ACTA BIOCLINICA

Volumen 4, N°7, Enero-Junio 2014

Trabajo Original

Depósito Legal: PPI201102ME3815

C. David y Col

ISSN: 2244-8136

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Streptococcus mutans* ANTE TRES VARIEDADES DE CHIMÓ.

Carla David[1], Migdalia Guerra[2], Soley Chidiak[3], Yuliana Cols [2], Leonidas Urdaneta[4], Patricio Jarpa[5]

1. Cátedra de Anatomía Humana. Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes, Mérida- Venezuela.

2. Odontólogo, Mérida, Venezuela.

3. Grupo investigaciones Biopatológicas, Laboratorio integrado de Biología Celular y Molecular Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

4. Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

5. Coordinación Investigación. Facultad de Odontología. Universidad Santo Tomas. Bucaramanga, Colombia.

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

ACTA BIOCLINICA

Volumen 4, N°7, Enero-Junio 2014

Trabajo Original

Depósito Legal: PPI201102ME3815

C. David y Col

ISSN: 2244-8136

Correspondencia: Od. Carla David, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Edificio del Rectorado. Calle 24, entre Avenidas 2 y 3, Mérida (5101), Venezuela. Tel/Fax. 00(58) 274-2402386.

Email: garla85@hotmail.com

RESUMEN: En Venezuela, el tabaco de mascar se le conoce con el nombre de “chimó". El chimó, se relaciona a creencias populares que se encuentran arraigadas en la mayoría de los consumidores de este producto. Una de estas creencias es atribuirle una propiedad anticariogénica. Sin embargo, son escasos los trabajos científicos referidos a la relación que podría existir entre el uso del chimó y la caries dental. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto *in vitro* de extractos de tres variedades de chimó sobre *Streptococcus mutans*, bacteria involucrada en la caries dental. Para ello se utilizaron tres variedades de chimó venezolano con la técnica de dilución en agar inoculadas con *S. mutans* (CVCM656). A las 24 y 48 horas se observó en los medios de cultivo la ausencia de inhibición a las diferentes concentraciones empleadas. Por consiguiente, se concluye que

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

las variedades de chimó ensayadas a las concentraciones utilizadas carecen de un efecto inhibitorio *in vitro* sobre *S. mutans* (CVCM 656).

PALABRAS CLAVE: chimó, tabaco de mascar, susceptibilidad bacteriana.

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *Streptococcus mutants* TO THREE VARIETIES OF CHIMÓ

ABSTRACT: In Venezuela, chewing tobacco it is known as "Chimó". The chimó is related to popular beliefs that are embraced by most of the consumers. One of these beliefs is an anticariogenic property. However, research explaining the relationship that may exist between tooth decay and the use of chimó is very rare. In order to determine the *in vitro* effect of chimó on *Streptococcus mutans* (CVCM 656), causal of tooth decay; extracts of three varieties of Venezuelan chimó were assayed in agar dilution technique against *S. mutans* CVCM 656. Absence of inhibition was observed at 24 and 48 hours of incubation in all the concentrations employed, concluding that these three varieties of chimó at the concentrations used in this study have no inhibitory effect on *S. mutans* (CVCM 656)

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

ACTA BIOCLINICA

Volumen 4, N°7, Enero-Junio 2014

Trabajo Original

Depósito Legal: PPI201102ME3815

C. David y Col

ISSN: 2244-8136

KEY WORDS: Chimó, chewing tobacco, bacterial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

El consumo de chimó es una práctica frecuente en Venezuela, siendo los principales usuarios las personas de los campos, algunos agricultores, pescadores y amas de casas. En la actualidad, su uso se ha expandido a las áreas urbanas, y se ha visto incrementado entre jóvenes de diversas edades, creando en ellos un hábito cotidiano. En Venezuela, el chimó es una variedad de tabaco masticable. Se define como una pasta gelatinosa muy densa, producida por el extracto del tabaco (1).

En la actualidad, la composición de este producto puede variar según el fabricante, el cual se le agregan clavos, especies, pimienta, menta y carbonato de sodio que le da al chimó el sabor picante (1). En los andes venezolanos al chimó, como producto popular, se le ha atribuido propiedades medicinales, dentro de las que se citan: antiespasmódico, antiséptico, antiparasitario, antitusígeno, antigripal, desinflamatorio, blanqueador

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

de las dentaduras y anticariogénico. Por otra parte, disminuye la ansiedad por hambre y genera calor interno en quien lo consume (1,2).Por el contrario en investigaciones científicas, se han reportado propiedades dañinas para la salud. A nivel sistémico, está asociado al desarrollo de problemas cardiovasculares, alterando la presión sanguínea debido al efecto vasopresor de la nicotina. En la cavidad bucal se han descrito las siguientes manifestaciones: pigmentaciones de color marrón en dientes y mucosas, mucositis marcada, sialorrea, despapilación de la lengua, halitosis nicotínica, enfermedad periodontal de moderada a severa, abrasión dentaria, estomatitis comisural, leucoplasia y en el consumo a largo plazo la presencia de carcinoma epidermoide bucal (3).

Una de las creencias más comunes en sus consumidores; es que el chimó protege contra la caries dental, es decir, se le confiere una actividad anticariogénica (3,4). La caries dental es definida como una enfermedad infectocontagiosa de etiología multifactorial, que se caracteriza por la disolución progresiva de los tejidos duros e infección de los tejidos blandos del diente, provocada principalmente por *Streptococcus mutans.* Este

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

microorganismo es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa que posee la propiedad patogénica de adherirse a la superficie dental, capaz de metabolizar azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos, lo cual provoca una disminución del pH hasta niveles críticos causando la desmineralización de los tejidos duros del diente (5). En cuanto al chimó, son escasos los estudios acerca de su efecto sobre *S. mutans*, así como su capacidad para detener el crecimiento y colonización de esta bacteria en cavidad bucal o frenar el proceso de la caries dental en personas consumidoras. No obstante, se ha reportado que el tabaco de mascar es capaz de promover *in vitro* el crecimiento de los microorganismos, debido a las altas concentraciones de azúcares; que poseen otros productos en otros países (6). .Sin embargo, ensayos *in vitro* con extracto de chimó venezolano, no evidencian actividad inhibitoria que induzca a considerarlo como una sustancia anticariogénica. De igual forma, al evaluar cargas de bacterias cariogénicas en individuos consumidores de chimo, se concluye que el chimó carece de un efecto inhibitorio sobre las cargas de *S. mutans* evaluadas en la biopelicula dental, atribuyendo la ausencia de la caries dental a un aumento

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

en la salivación y por lo tanto, a una autolimpieza en la cavidad bucal de los consumidores (7.8). Es importante señalar, que existe controversia en cuanto a los resultados reportados por la literatura (2,4,8). Adicionalmente conociendo que la técnica de susceptibilidad *in vitro* utilizada por otras investigaciones no es la más recomendada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (9,10), es posible que los resultados preliminares obtenidos en otros estudios sean de menor confiabilidad. Por tales motivos, y en vista que las creencias populares sobre las propiedades del chimó están verdaderamente arraigadas en sus usuarios, además del incremento en su consumo por la población joven y al desconocimiento acerca de los efectos perjudiciales que pudiera producir en quienes lo consuman; en nuestro contexto se hace importante estudiar si el chimó posee un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la microbiota de la cavidad bucal, principalmente sobre *S. mutans.* Adicionalmente, al encontrarse en Venezuela diversas presentaciones de chimó sobre las cuales cada fabricante utiliza elementos variados para su preparación, produciendo en el mercado variedades únicas, y desconociendo si

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

cada variedad pudiese provocar un efecto diferente sobre *S. mutans*, con los resultados de esta investigación se pretende, dar a conocer la efectividad desde el punto de vista cualitativo, que poseen tres variedades específicas de chimó en pasta, y al mismo tiempo comparar el posible efecto de cada uno de ellos sobre *S. mutans*, con la finalidad de brindar a los pacientes consumidores información concreta, científica y rigurosa sobre el efecto que tiene el producto sobre el riesgo a caries dental.

METODOLOGIA

Muestra: la muestra se seleccionó de las diferentes variedades de chimó disponibles, 3 variedades que se encuentran comúnmente en el mercado, a las que se les asignó letras del alfabeto aleatoriamente para su identificación. Variedad de chimó A: pasta solida semi-industrializada, contenida en un envase de plástico, sin registro sanitario, producido en el Estado Barinas, variedad de chimó B: pasta solida semi-industrializado, contenido en un envase metálico, con un contenido neto de 18 g, con registro comercial y sanitario ZR6-219, producido en el Estado Mérida y variedad de chimó C: pasta solida artesanal, contenido en

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

una hoja de plátano, sin registro sanitario ni comercial, producido en el Estado Mérida. Se utilizó la cepa 656 de *S. mutans*, proveniente del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) (ATCC 25175).

1. **Preparación de soluciones de chimó**

Se preparon soluciones madre a 51200 µg/mL de cada muestra de chimó haciendo uso de agua destilada como disolvente. Posteriormente, se procedió a la filtración al vacío de la soluciones madre, empleando papel de filtro de poro mediano, con la finalidad de eliminar todas las impurezas presentes en el chimó y esterilizadas con acrodiscos de filtros de acetato de celulosa Minisart (Sartorius®), de 2,5 cm de diámetro y con un poro 0,2 µ de diámetro, dentro de una campana de flujo laminar.

2. **Diluciones de chimó**

A partir de las soluciones madre, siguiendo el criterio descrito por el CLSI (10) para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos, se prepararon diluciones dobles seriadas desde 5120 µg/mL hasta 10 µg/mL

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Volumen 4, N°7, Enero-Junio 2014
Depósito Legal: PPI201102ME3815
ISSN: 2244-8136

dentro de una campana de flujo laminar para la esterilidad de las mismas (ver Tabla 1).

3. Preparación de los medios de cultivo para ensayos

Se preparó agar Müeller-Hinton (MHA)(Difco-Becton Dickison®) a partir de una base deshidratada comercialmente disponible, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se añadió a continuación 5% de sangre de carnero. Se comprobó el pH después de la adición de la sangre, el cual debió ser de 7,2 a 7,4.

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Seguidamente, se agregaron las diluciones de la solución de chimó (3 variedades de la muestra) al agar (1mL de la solución de chimó, a una determinada concentración, por 9 mL de agar fundido). Se mezcló completamente la solución de agar y la solución de chimó. Se sirvió, rápidamente, en placas de petri de fondo plano una cantidad de 25 mL a 30 mL de agar fundido, sobre una superficie plana, nivelada y horizontal, hasta obtener una profundidad de agar de 4 mm. Fueron incluidos un control de viabilidad para la cepa de referencia, con sólo MHA y sangre de

carnero al 5% y un control de inhibición con Amoxicilina (AMX) en concentraciones de 1 g/ml y 512 g/ml.

4. Preparación del inóculo bacteriano estándar

La preparación del inóculo bacteriano se efectuó mediante el método de la suspensión directa de las colonias de *S. mutans* en caldo BHI, hasta obtener la turbidez equivalente al estándar 0,5 McFarland. El inóculo final requerido se ajustó a $1x10^4$ UFC por lugar de inoculación en cada placa.

5. Inoculación de las placas

Con una micropipeta se aplicó una alícuota de 10 µL del inóculo de $1x10^4$ UFC/Ml a la superficie del agar, asegurando que la gota del inóculo tuviera de 5 a 8 mm de diámetro.

Una vez inoculadas las placas, se esperó a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos inoculados fuera absorbida por el agar, sin exceder los 30 minutos. Posteriormente, se incubaron en condiciones de microaerofília a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas.

De igual manera, se realizó la inoculación del control de viabilidad y

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Volumen 4, N°7, Enero-Junio 2014
Depósito Legal: PPI201102ME3815
ISSN: 2244-8136

del control con Amoxicilina siguiendo los criterios descritos anteriormente.

6. Lectura de la prueba y determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima CIM

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se establecería a partir de aquella placa donde se observara la inhibición total del crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Se realizó el ensayo de la susceptibilidad *in vitro* de la cepa bacteriana CVCM 656 de *S. mutans* ante la presencia de las variedades de chimó tipo A, B, C. Se verificó a las 24 y 48 horas y no se observó, en la totalidad de las muestras inhibición (ver tabla 2), por el contrario se observó crecimiento de colonias bacterianas. Cabe destacar que se percibió crecimiento de colonias bacterianas características de *S. mutans*. Igualmente, el control de viabilidad de la cepa 656 de *S. mutans* del CVCM y control de inhibición con Amoxicilina de 1 µg/mL , evidencia a las 24 y a las 48 horas, crecimiento de las colonias bacterianas (ver fig. 1). Por otro

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

lado, el control de viabilidad con antibiótico a 512 µg/mL, se evidenció la inhibición total del crecimiento.

Tabla 2. Lectura y registro a las 24 y 48 horas de las placas con chimó variedad A, B, C.

Nº de placa	Concentración final 1:10 Dilución en agar (µg/ ml)	Variedad A		Variedad B		Variedad C	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Placa 1	512	-	-	-	-	-	-
Placa 2	256	-	-	-	-	-	-
Placa 3	128	-	-	-	-	-	-
Placa 4	64	-	-	-	-	-	-
Placa 5	32	-	-	-	-	-	-
Placa 6	16	-	-	-	-	-	-

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Placa 7	8	-	-	-	-	-	-
Placa 8	4	-	-	-	-	-	-
Placa 9	2	-	-	-	-	-	-
Placa 10	1	-	-	-	-	-	-

+: Presencia de inhibición

-: indica ausencia de Inhibición

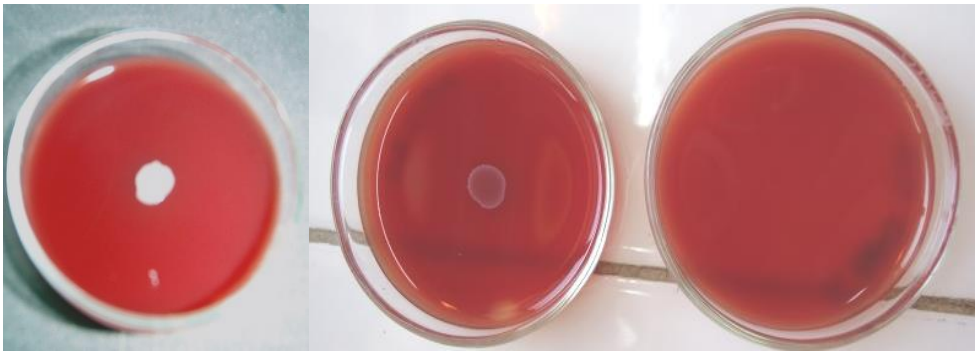
En cuanto al crecimiento encontrado, durante el primer registro a las 24 horas se observó en la placa 5 (32 µg/mL), 6 (16 µg/mL), placa 7 (8 µg/mL), placa 8 (4 µg/mL), placa 9 (2 µg/mL) y placa 10 (1 µg/mL) de la variedad tipo A un crecimiento débil comparado al crecimiento de las células bacterianas del control de viabilidad y al control con antibiótico. A diferencia de la placa 1 (512 µg/mL), placa 2 (256 µg/mL) (ver fig.19), placa 3 (128 µg/mL), placa 4 (64 µg/mL) cuyo crecimiento fue similar al crecimiento presentado en el control de viabilidad. Por otra parte, la variedad tipo B (fig. 1) y tipo C en todas sus

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

concentraciones presentaron un crecimiento débil en contraste al control de viabilidad. Por lo tanto, no se logro evaluar CIM

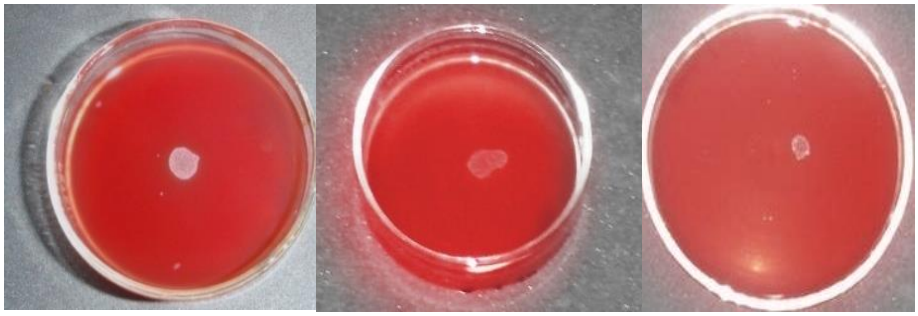
Posteriormente, se realizó un segundo registro a las 48 horas, donde las variedades tipo A, B y C mostraron un crecimiento bacteriano similar con el control de viabilidad.



Control de Viabilidad **Control de AMX 1µg/mL** **Control de AMX 512µg/mL**

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013



Variedad A (512 µg/mL) **Variedad B (512µg/mL)** **Variedad C (512µg/mL)**

Fig.1. Comparación de control de viabilidad de cepa 656 de *S. mutans* y Control con Amoxicilina con variedades A, B y C (48 horas).

DISCUSIÓN

El presente estudio, permitió demostrar *in vitro* que las tres variedades de chimó estudiadas, carecen de un efecto inhibidor sobre la cepa 656 de *S. mutans*, a las concentraciones empleadas. Al comparar los resultados obtenidos con aquellos de los estudios realizados por Lindermeyer et al. (6), quienes observaron promoción del crecimiento de *S. mutans* y *S.*

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

sanguinis y no inhibición por estos productos. Dicho resultado resulta paradójico con respecto a lo observado en la presente investigación. Sin embargo, sería improbable asociar al chimó venezolano con la promoción de crecimiento bacteriano, debido al bajo contenido de azúcares en este producto tal como lo reporta Rojas et al.(4).

Igualmente, resultados semejantes fueron reportados por Falkler et al. (12), quienes al estudiar el efecto *in vitro* de extractos del tabaco sin humo y extractos suplementados con solución salina básica sobre bacterias del género *Streptococcus* (*Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius y Streptococcus sanguinis*), demostraron que estos extractos no inhiben el crecimiento de estos microorganismos, por el contrario los extractos estudiados, sirven como sustrato para el crecimiento de los estreptococos orales, que se asocian frecuentemente con la caries dental. Dichos resultados explican que los extractos de tabaco sin humo suplementado con solución salina básica promueven el crecimiento bacteriano. Por otra parte, en este estudio se observó un crecimiento débil a las 24 horas y menos marcado a las 48 horas de las variedades B y C de chimó y las concentraciones más bajas de la variedad

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

A, que pudiese sugerir un leve efecto que impide el crecimiento marcado comparado con el control de viabilidad, lo cual puede sugerir que las concentración inhibitoria mínima se encuentre a concentraciones mayores a 512 µg/mL. Sin embargo, los resultados de estos autores pueden indicar, que los extractos carecen de sustentabilidad. Los resultados obtenidos por Ayo et al (12), en el que sometieron a prueba el efecto antibacterial del tabaco fumado sobre la microbiota de la saliva, utilizando 5 productos populares de Sudáfrica (tres de preparación tradicional y dos industrializados) contra aislados clínicos de bacilos Gram positivos. Determinaron que en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, dichos productos carecen de efectos inhibitorios. Sin embargo, los bacilos Gram positivos pueden presentar diferencia en cuanto a susceptibilidad por ser especies bacterianas diferentes a la cepa control de cocos Gram positivos empleados en el presente ensayo.

Píneda et al (2), evaluaron el efecto de los extractos del chimó venezolano sobre *S. mutans*, a través de la técnica de susceptibilidad disco-difusión en agar, sometiendo la cepa 656 de *S. mutans* a diferentes concentraciones de la variedad B de chimó incluida en este estudio,

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

demostrando una escasa actividad inhibitoria de esta sustancia, a pesar que en dicho estudio, utilizaron MHA sin suplementar con sangre de carnero. Se evidencia un comportamiento distinto a los resultados presentados por Píneda et al. (2), posiblemente debido a que su estudio se realizó en concentraciones diferentes de chimó y por medio de una técnica de susceptibilidad distinta. En este mismo sentido, emplean terminología poco objetiva en la descripción de sus resultados, lo cual puede crear controversia en cuanto a la presencia de inhibición en la cepa estudiada.

Sosa et al. (7), quienes caracterizaron la flora bacteriana en la biopelícula dental de individuos consumidores de chimó al comparar con un grupo no consumidor, determinaron que el mismo no provoca inhibición en la proliferación de cargas de *S. mutans* en la biopelícula dental, y por lo tanto no inhibe la formación de la biopelícula dental, sugiriendo que carece de un posible efecto anticariogénico. Al igual que el estudio de Cordero et al. (13), quienes recuperaron cargas bacterianas semejantes a los grupos consumidores y no consumidores demostrando nula inhibición de los microorganismos de saliva ante la presencia del chimó. Las

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

deducciones obtenidas con dichos estudios, pese a que no se relacionan con ensayos de susceptibilidad *in vitro*, concuerdan con los resultados de esta investigación, debido a que se puede percibir que los pacientes consumidores de chimó no presentan inhibición de los microorganismos cariogénicos presentes en la biopelícula dental y en saliva, permitiendo fortalecer más los resultados conseguidos en presente estudio.

CONCLUSION

Es de resaltar, que al determinar el efecto de tres variedades de chimó, oriundas de Venezuela, se abren nuevas bases de investigación, para descartar creencias populares, que presumen que esta pasta oscura protege a sus consumidores contra el ataque de la caries dental, considerando que cada día se observa un incremento en el consumo de dicho producto.

Al exponer uno de los agentes causales de la caries dental, como es *S. mutans* a diferentes variedades en distintas concentraciones de chimó venezolano, y evidenciar ausencia inhibición a las 24 y 48 horas de registro, se determinó que las variedades de chimó tipo A, B, C, a las concentraciones utilizadas en el presente estudio carecen de un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la cepa 656 de *S. mutans*, pero podría sugerir que las

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

concentraciones inhibitorias mínimas se encuentran a concentraciones mayores a 512 µg/mL

Sin embargo, la ausencia de inhibición encontrada en el presente estudio pone en duda la creencia popular que existe en cuanto a que el chimó protege contra la caries dental, no obstante, podrían existir otros factores *in vivo* que propicien la baja frecuencia de caries dental en los consumidores de chimó como es el incremento de las funciones y cantidad de la saliva, a la auto limpieza y barrido entre otros procesos asociados a la potenciación inmunidad de cavidad bucal.

REFERENCIAS

1. Jarpa P. Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pastas de tabaco de mascar, relacionadas con la adición de nicotina. Rev Fac Farm, 2003; 45(2): 7-11.
2. Pineda Y. y Premoli G. Susceptibilidad *in vitro* del chimó sobre *S. mutans*, al uso de extracto del chimó**.** Trabajo especial de grado para optar al título de especialidad en Rehabilitación Bucal, ante el consejo de la Facultad de Odontología de la

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Universidad de Los Andes. Documento sin publicación. 2005

3. Jarpa P.Potencial mutagénico del tabaco de mascar venezolano. Rev Fac Farm, 2003; 45(2):2-6.
4. Rojas A y Seelkopf C. Estudio sobre el chimó**.** Rev Fac Farm. 1960; 1: 65-85.
5. Liébana J. (2002). Microbiología Oral. (2ª Edición). Madrid – España: MacGraw-Hill.
6. Lindemeyer R; Baum R; Hsu, S y Going R. In vitro effect of tobacco on the growth of oral cariogenic streptococci. J Am Dent Assoc., 1981; 103(5):719-22.
7. Sosa M; Urdaneta L; Chidiak S; González A y Jarpa P. 2009. Caracterización preliminar de la flora bacteriana en la biopelìcula dental de individuos consumidores de chimó**.** Rev Od Los Andes, 2009; 2(3): 4-12.
8. Keene K. 1999. The effect the nicotine on growth of Streptococcus mutans. Miss DentAssoc J 4th quarter, 1999;55(4):38-39.
9. Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). (2009) Methods for dilution antimicrobial test for bacteria that grow aerobically.

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013

Approved Standars Eight- Edition. CLSI document MO7-A8.Wayne, PA.

10. Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). (2013). Performance Standars. Antimicrobial susceptibility testing: twenty third Infomational supplement. CLSI document M100- S23.
11. Falkler W; Zimmerman M; Martin, S; Hall E.(1987).The effect of smokeless-tobacco extracts on the growth of oral bacteria of the genus Streptococcus.Arch Oral Biol.1987; 32 (3):221-3.
12. Ayo A, Van Wink C, Van Wink CW, de Wet I. Smokeless tobacco products on South African market do not inhibit oral bacterial flora: pilot study. South Afr J Epidemiol Infect. 2005;20(4): 136-139.
13. Cordero D; Ramírez Y y Urdaneta L. (2008). Efectos del consumo de chimó sobre la microbiota habitual presente en Saliva. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo ante el Consejo de Facultad de Odontología de La Universidad de Los Andes.

Recibido: 11/08/2013

Aceptado: 12/10/2013