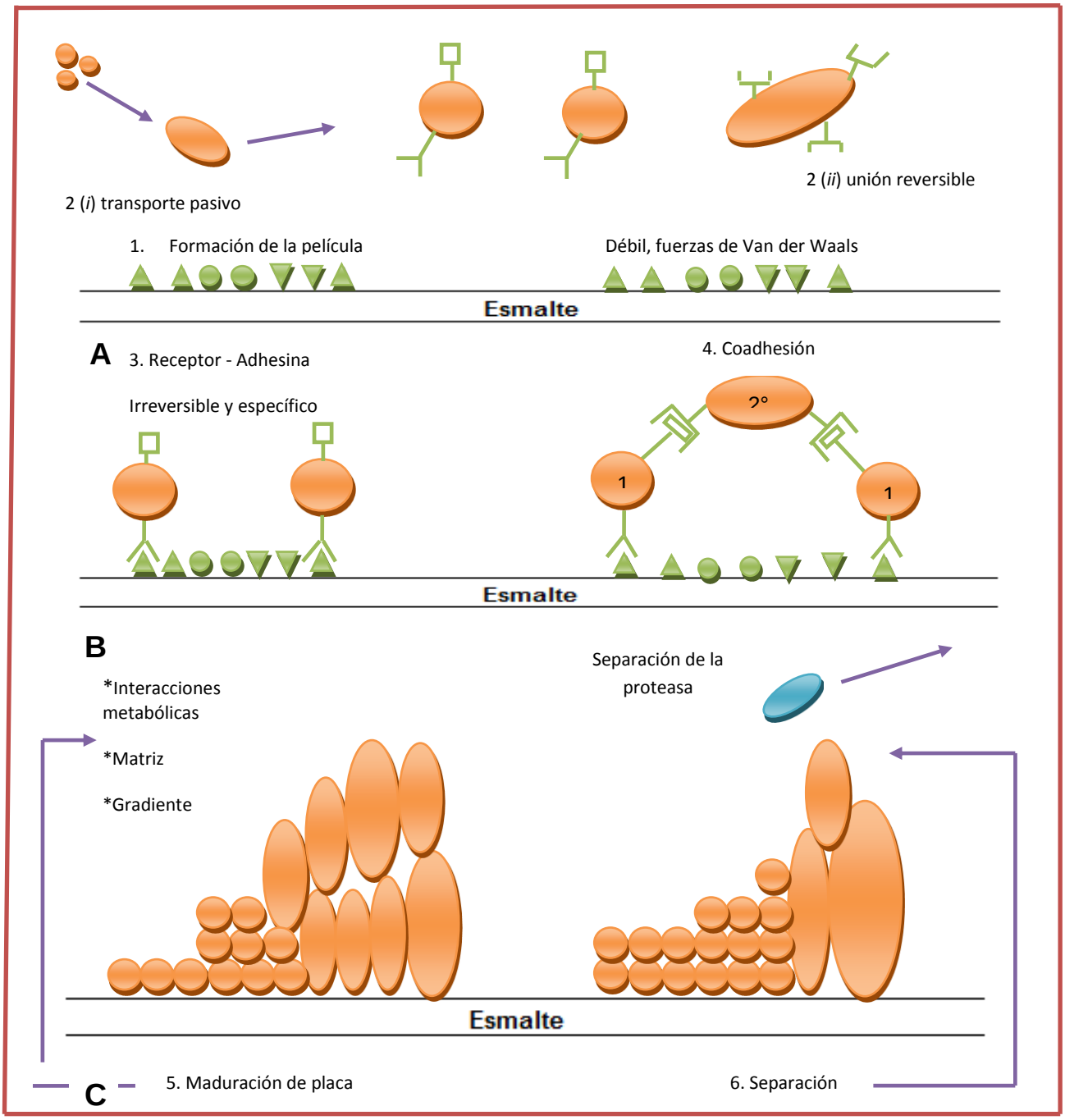


Figura 2.- Representación esquemática de las diferentes etapas de la formación de la placa dental; (A) 1. Formación de la película en una superficie limpia de un diente. 2(*i*) Las bacterias transportadas parcialmente a la superficie del diente donde ellas 2(*ii*) pueden ser sostenidas reversiblemente por fuerzas electrostáticas débiles de atracción. (B) 3. La unión llega a ser irreversible por interacciones moleculares específicas, entre las adhesinas en la bacteria y los receptores en la película adquirida y 4. Colonizadores secundarios, se unen a los colonizadores primarios. (c) 5. El crecimiento bacteriano resulta en la maduración de la placa, facilitando las interacciones interbacteriales. 6. Eventualmente la separación puede ocurrir, a veces como resultado de la degradación por las bacterias presentes en las adhesinas (Philip y cols., 2010).

Entre los microorganismos que forman ácidos, se encuentra *Lactobacillus spp*. Durante la formación de la placa es metabolizada la fructosa, que es utilizada como fuente de carbono, lo que produce ácido láctico (que desmineraliza la superficie del diente) y esto ocasiona la caries (Chung y cols., 2006).

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 a la boca. En teoría, la placa es la más adecuada para estimar las infecciones ocasionadas por *S. mutans* en individuos, porque esta bacteria habitualmente está presente en la superficie del diente (Seki y cols., 2003).

Otra de las patologías orales más comunes es la periodontitis que es un desorden inflamatorio destructivo, asociado con la acumulación de placa que puede iniciar como una reacción de inflamación local y a largo plazo la placa que persiste, induce una inflamación crónica en los tejidos periodontales e incluso perdida del diente (Pinto y cols., 2007).

La interacción entre estreptococos orales y la película de saliva juega un papel importante en la temprana colonización, agregación y formación de biopelícula. *Streptococcus gordonii* coloniza la cavidad oral en etapas tempranas de la vida e interacciona con otras especies, tales como *Porphyromonas gingivalis*, patógeno periodontal, lo que forma la biopelícula predominante en la superficie de los dientes (Okuda y cols., 2010).

Las enfermedades periodontales tienen una alta prevalencia y pueden afectar más del 90% de la población mundial. La prevención y el tratamiento, tienen por objeto controlar la placa bacteriana, inflamación y pérdida de dientes (Pinto y cols., 2007).

2.2.1. Tratamiento contra enfermedades periodontales.

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 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 30 segundos diariamente. Esta cantidad de tiempo resulta un cepillado cosmético, el cual deja durante corto tiempo una sensación agradable de limpieza (Cárdenas y cols., 2003).

Los tratamientos dentales usualmente son caros y poco accesibles especialmente en países subdesarrollados, entre algunos remedios utilizados está el uso de antisépticos de amonio cuaternario y antisépticos fenólicos. Existen diversos efectos secundarios comunes por el uso de estos remedios tales como la tinción de los dientes, cambio en el sabor de los alimentos o sensación de picor o ardor en la punta de la lengua (More y cols., 2008). 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).

Los enjuagues bucales han sido utilizados e investigados para evitar la formación de placa dental, pero la caries sigue siendo una causa importante de la perdida de dientes (Pan y cols., 1999). Se han llevado a cabo esfuerzos para la búsqueda de compuestos anticariogénicos que puedan ser incorporados a productos dentales (Ambrosio y cols., 2008) cuya finalidad es completar 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). Muchos intentos se han llevado a cabo para eliminar a S. *mutans*.

Antibióticos como ampicilina, tetraciclina, clorhexidina, eritromicina, penicilina y vancomicina han sido muy efectivos en la prevención de la caries dental, sin embargo el uso excesivo de estos químicos puede causar efectos secundarios indeseables como vómito y diarrea (Chung y cols., 2006).

Además, la aplicación de antibióticos en el tratamiento contra la caries dental, sería perjudicial para el paciente y podría promover el desarrollo de multirresistencia a fármacos (Yim y cols., 2010).

En la prevención de las enfermedades se ha planteado el control microbiológico, higiene bucodental, ingestión y aplicación de fluoruros, aplicación de fármacos y uso de sellantes en fisuras (Herazo y cols., 1993). Se puede aplicar el control microbiológico, mediante la inoculación de ciertos microorganismos que actúen sobre otras especies microbianas que estén produciendo enfermedades, consiste en prevenir una enfermedad de carácter infeccioso por medio de la sustitución del microorganismo causante de la enfermedad, por otro microorganismo de características similares, pero con la diferencia de ser inocuo para el huésped, al que se le está haciendo la prevención, y sin modificar el ecosistema que reside.

Actualmente, con el avance de la ingeniería genética y la biología molecular, es posible manipular muchos de los microorganismos existentes, para que actúen en el control microbiológico. En los programas de salud bucal, con el fin de evitar o reducir enfermedades como la caries dental, se podrían inocular microorganismos en boca, que controlen, desplacen o eliminen a *S. mutans*, sin generar problemas colaterales o sistémicos (Herazo y cols., 2000).

Sin embargo, en la aplicación del control microbiológico sobre *S. mutans*, es importante tener en cuenta, aspectos ecológicos orales y los eventos susceptibles de intervenir en la formación de la caries (Basson y cols., 2000; Hillman y cols., 2000).

Por otro lado, se han propuesto sustitutos de la sacarosa, y así remplazarla en la dieta diaria por otros endulzantes, que sean azúcares no metabolizados por microorganismos orales, con la finalidad de prevenir la desmineralización del diente. Los sustitutos de la sacarosa y otros azúcares fermentables, juegan un importante rol en el cuidado de la salud dental y el desarrollo del proceso de la caries.

Algunos como los polioles, fueron clasificados como azúcares no fermentables, los más comunes son el xilitol y el sorbitol, que han sido usados ampliamente como sustitutos de azúcar y usados como cuidado de la salud oral (Thaweboon y cols., 20011).

Estudios previos han demostrado que el xilitol, posee propiedades anticariogénicas, inhibiendo el crecimiento de *Streptococcus mutans*, e interfiriendo con la fermentación de azúcares por parte de los microorganismos orales (Miyasawa – Hori y cols., 2006). De los microorganismos presentes con mayor incidencia en la placa dental, ninguno de estos utiliza al sorbitol como fuente de energía. *S. mutans* y otras especies de *Lactobacillus*, fermentan el sorbitol en muy baja proporción (Haukioja y cols., 2008).

Sin embargo los edulcorantes sólo pueden ser utilizados en ciertas dosis y el uso de estos no puede ser considerado como un tratamiento dental. Además en niños, adultos mayores y personas con enfermedades hepáticas o renales no tienen la misma capacidad de absorción y metabolismo, como lo tienen los adultos sanos (Renwick y Nordmann 2007). Además se ha reportado que *S. mutans* produce glucanos insolubles en agua y glucosiltranferasas, independientemente de la presencia o ausencia de sacarosa en el medio de crecimiento (Fukushima y cols., 1995; Hamada y cols., 1989).

Este problema necesita de una búsqueda de agentes antibacteriales de origen natural, que sean seguros para los seres humanos y específicos para patógenos orales (Chung y cols., 2006). Reportes previos han mostrado que algunos productos naturales son candidatos a usarse como sustancias anticariogénicas, estos productos han sido usados en tratamiento contra dolor de dientes, caries y enfermedades periodontales (Hee-Yu y cols., 2007).

2.3. Triterpenos

Los triterpenos se encuentran muy distribuidos en el reino vegetal, particularmente en resinas y corcho de las plantas. Los triterpenos son compuestos cuyo esqueleto de carbono corresponde a seis unidades de isopreno (30 átomos de carbono) y biosintéticamente derivan del escualeno.

Los triterpenos pueden ser clasificados en acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos, dentro de estas familias se encuentran subclasificados por grupos (α-amirina, β-amirina, lupeol, etc) (Instituto de Química. UNAM., 2006). Las estructuras son bastante complejas y dentro de ellas puede haber estructuras de alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos.

El único triterpeno acíclico importante es el escualeno. Los triterpenos más importantes y ampliamente distribuidos son los pentacíclicos, que se han encontrado en las semillas tanto en forma de glucósidos (unidos a azúcares) como en forma libre; ejemplos de estos son la α- , β-amirina y sus derivados, así como los ácidos ursólico y oleanólico.

Ciertos triterpenos son notables por su sabor amargo; la limonina, principio amargo de los frutos de *Citrus* es un ejemplo; pertenece a la serie de triterpenos pentacíclicos amargos conocidos como limonoides y quasinoides. Se conocen cuatro esqueletos de anillos básicos en estos compuestos, son ursano, lupano, oleanano y friedelano.

Todos los miembros conocidos de estos grupos, están oxigenados en la posición tres, generalmente como alcoholes y algunos como cetonas. Se diferencian unos de otros por las insaturaciones y los grupos hidroxilo y carbonilo adicionados. Las diferencias estereoquímicas también juegan un papel importante. Las estructuras de tipo β-amirina, son las más comunes y están tanto en las plantas inferiores como en las superiores (Valencia, 1995).

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 (aisladas 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 del hueso.

Otros ejemplos de triterpenos son el ácido oleanólico y el ácido ursólico, estos son triterpenos pentacíclicos, se trata de ácidos basados en una estructura de isopreno que contienen 30 átomos de carbono y oxígeno (Connolly y cols., 2008). Mezclas de extractos herbales son comúnmente usados en la medicina tradicional y su potencial clínico está bien establecido. Varias de estas mezclas contienen ácido ursólico y oleanólico o sus derivados (Li y cols., 2003).

Johann y cols., (2007), evaluaron 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 microbianos 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).

Saeed y Sabir (2001) aislaron compuestos triterpenoides de las semilla 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.

De acuerdo con Ríos y Recio (2005), la obtención de una concentración mínima inhibitoria (CMI) por encima de 1 mg/mL para extractos de plantas y 0.1 mg/mL para metabolitos puros, muestra que los extractos o metabolitos probados son pobres en actividad, por otro lado, la actividad de extractos y compuestos aislados en concentraciones menores a 100 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente, son considerados interesantes y prometedores en la búsqueda de nuevos agentes anti infecciosos.

2.3.1. Fuentes de triterpenos de plantas mexicanas

Se han aislado triterpenos de siete especies correspondientes a los géneros *Lemaireocereus*, *Trichocereus*, *Escontria* (cactácea), así como el de dos *Byrsonimas* (Malpighiaceae), y una *Luffa* (Cucurbitaceae). El estudio fitoquímico de *B. crassifolia* y *B. spicata* (Oaxaca, México), plantas empleadas por la población durante el parto, permitió obtener la β-amirina en grandes cantidades (Instituto de Química. UNAM., 2006).

La búsqueda de triterpenos de *Luffa operculata*, cuyos frutos se emplean para preparar una solución jabonosa por los nativos del norte del Perú, permitió aislar el triterpeno gypsogenina. Este triterpeno mostro como particularidad tener oxidada la posición 24, situación poco encontrada en los triterpenos hasta entonces aislados.

De *L. treleasei* se aislaron los triterpenos ácido oleanólico y estelatogenina. En el último ejemplar estudiado de este género *L. quevedonis*, se encontraron los triterpenos ácido oleanólico y ácido betulínico. El estudio de *Euphorbia hirta* var. *procumbens*, mejor conocida como “hierba de la golondrina” mostro por primera vez en una planta de la coexistencia de la fridelina, producto que se encuentra en equilibrio ceto- enólico y de la β-amirina.

También se estudió *Pedilanthus calcaratus* y *Pedilanthus tehuacanus* de donde se aisló como único triterpeno la friedelina. De un estudio reciente se lograron aislar además de la argentanina A, argentanina B, tres triterpenos más: argentanina (D), *iso*-argentanina B e incanilina. Los triterpenos *iso*-argentanina B e incanilina fueron identificados mediante comparación con estándares y datos descritos en la literatura.

Del extracto clorofórmico de *Salvia mexicana* (Labiatae) se aisló junto con el alcohol betulínico, una nueva lactona triterpénica denominada salviólida. Esta lactona mostró ser parte de la serie del ácido oleanólico, siendo un isómero estructural de este.

Dos nuevos triterpenos fueron aislados de *Salvia nicolsoniana* (Labiatae), originaria de la sierra madre del sur (Guerrero), además del ácido ursólico, 3-*epi*-ursólico, oleanólico y betulínico. El primer compuesto nuevo fue el ácido 3α,24-dihidroxiolean-12-en-28-oico y tuvo una composición $C_{30}H_{48}O_4$. El segundo triterpeno nuevo que se aisló, presento un análisis elemental $C_{30}H_{46}O_6$ (Instituto de Química. UNAM., 2006).

En la medicina tradicional mexicana se ha usado la corteza del cuachachalate (*Amphyptherygium adstringens*, Julianiaceae) para el tratamiento de cálculos biliares, fiebres, hipocolesterolemia, gastritis, úlcera y cánceres de tracto gastrointestinal. Estudios previos habían demostrado la presencia de triterpenos tetracíclicos con esqueleto de tirucallano como los ácidos instipolinácico, cuachalálico y masticadienónico. Un nuevo estudio de esta planta permitió corroborar esta información e identificar además de los ácidos previamente descritos en la literatura, 3-β-hidroximasticadienónico, 3-α-hidroximasticadienónico, *iso*-masticadienónico y 3-*epi*-oleanólico (Instituto de Química. UNAM., 2006).

La salvia blanca (*Hyptis albida*, Labiatae), planta originaria de la cuenca del Río Balsas (Michoacán), es empleada en la medicina tradicional para tratar trastornos gastrointestinales y se emplea como condimento en la cocina del estado. El estudio del extracto cetónico de esta planta dio como resultado el aislamiento de los ácidos oleanólico, ursólico, betulínico, acetil–oleanólico y de tres lactonas triterpénicas ya conocidas: 3β-hidroxi-olean-28,13β-ólida, 11,12α-epoxi-3β-hidroxi-olean-28, además de otro compuesto novedoso en ese momento, 3β-hidroxi-olean-11-en-28,13β-ólida. Todos los compuestos descritos fueron identificados por comparación de sus datos espectroscópicos o bien por comparación con un estándar.

Las plantas de la familia *Lamiaceae* son una fuente abundante de triterpenos pentacíclicos análogos a la β-amirina principalmente. (Instituto de Química. UNAM., 2006).

2.3.2. Propiedades biológicas de los triterpenos

Pocos son los estudios concernientes a las propiedades biológicas de los triterpenos. Es conocida la ligera actividad antiinflamatoria de los ácidos ursólico y oleanólico. La argentanina A fue moderadamente activa como antimicrobiano frente a *Candida albicans*, *Turolopsis glabrata*, *Hansenulla sp*., *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En particular, con los dos últimos microorganismos mencionados, fue más efectiva que el compuesto estándar fluconazol.

Combinaciones de los triterpenoides aislados producen mayor inhibición de la inflamación que los compuestos aislados. Debido a que algunos triterpenos son parecidos a las moléculas esteroidales, se estudió el grado de unión de argentanina A, argentanina B, y argentanina D, moléculas parecidas a los triterpenos. Se realizo este estudio pues de acuerdo a diversas evaluaciones, los esteroides muestran actividad antimicrobiana (Rathee y cols., 2012).

Es bien conocido que plantas de uso tradicional, como algunas utilizadas en Brasil, entre ellas *Mikania* (Familia de la Astereaceae) conocida popularmente como “guaco” (Celeghini y cols., 2001). Esta planta posee múltiples actividades farmacológicas, especialmente anti inflamatorias, anti alérgicos y analgésicos (Yatsuda y cols., 2005). En Brasil, esta planta es ampliamente distribuida, con aproximadamente 200 especies (Barroso y cols., 1986).

Compuestos triterpenoides como el ácido oleanólico y ursólico, pueden ser aislados de varias plantas con propiedades medicinales, y está documentado que poseen propiedades antivirales, antiinflamatorias y antibacterianas particularmente contra Gram-positivas (Wolska y cols., 2010). Entre las diversas actividades del ácido ursólico y oleanólico son las antiinflamatorias (Li y cols., 2003), controlar úlceras (Nishino y cols., 1998), hepatoprotectivo (Udayama y cols., 1998), antidiabético (Ortiz- Andrade y cols., 2007), fungicida (Becker y cols., 2005) y contra parásitos (Cunha y cols., 2003).

La hidrofilicidad es fundamental en las propiedades fisicoquímicas de la molécula, la cual juega un papel importante en la actividad biológica. Esta propiedad puede influenciar la actividad farmacológica porque puede codificar la habilidad de la absorción del compuesto, transportación, distribución y excreción del organismo humano.

Con frecuencia hay una relación existente entre la medida de hidrofilicidad y la actividad biológica de la molécula. El incremento de esta actividad, resulta probablemente de una menor cantidad de grupos metilenos en la molécula, el cual resulta en una mejor difusión de la molécula a través de la membrana. Por el contrario, el decremento de la hidrofilicidad está en función del incremento de los metilenos, lo que provoca una reducción en la solubilidad (Soldi y cols., 2009).

Cuando el sustrato se dirige al receptor, es posible que sólo parte de la pequeña molécula haga contacto con la macromolécula, las otras partes de la pequeña molécula, las cuales no hacen contacto, no contribuyen a una unión hidrofóbica (Soldi y cols., 2009). El mecanismo de acción de los triterpenos no ha sido completamente explicado, pero se especula que este involucra la ruptura de la membrana en los componentes lipofílicos y que los grupos funcionales interfieren con la estructura de las proteínas (Lima y cols., 1992). Se ha logrado establecer el modo de acción de la actividad antiinflamatoria de los triterpenos, cuando la inflamación es producida por activadores de la proteína quinasa (Instituto de Química. UNAM., 2006).

2.4. Uso de esteres de α- y β-amirina (triterpenos) como anticariogénicos

La realización de estudios de la actividad biológica de compuestos naturales suministra un paso importante hacia el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas (Porto y cols., 2009). Las plantas proveen una fuente abundante de compuestos antimicrobianos y han sido utilizadas por siglos para inhibir el crecimiento microbiano (Johann y cols., 2007), porque las plantas tienen la habilidad de producir productos químicos, como defensa contra microorganismos propios del medio ambiente (Hemaiswarya y cols., 2008).

El uso de plantas ha sido asociado con la higiene dental y practicas terapéuticas desde tiempos inmemorables (More y cols., 2008). Reportes previos han mostrado que algunos productos naturales son candidatos para sustancias anticariogénicas (Matsumoto y cols., 1999).

Varias tribus africanas tienen como costumbre masticar varas de una planta llamada "mutala" conocida científicamente como *Diospyros lysioides* o *Euclea natalensis* (Lall y Meyer, 2000). El uso de plantas medicinales de las familias de Fabaceae, Ebenaceae, Bombaceae y Anonnacea, han sido reportadas para el tratamiento de enfermedades orales (Hadissa y Pierre, 2005).

Los compuestos triterpenoides derivados de plantas, en general son conocidos porque poseen un amplio espectro de actividad farmacológica, incluyendo anti-inflamatorio (Oliveira y cols., 2004), además de propiedades antibacteriales e incluso anticonceptivas. Un ejemplo de estos compuestos son α- y β-amirina (Soldi y cols., 2008). La α- y β-amirina son triterpenos pentacíclicos muy importantes, componentes principales de la resina de *Protium heptaphyllum* (Oliveira y cols., 2005). En los 10 últimos años han sido utilizados con mayor frecuencia, pues la síntesis de sus derivados obtenidos a partir de triterpenos de origen natural, proporcionaron grandes avances en el estudio farmacológico de estos compuestos (Soldi y cols., 2008).

La modificación estructural de productos naturales es una estrategia potencial para el desarrollo de nuevas drogas las cuales sean diferentes de las usadas comúnmente. En este contexto, los derivados de triterpenos son de particular interés (Tanachatchairatana y cols., 2008). Por otro lado, modificaciones pequeñas en la estructura de la molécula, pueden inhibir su eficacia, estas alteraciones estructurales en la molécula, puede modificar la absorción, distribución y excreción de los componentes, pues es bien conocida la especificad de las moléculas, hacia algunos marcadores (Soldi y cols., 2009).

Los triterpenos de α-amirina poseen un esqueleto base de tipo ursanato y la β-amirina posee un esqueleto base tipo oleanato, la única diferencia entre ellos es la posición del metil en sus anillos.

En la examinación de la estructura de los triterpenos pentacíclicos de amirina, se observó que es posible la explicación de su potencial de actividad farmacológica, debido a la presencia de sistemas de los anillos perhidro – aromáticos, la cual es muy parecida a las drogas conocidas como esteroides (Oliveira y cols., 2004).

Un gran avance durante los últimos años fue la síntesis de derivados provenientes de triterpenos como α- y β-amirina (Liu y cols., 2005). La esterificación de α- y β-amirina produce una serie de derivados análogos. Estas sustancias sintetizadas poseen actividades antifúngicas. La modificación producida por la introducción de grupos sustitutos puede llegar a modificar propiedades fisicoquímicas de la molécula, como hidrofobicidad, densidad electrónica, de manera que, a través de este camino se podrían encontrar análogos más efectivos, selectivos y menos tóxicos (Johann y cols., 2007).

Es relevante observar la importancia del efecto ocasionado por la hidrofobicidad en la molécula y de acuerdo con Soldi y cols. (2008), el efecto máximo de un compuesto triterpenoide, se observa en el octanoil.

El ácido murolico es un triterpenoide pentacíclico, naturalmente presente en plantas, cuyos derivados exhiben actividades biológicas prometedoras. La síntesis eficiente del ácido murolico ha sido consumada en once pasos con un rendimiento total del 24% iniciando del ácido betulínico. Algunos relacionados con triterpenos naturales incluyen maradiol, ácido acridocarpusico y ácido moronico (Zhang y cols., 2009).

Es de gran importancia entender la relación entre estructura y actividad en los compuestos, pues las alteraciones estructurales pueden mejorar la actividad contra bacterias orales (Porto y cols., 2009).

2.5. Modificación estructural de moléculas de triterpenos

La modificación estructural de productos naturales es una potencial estrategia para el desarrollo de nuevas drogas. En este contexto, los triterpenos y sus derivados son de particular interés (Tanachatchairatana y cols., 2008). De acuerdo con modificaciones hechas anteriormente, se ha reportado que el ácido betulínico, fue más activo que el epímero en C-3, ácido *epi*–betulínico. El ácido oleanólico fue 4 veces menos activo que el epímero en C-3, ácido 3-*epi*-oleanólico (Wachter y cols., 1999), el acetato derivado del ácido oleanólico fue tan activo como el compuesto de donde proviene (Kanokmedhakul y cols., 2005). El 3-ceto análogo del ácido oleanólico, muestra una concentración mínima inhibitoria (CMI) equivalente al ácido 3-*epi*-oleanólico (Wachter y cols., 1999).

La presencia de un grupo funcional éster en el C-22 del ácido oleanólico resulta en un decremento de la actividad biológica (Jiménez – Arellanes y cols., 2007). La adición del grupo funcional hidroxilo en las posiciones, C-19 y C-2 del ácido ursólico, que dan ácido promólico y ácido tormentico, respectivamente, resulta en un decremento de 2 veces menor actividad, respecto a la actividad antimicrobiana (Cantrell y cols., 2007).

Los epímeros en C-3 epímero de los triterpeno ácido ursólico y 3- *epi* -ursólico, muestra una actividad relativamente alta. La modificación de los anillos en triterpenoides también afectan la actividad antimicrobiana (Woldemichael y cols., 2003).

Los resultados observados entre varios grupos de triterpenos, representan un conflicto, de tal manera que es difícil la fabricación de compuestos modificados, y es aún más complicado predecir los requerimientos estructurales necesarios para aumentar la actividad antimicrobiana. Sin embargo, se ha descubierto que la presencia de un *p*-cumarato en el C-2 del ácido betulínico, resulta en un incremento de la actividad antimicrobiana. En este orden, para el estudio de la relación entre la estructura de ésteres sustitutos y la actividad antimicrobiana en triterpenos, otros sustitutos análogos de ésteres de cinamáto fueron preparados para su evaluación biológica (Tanachatchairatana y cols., 2008).

2.5.1. Introducción de grupo cinamoil y derivados de acetato y cinamáto

Las modificaciones químicas realizadas según Tanachatchairatana y cols. (2008), fueron enfocadas en la introducción del cinamoil y sustitutos del grupo cinamoil en el C-3, grupo hidroxilo del ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico (Figuras 3, 4 y 5).

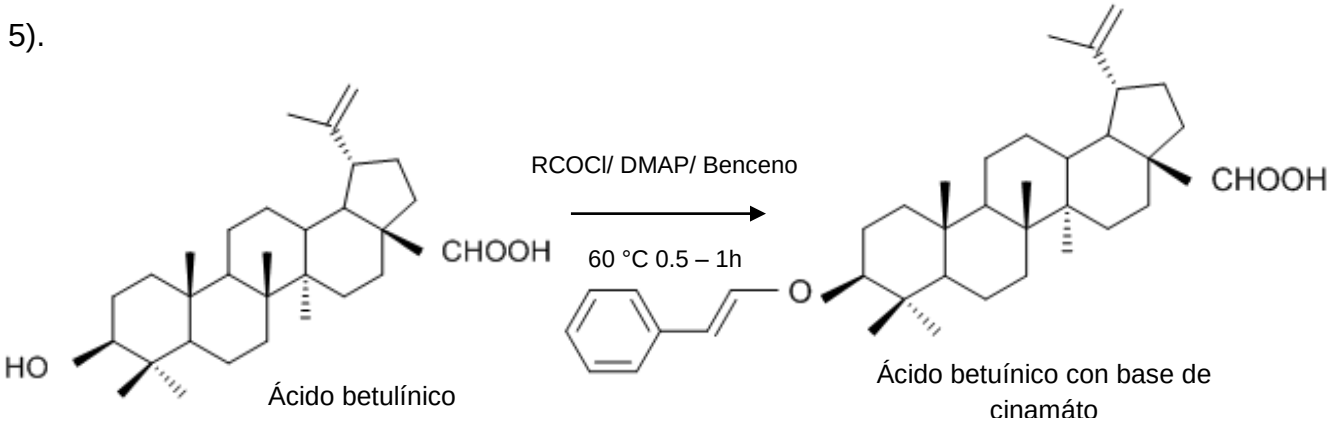


Figura 3.- Síntesis de la molécula ácido betulínico con base de cinamáto.

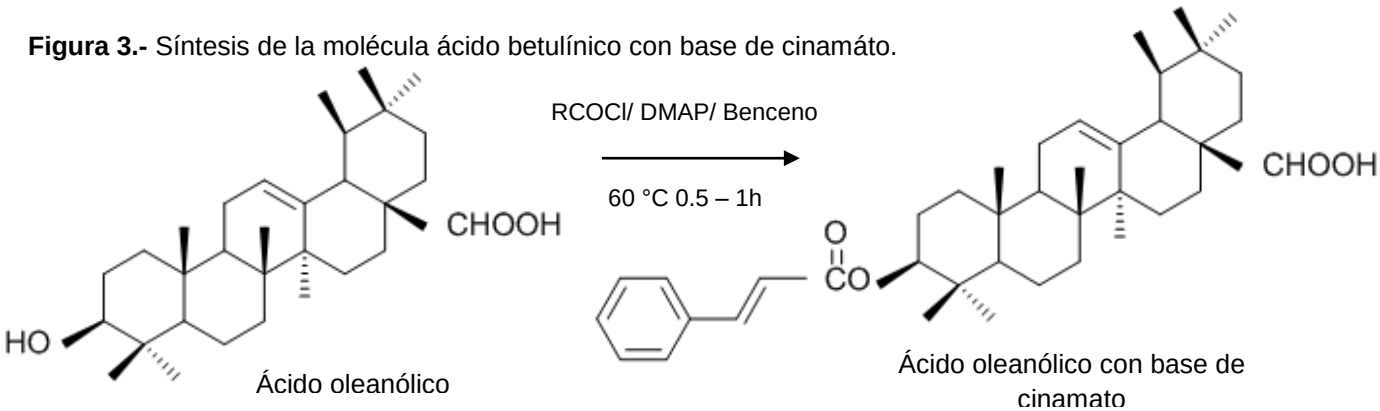


Figura 4.- Síntesis de la molécula ácido oleanólico con base de cinamato.

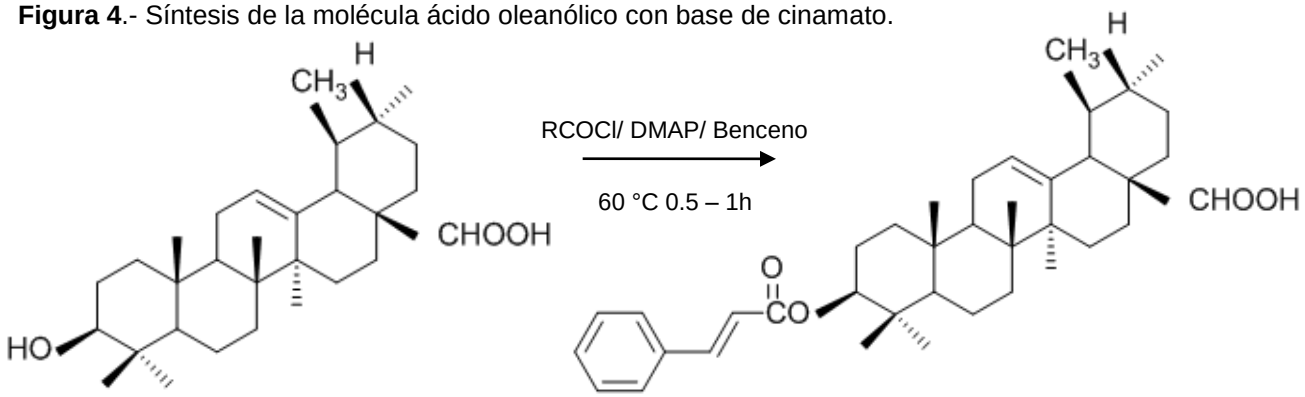


Figura 5.- Síntesis de la molécula ácido ursólico con base de cinamato.

Las fracciones de ésteres seleccionadas en el estudio fueron los cinamatos monosustituidos *p*-cumarato, el acetato y derivados del metil éster de ésteres del *p*-cumarato, el ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato) ésteres y sus derivados de acetato, el cafeato (3,4-dihidroxicinamato) ésteres y sus derivados de acetato, y el éster *p*-clorocinamato. El anterior grupo de ésteres fue seleccionado como representativos de no oxigenados, sustitutos de ésteres de cinamáto (Tanachatchairatana y cols., 2008).

De acuerdo a Tanachatchairatana y cols. (2008), entre los compuestos derivados del ácido betulínico, los que resultaron ser más activos fueron el *p*-cumaroil, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6.25 µg/mL. Su correspondiente acetato derivado fue menos activo, con una CMI de 12.5 µg/mL. En comparación con la molécula no modificada, ácido betulínico, que presento una CMI de 50 µg/mL. Sin embargo el éster ferulato y su derivado de acetato, como el éster de cafeato y su derivado de acetato, fueron mucho menos activos con una CMI de 200 µg/mL (Tabla 3).

En el grupo de los derivados del ácido oleanólico, los compuestos que resultaron ser más activos fueron el éster *p*-cumarato con una CMI de 6.25 µg/mL, su correspondiente acetato fue menos activo con una CMI de 12.5 µg/mL. El éster de ferulato fue menos activo que el éster *p*-cumarato con una CMI de 12.5 µg/mL. El *p*-clorocinamato fue un compuesto inactivo, con una CMI >200 µg/mL (Tabla 4).

Finalmente para el grupo de los derivados del ácido ursólico, el éster ferulato y su acetato resultaron ser los compuestos más activos con CMIs equivalentes, correspondientes a 3.13 µg/mL, el *p*-cumarato éster también presento actividad, con una CMI de 6.25 µg/mL, su correspondiente acetato y su derivado metil éster muestran una menor actividad con CMIs de 20 y 100 µg/mL, el *p*-clorocinamato y sus análogos fueron inactivos con una CMI >200 µg/mL (Tabla 5).

Tabla 3.- Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido betulínico (Tanachatchairatana y cols., 2008).

Derivados del ácido betulínico

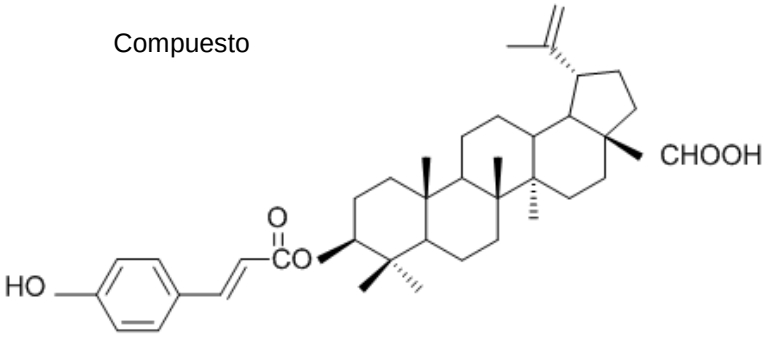
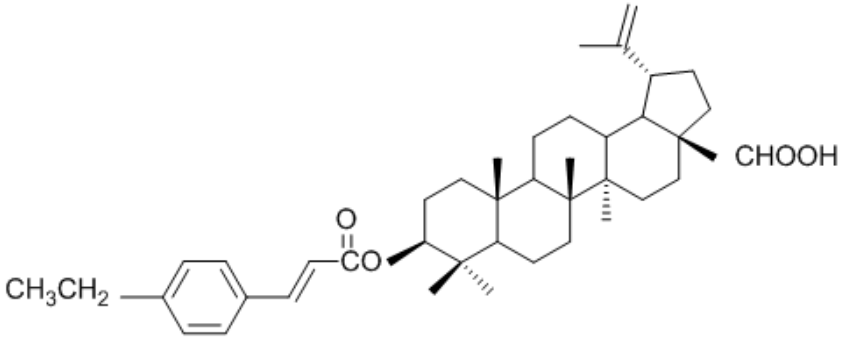
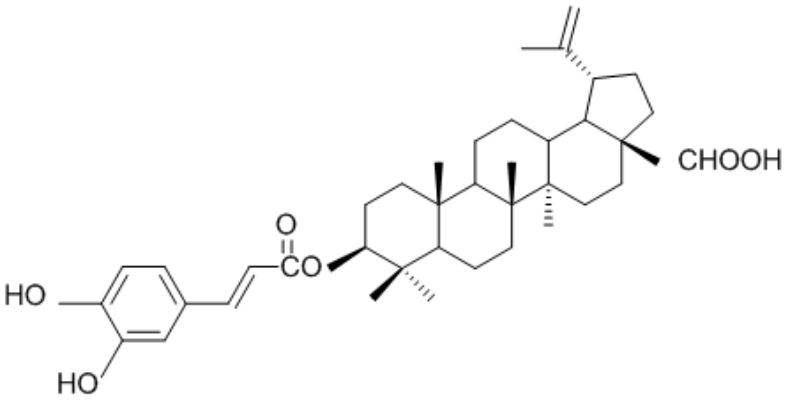
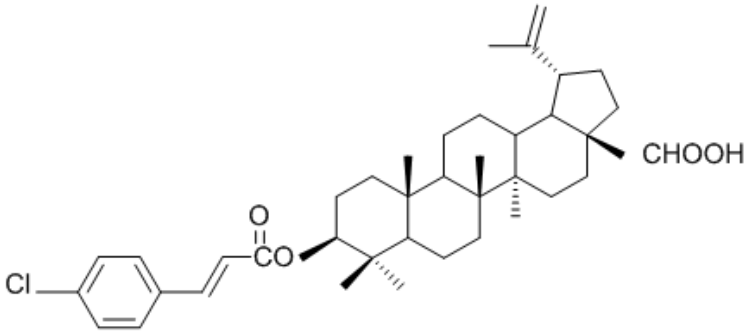
	Compuesto	MIC (µg/mL)
Compuestos con actividad antimicrobiana		6.25
		12.5
Compuestos sin actividad antimicrobiana		200
		>200

Tabla 4.- Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido oleanólico (Tanachatchairatana y cols., 2008).

Derivados del ácido oleanólico.

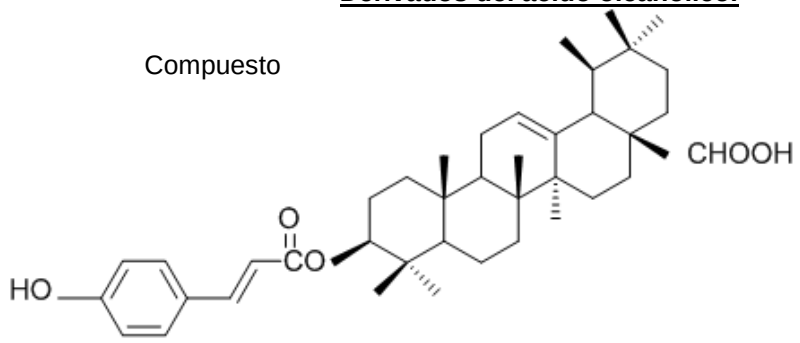
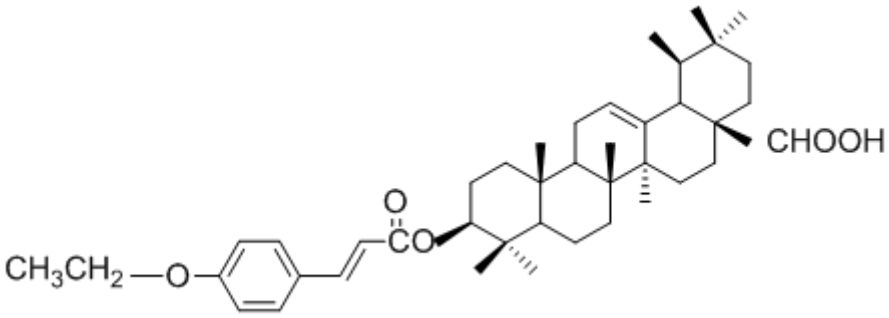
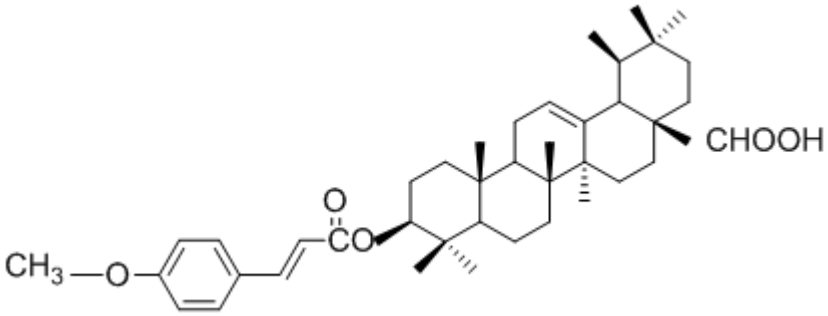
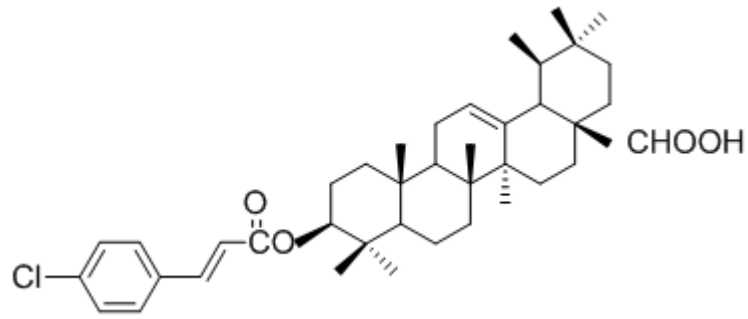
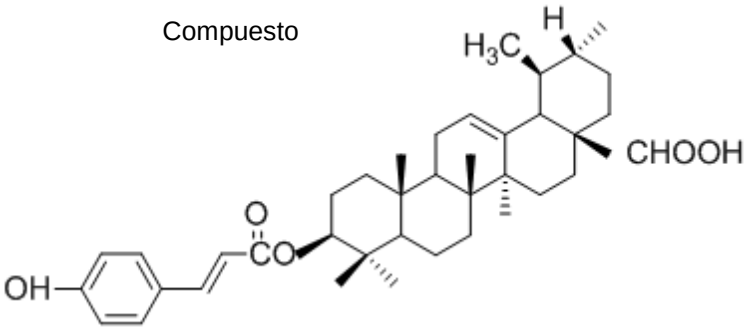
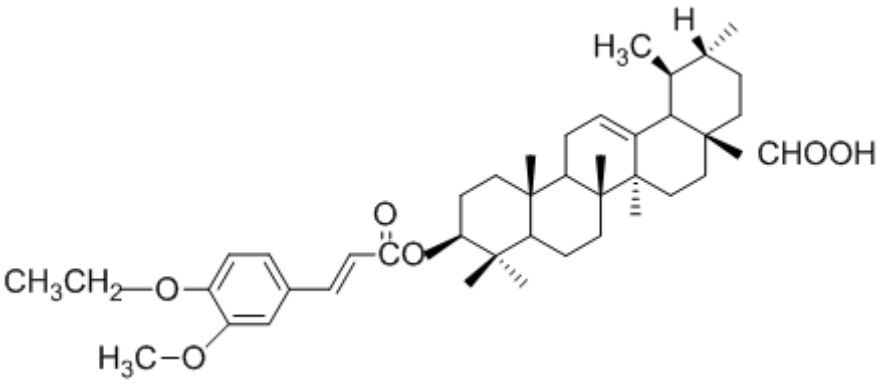
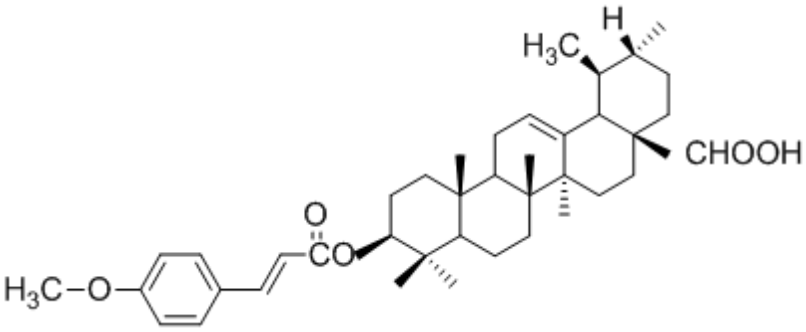
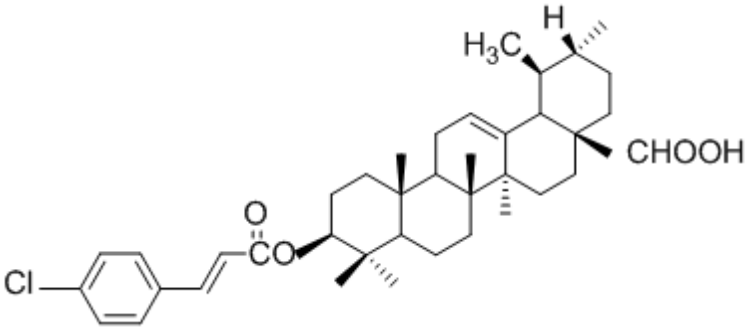
	Compuesto	MIC (µg/mL)
Compuestos con actividad antimicrobiana		6.25
		50
Compuestos sin actividad antimicrobiana		200
		>200

Tabla 5.- Compuestos con actividad y sin actividad antimicrobiana derivados del ácido ursólico (Tanachatchairatana y cols., 2008).

Derivados del ácido ursólico.

	Compuesto	MIC (µg/mL)
Compuestos con actividad antimicrobiana		6.25
		3.13
Compuestos sin actividad antimicrobiana		200
		>200

Entre los factores que se han observado, provocan el aumento en la actividad antimicrobiana se encuentran enlistados los siguientes (Tanachatchairatana y cols., 2008).

- La introducción de un grupo HBD en la molécula.

- La introducción de un grupo hidroxilo, metil ó acetil a la molécula, tomando en cuenta una separación entre estos sustituyentes.

- Colocar en posición *trans* a los grupos sustitutos que se sepa, aumenten la capacidad antimicrobiana de la molécula (Mutai y cols., 2009).

- La introducción de un grupo sustituto *p*-cumarato en la posición C-3 del ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.

- La presencia del grupo sustituto ferulato, resulto en un incremento de 4 magnitudes de la actividad antimicrobiana, del ácido oleanólico y ácido ursólico.

Factores que se han observado provocan un decremento en la actividad antimicrobiana (Porto y cols., 2009; Tanachatchairatana y cols., 2008).

- La sustitución y cercanía de dos grupos HBD, provocan un decremento de la actividad antimicrobiana.

- La introducción del éster ferulato en el ácido betulínico, ocasiona un decremento en 4 magnitudes de la actividad antimicrobiana.

- La presencia del grupo *p*-cloro, en cualquiera de las moléculas de triterpenos, resulta en la inactividad o no provee de actividad antimicrobiana a ésteres de triterpenos.

2.5.2. Efecto de los grupos donadores de hidrogeno (HBD)

Los diterpenos son una amplia clase de productos naturales derivados de plantas, que exhiben un amplio espectro de actividad biológica (Ambrosio y cols., 2006). Varios reportes han mostrado que esta clase de metabolitos secundarios muestra efectos analgésicos y anti–inflamatorios entre otras funciones. Además, esta clase de compuestos ha sido reportado que muestran una importante actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Se ha demostrado que algunos pimaranos tipo diterpenos aislados de *Viguiera arenaria*, son funcionales en la inhibición de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. mutans, S. sanguinis* y *Lactobacillus casei*, con una buena Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) evaluada en una rango de 2 a 10 µg/ mL (Porto y cols., 2009).

Se realizó una evaluación antimicrobiana con los extractos de diclorometano, de la raíz *V. arenaria*, planta de Brasil, rica en pimaranos tipo diterpenos y mostraron actividad contra varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el extracto de diclorometano mostro una CMI (menor a 100 µg/mL) prometedora en especial contra patógenos Gram-positivos (Porto y cols., 2009).

Recientemente han establecido que el sistema lipofílico de anillos posicionado estratégicamente, HBD; grupo donador de electrones, es muy importante en la actividad antimicrobiana mostrada por los diterpenos. Se ha observado que la proximidad entre los grupos hidrofílicos reduce la actividad antibacteriana. Tomando en cuenta aspectos estructurales de las moléculas, en las que se observó una mejor CMI, se puede inferir que la presencia de los grupos donadores de hidrogeno (HBD) en el C-19 o C-3 de los esqueletos de los diterpenos *ent*-pimaranos, influye en el aumento de la actividad antimicrobiana (Porto y cols., 2009).

Aunque las siguientes estructuras (Figura 6) no presentan modificaciones, si nos dan una pauta para entender las características que proporciona a la molécula la posición de los grupos HBD.

En la Figura 6, se observan estructuras de algunos diterpenos, en ellas se puede observar cómo influye la posición de los grupos sustitutos en la estructura de la molécula, para modificar la capacidad antimicrobiana. Los que se encuentran encerrados muestran los factores de la molécula que podrían disminuir la capacidad antimicrobiana.

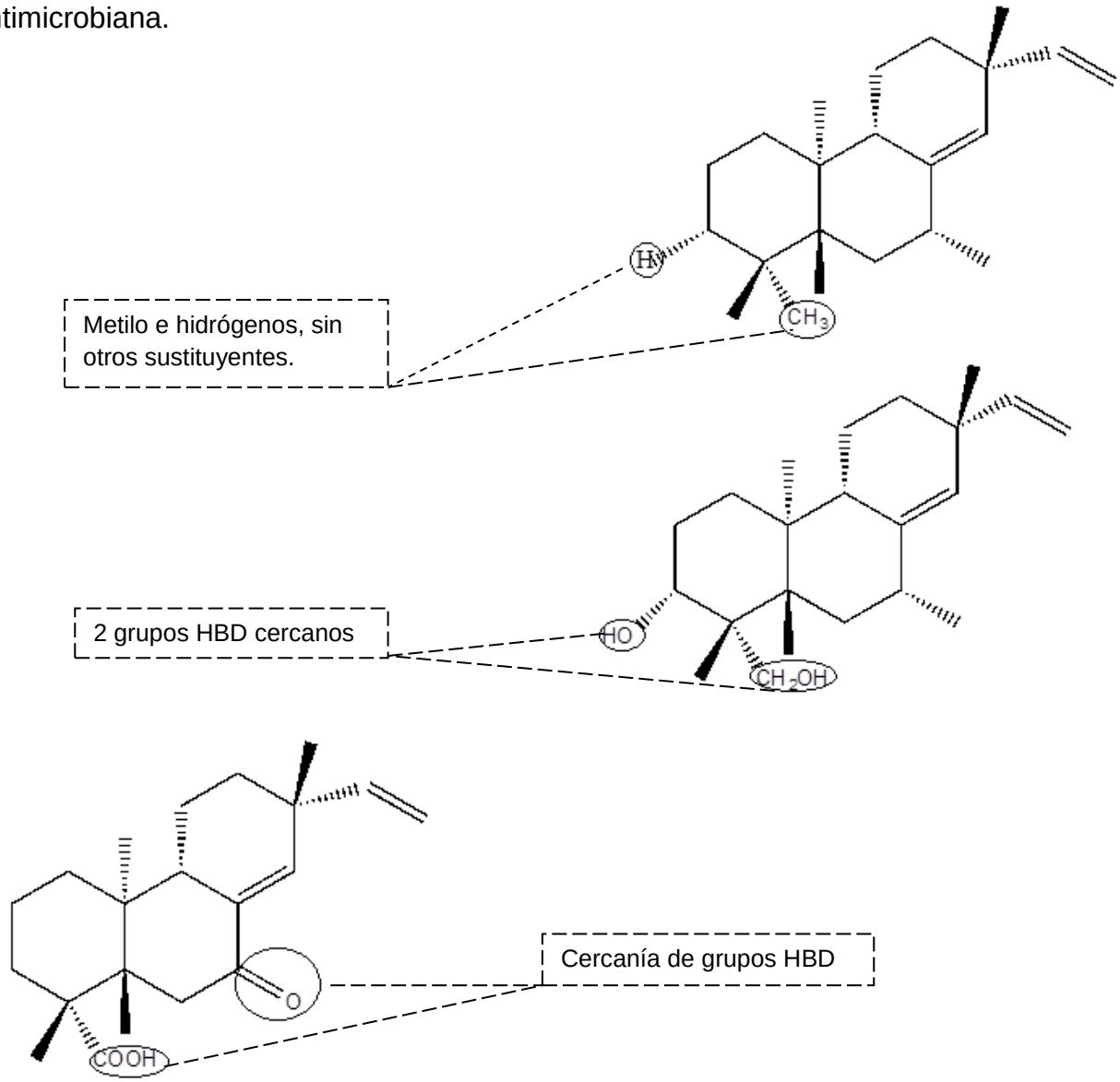


Figura 6.- Diterpenos aislados de *Vigueria arenaria*, que no mostraron capacidad antimicrobiana contra bacterias del género *Bacillus, Staphylococcus* y *Streptococcus*, donde se puede observar los grupos HBD y su influencia en la capacidad antimicrobiana del compuesto (Porto y cols., 2009).

En la figura 7 se observan otras estructuras de diterpenos, en ellas nuevamente es posible observar cómo influye la posición de los grupos sustitutos en la estructura de la molécula, para modificar la capacidad antimicrobiana.

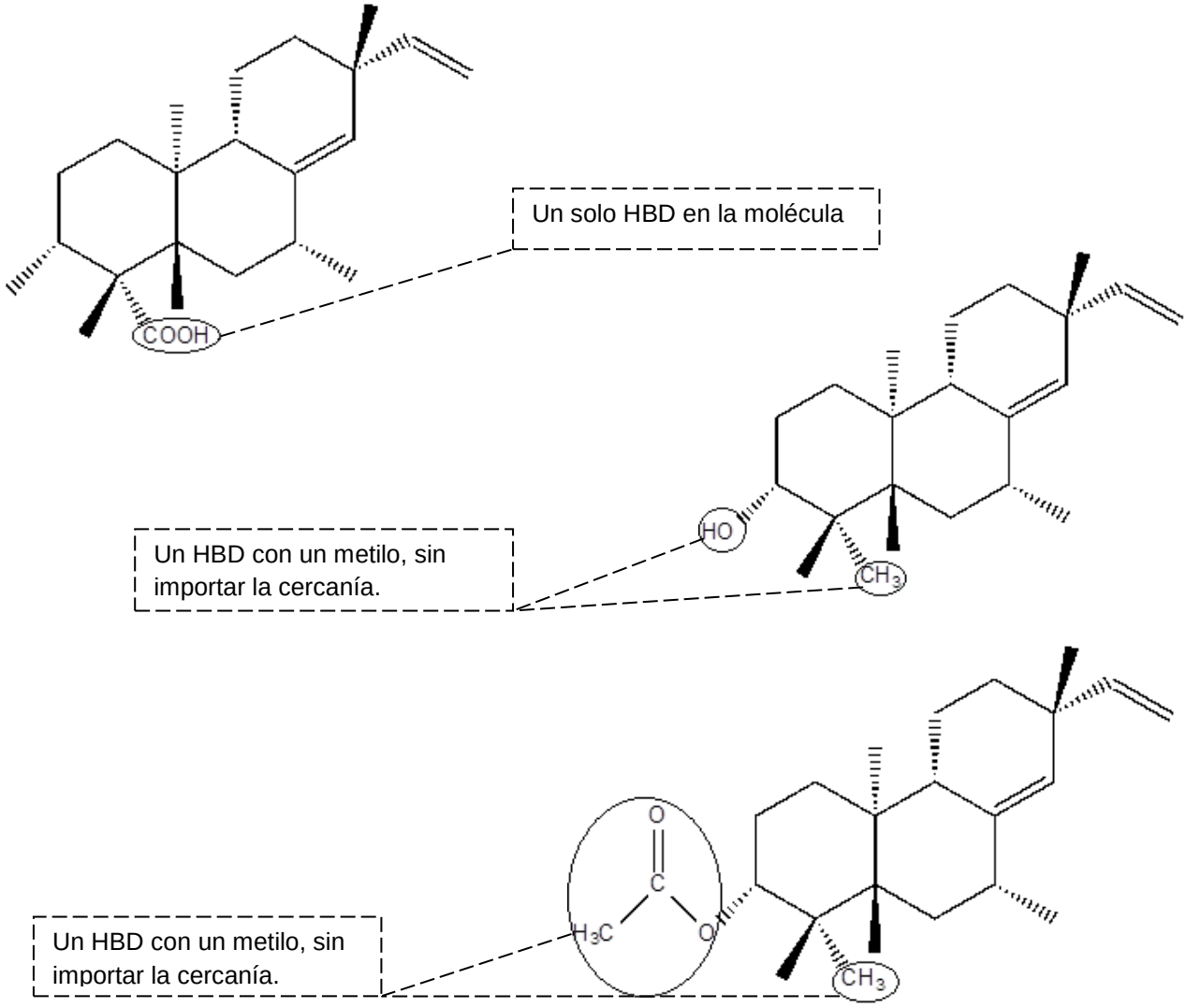


Figura 7.- Diterpenos aislados de *Vigueria arenaria*, que si mostraron capacidad antimicrobiana contra bacterias del género *Bacillus, Staphylococcus* y *Streptococcus*, donde se puede observar los grupos HBD y su influencia en la capacidad antimicrobiana del compuesto (Porto y cols., 2009).

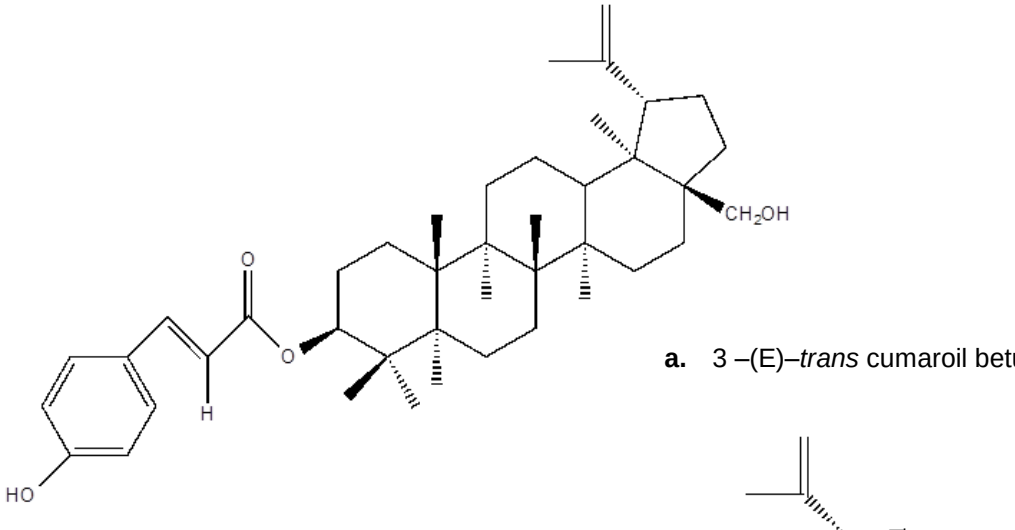
Tomando en cuenta los aspectos estructurales de los compuestos anteriores, se puede inferir que la presencia de HBD, juega un papel importante en el incremento o decremento de la actividad antimicrobiana. Es notoria la influencia que tienen los grupos hidrofílicos de la molécula en la modificación de la capacidad antimicrobiana, al respecto se puede inferir que un grupo hidrofílico en la molécula aumenta la actividad antimicrobiana, dos grupos disminuyen su capacidad, de manera que la cercanía entre ellos influye. Si la sustitución se hace en carbonos cercanos, la actividad antimicrobiana disminuye de manera considerable, sin embargo si la sustitución se hace entre carbonos lejanos, la actividad antimicrobiana disminuye, hasta un punto medio. La misma relación también fue observada, durante la investigación de la actividad antimicrobiana de *ent*-pimaranos diterpenos, contra patógenos de la cavidad oral (Porto y cols., 2009). Lo que sugiere que esta podría ser una regla general de la actividad de los *ent*-pimaranos diterpenos contra bacterias Gram-positivas.

Otros estudios como el reportado por Mutai y cols. (2009), sugieren que la actividad antimicrobiana, es determinada por el número y naturaleza de los sustitutos, entre los factores que se propone intervienen en la inhibición del crecimiento microbiano, es la introducción de un grupo hidroxilo en el carbono 3 de un compuesto triterpenoide, como el lupano. Ya que, si se realizara una sustitución en la misma posición, de una estructura similar, con un grupo diferente, como un carbonilo, la capacidad antimicrobiana se vería disminuida. Lo que propone Mutai y cols. (2009), es la introducción de dos grupos hidroxilos, uno en el carbono 3 y otro en el carbono 30, además observó que la introducción de un carbonilo en el carbono 3, en derivados del lupano disminuye drásticamente la actividad antimicrobiana, lo que indica que una posición libre, que es esencial en la capacidad antimicrobiana que puede mostrar un compuesto. El aumento de grupos hidroxilos, en dos miembros de los anillos aromáticos de la estructura de un triterpenoide, se observó que disminuye su capacidad antimicrobiana, sin embargo algunas diferencias en la actividad antimicrobiana observada entre lupanos, esteroles y pequeños anillos aromáticos, puede ser resultado de varios parámetros, entre ellos el número de unidades, su naturaleza especifica y su procedencia (Mutai y cols., 2009).

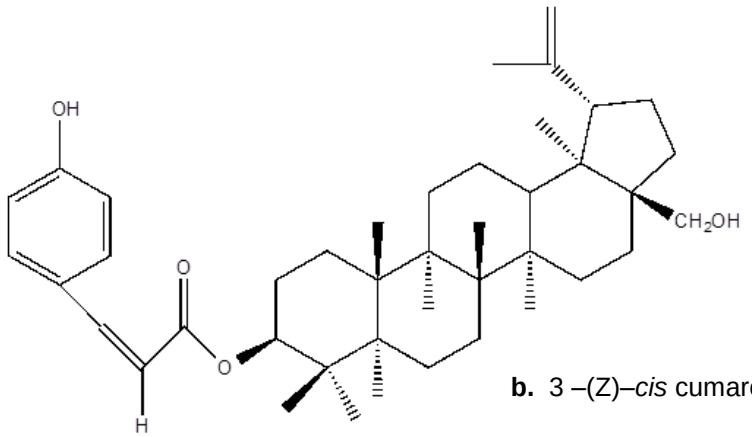
2.5.3. Efecto del impedimento estérico en la molécula.

Otro hecho importante, es mencionar que el impedimento estérico es un factor más que hay que tomar en cuenta, un esqueleto *trans* en la molécula, muestra mayor capacidad antimicrobiana.

Se pudo observar que al comparar la actividad antimicrobiana, mediante una prueba de difusión en agar, de un 3-(E)-*trans* cumaroil betulínico, con el 3-(Z)-*cis* cumaroil betulínico, se puede observar que la presencia de un esqueleto *trans* en la estructura de los anillos de cumaroil, contribuyo al aumento de la capacidad antimicrobiana. Sin embargo, la introducción de un esqueleto *cis* en la estructura de los anillos de cumaroil, reduce la capacidad antimicrobiana. Lo anterior confirma la dependencia por parte de la conformación de la molécula, con respecto a la actividad antimicrobiana (Figura 8).



a. 3 –(E)–*trans* cumaroil betulínico



b. 3 –(Z)–*cis* cumaroil betulínico

Figura 8.- La estructura a, con el sustituyente cumaroil en posición *trans*, muestra un mayor efecto antimicrobiano, respecto a la molécula con el sustituyente cumaroil en posición *cis* (Mutai y cols., 2009).

Sin embargo, es importante mencionar que algunas diferencias en la actividad antimicrobiana entre este tipo de moléculas aromáticas, con similitudes con los esteroides, pueden ser resultado de varios parámetros incluidos, el número de unidades, especificidad, origen y naturaleza de los grupos funcionales que conforman la molécula (Mutai y cols., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN.

La cavidad oral está poblada de una gran cantidad de especies bacterianas, algunos hongos y levaduras, estas en general no deberían causar ningún problema de salud, sin embargo, su excesiva acumulación es la causa potencial de patologías orales.

El procedimiento mecánico es el más efectivo para la remoción de placa, lo que evita la acumulación de microorganismos patógenos, sin embargo la mayoría de la población no lo realiza de manera eficiente. La placa es la que ocasiona el desarrollo de enfermedades como la caries, enfermedad que está a punto de ser considerada epidemia, debido a su alta prevalencia a nivel mundial. Padecimientos graves pueden desencadenar incluso en enfermedades cardiovasculares.

Por lo anterior se han utilizado diferentes métodos para el cuidado de la salud bucal, como por ejemplo, el uso de azúcares sustitutos, que no sean fermentados por bacterias orales, sin embargo, se ha observado que *Streptococcus mutans*, una de las bacterias asociada principalmente con la caries, produce ácido que daña el esmalte dental, aún en ausencia de sacarosa, que es considerada uno de los principales azúcares causantes de la caries. Además de que este tipo de endulzantes no es metabolizado de igual manera en niños y adultos mayores.

También se ha hecho uso de diferentes sustancias que muestran ser eficaces en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, sin embargo, su uso a largo plazo presenta efectos secundarios, como tinción de dientes, desarrollo de resistencia en bacterias, e incluso algunas de ellas muestra cierta citotoxicidad.

Por lo anterior se requiere del uso de fármacos novedosos que puedan contrarrestar las consecuencias por el uso de las sustancias comúnmente utilizadas. Desde hace mucho tiempo se sabe del uso de plantas con fines medicinales, de ahí la utilización de compuestos extraídos de plantas, entre los compuestos que se han aislado en mayor proporción de plantas que muestran efectos biológicos benéficos, son los compuestos triterpenoides como, α- amirina y ácido betulínico.

De la evaluación de estos compuestos se sabe que presentan una capacidad antimicrobiana contra bacterias de la cavidad oral. Además se ha observado que la modificación estructural de los compuestos, puede mejorar las características de la molécula, entre ellas el aumento de su capacidad antimicrobiana, solubilidad y la disminución de la toxicidad. Entre los grupos que se ha notado mejoran las características de la molécula es la adición de grupos hidroxilo y otros grupos donadores de electrones, así como la conformación estructural y la interacción entre los grupos sustitutos en la molécula.

Por esta razón, se propuso la evaluación del potencial antimicrobiano de compuestos triterpenoides modificados estructuralmente, comparando con compuestos obtenidos de fuentes de origen natural y sin modificación estructural, con la finalidad de observar posibles mejoras en la actividad antimicrobiana de los compuestos modificados, frente a bacterias patógenas del género *Streptococcus*, presentes en la cavidad oral.

4. HIPÓTESIS.

Se sabe que la modificación estructural de compuestos triterpenoides puede traer consigo mejoras a las características del compuesto, entre ellas, aumentar su capacidad antimicrobiana, solubilidad y disminución de la toxicidad. En este trabajo las modificaciones estructurales incluyen la introducción de grupos como el cinamato y metilos en los compuestos triterpenoides.

De acuerdo a lo anterior, se espera que los compuestos modificados estructuralmente, tengan una mejor actividad antimicrobiana, respecto a los compuestos no modificados, así mismo se espera una mejora de la solubilidad de los compuestos en agua.

5. OBJETIVOS.

5.1. General

Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de compuestos triterpenoides modificados estructuralmente, respecto a compuestos control no modificados, frente a algunas cepas patógenas del género *Streptococcus* de la cavidad oral.

5.2. Particulares

- Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de compuestos triterpenoides sin modificación estructural en cepas patógenas del género *Streptococcus* mediante pruebas de difusión en agar y de macrodilución.
- Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de compuestos triterpenoides estructuralmente modificados en cepas patógenas de *Streptococcus* presentes en la cavidad oral mediante pruebas de difusión en agar y de macrodilución.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Materiales

6.1.1. Cepas utilizadas

Para la realización de este proyecto se hizo uso de diferentes cepas de *Streptococcus*, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*, las cuales fueron utilizadas y proporcionadas de los lugares que se enlistan a continuación (Tabla 6).

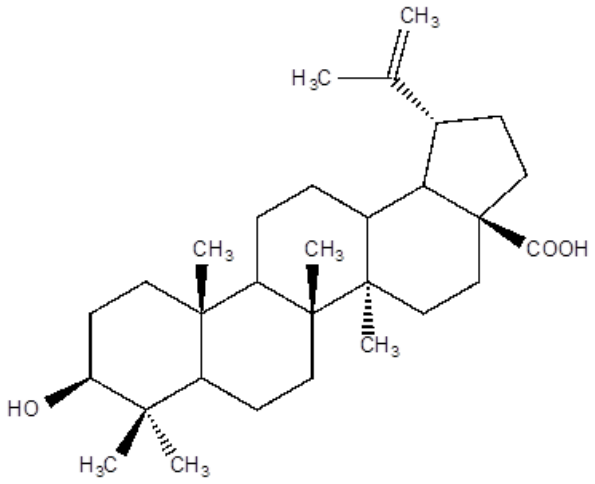
Tabla 6.- Cepas utilizadas y procedencia de las mismas.

Cepa	Procedencia	Proporcionada por
S. mutans (B)	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
S. mutans (C) ATCC10449	Conjunto E, Facultad de Química	Dr. José Fausto Rivera
S. sanguinis (B)	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
S. sanguinis (C)	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
S. oralis (B)	Cepario, Facultad de Química	Prof. Alejandro Camacho
S. oralis (C)	Cepario, Facultad de Química	Prof. Alejandro Camacho

6.1.2. Compuestos modificados estructuralmente y no modificados.

Todos los compuestos utilizados en la realización de este proyecto fueron proporcionados por el Dr. Arturo Navarro Ocaña, y se enlistan a continuación:

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

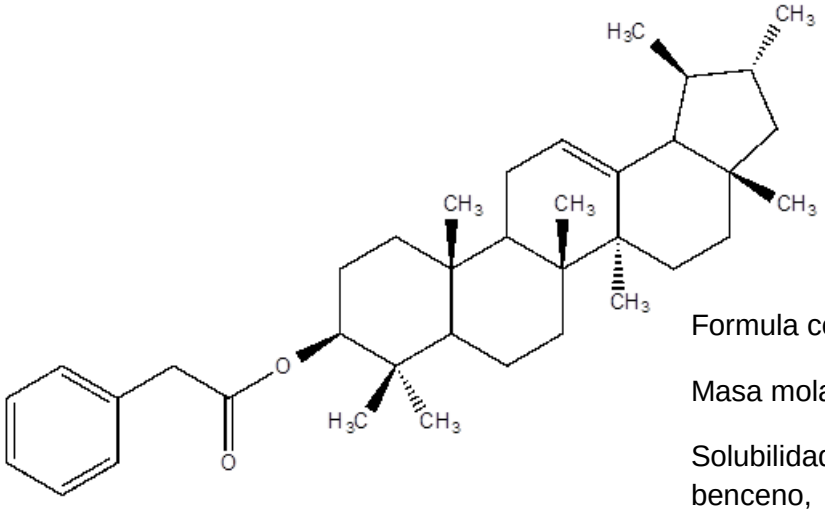


Formula condensada: $C_{30}H_{48}O_3$

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).

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

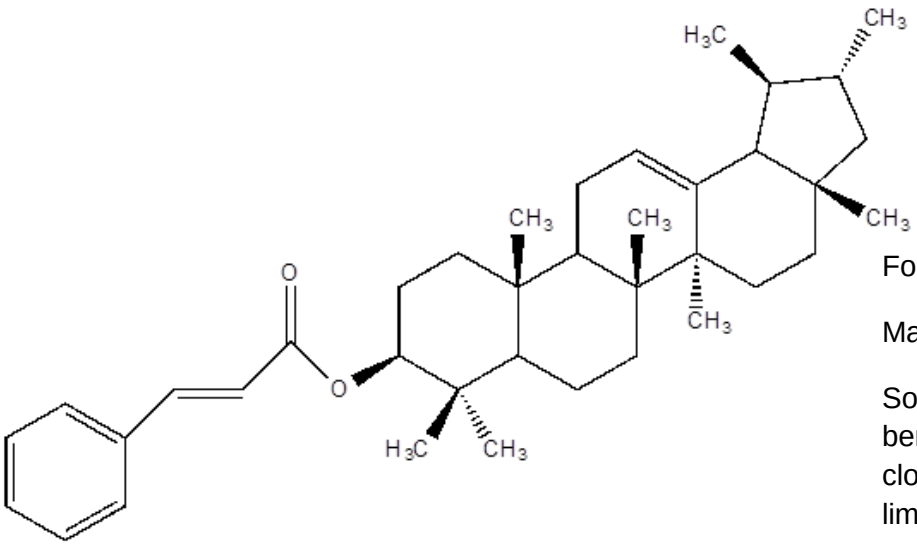


Formula condensada: $C_{38}H_{57}O_2$

Masa molar: 546.72 g/mol

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

- Cinamato de alfa amirina

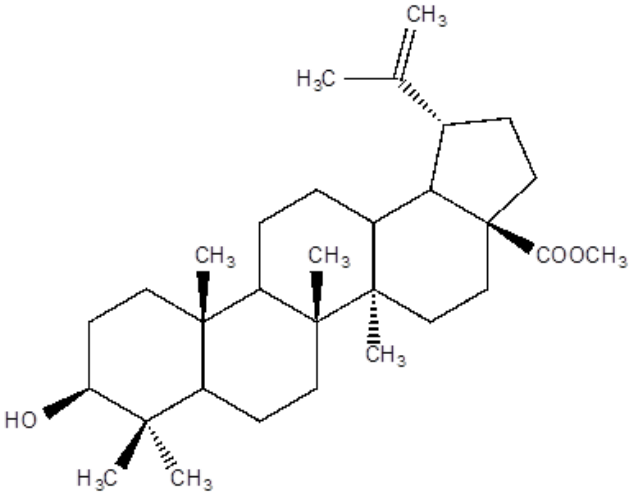


Formula condensada: $C_{39}H_{56}O_2$

Masa molar: 556 g/mol

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

- Metil éster del ácido betulínico



Formula condensada: $C_{31}H_{50}O_3$

Masa molar: 258 g/mol

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

6.2. Métodos

A continuación se describe la metodología general empleada a lo largo del desarrollo del trabajo.

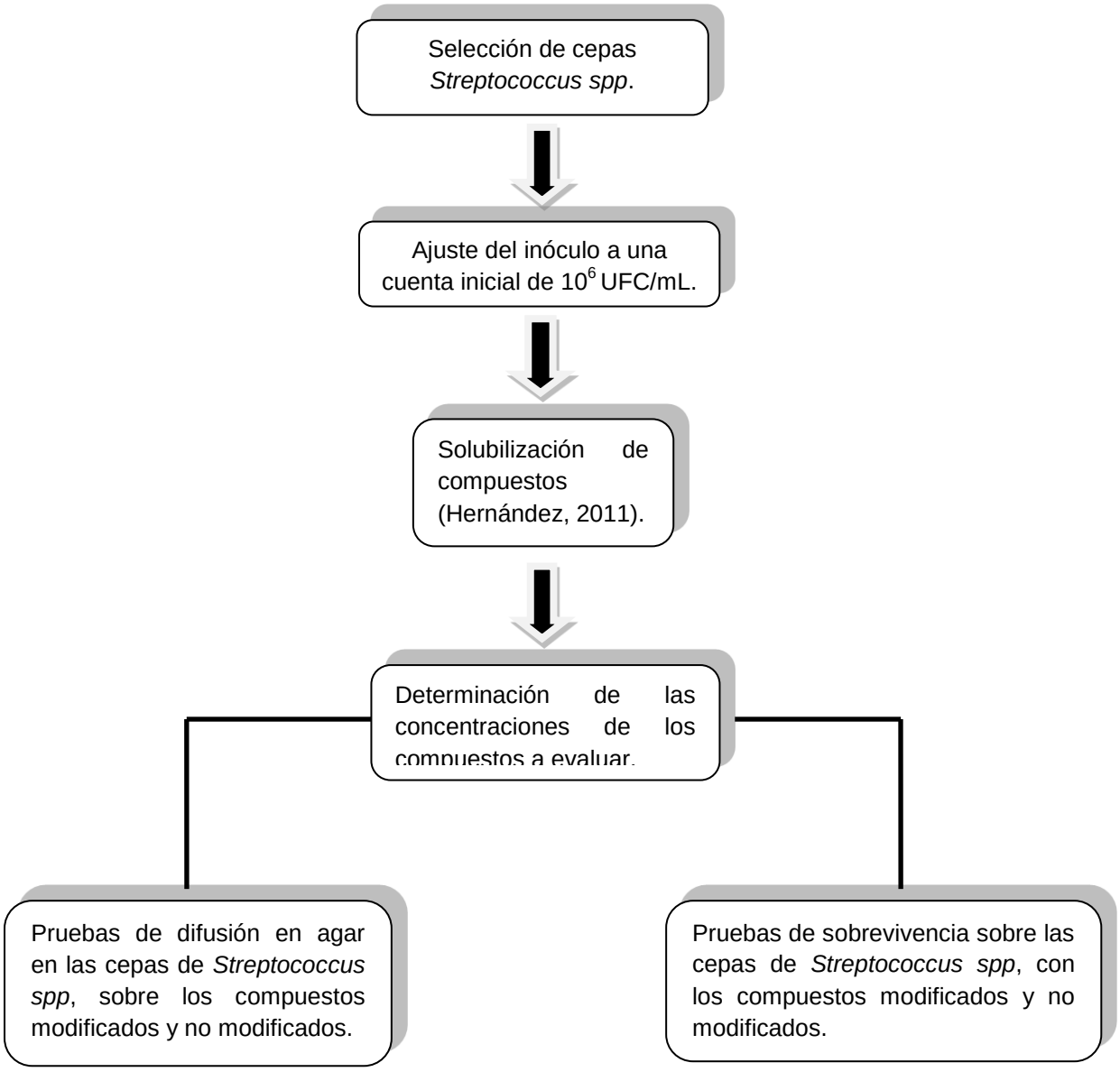


Figura 9.- Diagrama general de metodología empleada.

6.2.1. Determinación de la pureza de las cepas de *Streptococcus*.

De las cepas de *Streptococcus* conservadas en glicerol se tomaron 100µL, se inocularon en caldo BHI (Infusión corazón-cerebro), se incubaron a 37°C durante 18 horas, pasado este tiempo, se reinocularon nuevamente 100µL en caldo BHI, por lo que nuevamente se incubaron a 37°C, ahora durante 4 horas, las cepas que presentaron un mejor crecimiento después de este tiempo, se sembraron por estría en medio TSA (Agar Triptona-Soya), y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo se corroboro la pureza de las cepas, por medio de una tinción de Gram.

6.2.2. Conservación de las cepas.

Las cepas puras que presentaron mejor crecimiento en el medio BHI y medio TSA, se conservaron en el medio MRS (Agar Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* spp.). Para ello, se tomó una colonia aislada con un asa estéril, la colonia se suspendió en 5mL de caldo MRS, se incubó a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se llenaron micro tubos de 2mL con dicho cultivo en área estéril, los cuales fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, en área estéril se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en caldo MRS con glicerol al 10%. Los cultivos homogeneizados se conservaron en congelación a -64°C, hasta su uso posterior.

6.2.3. Estandarización de las células viables a una cuenta de 10^6 UFC/mL.

Para hacer la evaluación de los compuestos y las pruebas de difusión en agar, fue necesario estandarizar las células viables de las cepas de *Streptococcus* a una cuenta microbiana de 10^6 UFC/mL, ya que se sabe que en esta concentración se encuentran dichos microorganismos en la cavidad oral en estado de enfermedad (Darout y cols., 2002). Se inocularon 100 µL del cultivo conservado en glicerol en 5mL de caldo BHI, se incubaron a 37°C durante 18 horas, pasado este tiempo, de dicho cultivo se tomaron 100 µL y se inocularon nuevamente en 5mL de caldo BHI, el cual se incubo a 37°C durante 4 horas (tiempo 0).

Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica del cultivo a 600nm, y de acuerdo a la lectura se realizaron las diluciones necesarias para llevar el cultivo a una DO de 0.01 con el objetivo de estandarizar la cuenta microbiana. Se realizó una cuenta en placa en medio TSA a partir del cultivo ajustado, se hicieron diluciones sucesivas en solución salina al 0.85%, se inocularon las placas medio TSA y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo se contabilizaron las colonias de color beige, circulares y pequeñas, presentes en las cajas, con esta cuenta se determinó la concentración de bacterias en el inóculo ajustado.

6.2.4. Solubilización de los compuestos antimicrobianos.

Para determinar la capacidad antimicrobiana de los compuestos, fue necesario solubilizar los compuestos triterpenoides, utilizando la metodología descrita por Hernández (2011), basada en la formación de emulsiones con Tween ® 80.

6.2.4.1. Formación de emulsión con Tween ® 80.

Dada la naturaleza química de los compuestos a valorar, el primer paso para su evaluación como antimicrobianos, consiste en su solubilización en los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de las cepas de *Streptococcus*, entonces se realizó una dispersión con la finalidad de mejorar su solubilidad, por lo que se formó una emulsión, basando la metodología en Hernández (2011), primero se pesó una determinada cantidad de compuesto en un vial (Tabla 7), de acuerdo a la concentración que se quería obtener.

A este vial se le agregaron 5mL de agua destilada y 0.86 mL de Tween® 80, la solución se sonicó a 47 KHz a temperatura ambiente, durante 4 horas o el tiempo necesario para la dispersión total del compuesto. Ver Tabla 7.

Tabla 7.- Preparación de emulsiones.

Concentración del compuesto (mg/mL)	Cantidad del compuesto (mg)	Cantidad de agua (mL)	Cantidad de Tween® 80 (mL)
0.1	12	5	0.36
0.5	30	5	0.36
1.0	60	5	0.36

6.2.5. Determinación de las concentraciones a evaluar con ácido betulínico.

a) Reactivación de la cepa: Se inocularon 100 µL del cultivo conservado en glicerol en 5mL de medio BHI. Se incubaron a 37°C durante 17 horas. Se inocularon 100 µL de este nuevo cultivo en 5mL de caldo BHI, se incubó nuevamente a 37°C durante 4 horas. Después de este tiempo, se realizaron las diluciones necesarias, de acuerdo a la densidad óptica obtenida, para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL, de la bacteria a ensayar (tiempo 0).

b) Compuesto a evaluar: El compuesto evaluado fue ácido betulínico, compuesto que no presenta modificaciones estructurales, se utilizó para determinar las concentraciones a las que se realizarían las posteriores pruebas de macrodilución. Se prepararon 5 mL de la emulsión, mediante la metodología descrita previamente (6.2.4.1). Además se preparó un control positivo (clorhexidina al 20%) y un control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano). Las concentraciones evaluadas fueron 100, 500 y 1000 µg/mL.

c) Preparación de micromedios: Los medios de cultivo fueron preparados respecto a lo descrito en la Tabla 8, del mismo modo se preparó un control positivo (medio inoculado con la respectiva cepa y clorhexidina al 20%), y un control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano) para cada concentración de cada compuesto evaluado.

Tabla 8.- Preparación de micromedios.

Reactivo (µL)	**Control (+)**	**Control (-)**	**Compuesto (0.1mg/mL)**	**Compuesto (0.5mg/mL)**	**Compuesto (1mg/mL)**
Medio BHI	3450	3450	3450	3450	3450
Sacarosa 1%	390	390	390	390	390
Cultivo 10^6 UFC/mL	300	300	300	300	300
Emulsión (0.1mg/mL)	0	0	375	0	0
Emulsión (0.5mg/mL)	0	0	0	375	0
Emulsión (1mg/mL)	0	0	0	0	375
Digluconato de Clorhexidina (20%)	375	0	0	0	0
Agua (5mL) + Tween® 80 (0.36mL)	0	375	0	0	0
Volumen final	4500	4500	4500	4500	4500

Una vez preparados los micromedios, se incubaron a 37° C durante 24 horas, pasado este tiempo se realizó la cuenta en placa en medio TSA, de las diluciones en solución salina al 0.85%, 10^{-3} una sola vez y 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7} por duplicado.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, pasado este tiempo se realizó el conteo de las colonias color crema, redondas y medianas.

Si en las placas no hubo crecimiento de la bacteria, se consideró como un efecto bactericida, con una concentración mínima inhibitoria (CMI), correspondiente a la concentración a la que se evaluó dicho compuesto. En el caso contrario, se realizó la cuenta de las placas donde hubo crecimiento de las cepas.

Para obtener el porcentaje de sobrevivencia de las bacterias, se consideró como 100% el total de colonias contadas en placa para el control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano), del total de colonias contadas en placa a las diferentes concentraciones, se determina la cantidad de estas que se encuentran respecto al total obtenido en el control negativo, de ahí se calcula el porcentaje.

6.2.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana, con la prueba de macrodilución, de los compuestos triterpenoides modificados y no modificados, a una concentración de 10^6 UFC/mL.

a) Reactivación cepa: Se tomaron 100 µL del cultivo conservado en glicerol de cada cepa a evaluar, y se agregaron a viales con 5mL de medio BHI, los cuales se incubaron a 37°C durante 17 horas. Se tomaron 100 µL de este nuevo cultivo y se inocularon en 5mL de caldo BHI, se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 horas. Después de este tiempo, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una D.O de 0.01 y así llegar a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL, de la bacteria a ensayar (tiempo 0).

b) Compuestos a evaluar: Los compuestos evaluados fueron los controles (ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina) y los compuestos modificados (cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico). Se prepararon 5mL de la emulsión correspondiente según lo descrito en la Tabla 9.

Además, se preparó un control positivo (clorhexidina al 20%) y un control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano). Las concentraciones evaluadas fueron 500, 1000, 1500 y 2000 µg/mL.

Tabla 9.- Preparación de emulsiones de los compuestos a evaluar.

Concentración del compuesto (mg/mL)	Cantidad del compuesto (mg)	Cantidad de agua (mL)	Cantidad de Tween® 80 (mL)
0.5	30	5	0.36
1.0	60	5	0.36
1.5	90	5	0.36
2.0	120	5	0.36

c) Preparación de micromedios: Los medios de cultivo fueron preparados respecto a la Tabla 10, del mismo modo se preparó un control positivo (clorhexidina al 20%) y un control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano), para cada concentración de cada compuesto evaluado.

Tabla 10.- Preparación de micromedios con los compuestos a evaluar.

Reactivo (µL)	**Control (+)**	**Control (-)**	**Compuesto (0.5mg/mL)**	**Compuesto (1mg/mL)**	**Compuesto (1.5mg/mL)**	**Compuesto (2.0mg/mL)**
Medio BHI	3450	3450	3450	3450	3450	3450
Sacarosa 1%	390	390	390	390	390	390
Cultivo 10^6 UFC/mL	300	300	300	300	300	300
Emulsión (0.5mg/mL)	0	0	375	0	0	0
Emulsión (1mg/mL)	0	0	0	375	0	0
Emulsión (1.5mg/mL)	0	0	0	0	375	0
Emulsión (2.0mg/mL)	0	0	0	0	0	375
Digluconato de Clorhexidina (20%)	375	0	0	0	0	0
Agua (5mL) + Tween® 80 (0.36mL)	0	375	0	0	0	0
Volumen final	4500	4500	4500	4500	4500	4500

Una vez preparados los micromedios, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizó la cuenta en placa en medio TSA de las diluciones 10^{-3} una sola vez y 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7} por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se realizó el conteo de las colonias color crema, redondas y medianas.

Si en las placas no hubo crecimiento de la bacteria, se consideró como un efecto bactericida, con una concentración mínima inhibitoria (CMI), correspondiente a la concentración a la que se evaluó dicho compuesto. En el caso contrario, se realizó la cuenta de las placas donde hubo crecimiento de las cepas.

Para obtener el porcentaje de sobrevivencia de las bacterias, se consideró como 100% el total de colonias contadas en placa para el control negativo (medio sin compuesto antimicrobiano), del total de colonias contadas en placa a las diferentes concentraciones, se determina la cantidad de estas que se encuentran respecto al total obtenido en el control negativo, de ahí se calcula el porcentaje.

6.2.7. Prueba de difusión en agar.

Se realizó la prueba de difusión en agar, con la finalidad de tener un parámetro más para evaluar la capacidad antimicrobiana de los compuestos, tomando en cuenta la metodología descrita por Rodríguez (2011). En dicha prueba se forman pozos sobre placas de medio BHI, con torres de vidrio de aproximadamente 5mm de diámetro, en los pozos se agrega el compuesto con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, sobre la placa de BHI crece la bacteria a inhibir. La presencia de halos claros alrededor de un pozo, se interpreta como una inhibición o diminución en el crecimiento bacteriano ocasionado por acción del compuesto. En la Figura 10, se puede observar la metodología general empleada.

Es importante evaluar el número de microorganismos que crecen en la placa, ya que para observar la inhibición por parte del compuesto, el crecimiento de microorganismos en placa debe ser homogéneo, por lo que se evaluó la cantidad de inóculo a utilizar para las placas.

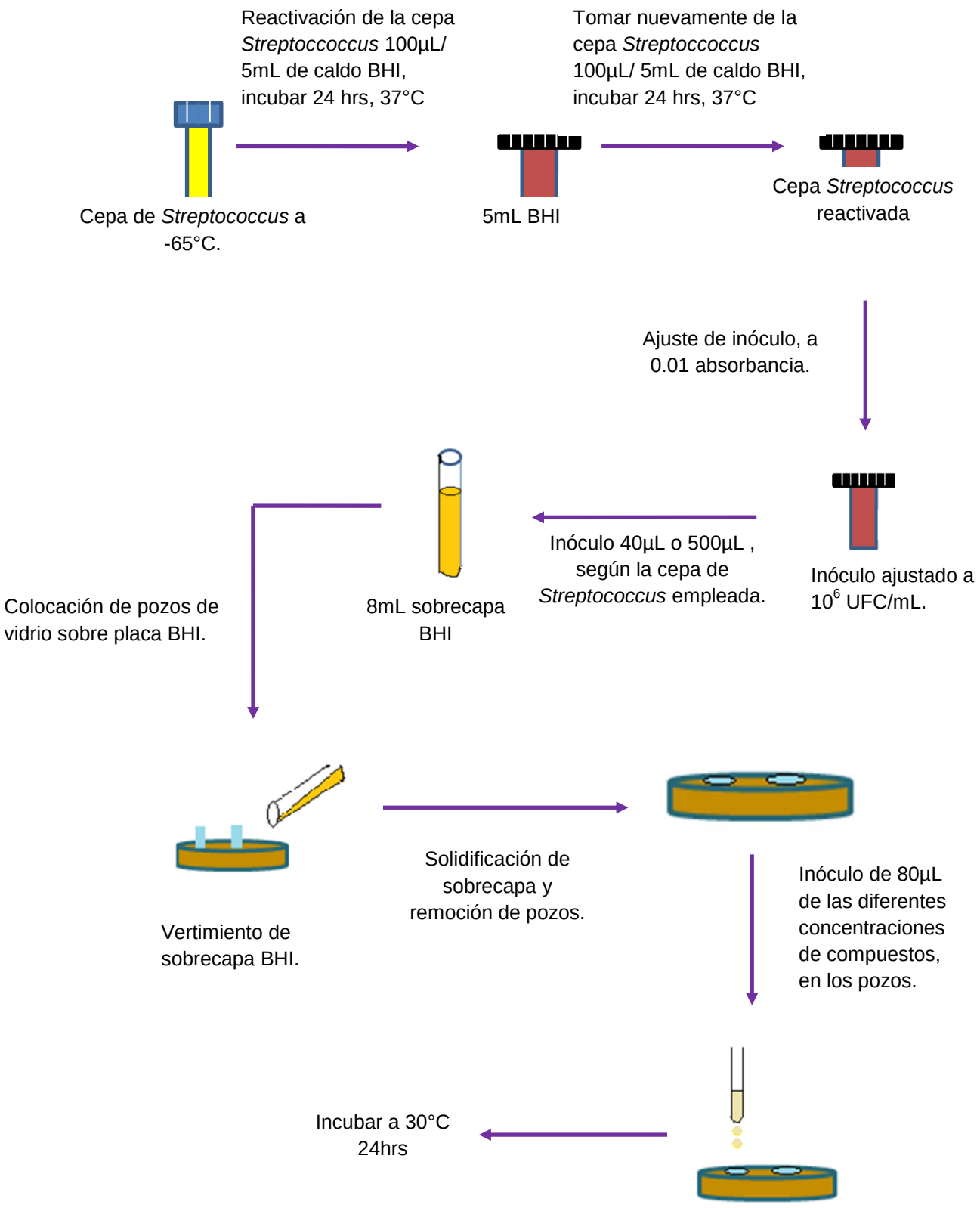


Figura10.- Metodología empleada para buscar la actividad antimicrobiana de los compuestos triterpenoides sobre las cepas de *Streptococcus spp*, por medio del método de difusión en agar (Modificada de Rodríguez 2011).

6.2.7.1. Ensayo para determinar la cantidad de inóculo a utilizar en la prueba de difusión en agar.

a) Reactivación de la cepa: Se inocularon 100 µL de las cepas a evaluar conservadas en glicerol, en 5 mL de medio BHI, los cuales se incubaron a 37°C durante 17 horas. Se tomaron 100 µL de este nuevo cultivo y se inocularon en 5mL de caldo BHI, se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 horas. Después este tiempo, se realizaron las diluciones necesarias, para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL y una D.O. de 0.01, de la bacteria a ensayar.

b) Difusión en placa: De la cepa ajustada a 10^6 UFC/mL, se tomaron 40, 80, 100, 300 y 500 µL, estas cantidades se inocularon en un tubo con 8 mL de agar BHI fundido, dicha cantidad de agar fundido inoculado se vertió sobre una placa de agar BHI, se dejo solidificar y se incubo a 37°C durante 24 horas. La mejor concentración de inóculo fue en la cual el crecimiento de microorganismos fue homogéneo en placa.

6.2.7.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los compuestos triterpenoides modificados y los no modificados, sobre las cepas de *Streptococcus*, mediante la prueba de difusión en agar.

a) Reactivación de la cepa: Se tomaron 100 µL del cultivo conservado en glicerol de cada cepa a evaluar, y se agregaron a viales con 5 mL de medio BHI, los cuales se incubaron a 37°C durante 17 horas. Se tomaron 100µL de este nuevo cultivo y se inocularon en 5 mL de caldo BHI, se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 horas. Después de este tiempo, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una D.O de 0.01 y así llegar a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL, de la bacteria a ensayar (tiempo 0).

b) Compuestos a evaluar: Los compuestos evaluados fueron los controles (ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina) y los compuestos modificados (cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico). Se prepararon 5 mL de la emulsión correspondiente como la metodología descrita en 6.2.4.1.

c) Preparación de la placa de medio BHI: Para la preparación de las placas de medio BHI, se preparó caldo BHI siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo A1). Se le adiciono además 1.7% de agar, marca Bacto® para tener un medio sólido. Ya que todos los componentes se disolvieron, se esterilizó el medio a 121°C y 1atm durante 15 minutos. Una vez que enfrió a 40°C, se distribuyó en cajas petri, colocando 10mL en cada una y dejando enfriar a temperatura ambiente. Para corroborar la esterilidad del medio, las cajas se incubaron a 30°C durante 24 horas.

d) Preparación de sobrecapa de medio BHI: Se preparó caldo BHI según las instrucciones del fabricante. Adicionalmente se le agrego 0.8% de agar marca Bacto® para lograr tener un medio sólido. Se homogeneizaron ambos compuestos con ayuda de una parilla de agitación marca Thermolyne, para después distribuir 7 mL de medio en tubos con tapón de rosca. Finalmente los tubos con medio se esterilizaron a 121°C y 1 atm por 15 minutos.

e) En la placa de agar BHI se colocaron las torres de cristal y en los pozos formados, se agregaron, para el control negativo (agua y Tween® 80), control positivo (clorhexidina al 20%), y los compuestos en las concentraciones de 500, 1000, 1500 y 2000 µg/mL. De las cepas ajustadas a 10^6 UFC/mL, se tomaron 40µL de la cepa *Streptococcus mutans*, y 500µL de las cepas *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*, y se inocularon en la sobrecapa fundida, el medio inoculadó se vierte sobre la placa con las torres de cristal previamente colocadas. Se deja solidificar el medio, se retiran las torres de cristal previamente colocadas, quedando pequeños pozos marcados. En los pozos se agregaron 80 µL del compuesto emulsionado a diferentes concentraciones, y los controles positivo y negativo.

7. Resultados y discusión.

7.1. Resultados

7.1.1. Selección de cepas del género *Streptococcus spp*.

Se realizó la selección de cepas de una colección preservada en el laboratorio, para dicha selección se tomaron en cuenta las principales especies de *Streptococcus* causantes de las principales patologías de la cavidad oral como caries y enfermedades periodontales (Kolenbrander y cols., 2009).

De acuerdo con lo anterior se optó por escoger a *Streptococcus mutans*, pues esta es conocida como una de las principales bacterias causante de la formación de placa y caries dental (Hee Yu y cols., 2007). La otra bacteria seleccionada fue *Streptococcus sanguinis*, ya que indirectamente afecta el proceso de la caries a través de la competencia con *Streptococcus mutans* para habitar los nichos orales existentes, durante la formación de la placa dental (Yim y cols., 2010). Finalmente *Streptococcus oralis*, es una bacteria asociada con la fermentación de carbohidratos y la producción de exoglucosidasas, causantes de la placa.

La evaluación del crecimiento de las cepas fue realizado en medio TSA y caldo BHI, dichos medios fueron seleccionados porque en ellos se observó un mejor crecimiento de las cepas de *Streptococcus*, con las cuales se trabajaría (Hernández 2011). Posteriormente se eligieron las cepas que presentaron el mejor crecimiento en los medios seleccionados, en el caso del medio TSA, además, se observó que las colonias que crecieron tuvieran características propias de la cepa.

Entre las características que se tomaron en cuenta para elegir estas cepas, fue el adecuado crecimiento en placa (con colonias crema, redondas y medianas). Así como una adecuada velocidad de crecimiento.

Se realizó una tinción de Gram a las cepas que presentaron el mejor crecimiento, en un tiempo de 24 horas en medio TSA y 4 horas después de la reinoculación en caldo BHI, para lo cual es importante mencionar que dichos tiempos fueron determinados de acuerdo a la cinética de crecimiento para cada cepa (Hernández (2011). Esto se realizó con la finalidad de observar la morfología, Gram característico y comprobar la pureza de las cepas.

De acuerdo con las características descritas previamente, se realizó la tinción de Gram a las cepas: S. *mutans* (C), S. *sanguinis* (B) y S. *oralis* (C) (tabla 11).

Tabla **11.-** Características al microscopio de las cepas de *Streptococcus*.

Cepa	Gram	Observaciones
***S. mutans* (C) ATCC 10449**	+	Cocos pequeños agrupados en cadena corta, algunos aislados.
***S. sanguinis* (B)**	+	Cocos pequeños, agrupados en cadena y algunos otros aislados.
***S. oralis* (C)**	+	Cocos pequeños, en cadena y aislados, muy pocos pueden verse agrupados.

Mediante esta observación se corroboró la pureza de las cepas, por lo tanto se tomaron como las más apropiadas para la evaluación de la posible capacidad antimicrobiana de los compuestos modificados y control.

7.1.2. Estandarización del inoculo

Ya que se habían seleccionado las cepas de *Streptococcus* con las cuales se realizaría la evaluación de los compuestos modificados, se procedió a llevar un ajuste del inóculo de las mismas, con la finalidad de que la concentración celular fuera constante en todas las evaluaciones posteriores.

Se decidió que la concentración bacteriana en los ensayos sería similar a la cual se encuentran las bacterias patógenas en la cavidad oral cuando hay estado de enfermedad, de acuerdo con Darout y cols., (2002); Braislford y cols., (2001); Li y cols., (2004); en presencia de caries S. *mutans* se encuentra en un orden de hasta 10^6 UFC/mL, S. *oralis* se encuentra en un orden de hasta 10^4 UFC/mL, mientras que S. *sanguinis* se encuentra de 10^3 – 10^4 UFC/mL.

De acuerdo a lo anterior, la concentración inicial de la cepa fue de 10^6 UFC/mL, tomando el inóculo después de las 4 horas de incubación de una cepa reactivada de un cultivo de 17 horas de crecimiento, ya que en este momento las cepas están en una fase de crecimiento acelerado, y llevando este inóculo a una densidad óptica de 0.01 (Hernández 2011).

7.1.3. Determinación de las concentraciones a evaluar en los compuestos control y modificados sobre las cepas de *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Para poder realizar la evaluación de los compuestos, primero se determinó las concentraciones a las cuales se harían los ensayos de la posible actividad antimicrobiana. Para lo anterior, se consideró lo reportado por Hernández (2011), quien reportó que para los compuestos ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina, no hay diferencia significativa (α=5%), entre las concentraciones de 53.33, 100 y 533.33 µg/mL por lo que en el presente trabajo se decidió evaluar concentraciones mayores.

Para ello se utilizó el compuesto control ácido betulínico, donde se realizaron evaluaciones a concentraciones iniciales de 100, 500 y 1000 µg/mL, sobre *S. mutans*, considerada la principal cepa cariogénica, a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL. Para la realización de lo anterior se siguió la metodología descrita en la parte 6.2.4.1 para la formación del compuesto emulsionado y 6.2.5 para la formación de los micromedios.

A continuación se presenta el resultado que se obtuvó de la prueba, expresado en porcentaje de células viables (Figura 11). El porcentaje de células viables se obtuvó tomando como 100% las UFC del control negativo, de ahí se obtuvó la proporción respecto a las UFC obtenidas en cada concentración. Los resultados completos se muestran en el Anexo C1.

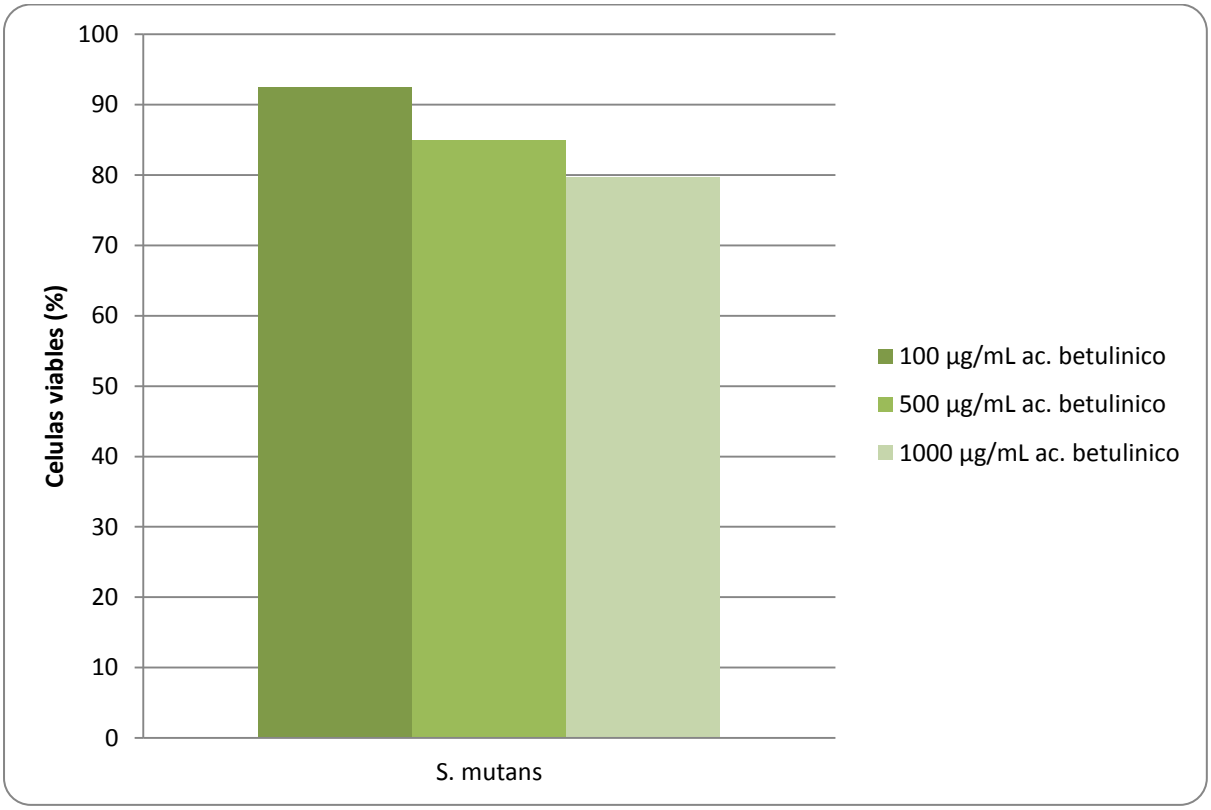


Figura 11.- Efecto del ácido betulínico sobre la cepa *Streptococcus mutans*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, expresado en % de células viables.

En la Figura 11 se puede observar el efecto del ácido betulínico sobre *Streptococcus mutans*, considerada como una de las principales bacterias causantes del desarrollo de enfermedades periodontales (Bratthall y cols., 2005). Se observa que conforme aumenta la concentración del compuesto, el crecimiento microbiano va disminuyendo. Lo que es importante notar, es el porcentaje de disminución de las concentraciones que van de 100 µg/mL a 1000 µg/mL, sólo es del 8% y según Hernández (2011), esta disminución es de medio ciclo logarítmico, además de que estadísticamente (α=5%) no muestra diferencia significativa entre dichas concentraciones.

El ácido betulínico es uno de los que presenta un mejor efecto sobre la cepa de *S. mutans*, junto con el fenilacetato de α-amirina, pero según Hernández (2011) no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 100 µmL y 500 µg/mL con un α=5%.

De acuerdo a lo anterior, se decidió aumentar el rango de concentraciones en los compuestos a evaluar, finalmente las concentraciones que se tomaron, fueron 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL y 2000 µg/mL.

7.1.4. Efecto de los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Se realizó una evaluación de la capacidad antimicrobiana sobre compuestos no modificados, debido a que es necesario tener un parámetro de comparación respecto a los compuestos modificados. Fueron seleccionados el ácido betulínico y el fenilacetato de α-amirina, ya que de acuerdo a Hernández (2011), son de los compuestos con mayor capacidad para inhibir bacterias patógenas presentes en la cavidad oral. El ácido betulínico es un triterpeno de origen natural aislado de varias plantas, entre las cuales están las hojas de *Vitex negundo* (Chandramu y cols., 2003). En plantas mexicanas se ha aislado de *Luffa quevedonis*, encontrada ampliamente en el estado de Chiapas, donde además se encontró ácido oleanólico (Instituto de Química. UNAM., 2006).

Según Hernández (2011), el efecto del ácido betulínico logra una reducción en la concentración microbiana en especial y de manera significativa sobre la cepa de *S. mutans*. El ácido betulínico en una concentración de 2000 µg/mL, puede inhibir hasta tres ciclos logarítmicos respecto al control negativo (medio sin compuesto) . Además se sabe que el ácido betulínico posee una considerable actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas (Schühly y cols., 1999).

El fenilacetato de α-amirina, fue otro de los compuestos que se decidió usar como control, ya que de acuerdo con Hernández (2011), el efecto de este compuesto sobre la cepa de S. *mutans* genera una reducción en la cuenta viable, de casi un ciclo logarítmico. Además, este compuesto también resulto tener un mayor efecto sobre las cepas de *S. mutans, S. sanguinis y S. oralis,* con respecto a otros compuestos evaluados en su trabajo, tales como los triterpenos de α- y β-amirina.

7.1.4.1. Pruebas de macrodilución sobre los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Para llevar a cabo la evaluación de los compuestos triterpenoides no modificados, con la prueba de macrodilución, se realizaron las metodologías previamente descritas en 6.2.4 y 6.2.6, dónde se llevó a cabo la evaluación con los compuestos no modificados sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL. Se utilizaron las siguientes concentraciones de compuesto, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL y 2000 µg/mL.

En las Figuras 12 y 13 se puede ver el efecto de los compuestos evaluados sobre el crecimiento de *Streptococcus*, expresados en porcentaje de células viables. Los resultados completos para el efecto del ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre las cepas de estreptococos se pueden observar en el Anexo C2.

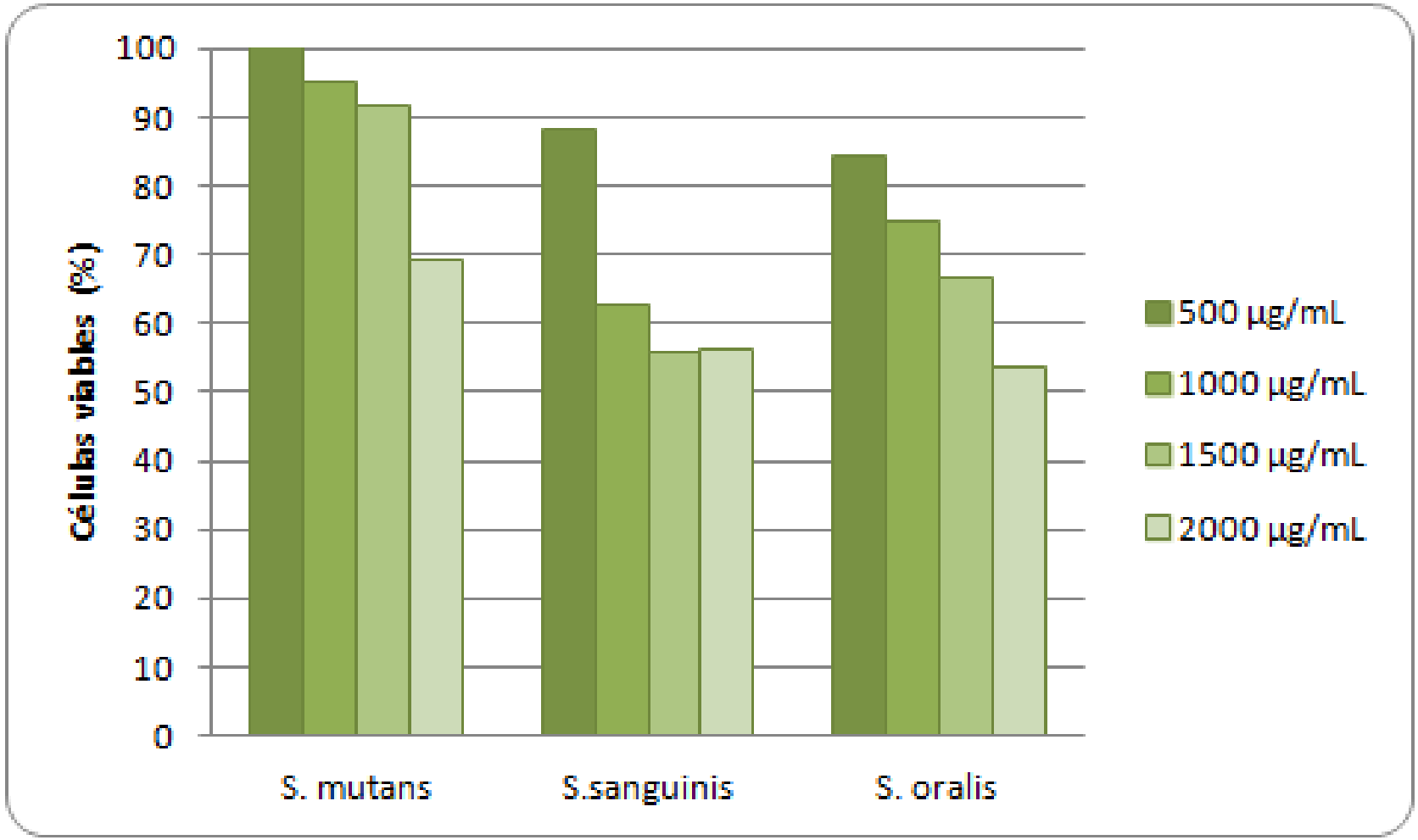


Figura 12.- Efecto del compuesto control ácido betulínico sobre especies de *Streptococcus spp*.

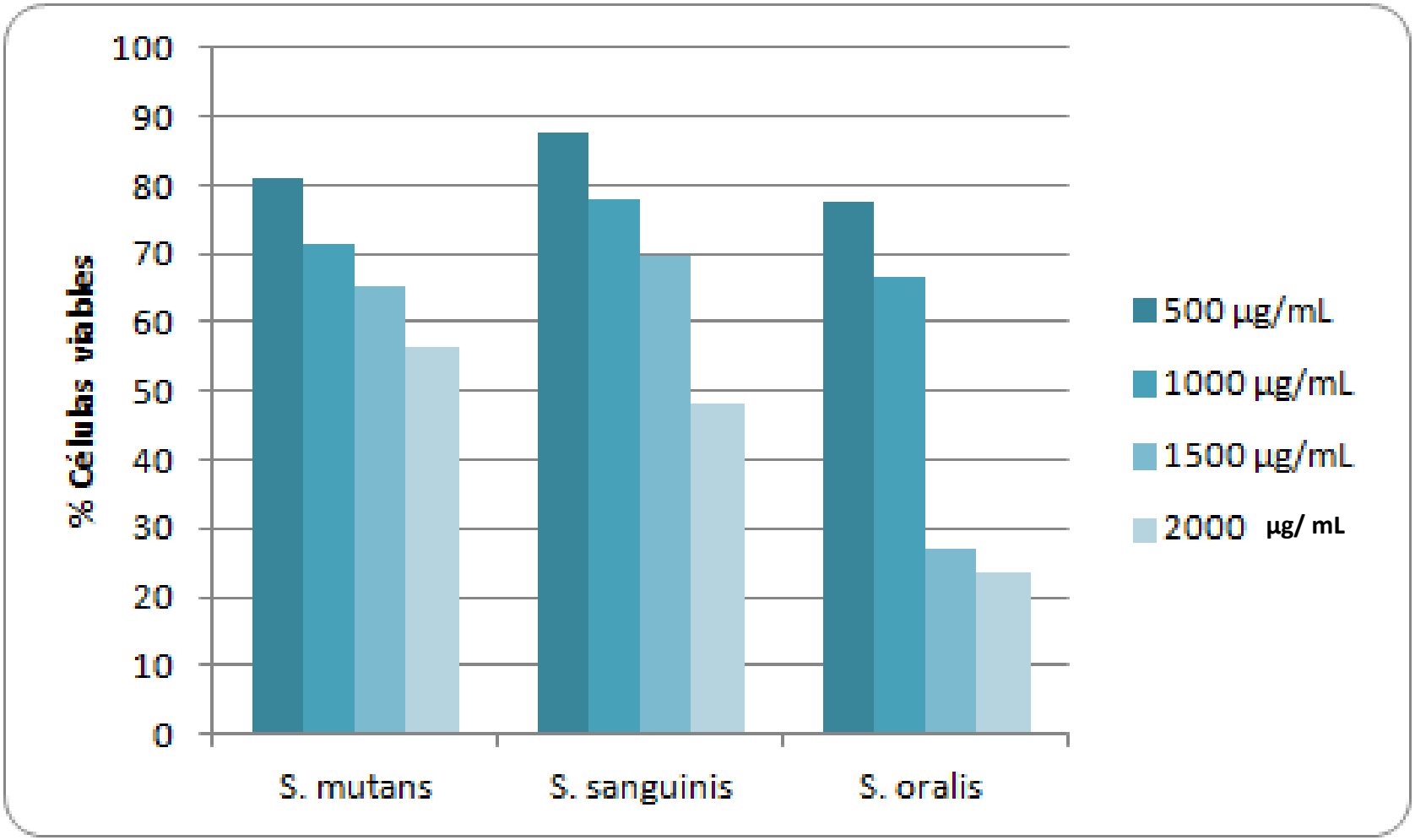


Figura 13.- Efecto del compuesto control fenilacetato de α-amirina sobre especies de *Streptococcus spp*.

En la Figura 12 se puede observar el efecto del ácido betulínico sobre las cepas de *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, al aumentar la concentración del compuesto, disminuye la concentración de células viables, lo cual era de esperarse, pues de acuerdo a Hernández (2011) se observa una tendencia a disminuir la concentración de las cepas conforme aumenta la concentración del compuesto, presentando una diferencia significativa con un α=5% respecto al control, en la concentración de 2000 µg/mL.

De acuerdo al análisis estadístico del presente trabajo (Anexo D), para el compuesto ácido betulínico, no existe diferencia significativa a partir de la concentración de 500 µg/mL, pero si a partir de la de 1000 µg/mL, tomando en cuenta todas las cepas. En todos los casos se puede ver que el efecto del compuesto a una concentración de 2000 µg/mL es mayor que las demás concentraciones, existiendo una diferencia significativa con un α=5% en los dos compuestos a esta concentración. Además de encontrarse que hay una diferencia significativa entre las especies de estreptococos evaluadas, observándose un mayor efecto sobre *S. mutans*.

Algo similar ocurre con el fenilacetato de α-amirina (Figura 13), donde también se observó una disminución en la concentración de células viables, al aumentar la concentración del compuesto. De acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) no hay diferencia significativa en las concentraciones de 500 µg/mL y 1000 µg/mL, sólo a partir de la concentración de 1500 µg/mL. Nuevamente se puede observar que hay una mayor disminución en la cuenta de células viables a la concentración de 2000µg/mL, existiendo una diferencia significativa para todos los casos evaluados. Entre las cepas de estreptococos evaluadas, también se observa diferencia significativa, observándose un mayor efecto sobre *S. oralis*.

Existe un mayor efecto por parte del compuesto no modificado ácido betulínico, respecto al fenilacetato de α-amirina, además de que este muestra un mayor efecto sobre *S. mutans*, que es una de las principales cepas con mayor participación sobre la caries y otras enfermedades.

Lo que posiblemente confiere su mayor actividad al ácido betulínico, respecto al fenilacetato de α-amirina, sobre las cepas de estreptococos, es la presencia del grupo hidroxilo que se encuentra en la posición 3 de la molécula (Tanachatchairatana y cols., 2008).

El comportamiento mostrado por parte del ácido betulínico, es una tendencia que posiblemente era de esperarse, ya que este compuesto muestra una buena actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias del género *Mycobacterium*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de hasta 50 µg/mL (Tanachatchairatana y cols., 2008).

En cambio, en la molécula fenilacetato de α-amirina, se observa un grupo donador de hidrógenos (HBD) y un metilo con bastante cercanía al HBD, lo cual, si bien no es un factor para limitar la capacidad antimicrobiana del compuesto, podría disminuir esta en cierto grado (Mutai y cols., 2009).

Derivados del compuesto α-amirina, como acetatos y formiatos también muestran capacidad antimicótica, especialmente contra una de las levaduras presentes en la cavidad oral, *Candida albicans* (Johann y cols., 2007). Por lo que también era posible que se diera una tendencia a disminuir la concentración de bacterias del género *Streptococcus*.

Si tomamos como parámetro la definición de Ríos y Recio (2005), entonces, para ensayos antimicrobianos, extractos de plantas, aceites esenciales y compuestos aislados de fuentes naturales, concentración mínima inhibitoría (CMI) mayores a 1mg/mL y extractos puros con CMI mayores a 0.1 mg/mL, son extractos o metabolitos con poca actividad. Por otro lado, extractos y componentes aislados en concentraciones menores a 100 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente, son considerados compuestos interesantes y prometedores en la búsqueda de agentes antimicrobianos.

De acuerdo a esta definición se puede decir que estos compuestos no presentan actividad antimicrobiana prometedora, ya que aún por encima de 2000 µg/mL no se observa una inhibición total del crecimiento bacteriano, sin embargo, si se puede observar una disminución de el porcentaje de células viables, por parte de ambos compuestos, entonces se puede decir que hay un efecto bacteriostático por parte de los compuestos control (no modificados), sobre las cepas de estreptococos.

Con la modificación estructural de estas moléculas, al introducir un metil éster en el ácido betulínico y un acetato en la molécula α-amirina se espera una mejora de la actividad antimicrobiana, sobre cepas patógenas de la cavidad oral del género *Streptococcus spp*.

7.1.4.2. Determinación de la cantidad de inóculo a utilizar, de las cepas de *Streptococcus* a una concentración de 10^6 UFC/mL. Para la prueba de difusión en agar.

Para realizar la evaluación de los compuestos modificados y control, con la prueba de difusión en agar, se consideró hacer pruebas de crecimiento de la cepa en el medio BHI sólido, agregando diferentes cantidades de inóculo, con la cuenta estándar de 10^6 UFC/mL, para asegurar que en la placa pudiese ser observable un crecimiento homogéneo de la bacteria, adecuado para que en pruebas posteriores los posibles halos formados por acción del compuesto pudieran ser observados.

De acuerdo a Rodríguez (2011), se reporta que la cantidad de inóculo a utilizar es de 40 µL, prueba estandarizada para observar la inhibición de bacterias patógenas debido a las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, por lo que se realizaron pruebas usando un rango entre 40 y 500 µL, esto se realizó porque el género de las bacterias utilizadas no es el mismo que el reportado en literatura, por lo que el crecimiento posiblemente sea diferente. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

En todos los casos se estandarizó el inóculo según lo descrito en la metodología 6.2.3, a partir de este inóculo estandarizado se inocularon por extensión en placa las cantidades indicadas en la Tabla 12, se incubaron 24 horas a 37°C. Si se observaba un crecimiento uniforme y homogéneo en la placa al pasar dicho tiempo, se tomó como la cantidad de inóculo adecuado, para la posterior realización de la prueba de difusión en agar.

Tabla 12.- Pruebas de crecimiento con cantidades diferentes de inóculo.

	Cepa	**Cantidad de inóculo (µL)**				
		40	**80**	**100**	**300**	**500**
Observaciones	**S. *mutans***	Se observa crecimiento adecuado.	*	*	*	*
	S. *sanguinis*	-	-	-	Muy poco crecimiento, no observable a simple vista.	Crecimiento adecuado homogéneo y uniforme.
	S. *oralis*	-	-	-	Se observa un crecimiento muy escaso.	Crecimiento adecuado homogéneo y uniforme.

-.- Crecimiento no observable.

*.- Pruebas que ya no hubo necesidad de realizar.

Como se puede observar en la tabla 12, se necesitó una mayor cantidad de inoculo para las cepas S. *sanguinis* y S. *oralis*, lo cual era de esperarse, pues de acuerdo a la morfología de crecimiento de las colonias de estas cepas, son blancas y pequeñas, por lo que a bajas cantidades de inóculo, es apenas observable el crecimiento de la bacteria. Por esta razón se fue aumentando la cantidad de inóculo, hasta que en 500 µL se consiguió llegar a la cantidad adecuada, en la que el crecimiento fuera observable y uniforme. En cambio para la cepa *S. mutans*, se necesitaron sólo 40 µL de inóculo, también es concordante pues esta bacteria forma colonias grandes, color crema y redondas, crecimiento característico de la cepa, finalmente el crecimiento se observó mejor y uniforme con esta cantidad de inóculo.

7.1.4.3. Pruebas de difusión en agar sobre los compuestos triterpenoides control, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Es una prueba para analizar si existió inhibición sobre algunas de las cepas patógenas de la cavidad oral del género *Streptococcus*, y si esta pudiera ser debida a los compuestos utilizados.

De acuerdo con los resultados descritos en la Tabla 13, se observa que los halos formados por parte de los compuestos control en la mayoría de casos fueron opacos y en muy pocas concentraciones claros, así mismo, en todos los casos se observa que en la mayor concentración se forma el mayor tamaño de halo. El ácido betulínico muestra una mejor efectividad sobre la cepa *S. oralis*, pues para esta bacteria, en todas las concentraciones se observa una formación de halos opacos y medianamente opacos.

Para el compuesto fenilacetato de α-amirina se observa un efecto similar sobre las cepas *S. mutans* y *S. oralis*, pues los diámetros de los halos formados por parte del compuesto para esta cepa son todos aproximadamente de 13 mm, nuevamente observándose un mejor efecto del compuestos sobre la cepas a la mayor concentración, la cual es de 2000 µg/mL.

La cepa *S. sanguinis* es en la que se observa menos acción por parte de ambos compuestos, pues se observa que sólo en las concentraciones de 1500 µg/mL y 2000 µg/mL hay formación de un halo opaco por parte del compuesto ácido betulínico y en el caso del fenilacetato de α-amirina se observa la formación de halo opaco sólo en la mayor concentración, la cual es de 2000 µg/mL.

Tabla 13.- Efecto de los compuestos control ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre las especies de *Streptococcus* a una concentración de 10^6 UFC/mL, para la prueba de difusión en agar.

Cepas	Concentración µg/mL	Compuestos control	
		Ácido betulínico	**Fenilacetato de α-amirina**
S. mutans	Control (+)	32.1mm***	32.9mm***
	500	--	--
	1000	--	
	1500	--	13.5mm*
	2000	14mm**	13mm*
S. sanguinis	Control (+)	29.2mm***	31.3mm**
	500	--	--
	1000	--	--
	1500	12.2mm*	--
	2000	13mm*	12.8mm**
S. oralis	Control (+)	30.2mm***	31.5mm***
	500	12.2mm*	--
	1000	12.4mm*	--
	1500	14.8mm**	13.3mm**
	2000	14.6mm***	13.8mm**

*opaco, ** medianamente opaco, ***: medianamente claro

A continuación, se muestra una imagen (Figura 14) donde se observa la prueba de difusión en agar del compuesto control ácido betulínico, sobre la cepa *S. mutans*, en el que se utilizó digluconato de clorhexidina al 20% como control positivo, este es un compuesto utilizado contra la placa dental y el desarrollo de la caries dental (Fitzgerald y cols., 1986). En la placa se observa el halo de inhibición formado por el control positivo, en contraste en el control negativo (agua y Tween® 80) no se observa ninguna inhibición.

En las concentraciones de 500 µg/mL, 1000 µg/mL y 1500 µg/mL, para el compuesto ácido betulínico sobre la cepa *S. mutans*, no se observa inhibición de la bacteria, ya que no se forman halos de inhibición, una disminución en el crecimiento microbiano es visible hasta la concentración más alta, a 2000 µg/mL.

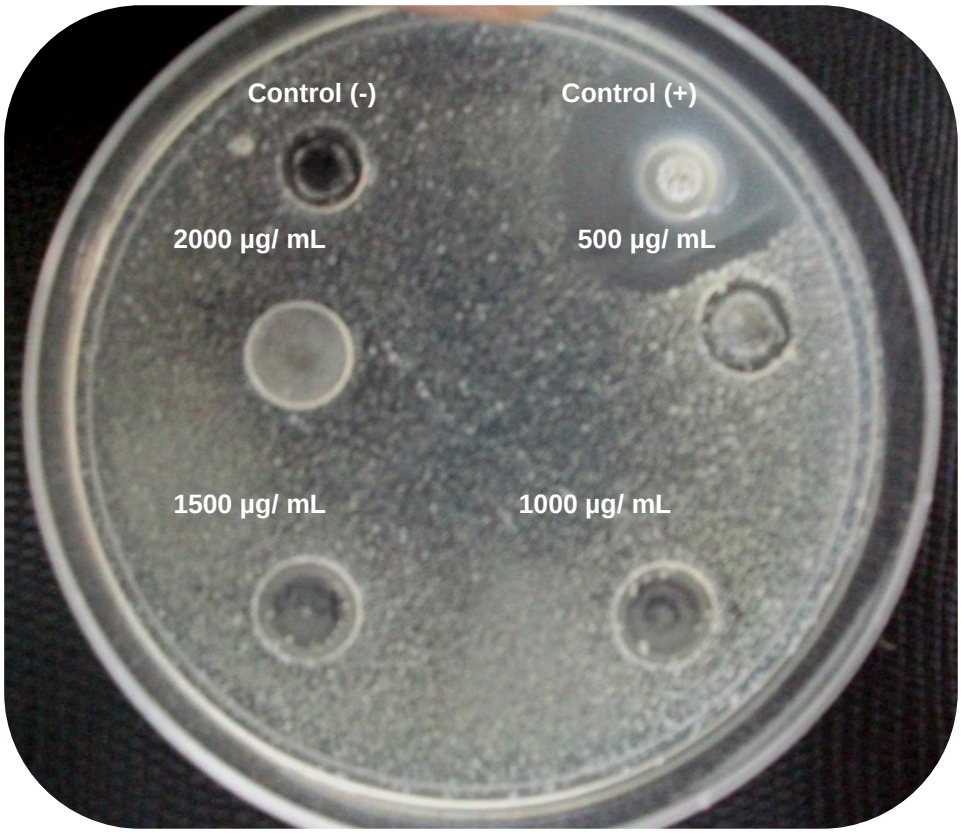


Figura 14.- Efecto del compuesto control ácido betulínico sobre la cepa *S. mutans*.

En general se pudo observar que el ácido betulínico no muestra una acción bactericida, pues no hay halos claros comparables con el control positivo, lo que hubiera indicado una inhibición total de la bacteria, por lo tanto se puede decir que hay una acción bacteriostática por parte del compuesto ácido betulínico sobre las especies de *Streptococcus spp*. Este efecto se observa con la formación de halos opacos en la placa, lo que nos índica que hay una disminución del crecimiento bacteriano, pero no una inhibición del mismo.

Se puede observar que en las concentraciones más altas (1500 y 2000 µg/mL), hay una disminución en el crecimiento de la bacteria, lo que se pudo observar en torno a los pozos correspondientes, pues a pesar de que no se observa un halo claro como tal, si se alcanza a ver que el área alrededor del pozo presenta una disminución en el crecimiento bacteriano. En la Tabla 13 se puede observar que en la concentración de 2000 µg/mL los halos formados son medianamente opacos de aproximadamente de 15 mm.

El efecto del ácido betulínico sobre *S. sanguinis* es mínimo, en la Tabla 13 se observa que la formación del halo fue de 14 mm y opaco hasta la concentración de 2000 µg/mL, además no se ve afectado el crecimiento de la bacteria, pues comparando el control (+) con las demás concentraciones se puede ver que no hay presencia de halos en ninguna de estas. A pesar de que se cree que S. *sanguinis* tiene un bajo potencial cariogénico, se ha reportado que es resistente a fármacos (Yim y cols., 2010). En este aspecto se puede decir que incluso el halo formado por el control positivo es menos claro que los formados en las placas de las otras bacterias, S. *mutans* y S. *oralis*.

El efecto del ácido betulínico sobre *S. oralis* es claro, se pudo ver que conforme va aumentando la concentración del compuesto, va disminuyendo el crecimiento de la bacteria, incluso desde la concentración de 1000 µg/mL, se puede ver la formación de halos medianamente visibles alrededor del pozo, y aunque el tamaño del halo no varía de una concentración a otra, si la claridad del mismo, en función del crecimiento de la bacteria.

Aunque se considera que *S. oralis* es una bacteria de baja virulencia, si es una bacteria implicada en el desarrollo de enfermedades cardiacas (Thaler y cols., 2001), además es sensible a antibióticos, como penicilina, vancomicina y gentamicina (Hart y cols., 2006).

Para el caso del compuesto fenilacetato de α-amirina, sobre las especies de *Streptococcus spp*, en general, se pudo observar que la acción de este, provoca una disminución en el crecimiento de la bacteria, conforme va aumentando la concentración se puede ver que el crecimiento alrededor del pozo correspondiente va disminuyendo.

Para el caso de la bacteria *S. mutans* es claro, pues incluso en las concentraciones más altas (1500 y 2000 µg/mL) es posible ver ligeros halos alrededor del pozo.

Respecto a la bacteria *S. sanguinis*, nuevamente se puede observar que la acción del compuesto fenilacetato de α-amirina es mínimo frente a esta bacteria, sólo hasta la concentración de 2000 µg/mL fue posible observar una inhibición. En cambio, para la cepa *S. oralis* se observa una inhibición en el crecimiento de la bacteria a las últimas concentraciones, incluso para esta bacteria los halos de inhibición son más claros.

De los compuestos no modificados se puede decir que probablemente tengan una actividad antimicrobiana débil, pues se sabe que la actividad antibacteriana en pruebas de difusión fue clasificada de acuerdo a lo siguiente: muy fuerte corresponde a un diámetro ≥30 mm, fuerte, corresponde a un diámetro 21-29 mm, moderado, corresponde a un diámetro de 16-20 mm; débil, corresponde a un diámetro ≤10 mm (Lee y cols., 2004). En las pruebas de difusión en agar no se observa una total inhibición de la bacteria, ya que los halos formados en casi todas las concentraciones, resultan ser opacos y sólo en la concentración de 2000 µg/mL para la cepa *S. oralis* se observan los halos más claros, pero no comparados con el control positivo. Además dichos halos tienen un diámetro de 15 mm aproximadamente. De acuerdo a lo anterior y si tomamos en cuenta la definición dada por Lee y cols. (2004), se puede decir que la actividad antimicrobiana de estos compuestos es débil.

Las metodologías utilizadas para la evaluación de estos compuestos, tanto la prueba de macrodilución (6.2.6) como la prueba de difusión en agar (6.2.7), ambas son pruebas que determinan la capacidad de compuestos triterpenoides para inhibir bacterias, en particular para el presente trabajo, la inhibición de bacterias patógenas de *Streptococcus,* presentes en la cavidad oral. Para el desarrollo de ambas metodologías fue importante la solubilización de los compuestos triterpenoides en agua, pues su difusión en ambos casos, es en medios polares.

Respecto a la evaluación de los compuestos control con ambas metodologías, como era de esperarse, muestra resultados similares, pues en ambos casos se observa una disminución de la concentración bacteriana conforme aumenta la concentración del compuesto.

Para el ácido betulínico hay una diferencia significativa a partir de 1000 µg/mL en la prueba de macrodilución, aunque en las pruebas de difusión en agar se observa hasta 1500 µg/mL. Así mismo, de acuerdo a la prueba de macrodilucion se observa un mayor efecto sobre la cepa *S. mutans*, en cambio en la prueba de difusión en agar se observa un mayor efecto por parte del compuesto sobre *S. oralis*, aunque hay que recordar que en la prueba de macrodilución se realizó un análisis estadístico (α=5%), según lo descrito en el anexo D, a diferencia de la prueba de difusión en agar que fue cualitativa.

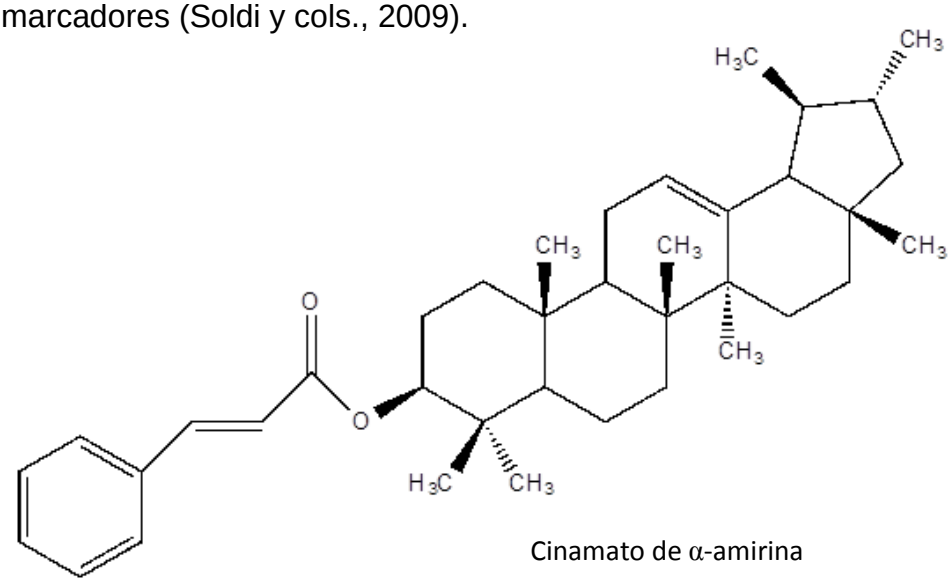
Para el fenilacetato de α-amirina hay una diferencia significativa a partir de 1500 µg/mL en la prueba de macrodilución, al igual que en las pruebas de difusión en agar, donde a partir de esta concentración se observan halos opacos. Además en ambas pruebas se observa un mayor efecto sobre la cepa *S. oralis*.

7.1.5. Efecto de los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

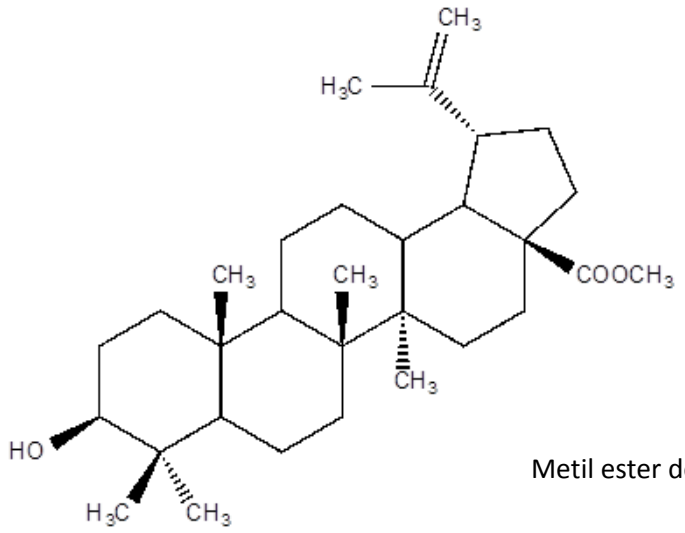
Esta evaluación se realizó con la finalidad de observar las posibles mejoras de la actividad antimicrobiana de los compuestos modificados cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico (Figura 15), respecto a los compuestos control.

Se seleccionaron estos compuestos debido a que sus homólogos no modificados, resultaron ser los más activos que una serie de compuestos evaluados por Hernández (2011). Los compuestos que se utilizaron en el trabajo fueron modificados vía enzimática, a partir de compuestos extraídos de fuentes naturales. Adicionalmente, se sabe que la introducción de un grupo cinamoil, en el carbono 3 del ácido betulínico, resulta en un aumento en la capacidad antimicrobiana de la molécula, sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Tanachatchairatana y cols., 2008).

Incluso se puede modificar su absorción y distribución de los compuestos en los organismos, pues es bien conocida la especificidad de las moléculas hacia algunos marcadores (Soldi y cols., 2009).



Cinamato de α-amirina



Metil ester del ácido betulínico

Figura 15.- Estructuras de los compuestos modificados, cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico.

7.1.5.1. Pruebas de macrodilución de los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico, sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Para llevar a cabo la evaluación de los compuestos triterpenoides modificados, se realizaron las metodologías previamente descritas en 6.2.6 y 6.2.7, dónde se llevo a cabo la evaluación con los compuestos modificados sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL. Con las siguientes concentraciones de los compuestos: 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL y 2000 µg/mL.

Se pueden ver los resultados expresados en porcentaje de células viables (Figuras 16 y 17), los resultados completos del efecto del cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico, sobre las cepas de estreptococos se pueden observar en el Anexo C3.

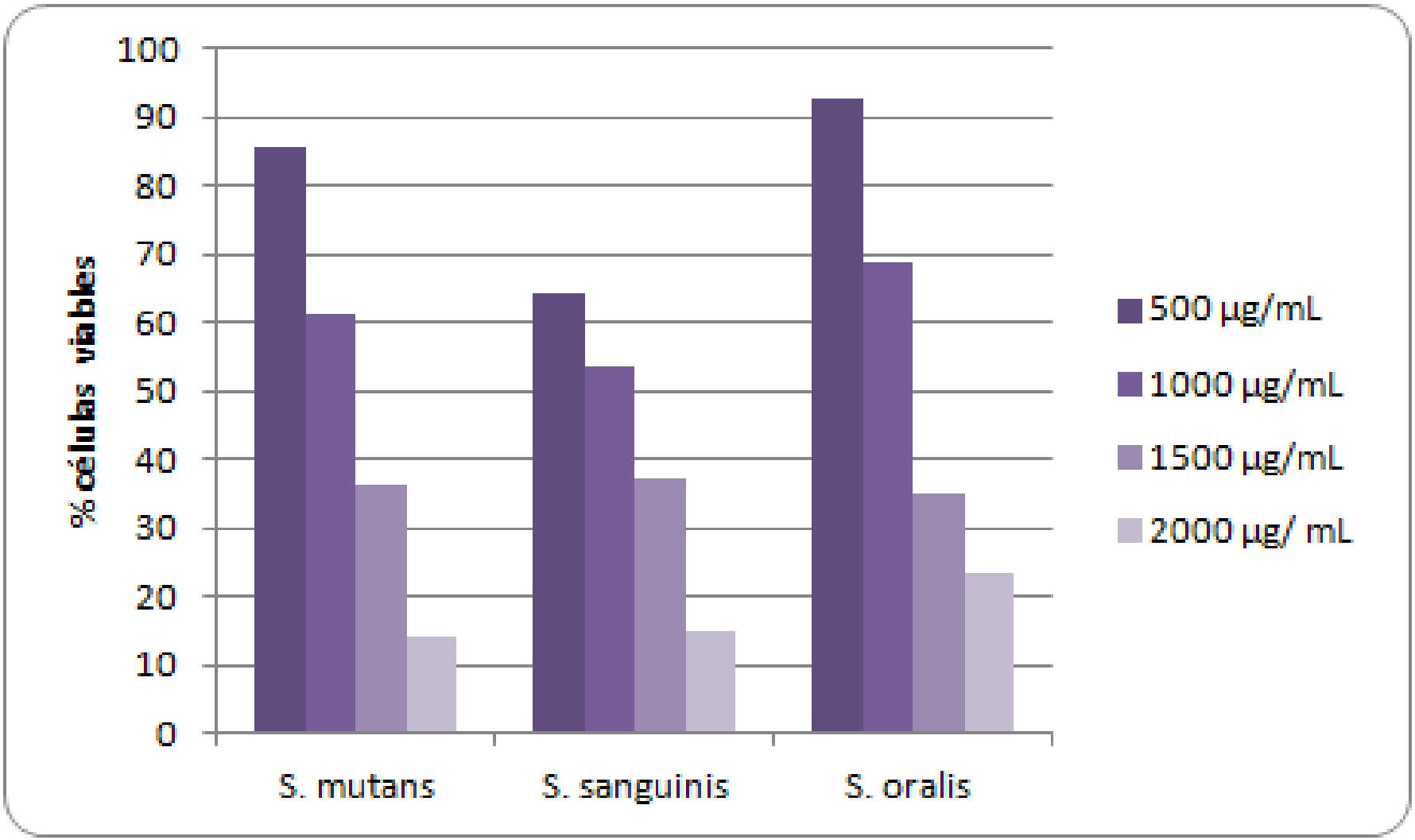


Figura 16.- Efecto del compuesto modificado cinamato de α-amirina sobre especies de *Streptococcus. spp*.

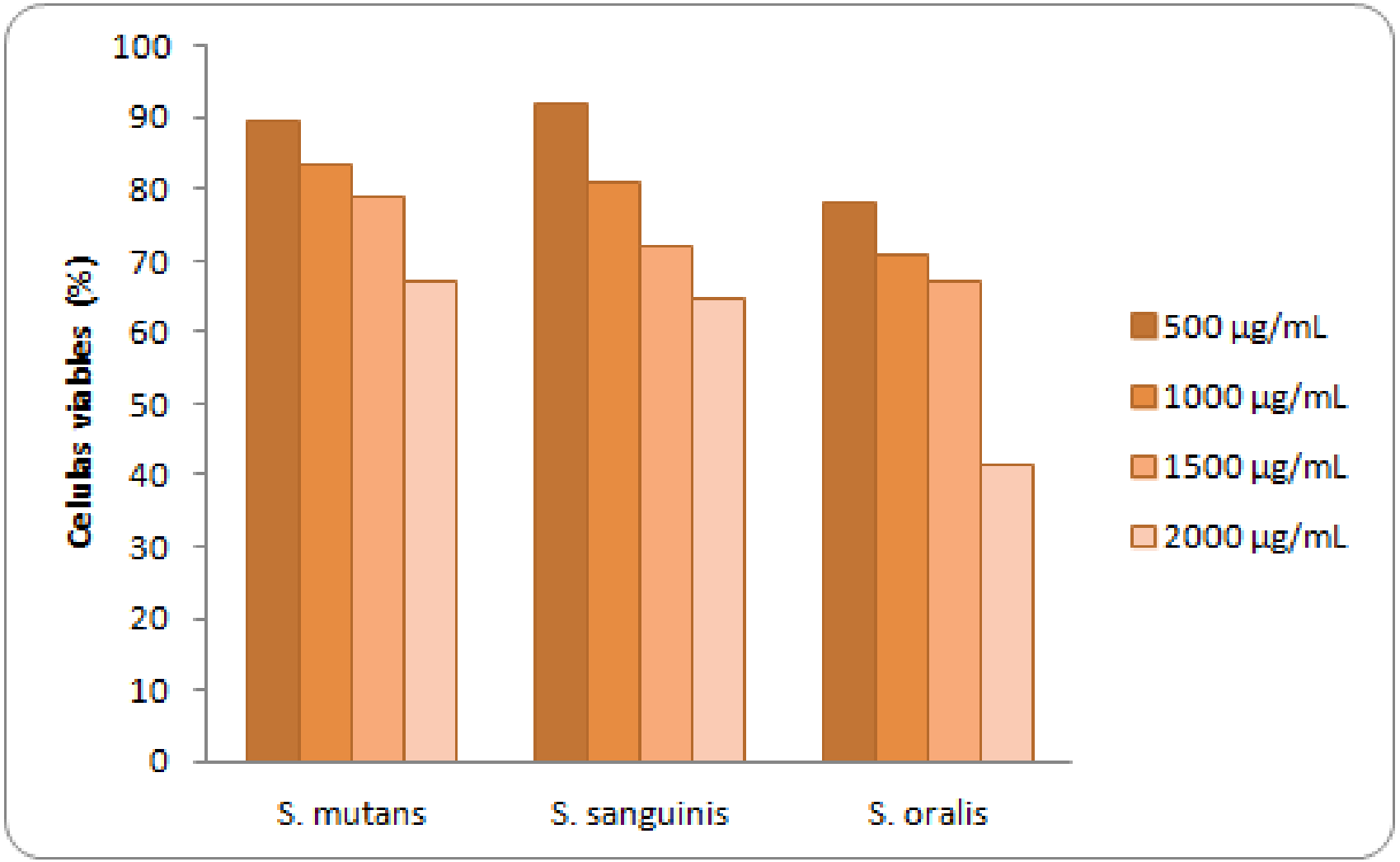


Figura 17.- Efecto del compuesto modificado metil éster del ácido betulínico sobre especies de *Streptococcus spp*.

Respecto al compuesto modificado cinamato de α- amirina (Figura 16), para las tres especies de *Streptococcus spp*, se observa que conforme aumenta la concentración, disminuye el porcentaje de células viables. Para la cepa *S. mutans*, el porcentaje de células viables en la concentración de 1000 µg/mL fue del 61% y de acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) a partir de esta concentración existe diferencia significativa (α=5%). Para la cepa *S. sangunis*, se observa que el porcentaje de células viables en la concentración de 1000 µg/mL es aproximadamente del 54%, para *S. oralis* es del 69%. De acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) a partir de esta concentración existe diferencia significativa (α=5%). El efecto del compuesto cinamato de α-amirina (Figura 16), sobre la cepa *S. mutans*, es significativo (α=5%), respecto a las cepas *S. sanguinis* y *S. oralis*. Lo que indica que el compuesto tiene una mayor acción sobre la cepa *S. mutans*, en todas las concentraciones evaluadas.

Si comparamos lo anterior con los compuestos control, se observa que el ácido betulínico presenta una diferencia significativa (α=5%), a partir de 1000 µg/mL, sin embargo, los porcentajes de sobrevivencia para dicha concentración son más altos, que en el compuesto modificado. Si comparamos con el fenilacetato de α-amirina, este presenta diferencia significativa en 1500 µg/mL, a comparación de cinamato de α-amirina (compuesto modificado) que presenta diferencia significativa a partir de 1000 µg/mL.

La introducción de un cinamato en la posición 3 de la molécula ácido betulínico, genera un compuesto que muestra una buena actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) mayor a 200 µg/mL, (Tanachatchairatana y cols., 2008). Se realizó una sustitución similar sobre la α-amirina, en el presente trabajo. Sin embargo se realizó la evaluación sobre bacterias del genero *Streptococcus*. Ya que se introdujo un cinamato en la posición 3 a la molécula α-amirina, de acuerdo a Tanachatchairatana (2008), la introducción de este grupo en moléculas que tienen como base estructuras tipo triterpenos, representa una mejora en la actividad antimicrobiana del compuesto.

Se observó que la sola introducción del cinamato en el ácido ursólico y ácido betulínico no produjo un efecto significativo respecto a la acción antimicrobiana, sin embargo la sustitución de este grupo sobre el ácido oleanólico, si produce un efecto considerable.

De acuerdo con lo anterior se puede decir que la introducción del cinamato es lo que provoca el aumento en la capacidad antimicrobiana para el caso particular del ácido oleanólico, por lo tanto las posibles mejoras en la capacidad antimicrobiana de un compuesto, también dependen de la estructura que se tenga como base para la sustitución de grupos. La presencia de un grupo donador de electrones (HBD), índica el aumento en la capacidad antimicrobiana (Porto y cols., 2009). La presente molécula evaluada (cinamato de α-amirina) presenta un HBD en el carbono 3 en la molécula base triterpenoide, este es otro factor que índica la mejora en las características de la molécula.

Respecto al compuesto modificado metil éster del ácido betulínico (Figura 17), para las tres cepas se puede observar que conforme aumenta la concentración del compuesto, disminuye el crecimiento bacteriano, para la cepa *S. mutans* el porcentaje de células viables en la concentración de 1000 µg/mL es aproximadamente del 83% y de acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) a partir de esta concentración existe diferencia significativa (α=5%).

En la cepa *S. sanguinis*, para la concentración de 1000 µg/mL, se puede observar que el porcentaje de células viables es aproximadamente del 80%, al igual que para la cepa *S. oralis* que presenta un porcentaje de sobrevivencia aproximado del 73%, de acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) a partir de esta concentración existe diferencia significativa (α=5%). El compuesto metil éster del ácido betulínico, de acuerdo al análisis estadístico (Anexo D) presenta una diferencia significativa para todas las especies de *Streptococcus spp*, lo que indica que este compuesto no presenta un efecto especialmente mayor, sobre alguna de las tres cepas.

Haciendo una comparación entre los compuestos control (no modificados) y el metil éster del ácido betulínico (compuesto modificado), este muestra diferencia significativa (α=5%), a partir de la concentración de 1000 µg/mL, al igual que el ácido betulínico (compuesto control) sin embargo los porcentajes de sobrevivencia a esta concentración son más altos. Para el metil éster del ácido betulínico (control) se observa diferencia significativa hasta la concentración de 1500µ/mL, para el modificado es 1000 µg/mL.

De acuerdo con lo anterior, probablemente el metil éster del ácido betulínico (compuesto modificado), no muestre una capacidad antimicrobiana considerablemente mayor, respecto a la molécula que se tomó como base para su elaboración (ácido betulínico). Aunque en general la introducción de un grupo metil o acetil a la molécula provoca el aumento de la capacidad antimicrobiana (Mutai y cols., 2009).

De acuerdo con la definición dada por Ríos y Recio (2005), los compuestos modificados no tienen un efecto bactericida, ya que no hay inhibición total del crecimiento bacteriano, ni aún a la mayor concentración. A pesar de que no tienen efecto bactericida, si presentan un efecto bacteriostático.

Es de particular interés observar las diferencias que hay entre la acción antimicrobiana por parte de los compuestos modificados, respecto a los control (no modificados), para ello se realizó el análisis estadístico pertinente (Anexo D) donde se tomaron en cuenta los diferentes factores que influyen en la prueba de macrodilución sobre las bacterias, tales como, la cepa, los compuestos triterpenoides control y modificados, así como la concentración.

Donde se encontró que hubo diferencia significativa (α=5%) entre todos los compuestos evaluados, ya sea entre los compuestos control y los modificados, así como entre los controles. Sin embargo no hay diferencia significativa entre los compuestos modificados, lo que quiere decir que ambos compuestos actúan de la misma manera sobre las especies evaluadas de *Streptococcus.*

Se observó que hay una diferencia significativa (α=5%) entre el ácido betulínico (control) y los compuestos modificados cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico, es importante notar que de acuerdo al análisis estadístico, el compuesto cinamato de α-amirina ejerce un efecto antimicrobiano, ligeramente mayor, respecto al ácido betulínico, incluso por encima que el metil éster del ácido betulínico. Aunque la acción que ejerce el cinamato de α-amirina sobre el metil éster del ácido betulínico no muestra diferencia significativa (α=5%).

Para el compuesto fenilacetato de α-amirina (control) se observa nuevamente que existe diferencia significativa respecto a los compuestos modificados, donde es de particular interés notar que el cinamato de α-amirina (compuesto modificado) ejerce una mayor acción antimicrobiana respecto al ácido betulínico (control), incluso por encima del metil éster del ácido betulínico.

Entonces si consideramos los compuestos modificados, resulta que al hacer la comparación entre estos y los controles (compuestos no modificados) para la prueba de macrodilución, se puede notar una mayor eficacia por parte del cinamato de α-amirina, respecto al otro compuesto modificado metil éster del ácido betulínico, aunque esta diferencia no es significativa.

Se observa que los compuestos modificados presentan una diferencia significativa a partir de la concentración de 1000 µg/mL, al igual que el compuesto control ácido betulínico, sin embargo este compuesto presenta un mayor porcentaje de sobrevivencia de bacterias a esta concentración, y realizando el análisis estadístico (Anexo D) tomando en cuenta todas las concentraciones, resulta haber una diferencia significativa (α=5%), entre este compuesto no modificado y los que si fueron modificados, resultando más efectivos los compuestos con modificaciones.

Entonces, no existe diferencia significativa (α=5%) entre ambos compuestos modificados, pero si la hay entre los compuestos modificados y los controles, observándose un mayor efecto antimicrobiano por parte de los compuestos modificados.

7.1.5.2. Pruebas de difusión en agar sobre los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico, sobre las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 14, se observa que los halos formados por parte de los compuestos modificados, en la mayoría de casos fueron opacos y en muy pocas concentraciones se observaron claros, así mismo, en todos los casos se observa que en la mayor concentración se forma el mayor tamaño de halo y el más claro.

En general se observa que el compuesto cinamato de α-amirina, forma halos de aproximadamente 15 mm en las concentraciones mayores (1500 y 2000 µg/mL), sobre las cepas *S. mutans* y *S. sanguinis*, dichos halos son mayores que los formados por el compuesto metil éster del ácido betulínico, que en las mayores concentraciones forma halos de aproximadamente 13 mm, nuevamente sobre las cepas *S. mutans* y *S. sanguinis.*

Ambos compuestos modificados muestran una mejor efectividad sobre la cepa *S. oralis*, pues en todas las concentraciones se observa la formación de halos opacos y medianamente opacos, excepto en la concentración de 500 µg/mL, del compuesto metil éster del ácido betulínico. Además los halos formados por parte de los compuestos sobre esta cepa, son más claro que los formados sobre las otras.

La cepa *S. sanguinis* es en la que se observa menos acción por parte de ambos compuestos, pues en las más altas concentraciones (1500 µg/mL y 2000 µg/mL) hay formación de halos opacos de aproximadamente 13 mm, halos más pequeños que los formados sobre las otras cepas.

Tabla 14.- Efecto de los compuestos modificados cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico sobre las especies de *Streptococcus*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, para la prueba de difusión en agar.

Cepas	Concentración µg/mL	Compuestos modificados	
		Cinamato de α-amirina	Metil éster del ácido betulínico
S. mutans	Control (-)	33.1mm***	32mm***
	500	--	--
	1000	--	
	1500	13.5mm**	13mm*
	2000	15.3mm**	13.7mm*
S. sanguinis	Control (-)	30mm***	31.2mm***
	500	--	--
	1000	--	--
	1500	12.9mm*	--
	2000	13.2mm*	13mm*
S. oralis	Control (-)	33.2mm***	33.8mm***
	500	12.5mm*	--
	1000	12.6mm*	12.1mm*
	1500	15mm**	13.3mm**
	2000	15.1mm***	14.2mm**

En la Figura 18 se observa la prueba de difusión en agar del compuesto modificado cinamato de α-amirina, sobre la cepa *S. mutans*, donde se utilizó como control positivo el digluconato de clorhexidina al 20%. Se observa una tendencia similar a las pruebas realizadas con los compuestos control, pues se puede ver que conforme aumenta la concentración del compuesto, hay una disminución en el crecimiento de la bacteria, sin inhibir totalmente el crecimiento de la bacteria.

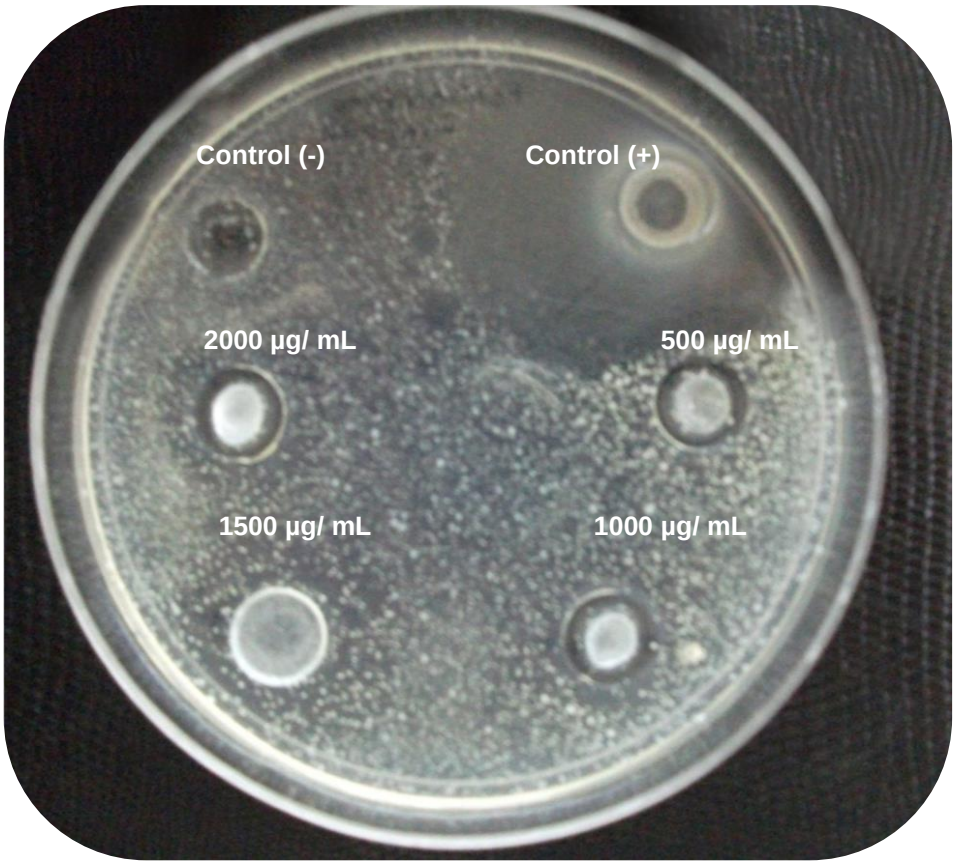


Figura 18.- Efecto del compuesto modificado cinamato de α-amirina sobre la cepa *S. mutans*. Prueba de difusión en agar.

Respecto al efecto del cinamato de α-amirina sobre las cepas de *Streptococcus*, en general se puede observar que no hay una acción bactericida sobre las cepas (Tabla 14), en las mayores concentraciones se puede notar una disminución del crecimiento bacteriano, aunque no se observa tan claro el halo formado alrededor de los pozos sí lo comparamos con el control positivo. En particular para la cepa *S. mutans* se observa un buen efecto antimicrobiano por parte del compuesto, pues incluso en la mayor concentración se puede observar una halo de inhibición bastante claro, que puede ser contrastado con el control positivo.

Este compuesto modificado presenta poca acción sobre la bacteria *S. sanguinis*, sólo hasta las concentraciones más altas es posible observar halos de inhibición, sin embargo estos son muy opacos.

Para la cepa *S. oralis* se puede observar que hay mayor acción por parte del compuesto, pues desde la concentración más baja se puede observar una inhibición opaca alrededor del pozo. Aunque esta no es una de las principales bacterias causantes de la caries, si ha sido asociada raramente a casos de endocarditis (Renton y cols., 2009). En comunidades de multi especies bacterianas, como las encontradas en biopelículas orales, se compite entre espacios viables adecuados para el crecimiento bacteriano y nutrientes. La competición involucra varios mecanismos, incluidos la excreción y la inhibición de sustancias contra otros competidores (Kreth y cols., 2005). Lo que hace pensar que posiblemente la bacteria, *S. oralis* no tenga un nicho adecuado para su crecimiento y por ello se vea limitado este crecimiento en las pruebas de difusión en agar. Pues esta es una de las bacterias que mostraron mayor sensibilidad a los compuestos.

Respecto al compuesto metil éster del ácido betulínico, se puede decir que también se observa una tendencia a disminuir el crecimiento de microorganismos conforme la concentración aumenta (Tabla 14), sin embargo el efecto producido no es completamente inhibitorio, por lo que se puede decir que sólo se presenta un efecto bacteriostático por parte del compuesto. En particular para la cepa *S. mutans*, se observa un halo muy opaco a partir de la concentración de 1500 µg/mL, para la concentración de 2000 µg/mL ya es visible un halo más claro, aunque de tamaño similar. Para *S. sanguinis*, al igual que los anteriores compuestos no se observa un buen efecto del compuesto sobre esta cepa, pues sólo es observable un halo de inhibición bastante opaco en la concentración de 2000 µg/mL. En cambio el efecto para la cepa *S. oralis* es bueno, ya que a partir de la concentración de 1000 µg/mL ya es observable un halo claro, el cual va aumentando y haciéndose más claro, conforme aumenta la concentración del compuesto. De acuerdo con los resultados de la prueba de difusión en agar, en los compuestos modificados, en general se puede decir que el cinamato de α-amirina muestra una mejor capacidad antimicrobiana, respecto al metil éster del ácido betulínico, basándonos en los diámetros y en la opacidad/claridad de los halos de inhibición formados por ambos compuestos, usados frente a las diferentes cepas y a las diferentes concentraciones.

De acuerdo a la definición dada por Lee y cols., (2004), se puede decir que los compuestos modificados presentan una actividad antibacteriana débil, pues sus dímetros están entre los 13 y 16 mm, aunque los halos que se pueden ver no son claros, en este sentido los compuestos podrían ser considerados poco prometedores.

De acuerdo a lo anterior, los resultados son concordantes con el obtenido en las pruebas de macrodilución, pues de igual manera se observa que el compuesto modificado cinamato de α-amirina tiene una acción ligeramente mayor respecto al otro compuesto modificado metil éster del ácido betulínico. Aunque según el análisis estadístico realizado, esta diferencia no es significativa (α=5%).

Respecto a la modificación estructural, se puede decir que posiblemente la introducción del sustituyente cinamato en el carbono 3 de la molécula α-amirina es más prometedora, que la metilación realizada en el grupo carbonilo del ácido betulínico, pues en las pruebas de difusión en agar, los diámetros resultaron ser un tanto mayores por parte del compuesto cinamato de α-amirina. Probablemente las pruebas de difusión podrían tener similitudes con las de macrodilución, pues si los compuestos modificados no lograron aumentar su capacidad antimicrobiana, podría ser que tampoco su solubilidad, por lo que estos compuestos tenderían a ser poco hidrofílicos, y la difusión del compuesto a través del agar, para ejercer efecto sobre las bacterias, resultaría poco eficiente.

8. Conclusiones.

- De los compuestos control (ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina), tiene mejor efecto el ácido betulínico ejerciendo una mayor acción sobre la cepa *S. mutans*, de acuerdo a la prueba de macrodilución y sobre la cepa *S. oralis*, de acuerdo a la prueba de difusión en agar.

- De acuerdo al análisis estadístico se observa un mayor efecto antimicrobiano por el compuesto modificado cinamato de α-amirina tanto en la prueba de macrodilución como en la de difusión en agar, respecto al metil éster del ácido betulínico, sin embargo esta diferencia no es significativa.

- Existe diferencia significativa (α=5%), entre compuestos control y modificados, de manera que ejercen un mayor efecto antimicrobiano los compuestos modificados.

- La bacteria *Streptococcus sanguinis* resulta ser la menos sensible por la acción de los compuestos, tanto de los controles, como los modificados, en la prueba de difusión en agar.

- En la prueba de macrodilución el compuesto control metil éster del ácido betulínico muestra diferencia significativa en la reducción de cuenta microbiana a partir de 1500 µg/mL, en comparación de los compuestos modificados que muestran diferencia significativa a partir de 1000 µg/mL.

- En la prueba de macrodilución, los compuestos modificados muestran diferencia significativa sobre el crecimiento de bacterias a partir de la concentración de 1000 µg/mL, al igual que el ácido betulínico (compuesto control), sin embargo según el análisis estadístico (α=5%), tomando en cuenta todas las cepas y concentraciones, existe diferencia significativa entre compuestos modificados y el control.

- La introducción de un éster metílico en el ácido betulínico, no modifica de manera significativa la capacidad antimicrobiana de la molécula, en comparación con la introducción de un cinamato en la posición 3 del compuesto α-amirina.

- Finalmente, no hay actividad bactericida por parte de ninguno de los compuestos evaluados, sin embargo si se puede observar una actividad bacteriostática.

9. Perspectivas.

- Evaluar la capacidad antimicrobiana que podría ocasionar el sinergismo entre compuestos sin modificaciones estructurales, así como con modificaciones estructurales, sobre las principales cepas de *Streptococcus* causantes de problemas de caries y enfermedades periodontales.

- Evaluar la capacidad antimicrobiana de compuestos modificados estructuralmente sobre otros microorganismos de la cavidad oral, como la levadura *Candida albicans*.

- Mejorar la técnica para la solubilización de compuestos con baja solubilidad en agua, sin el uso de solventes orgánicos.

10. Anexos.

A.- Medios, reactivos y equipo.

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

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

Por instrucciones del proveedor

1. Suspender 70 g del polvo en 1L 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

Usos del medio de cultivo

Para cultivo, aislamiento y cuenta de *Lactobacilos* a partir de diversas muestras. En este medio es bueno el crecimiento de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* y *Pediococcus damnosus*.

- Agar TSA (Agar Triptona-Soya) Difco™

Por instrucciones del proveedor

1. Suspender 23 g del polvo en 1L 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

Usos del medio de cultivo

Para cultivo de microorganismos, aislamiento y pruebas de límite microbiano a partir de diversas muestras. Útil para conservación de cepas microbianas. En este medio es bueno el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus pyogenes*.

- Caldo BHI (Infusión corazón cerebro) Difco™

Por instrucciones del proveedor

1. Suspender 37 g del polvo en 1L 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

Usos del medio de cultivo

Medio de cultivo muy rico en nutrientes, especialmente útil para el desarrollo y crecimiento de microorganismos exigentes, incluyendo bacterias aerobias, anaerobias, hongos y levaduras a partir de diversas muestras. En este medio es bueno el crecimiento de *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*.

A.2. Reactivos y equipo utilizados durante el desarrollo del trabajo.

Reactivos	Equipo
Cloruro de sodio, Sigma®	Espectrofotómetro Spectronic 21D, Milton Ray®
Digluconato de clorhexidina solución al 20% en agua, Sigma®	Incubadora modelo Max Q 4000, ThermoScientific®
Sacarosa, Mallinckrodt®	Incubadora modelo VWR 1550, VWR Scientific Inc®
Tween® 80, Sigma-Aldrich®	Sonicador modelo 2210, Branson®

Anexo B

B.1. Tinción de Gram.

La tinción de Gram se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Preparación de frotis.
2. Adicionar una gota de cristal violeta y dejarlo durante 1 minuto.
3. Lavar con agua y dejar escurrir.
4. Cubrir la preparación con lugol (solución yodo-yoduro), y dejarlo actuar durante 1 minuto.
5. Lavar con agua y decolorar con una mezcla acetona: etanol (1:1) hasta que deje de salir el colorante.
6. Inmediatamente después enjuagar y eliminar el exceso.
7. Aplicar safranina y esperar 1 minuto.
8. Enjuagar con agua, escurrir y secar.
9. Realizar la observación microscópica.

Anexo C

C.1. Resultado de la evaluación del ácido betulínico a concentraciones de 100 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL, sobre la cepa *S. mutans*, a una concentración de 10^6 UFC/mL, para determinar el rango de concentraciones a utilizar en evaluaciones posteriores.

TablaC1.- Evaluación de ácido betulínico sobre *Streptococcus mutans* a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL.

	Streptococcus mutans			
Ácido betulínico	Muestra	UFC/mL	Log (UFC/mL)	% Células viables
	t_0	1.02 X 10^7	7.007	
	Control (-)	2.71 X 10^9	9.432	100
	100µg/mL	2.28 X 10^9	9.357	92.402
	500µg/mL	1.90 X 10^9	9.279	84.927
	1000µg/mL	1.66 X 10^9	9.219	79.604

C.2. Resultado de las evaluaciones de los compuestos triterpenoides no modificados, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina sobre bacterias de *Streptococcus,* con una concentración de 10^6 UFC/mL.

Tabla C2.- Evaluación del compuesto control ácido betulínico sobre bacterias de *Streptococcus*. A una concentración de 10^6 UFC/mL.

		Streptococcus mutans			***Streptococcus sanguinis***			***Streptococcus oralis***		
	Muestra	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**
Ácido betulínico	t0	1.13×10^7	7.052	-	2.26×10^7	7.353	-	$1.49E \times 10^7$	7.173	-
	Control (-)	2.05×10^9	9.380	100	1.69×10^6	6.228	100	2.09×10^8	8.320	100
	500 µg/mL	1.91×10^9	9.322	99.709	1.42×10^6	6.151	88.231	1.55×10^8	8.188	84.315
	1000 µg/mL	1.52×10^9	9.267	95.261	8.83×10^5	5.946	62.856	1.23×10^8	8.09	74.705
	1500 µg/mL	1.64×10^9	9.230	91.555	7.50×10^5	5.875	55.731	9.9×10^7	7.997	66.515
	2000 µg/mL	8.70×10^9	8.977	69.363	7.60×10^5	5.880	56.294	6.68×10^7	7.824	53.510

Tabla C3.- Evaluación del compuesto control fenilacetato de α-amirina, sobre bacterias de *Streptococcus*. A una concentración de 10^6 UFC/mL.

	Muestra	*Streptococcus mutans*			*Streptococcus sanguinis*			*Streptococcus oralis*		
		UFC/mL	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**
Fenilacetato de α- amirina	t0	2.11×10^7	7.324	-	1.46×10^7	7.163	-	2.01×10^7	7.302	-
	Control (-)	2.08×10^9	9.317	100	5.07×10^8	8.705	100	5.02×10^8	8.700	100
	500 µg/mL	1.33×10^9	9.122	80.953	3.89×10^8	8.590	87.578	3.02×10^8	8.480	77.342
	1000 µg/mL	1.02×10^9	9.007	71.331	3.11×10^8	8.492	78.121	2.25×10^8	8.352	66.437
	1500 µg/mL	8.45×10^8	8.926	65.192	2.48×10^8	8.395	69.585	4.33×10^7	7.636	27.137
	2000 µg/mL	6.30×10^8	8.799	56.457	1.24×10^8	8.094	48.299	3.38×10^7	7.529	23.550

C.3. Resultado de las evaluaciones de los compuestos triterpenoides modificados, cinamato de α-amirina y metil éster del ácido betulínico, sobre bacterias de *Streptococcus,* con una concentración de 10^6 UFC/mL.

Tabla C4.- Evaluación del compuesto modificado cinamato de α-amirina, sobre bacterias de *Streptococcus*. A una concentración de 10^6 UFC/mL.

		Streptococcus mutans			***Streptococcus sanguinis***			***Streptococcus oralis***		
	Muestra	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**
Cinamáto de α- amirina	t0	7.00×10^6	6.845	-	1.84×10^7	7.265	-	6.52×10^6	6.814	-
	Control (-)	2.11×10^9	9.324	100	5.08×10^8	8.706	100	5.97×10^8	8.775	100
	500 µg/mL	1.52×10^9	9.182	85.801	2.14×10^8	8.329	64.246	5.15×10^8	8.711	92.942
	1000 µg/mL	7.55×10^8	8.877	61.233	1.53×10^8	8.183	53.859	2.84×10^8	8.453	68.794
	1500 µg/mL	2.65×10^8	8.669	36.195	7.73×10^7	7.888	37.290	7.90×10^7	7.897	34.827
	2000 µg/mL	4.67×10^7	7.669	14.166	1.60×10^7	7.204	15.050	3.93×10^7	7.594	23.548

Tabla C5.- Evaluación del compuesto modificado metil éster del ácido betulínico, sobre bacterias de *Streptococcus*. A una concentración de 10^6 UFC/mL.

	Muestra	*Streptococcus mutans*			*Streptococcus sanguinis*			*Streptococcus oralis*		
		UFC/mL	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**	**UFC/mL**	**Log (UFC/mL)**	**% Células viables**
Metil éster del ácido betulínico	t0	1.33×10^7	7.123	-	2.24×10^7	7.349	-	1.83×10^7	7.262	-
	Control (-)	1.98×10^9	9.295	100	4.02×10^7	7.604	100	4.28×10^8	8.631	100
	500 µg/mL	1.56×10^9	9.193	89.577	3.48×10^7	7.541	92.009	2.63×10^8	8.419	77.974
	1000 µg/mL	1.20×10^9	9.077	83.581	2.79×10^7	7.446	81.049	2.19×10^8	8.339	70.883
	1500 µg/mL	1.35×10^9	9.130	78.857	2.28×10^7	7.357	71.946	1.98×10^8	8.296	67.272
	2000 µg/mL	8.60×10^8	8.934	67.288	1.91×10^7	7.279	64.669	8.02×10^7	7.903	41.443

Anexo D.- Análisis estadístico

D.1. Tratamiento estadístico (ANOVA multifactorial y prueba de múltiples rangos, mediante el paquete estadístico Statgraphics X64) de los resultados del efecto de los compuestos modificados sobre las especies de *Streptococcus spp*.

D.1.1. Efecto de los compuestos modificados, cinamato de α-amirina, metil éster del acido betulínico sobre las cepas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis* a una concentración de 10^6 UFC/ mL.

Tabla D1.- Resumen estadístico para los datos resultantes del efecto que ejercen los compuestos modificados sobre las especies de *Streptococcus spp*, a una concentración de 10^6 UFC/mL. Los cuales fueron expresados en porcentaje de células viables

Recuento	30
Promedio	69.1503
Desviación estándar	26.5551
Coeficiente de variación	38.402%
Mínimo	14.1668
Máximo	100.0
Rango	85.8332
Sesgo estandarizado	-1.46683
Curtosis estandarizada	-0.618837

La Tabla D1 muestra los estadísticos de resumen para porcentaje de células viables. 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 del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

D.1.1.1. Compuesto modificado cinamato de α-amirina

A continuación se realizó un análisis, tomando en cuenta que los valores tienen una distribución normal, por lo que se pudo comparar las medias de los grupos a través de las varianzas. Por lo tanto, para determinar si había diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células viables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta otras variables de estudio como la concentración y la cepa. Los resultados se observan a continuación.

Tabla D2.- Prueba ANOVA para determinar si existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones y cepas evaluadas, en el compuesto modificado, cinamato de α-amirina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	1.56525E19	4	3.91312E18	12.81	**0.0015**
B:Cepa	6.9959E18	2	3.49795E18	11.45	**0.0045**
RESIDUOS	2.44343E18	8	3.05429E17		
TOTAL (CORREGIDO)	2.50918E19	14			

La Tabla D2 ANOVA descompone la variabilidad de células viables en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las células viables con un 95.0% de nivel de confianza.

Si tomamos en cuenta que el Ho es que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de células viables respecto a la concentración utilizada. Entonces se rechaza la Ho y se dice que la concentración si es significativa para explicar el porcentaje de células viables.

Puesto que se encontró que hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones evaluadas, se procede a hacer un análisis de la significancia entre cepas y entre concentraciones, con una prueba de múltiples rangos.

Tabla D3.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del cinamato de α-amirina existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2000 µg/mL	3	5.7277	3.19076	X
1500 µg/mL	3	1.22485	3.19076	XX
1000 µg/mL	3	2.08437	3.19076	XX
500 µg/mL	3	2.79588	3.19076	XX

En la Tabla D3, se han identificado cuatro 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.

Tabla D4.- Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del cinamato de α-amirina existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 500		5.96996	1.04057
0 - 1000	*	1.30851	1.04057
0 - 1500	*	2.16803	1.04057
0 - 2000	*	2.82011	1.04057
500 - 1000		7.11513	1.04057
500 - 1500	*	1.57103	1.04057
500 - 2000	*	2.22311	1.04057
1000 - 1500		8.59521	1.04057
1000 - 2000	*	1.5116	1.04057
1500 - 2000		6.52075	1.04057

* Indíca una diferencia significativa.

La Tabla D4, se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla D5.- Diferencia entre las medias para determinar entre que especies de *Streptococcus* evaluadas hay diferencia estadista significativa respecto al porcentaje de células viables, para el compuesto cinamato de α-amirina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S. mutans - S. oralis	*	1.21969	8.06021
S. mutans – S. sanguinis	*	1.60133	8.06021
S. oralis – S. sanguinis		3.8164	8.06021

* Indica una diferencia significativa.

La Tabla D5 aplica un procedimiento de comparación múltiple, para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

D.1.1.2. Compuesto modificado metil éster del ácido betulínico.

A continuación se realizó un análisis, tomando en cuenta que los valores tienen una distribución normal, por lo que se pudo comparar las medias de los grupos a través de las varianzas. Por lo tanto, para determinar si había diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de reducción de células viables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta otras variables de estudio como la concentración y la cepa. Los resultados se observan a continuación.

Tabla D6.- Prueba ANOVA multifactorial, para determinar si existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones y cepas evaluadas, del compuesto modificado metil éster del ácido betulínico.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0.36296	4	0.09074	12.09	**0.0018**
B:Cepas	7.06323	2	3.53162	470.64	**0.0000**
RESIDUOS	0.0600304	8	0.0075038		
TOTAL (CORREGIDO)	7.48622	14			

La Tabla D6 ANOVA descompone la variabilidad de células viables en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre células viables con un 95.0% de nivel de confianza.

Si tomamos en cuenta que el Ho es que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de células viables respecto a la concentración utilizada. Entonces se rechaza la Ho y se dice que la concentración si es significativa para explicar el porcentaje de células viables.

Puesto que se encontró que hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones evaluadas, se procede a hacer un análisis de la significancia entre cepas y entre concentraciones, con una prueba de múltiples rangos.

Tabla D7.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del metil éster del ácido betulínico existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2000 µg/mL	3	8.03946	0.0500127	X
1500 µg/mL	3	8.26152	0.0500127	X
1000 µg/mL	3	8.28776	0.0500127	X
500 µg/mL	3	8.38489	0.0500127	XX

En la Tabla D7, se han identificado cuatro 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.

Tabla D8.- Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del compuesto modificado, metil éster del ácido betulínico, existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 – 500		0.125637	0.163101
0 – 1000	*	0.222767	0.163101
0 - 1500	*	0.249002	0.163101
0 - 2000	*	0.471063	0.163101
500 - 1000		0.0971301	0.163101
500 - 1500		0.123365	0.163101
500 - 2000	*	0.345425	0.163101
1000 - 1500		0.0262351	0.163101
1000 - 2000	*	0.248295	0.163101
1500 - 2000	*	0.22206	0.163101

* Indica una diferencia significativa.

Esta Tabla D8 se aplicó un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla D9.- Diferencia entre las medias para determinar entre que especies de *Streptococcus* evaluadas hay diferencia estadística significativa respecto al porcentaje de células viables para el compuesto metil éster del ácido betulínico.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S. mutans – S. oralis	*	0.80801	0.126337
S. mutans – S. sanguinis	*	1.68045	0.126337
S. oralis – S. sanguinis	*	0.872439	0.126337

* Indica una diferencia significativa.

En la Tabla D9 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

D.2. Tratamiento estadístico de los resultados del efecto de los compuestos no modificados sobre las especies de *Streptococcus spp*.

D.2.1 Efecto de los compuestos no modificados, ácido betulínico y fenilacetato de α-amirina, sobre las cepas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis* a una concentración de 10^6 UFC/ mL.

Tabla D10.- Resumen estadístico para los datos resultantes del efecto que ejercen los compuestos no modificados sobre las especies de *Streptococcus*, a una concentración de 10^6 UFC/mL. Los cuales fueron expresados en porcentaje de células viables.

Recuento	60
Promedio	8.29449
Desviación Estándar	0.912821
Coeficiente de Variación	11.0052%
Mínimo	5.875
Máximo	9.3802
Rango	3.5052
Sesgo Estandarizado	-1.69241
Curtosis Estandarizada	1.62989

La Tabla D10 muestra los estadísticos de resumen para porcentaje de células viables. 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 del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

D.2.1.1. Compuesto no modificados, ácido betulínico.

A continuación se realizó un análisis, tomando en cuenta que los valores tienen una distribución normal, por lo que se pudo comparar las medias de los grupos a través de las varianzas. Por lo tanto, para determinar si había diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células viables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta variables de estudio como la concentración y la cepa. Los resultados se observan a continuación.

Tabla D11.- Prueba ANOVA multifactorial, para determinar si existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones y cepas evaluadas, del compuesto no modificado ácido betulínico.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Cepa	26.6077	2	13.3039	3449.14	**0.0000**
B:Concentración	0.313442	4	0.0783605	20.32	**0.0003**
RESIDUOS	0.0308573	8	0.00385716		
TOTAL (CORREGIDO)	26.952	14			

La Tabla D11 ANOVA descompone la variabilidad de células viables en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las células viables con un 95.0% de nivel de confianza.

Ya que se encontró diferencia significativa entre las cepas y concentraciones se procede a hacer un análisis de la significancia entre cepas y entre concentraciones, con una prueba de múltiples rangos.

Tabla D12.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del ácido betulínico existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2000	3	7.56117	0.0358569	X
1500	3	7.7008	0.0358569	X
1000	3	7.76787	0.0358569	X
500	3	7.88743	0.0358569	X

En la Tabla D12 se han identificado 3 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.

Tabla D13.- Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del compuesto no modificado, ácido betulínico, existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Contraste	***Sig.***	***Diferencia***	***+/- Límites***
1000 - 1500		0.0670667	0.116936
1000 - 2000	*	0.2067	0.116936
1000 - 500	*	-0.119567	0.116936
1000 - 0	*	-0.2087	0.116936
1500 - 2000	*	0.139633	0.116936
1500 - 500	*	-0.186633	0.116936
1500 - 0	*	-0.275767	0.116936
2000 - 500	*	-0.326267	0.116936
2000 - 0	*	-0.4154	0.116936
500 - 0		-0.0891333	0.116936

* indica una diferencia significativa.

En la Tabla D13 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla D14.- Diferencia entre las medias para determinar entre que especies de *Streptococcus* evaluadas hay diferencia estadista significativa respecto al porcentaje de células viables para el compuesto no modificado, ácido betulínico.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S. mutans – S. oralis	*	1.15112	0.0905784
S. mutans – S. sanguinis	*	3.21914	0.0905784
S. oralis – S. sanguinis	*	2.06802	0.0905784

* Indica una diferencia significativa.

La Tabla D14 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

2.1.2. Compuesto no modificado fenilacetato de α-amirina.

A continuación se realizó un análisis, tomando en cuenta que los valores tienen una distribución normal, por lo que se pudo comparar las medias de los grupos a través de las varianzas. Por lo tanto, para determinar si había diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células viables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta variables de estudio como la concentración y la cepa. Los resultados se observan a continuación.

Tabla D15.- Prueba ANOVA multifactorial, para determinar si existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones y cepas evaluadas, del compuesto no modificado fenilacetato de α-amirina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Cepa	2.05946	2	1.02973	26.05	**0.0003**
B:Concentración	1.15614	4	0.289034	7.31	**0.0088**
RESIDUOS	0.316291	8	0.0395364		
TOTAL (CORREGIDO)	3.53188	14			

La tabla D15 ANOVA descompone la variabilidad de células viables en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Células viables con un 95.0% de nivel de confianza

Ya que se encontró diferencia significativa entre las cepas y concentraciones se procede a hacer un análisis de la significancia entre cepas y entre concentraciones, con una prueba de múltiples rangos.

Tabla D16.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del fenilacetato de α-amirina existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2000	3	8.14087	0.114799	X
1500	3	8.31953	0.114799	XX
1000	3	8.61743	0.114799	XX
500	3	8.73083	0.114799	X

En la tabla D16 han identificado 3 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.

Tabla D17.- Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del compuesto no modificado, fenilacetato de α-amirina, existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 500		0.176733	0.374381
0 - 1000		0.290133	0.374381
0 - 1500	*	0.588033	0.374381
0 - 2000	*	0.7667	0.374381
500 - 1000		0.1134	0.374381
500 - 1500	*	0.4113	0.374381
500 - 2000	*	0.589967	0.374381
1000 - 1500		0.2979	0.374381
1000 - 2000	*	0.476567	0.374381
1500 - 2000		0.178667	0.374381

* Indica una diferencia significativa.

En la tabla D17 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla D18.- Diferencia entre las medias para determinar entre que especies de *Streptococcus* evaluadas hay diferencia estadista significativa respecto al porcentaje de células viables para el compuesto no modificado, fenilacetato de α-amirina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S. mutans – S. oralis	*	0.89478	0.289995
S. mutans – S. sanguinis	*	0.57916	0.289995
S. oralis – S. sanguinis	*	-0.31562	0.289995

* indica una diferencia significativa.

La tabla D18 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

D.3. Tratamiento estadístico de los resultados del efecto de todos los compuestos evaluados sobre las especies de *Streptococcus spp*.

D.3.1. Efecto de los compuestos control y modificados, ácido betulínico, fenil acetato de α-amirina, cinamato de α-amirína y metil éster del acido betulínico sobre las cepas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis* a una concentración de 10^6 UFC/ mL.

- Un hecho importante a considerar fue realizar un análisis para determinar si había diferencia estadista significativa en el porcentaje de células viables, de acuerdo al compuesto utilizado, por lo que se realizo un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta todos los factores involucrados, como la concentración, la cepa y el compuesto. Los resultados se observan a continuación.

Tabla 19.- Resumen estadístico para los datos resultantes del efecto que ejercen todos los compuestos evaluados sobre las especies de *Streptococcus spp*, a una concentración de 10^6 UFC/mL.

Recuento	60
Promedio	8.24174
Desviación Estándar	0.901357
Coeficiente de Variación	10.9365%
Mínimo	5.875
Máximo	9.3802
Rango	3.5052
Sesgo Estandarizado	-1.49045
Curtosis Estandarizada	1.47564

La Tabla D19 muestra los estadísticos de resumen para Porcentaje de células viables. 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 del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

A continuación se realizó un análisis, tomando en cuenta que los valores tienen una distribución normal, por lo que se pudo comparar las medias de los grupos a través de las varianzas. Por lo tanto, para determinar si había diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células viables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, tomando en cuenta otras variables de estudio como la concentración, compuesto y la cepa. Los resultados se observan a continuación.

Tabla D20.- Prueba ANOVA para determinar si existe diferencia estadística significativa entre todos los compuestos evaluados, respecto al porcentaje de células viables, tomando en cuenta las variables, compuesto, cepa y concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	23.382	2	11.691	711.45	0.0000
B:Cepa	4.42551	4	1.10638	67.33	0.0000
C:Compuesto	4.79397	3	1.59799	97.24	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.134134	8	0.0167667	1.02	0.4477
AC	13.3787	6	2.22978	135.69	0.0000
BC	1.4255	12	0.118792	7.23	0.0000
RESIDUOS	0.394384	24	0.0164327		
TOTAL (CORREGIDO)	47.9342	59			

La Tabla ANOVA descompone la variabilidad de células viables en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 5 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre células viables con un 95.0% de nivel de confianza.

Ya que se encontró diferencia significativa entre los factores evaluados, se procede a hacer un análisis de la significancia entre compuestos, con una prueba de múltiples rangos.

Tabla D21.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones existe diferencia significativa por parte de la acción de los compuestos control y modificados.

	Compuesto	**Casos**	**Media LS**	**Sigma LS**	**Grupos Homogéneos**
Compuestos control	Ácido betulínico	15	7.77877	0.0330985	X
	Fenil acetato de alfa amirina	15	8.29683	0.0330985	X
Compuestos modificados	Cinamáto de alfa amirina	15	8.3481	0.0330985	X
	Metil ester del ácido betulínico	15	8.54325	0.0330985	X

En la Tabla D21, se han identificado 3 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.

Tabla D22.- Diferencia entre las medias para determinar entre que compuestos, existe diferencia significativa en la reducción del porcentaje de células viables de las especies de *Streptococcus*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
AB - CA	*	-0.569333	0.0966079
AB - FA	*	-0.76448	0.0966079
AB - ME	*	-0.518064	0.0966079
CA - FA	*	-0.195147	0.0966079
CA - ME		0.0512689	0.0966079
FA - ME	*	0.246416	0.0966079

* Indica una diferencia significativa, AB: ácido betulínico, FA: fenilacetato de α-amirina, CA: cinamáto de α-amirina, ME: metil éster del ácido betulínico.

En la Tabla D22 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

11. Bibliografía.

- Abdus M, Matsumoto N, Matin K, Tsuha 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. Clinic Diagnostic Laboratory Immunology; 11: 379-386.
- Aframian J, Daviddowitz T, Benoliel R. (2006) The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. Oral Diseases; 12: 420-423.
- Ambrosio R, Furtado NAJC, De oliveira R, Da Costa B, Martins G, De Carvalho T, Porto T, Veneziani R. (2008) Antimicrobial activity of Kaurane diterpenes against oral pathogens. Z Naturforsch; 63c: 323-330.
- Baca P, Castillo A, Liébana M, Junco P. (2008) Genotypes of *Streptococcus mutans* in saliva versus dental plaque. Archives of oral biology; 53: 751-754.
- Barile E, Fattorusso E, Ialenti A, Ianaro A, Lanzotti V. (2007) Paraliane and pepluane diterpenes as anti-inflammatory agents: First insights in structure–activity relationships. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 17:4196–4200.
- Barros G. (1986) Sistematica de angiospermas do Brasil. Imprensa universitária. Universidade federal de Vicosa Vol. 3 Apud Ruas, P.M., Ruas CF, Maffei EMD, Marin – Morales MA, 2000 Chromosome studies in the genus *Mikania* (Asteraceae). Genetics and Molecular Biology; 23: pp. 979-984.
- Basson N. (2000) Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culure in a chemostat. Journal of Medical Microbiology; 49: 969-975.
- Becker H, Scher J, Speakman J, Zapp J. (2005) Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from Lythrum salicaria. Fitotherapia; 76: 580-584.
- Brailsfor S, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adams S, Allison C, Beighton D. (2001) The predominant Aciduric Microflora of Root-caries lesions. Journal Dentist Research; 80(9): 1828-1833.
- Bratthall D, Petersson G. (2005) Cariogram – a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. Community Dental Oral Epidemiology; 33 (4): 256-264.

- Caleghini R, Vilegas, J, Lancas. (2001) Extraction and quantitative HPLC analysys coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng ("guaco") leaves. Journal of the Brazilian Chemical Society; 12: 706-709.
- Cárdenas J. Fundamentos de odontología, 3a edición. Corporación para investigaciones biológicas, México 2003 pp, 76-78.
- Carlsson J. (1986) Metabolic activities of oral bacteria. *Textb cariol*; 77-106.
- Casanova- Rosado A, Medina- Solís C, Casanova-Rosado J, Vallejos-Sánchez A, Maupomé G, Ávila-Burgos L. (2005) Dental caries and associated factor in Mexican schoolchildren aged 6-13 year. *Acta odontologica escandinava*; 63: 245-251.
- Chandramu C, Manohar R, Krupadanam D, Dashavantha R. (2003) Isolation, characterization and biological activity of betulínico acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res*; 17: 129-134.
- Connolly J, Hill R. (2008) Triterpenoids. Natural Products; 25: 794-830.
- Cunha W, Martins C, Ferreira de Silva D, Crotti A, Lopez N, Albuqureque S. (2003) In vitro trypanocidal activity of triterpenes from Miconia species. Planta Medicinal; 69: 470-472.
- Darout I, Albandar J, Skaug N, Ali R. (2002). Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. Journal Clinical Periodontal; 29: 411-420.
- Devine D. (2003) Antimicrobial peptides in defense of the oral and respiratory tracts. Molecular Inmmunology; 63: 281 – 322.
- Fitzgerald R, Dorothea B, Fitzgerald and Beatrice O. (2000) Effects of clorhexidine gluconate in drinking water on dental caries and oral microorganism in the Syrian hamster. *Archs Oral Biol*; 10: 707-709.
- Fukoshima K. (1995). Molecular biology of mutans streptococcal glucosyltransferase: inducing mechanisms of dental caries (in Japanese); 42: 157-167.

- Gudkina J, Brinkmane A. (2010) The impact of salivary mutans streptococci and sugar consumption on caries experience in 6- years old and 12- years old in Riga. Stomatologija; 12: 56-59.
- Guha- Chowdhury N, Iwamy Y, Yamada T, Pearce E. (1995) The effect of fluorhydroxyapatite-derived fluoride on acid productions by *streptococci*. Journal Dentist Research; 74: 1618-1624.
- Hadissa T, Jean Pierre D. (2005) Use of medicinal plants for treatment of oral diseases in Burkina Faso. Journal of Ethnopharmacology; 104: 68-78.
- Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Okahashi N, Koga T. (1989) Purification and characterization of cell- associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*. Journal Genetics Microbiology; 135: 335-344.
- Hart W, Jones R. (2006) Two-stage revision on infected total knee replacements using articulating cement spacers and short – terms antibiotic therapy. Journal Bone and joint surg; 88-B: 1011-1015.
- Haukioja A, Soderling E, Tenovus J. (2008) Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotics Lactobacillus and bifidobacterium in vitro. Caries Research; 42: 445-453.
- Heinemann J. (2001) Can smart bullets penétrate magic bullet-proof vests. Drug Discovery Today; 278: 46-53.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi A, Doble M. (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Microbiological Research; 2: 177-184.
- Herazo B. (1993) Clínica del sano en odontología, segunda edición, Ediciones Ecoe, Bogotá, D.C., Colombia, 350pp.
- Hernández Pérez D. (2011) Efecto antimicrobiano de derivados de α- y β-amirina proveniente de fuentes naturales contra bacterias de la cavidad oral, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Holanda P, Pinto L, Cunha G, Chaves M, Santos F, Rao V. (2008) α, β- amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induce acute pancreatitis in rats. Inflammopharmacology; 16:48-52.
- Huang D, Ding Y, Zhang W, Fang W, Chen X. (2006) Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. Can Let; 233: 289-296.
- Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM. (2006) Química de la flora mexicana. Alfonso Romero de Vivar Romo, pp. 89-128.
- Irigoyen – Camacho M, Zepeda- Zepeda M, Sánchez L, Molina- Frechero N. (2001) Prevalence and incidence of dental caries and oral higiene habits in a group of schoolchildren of México City. Longitudinal Study. Revista de la Asociación Dental Mexicana; 58: 98-104.
- Jain S, Jain R, Singh B. (2003) Antimicrobial principles of *Arnebia hispidissima*. Pharmacology Biology; 16:48-52.
- Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, Kuo MY. (1998) Citotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. Cell Biological Toxicology; 14: 383-389.
- Johann S, Soldy C, Lyon J, Pizzolatti M, Resende M. (2007) Antifungal activity of the amyrin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. Letters Applications Microbiology; 45: 148-153.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Q. (2005) Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. Journal Bacteriology; 187(21): 7193-7203.
- Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S, Phatchana R. (2005) Biological activity of Anthraquinones from Prismatomeris fragans. Journal of ethnopharmacology; 100: 284-288.
- Kohler B, Birkhed D, Olsson S. (1995) Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Research; 29: 402-406.
- Kolenbrander P, Jacuboviks N, Bachrach G. (2009) Oral Microbilogy. Enciclopedia of Microbiology; 566-588.

- Lall N, Meyer M. (2000) Antibacterial activity of water and acetone extracts of the roots of *Euclea natalensis*. Journal of Ethnopharmacology; 72: 313-316.
- Lee K, Lee B, Kim C, Ahn Y. (2004) Anti- Helicobacter pylori activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jeju Island. Agricultural Chemistry and biotechnology; 47: 91-96.
- Li D, Hyun J, Jeong C, Kim Y, Lee E. (2003) Antiinflammatory activity of a-hederin methyl ester from the alkaline hydrolysate of the butanol fraction of kalopanax pictus bark extract. Biological Pharmacology Bull; 26: 429-433.
- Li J, Helmerhorst E, Leone C, Troxler R, Yaskell T, Haffajje A, Socransky S, Oppenheim F. (2004) Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. Journal Applications Microbiology; 97: 1311-1318.
- Liébana J, Castillo A, Gutiérrez J. (1995) Género *Streptococcus*. Microbiología oral. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; pp. 219-239.
- Lima E, Paulo M, Giesbrecht A. (1992) In vitro antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. Revista Microbiology; 23: 235-238.
- Limberger R, Aboy A, Bassani V, Moreno P, Henriques A. (2001) Essential oils from four Mikania species (Asteraceae). Journal of Essential Oil Research 13; 225-228.
- Liu J. (2005) Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. Journal Ethnopharmacology; 100: 92-94.
- Marsh P, Martin M. (1992) Oral microbiology, 3rd ed. Chapman and Hall. London, pp. 131-136.
- Marsh P, Bradshaw D. (1999) Microbial community aspects of dental plaque: in Newman HN, Wilson M (eds): Dental *Plaque Revistes:* Oral Biofilms in Health and Diseases; Cardiff, Bio- Line, pp. 237-253.
- Matsumoto M, Minami T, Sasaki S, Sobue S, Oshima T. (1999) Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Research; 33: 441-445.

- Medina- Solis C, Maupomé G, Ávila- Burgos L, Pérez- Nuñez, Pelacastre-Villafuerte B, Pontigo- Loyola A. (2006) Politicas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. Revista Biomédica; 17: 269-268.
- Meyer D, Fives-Taylor P. (1998) Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. Current opinion in Microbiology; 1: 88-95.
- Miller H. Chris J, Palenik C. Control de la infección. Ed, Harcourt. España 2000, pp. 43-47.
- Miyasawa- Hori H, Aisawa S, Takahashi N. (2006) Difference in xylitol sensitivity of acid production among *Streptococcus mutans* strains and the biochemical mechanisms. Oral Microbial Immunology; 21: 201-205.
- More G, Tshikalange T, Lall N, Botha F, Meyer M. (2008) Antimicrobial activity of medicinal plants against oral Microorganisms. Journal of Ethnopharmacology; 119: 473–477.
- Moynihan P. (2005). The interrelationship between diet and oral healt. Proc Nutr Soc; 64: 571-580.
- Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V. (2009) Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes. Journal of ethnopharmacology; 123: 143-148.
- Oliveira F, Lima – Junior R, Cordeiro W, Vieira – Junior G, Chaves M, Almeida F, Silva R, Santos F. (2004) Pentacyclic triterpenoids α, β-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. Pharmacology Biochemistry Behavior; 69: 719-725.
- Okada M, Soda Y, Hayashi F. (2005) Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in preschool associated. Journal Medical Microbiology; 54: 661-665.
- Ortiz-Andrade R, García- Jimenez S, Castillo- Espana P, Ramirez-Avila G, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S. (2007) Alpha-glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from Tournefortia hartwegiana: an anti-hyperglycemic agent. Journal Ethnopharmacology; 109: 48-53.

- Pan P, Finnegan M, Sturdivant L, Barnett M. (1999) Comparative antimicrobial activity of an essential oil and amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse *in vitro*. Journal Clinical Periodontal; 26: 474-476.
- Petersen P, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan- Day S, Ndiaye C. (2005) The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bulletin of the World Health Organization; 83: 661-669.
- Philips D, Martin M, Lewis M, Williams D. (2010) Oral Microbiology. Ed. Churchill Livingstone Elsevier, Quinta edición. Gran Bretaña. pp. 5-40.
- Pitts N, Stamm J. (2004) International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW –CCT) – final consensus statements: agreeing where the evidence leads. Journal of Dental Research; 83 (Special Issue C): C125-8.
- Popova Milena P, ChinouIoanna B, MarekovIlko N, BankovaVassya S. (2009) Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. Phytochemistry; 70: 1262-1271.
- Porto T, Furtado M, Heleno V, Martins C, Da Costa F, Severiano M, Silva A, Veneziani R, Ambrósio R. (2009) Antimicrobial *ent*-pimarane diterpenes from Viguiera arenaria against Gram – positive bacteria. Fitoterapia; 80: 432-436.
- Renton B, Clage J, Cooke R. (2009) *Streptococcus oralis* endocarditis presenting has infective discitis in an edentulous patient. International Journal of Cardiology; 137: e13-e14.
- Renwick A, Nordmann H. (2007) First European conference on aspartame: Putting safety and benefits into perspective. Synopsis of presentations and conclusions. Food and chemical toxicology; 45: 1308-1313.
- Ríos J, Recio M. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal Ethnopharmacology; 100: 80-84.
- Rivera G, Martínez J, Hernández E. (2006) Caries dental e higiene bucal en adolecentes. Revista ADM; 56(6): 231-234.
- Rivero- Cruz J, Zhu M, Kinghorn A, Wu C. (2008) Antimicrobial constituents of Thompson seedless rainsis (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytol Let*; 1(3): 151-154.

- Rodríguez Savedra C. (2011) Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. (2005) Molecular analysis of human oral microbiota. Journal Periodontal Research; 40: 277-285.
- Samaranayake, L. (2000) Essential microbiology for dentistry; with a contribution by B.M. Jones; Foreword by Crispian Scully Endinburgh. Churchill Livingstone, New York.
- Sánchez- Pérez T, Sáenz- Martínez L. (1998) Caries experience as a predictor of disease to 18 months. *Revista de la Asociación Dental Méxicana*; 55: 283-286.
- Schüly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O. (1999) New triterpenoides with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta med*; 65(8): 740-743.
- Segovia– Villanueva A, Estrella- Rodríguez R, Medina- Solís C, Maupomé G. (2006) Caries experience and caries factors among preschoolers in Southeastern México. Journal of Public Health Dentistry; in press.
- Seiki M, Karakama F, Terajima T, Ichikawa Y, Ozaki T, Yoshida S, Yamashita Y. (2003) Evaluation of mutans streptococci in plaque and saliva: correlation whith caries development in preschool children. Journal of Dentistry; 31: 283-290.
- Shen S, Samaranayake L. (2005) Coaggregation profiles of the microflora from roots surface caries lesions. Archives Oral Biology; 50: 23- 32.
- Soldi C, Pizzolatti M, Luiz A, Marcon R, Meotti F, Mioto L, Santos A. (2008) Synthetic derivatives of the α – and β- amyrin triterpenes and their antiniciceptive properties. Bioorganic & medicinal chemistry; 6: 3377-3386.
- Takahashi N, Nyvad B. (2011) The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. Journal Dentist Research; 90: 294-303.
- Tanachatchairatana T, Bremner J, Chokchaisiri R, Suksamrarn A. (2008) Antimycobacterial activity of cinnamate based esters of the triterpenes betulínico, oleanolic and ursolic acids. Chemistry Pharmacology Bull; 56 (2): 194-198.

- Taweboon B, Taweboon S, Tri D. (2011) Fermentation of various sugars substitutes by oral microorganisms. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine; S258-S260.
- Thaler S, Maguire J. (2001) Artitris infecciosa. En: Braunwald Fauci, Kasper Hauser, Jameson Longo. Editors: Harrison, Principios de medicina interna. 15a ed. México DF: Mac GrawHill interamericana, pp. 2337-3343
- Udayama M, Ohkawa M, Yoshida N, Kinjo J, Nohara T. (1998) Structures of three new oleanane glucuronides isolated from Lathyrus palustris var. pilosus and hepatoprotective activity. Chem Pharm Bull; 46: 1412-1415.
- US Departament of health and Human Services (2000). Oral health in America: a report of the surgeon general. Rockville, MD: US Departament of Health and Human Services, National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health.
- Valencia C. (1995) Fundamentos de fitoquímico, Trillas, México, pp. 190-198
- Vallejo- Sanchez A, Medina- Solís C, Casanova- Rosado J, Maupomé G, Minaya- Sánchez M, Pérez- Olivares S. (2006) Caries increment in the permanent dentition of Mexican children in relation to prior caries experience on permanent and primary dentitions. Journal of Dentistry ; 34 : 709-715.
- .Negroni M. (2009) Microbiología estomatológica y guía práctica, 2a ed, Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 228.
- Vallim M, De Paula J, Pereira R, Teixeira V. (2004) The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. Biochemical Systematics and ecology ; 33 : 1-16.
- Vanderas A, Kavvadia K, Papagiannoulis L. (2004) Development of caries en permanent first molars adjacent to primary second molars with interproximal caries : four – year prospective radiographic study. Pediatric Dentistry ; 26 : 362-368.
- Velásquez O, Vera H, Irigoyen M, Mejía A, Sánchez T. (2003) Cambios en la prevalencia de la caries dental en escolares de tres regiones de México : encuestas de 1987- 1988 y de 1997- 1998. *Revista Panamericana de Salud Pública*; 13(5): 1-14.

- Villaseñor I, Canlas A, Faustino K, Plana K. (2004) Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl) Masam leaves. Journal ethnopharmacology ; 92 : 53-56.
- Wächter G, Valcic S, Flagg M, Franzblau S, Montenegro G, Suarez E, Timmermann B. (1999) Antitubercular activity of pentaciclyc triterpenoids from plants of Argentina and Chile. Phytomedicine; 6: 341-345.
- Woldemichael G, Montenegro G, Timmermann B. (2003) Triterpenoidal lupin saponins from the Chilean legume *Lupinus oreophilus* Phil. Phytochemistry; 8: 853-857.
- Wolska K, Grudniak A, Fiecek B, Kraozkiewicz- Dowjat A, Kurek A (2010) Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. Central European Journal of Biology; 5(5): 543-553.
- Yu H, Lee D, Seo S, You Y. (2007) Anticariogenic properties of the extract of *Cyperus rotundus*. The American Journal of Chinese Medicine; 3:497-505.