



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE REHABILITACION BUCO-MAXILOFACIAL  
UNIDAD DE CARIOLOGÍA**

**EFEECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE CRANBERRY Y  
CARACTERIZACIÓN DE SUS PROANTOCIANIDINAS TIPO A POR  
MALDI-TOF**

*Antibacterial effect of cranberry extracts and type A proanthocyanidins characterization  
by MALDI-TOF*

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la Universidad de Talca  
como parte de los requisitos científicos exigidos para la obtención del título  
de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTE: CRISTOPHER ANTONIO ARAVENA TAPIA  
PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO ANDRES GIACAMAN SARAH  
CO-GUÍA: TM. NATALIA LOREEN GARCÍA MANRÍQUEZ  
PROFESOR INFORMANTE: DRA. CECILIA MUÑOZ SANDOVAL**

**TALCA - CHILE  
2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## INFORMACIONES CIENTÍFICAS DEL PROFESOR GUÍA

<b>Nombre</b>
RODRIGO ANDRES GIACAMAN SARAH
<b>ORCID</b>
<a href="https://orcid.org/0000-0003-3362-5173">https://orcid.org/0000-0003-3362-5173</a>
<b>Google Scholar</b>
<a href="https://scholar.google.com/citations?user=Oa_CitgAAAAJ&amp;hl=es&amp;oi=ao">https://scholar.google.com/citations?user=Oa_CitgAAAAJ&amp;hl=es&amp;oi=ao</a>
<b>Correo electrónico</b>
<a href="mailto:giacaman@utalca.cl">giacaman@utalca.cl</a>

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia (Marta, Manuel y Genesis) por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, definitivamente no podría haber logrado nada sin ellos. Gracias por ser mi fortaleza y mi motivación para seguir adelante. Por el esfuerzo que hicieron tras cada paso que yo daba, por el amor incondicional de cada uno.

Agradezco a mis amigos por ser un apoyo en los malos y buenos momentos. Gracias por hacerme parte de sus vidas, por convertirse en mi segunda familia, por cada sonrisa y palabra de aliento.

Gracias al universo y su azar por haberlos conocido.

Quiero agradecer a los docentes y funcionarios que fueron parte de mi formación como profesional y que dejaron una marca positiva en mí.

Finalmente quiero agradecer a mis tutores. Por un lado, agradezco al Dr. Giacaman por acogerme y motivarme en el mundo de la investigación. Gracias por sus mensajes de apoyo y buena disposición en todo lo que podía necesitar. Por otro lado, quiero agradecer a Natalia por todo lo que me ha ayudado, por su buena energía, disposición y alegría. Gracias por apoyarme cuando lo necesitaba, por las conversaciones y las largas horas de trabajo.

Un placer haberlos conocido y trabajar junto a ustedes.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
1.1. Palabras Clave.....	5
2. ABSTRACT.....	6
2.1. Keywords.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. MÉTODOS.....	9
4.1 Determinación de CMI y CMB de extractos de cranberry sobre <i>S. mutans</i> .....	9
4.2 Caracterización de extracto mediante MALDI-TOF .....	11
4.3 Determinación de la sensibilidad para PACs de la técnica MALDI-TOF.....	12
4.4 Diseño General.....	14
5. RESULTADOS.....	15
5.1. Determinación de CMI y CMB del extracto con 3,6% de PACs sobre <i>S. mutans</i> .....	15
5.2 Determinación de CMI y CMB del extracto con 15% de PACs sobre <i>S. mutans</i> .....	16
5.3 Determinación de CMI y CMB del extracto con 20% de PACs sobre <i>S. mutans</i> .....	17
5.4. Análisis de extracto de cranberry de 3,6 de PACs por MALDI-TOF.....	18
5.5 Análisis de concentraciones de PACs disueltas en saliva por MALDI-TOF.....	19
6. DISCUSIÓN.....	20
7. REFERENCIAS.....	24
8. APÉNDICES.....	27

## 1. RESUMEN

El cranberry ha sido utilizado por años como tratamiento para infecciones relacionadas al tracto urinario ya que los fenoles de este fruto poseen propiedades antibacterianas. Sin embargo, su estudio en microbiota oral es nueva y centrada al uso de grandes concentraciones de proantocianidinas (PACs) tipo A como el principal agente bioactivo.

El objetivo de este estudio fue investigar la efectividad antibacteriana de extractos de cranberry con bajos porcentajes de PACs tipo A, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) sobre *Streptococcus mutans*. Además, se determinó la sensibilidad de la técnica de MALDI-TOF para detectar PACs de cranberry disueltas en saliva.

Los resultados indicaron que los extractos de 15% y 20% de PACs presentaron una CMI en la dilución de 12,5% (0,125g/mL). Por su parte, la CMB se observó en la misma dilución anterior en el extracto de 15%, sin embargo, el extracto de 20% lo logró en la dilución de 6,25% (0,0625g/mL). Por otro lado, la CMI y la CMB del extracto de cranberry con 3,6% de PACs se observó en la dilución de 25% (0,25g/mL). Mediante el análisis en MALDI-TOF fue posible evidenciar diferentes peaks correspondiente a PACs concordando con estudios previos.

En conclusión, los resultados demuestran que los extractos de cranberry con bajos porcentaje de PACs aparentan producir un efecto antibacteriano contra *S. mutans in vitro*. Por otro lado, la técnica MALDI-TOF demuestra tener la sensibilidad suficiente para detectar pequeñas cantidades de PACs disueltas en saliva.

### 1.1 Palabras Clave

**Arándano, *Streptococcus mutans*, Biopelícula, Proantocianidina, MALDI-TOF**

## 2. ABSTRACT

Cranberry has been used for years as a treatment for urinary tract infections since the phenols in this fruit have antibacterial properties. However, its study in the oral microbiota is new and focused on the use of high concentrations of proanthocyanidins (PACs) type A as the main bioactive agent.

The objective of this study was to investigate the antibacterial effectiveness of cranberry extracts with low percentages of type A PACs, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) on *Streptococcus mutans*. In addition, the sensitivity of the MALDI-TOF technique to detect cranberry PACs dissolved in saliva was determined.

The results indicated that the extracts of 15% and 20% of PACs presented a MIC in the dilution of 12.5% (0.125g /mL). For its part, the MBC was achieved in the same previous dilution in the 15% extract but in the 20% extract it was observed in the 6.25% dilution (0.0625g /mL). On the other hand, the MIC and MBC of the cranberry extract with 3.6% PACs was observed at the 25% dilution (0.25g / mL). Through the MALDI-TOF analysis, it was possible to show different peaks corresponding to PACs agreeing with previous studies.

In conclusion, the results show that cranberry extracts with a low percentage of PACs appear to produce an antibacterial effect against *S. mutans* in vitro. Furthermore, the MALDI-TOF technique proves to have sufficient sensitivity to detect small amounts of PACs dissolved in saliva.

### 2.1. Keywords

**Cranberry, *Streptococcus mutans*, Biofilm, Proanthocyanidin, MALDI-TOF**

### 3. INTRODUCCION

La caries dental es una de las enfermedades crónicas más prevalentes a nivel mundial cuyas consecuencias afectan entre el 80% al 90% de la población (1). Se ha estimado que el biofilm dental posee unas 700 especies de bacterias, las cuales están embebidas en una matriz celular rica en polisacáridos (2) destacando los *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y *Streptococcus sobrinus* como las especies más cariogénicas dentro de este consorcio bacteriano (1, 3) las cuales fomentan la disbiosis polimicrobiana responsable de la caries (4). *S. mutans* sintetiza glucanos extracelulares a partir de sacarosa utilizando las glucosiltransferasas (GTF) presentes en sus membranas (5), los cuales son críticos para la formación y la integridad del biofilm favoreciendo la acumulación de estreptococos cariogénicos en la superficie del diente dándole estabilidad estructural.

Los nuevos desafíos en el manejo de la caries dental apuntan a modificar las características de los biofilms actuando a nivel de la composición y adhesión bacteriana (6), disminuyendo la virulencia de los patógenos sin su eliminación. Lo anterior se fundamenta en que existe evidencia de que el uso de bactericidas puede generar resistencia y generar una repoblación de la superficie de los dientes una vez que se detiene la intervención (2, 7).

En este contexto, se han estudiado los polifenoles naturales de varios frutos como agente antibacteriano y se ha demostrado su efectividad al actuar de manera directa en el metabolismo y en los mecanismos de formación de biofilms (8). Dentro de los frutos con importantes cantidades de polifenoles destacan los cranberry los que han llamado la atención tanto por su presencia en la dieta humana como por su composición única de polifenoles (9). Estos constituyen una fuente excepcionalmente rica de varias clases de flavonoides bioactivos incluyendo los flavonoles, antocianinas y PACs, los cuales ofrecen un potencial terapéutico para enfermedades relacionadas con el manejo de los biofilms (10, 11). Los cranberry presentan altas concentraciones de PACs de tipo A biológicamente activas, destacando por sobre otros frutos (12, 13).

Las PACs químicamente corresponden a polímeros de flavan-3-ols (14). Son de alto peso molecular, de gran tamaño y poseen OH libres (7, 14). Las subunidades de las PACs derivadas de los flavan-3-ols pueden adoptar distintas formas (catequina, (epi)catequina, (epi)galocatequina, galato de (epi)galocatequina) los cuales se unen con mayor frecuencia a través de un enlace de tipo B y con menos frecuencia por un doble enlace tipo A (5, 7). Las PACs tipo A generalmente están compuestas de monómeros de (epi)catequina (15) con al menos un enlace interflavan tipo A y parecen ser más activos biológicamente que las PACs tipo B debido a la rigidez conformacional que ofrecen los enlaces dobles (5, 16).

Los cranberry y sus derivados tienen diversos efectos antioxidantes, antitumorales, antibacterianos, antifúngicos destacando su efecto sobre el tracto urinario (17, 18) por sus propiedades anti adhesivas e inhibitorias en la formación de biofilms (15). Esta última propiedad mencionada también afecta a los biofilm orales inhibiendo la actividad de las GTF de *S. mutans*, reduciendo la producción de polímeros extracelulares y su hidrofobicidad (9), afectando su adhesión sobre la superficie dental favoreciendo así a la flora comensal (16, 19). Además interrumpe la producción de ácidos al inhibir la actividad de la F-ATPasa enzima translocadora de protones (20).

La investigación del efecto de los cranberry sobre el sistema digestivo/urinario es amplia, mientras que el estudio en la cavidad oral es nuevo y enfocado en estudios de extractos con altas concentraciones de polifenoles (17, 21, 22). Al realizar una búsqueda bibliográfica sobre el estudio de PACs en bajas concentraciones como agente antibacteriano oral los resultados son escasos como lo es también las posibles interacciones existentes entre sus compuestos bioactivos y la saliva. Por lo tanto, el propósito de este estudio experimental fue evaluar la efectividad antibacteriana de 3 extractos de cranberry con diferentes concentraciones de PACs (3,6%, 15% y 20%) sobre *S. mutans*. Además, se determinó la sensibilidad de la técnica de MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) en la detección de los PACs provenientes de cranberry disueltas en saliva. Estos hallazgos permitirán contar con mejor información para el diseño de estudios clínicos futuros y con ello contar con una nueva herramienta para el manejo de biofilms en enfermedades bucales, particularmente en caries dental.

## 4. Métodos

### 4.1 Determinación de CMI y CMB de extractos de cranberry sobre *S. mutans*

#### Preparación de placas Agar MSB y de inóculo de *S. mutans*

Para el recuento de microorganismos se realizaron placas de cultivo según protocolo (Apéndice 1). Se utilizó Agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), medio de cultivo gold standard para *S. mutans* (23).

La preparación del inóculo se realizó siguiendo los protocolos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (24) cuyo procedimiento se encuentra detallado en el Apéndice 2. La cepa utilizada para este estudio fue *S. mutans* de segunda generación UA159.

#### Preparación de extractos

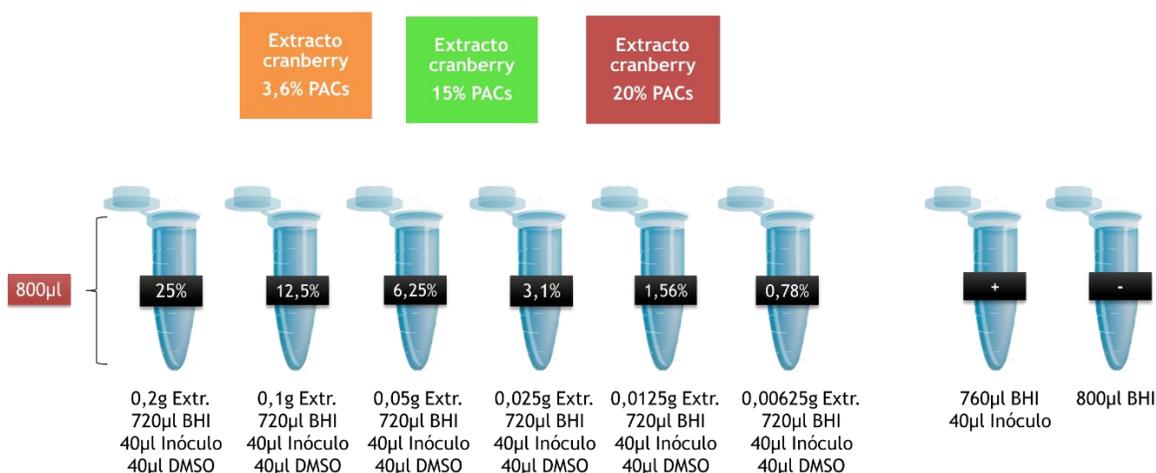
Los extractos de cranberry liofilizados fueron elaborados por la empresa Cloetta Holland quienes proporcionaron 3 extractos diferentes con una concentración de PACs al 3,6%, 15% y 20%, respectivamente. Para cada concentración se realizaron 6 diferentes diluciones: al 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625 y 0,78%. En total se obtuvieron 18 muestras en diferentes concentraciones cómo es posible observar en la tabla 1.

**Tabla 1. Concentración de PACs finales por preparación de extractos.**

Concentración de Extractos	PACs 3,6% (PACs/mL)	PACs 15% (PACs/mL)	PACs 20% (PACs/mL)
25%	0,009g	0,0375g	0,04g
12,5%	0,0045g	0,01875g	0,02g
6,25%	0,00225g	0,009375g	0,01g
3,125%	0,001125g	0,0046875g	0,005g
1,5625%	0,0005625g	0,00234375g	0,0025g
0,78%	0,00028125g	0,001171875g	0,00125g

## Preparación de diluciones

Las diluciones de los diferentes extractos se realizaron en tubos Eppendorf siendo disueltas en 800  $\mu$ L de solución. En la figura 1 es posible observar cómo se realizaron las diferentes diluciones utilizando como solvente orgánico al dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizó además un control positivo y control negativo dentro de este ensayo.



**Figura 1. Esquema de diluciones para cada grupo de extracto.** Se obtuvieron 18 diluciones en total. Se realizaron 6 diluciones por cada grupo de extracto (3,6%, 15% y 20% de PACs). Además, se realizó un control positivo y un control negativo.

Una vez preparadas las diluciones con el inóculo bacteriano, se transfirieron 100  $\mu$ L de cada una a una placa de 96 pocillos para luego ser incubadas por 24 horas a 37°C con 10% CO<sub>2</sub>. De cada dilución preparada se tomó una muestra antes de su incubación, denominada Tiempo 0 y otra muestra transcurridas las 24 horas para ser cultivadas en agar MSB.

## **Cultivo de muestras**

A las muestras tomadas en el Tiempo 0 y Tiempo 24 horas se le realizaron diluciones seriadas hasta lograr una dilución de 1:100.000 (v/v) en caldo estéril BHI. Posteriormente se sembraron 10 µL de cada una en agar MSB en triplicado dando un total de 135 placas (Apéndice 3). Este procedimiento fue realizado para las 6 diluciones provenientes de cada extracto además de los controles positivos y negativos.

## **Incubación y conteo de colonias**

Una vez sembradas todas las placas se incubaron a 37°C con 37% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada grupo de estudio mediante microscopio óptico 4x. Se consideró aquellas colonias desarrolladas en la dilución más alta que permitieran ser contadas, posteriormente, los datos fueron corregidos por el factor de dilución siendo expresadas como UFC/mL.

## **4.2 Caracterización de extracto mediante MALDI-TOF**

Como material estándar para la curva de calibración se utilizó el extracto de cranberry con 3,6% de PACs elaborado por Cloetta Holland. Se utilizaron 100 mg de extracto de cranberry diluidos en 5000µL de H<sub>2</sub>O para ser posteriormente filtrado en cartuchos Oasis HLB CARTRIDGE según lo descrito en el protocolo de extracción por De Marchi (25) (Apéndice 4). De esta manera se obtuvo un filtrado con PACs purificadas listas para su análisis mediante MALDI-TOF (Modelo Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, USA)). El voltaje de aceleración utilizado fue de 20 kV y el voltaje de reflectrón fue de 21 kV para el análisis de PACs (25, 26).

### **4.3 Determinación de la sensibilidad para PACs de la técnica MALDI-TOF**

Para determinar la sensibilidad que posee el equipo de MALDI-TOF en la detección de PACs se realizó una curva de calibración que contenía 8 muestras con concentraciones diferentes disueltas en saliva.

#### **Recolección de Saliva**

Para realizar los diferentes puntos de la curva de calibración fue necesario recolectar la saliva donada voluntariamente por 2 investigadores formando así un pool salival. A continuación, se detalla los criterios de donación:

- **Criterios de Inclusión:** Encontrarse sistémicamente compatible (no poseer enfermedades o consumir medicamentos del listado de la encuesta de selección (Apéndice 5), no ser fumadores o ser exfumadores por un periodo de 1 año y poseer un flujo salival estimulado en rangos de normalidad (evaluado por una prueba de flujo salival previa durante la selección (Apéndice 6)).
- **Criterios de Exclusión:** Consumo de alcohol en menos de 24 horas previas al estudio o de sustancias antisépticas o similares, flujo salival alterado (Apéndice 6), no haber consumido alimentos antes de 1 hora.

Los 2 investigadores donadores depositaron al menos 5 mL cada uno de saliva estimulada por la masticación de una lámina de Parafilm en el tubo rotulado para tal propósito. La saliva recolectada desde los 2 voluntarios fue combinada y agitada para su homogeneización y posterior utilización en la preparación de las diluciones.

## Preparación de las diluciones de calibración

El extracto utilizado para realizar la curva de calibración fue el de 3,6% de PACs. En la tabla 2 es posible observar los diferentes puntos incluidos en la curva y el contenido de cada uno de ellos.

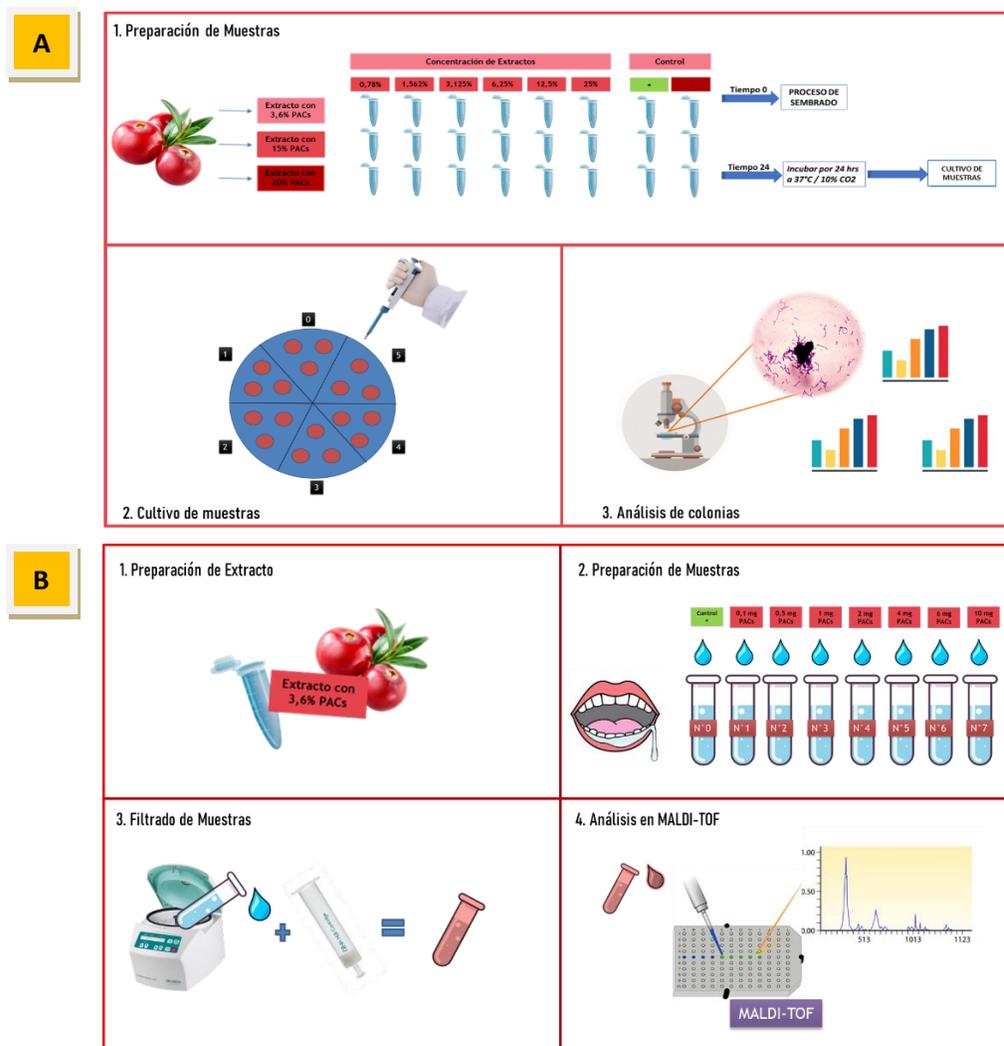
**Tabla 2. Diluciones para calibración de extractos de cranberry con saliva en MALDI-TOF**

Tubo	Contenido
0	1mL Saliva
1	1mL Saliva + 0,0028g extracto (0,1mg PACs)
2	1mL Saliva + 0,0138g extracto (0,5mg PACs)
3	1mL Saliva + 0,028g extracto (1mg PACs)
4	1mL Saliva + 0,055g extracto (2mg PACs)
5	1mL Saliva + 0,1111g extracto (4mg PACs)
6	1mL Saliva + 0,1666g extracto (6mg PACs)
7	1mL Saliva + 0,2777g extracto (10mg PACs)

Cada muestra se centrifugo a 1000 g a 4°C por 10 minutos (Thermo scientific, Heraeus Megafuge 16R, Massachusetts, EE.UU) y posteriormente se realizó un proceso de filtrado en cartuchos Oasis HLB CARTRIDGE según lo descrito en el protocolo de extracción por De Marchi (25) (Apéndice 4). De esta manera se obtuvo un filtrado con PACs purificadas listas para su análisis mediante MALDI-TOF (Modelo Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, USA)). El voltaje de aceleración utilizado fue de 20 kV y el voltaje de reflectrón fue de 21 kV para el análisis de PACs (25, 26).

## 4.4. Diseño General

En la Figura 2 es posible observar de manera esquemática el diseño general de la investigación.



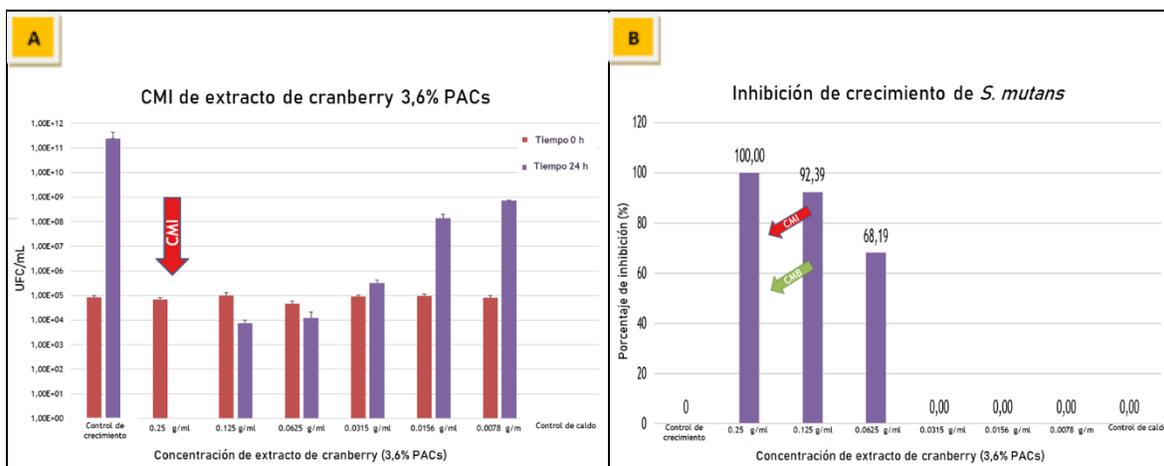
**Figura 2A. Metodología utilizada para determinar CMI y CMB de los 3 extractos de cranberry.** En esta figura es posible observar las diferentes diluciones realizadas por cada extracto a las cuales se les incorporo un inóculo de *S. mutans*. Luego se tomó una alícuota en el tiempo 0 y luego de 24 horas de incubación para ser cultivadas en agar MSB realizando su posterior recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante microscopia óptica 4x. **Figura 2B. Caracterización de PACs por la técnica de MALDI-TOF.** En una primera instancia se analizó el extracto puro para posteriormente realizar 7 diluciones de éste en saliva. Las cuales posteriormente fueron centrifugadas y filtradas para ser analizadas mediante MALDI-TOF.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinación de CMI y CMB del extracto con 3,6% de PACs sobre *S. mutans*

La CMI del extracto de cranberry con 3,6% de PACs se logró en la dilución del 25% (0,25g/mL) de extracto (Figura 3A).

El porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans* fue de 100% al utilizar la dilución del 25% (0,25g/mL) del extracto siendo esta su CMB. Por su parte, se logró el 92,39% de inhibición en la dilución de 12,5% (0,125g/mL). Finalmente, se obtuvo un 68,19% de inhibición con la dilución de 6.25% (0.0625g/mL). El extracto de cranberry con 3,6% de PACs en diluciones iguales o menores al 3.125% (0.0315g/mL) no evidenció inhibición del crecimiento de *S. mutans* (Figura 3B).

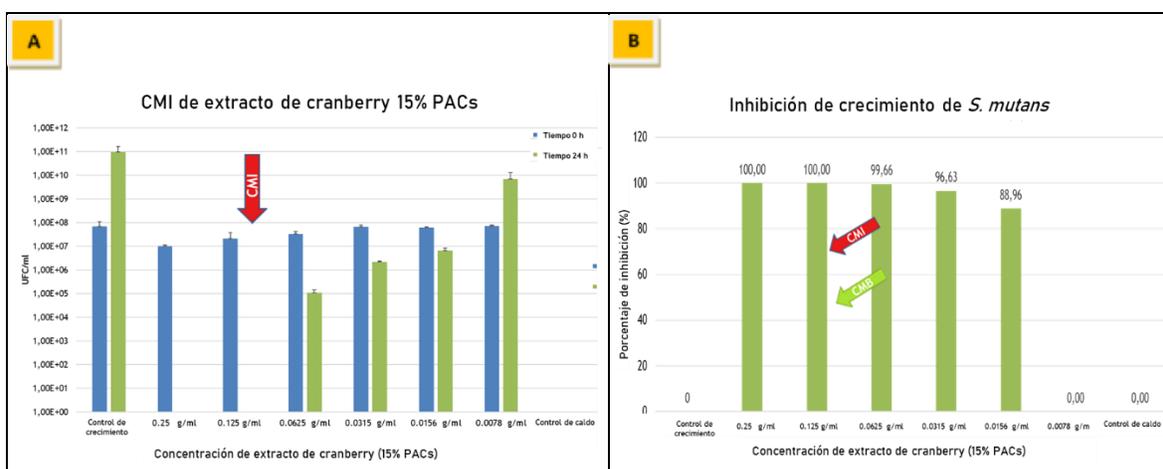


**Figura 3. A: CMI extracto de 3,6% de PACs.** Las barras rojas corresponden a la media de UFC de *S. mutans* al Tiempo 0. Por su parte las barras moradas corresponden al promedio de UFC de *S. mutans* a Tiempo 24 horas con sus respectivas desviaciones estándar. Se puede evidenciar que en la dilución de 25% de extracto (0,25g/mL) se logró la CMI. **B: Inhibición de crecimiento de *S. mutans*.** La barra morada corresponde al porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans*. Se evidencia que en la dilución de 25% (0,25g/mL) se logró la CMI y CMB con un 100% de inhibición sobre *S. mutans*.

## 5.2 Determinación de CMI y CMB del extracto con 15% de PACs sobre *S. mutans*

La CMI y la CMB del extracto de cranberry con 15% de PACs se logró utilizando la dilución de 12,5% (0.125g/mL) de extracto (Figura 4A).

El porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans* fue del 100% al utilizar las diluciones de 25% (0,25g/mL) y 12,5% (0.125g/mL) del extracto; se logró el 99,66% de inhibición con una dilución de 6,25% (0,0625g/mL); en una dilución de 3,15% (0.0315g/mL) se obtiene un 96.63% de inhibición; finalmente se logró un 88.96% de inhibición con una dilución de 1.56% (0.0156g/mL). En diluciones de extractos de cranberries con 15% de PACs iguales o menores a 0,78% (0.0078 g/mL) no se logró inhibición del crecimiento de *S. mutans* (Figura 4B).

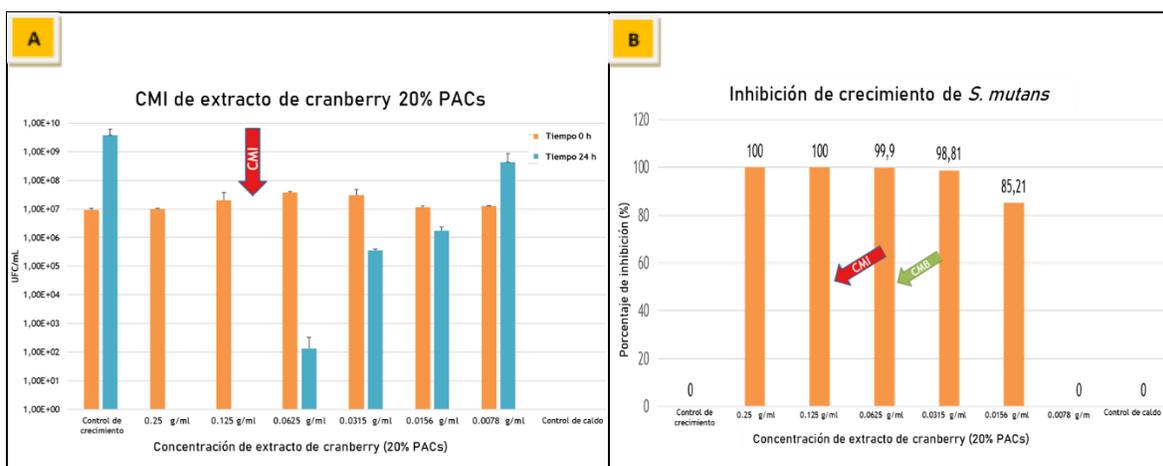


**Figura 4. A: CMI extracto de 15% de PACs.** Las barras azules corresponden a la media de UFC de *S. mutans* al Tiempo 0. Por su parte las barras verdes corresponden al promedio de UFC de *S. mutans* a Tiempo 24 horas con sus respectivas desviaciones estándar. Se puede evidenciar que en la dilución 12,5% (0,125g/mL) se logró la CMI. **B: Inhibición de crecimiento de *S. mutans*.** La barra verde corresponde al porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans*. Se evidencia que en la dilución 12,5% (0,125g/mL) se logró la CMI y CMB con un 100% de inhibición sobre *S. mutans*.

### 5.3 Determinación de CMI y CMB del extracto con 20% de PACs sobre *S. mutans*

La CMI del extracto de cranberry con 20% de PACs se logró utilizando una dilución de 12,5% (0.125g/mL) de extracto (Figura 5A).

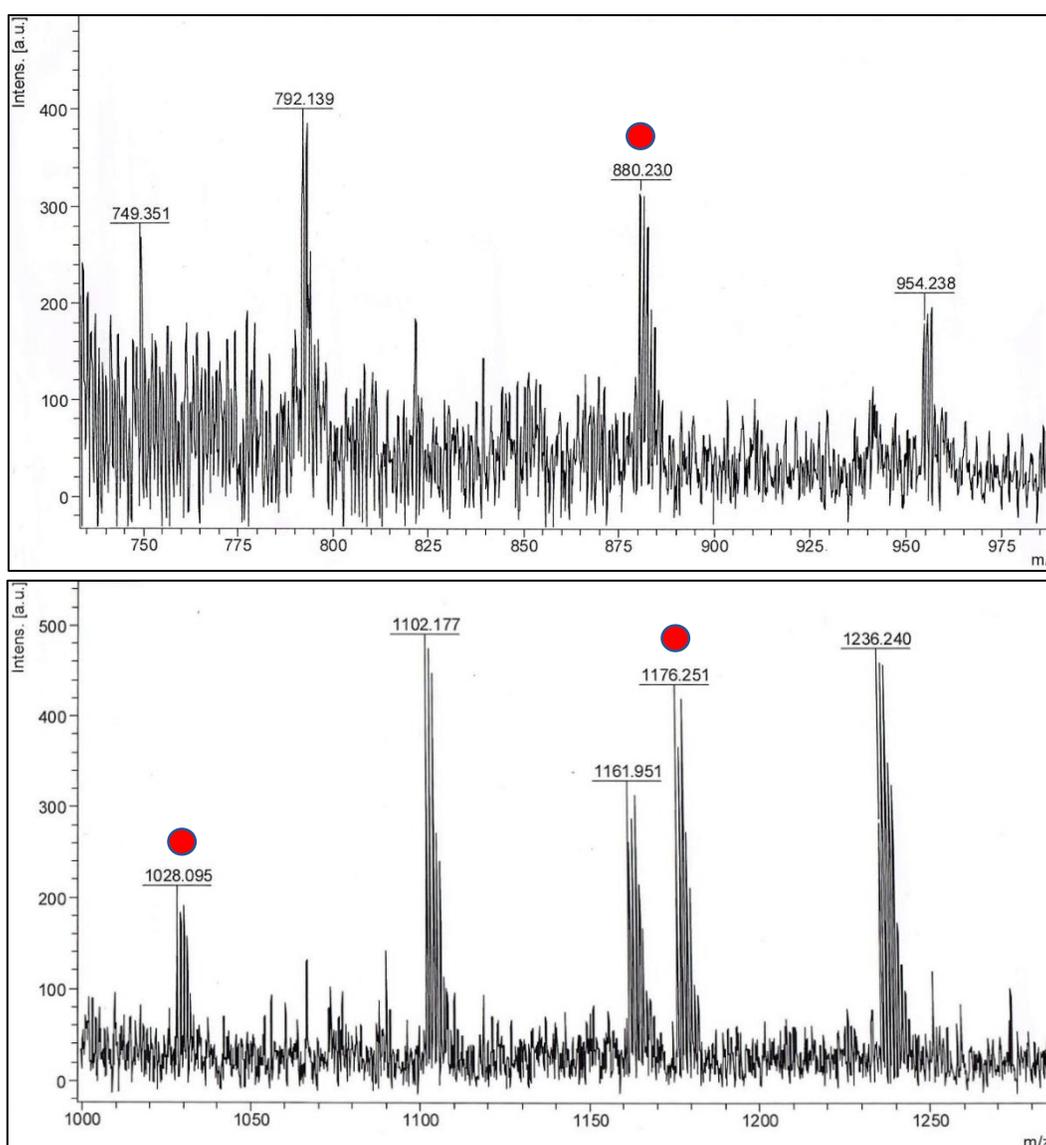
El porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans* fue de 100% al utilizar las diluciones de 25% (0,25g/mL) y de 12,5% (0.125g/mL) del extracto; se logró el 99,9% de inhibición con la dilución de 6,25% (0,0625g/mL) siendo esta su CMB; se consigue un 98.81% de inhibición en la dilución de 3,15% (0.0315g/mL); y finalmente un 85.21% de inhibición se logró en la dilución de 1.56% (0.0156g/mL). En diluciones de extracto igual o menor a 0,78% (0.0078 g/mL) no se logró inhibición del crecimiento de *S. mutans* (Figura 5B).



**Figura 5. A: CMI extracto de 20% de PACs.** Las barras naranjas corresponden a la media de UFC de *S. mutans* al Tiempo 0. Por su parte las barras celestes corresponden al promedio de UFC de *S. mutans* a Tiempo 24 horas con sus respectivas desviaciones estándar. Se puede evidenciar que en la dilución 12,5% (0,125g/mL) se logró la CMI. **B: Inhibición de crecimiento de *S. Mutans*.** La barra naranja corresponde al porcentaje de inhibición de crecimiento de *S. mutans*. Se evidencia que en la dilución 12,5% (0,125g/mL) se logró la CMI con un 100% de inhibición sobre *S. mutans*. Por su parte la CMB se logró en la dilución 6,25% (0,0625g/mL) con un porcentaje de inhibición del 99,9%.

#### 5.4. Análisis de extracto de cranberry de 3,6 de PACs por MALDI-TOF

En los espectrogramas correspondientes al extracto de cranberry con 3,6% de PACs (Figura 6) se observaron peaks de intensidad en distintas masas/cargas ( $m/Z$ ) lo cuales son candidatos a ser representativos de moléculas grandes del extracto tales como oligosacáridos y PACs con diferentes grados de polimerización. Se destacan 3 peaks: a 880 $m/Z$ , 1028 $m/Z$  y 1176 $m/Z$  los cuales debido a su  $m/Z$  característicos podrían corresponder a marcadores de PACs.



**Figura 6. Espectrograma de extracto de cranberry de 3,6% de PACs en MALDI-TOF.**  
Los peaks destacados corresponden al aumento de intensidad en determinadas masas/carga presumiblemente asociado a PACs.

## 5.5. Análisis de concentraciones de PACs disueltas en saliva por MALDI-TOF

El espectrograma de la muestra 0 corresponde a la saliva posterior a su filtrado. Se observó un peak correspondiente a 1060 masa/carga ( $m/Z$ ) característico basal de la muestra de saliva. Al comparar la muestra 0 con las demás muestras se destacaron 4 diferentes peaks presuntamente asociados a PACs de los extractos. Se encontró en la muestra 6 y 7 un peak en el rango de 1044 $m/Z$ ; en la muestra 7 se observó un peak en 1050,256 $m/Z$ ; en el rango de los 1066 $m/Z$  aparecieron peaks en las muestras 2 al 7 excepto en la muestra 4. Finalmente, se observaron peaks en el rango de los 1082 $m/Z$  desde la muestra 2 a la 7 (ver recuadros rojos en Figura 7).

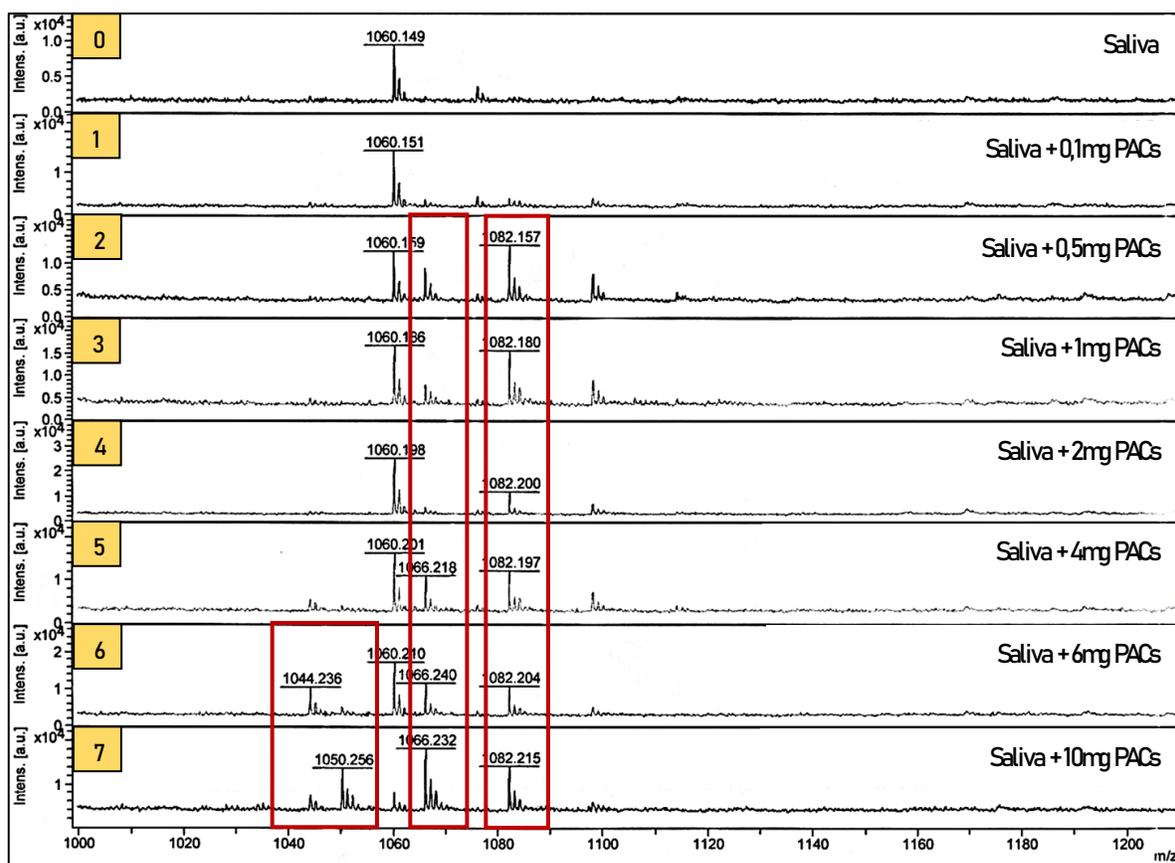


Figura 7. Espectrograma de diferentes grupos de estudio por MALDI-TOF. Los recuadros destacados en rojo indican el aumento de la intensidad de los peaks en determinadas masas/carga presumiblemente asociado a PACs.

## 6. DISCUSIÓN

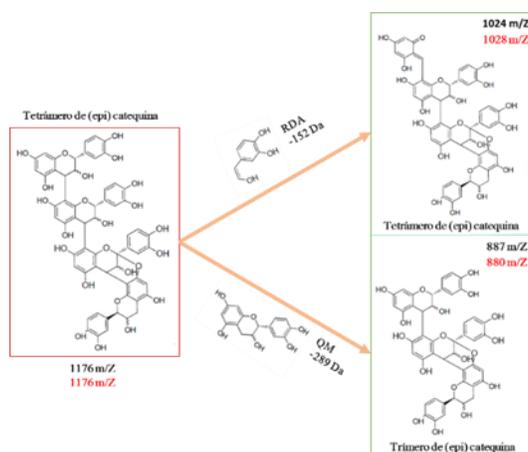
Los extractos de cranberry están formados por oligosacáridos de la pared celular junto con polifenoles propios del fruto tales como PACs, flavonoles y antocianinas (19) los cuales poseen un gran potencial para desarrollarse como un agente anticariogénico en proporciones correctas para el control de formación de biofilms. Nuestros resultados *in vitro* indican que aparentemente los extractos con bajo porcentaje de PACs son capaces de obtener un efecto antibacteriano ante *S. mutans* y que las PACs tipo A disueltas en saliva pueden ser detectadas en MALDI-TOF.

Los extractos de cranberry con 15% y 20% de PACs presentaron su CMI sobre *S. mutans* en la dilución de 12,5% (0,125g/mL). Por su parte, la CMB se logra en la dilución de 12,5% (0,125g/mL) del extracto de 15% de PACs sin embargo en el extracto de 20% lo logra en la dilución de 6,25% (0,0625g/mL). Lo anterior puede ser explicado por el mayor contenido de PACs tipo A disponibles en la composición del extracto de 20%, lo que aumenta su efectividad para lograr el 99,9% de inhibición sobre *S. mutans* en una menor concentración de extracto de cranberry. El extracto con 3,6% de PACs logra su CMI y CMB al utilizar la dilución de 25% (0,25g/mL) siendo esta una concentración mayor en comparación a los otros extractos lo que puede ser explicado por la menor concentración de PACs tipo A disponibles en este extracto.

Los efectos más destacados de las PACs sobre el metabolismo bacterianos son: inhibición de las GTF B y C del *S. mutans* lo que afecta la formación de polímeros extracelulares (5, 7, 21); inhibición de la F1F0-ATPasa y la formación de complejos irreversibles a los dominios catalíticos (5). Cabe destacar que tanto los flavonoles y antocianinas han demostrado un efecto antibacteriano *in vitro* similar a las PACs (5, 8), pero en menor intensidad o de forma parcial por lo que las PACs serían más eficaces que los flavonoles y estos a su vez más que las antocianinas (19). En la literatura se describe una sinergia de los componentes fenólicos al actuar de manera simultánea favoreciendo los efectos antibiofilm (5, 22). En esta investigación, los extractos con baja cantidad de PACs en su composición poseen un mayor porcentaje de flavonoles y antocianinas los cuales

compensan su mecanismo de acción permitiendo el efecto antibacteriano de los extractos. Además, podría existir un segundo tipo de sinergia con los xiloglucanos de la membrana celular de los cranberry, la que se ha descrito como efectiva y más específica en bacterias del tracto urinario/intestinal (17), con buen efecto antibiofilm. Esta sinergia que está siendo estudiada podría ser extrapolada y confirmada a nivel de microbiota oral en un futuro. Los efectos compensatorios y sinérgicos de la composición única de los cranberry permiten un efecto antibacteriano efectivo en concentraciones bajas de PACs sobre *S. mutans* y potencialmente contra otros blancos bacterianos.

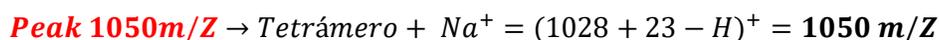
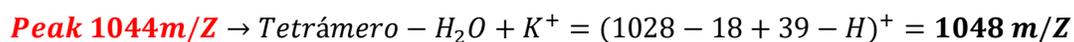
Los resultados obtenidos por MALDI-TOF en el espectrograma del extracto de cranberry con 3,6% de PACs muestran peaks  $m/Z$  característicos de este compuesto (Figura 6). Sin embargo, para tener certeza de que los peak obtenidos representan fielmente a las PACs se debe realizar un análisis estadístico con un mayor número de muestras para determinar si el rango obtenido corresponde a PACs. El primer peak candidato corresponde a 1176,251 $m/Z$  el cual coincide con lo obtenido en la literatura siendo un espectro típico de un tetrámero de (epi)catequina con un enlace tipo A según Mateos (27). La existencia de este tetrámero puede explicar los peaks que le anteceden como parte del patrón típico de fragmentación de los compuestos polifenólicos (28-30) destacando dos procesos principales observables que disminuyen el grado de polimerización: el proceso retro Diels- Alder (RDA) en donde una unidad de (epi)catequina se fragmenta (-152Dalton (Da)) (29, 30) y por otro lado se encuentra la escisión de quinona metilada (QM) (-289Da) (31, 32) como se observa en la figura 8.



**Figura 8. Patrón de fragmentación de un tetrámero de (epi)catequina con un enlace tipo A ( $m/z$  1,176).**

Resultados en negro teórico, resultados en rojo obtenidos del estudio.

Nuestro interés es conocer cómo interactúan las PACs en la cavidad oral, para esto resultado necesario analizar cómo interactúa con la saliva, fluido que posee alto contenido de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) (33, 34). Lo anterior toma importancia ya que se describe que las PACs son propensas a formar enlaces con estos iones cuando están presentes en el medio por sobre a la unión clásica con un ion protonado molecular ( $\text{H}^+$ ) (28, 35). MALDI-TOF produce la ionización de las muestras (36), por lo que la asociación de PACs e iones Na/K es inevitable como lo es también la deshidratación de las muestras (27). En el espectrograma (figura 7) se observan 4 diferentes peaks candidatos a PACs ya que no son observados en la muestra 0 correspondiente a solo saliva. Los peak de 1044m/Z, 1050m/Z, 1066m/Z y 1082m/Z son explicados por las asociaciones típicas de los polifenoles. Por su parte el peak de 1082m/Z se explica utilizando el trímero de (epi)catequina (880m/Z) el cual formaría un tetrámero con una (epi)galocatequina lo que produce un aumento de 153Da (27, 28, 30) (Figura 9).



**Figura 9. Fórmulas de asociaciones producidas por PACs en un estado ionizado.** Los peaks destacados en rojo corresponden a los observados en el estudio asociados aparentemente a PACs. Por su parte, los datos destacados en negro corresponden a los resultados teóricos de asociaciones típicas de PACs.

Tanto el peak de 1082m/Z como el de 1044m/Z difieren del resultado teórico de 1077m/Z y 1048m/Z respectivamente. Los peaks de 1066m/z y 1082m/Z se destacan al aparecer en la muestra 2 la cual corresponde a 0,5mg de PACs siendo esta la menor concentración que aparentemente fue capaz de detectar el MALDI-TOF. En esa misma línea, una explicación a la diferencia encontrada entre lo teórico y lo observado puede ser por posibles interacciones PACs-saliva que pueden estar afectando la descomposición normal de las PACs alterando los resultados como también la formación de compuestos intermedios antes de su descomposición final.

La bibliografía relacionada a la interacción PACs-saliva es limitada y escasa por lo que pueden existir múltiples factores involucrados en la reacción aún no esclarecidos. Se ha descrito que las PACs son capaces de unirse a proteínas salivales por la formación de enlaces de hidrógenos de los grupos –OH de los taninos condensados formando un complejo (37). Por otra parte si bien se ha descrito la hidrólisis de algunos glicósidos de flavonoides por acción de  $\alpha$ -glucosidasas salivales (38) no se ha demostrado con PACs.

Dentro de las limitaciones de este estudio se destaca que no se puede saber con certeza si el porcentaje de PACs de los extractos fabricados por Cloetta Holland son los declarados, por lo tanto, los resultados acá obtenidos son predictivos en dichas concentraciones. Otra limitación fue debido a lo acontecido nacional e internacionalmente resultando laborioso analizar las muestras, incluso pasando por largos periodos de espera entre la preparación de estas y su análisis en MALDI-TOF.

Los resultados obtenidos darán las directrices para realizar estudios futuros en un modelo de anticariogenicidad *in vitro* comprobando su efectividad sobre las lesiones de caries y el biofilm asociado. En una etapa posterior a esto se espera que se realicen estudios clínicos para analizar el comportamiento de las PACs en el medio ambiente oral con todas las variables que estas incluyen.

En conclusión, los resultados de este estudio experimental evidencian que los extractos de cranberry con bajos porcentaje de PACs tipo A producen un efecto antibacteriano contra *S. mutans in vitro*. Además, las PACs al estar disueltas en saliva pueden ser analizadas en MALDI-TOF con una sensibilidad aparente de 0,5mg de PACs.

## 7. REFERENCIAS

1. Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23(2):76-82. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010.
2. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. *Frontiers in Microbiology.* 2016;6(1529). doi: 10.3389/fmicb.2015.01529.
3. Hsiao J, Wang Y, Zheng L, Liu R, Said R, Hadjiyski L, et al. In Vivo Rodent Models for Studying Dental Caries and Pulp Disease. In: Papagerakis P, editor. *Odontogenesis: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2019. p. 393-403.
4. Valdebenito B, Tullume-Vergara PO, González W, Kreth J, Giacaman RA. In silico analysis of the competition between *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mutans* in the dental biofilm. *Molecular Oral Microbiology.* 2018;33(2):168-80. doi: 10.1111/omi.12209.
5. Philip N, Walsh LJ. Cranberry Polyphenols: Natural Weapons against Dental Caries. *Dentistry Journal.* 2019;7(1):20.
6. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without Killing. *Caries Research.* 2015;49(suppl 1)(Suppl. 1):46-54. doi: 10.1159/000377732.
7. Philip N, Bandara HMHN, Leishman SJ, Walsh LJ. Inhibitory effects of fruit berry extracts on *Streptococcus mutans* biofilms. *European Journal of Oral Sciences.* 2019;127(2):122-9. doi: doi:10.1111/eos.12602.
8. Álvarez-Martínez FJ, Barrajon-Catalán E, Encinar JA, Rodríguez-Díaz JC, Micol V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Curr Med Chem.* 2020;27(15):2576-606. doi: 10.2174/0929867325666181008115650.
9. Yoo S, Murata RM, Duarte S. Antimicrobial Traits of Tea- and Cranberry-Derived Polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research.* 2011;45(4):327-35. doi: 10.1159/000329181.
10. Cunningham DG, Vannozzi SA, Turk R, Roderick R, O'Shea E, Brilliant K. Cranberry Phytochemicals and Their Health Benefits. *Nutraceutical Beverages.* ACS Symposium Series. 871: American Chemical Society; 2003. p. 35-51.
11. Gupta A, Bansal K, Marwaha M. Effect of high-molecular-weight component of Cranberry on plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts in children: an in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2015;33(2):128-33. doi: 10.4103/0970-4388.155125.
12. Koo H, Nino de Guzman P, Schobel BD, Vacca Smith AV, Bowen WH. Influence of Cranberry Juice on Glucan-Mediated Processes Involved in *Streptococcus mutans* Biofilm Development. *Caries Research.* 2006;40(1):20-7. doi: 10.1159/000088901.
13. Bonifait L, Grenier D. Cranberry Polyphenols: Potential Benefits for Dental Caries and Periodontal Disease. *Journal (Canadian Dental Association).* 2010;76:a130.
14. Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Iahtisham Ul H, Patel S, Pan X, et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2019;116:108999. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108999.

15. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. 2016;6(1529). doi: 10.3389/fmicb.2015.01529.
16. Philip N, Bandara H, Leishman SJ, Walsh LJ. Effect of polyphenol-rich cranberry extracts on cariogenic biofilm properties and microbial composition of polymicrobial biofilms. *Arch Oral Biol.* 2019;102:1-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.026.
17. Coleman CM, Ferreira D. Oligosaccharides and Complex Carbohydrates: A New Paradigm for Cranberry Bioactivity. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2020;25(4):881. doi: 10.3390/molecules25040881.
18. Anhe FF, Varin TV, Le Barz M, Desjardins Y, Levy E, Roy D, et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr Obes Rep.* 2015;4(4):389-400. doi: 10.1007/s13679-015-0172-9.
19. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res.* 2010;44(2):116-26. doi: 10.1159/000296306.
20. Duarte S, Gregoire S, Bowen WH, Koo H, Singh AP, Vorsa N, et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters.* 2006;257(1):50-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00147.x.
21. Philip N, Leishman SJ, Bandara H, Healey DL, Walsh LJ. Randomized Controlled Study to Evaluate Microbial Ecological Effects of CPP-ACP and Cranberry on Dental Plaque. *JDR Clin Trans Res.* 2020;5(2):118-26. doi: 10.1177/2380084419859871.
22. Kokubu E, Kinoshita E, Ishihara K. Inhibitory Effects of Lingonberry Extract on Oral Streptococcal Biofilm Formation and Bioactivity. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2019;60(1):1-9. doi: 10.2209/tdcpublication.2018-0007.
23. Babu V, Hegde S, Bhat S, Sargod S. Evaluation of Efficacy of Three Different Commercially Available Kit for Chairside Cariogenic Bacteria Test - Caries Risk Test, Saliva-check Mutans and CariScreen. *Cureus.* 2019;11(12):e6504. doi: 10.7759/cureus.6504.
24. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4). doi: 10.1128/jcm.01934-17.
25. De Marchi F, Seraglia R, Molin L, Traldi P, Dalla Vedova A, Gardiman M, et al. Study of isobaric grape seed proanthocyanidins by MALDI-TOF MS. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 2014;49(9):826-30. doi: 10.1002/jms.3422.
26. Monagas M, Quintanilla-López JE, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Lebrón-Aguilar R. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2010;51(2):358-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.035>.
27. Mateos-Martín ML, Fuguet E, Quero C, Pérez-Jiménez J, Torres JL. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(3):1327-36. doi: 10.1007/s00216-011-5557-3.
28. Esquivel-Alvarado D, Alfaro-Viquez E, Krueger CG, Vestling MM, Reed JD. Classification of proanthocyanidin profiles using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) spectra data combined with

- multivariate analysis. *Food Chemistry*. 2021;336:127667. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127667>.
29. Feliciano RP, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Vestling MM, Reed JD. Deconvolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry isotope patterns to determine ratios of A-type to B-type interflavan bonds in cranberry proanthocyanidins. *Food Chem*. 2012;135(3):1485-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.102.
30. Esquivel-Alvarado D, Alfaro-Viquez E, Krueger CG, Vestling MM, Reed JD. Identification of A-Type Proanthocyanidins in Cranberry-Based Foods and Dietary Supplements by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, First Action Method: 2019.05. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2020. doi: 10.1093/jaoacint/qsaa106.
31. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Zhang Z, Beecher G, Holden J, et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J Mass Spectrom*. 2003;38(12):1272-80. doi: 10.1002/jms.541.
32. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem*. 2003;51(25):7513-21. doi: 10.1021/jf034815d.
33. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh C-K. Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*. 2005;33(3):223-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>.
34. Roblegg E, Coughran A, Sirjani D. Saliva: An all-rounder of our body. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;142:133-41. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.
35. Reed JD, Krueger CG, Vestling MM. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*. 2005;66(18):2248-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.015>.
36. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22:35-45.
37. Lira Olivares C. Efecto del pH sobre la interacción proantocianidina-proteína salival y su relación con la sensación de astringencia: Universidad de Chile 2014.
38. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*. 2005;135(1):48-52. doi: 10.1093/jn/135.1.48.

## 8. APÉNDICES

### Apéndice 1.

#### **Protocolo de Preparación de Placas MSB**

- Suspender 90 gramos de Agar MSB en 1 litro de H<sub>2</sub>O purificada.
- Pesar y adicionar 150 gramos de sacarosa (concentración final de sacarosa en el medio será de un 15%).
- Disolver con temperatura agitando constantemente dejando que hierva durante 1 min.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.
- Enfriar a 50-55°C.
- Adicionar 1 ml de telurito de potasio al 3,5% el cual será agregado a través de un filtro de membrana de 0,22 µm para esterilizarlo.
- Adicionar 1 ml de bacitracina 200 UI/ml.
- Plaquear rápidamente en condiciones estériles.

### Apéndice 2.

#### **Protocolo de Preparación de Inóculo de *S. mutans* según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio**

- Seleccionar 3 a 5 colonias bien aisladas de *S. mutans* de la misma generación sembradas en un medio no selectivo de agar de 24 horas.
- Transferir las colonias seleccionadas a un tubo que contenga 5ml de caldo de cultivo cerebro-corazón (BHI) estéril.
- Inocular el caldo de cultivo a 35 ± 2°C hasta que logre exceder la turbidez el estándar de 0,5 McFarland a través de densimetría.
- Ajustar la densidad agregando caldo BHI estéril hasta obtener el estándar de 0,5 McFarland.

### Apéndice 3.

El total de placas sembradas corresponde a los 18 grupos experimentales más los 2 grupos control (positivo y negativo). Cada uno de ellos sembrados en tiempo 0 y Tiempo 24, excepto por el control negativo. El total fue multiplicado por 3 (sembrado en triplicado).

#### Registro de placas BHI sembradas según extractos.

Soluciones Madres	PACs 3,6% (N° de placas totales sembradas: tiempo 0 y 24)	PACs 15% (N° de placas totales sembradas: tiempo 0 y 24)	PACs 20% (N° de placas totales sembradas: tiempo 0 y 24)	Total
25%	2	2	2	6
12,5%	2	2	2	6
6,25%	2	2	2	6
3,125%	2	2	2	6
1,5625%	2	2	2	6
0,78%	2	2	2	6
Control Positivo	2	2	2	6
Control Negativo	1	1	1	3
Total	15	15	15	45x3 <b>135</b>

### Apéndice 4.

#### Protocolo de Extracción de Proantocianidinas según De Marchi

(25)

#### Activación de cartucho y filtrado

- Pasar por los cartuchos Oasis HLB CARTRIDGE 3 ml de metanol.
- Pasar 5ml H<sub>2</sub>O purificada.
- Pasar la muestra de la cual se desea extraer sus componentes fenólicos (PACs).
- Pasar 3ml de H<sub>2</sub>O purificada.
- Finalmente extraer la muestra filtrada por los cartuchos lavando con 3ml de metanol y guardar el filtrado obtenido en un tubo eppendorf para su análisis.

## Apéndice 5.

### Criterios de Participación en Donación Salival

Nombre:

En este documento, se le mostrará un listado de condiciones para saber si usted cumple o no con los criterios para participar de nuestra investigación. Deberá leer y marcar si consume o presenta alguno de los hábitos que se muestran a continuación.

No Fumador o ser exfumador por un periodo de 1 año	SI _____	NO _____
--	----------	----------

Consumo alguno de estos medicamentos: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Grupos de Medicamentos	Ejemplos
<b>Anorexígenos</b> ( <i>Inhiben el apetito</i> )	Fenfluramina
<b>Ansiolíticos</b> ( <i>Disminuye la ansiedad</i> )	Lorazepam, diazepam
<b>Anticonvulsiantes</b> ( <i>Tratamiento de convulsiones/epilepsia</i> )	Gabapentin
<b>Antidepresivos Tricíclicos</b> ( <i>Tratamiento de depresión y bipolaridad</i> )	Amitriptilina, Imipramina
<b>Antidepresivos ISRS</b> ( <i>Tratamiento de depresión y bipolaridad</i> )	Sertralina, fluoxetina
<b>Antieméticos</b> ( <i>Tratamiento de mareos y vómitos</i> )	Meclizina
<b>Antihistamínicos</b> ( <i>Tratamiento de alergia</i> )	Loratadina
<b>Anti parkinsonianos</b> ( <i>Tratamiento de Parkinson</i> )	Biperideno, Selegilina
<b>Antipsicóticos</b> ( <i>Tratamiento de esquizofrenia y el trastorno bipolar</i> )	Clozapina, clorpromazina
<b>Broncodilatadores</b> ( <i>Aumentan flujo aéreo, tratamiento de asma</i> )	Ipratropium, Albuterol
<b>Descongestionantes</b> ( <i>Alivian la congestión nasal</i> )	Pseudoefedrina
<b>Diuréticos</b> ( <i>Aumentan la producción de orina</i> )	Espironolactona, furosemida
<b>Relajantes musculares</b> ( <i>Disminuye tono muscular</i> )	Baclofen
<b>Analgésicos narcóticos</b> ( <i>Alivian dolor intenso</i> )	Meperidina, morfina
<b>Sedantes</b> ( <i>Disminuyen excitación nerviosa</i> )	Flurazepam
<b>Antihipertensivos</b> ( <i>Disminuyen presión arterial</i> )	Enalapril, propanolol
<b>Anticoagulantes</b> ( <i>Disminuye formación de coágulos sanguíneos</i> )	Warfarina

## Apéndice 6.

### Examen Flujo Salival Estimulada

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Fecha de Examen: \_\_\_\_\_

#### **Instrucciones**

Debe masticar una lámina de parafina depositando la producción de saliva en un tubo milimétrico estéril durante un periodo de 5 minutos.

Se debe excluir la espuma formada durante este proceso para realizar la cuantificación.

#### **Resultados de Flujo Salival Estimulado**

**Volumen de saliva recolectado (ml) / 5 minutos**

Categoría	Valor de referencia	Resultados
Normal	Mas de 1.1 ml/min	
Bajo I	Entre 0.9 y 1.1 ml/min	
Bajo II	Entre 0.5 y 0.9 ml/min	
Muy Bajo	Menor a 0.5 ml/min	