

Caracterización preliminar de la flora bacteriana en la biopelícula dental de individuos consumidores de chimó

PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE BACTERIAL MICROFLORA IN DENTAL BIOFILMS
FROM CHIMÓ CONSUMERS

MANUEL E. SOSA G.ⁱ • LEONIDAS E. URDANETA P.ⁱⁱ • SOLEY CHIDIAK T.ⁱⁱⁱ •
ANA C. GONZÁLEZ^{iv} • PATRICIO J. JARPA R.^v

ⁱOdontólogo. ⁱⁱMSc en Microbiología Clínica, Departamento de Biopatología, Facultad de Odontología.

ⁱⁱⁱFarmacéutica. Departamento de Biopatología, Facultad de Odontología. ^{iv}Licenciada en Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ^vMSc in Oral Sciences. Departamento de Biopatología, Cátedra de Microbiología.

Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. E-mail: lurdanet@ula.ve.

RESUMEN

El chimó es una variedad de tabaco de mascar típica de muchos pueblos andinos. A éste, se le atribuyen efectos inhibitorios sobre biopelículas y caries dentales según las creencias populares. Al ser la biopelícula dental, el origen para otras patologías intraorales y con la finalidad de estudiar el efecto del chimó sobre la conformación bacteriana de esta, se evaluó el índice de O'Leary y se realizaron análisis microbiológicos comparativos a muestras de placa dental, recolectadas en cuatro momentos distintos, de 5 individuos consumidores de chimó (grupo problema) y 5 no consumidores de chimó (grupo control). Las muestras fueron disgregadas e inoculadas en Agar Infusión Cerebro Corazón para determinar cargas bacterianas totales aeróbicas y microaerófilas; y en Agar Rogosa y Agar Mitis Salivarius con Bacitracina y Sacarosa para el recuento de *Lactobacillus* spp y *Streptococcus mutans* respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre las cargas bacterianas aeróbicas totales de ambos grupos, sin registrarse efecto inhibitorio sobre *S. mutans* para el grupo problema. Resultó difícil recuperar *Lactobacillus* spp bajo las condiciones empleadas. Los resultados sugieren que el chimó no inhibe la formación de la biopelícula dental, ni posee efecto anticariogénico. Es recomendable realizar estudios prospectivos con mayor número de muestras que consideren factores socioepidemiológicos.

Palabras clave: chimó, biopelícula, placa dental, flora bacteriana bucal, potencial cariogénico.

ABSTRACT

The chimó is a variety of smokeless tobacco typical from many towns in Los Andes. According to popular believes, some inhibitory effects on biofilms and caries are attributed to chimó. As dental biofilm is the origin for other intraoral pathologies and with the purpose of studying the effect of chimó on bacterial conformation of it, we evaluated the O'Leary index and performed microbiological comparative analyses to samples of dental plaque collected in four different times from 5 chimó consumers (problem group) and 5 non consumers (control group). Samples were disgregated and inoculated in Brain Heart Infusion Agar to determine total aerobic bacterian charges and in Rogosa Agar and Mitis Salivarius Agar with Bacitracin and Sucrose for the new count of *Lactobacillus* spp and *Streptococcus mutans* respectively.

Significant differences were observed between the total aerobic bacterial charges of both groups without signs of inhibitory effect on *S. mutans* for the problem group. It was hard to recover *Lactobacillus* spp under the conditions of this experiment. Results suggest that chimó does not inhibit either the formation of dental biofilm nor has a anticariogenic effect. It is recommended to conduct prospective studies with a larger number of samples taking into account socioepidemiologic aspects.

Key words: chimó, biofilm, dental plaque, oral bacterial flora, cariogenic potential.

Introducción

En Venezuela se conoce el tabaco de mascar con el nombre de “chimó”, que es una pasta de color oscuro, con una arraigada figuración folklórica y tradicional, que manifiesta la identidad de los pueblos venezolanos y, muy especialmente, de los pueblos andinos. El chimó ha sido utilizado como medio de socialización y se le atribuye un sabor desagradable y efectos estimulantes que permiten mitigar necesidades fisiológicas como el hambre, el frío y hasta la ansiedad; sin embargo, son pocas las referencias que detallan las características y propiedades de la pasta de chimó como producto autócoto y sus efectos sobre la población (Alvarado, 1989; Aranguren, 2005; Dupouy, 1952; Jarpa, 2003a y 2003b; Rojas, 1958).

Son muchos los beneficios que de manera popular se le han adjudicado al chimó, sobre todo en los ambientes rurales, manifestándose su uso como repelente de insectos, antídoto ante mordeduras de animales ponzoñosos, excelente antiséptico y desinfectante en heridas abiertas, entre otras aplicaciones que abarcan el campo odontológico, al ser empleado en sustitución de la pasta dental, por atribuírsele propiedades anticariogénicas (Dupouy, 1952). Este último aspecto no está formalmente descrito por estudios clínicos ni se ha ubicado publicación alguna que lo señale, observándose la existencia limitada de información científica referente al chimó.

En vista de lo anteriormente planteado surge la inquietud de aclarar las propiedades del chimó en el contexto clínico odontológico, tratando de evaluar su efecto sobre la composición y proliferación de la flora bacteriana durante la formación de la biopelícula dental, y el condicionamiento que

ejerce sobre el potencial cariogénico de la misma. Esto, fundamentándose en conocimientos populares que sugieren que en individuos consumidores crónicos de chimó la proliferación de microorganismos en cavidad bucal se ve seriamente afectada, considerándose una posible tendencia a la disminución debido al efecto inhibitorio que podría causar el mismo sobre la diversidad bacteriana y su proliferación. Dicho efecto limitaría la aparición de la biopelícula dental y los procesos patológicos subsiguientes. Para dilucidar tal situación, el presente estudio describe de manera comparativa y preliminar la flora bacteriana que se adosa a las superficies supragingivales de los dientes en individuos consumidores y no consumidores de chimó por medio de la caracterización morfológica, tinte, de requerimientos de oxígeno y la semicuantificación de la flora bacteriana cariogénica y total presente en la biopelícula supragingival a las 0, 2, 6 y 12 horas después del cepillado.

Materiales y métodos

Se planteó un estudio preliminar de tipo descriptivo correlacional (Sampieri, 2003). Fueron incluidos en el estudio aquellos individuos que asistieron a la consulta odontológica en el servicio del Ambulatorio tipo III de la ciudad de Ejido en el estado Mérida y que voluntariamente aceptaron participar. Se logró conformar un grupo problema, de cinco individuos, sin limitaciones en la edad, sin enfermedades sistémicas, que no estuvieran bajo tratamiento medicamentoso, con dentadura natural, no fumadores, consumidores de chimó; y un

grupo control de cinco individuos en condiciones idénticas pero sin el hábito de consumo de chimó. Los individuos dieron su consentimiento informado para posteriormente evaluar el índice O'Leary de placa dental (Carranza y Newman, 1998; Lindhe, 2000); y recolectar muestras seriadas de placa dental supragingival de los dientes anteroinferiores por vestibular a las 0, 2, 6, y 12 horas después del cepillado, evitando realizar higiene bucal durante ese período para facilitar la formación de la biopelícula dental.

Aproximadamente 8 mg de biopelícula dental fueron obtenidos por raspado con cureta estéril y colocados en tubos Eppendorf con 200 µL de solución salina fisiológica para su transporte inmediato. Las muestras fueron resuspendidas hasta homogeneidad haciendo uso de un vortex, procediendo a cultivarlas en medios sintéticos según la técnica de semicuantificación bacteriana (Kone-man y Allen, 1999), utilizando una placa de Agar Infusión Cerebro Corazón o ABHI (DIFCO), para el recuento de bacterias en condiciones aeróbicas, y otra placa de este mismo medio de cultivo para el recuento de bacterias en condiciones de microaerofilia. También se cultivó en Agar Rogosa o AR (DIFCO) para el recuento de *Lactobacillus* spp y en Agar Mitis Salivarius (DIFCO) con 0,2 U/ml de Bacitracina (Sigma) y 20% de Sacarosa (DIFCO) o AMSBS, para el recuento de *Streptococcus mutans* (Gold, Jordan y Van Houte, 1973; Jordan, Laraway, Snirch y Marmel, 1987). Todos los medios fueron incubados a 35 ± 1 °C por 48 horas. Los valores de *S. mutans* y *Lactobacillus* spp fueron comparados con las tablas establecidas para ensayos comerciales y señaladas en Negroni (1999). Las colonias obtenidas en ABHI fueron caracterizadas microscópicamente con la tinción de Gram. El análisis estadístico se realizó a través del paquete SPSS v.13.0.

Resultados

Al evaluar el índice O'Leary de placa dental se observó que los valores promedio, en expresión porcentual, fueron significativamente mayores ($p=0,018$) en el grupo problema ($30,6\% \pm 6,6$) en comparación con el grupo control ($23,8\% \pm 7,80$) (Tabla 1).

Tabla 1. Registro porcentual de Índice O'Leary aplicado a ambos grupos de estudio.

Grupo	Individuo	Registro de placa dental (O'Leary)	Registro promedio ($x \pm 2$ DE)
Consumidor de chimó	1	32%	30,6% \pm 6,6
	2	26%	
	3	30%	
	4	35%	
	5	30%	
No consumidor de chimó	6	18%	23,8% \pm 7,80
	7	22%	
	8	28%	
	9	26%	
	10	25%	

($p = 0,018$)

El crecimiento bacteriano en ABHI bajo condiciones de aerobiosis permitió evidenciar que en ambos grupos de estudio prevaleció la morfología cocoide con 96,15 % para el grupo problema y 80% para el grupo control (cálculos no mostrados), con tinción predominante grampositiva para el grupo problema y gramnegativa para el grupo control. Las bacterias de forma bacilar fueron principalmente observadas en el grupo control, predominando aquellas con tinción gramnegativa. Los cultivos incubados en microaerofilia también presentaron predominio de crecimiento bacteriano con morfología cocoide con características tintoriales principalmente grampositivas. Por su parte, el morfotipo bacilar se mantuvo en proporciones bajas para ambos grupos, sin observarse un predominio tintorial específico (Tabla 2, Gráfico 1).

Tabla 2. Número de colonias bacterianas aeróbicas y microaerófilas según sus características morfotintoriales por muestra en cada grupo de individuos.

Grupo		7 am		9 am		1 pm		7 pm		Total /morfotipo		Total geral.		
		Cocos		Bacilos		Cocos		Cocos		Bacilos				
		Gram pos.	Gram neg.	Gram pos.	Gram neg.									
Aerobiosis	C	5	1	-	-	4	2	-	-	5	1	1	-	26
	NC	5	1	1	1	3	-	1	1	-	5	-	1	
Micro-aerofilia	C	2	4	-	-	3	2	2	-	5	2	-	-	28
	NC	2	2	1	-	4	1	-	-	3	1	-	1	

C: consumidores de chimó, NC: no consumidores de chimó, pos: positivo, neg: negativo.

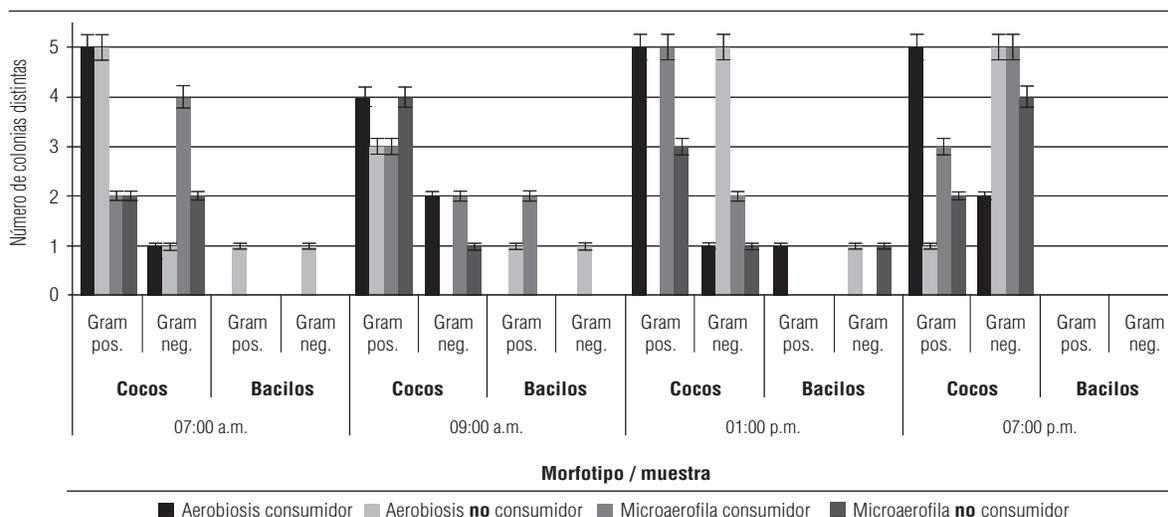


Gráfico 1. Distribución de los morfotipos bacterianos aeróbicos y microaerófilos según características tintoriales por grupo de individuos y muestra

En el Gráfico 2 y en la Tabla 3 y se muestra el promedio general de la evolución de las poblaciones bacterianas aeróbicas por grupos en los cuatro momentos. El grupo problema presenta menor carga bacteriana aeróbica en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) que el grupo control, siendo esta diferencia significativa para la muestra estudiada ($p=0,027$). En cuanto a la carga bacteriana microaerófila, el grupo problema también mantuvo valores inferiores a los del grupo control durante las 4 determinaciones, sin embargo, esta diferencia no indica importancia estadística ($p=0,079$).

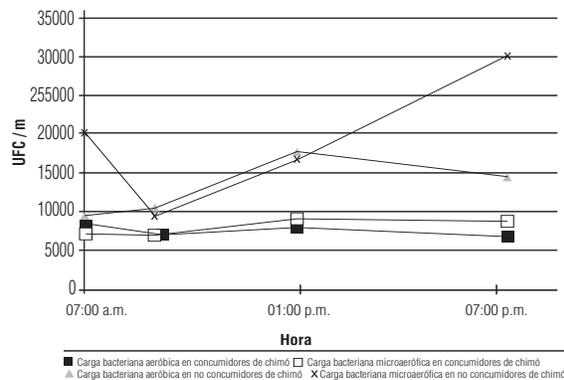


Gráfico 2. Evolución de la carga bacteriana aeróbica y microaerófila en individuos consumidores y no consumidores de chimó.

Tabla 3. Comparación de la evolución de la carga bacteriana promedio aeróbica y microaerófila en individuos consumidores y no consumidores de chimó.

Condición de cultivo	Individuos	Carga bacteriana promedio UFC/ml \pm EE			
		07:00 a.m.	09:00 a.m.	01:00 p.m.	07:00 p.m.
Aerobiosis	Consumidores	8160 \pm 2134	6820 \pm 1958	8440 \pm 2219	6700 \pm 1254
	No consumidores	9540 \pm 827	10440 \pm 440	17280 \pm 2881	14240 \pm 2473
Microaerofilia	Consumidores	7460 \pm 2234	6880 \pm 1781	8700 \pm 2645	8460 \pm 1745
	No consumidores	20240 \pm 5989	9340 \pm 685	16740 \pm 5917	30060 \pm 60

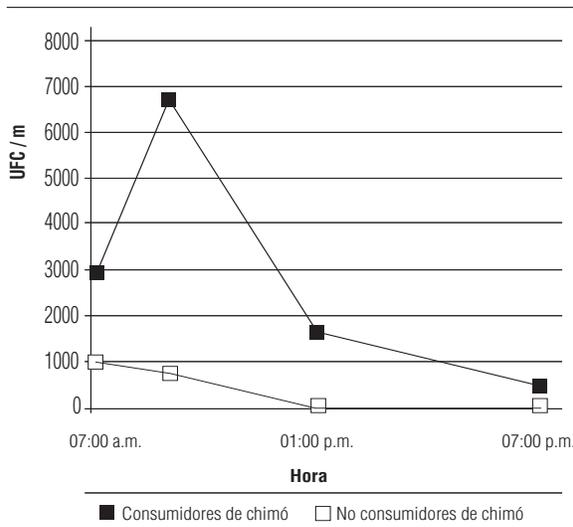
UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por mililitro

En cuanto al promedio general de *Streptococcus mutans* se observan siempre valores superiores en los individuos consumidores, sin embargo, dicha diferencia resulta no significativa ($p=0,160$) (Tabla 4, Gráfico 3). Por su parte, las cargas de lactobacilos siempre fueron cercanas a cero para ambos grupos.

Tabla 4. Carga promedio de *S. mutans* en cada muestra por grupo

Grupo de individuos	Carga promedio de <i>S. mutans</i> en cada muestra por grupo (UFC/mL) \pm EE				
	7 am	9 am	1 pm	7 pm	Promedio
Consumidor de chimó	2960 \pm 1530	6700 \pm 2043	1660 \pm 1164	440 \pm 223	2940 \pm 1355
No consumidor de chimó	940 \pm 464	760 \pm 523	0	0	425 \pm 248

($p = 0,160$)

**Gráfico 3.** Evolución de la carga promedio de *S. mutans* en cada muestra por grupo

Discusión

Como parte de las evaluaciones clínicas previas a la realización de las actividades de laboratorio, se aplicó el índice de O'Leary con el propósito de medir los niveles de higiene oral. En este sentido, valores por debajo del 25% son considerados como óptimos, infiriendo hábitos de higiene bucodental aceptable (Carranza y Newman, 1998; Lindhe, 2000). En el presente estudio, dicho criterio es atribuible únicamente al grupo control, con un valor promedio de 24%, mientras que, para el grupo problema fue de 31%, lo cual permitiría sugerir que los individuos consumidores de chimó tienen mayor riesgo de desarrollar patologías asociadas a biopelículas dentales tales como: caries y enfermedad periodontal, entre otras. Si bien se observa una

pequeña diferencia en promedio general entre ambos grupos, la misma es significativa ($p=0,018$), y esto podría deberse a divergencias en cuanto a los hábitos de higiene oral propios de cada individuo; condiciones que podrían estar asociadas a diferencias socioeconómicas o culturales que puedan existir entre los integrantes de cada grupo y que no fueron evaluadas en la presente investigación.

Marsh (2004) señala que 50% de la biopelícula dental está constituido por células, dentro de las cuales se incluyen las de tipo bacteriano. Estas últimas, según sus características morfotintoriales, pueden incluir 50% de cocos y 48% de bacilos (Liébana, 2002). Comparando estos datos con los resultados obtenidos en esta investigación se evidencia similitud del morfotipo bacteriano aislado, con predominio de cocos grampositivos aeróbicos y microaerófilos en ambos grupos. Es importante mencionar, que la diversidad de morfotipos observados fue menor en el grupo problema en comparación con el grupo control. Por otra parte, hay que mencionar que la presencia de anaeróbicos facultativos o estrictos no fue evaluada en nuestra investigación, aspecto que resultaría de importancia incluir en estudios posteriores.

En el grupo no consumidor de chimó, la evolución de la carga bacteriana aeróbica y microaerófila estuvo siempre por encima de los valores registrados para el grupo consumidor de chimó, demostrando diferencia significativa ($p=0,027$) solo para los medios de cultivo bajo condiciones aeróbicas, ya que en aquellos cultivados bajo condiciones de microaerofilia no hubo diferencia estadística de importancia ($p=0,079$). Se puede inferir una posible ventaja de los consumidores de chimó sobre los no consumidores en referencia al efecto inhibitor en la proliferación de placa dental. Al respecto, estudios realizados en individuos consumidores de tabaco de mascar y fumadores, han descrito que la disminución de la microflora oral es consecuencia de cambios en el proceso de salivación (Avasn Maruthi, Rao, Palivela y Thakre, 2004). Estos aspectos, aunados a la diversidad de morfotipos anteriormente descrita, permitiría considerar que aun cuando los consumidores de chimó mantengan cargas bacterianas aeróbicas y microaerófilas bajas,

la constitución de las mismas puede resultar diferente a la de los no consumidores, por lo cual se destaca la necesidad de identificar las especies bacterianas que puedan prevalecer en cada caso.

Resulta importante señalar que, las diferencias observadas en el presente estudio pudieran relacionarse con el incremento del volumen y las funciones salivales, lo cual, aunque no explica la relación directa entre el chimó y dichas variaciones, si permitiría sugerir alteraciones de las proteínas presentes en saliva y, por ende, en los procesos de agregación, adherencia, destrucción, inhibición del metabolismo y nutrición bacteriana señalados por Rudney (1995 y 2000), pudiendo generar una desorganización de la biopelícula dental en los consumidores de chimó, posiblemente condicionada por interferencia de la señalización interbacteriana y definiendo el potencial patógeno de la biopelícula dental (Xavier, Picioreanu, Almeida y Loosdrecht, 2003). Esto sugiere que la diversidad bacteriana pueda ser mucho más relevante que la cantidad.

Para la determinación del potencial cariogénico en consumidores y no consumidores de chimó se analizaron las cargas bacterianas de microorganismos acidogénicos como *S. mutans* y *Lactobacillus* spp. En referencia a *S. mutans* los resultados para los consumidores de chimó mantuvieron valores superiores a los registrados en los no consumidores sin diferencia estadística ($p=0,160$). Al comparar estos valores con los rangos preestablecidos para ensayos comerciales, se observa un riesgo bajo a caries en ambos grupos, aun cuando se evidencien valores más elevados en el grupo problema. Cabe destacar que dichos ensayos son diseñados para muestras de saliva, pero fueron utilizados como punto de referencia debido a que se desconocen estudios de cuantificación de *S. mutans* y de *Lactobacillus* spp en placa dental. Sin embargo, el incremento en la carga de estreptococos en los consumidores de tabaco de mascar u otras presentaciones había sido descrito previamente por investigadores como Falkler, Zimmerman, Martin y Hall (1987), Keene y Johnson (1999) y Lindemeyer, Baum, Hsu y Going (1981), destacando el rol que puede jugar la presencia de nicotina y carbohidra-

tos en dichos productos. Así mismo, se ha descrito el papel que puede desempeñar la nicotina en la modulación de la respuesta inmunológica, reportándose disminución de las funciones de algunos tipos celulares que participan en la defensa de la cavidad oral ante la presencia de posibles patógenos (Barbour, Nakashima, Zhang, Tangada, Hahn, Schenkein y Tew, 1997; Kinane y Chestnutt, 2000), e incrementándose los factores humorales tipo IgA en la saliva de los consumidores (Gregory, Kindle, Hobbs y Malmstrom, 1991), aspecto que debería considerarse dentro de los múltiples factores asociados a la aparición de biopelícula dental, caries y procesos subsiguientes. Los resultados obtenidos por el presente estudio, en lo referido a *S. mutans*, junto a las observaciones realizadas por Pineda (2005), Keene y Jonson (1999) y Falkler et al. (1987), contribuyen a proyectar criterios que debaten los beneficios adjudicados al consumo de chimó en la prevención de caries dental.

En cuanto a *Lactobacillus* spp, es necesario mencionar que las especies de este género se ubican principalmente en la saliva y dorso de la lengua con poca presencia en superficies lisas de los dientes, debido a que este microorganismo carece de capacidad de adherencia a las mismas (Liébana, 2002), motivo por el cual pudo haber sido difícil la recuperación de este microorganismo a través de los procedimientos utilizados en este estudio.

Con base en estos resultados se hace evidente que el riesgo de procesos patógenos como la caries dental en los consumidores de chimó no se ve disminuido debido a que no hubo inhibición en la proliferación de *S. mutans*, quedando en duda el efecto protector ante la caries dental. Resulta factible pensar que el efecto anti-caries al que se refieren Alvarado (1984), Dupouy (1952) y los creyentes del chimó, pueda basarse en variaciones de la conformación bacteriana en la biopelícula, debido al incremento de las funciones de la saliva, o modificaciones físico químicas del microambiente oral. No obstante, se debe recordar que la caries dental es considerada una enfermedad compleja y multifactorial donde los factores influyentes en una población particular no son necesariamente los

mismos de otra población con diferentes hábitos culturales y de comportamiento (Fejerskov, 2004).

Vale recordar que en este estudio preliminar, con un número limitado de participantes, se utilizó muestra de placa dental y no saliva como reportan otros autores, por lo que resultaría útil establecer criterios de correlación entre ambos tipos de muestra y ampliar los grupos de estudio en investigaciones subsiguientes.

Conclusiones

El chimó no ejerce un efecto inhibitorio sobre las cargas bacterianas evaluadas en placa dental, sean estas cariogénicas o no. De hecho el observar cargas elevadas de *S. mutans* en el grupo problema sugiere mayor predisposición a padecer de procesos cariosos en comparación con el grupo control. Se reconoce además, la dificultad para recuperar y cuantificar lactobacilos a partir de muestras de placa dental haciendo uso de los procedimientos señalados en la presente investigación.

Agradecimiento

A la Prof. Elsa Velazco, Coordinadora del Laboratorio de Bacteriología Clínica Anaerobia "Dr. Roberto Gabaldón", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, por su colaboración.

Referencias

- Alvarado, L. 1984. *Obras completas*. Caracas-Venezuela: La Casa de Bello.
- Aranguren, M. 2005. *Características sociodemográficas y manifestaciones bucales del consumo de chimó: Estudio preliminar en la población de Tabay, estado Mérida. Mérida-Venezuela*. Trabajo especial de grado, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes.
- Avasn Maruthi, Y., Rao, R. S., Palivela, H. y Thakre, S. 2004. Impact of gutkha & smoking on microbial environment of oral cavity: a case study on slum dwellers of selected areas in Visakhapatnam. *J Environ Sci Eng*, 46(4):268-273.
- Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J-B., Tangada, S., Hahn, Ch., Schenkein, H. A. y Tew J. 1997. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8(4):437-460.
- Carranza, F. y Newman, M. 1998. *Periodontología clínica*. 8ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Dupouy, W. 1952. *Aspectos folklóricos del uso del chimó*. Caracas-Venezuela: Archivo venezolano del folklore.
- Falkler, W. A., Zimmerman, M. L., Martin, S. A. y Hall E. R. 1987. The effect of smokeless-tobacco extracts on the growth of oral bacteria of the genus *Streptococcus*. *Arch Oral Biol*, 32(3):221-223.
- Fejerskov, O. 2004. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*, 38:182-191.
- Gold, O. G., Jordan, H. V. y Van Houte, J. 1973. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 18:1357-1364.
- Gregory, R. L., Kindle, J. C., Hobbs, L. C. y Malmstrom, H. S. 1991. Effect of smokeless tobacco use in humans on mucosal immune factors. *Arch Oral Biol*, 36(1):25-31.
- Jarpa, P. 2003a. Potencial mutagénico del tabaco de mascar venezolano. *Rev Fac Far*, 45(2):2-6.
- Jarpa, P. 2003b. Medición de pH de 12 preparaciones distintas de pasta de tabaco de mascar, relacionándolas con la adicción a la nicotina. *Rev Fac Farm*, 45(2):7-11.
- Jordan, H. V., Laraway, R., Snirch, R y Marmel, M. (1987). A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 66:57-61.
- Keene, K. y Johnson, R. B. (1999). The effect of nicotina on growth of *Streptococcus mutans*. *Miss Dent Assoc J*, 55(4):38-39.
- Kinane, D. F. y Chestnutt, I. G. 2000. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(3):356-365.
- Koneman, E. y Allen, S. 1999. *Diagnóstico microbiológico*. 5ª ed. Argentina: Médica-Panamericana.
- Liébana, U. 2002. *Microbiología oral*. 2ª ed. Madrid-España: McGraw-Hill.
- Lindemeyer, R. G., Baum, R. H., Hsu, S. C. y Going, R. E. 1981. In vitro effect of tobacco on the growth of oral cariogenic streptococci. *J Am Dent Assoc*, 103(5):719-722.
- Lindhe, J. 2000. *Periodontología clínica*. Madrid-España: Médica Panamericana.
- Marsh, P. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*, 38:204-211.

- Negroni, M. 1999. *Microbiología estomatológica*. Caracas-Venezuela: Médica Panamericana.
- Pineda C. 2005. *Susceptibilidad in vitro de Streptococcus mutans, al uso de extracto de chimó*. Tesis de especialidad. Mérida-Venezuela: Postgrado en Rehabilitación Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes.
- Rojas, A. 1958. *Estudio sobre el chimó en rama*. Tesis de doctorado. Mérida-Venezuela: Universidad de los Andes.
- Rudney, J. 1995. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med*, 6(4):343-367.
- Rudney, J. 2000. Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res*, 14:29-35.
- Sampieri, R. 2003. *Metodología de la investigación*. 3^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Xavier, J., Picioareanu, C., Almeida, J. y Loosdrech, M. 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Bol Biotecnol*, 76:2-13.