

Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*, bacterias iniciadoras en la formación de biopelícula dental

In vitro antibacterial effect of *Stevia rebaudiana* extract on *Streptococcus sanguinis* and *Actinomyces viscosus*, starter bacteria in dental biofilm formation

Resumen

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Stevia rebaudiana* (*S. rebaudiana*) frente a *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*). **Métodos:** Se desarrolló la prueba de sensibilidad en placa de agar con discos, para lo cual se cultivaron las cepas de *S. sanguinis* y *A. viscosus* en placas de agar tripticasa soya (TSA) y agar sangre respectivamente, incubando a 37 °C por 48 horas a *S. sanguinis* y por 7 días en condiciones de anaerobiosis a *A. viscosus*. Las cepas bacterianas fueron estandarizadas a una escala de 0,5 de Mc Farland, y tomando inóculos de 100 µL fueron sembradas en diez placas de agar sangre y TSA, luego sobre cada placa se colocaron los discos de papel secante de 6 mm de diámetro de forma equidistante, cargados con 10 µL de las diferentes concentraciones del extracto, para luego ser incubados. **Resultados:** Las concentraciones de 15, 30, 50, 60 y 120 mg/ml presentaron un halo de inhibición promedio de 6,8±0,258; 8,2±1,15; 8,2±1,13; 8,3±0,823; 8,1±0,80 mm respectivamente, para las bacterias de *S. sanguinis*. Las concentraciones de 15, 30, 50, 60 y 120 mg/ml presentaron un halo de inhibición promedio de 7,2±0,75; 9,65±2,15; 9,20±2,03; 7,95±1,09; 8,05±0,96 mm respectivamente, para las bacterias de *A. viscosus*. La prueba de Kruskal Wallis determinó que existe diferencia estadísticamente significativa con $p < 0,05$ de los promedios entre las concentraciones de *A. viscosus*. **Conclusiones:** El extracto de *S. rebaudiana* no presenta efecto antibacteriano para *S. sanguinis*, pero sí presenta efecto antibacteriano sobre *A. viscosus* para las concentraciones de 30 y 50 mg/ml.

Palabras clave: Antibacteriano; *Actinomyces viscosus*; Biopelícula dental; *Stevia*; *Streptococcus sanguinis*.

Katherine Brañez Reyes ^{1,a}, Donald Ramos-Perfecto ^{2,a,b}, Américo Castro Luna ^{3,c}, César Piscoche Botello ^{1,a}, Darío Dávila Paredes ^{4,d}, Juan Celidonio Ruiz Macedo ^{4,d}

¹ Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Departamento Académico de Ciencias Básicas. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

⁴ Centro de Investigaciones de Recursos Naturales, CIRNA. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Loreto, Perú.

^a Cirujano Dentista.

^b Magíster en Microbiología.

^c Doctor en Farmacia y Bioquímica.

^d Ingeniero Forestal.

Correspondencia:

Katherine Brañez Reyes

Correo electrónico: katherine.brañez@gmail.com

Calle Salvador 770 Nochetto, Santa Anita, Lima 1, Perú.

Coautores:

Donald Ramos Perfecto

dramosp@unmsm.edu.pe

Américo Castro Luna

acastrol@unmsm.edu.pe

César Piscoche Botello

cpiscocheb@unmsm.edu.pe

Darío Dávila Paredes

davilaparedesdario@yahoo.es

Juan Celidonio Ruiz Macedo

juaceruma@yahoo.es

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Con apoyo del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Fecha de recepción: 03/10/17

Fecha de aceptación: 27/02/18

Abstract

Objective: To determine the antibacterial effect of *Stevia rebaudiana* extract (*S. rebaudiana*) against *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) and *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*).

Methods: The plaque agar sensitivity test was developed with discs, for which strains of *S. sanguinis* and *A. viscosus* were grown on trypticase soy agar plates (TSA) and blood agar, respectively, incubating at 37 °C. for 48 hours to *S. sanguinis* and for 7 days under conditions of anaerobiosis to *A. viscosus*. The bacterial strains were standardized at a scale of 0.5 of Mc Farland, and taking inocula of 100 µL were seeded in ten plates of blood agar and TSA, then in each plate were placed discs of 6 mm diameter in equidistant form, loaded with 10 µL of different concentrations of the extract, to incubate. **Results:** The concentrations of 15, 30, 50, 60 and 120 mg/ml presented an average inhibition halo of 6.8±0.258; 8.2±1.15; 8.2±1.13; 8.3±0.823; 8.1±0.80 mm respectively, for the bacterium *S. sanguinis*. The concentrations of 15, 30, 50, 60 and 120 mg/ml showed an average inhibition halo of 7.2±0.75; 9.65±2.15; 9.20±2.03; 7.95±1.09; 8.05±0.96 mm respectively, for the bacterium *A. viscosus*. The Kruskal Wallis test determined that there is a statistically significant difference with $p < 0.05$ of the averages between the concentrations of *A. viscosus*. **Conclusions:** The extract of *S. rebaudiana* does not have an antibacterial effect for *S. sanguinis*, but has an antibacterial effect on *A. viscosus* for concentrations of 30 and 50 mg/ml.

Keywords: Anti-bacterial agents; *Actinomyces viscosus*; Dental plaque; *Stevia*; *Streptococcus sanguis*.

Introducción

Estudios epidemiológicos del Ministerio de Salud del Perú reportan que la prevalencia de caries dental en la población general es del 90,4%¹ y según la Organización Mundial de la Salud (OMS)², el 60%- 90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo, afirmando que las principales afecciones bucales como caries dental y enfermedad periodontal constituyen un importante problema de salud debido a su alta prevalencia e incidencia en la salud general de la población mundial³. La caries dental es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la desmineralización progresiva de las porciones inorgánicas del diente y el deterioro posterior de las porciones orgánicas de este⁴. Es un proceso destructivo que se origina por la acción de los microorganismos que forman parte de la biopelícula dental^{5,6}. Esta es una enfermedad localizada que resulta de los procesos metabólicos de la biomasa microbiana en contacto con la superficie dental y la dieta, que proporcionan los requerimientos nutricionales y por lo tanto energéticos a los microorganismos de la microbiota bucal⁷. En relación a los microorganismos se ha determinado que existe una flora bacteriana iniciadora en la formación de la biopelícula dental, la cual es considerada como el mayor factor asociado a la aparición de la caries dental, entre los cuales están *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*).

Streptococcus sanguinis es un microorganismo que forma parte del ecosistema oral, pertenece al grupo de *Streptococcus viridans*, muy asociado a patologías como la endocarditis bacteriana. En relación a patologías bucales, es el iniciador en la formación de la biopelícula dental o placa dental, complejo asociado a la caries dental y enfermedades periodontales. Este microorganismo presenta como unidad formadora una estructura llamada coco de aproximadamente 0,6 µm de diámetro, que se dis-

pone en cadenas medianas o largas. Son Gram positivo, catalasa negativa y anaerobios facultativos. Su genoma es un ADN circular de 2388435 pb. Entre sus factores de virulencia destacan sus fimbrias y adhesinas, estructuras que le permiten gran adherencia a la película adquirida dental, así como la producción de glucosiltransferasas responsables en la formación de glucanos, compuestos que van a permitir mayor adhesión de otros microorganismos⁸⁻¹⁰.

Actinomyces viscosus, es una bacteria Gram positiva antiguamente llamada *Odontomyces viscosus*, morfológicamente es un bacilo que puede presentar forma curva, en barra, filamentosa larga o corta observándose por microscopía como formas ramificadas. Sus colonias son de un color blanco pálido brillante, circulares y de borde entero, esto es típico en un medio de agar sangre. Su factor de virulencia más resaltante son las fimbrias, como la fimbria tipo I, la cual tiene afinidad por las proteínas ricas en prolina y estaterina, así como por la superficie del esmalte dental a través de un mecanismo adhesina-receptor. Producen polisacáridos intracelulares y extracelulares de alto peso molecular a partir de sacarosa, que por medio de exoenzimas van a formar mütanos, dextranos y lévamos, siendo los mütanos compuestos que tienen gran función adhesiva y los otros dos usados como reserva alimenticia^{10,11}.

Las enfermedades bucales de mayor prevalencia son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas que están presentes de forma natural y que ayudan a mantener el estado normal de la cavidad bucal¹². En apoyo al control de las enfermedades bucales, varias plantas medicinales de nuestro medio están siendo estudiadas como el *Erythroxylum novogranatense var truxlense* (hoja de coca) y *Plantago major* (llantén), evaluando su acción inhibitoria sobre el crecimiento de bacterias y hongos¹³. Otros estudios han analizado el efecto de la

Camellia sinensis (té verde) en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)¹⁴.

Stevia rebaudiana (*S. rebaudiana*) es un producto natural con propiedades antihiper glucémico, hipotensor, cardiotónico, así como un edulcorante que podría reemplazar al azúcar refinada muy utilizada en nuestros días. Esta planta es cultivada en nuestro país desde hace una década y es perfectamente adaptable a las regiones tropicales y subtropicales del Perú, como en las regiones de Cajamarca, Amazonas, San Martín, Ucayali y Apurímac¹⁵.

El estudio desarrollado tiene por objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana*, sobre dos bacterias consideradas iniciadoras de la biopelícula dental, como son *S. sanguinis* y *A. viscosus*

Métodos

El estudio fue de tipo experimental, prospectivo e *in vitro*; se realizó previa aceptación de la metodología del estudio por el Instituto de Investigación Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Se utilizaron las cepas de *S. sanguinis* ATTC 10556 y *A. viscosus* ATTC 15985, las cuales pasaron un control de calidad en su obtención, como en su activación.

Las concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml, del extracto hidro-alcohólico de *Stevia rebaudiana* se prepararon en el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

Una vez obtenido el extracto y las cepas se procedió a desarrollar la prueba de sensibilidad, difusión en agar con disco.

Prueba de sensibilidad de difusión en placa de agar con disco. La activación de las cepas se realizó según microorganismo, *S. sanguinis* en medios de agar tripticosa soya (TSA) por 24- 48 horas a 37° con CO₂ al 5% y *A. viscosus* en agar sangre por 7 días en anaerobiosis, a 37 °C. Luego de la activación de las cepas, se determinó para ambas cepas un nivel de turbidez de 0,5 de Mc Farland, se sembró por diseminación un inóculo de 100 µl de la dilución en agar TSA y sangre, seguidamente colocamos los discos conteniendo 10 µl de las diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* (15 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml), colocando un disco para el control positivo (clorhexidina al 0,12%) y otro para el control negativo (etanol 96°). Posteriormente se procedió a incubar a 37°C por 48 horas en medio CO₂ al 5% (*S. sanguinis*) y 7 días en anaerobiosis (*A. viscosus*). La lectura se realizó pasado el tiempo de incubación, en función a la medición de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de los microorganismos (HICM) confrontando los resultados con la escala de Duraffourd: sensibilidad nula () si el HICM fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

Resultados

Los resultados mostraron que el extracto de *S. rebaudiana* tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre *A. viscosus*, siendo las medias de los diámetros de los halos de inhibición 9,65±2,15; 9,2±2,03; 8,05±0,96, 7,95±1,09 y 7,2±0,75 mm correspondiendo el mayor promedio para la concentración de 30 mg/ml y la menor concentración para la de 15 mg/ml (Figura 1).



Figura 1. Halos de inhibición del extracto de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones sobre *A. viscosus*, en agar sangre

En la Figura 1 se puede apreciar que el efecto antibacteriano de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus* no es directamente proporcional a su concentración. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis indicó que existen diferencias significativas ($p=0,02$) entre el efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* (Figura 2).

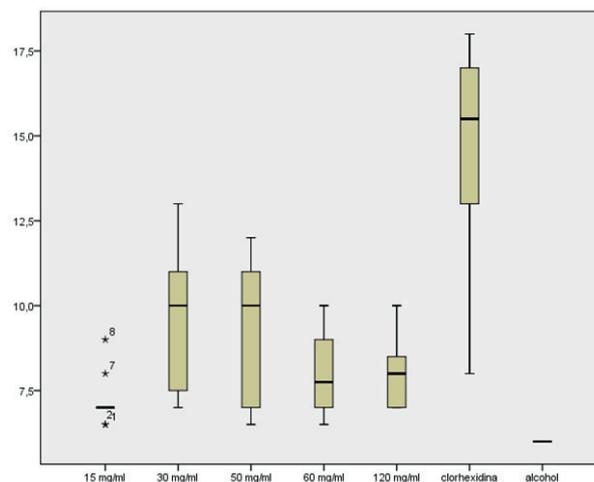


Figura 2. Resultados de los halos de inhibición en mm sobre *A. viscosus* causados por las diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana*, como de los controles positivo y negativo

En relación al efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus*, se obtuvo que los halos de inhibición del crecimiento bacteriano que se encontraron en el rango de sensibilidad límite (9-14 mm) correspondieron a la formación de 19 halos (38%) mientras

que 31 halos (62%) tuvieron sensibilidad nula (< 8 mm) (según la escala de Duraffourd).

Los resultados mostraron que el extracto de *S. rebaudiana* no tiene actividad antibacteriana *in vitro* sobre *S. sanguinis*, siendo las medias de los diámetros de los halos de inhibición $6,8 \pm 0,258$; $8,2 \pm 1,15$; $8,2 \pm 1,13$; $8,3 \pm 0,823$ y $8,1 \pm 0,80$ mm (Figura 3).

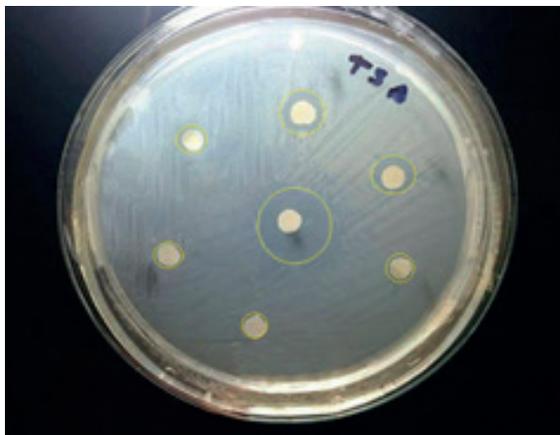


Figura 3. Halos de inhibición del extracto de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones sobre *S. sanguinis* en agar TSA

En la concentración de 15 mg/ml los diámetros de los halos están dispersos entre el 25% y 50%, mientras que en las concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml los diámetros de los halos están dispersos equitativamente entre el 25% a 50% y 50% a 75%. En la concentración del 30 mg/ml los diámetros de los halos están más dispersos entre el 50% y 75% de la muestra (Figura 4).

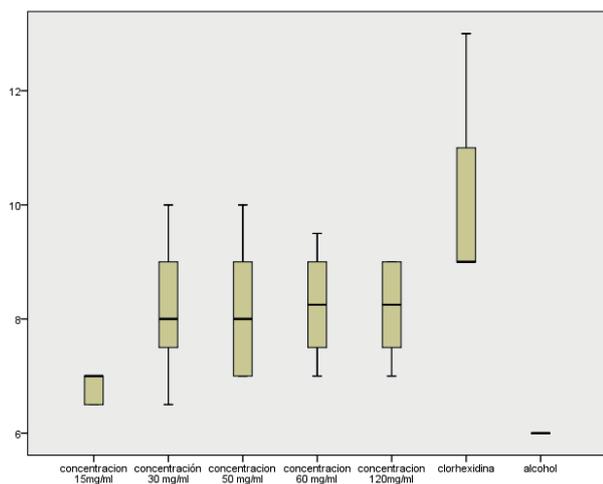


Figura 4. Resultados de los halos de inhibición en mm sobre *S. sanguinis* causados por las diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana*, como de los controles positivo y negativo

Discusión

Actualmente se investigan numerosas plantas con el objetivo de encontrar en ellas propiedades antimicrobianas que luego puedan ser utilizados medicinalmente ¹⁶. *S. rebaudiana* es una planta que es utilizada en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades. En la presen-

te investigación se buscó determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* frente a *S. sanguinis* y *A. viscosus*. No se encontró un trabajo sobre el efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre las cepas de *S. sanguinis* pero en el estudio de Pérez ¹⁷ al evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de hojas frescas de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*, con seis concentraciones en etanol de 70° y seis concentraciones en etanol de 30°, concluyó que el extracto etanólico de *S. rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *S. mutans*, bacteria del mismo género al cual pertenece el *S. sanguinis*.

Gamboa *et al.* ¹⁸ en su estudio acerca de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *S. rebaudiana* sobre microorganismos cariogénicos, como las bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus*, determinó un mejor resultado en la inhibición del desarrollo de *Lactobacillus*, pero también pudo inhibir al género *Streptococcus*, al cual pertenece el *S. sanguinis*.

Vitery *et al.* ¹⁹ en su estudio que evaluó la actividad inhibitoria de la *S. rebaudiana* sobre el *L. acidophilus* y *S. mutans*, comprobaron que esta tiene actividad antibacteriana sobre estos géneros. También Tovar *et al.* ²⁰ evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de *Stevia* en comparación con el xilitol sobre el *S. mutans* obteniendo como resultado que la *S. rebaudiana* presenta mayor efecto antimicrobiano que el xilitol.

Jayaraman *et al.* ²¹ evaluaron las actividades antimicrobianas y antitumorales del extracto de *S. rebaudiana*, comparando el efecto de cuatro extractos disueltos en diferentes solventes como, acetato de etilo, acetona, cloroformo y agua, contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Vibrio cholerae*, utilizando el método de difusión de agar con pozos. Así también se evaluó la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton*, siendo el extracto de acetona el que presentó mayor actividad frente a Gram positivas, por lo que este mismo efecto se podría dar sobre *S. sanguinis* y *A. viscosus* ya que son Gram positivos los dos microorganismos.

Lin *et al.* ²² comprobaron la acción antibacteriana y antitumoral de los análogos de esteviósido, los compuestos sintetizados fueron más activos contra bacterias Gram positivas como el *Bacillus subtilis*. El estudio realizado evaluó el efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus*, cuyo resultado fue que a la concentración de 30 y 50 mg/ml presentan sensibilidad límite según la escala de Durafford, pero no se encontró estudios donde lo hayan enfrentado contra esta bacteria. Mención aparte, se deben realizar más estudios utilizando diferentes procedimientos, sean *in vivo* o *in vitro*, ya que a la luz del conocimiento actual, *Stevia rebaudiana*, sería un buen prospecto para su posible uso en colutorios y pastas dentales, ya sea por su efecto antibacteriano como por su condición de edulcorante.

Se concluye que bajo las condiciones de los procedimientos realizados en los ensayos, el extracto hidro-alco-

holico de *Stevia rebaudiana* tiene un efecto antibacteriano *in vitro* sobre *A. viscosus*, para las concentraciones de 30 y 50 mg/ml, no existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre *S. sanguinis*.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento económico parcial, para el desarrollo del presente estudio, así como al Instituto de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo en la ejecución del estudio. Así también a la Srta. Yuli Ramos P. por su apoyo en la recolección de bibliografía y tipeo del artículo.

Referencias bibliográficas

1. Minsa. Salud Bucal. Ministerio de Salud del Perú;2002 (Citado el 05 de noviembre de 2017) Disponible en : https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13
2. OMS. Salud Bucodental. Organización Mundial de la Salud; 2012 (Citado el 06 de noviembre del 2017) Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/
3. Sitkiewicz I. How to become a killer, or is it all accidental? Virulence strategies in oral Streptococci. Mol Oral Microbiol. 2017;1-12. doi: 10.1111/omi.12192.
4. Kreth J, Giacaman R, Raghavan R, Merrit J. The road less traveled- defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. Mol Oral Microbiol. 2017;32(3):181-196.
5. Ramos PD, Brañez K. *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus* bacterias pioneras en la formación de biofilm dental. Kiru. 2016;13(2):179-184.
6. Könönen E, Wade WG. *Actinomyces* and related organisms in human infections. Clin Microbiol Rev. 2015;28(2):419-422.
7. Gonzáles A, Martínez T, Alfonso B, Rodríguez JA, Morales A. Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes: Distrito Capital, Venezuela. Rev Cubana Estomatol 2009;46(3):30 -37.
8. Szpunar S, Eklund SA, Burt BA. Sugar consumption and caries risk in schoolchildren with low caries experience. Community Dent Oral Epidemiol.1995;23(3):142-146.
9. Campos C. Etiología de la caries, *Streptococcus mutans*, capacidad buffer salival y tipo de dieta. Revista ADM. 1985;42:43-50.
10. Liébana J. Microbiología oral. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill –Interamericana; 2002. Capítulo 33, Bacilos Grampositivos anaerobios facultativos de interés oral; p. 345-347.
11. Bascones A. Tratado de odontología (tomo I). 4ta ed. Barcelona: Ediciones Avances; 2001. Capítulo 5, Microbiología oral; p. 682-694.
12. Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. Av Periodoncial. 2005;17(2):79-87.
13. Bazalar D, Choquesillo F, Milla H, Herrera O, Félix M. Acción inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxylum novogranatense* (morrís) Var. *Truxyllense* (rusby) y *Plantago major* (llantén) frente a bacterias y hongos. Ciencia e investigación UN-MSM. 1998;1(2):58-61.
14. Moromi H, Martínez E, Villavicencio J. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana 'por *Streptococcus mutans*. Odontol. Sanmarquina. 2006;9(2):15-17.
15. EDAC. Manual técnico de producción de Stevia – agricultura ecológica [Internet].Cajamarca: EDAC;2008 [citado 3 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://agricultura-ecologica.servidor-alicante.com/documentos-agricultura-ecologica/Agricultura-Ecologica-Manual-tecnico-de-produccion-de-Stevia.pdf>.
16. Moromi NH, Martínez CE, Ramos PD. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontol Sanmarquina. 2009;12(1):25-28.
17. Pérez Guevara SP. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2013. 70p.
18. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol Latinoam. 2012;25(2):171-175.
19. Vitery S, Escribano V, Gamboa J, Chavarria B, Gómez S. Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*; Rev Nal Odo UCC. 2010;6(10):57-64.
20. Tovar G, Cupé A. Actividad antimicrobiana de la *Stevia* en comparación con el xilitol, frente a los *Streptococcus mutans* – un estudio *in vitro*. Rev OACTIVA UC Cuenca. 2016;1(2):51-54.
21. Jayaraman S, Manoharan MS y Lllanchezian S. *In-vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. Trop J Pharm Res. 2008;7(4):1143-1149.
22. Lin LH, Lee LW, Sheu SY, Lin PY, Study on the Steviol, Steviol, and Isosteviol 19-Alkyl Amide Dimers: Synthesis and cytotoxic and antibacterial activity. Chem Pharm Bull. 2004;52(9):1117-1122.

