



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA  
SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS DE LA CAVIDAD ORAL  
AISLADOS DE LOS FRUTOS DE *Spondias purpurea* L.  
(CIRUELO ROJO)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

**PAULINA DEL VALLE PÉREZ**



MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz
2do. suplente:	M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar.

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111 Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

---

Paulina Del Valle Pérez

## DEDICATORIAS

A mi abue Luz María, gracias por el cariño y el tiempo que con tanto amor me dedicaste para cuidarme y guiarme para ser una mejor persona, aunque ya no estás conmigo, te sigo recordando con todo mi amor y a ti debo cada uno de mis logros.

A mi mamá, María Luisa, gracias por el apoyo incondicional que me has brindado, por tu amor, tu comprensión, tus sacrificios para que yo pudiera crecer en todos los sentidos, por compartir conmigo tantas alegrías y ser la mano que me ayuda a levantarme en momentos difíciles, por aguantar mis enojos e impulsarme en momentos de incertidumbre. Gracias mamá, a ti debo este gran logro. Te amo

A mi hermana Janis, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas, por las horas de juegos, de tele, de riñas, de risas de cuando éramos pequeñas y por el tiempo que ahora compartimos junto con la pequeña Sofí. Son una parte esencial en mi vida. Las amo.

A mi papá, gracias por tu apoyo, espero que compartas conmigo este logro que es tuyo también y que la vida te traiga muchos momentos felices.

A mis tíos Beru, Poncho, Paty, y Silvi, Alex, Alfred, Arce, y mi abue Ame, todos son muy importantes para mi y agradezco los momentos que he pasado con cada uno de ustedes y sus enseñanzas que a lo largo de mi vida me han hecho crecer.

A mi abue Bau, con cariño te recordaré siempre, por tus bromas, tu alegría y todos los domingos que en familia pudimos disfrutar a tu lado.

A Rod, por ser una parte muy importante en mi vida, gracias por todas las cosas maravillosas que hemos vivido, por hacerme sonreír cuando estoy triste y alegrar

siempre mis días. Espero que todos tus sueños se realicen y que tengas mucho éxito en tu vida. Te amo.

A mi amiga Pau, gracias por todos estos años de conocerte, y aunque te descuide durante toda la carrera, sabes que te quiero muchísimo y que siempre serás muy importante para mi.

A mis amiga Jess, gracias por tu amistad, eres una amiga muy especial para mi y espero siempre conservar tu amistad, siempre recordaré los momentos que hemos vivido. Espero que siempre tengas éxito y que logres cumplir todas las metas que te has propuesto.

A mis amigos de la barda: Pancho, Roberto (Stimpy), Chucho, David, Odín, Oscar, Arizmendi, Alex, Rodas, Adrián, Ulises, Isaac, Chava y a Paloma, Grisi, Erika, Aurora, Azalea, María, gracias a todos por los buenos momentos que hemos pasado, los viajes, las fiestas, la gas, las clases, las horas riendo en la barda, cada uno de ustedes es muy importante para mi y espero seguir conservando su amistad a lo largo de los años.

A mis amigos: Meche, Mariana, Ricardo, David, Roberto, Sara, Goretti, Oscar, el poco tiempo que he compartido con ustedes ha sido genial para mi, agradezco haberlos conocido y valoro mucho la amistad que hemos construido.

A Cris, Gloria, Fer, Gloria y Goyo, gracias por la amistad que durante estos años nos han brindado, por abrirnos las puertas de su hogar y compartir buenos momentos con nosotras.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México a la cual estoy muy agradecida por darme la oportunidad de pertenecer a ella y forjarme como profesionista y como ser humano.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus valiosas observaciones para mejorarlo.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los distintos espectros utilizados en ésta investigación.

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207 e IN205709.

Al Maestro Alejandro Camacho por el apoyo técnico para el crecimiento de las bacterias empleadas en esta investigación.

A la M. en C. Georgina Duarte Lisci por su colaboración para la realización de la técnica de microextracción en fase sólida.

---

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	I
<b>LISTA DE CUADROS</b>	III
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	IV
<b>LISTA DE DIAGRAMAS</b>	V
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Generalidades de la bacteria cariogénica	3
<i>Streptococcus mutans</i>	
2.1.1. Incidencia en la caries dental	3
2.1.2. Factores cariogénicos de <i>S. mutans</i>	3
2.1.3. Actividad antibacteriana contra <i>S. mutans</i> de compuestos de origen natural	4
2.2. <i>Spondias purpurea</i> L. (Anacardiaceae)	7
2.2.1. Aspectos generales	7
2.2.2. Aspectos botánicos	8
2.2.3. Aspectos etnobotánicos	9
2.2.4. Otros usos	10
2.2.5. Estudios de eficacia preclínica	11
2.2.6. Estudios químicos	11
2.3. Los ácidos anacárdicos	16
2.3.1. Generalidades	16
2.3.2. Nomenclatura	16
2.3.3. Los ácidos anacárdicos en la naturaleza	17
2.3.4. Actividad biológica	17
2.4. Microextracción en fase sólida (SPME)	19

	<b>Página</b>
2.4.1. Generalidades	19
2.3.2. Fundamentos	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>IV. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>26</b>
4.1. Procedimientos generales	26
4.1.1. Análisis cromatográficos	26
4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	26
4.2. Material vegetal	27
4.3. Estudio Fitoquímico de <i>Spondias purpurea</i>	27
4.3.1. Obtención del extracto total de los huesos de <i>S. purpurea</i>	27
4.3.2. Fraccionamiento primario del extracto total de los huesos de <i>S. purpurea</i>	27
4.3.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F <sub>1</sub>	27
4.4. Reacción de metililación del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	31
4.5. Microextracción en fase sólida de los componentes volátiles de las hojas y la pulpa de <i>S.purpurea</i> .	31
4.6. Ensayo biológico	32
4.6.1. Microorganismos de prueba	32
4.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	33
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>34</b>
5.1. Caracterización estructural del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> ).	36



---

	<b>Página</b>
5.2. Determinación de los compuestos volátiles en los frutos y hojas de <i>Spondias purpurea</i> por microextracción en fase sólida (SPME)	48
5.2.1. Actividad antibacteriana de los principales componentes volátiles detectados en los frutos y las hojas de <i>S. purpurea</i> contra las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	54
<b>VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	57
<b>VII. PERSPECTIVAS</b>	58
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	59

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados Celsius
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases- espectrometría de masas
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Correlación homonuclear
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
eV	Electrón-volts
g	Gramo
GTF's	Glucosiltransferasas
h	Hora
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
$\mu$ g	Microgramo

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
µm	Micrómetro
M	Concentración molar
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
SMPE	Solid phase microextraction
t	Triplete
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1.	Compuestos de origen natural con actividad contra <i>Streptococcus mutans</i>	6
2.	Compuestos volátiles detectados en <i>Spondias purpurea</i>	12
3.	Ácidos anacárdicos encontrados en <i>Spondias mombin</i>	19
4.	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F <sub>1</sub>	28
5.	Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F <sub>1-4</sub>	29
6.	Condiciones para la microextracción de volátiles presentes en <i>S. purpurea</i>	32
7.	Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total y las fracciones de <i>S. purpurea</i> contra las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	35
8.	Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de <i>Spondias purpurea</i> contra las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
9	Constantes espectroscópicas en las RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C para el ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> ).	47
10.	Principales componentes volátiles presentes en el fruto de <i>Spondias purpurea</i> .	49
11.	Principales componentes volátiles presentes en las hojas de <i>Spondias purpurea</i> .	52
12.	Actividad antibacteriana (CMI) de los principales componentes volátiles presentes en <i>S. purpurea</i> contra las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1.	Árbol y frutos de <i>Spondias purpurea</i>	9
2.	Distribución geográfica y zonas de uso de <i>S. purpurea</i>	9
3.	Estructura de un ácido anacárdico C <sub>15:1</sub>	16
4.	Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza (headspace)	23
5.	Estructuras de los compuestos aislados de <i>Spondias purpurea</i> .	36
6.	Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> ).	38
7.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> ).	39
8.	Principales fragmentos obtenidos para los ácidos anacárdicos metiltiolados.	41
9.	Derivado metiltiolado del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> ) y los fragmentos resultantes	42
10.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	43
11.	Espectro COSY del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	44
12.	Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	45
13.	Espectro de HSQC del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	46
14.	Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en los frutos de <i>S. purpurea</i>	50
15.	Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las hojas de <i>S. purpurea</i>	53

**LISTA DE DIAGRAMAS**

<b>Diagrama</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1.	Proceso de obtención y fraccionamiento del extracto de los huesos de <i>S. purpurea</i>	30

## I. INTRODUCCIÓN

En México las plantas han sido un recurso muy importante para la medicina tradicional desde tiempos inmemoriales. Los conocimientos acerca de las plantas medicinales en nuestro país datan de épocas anteriores al descubrimiento de América. Los indígenas en virtud de su íntimo contacto con la naturaleza y por una experiencia prolongada, habían adquirido amplios conocimientos sobre las propiedades curativas de las plantas y las sabían aprovechar con acierto. En la actualidad, las plantas medicinales siguen siendo utilizadas a lo largo de todo el país para tratar una infinidad de padecimientos.

La ciencia moderna ha permitido el estudio exhaustivo de algunas de las especies empleadas en la medicina tradicional, sin embargo aún queda mucho por estudiar. En lo que respecta al uso de plantas con propiedades antimicrobianas, se han descrito ya un gran número de especies que actúan contra diversos microorganismos, principalmente bacterias.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas constituyen las primeras causas de muerte en todo el mundo y de éstas, las enfermedades orales como la caries dental y la periodontitis son un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y cada vez con mayor frecuencia a los países en vías de desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres. Existe la idea de que las caries y las enfermedades periodontales han dejado de ser un problema en países desarrollados, pero en realidad afecta entre el 60 y 90% de la población escolar y a la mayoría de los adultos en el mundo. La caries dental es también la enfermedad oral más frecuente en países asiáticos y latinoamericanos.

Debido a la poca eficacia que presentan los tratamientos que se emplean para aliviar estos padecimientos es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces, con menos efectos colaterales y con nuevos mecanismos de acción.

En este sentido, las plantas medicinales representan una de las mejores alternativas para la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos. Bajo este contexto se planteó el presente proyecto de investigación que describe el estudio fitoquímico del ciruelo rojo, especie conocida en la medicina tradicional mexicana para tratar padecimientos ocasionados por bacterias.



## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*

#### 2.1.1. Incidencia en la caries dental

La caries dental es una de las enfermedades crónicas infecciosas más comunes que afectan a toda la población mundial. Existen tres hipótesis para explicar la etiología de este padecimiento: **1)** La de la placa específica, que propone que solo unas pocas especies como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* están involucradas en la enfermedad. **2)** La segunda es la de la placa no específica, y plantea que la caries es el resultado de la actividad de la microflora total de la placa dentobacteriana. **3)** Por último, la hipótesis ecológica sugiere que la caries es el resultado del cambio en el balance de la microflora residente ocasionado por variaciones en las condiciones ambientales de la cavidad oral (Aas *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios revelan que especies como *Streptococcus mutans* y otros estreptococos, *Veillonella* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp., *Propionibacterium* spp., *Lactobacillus fermentum* y *Rothia dentocariosa* están asociadas con la caries dental (Aas *et al.*, 2008).

La placa dental juega un papel muy importante en el desarrollo de la caries, la cual resulta en una disfunción dental y hasta la pérdida de los dientes. La placa dentobacteriana se forma en dos etapas: inicialmente ocurre la adhesión reversible de diversas bacterias orales a la superficie dental, seguida de la acción de las glucosiltransferasas (GTF's), las cuales forman una capa de polímeros de glucosa insolubles a partir de la sacarosa, que promueven la adhesión irreversible de las bacterias. Posteriormente microorganismos acidogénicos producen ácido láctico por medio de la fermentación de azúcares como fructosa, lo que conduce finalmente al ataque del esmalte y a la formación de la caries dental (Chung *et al.*, 2006).

#### 2.1.2. Factores cariogénicos de *S. mutans*

*Streptococcus mutans* es uno de los principales agentes causales de la caries dental en humanos. Los factores asociados con este carácter patogénico incluyen

la adhesión, la acidogenicidad y la tolerancia a pH ácido (da Silva-Leitão *et al.*, 2004).

Las GTF's secretadas por *S. mutans* sintetizan polisacáridos extracelulares complejos (principalmente glucanos) a partir de la sacarosa de la dieta, y son la clave para la acumulación bacteriana en la superficie dental y contribuyen a la integridad estructural de la bioplaaca (Thimothe *et al.*, 2007). Este microorganismo secreta al menos tres tipos de GTF's que pueden sintetizar glucanos solubles  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) y glucanos insolubles  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Devulapalle *et al.*, 2004).

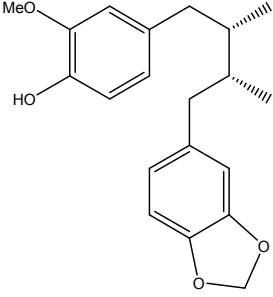
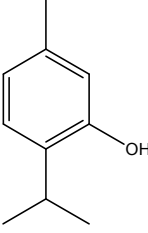
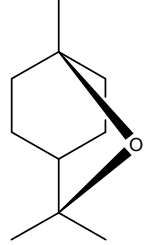
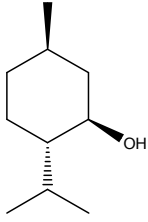
La capacidad acidogénica de *S. mutans* disminuye considerablemente el pH de la placa lo que contribuye a la desmineralización del esmalte dental y a la selección de organismos tolerantes (Thimothe *et al.*, 2007).

### **2.1.3. Actividad antibacteriana contra *S. mutans* de compuestos de origen natural**

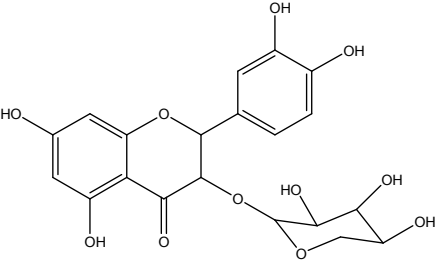
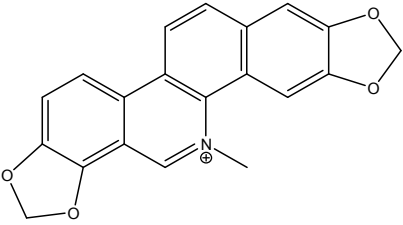
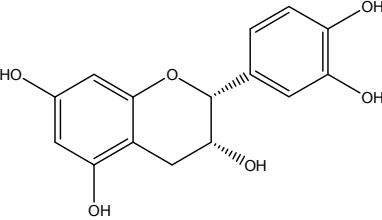
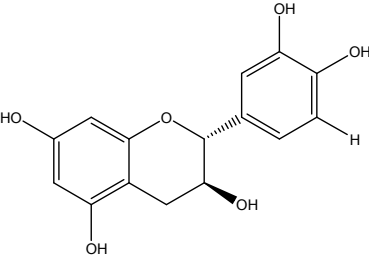
Se han descubierto y desarrollado diversos agentes efectivos para eliminar a *S. mutans* de la microflora oral. Los antibióticos como ampicilina, clorhexidina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y vancomicina han resultado muy efectivos para prevenir las caries, sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos puede generar un desbalance en la flora oral e intestinal y causar efectos indeseables como susceptibilidad a microorganismos, vómito, diarrea y pueden manchar el esmalte dental (Chung *et al.*, 2006).

En la literatura se han reportado diversos compuestos aislados de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales, que presentan una potente actividad antibacteriana contra *S. mutans*. En el siguiente cuadro se muestran algunos ejemplos de compuestos reportados, así como algunas de las especies de las que fueron aislados.

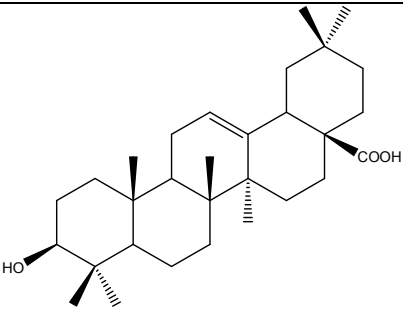
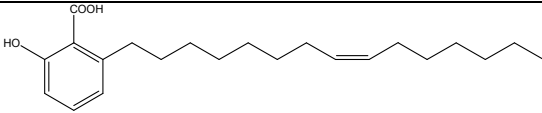
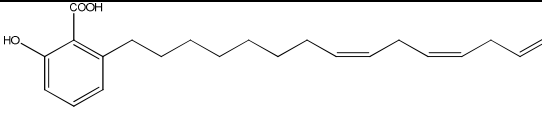
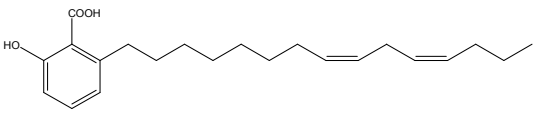
**Cuadro 1.** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans*.

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Macelignano		<i>Myristica fragans</i>	Chung et al., 2006
Timol		<i>Thymus vulgaris</i>	Chung et al., 2006
Eucaliptol		<i>Eucalyptus globulus</i>	Chung et al., 2006
Mentol		<i>Menta piperita</i>	Chung et al., 2006

**Cuadro 1.** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans* (continuación).

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Guajaverina		<i>Psidium guajava</i>	Prabu <i>et al.</i> , 2006
Sanguinarina		<i>Sanguinaria canadensis</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Epicatequina		<i>Theobroma cacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001
Catequina		<i>Camellia sinensis</i>	Murphy, 1999
Ácido oléico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$	<i>Theobroma cacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001

**Cuadro 1.** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans* (continuación).

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Acido oleanólico		<i>Vitis vinifera</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2008
Ácido anacárdico C <sub>15:1</sub>		<i>Anacardium occidentale</i>	Kasemura <i>et al.</i> , 2002
Ácido anacárdico C <sub>15:3</sub>		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003
Ácido anacárdico C <sub>15:2</sub>		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003

## 2.2. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae)

### 2.2.1. Aspectos generales

El ciruelo rojo (*Spondias purpurea*) es una especie endémica de Mesoamérica y su distribución se extiende desde México hasta Brasil y Perú. En nuestro país, es una especie ampliamente distribuida principalmente en la vertiente del Pacífico y en estados de la República Mexicana como Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Veracruz y Yucatán (CONABIO, 2008; INI, 1994).

En México es conocida popularmente con nombres como ciruelo, ciruelo rojo, ciruelo cimarrón, ciruela, ciruela colorada, ciruela campechana, jocote, ciruelo de San Juan, yoyomo, jondura, chiabal, entre otros (CONABIO, 2008; INI, 1994; Martínez, 1996). En Brasil y otros países de América del Sur es conocida como siriguela (Ceva-Antunes *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Aspectos botánicos**

*Spondias purpurea* L., perteneciente a la familia Anacardiaceae, es un árbol o arbusto caducifolio, de 3 a 15 metros de altura, con un diámetro de hasta 80 centímetros. Posee una copa muy extendida y hojas alternas, pinnadas de color verde amarillento de 10 a 20 cm de largo con 9 a 25 folíolos elípticos de 1.9 a 4 cm de largo, con borde ligeramente ondulado. El tronco es corto y se ramifica desde 1 metro de altura, presenta ramas gruesas, retorcidas y frágiles o quebradizas. La corteza externa es rugosa, muy ornamentada y con aspecto muy variable, de color gris plomo a moreno verdoso, a veces con fisuras irregulares y protuberancias con textura de corcho, pequeñas o en ocasiones grandes, que incluso pueden confundirse con espinas. Tiene panículas finamente vellosas con pocas flores, las flores son pequeñas y de color rojo brillante o rosado de 0.63 centímetros de diámetro y con cáliz diminuto con 5 lóbulos y 5 pétalos. Los frutos son de color rojo purpúreo o amarillo, ovoides de 3 cm de largo por 1.5 cm de ancho, con escasa pulpa de color amarillo, jugosa y agridulce, el hueso es fibroso y grande, de 0.5 a 0.75 cm de largo, con 1 a 5 semillas (CONABIO, 2008; INI, 1994; Martínez M., 1996).

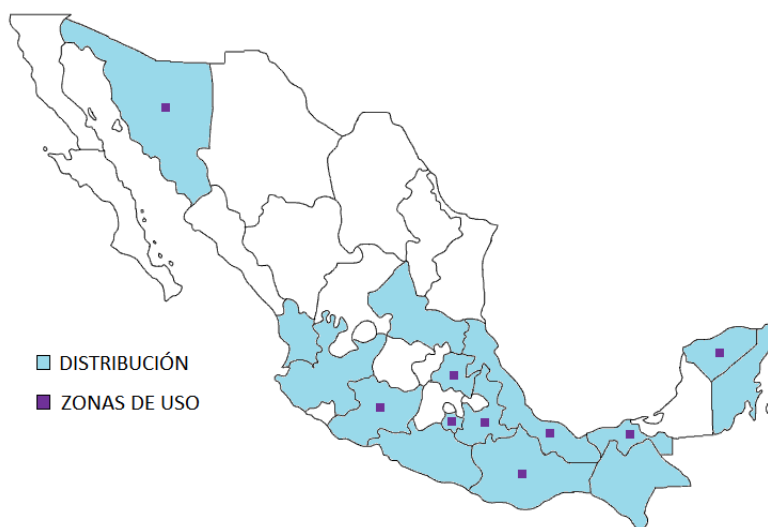
Es una planta silvestre aunque también puede encontrarse cultivada en huertos familiares. Está asociada a vegetación de bosque tropical, bosque caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque de pino o de encino y bosque espinoso. Habita en clima cálido, semicálido y templado (INI, 1994).



**Figura 1.** Árbol y frutos de *Spondias purpurea*.

### 2.2.3. Aspectos etnobotánicos

Los estados de la República Mexicana en donde es más utilizada con fines medicinales son: Sonora, Michoacán, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Tabasco y Yucatán.



**Figura 2.** Distribución geográfica y zonas de uso de *S. purpurea* (INI, 1994).

Es una planta de origen americano de uso muy antiguo. Se indicaba en el siglo XVI contra afecciones de la piel, en particular para curar la sarna. Hoy en día se sigue recomendando en la medicina tradicional contra ciertos padecimientos de la

piel, y puesto que se ha detectado actividad antibiótica en sus extractos, esto valida tal uso (INI, 1994).

La hoja y la corteza son utilizadas para eliminar el salpullido (uso referido en los estados de Hidalgo, Tabasco y Yucatán), para lo cual se hacen frotaciones de las hojas y la corteza, con aguardiente o agua, en las partes afectadas, o bien, la hoja se calienta en el comal y se aplica directamente en las ronchas. También se utiliza contra el “algodoncillo”, ronchas, sarampión, granos y “clavillos”. En padecimientos urinarios, es usado como diurético, contra los cálculos renales y acumulación de ácido úrico. Se usa para curar los bronquios, la garganta, espasmos, hidropesía y para purificar la sangre. También es útil para tratar fuegos en la boca, dolor de estómago, diarrea y para fortalecer la dentadura (se macera en agua la corteza y se hacen enjuagues bucales) (INI, 1994).

El extracto de hojas o corteza es utilizado como antipirético y antidiarreico. La infusión de hojas se utiliza para lavar heridas, inflamaciones y quemaduras, así como para tratar infecciones de encías, salpullido y sarampión. El extracto de la corteza cocida es un remedio para la roña, disentería y para la flatulencia infantil. La savia de la corteza se usa para tratar estomatitis en infantes. Por otra parte, el extracto del fruto se utiliza para sanar inflamaciones, y el jarabe para curar diarrea crónica; el fruto también es utilizado para tratar la pus en orina, como diurético y antiespasmódico (machacado en alcohol). La raíz se utiliza para erupciones acompañadas de dolor de cabeza y para enfermedades del intestino y la vejiga. La resina se mezcla con jugo de piña o guanábana para tratar la ictericia (CONABIO, 2008).

#### **2.2.4. Otros usos**

- Adhesivo: La resina es utilizada en América Central para elaborar pegamentos y gomas.
- Comestible: Los frutos frescos se comen maduros o crudos, deshidratados, curtidos en alcohol o salmuera. Con los frutos se elaboran bebidas refrescantes y vinagre, se usan también para hacer gelatina o jalea, tartas, atole y salsa.
- Estimulante: Con los frutos se elaboran vinos y otras bebidas alcohólicas.



- Forrajero: Las hojas son utilizadas para alimentar ganado y cebar cerdos.
- Industrializable: La madera es ligera y blanda y en Brasil se ha encontrado que es adecuada para la fabricación de papel.
- Melífera: La flor es utilizada en apicultura.
- Fabricación de jabón: Las cenizas de la madera se utilizan en la elaboración de jabón.

(CONABIO, 2008)

### 2.2.5. Estudios de eficacia preclínica

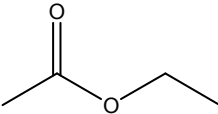
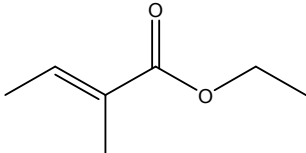
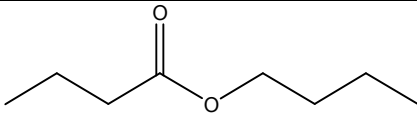
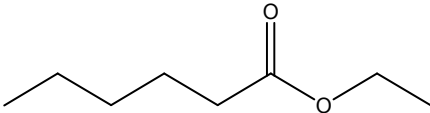
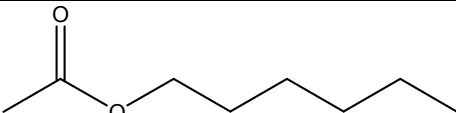
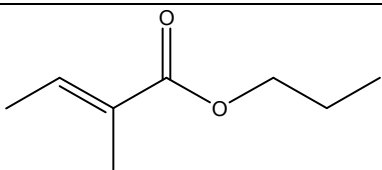
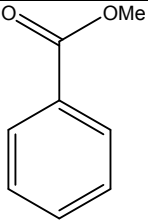
Esta planta ha sido muy poco estudiada para conocer sus acciones terapéuticas. Sólo se reporta la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto de las hojas, el cual mostró actividad frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, dando resultados negativos frente a bacterias Gram negativas y *Candida albicans* (INI, 1994).

### 2.2.6. Estudios químicos

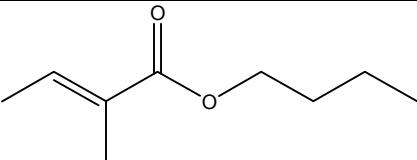
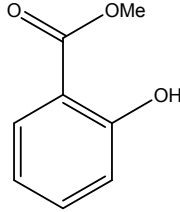
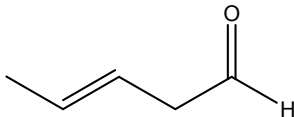
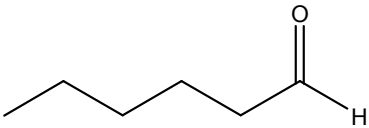
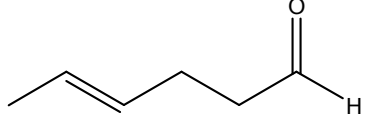
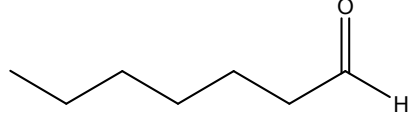
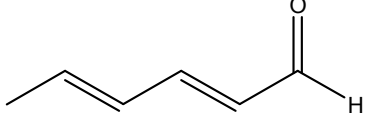
Estudios fitoquímicos previos de *Spondias purpurea* han permitido la caracterización de diversos compuestos que son responsables de las características organolépticas. En 2006 Ceva-Antunes y colaboradores realizaron el análisis del aceite esencial de la pulpa de los frutos de *S. purpurea* originaria de Brazil por medio de Microextracción en Fase Sólida (SPME) detectando mayoritariamente ésteres y aldehídos. Los compuestos más abundantes encontrados fueron hexanal, 3-hexen-1-ol, *trans*-2-hexenal, 2-hexen-1-ol, acetato de hexilo y acetato de etilo. En el Cuadro 2 se muestran los compuestos volátiles que se detectaron.

Por otra parte, se han realizado estudios con el exudado de *Spondias purpurea*, encontrando en la goma un polisacárido compuesto de galactosa (59%), arabinosa (9%), manosa (2%), xilosa (2%), ramnosa (2%) y residuos de ácido urónico (26%) en la forma de ácido D-glucurónico. También se encontró que este polisacárido contiene material proteico constituido principalmente por residuos de hidroxiprolina, serina, leucina, alanina y valina (Martínez *et al.*, 2008).

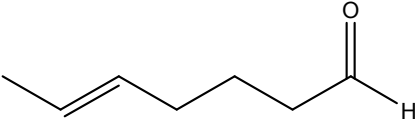
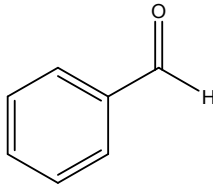
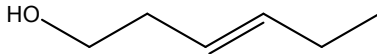
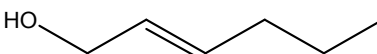
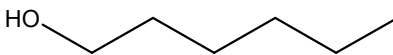
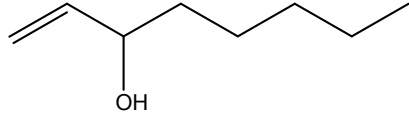
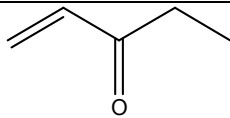
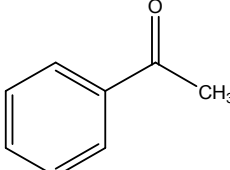
**Cuadro 2.** Compuestos volátiles detectados en *Spondias purpurea* (Ceva-Antunes et al., 2006).

<b>A. Esteres</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>
Acetato de etilo	
Tiglato de etilo	
Butirato de butilo	
Hexanoato de etilo	
Acetato de hexilo	
Tiglato de propilo	
Benzoato de metilo	

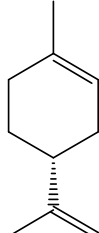
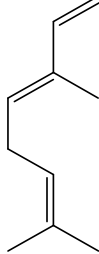
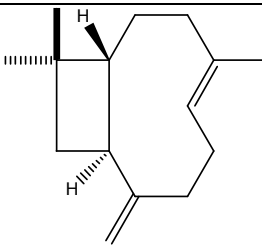
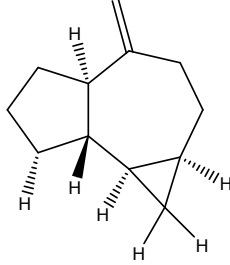
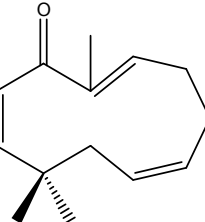
**Cuadro 2.** Compuestos volátiles detectados en *Spondias purpurea* (continuación).

<b>A. Esteres</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>
<i>n</i> -Butil-tiglato	
Salicilato de metilo	
<b>B. Aldehídos</b>	
<i>trans</i> -2-Pentalenal	
Hexanal	
<i>trans</i> -2-Hexenal	
Heptanal	
2, 4-Hexadienal	

**Cuadro 2.** Compuestos volátiles detectados en *Spondias purpurea* (continuación).

<b>B. Aldehídos</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>
2-Heptenal	
Benzaldehído	
<b>C. Alcoholes simples y cetonas</b>	
3-Hexen-1-ol	
2-Hexen-1-ol	
Hexanol	
1-Octen-3-ol	
Etil vinil cetona	
Acetofenona	

**Cuadro 2.** Compuestos volátiles detectados en *Spondias purpurea* (continuación).

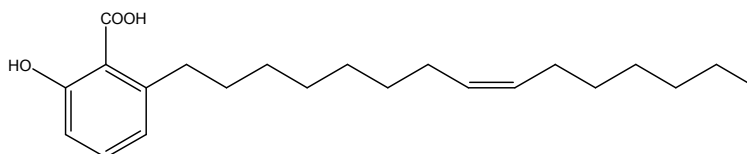
<b>D. Terpenoides</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>
Limoneno	
<i>trans</i> -β-Ocimeno	
( <i>E</i> )-Cariofileno	
Aromadendreno	
α-Humuleno	

## 2.3. Los ácidos anacárdicos

### 2.3.1. Generalidades

En la última década, el desarrollo de mejores métodos de aislamiento así como la investigación de nuevas fuentes naturales, ha permitido que compuestos como los ácidos anacárdicos sean investigados con mayor profundidad por su importancia en el ámbito químico y biológico (Tyman, 2001). Los ácidos anacárdicos son derivados de ácidos grasos que poseen un residuo de ácido salicílico. La cadena lateral siempre tiene grupos metilenos que pueden contener 1, 2 ó 3 insaturaciones, y puede tener una longitud que varía desde 2 ( $C_2$ ) hasta 21 carbonos ( $C_{21}$ ) (Tyman, 2001; Corthout *et al.*, 1994).

Los ácidos anacárdicos más comunes en la naturaleza poseen cadenas laterales  $C_{13}$ ,  $C_{15}$  y  $C_{17}$ , con monoinsaturaciones en la posición 8' ó 10'. Los  $C_{15}$  generalmente son di o triinsaturados en las posiciones 8', 11' y 8', 11', 14', respectivamente. Todos los compuestos aislados hasta la fecha poseen insaturaciones con configuración Z (*cis*) (Tyman, 2001).



**Figura 3.** Estructura de un ácido anacárdico  $C_{15:1}$  (Tyman, 2001).

### 2.3.2. Nomenclatura

A manera de ejemplo, se ilustrará como nombrar a un ácido anacárdico con una cadena lateral de 15 carbonos ( $C_{15}$ ), comenzando por el nombre sistemático IUPAC :

- Saturado ( $C_{15:0}$ ): ácido 2-hidroxi-6-(*n*-pentadecil)-benzoico
- Monoinsaturado ( $C_{15:1}$ ): ácido 2-hidroxi-6-[(*Z*)-pentadec-8'-enil]-benzoico
- Diinsaturado ( $C_{15:2}$ ): ácido 2-hidroxi-6-[(*Z,Z*)-pentadec-8',11'-dienil]-benzoico

- Triinsaturado (C<sub>15:3</sub>): ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z,Z)-pentadec-8',11',14'-trienil]-benzoico

Sin embargo, para no utilizar nombres tan largos, se puede utilizar la misma terminología que en los ácidos grasos, utilizando por ejemplo, para un ácido anacárdico con una cadena lateral de 15 carbonos: (C<sub>15:0</sub>), (C<sub>15:1</sub>), (C<sub>15:2</sub>) y (C<sub>15:3</sub>) para cadenas saturadas, monoinsaturadas, diinsaturadas y triinsaturadas respectivamente. Si se desea indicar la posición de la doble ligadura, pueden denotarse como 8'Z (C<sub>15:1</sub>); 8'Z, 11'Z (C<sub>15:2</sub>); 8'Z, 11'Z, 14'Z (C<sub>15:3</sub>).

Otra forma de nombrarlos, es designando la posición de la doble ligadura con el símbolo ω (omega), seguido del numero de la posición en donde se encuentre, comenzando por el final de la cadena lateral hasta el anillo bencénico, por ejemplo un ácido anacárdico 10Z (C<sub>17:1</sub>) sería un C<sub>17:1</sub> (ω-5) (Tyman, 2001).

### 2.3.3. Los ácidos anacárdicos en la naturaleza

Los ácidos anacárdicos están ampliamente distribuidos en muchas familias botánicas y biológicas. En la última década se han revelado muchas nuevas fuentes naturales de éstos compuestos, por ejemplo, especies de la familia Anacardiaceae como *Anacardium occidentale* (nuez de la India), *Pistachia vera* (pistache) y *Spondias mombin*; de la familia Miristicaceae como *Kneama elegans*, de la familia Geraniaceae como *Pelargonium x hortorum*, de la familia Ginkgoaceae como el *Ginkgo biloba* y Basidiomicetos como *Merilius* ssp (Tyman, 2001). Los ácidos anacárdicos son biosintetizados mediante la condensación de un ácido graso con tres moléculas de malonil-coenzima A, seguida de deshidratación e hidrólisis para formar el anillo aromático (Corthout *et al.*, 1994).

### 2.3.4. Actividad biológica

Entre todas las actividades biológicas que presentan los ácidos anacárdicos, la actividad antimicrobiana ha sido la más estudiada. Se ha encontrado que el potencial antibacteriano de estos compuestos no depende del número de insaturaciones que posean en la cadena lateral, sin embargo, la longitud de la cadena sí juega un rol importante.

Se ha reportado que diversos ácidos anacárdicos ( $C_{15:3}$ ,  $C_{15:2}$  y  $C_{12:0}$ ) aislados de *Anacardium occidentale* y de *Ozoroa mucronata* resultaron activos frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del orden de 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , así como frente a *Streptococcus mutans* con CMI de 1.56  $\mu\text{g/mL}$ . Así mismo, se observó que estos ácidos fueron capaces de potenciar la actividad antibacteriana de la meticilina cuando se probaron en combinación (Kubo *et al.*, 2003).

Por otra parte, se encontró que una mezcla de ácidos anacárdicos aislados de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) presenta potente actividad antibacteriana (CMI= 10  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *Helicobacter pylori*, agente causante de la gastritis crónica y úlcera péptica (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Se han descrito productos formulados con diversos compuestos fenólicos derivados de *Anacardium occidentale*, incluyendo ácidos anacárdicos, que han resultado efectivos contra *Propionibacterium acnes*, agente bacteriano responsable del desarrollo del acné (Kubo *et al.*, 1994).

Recientemente, se estudiaron las sales de ácidos anacárdicos con aminas y aminoácidos, como ingredientes en formulaciones de productos comerciales, por ejemplo cosméticos, por sus propiedades tensoactivas, antibacterianas, absorbentes de luz UV y contraírritantes (Tyman, 2001).

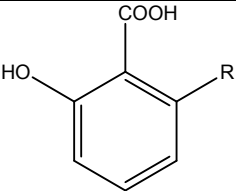
La capacidad antimicrobiana de los ácidos anacárdicos se debe, primeramente, a que actúan como tensoactivos, causando así el colapso de la membrana celular; también se cree que son inhibidores de la cadena respiratoria bacteriana, ya que debido a su carácter anfipático entran a la membrana lipídica en donde se encuentran embebidas la cadena transportadora de electrones y las ATPasas (Kubo *et al.*, 2003). En segunda instancia, se ha reportado que estos ácidos presentan alta selectividad por  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  lo que implica que disminuyen la disponibilidad de estos iones esenciales para las bacterias (Nagabhushana *et al.*, 1995). También se reporta que los ácidos anacárdicos tienen la capacidad de inhibir enzimas bacterianas como la  $\beta$ -lactamasa y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Coates *et al.*, 1994; Murata *et al.*, 1997).



Otra actividad que presentan los ácidos anacárdicos o sus derivados como el cardanol (producto de la descarboxilación) es la antitumoral, encontrándose en el *Ginkgo biloba* estos tipo compuestos (Itokawa *et al.*, 1989).

En la especie *Spondias mombin* (Anacardiaceae), existe una mezcla de ácidos anacárdicos que presentan potente actividad antibacteriana (del orden de 3-25  $\mu\text{m/mL}$ ) frente a *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* y *Mycobacterium fortuitum* (Corthout *et al.*, 1994). En el siguiente cuadro se muestra la estructura de estos ácidos, de los cuales el 1 y 2 presentan la mejor actividad.

**Cuadro 3.** Ácidos anacárdicos encontrados en *Spondias mombin* (Corthout *et al.*, 1994).

	
1	R= C <sub>17:3</sub> ( $\omega$ -3, 6, 9)
2	R= C <sub>17:2</sub> ( $\omega$ -6, 9)
3	R= C <sub>17:1</sub> ( $\omega$ -7)
4	R= C <sub>19:1</sub> ( $\omega$ -7)
5	R= C <sub>21:1</sub> ( $\omega$ -6)

## 2.4. Microextracción en fase sólida (SPME)

### 2.4.1. Generalidades

La microextracción en fase sólida o solid-phase microextraction (SPME) es una técnica relativamente nueva que ofrece diversas ventajas en los análisis cromatográficos cualitativos y cuantitativos de analitos inmersos en matrices complejas, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas. La SPME consta de dos etapas: a) la adsorción de los compuestos presentes en la matriz a una capa gruesa de

silicón o algún otro material adsorbente, y b) la transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico ya sea de líquidos o de gases (Hinshaw, 2003).

La SPME ha tenido muchísimas aplicaciones, entre las que se reportan el análisis de esencias florales, agentes químicos tóxicos, impurezas en productos farmacéuticos, plaguicidas organoclorados en téis chinos, compuestos volátiles en quesos, volátiles fenólicos en vinos, contaminantes ambientales en muestras de agua, aminas alifáticas en el aire, entre otras (Hinshaw, 2003).

Esta innovadora técnica de análisis ofrece importantes ventajas como disminuir o eliminar el uso de disolventes, además de ser rápida, económica y versátil (Hinshaw, 2003; Vas y Vékey, 2004).

#### **2.4.2. Fundamentos**

La microextracción en fase sólida se basa en la extracción de solutos de una muestra a una pequeña fibra adsorbente. Después del periodo de extracción, en el que se ha alcanzado un equilibrio, los solutos adsorbidos son transferidos a la fase móvil líquida o gaseosa del sistema cromatográfico para ser analizados. El éxito de la técnica depende de las condiciones elegidas que favorezcan la adsorción de los solutos así como de las condiciones para que sean separados de la superficie sólida lo más completa y rápidamente posible para el análisis cromatográfico (Hinshaw, 2003).

Los métodos convencionales de análisis cuantitativo se basan en la extracción completa de los analitos de interés de la muestra, la SPME no funciona de esta forma ya que en ésta técnica la cantidad extraída de analito por la fibra es proporcional a la concentración del compuesto en la muestra (Vas y Vékey, 2004). Para elegir el mejor sistema de extracción, es necesario identificar las variables que puedan influir en éste:

- Características de la matriz: puede ser gaseosa (*v. gr.* aire interior, atmósfera, insecticidas, etc.), líquida (*v. gr.* agua potable, jugo, sangre, vino, etc.) o sólida (*v. gr.* queso, tabaco, flores, frutas, medicamentos, etc.). Se debe definir si la matriz es simple o compleja; una matriz simple es aquella

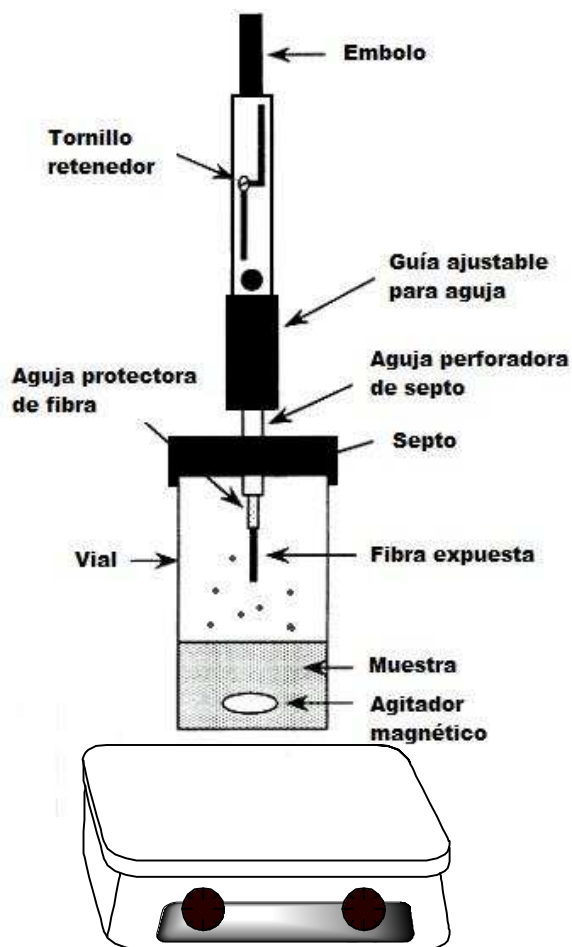
que tiene bajo contenido de compuestos orgánicos totales, por ejemplo agua para beber, y una matriz compleja es aquella que tiene una mayor variación en el contenido de compuestos orgánicos totales, pH, o que contenga lípidos ó proteínas, por ejemplo fluidos biológicos (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).

- Método de extracción: como en esta técnica se emplean viales para contener la muestra a analizar, se debe elegir el método de extracción que se va a emplear, el cual puede ser por espacio de cabeza (headspace), en el que el medio entre la fibra y la muestra es el aire, o por inmersión directa de la fibra. Para compuestos volátiles, el método recomendando es por espacio de cabeza, seguido de análisis por CG-EM. Por otro lado, los compuestos polares no volátiles, se deben extraer por inmersión directa para analizarlos posteriormente por CG ó CLAE (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- Tiempo: éste parámetro es crítico para la SPME, si se varía el tiempo de exposición de la fibra durante la extracción, variará la concentración de los analitos adsorbidos en ésta, hasta que se alcanza un equilibrio (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- Temperatura: éste parámetro también afecta el equilibrio durante la extracción. Si se incrementa la temperatura, se cambiará el equilibrio de distribución de los analitos entre la muestra y el espacio de cabeza, resultando un cambio en la concentración de analitos en la fibra, por ello se debe establecer la temperatura óptima antes de exponer la fibra (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- Tipo de fibra: Los materiales adsorbentes que se utilizan para recubrir las fibras son principalmente polidimetilsiloxano (PDMS), PDMS-divinilbenceno (PDMS-DVB), poliacrilato, carboxen-PDMS, carbowax, entre otros. Dependiendo del grosor de la película y de la composición de ésta, la fibra puede tener características polares, no polares o bipolares y puede ser utilizada en CG ó CLAE ó ambas. La fibra se debe limpiar antes de la

extracción para remover cualquier contaminante presente (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).

- Agitación: Por lo general la agitación de la muestra se hace por medio de agitadores magnéticos o por sonicación. Cuando la muestra es agitada, el equilibrio se alcanza más rápido (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- Otros parámetros: para mantener la precisión y reproducibilidad en el análisis, los parámetros anteriores y otros como pH, fuerza iónica, volumen de muestra así como las condiciones para la desadsorción deben mantenerse constantes (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).

En la Figura 4 se esquematiza una microextracción en fase sólida de volátiles en una muestra líquida o sólida por el método de espacio de cabeza.



**Figura 4.** Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza (headspace).

### III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde el descubrimiento de la penicilina y su posterior introducción al mercado, los antibióticos han sido la piedra angular contra las infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso inapropiado, la prescripción empírica y la interrupción del tratamiento contra las infecciones han originado el incremento de bacterias patógenas resistentes a ellos como un mecanismo de defensa y estrategia de supervivencia. La flora de la cavidad oral está compuesta por bacterias, hongos y levaduras. De estos microorganismos, las bacterias representan la mayor parte. En la boca se han identificado aproximadamente 350 especies de bacterias, éstas pueden residir en la cavidad como parte de la flora común o pueden ser patógenas causando enfermedades orales, repercutiendo negativamente en la calidad de vida de las personas que las padecen.

La Organización Mundial de la Salud define a las enfermedades orales como aquellas que afectan el estado de la boca, es decir, la lengua, los dientes y las glándulas salivales. De manera general, las caries y la periodontitis son los padecimientos más representativos, ocasionados por una alimentación desordenada, elevada ingesta de alimentos ricos en azúcares y una deficiencia en la higiene oral, entre otros factores.

A pesar de los avances en materia de salud oral, todavía existen serios problemas dentales y periodontales que aquejan a la población mundial, principalmente en grupos no privilegiados de países desarrollados y en vías de desarrollo. Por ello resulta evidente la necesidad de investigar de manera exhaustiva nuevos remedios para estos padecimientos, explotando la amplia biodiversidad vegetal que se tiene en México así como la extensa medicina tradicional mexicana.

El ciruelo rojo (*Spondias purpurea* L.) es conocido en la medicina tradicional de nuestro país como remedio para tratar problemas dentales y periodontales por su actividad antibacteriana. Por lo mencionado con anterioridad, el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en aislar compuestos con

actividad antibacteriana a partir del ciruelo rojo que actúen contra bacterias patógenas de la cavidad oral.

Para cumplir con este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i) Realizar el estudio químico biodirigido del extracto de los huesos de *Spondias purpurea*, por medio de técnicas fitoquímicas convencionales.
- ii) Determinar la estructura molecular de los compuestos bioactivos con la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- iii) Evaluar el potencial antibacteriano de estos compuestos utilizando *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* como microorganismos de prueba.

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Procedimientos Generales

#### 4.1.1. Análisis Cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica y preparativa se realizaron sobre placas de aluminio de diversas dimensiones y de vidrio de 20 x 20 cm, recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck, con un espesor de película de 0.25 y 1 mm respectivamente, utilizando diversos sistemas de elución. Las placas se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con una solución de anisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, o bien con Sephadex LH-20, empacado en columna de vidrio (5 x 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución.

#### 4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN<sup>1</sup>H 400 MHz) y de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C, 100 MHz) se generaron en el equipo Varian modelo VNMRS, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente y tetrametilsilano como referencia para los desplazamientos químicos expresados en ppm. Los espectros de masas por impacto electrónico de 70 eV se obtuvieron con el equipo LECO modelo Pegasus 4D con analizador másico TOF (Tiempo de Vuelo), por introducción en cromatógrafo de gases (CG-EM) marca Agilent modelo 6890N con una columna capilar DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón) de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro interno con un espesor de película de 0.18 µm.



Los puntos de fusión fueron determinados en el equipo Fisher-Johns y se reportan sin corrección.

#### **4.2. Material vegetal**

Los frutos y hojas de *Spondias purpurea* se recolectaron en el estado de Morelos, en el pueblo de Amatlán, Municipio de Tepoztlán. La especie fue identificada por el Dr. Salvador Pérez de la Facultad de Química UAQ y una muestra de referencia se depositó en el Herbario de Querétaro (QMEX) con la clave de acceso PS-01.

#### **4.3. Estudio Fitoquímico de *Spondias purpurea*.**

##### **4.3.1. Obtención del extracto total de los huesos de *S. purpurea*.**

El material vegetal fresco (665.4 g de huesos) se trató con 700 mL de MeOH durante un día para eliminar la humedad. Posteriormente los huesos se fragmentaron en un molino de cuchillas Willey modelo 4 y se sometieron a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente con 1 L de mezcla de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 por 72 horas. Los extractos orgánicos se combinaron y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 10 g de un extracto total de apariencia viscosa anaranjado oscuro.

##### **4.3.2. Fraccionamiento primario del extracto total de los huesos de *S. purpurea*.**

El extracto total (10 g) se sometió a un proceso de partición con hexano/metanol-agua (50:45:5), obteniendo una fracción hexánica de 1.9411 g (F<sub>1</sub>). Posteriormente se realizó otra partición del extracto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obteniendo una fracción de 1.2585 g (F<sub>2</sub>). Finalmente el extracto se sometió a una última partición con acetato de etilo obteniendo una fracción de 1.2783 g (F<sub>3</sub>). Las tres fracciones fueron analizadas por CCF.

##### **4.3.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F<sub>1</sub>.**

La fracción F<sub>1</sub> presentó una CMI frente a *S. mutans* menor a 1000 µg/mL. Esta fracción se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una CCA

empacada con 100 g de gel de sílice utilizando como fase móvil un gradiente de Hex→AcOEt. Mediante este proceso se generaron 70 fracciones que se reunieron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose cuatro fracciones secundarias ( $F_{1-1}$ ,  $F_{1-2}$ ,  $F_{1-3}$  y  $F_{1-4}$ ).

**Cuadro 4.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción  $F_1$ .

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hex	100	1-5
Hex-AcOEt	95:5	6-9
Hex-AcOEt	90:10	10-16
Hex-AcOEt	85:15	17-37
Hex-AcOEt	80:20	38-46
Hex-AcOEt	75:25	47-53
Hex-AcOEt	70:30	54-58
Hex-AcOEt	50:50	59-67
AcOEt	100	68-70

La fracción  $F_{1-2}$  (214.3 mg) se sometió a una cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 (5 x 30 cm), utilizando un gradiente de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$ . De este proceso resultaron 6 fracciones ( $F_{1-2-1}$ - $F_{1-2-6}$ ). Posteriormente se realizó una CCF de tipo preparativa de la fracción  $F_{1-2-5}$  (fase móvil Hex-AcOEt-HCOOH 80:20:2) que permitió obtener 14.4 mg de un residuo sólido de color blanco que se identificó como  $\beta$ -sitosterol (**1**).

La fracción  $F_{1-4}$  (598.9 mg) se fraccionó de manera adicional en una CCA con 100 g de gel de sílice, empleando un gradiente de elución de Hex→AcOEt y se generaron 30 fracciones que por su similitud cromatográfica se reunieron en cinco fracciones terciarias ( $F_{1-4-1}$  -  $F_{1-4-5}$ ).

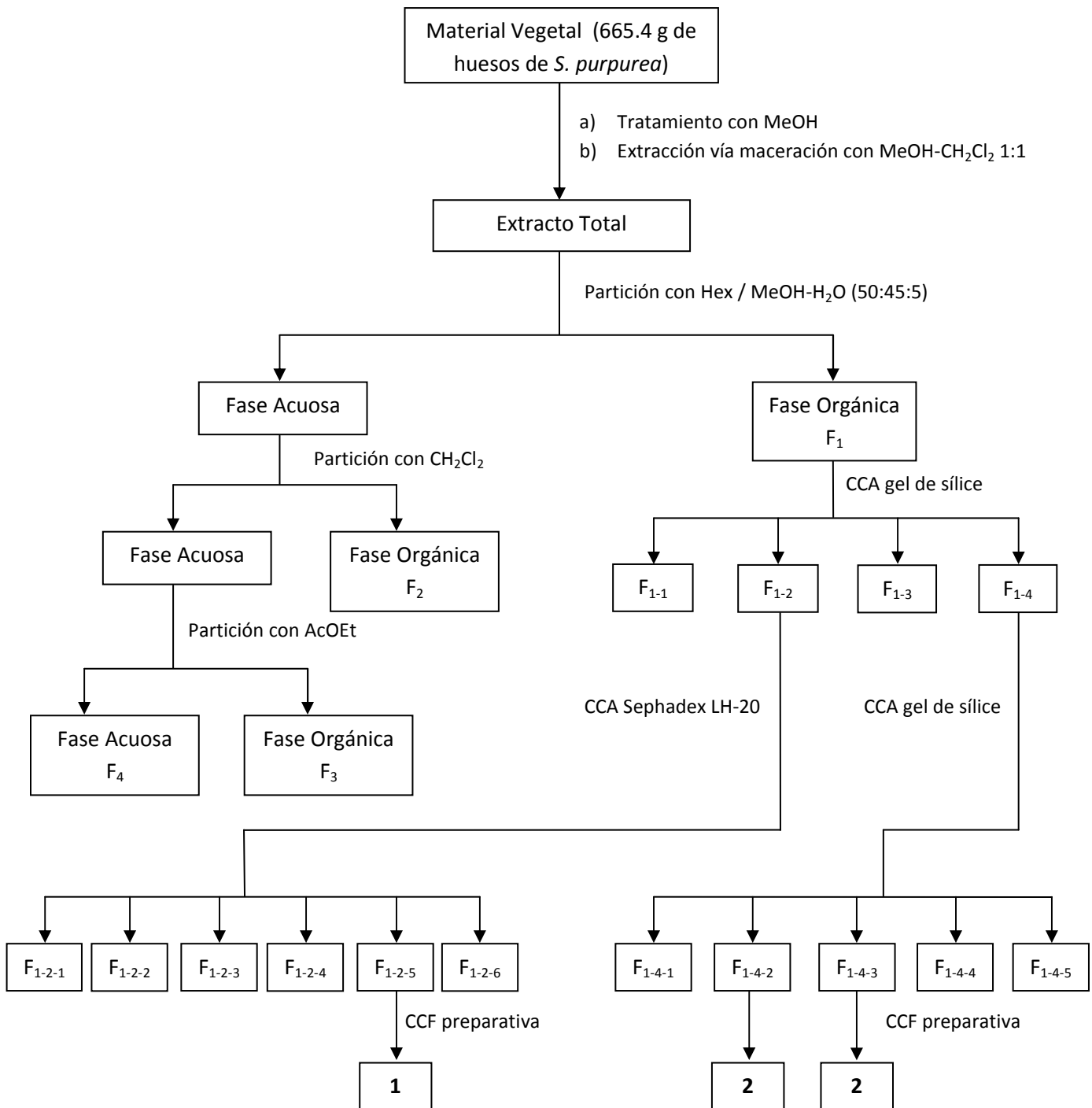
**Cuadro 5.** Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F<sub>1-4</sub>.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hex-AcOEt	70:30	1-6
Hex-AcOEt	60:40	7-13
Hex-AcOEt	50:50	14-19
Hex-AcOEt	40:60	20-23
Hex-AcOEt	30:70	24-26
Hex-AcOEt	20:80	26-30

Las fracciones F<sub>1-4-2</sub> y F<sub>1-4-3</sub> se cromatografiaron mediante CCF de tipo preparativa por separado (fase móvil Hex-AcOEt-HCOOH 75:25:2) y se logró aislar 96.3 mg de un residuo blanco con apariencia de cera que se identificó como el ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**).

El diagrama 1 resume el proceso de obtención y fraccionamiento del extracto de los huesos de *Spondias purpurea*.

**Diagrama 1.** Proceso de obtención y fraccionamiento del extracto de los huesos de *Spondias purpurea*.



#### **4.4. Reacción de metilación del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2).**

Un miligramo del compuesto 2 se disolvió en una mezcla de 1 mL de disulfuro de dimetilo (DMDS) y 1 mL de disulfuro de carbono, posteriormente se adicionaron 1.3 mg de yodo. La mezcla de reacción se calentó a 60°C por un periodo de 40 horas en un vial sellado. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo utilizando una solución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )  $3 \times 10^{-4}$  M. La fracción orgánica fue extraída y evaporada a sequedad. Por último, el producto obtenido se sometió a un análisis por CG-EM (Liu y Abreu 2006).

#### **4.5. Microextracción en fase sólida de los componentes volátiles de las hojas y la pulpa de *S.purpurea***

La microextracción en fase sólida se realizó en el laboratorio de espectrometría de masas de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química.

Inicialmente las fibras utilizadas (Supelco, Fase adsorbente: 50/30 $\mu\text{m}$  DVB/Carboxen/PDMS) se insertaron en el inyector del cromatógrafo (CG-EM), para limpiarlas durante 30 minutos con una temperatura de inyector de 300°C y correr un blanco (Gas acarreador: Helio, Modo: Splitless, Temperatura de Horno: 150°C, aumentando 50°C por minuto hasta 300°C, Barrido de masas: 50-500 uma, Temperatura de la cámara: 200°C). De esta forma se aseguraba que las fibras no tuvieran ningún contaminante que pudiera interferir con el análisis.

Una muestra del material vegetal se colocó en viales de vidrio con septo, agregando 4 mL de agua destilada y 10 mg de cloruro de sodio para favorecer la extracción. Los viales se colocaron en una parrilla de calentamiento con agitación constante. El sistema que contiene la fibra se adaptó con un sujetador y se perforó el septo del vial con la aguja; cuando se llegó a 50°C, se bajó el émbolo y la fibra fue expuesta para comenzar la microextracción por el método de espacio de cabeza (Figura 4) manteniendo la temperatura en un rango de 50-70°C durante un periodo de tiempo determinado. En el siguiente cuadro se describen las

condiciones bajo las cuales se realizó la microextracción de los componentes volátiles tanto de las hojas molidas como de la pulpa de *S. purpurea*.

**Cuadro 6.** Condiciones para la microextracción de volátiles presentes en *S. purpurea*.

Vial	Material vegetal	Peso (g)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo de extracción (h)
1	Hojas	1.2323	50-65	220	1
2	Pulpa	0.2558	50-70	360	1.5

Una vez cumplido el tiempo de extracción, la fibra se retiró y se introdujo inmediatamente en el inyector del cromatógrafo (CG-EM) para realizar el análisis (Temperatura de inyector: 300°C, Modo: Splitless, Temperatura de la columna: 50°C, aumentando 20°C por minuto hasta 300°C, Barrido de masas: 50-500, Temperatura de la cámara: 200°C), y obtener así los cromatogramas y los espectros de masas.

Gracias a esta técnica fue posible conocer la composición cualitativa de los volátiles mayoritarios presentes en los frutos y las hojas de *Spondias purpurea*.

## 4.6. Ensayo Biológico

### 4.6.1. Microorganismos de prueba

Para determinar la actividad antibacteriana del extracto total, fracciones y compuestos aislados de *S. purpurea* se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10499) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por tratarse de los principales patógenos orales causantes de la caries dental y enfermedades periodontales. Para el desarrollo de *S. mutans* se utilizó caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) como medio de cultivo, incubando a 37°C bajo condiciones aerobias. Para desarrollar a *P. gingivalis* el medio de cultivo utilizado fue soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%), incubando a 37°C bajo condiciones anaerobias mediante un sistema de

recipientes de GasPack EZ (BD) conteniendo un sobre activado para la generación de CO<sub>2</sub> (GasPack EZ CO<sub>2</sub>).

#### **4.6.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La actividad antibacteriana se expresó en términos de concentración mínima inhibitoria y se determinó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Los cultivos de cada microorganismo se incubaron por una noche, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos, se lavó 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS pH 6.8) y se resuspendieron con la misma solución. La suspensión celular se ajustó con un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy) de forma que cada pozo contuviera 5x10<sup>5</sup> UFC/mL para *S. mutans* ó 5x10<sup>6</sup> UFC/mL para *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Cada muestra se ensayó por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C bajo las condiciones correspondientes, determinando el crecimiento espectroscópicamente (A<sub>660</sub>) después de 24 y 48 horas con una lectora de placas de 96 pozos.

Como control negativo se utilizó el medio de cultivo inoculado, mientras que el blanco fue el medio de cultivo sin inocular. El control positivo fue el medio de cultivo inoculado con gluconato de clorhexidina.

El valor de CMI para cada microorganismo se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 A<sub>660</sub> nm.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los frutos de *Spondias purpurea* (ciruelo rojo) son comestibles y se consumen a lo largo del país en forma fresca o como conservas. En varios estados de la república, se menciona el empleo del cocimiento de los huesos para enfermedades de origen bacteriano. Debido al uso de los huesos del ciruelo rojo para el tratamiento de infecciones de la cavidad oral en la medicina tradicional de nuestro país, se decidió determinar la actividad antibacteriana de los compuestos mayoritarios de los huesos contra la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y la causante de la gingivitis, *Porphyromonas gingivalis*. El proceso de maceración con una mezcla de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 permitió la obtención de un extracto total de naturaleza viscosa, anaranjado oscuro, con CMI de 512 µg/ml y 256 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente (Cuadro 7). Un extracto vegetal se considera activo contra las bacterias de prueba si presenta una CMI menor a 1000 µg/ml (Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

El extracto total se disolvió en metanol acuoso y fue sometido a un fraccionamiento primario por partición utilizando hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y acetato de etilo, sucesivamente. Como resultado de este proceso se obtuvieron las fracciones de hexano (F<sub>1</sub>), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>), acetato de etilo (F<sub>3</sub>) y de metanol acuoso (F<sub>4</sub>).

La fracción primaria activa F<sub>1</sub> (Cuadro 7) fue sometida a una cromatografía en columna abierta con gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones como fase móvil. De este proceso se obtuvieron 70 fracciones que fueron combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en cuatro fracciones secundarias (F<sub>1-1</sub> a F<sub>1-4</sub>), que también se sometieron al ensayo biológico y se encontró que las fracciones F<sub>1-2</sub> y F<sub>1-4</sub> presentan actividad contra *S. mutans* y *P. gingivalis* (Cuadro 7).



**Cuadro 7.** Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total y las fracciones de *S. purpurea* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Muestra	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Extracto total	512	256
F <sub>1</sub> (hexano)	128	64
F <sub>1-2</sub>	102	51
F <sub>1-4</sub>	204	102
CHX*	3.7	1.2

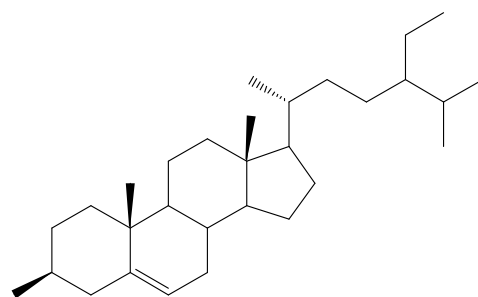
CHX\*: gluconato de clorhexidina

A partir de la fracción F<sub>1-2</sub> se obtuvo por medio de cromatografía en columna abierta al esteroide  $\beta$ -sitosterol (**1**). Por otra parte, de la fracción activa F<sub>1-4</sub> (CMI= 128  $\mu\text{g/ml}$  y 64  $\mu\text{g/ml}$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), se aisló un sólido blanco con apariencia de cera, la identificación de este compuesto (**2**) se explica de manera detallada en el apartado 5.1 de este trabajo.

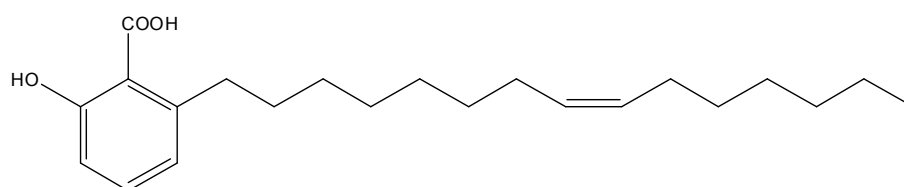
**Cuadro 8.** Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de *Spondias purpurea* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Compuesto	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
$\beta$ -sitosterol ( <b>1</b> )	>1000	>1000
Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico ( <b>2</b> )	35	17.5
CHX*	3.7	1.2

CHX\*: gluconato de clorhexidina



$\beta$ -Sitosterol (1)



Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2)

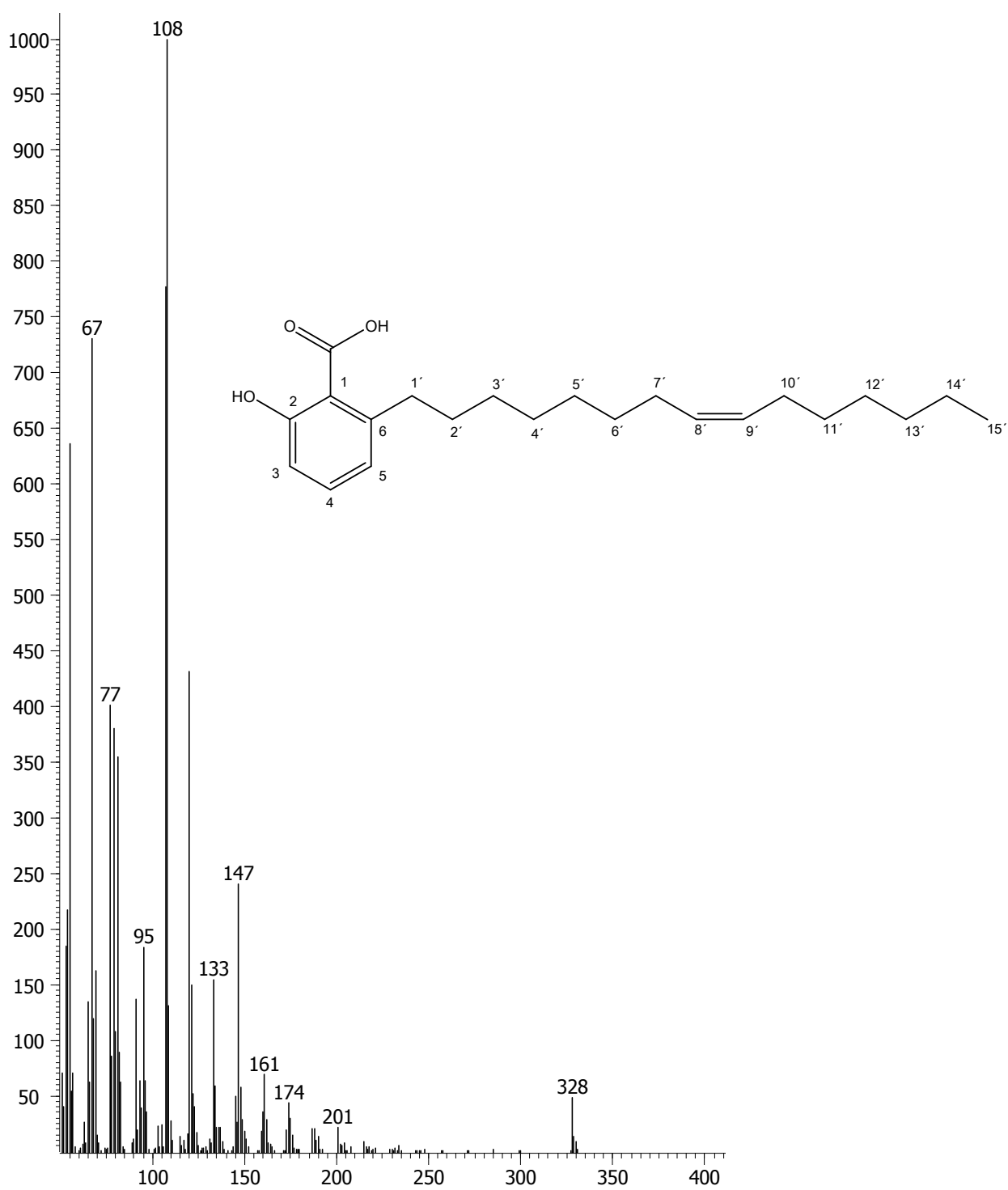
**Figura 5.** Estructuras de los compuestos aislados de *Spondias purpurea*

### 5.1. Caracterización estructural del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2)

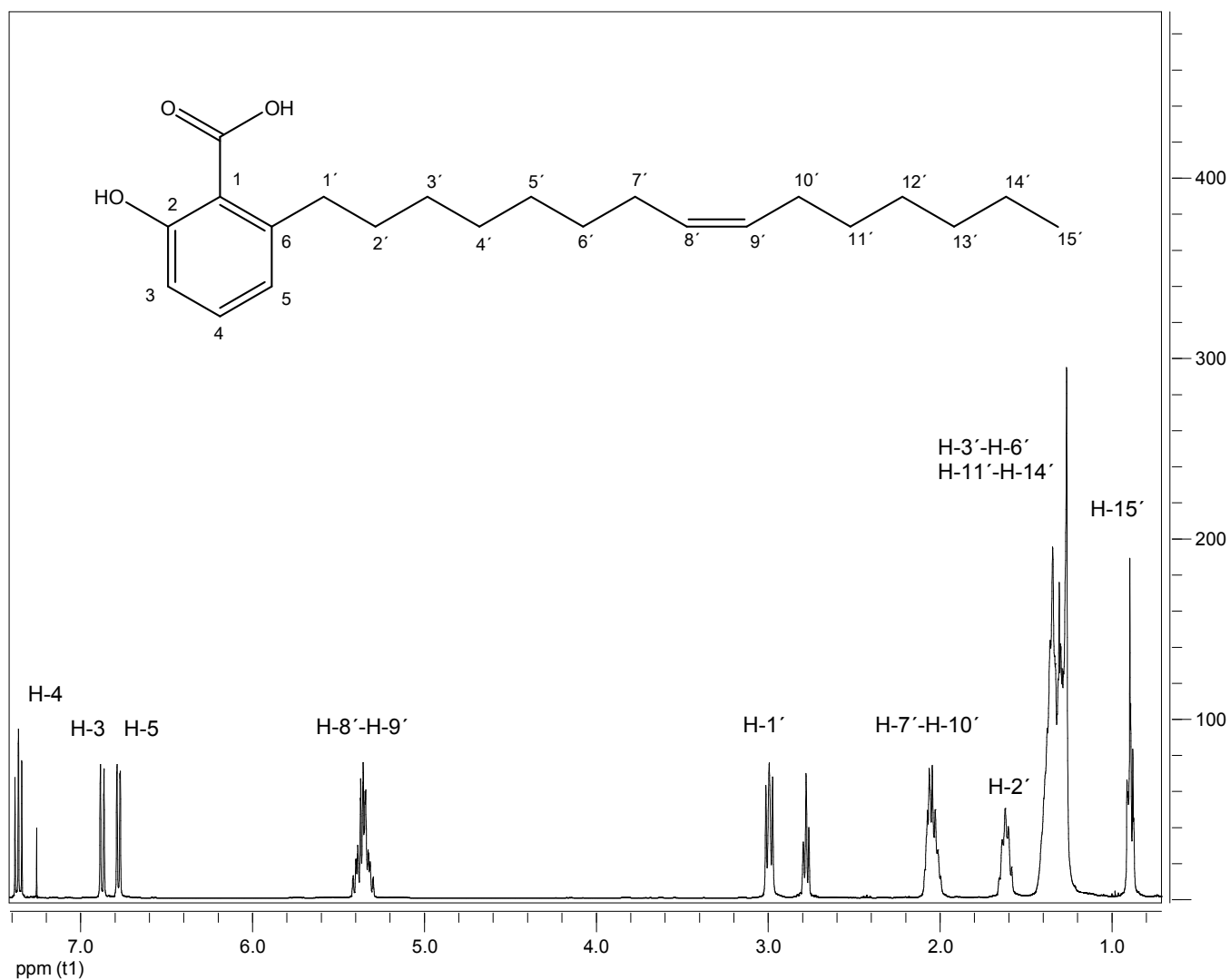
El ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2) se aisló como un sólido blanco con un punto de fusión de 78-80 °C. Las constantes espectroscópicas del compuesto 2 se resumen en el Cuadro 9. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{22}H_{34}O_3$  mediante espectrometría de masas y permite seis insaturaciones. El espectro de masas (Figura 6) no mostró el ión molecular de 346 una sino un fragmento de 328 una resultante de la pérdida de agua [ $M^+ - H_2O$ ]. El espectro al UV presentó un máximo de absorción a 207 nm.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 2 (Figura 7) mostró el perfil típico para los compuestos del tipo de los ácidos anacárdicos (Mata *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2004; Liu y Abreu, 2006) presentando las siguientes señales diagnósticas:

- a) Un sistema ABC para tres hidrógenos aromáticos de un benceno 1, 2, 3 trisustituído. El sistema ABC se observó en  $\delta$  7.36 (*dd*,  $J= 8.0$  Hz, H-4), 6.87 (*dd*,  $J= 8.0, 0.9$  Hz, H-3) y en 6.77 (*dd*,  $J=8.0, 0.9$  Hz, H-5).
- b) Un multiplete centrado en  $\delta$  5.35 que integra para dos protones asignable a una doble ligadura. La forma del multiplete sugiere que la misma tiene una estereoquímica Z (van Beek y Wintermans, 2001).
- c) Un triplete ( $J= 8.0$  Hz) característico para un metileno bencílico centrado en  $\delta$  2.98. Esta señal tiene correlación con el multiplete asignable a H-2' centrado en  $\delta$  1.60 en el espectro de correlación homonuclear COSY (Figura 11).
- d) Una señal que integra para cuatro hidrógenos asignable a dos grupos metileno vecinos a una doble ligadura centrada en  $\delta$  2.03. Esta señal muestra en el espectro COSY una correlación con la señal asignable a los protones vinílicos centrada en  $\delta$  5.35.
- e) Un multiplete que integra para dos protones en  $\delta$  1.60. Esta señal mostró una correlación en el espectro de COSY con la señal para el metileno bencílico en  $\delta$  2.98.
- f) Un multiplete ancho asignable a los protones de los metilenos alifáticos en  $\delta$  1.25–1.36. Esta señal muestra correlaciones en el espectro de COSY con las señales centradas en  $\delta$  2.03, 1.60 y 0.89.
- g) Un triplete ( $J= 7.6$  Hz) característico para un metilo alifático terminal en  $\delta$  0.89. Esta señal muestra una correlación en espectro de COSY con en multiplete en  $\delta$  1.25.



**Figura 6.** Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2).

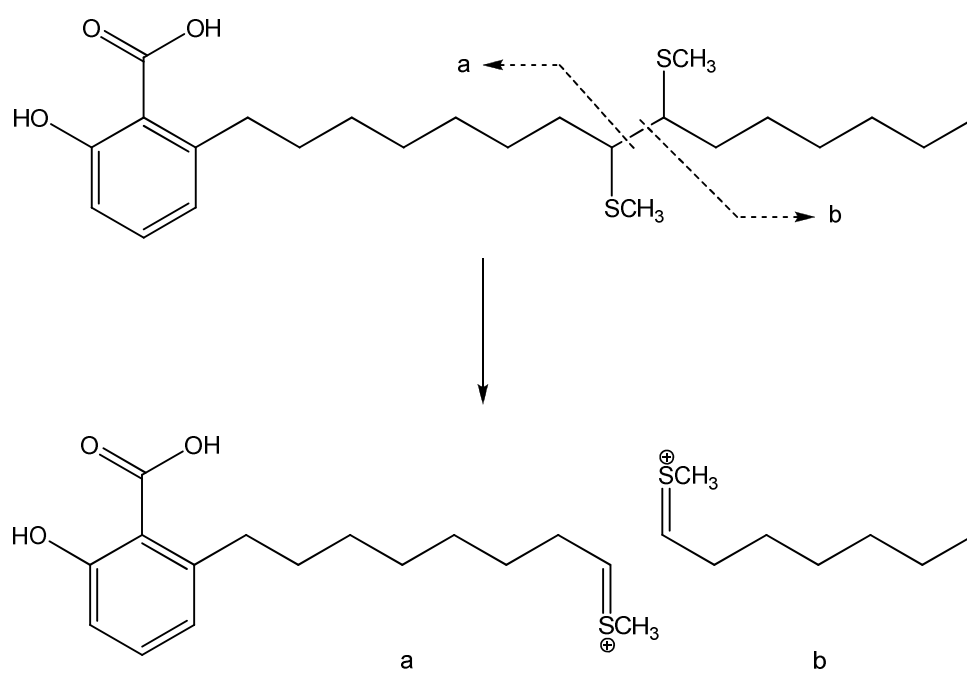


**Figura 7.** Espectro de RMN $^1\text{H}$  del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**).

El espectro de RMN<sup>13</sup>C (Figura 10) mostró el perfil típico para un ácido anacárdico (van Beek y Wintermans, 2001). El análisis detallado del espectro de RMN<sup>13</sup>C modalidad DEPT indicó claramente que las señales correspondían a un metilo, 12 metilenos, cinco metinos y cuatro carbonos cuaternarios. De acuerdo con su desplazamiento químico y multiplicidad, el metilo en  $\delta$  14.05 pertenece a una cadena alifática lineal. Las señales correspondientes a los grupos metileno en  $\delta$  36.45, 31.97, 29.56 y 27.2 se asignaron como sigue: la señal en  $\delta$  36.45 con base en su desplazamiento químico y las interacciones mostradas en el espectro de HSQC (Figura 13) al metileno bencílico (C-1'), la señal en  $\delta$  31.97 se asignó a C-2', la señal en  $\delta$  29.56 a los carbonos C-3'-C-6' y C-11'-C-14', y por último, la señal en  $\delta$  27.2 a C-7' y C-10'. Las señales correspondientes a los grupos metino en  $\delta$  135.44, 122.76 y 115.89 se asignaron a los carbonos aromáticos C-4, C-5 y C-3, respectivamente. Por otro lado, los metinos en  $\delta$  130.17 y 127.98 asignables a los carbonos C-8' y C-9'. Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios en  $\delta$  176.14, 163.63, 147.78 y 110.37 son atribuibles al grupo carbonilo del ácido unido a C-1, y a los carbonos C-2, C-6 y C-1 del anillo aromático, respectivamente.

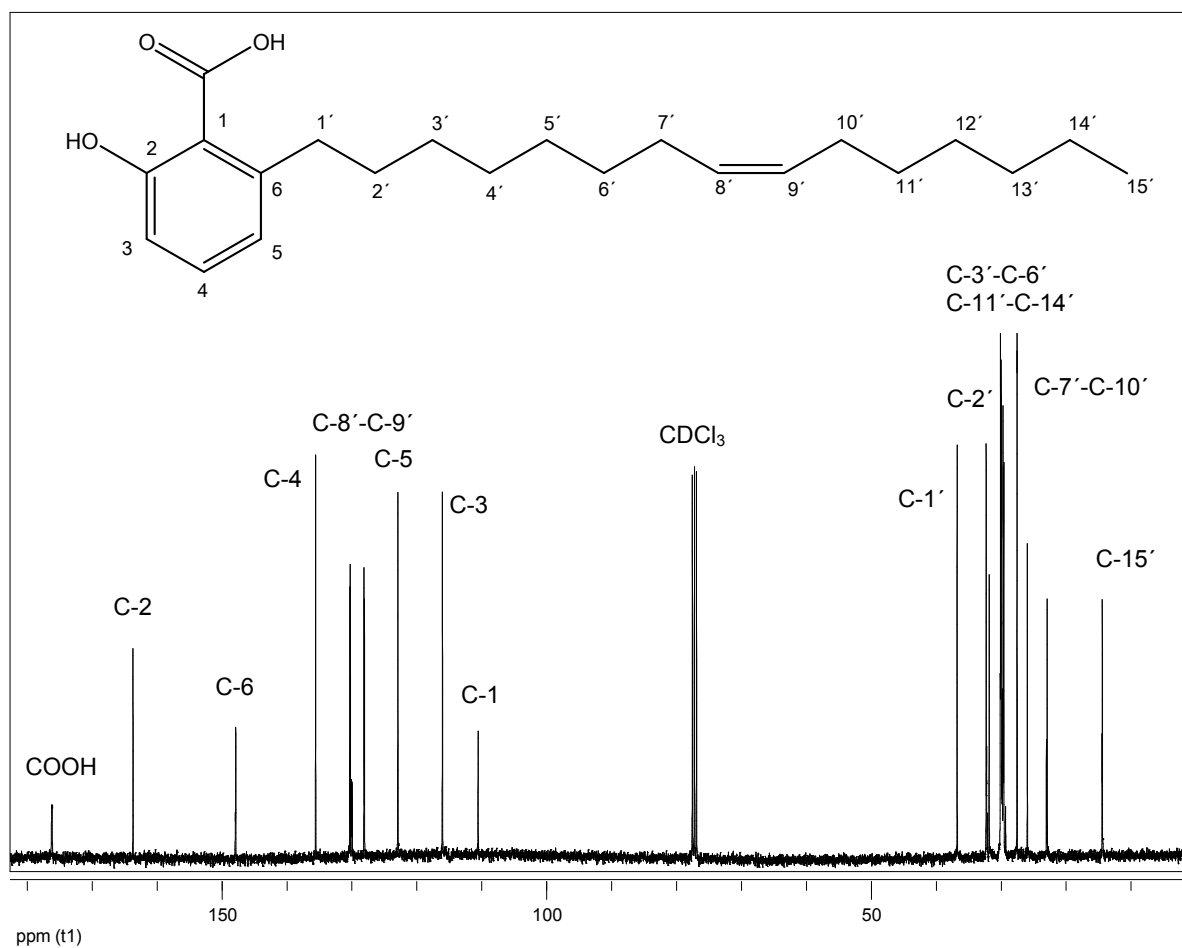
Los elementos estructurales presentados hasta el momento permitieron corroborar la presencia de un ácido anacárdico con una cadena lateral de 15 carbonos y una doble ligadura. La posición de la doble ligadura en la cadena se estableció en base al análisis del espectro de masas del derivado metiltiolado utilizando la metodología descrita por Liu y Abreu (2006). En la figura 9 se muestra el esquema de la reacción de metiltiolación y el patrón de fragmentación esperado para el ácido anacárdico.



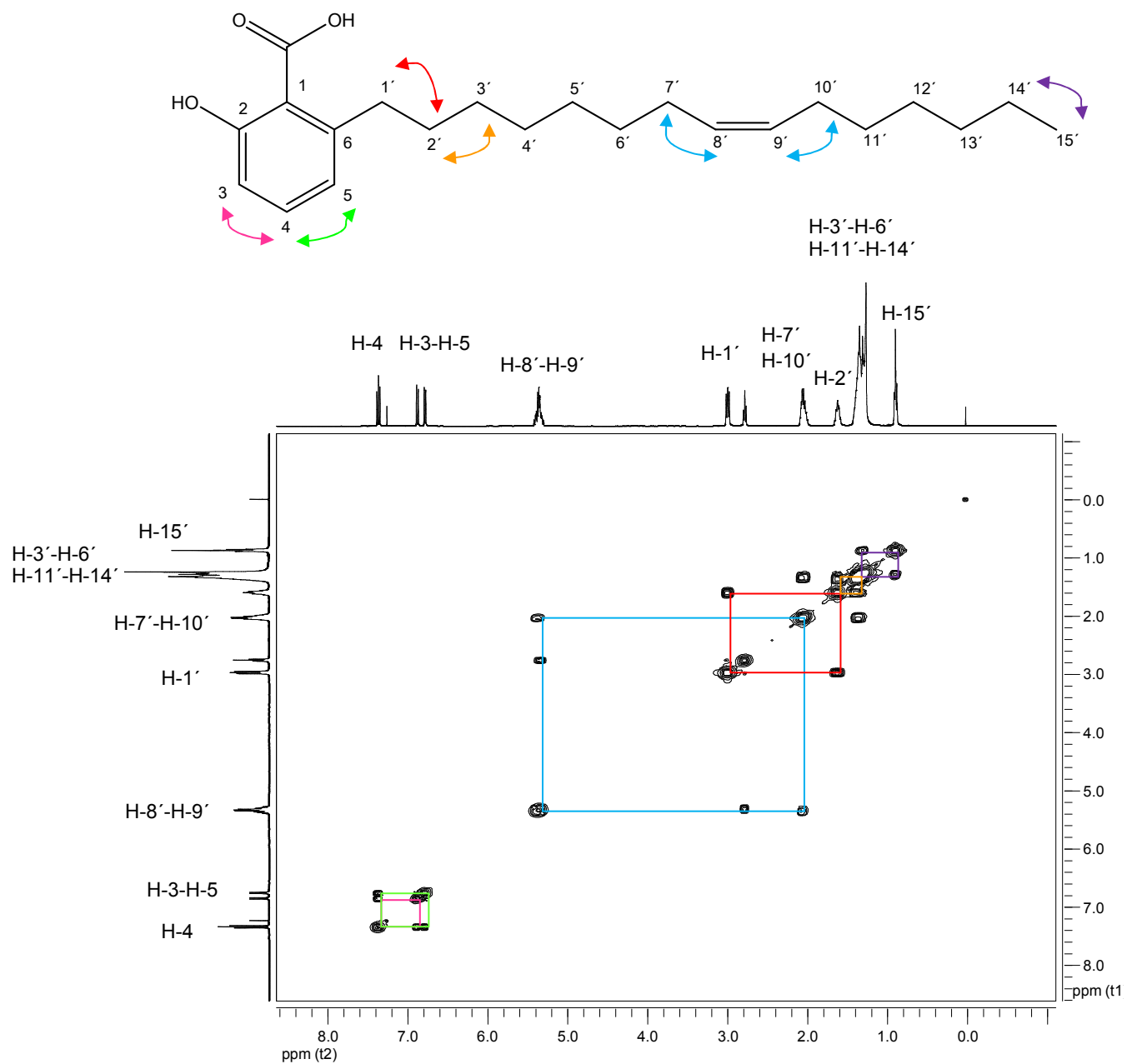


**Figura 9.** Derivado metilolado del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**) y los fragmentos resultantes.

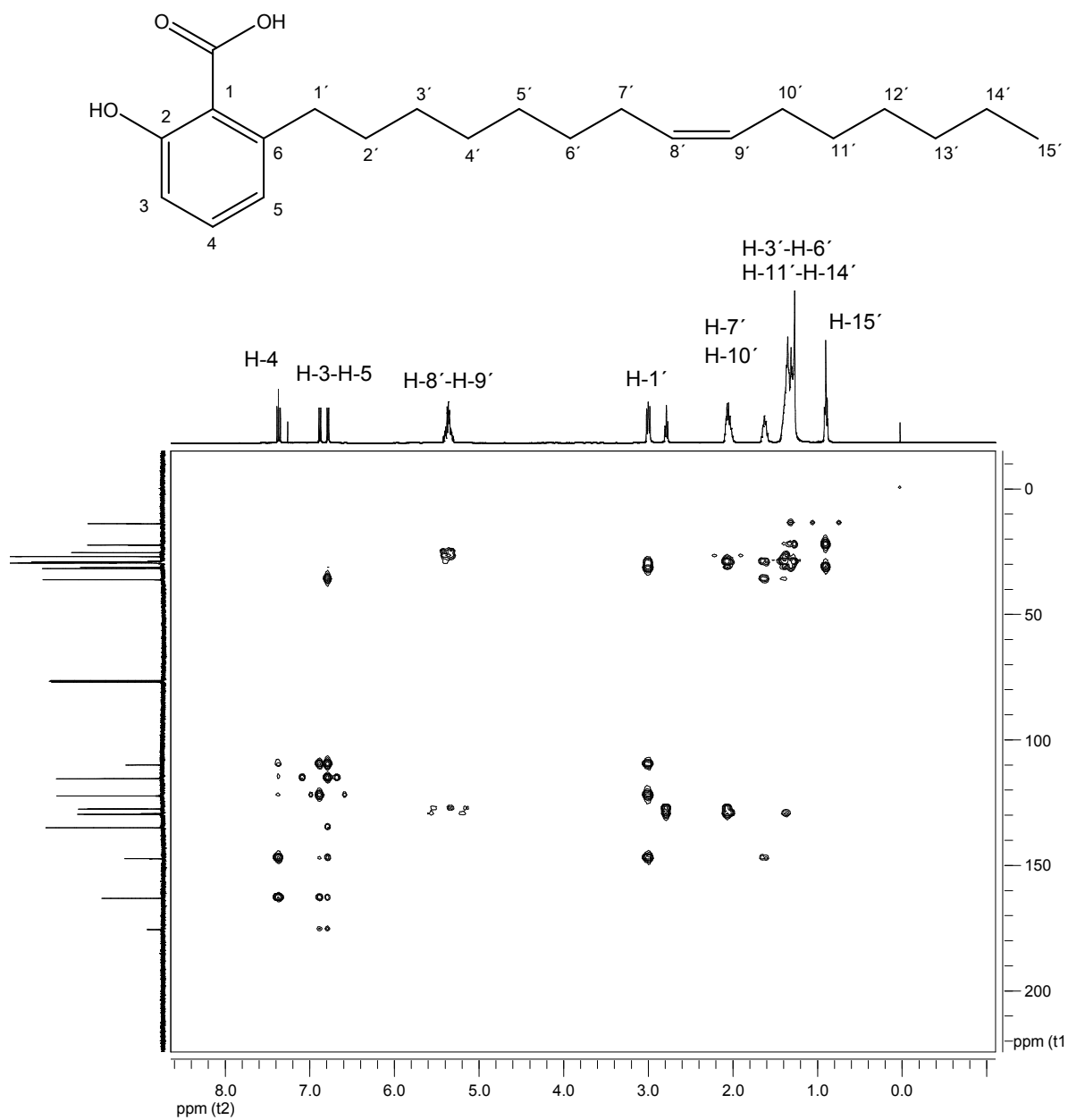




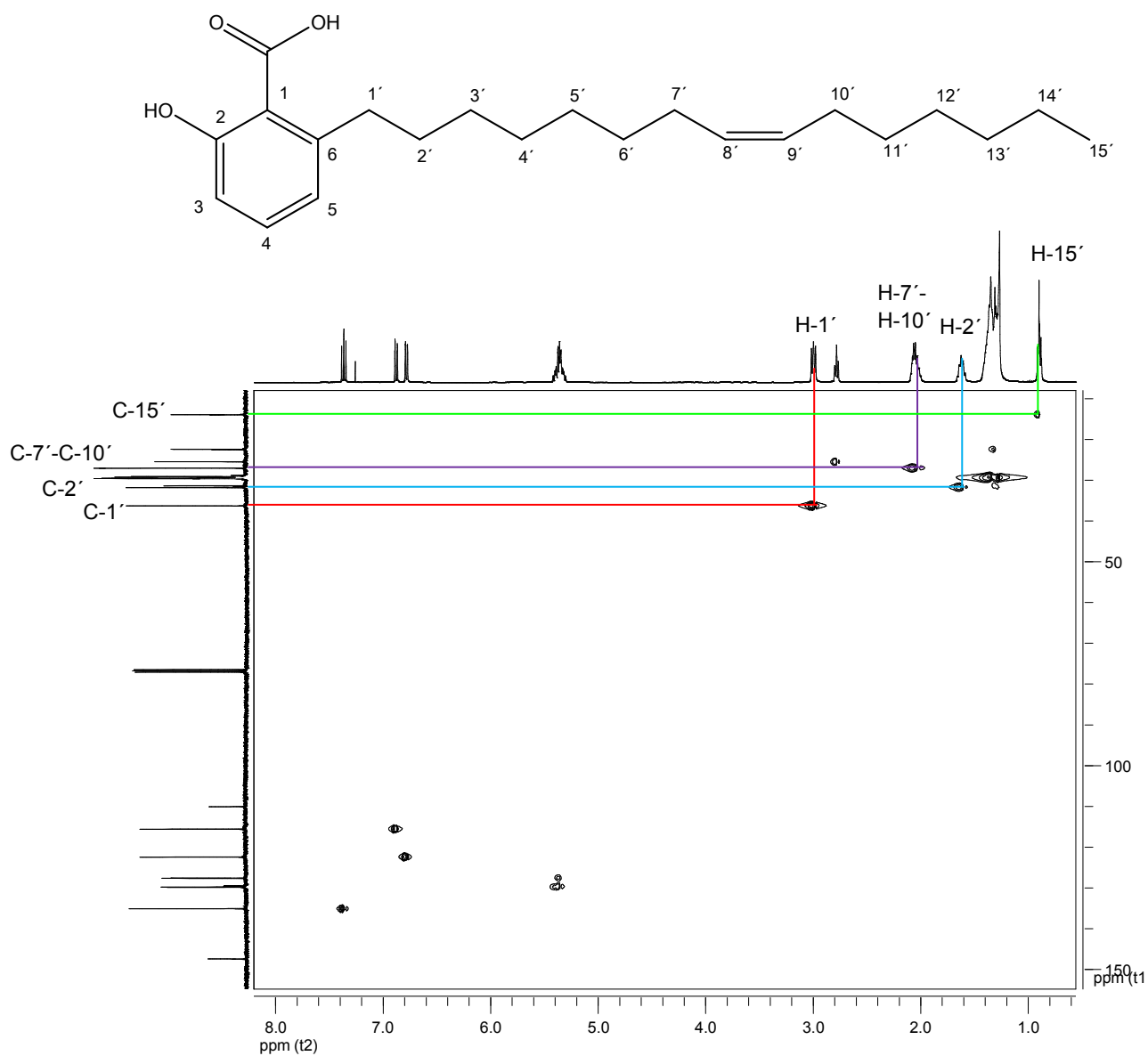
**Figura 10.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**).



**Figura 11.** Espectro COSY del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2).



**Figura 12.** Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2).



**Figura 13.** Espectro de HSQC del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (2).

**Cuadro 9.** Constantes espectroscópicas en las RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para el ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**).

Posición	RMN <sup>13</sup> C δ	RMN <sup>1</sup> H δ
1	110.37	–
2	163.63	–
3	115.89	6.87 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8, 0.9 )
4	135.44	7.36 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =8)
5	122.76	6.77 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8, 0.9)
6	147.78	–
1- <u>C</u> OOH	176.14	–
1'	36.45	2.98 ( <i>t</i> , <i>J</i> =8)
2'	31.97	1.60
3'	29.56	1.25
4'	29.56	1.25
5'	29.56	1.25
6'	29.56	1.25
7'	27.21	2.03
8'	130.17	5.35
9'	127.98	5.35
10'	27.21	2.03
11'	29.56	1.25
12'	29.56	1.25
13'	29.56	1.25
14'	29.56	1.25
15'	14.39	0.89 ( <i>t</i> , <i>J</i> =6.8)

CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H [400 MHz, *J* (Hz), δ en ppm], <sup>13</sup>C [100 MHz, δ en ppm]

## 5.2. Determinación de los compuestos volátiles en los frutos y hojas de *Spondias purpurea* por microextracción en fase sólida (SPME)

La determinación cualitativa de los componentes volátiles presentes en los frutos y hojas de *S. purpurea* se realizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida, seguida de un análisis por CG-EM. El cromatograma de gases resultante del fruto (Figura 13) indicó la presencia de 175 componentes de los cuales 45 son los mayoritarios representando el 67.43 % de la composición total. Por otro lado, el cromatograma resultante de las hojas (Figura 14) indicó la presencia de 172 componentes de los cuales 51 son los mayoritarios representando el 77.52 % del total. Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo. En los cuadros 10 y 11 se enlistan los tiempos de retención y la proporción de los componentes volátiles presentes en el fruto y las hojas respectivamente. Los constituyentes más abundantes en el aceite del fruto fueron benzaldehído, metoximetilbenceno, nonanal,  $\alpha$ -cubebeno y salicilato de metilo. Por otra parte, en el aceite esencial de las hojas los constituyentes mayoritarios fueron 2-hexenal, 6-metil-5-hepten-2-ona, nonanal, cariofileno, eugenol, 3-hexen-1-ol, alcohol bencílico, salicilato de metilo, benzaldehído y ácido hexanoico. Los constituyentes comunes en los aceites esenciales de las hojas fueron el 2-hexenal, nonanal, salicilato de metilo y el cariofileno. De los constituyentes más importantes por sus propiedades biológicas destacan el cariofileno, el salicilato de metilo, el eugenol y nonanal.

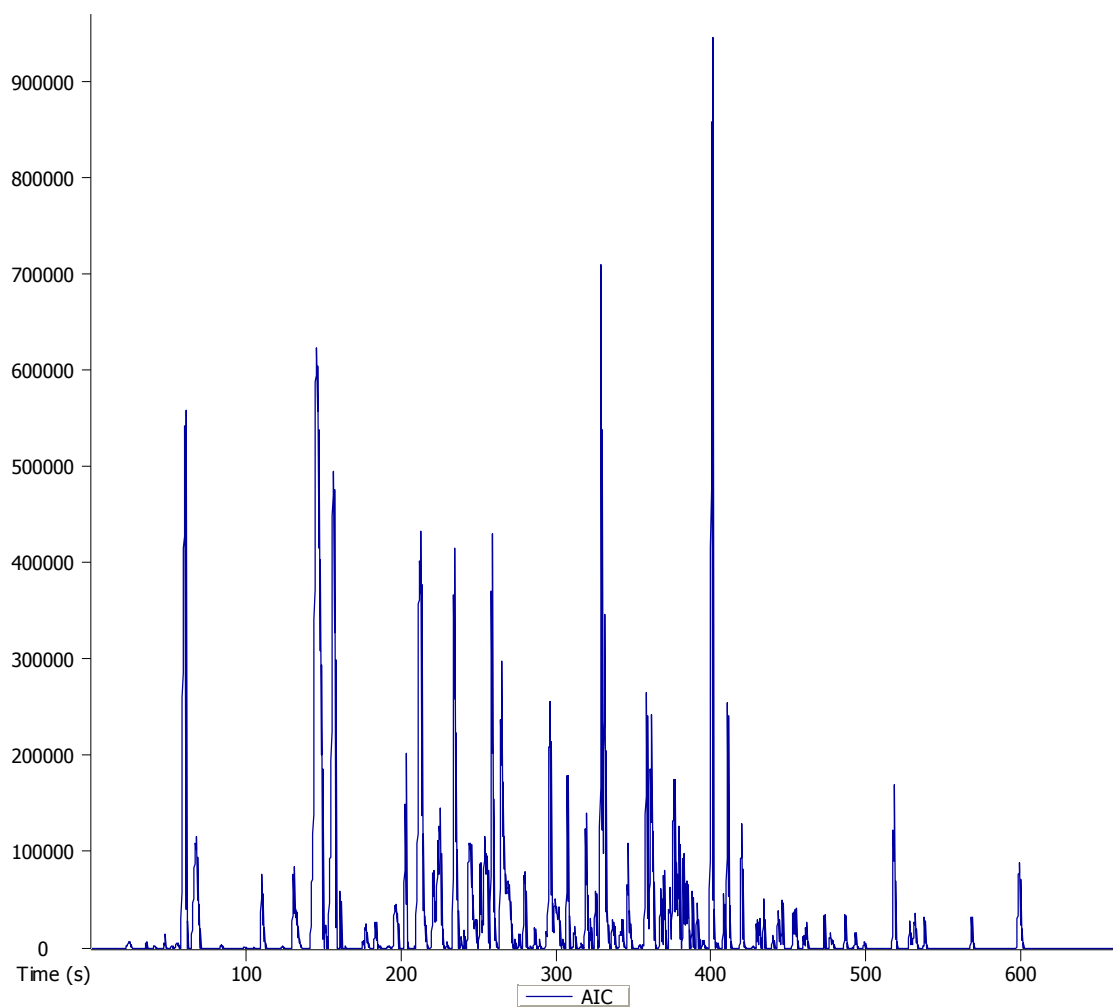
**Cuadro 10.** Principales componentes volátiles presentes en el fruto de *Spondias purpurea*.

Compuesto	Tiempo de retención (s)	Área (%)	Fórmula
2,3-Bis(1-metiletil)- trans-oxirano	68.009	3.354	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O
2-Etilfurano	70.009	0.39349	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O
2-Hexenal	110.109	0.45356	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
Metoxifeniloxima	131.009	0.42352	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
2-Metil-2-butenato de etilo	132.409	0.49378	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Benzaldehído	145.909	5.8193	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O
5H-Tetrazol-5-amina	146.809	4.8777	CH <sub>3</sub> N <sub>5</sub>
Metoximetilbenceno	156.809	8.5867	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O
3-Metilpentanoato de etilo	161.109	1.8951	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
D-Limoneno	175.509	0.020513	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Hemihidrato de 3,3-dimetil-2-oxobutanal	203.609	1.2079	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
2,4-Hexadienoato de etilo	207.609	0.5022	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	211.809	2.4295	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
Nonanal	213.009	2.4576	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O
2-Metil-2-butenato de propilo	225.609	0.68959	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
1,1'-[oxybis(metilen)]bis-benceno	234.609	5.0179	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O
(E,Z)-2,6-Nonadienal	235.909	1.2765	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O
Benzoato de etilo	244.109	0.72744	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
3,7-Dimetil-1-octeno	245.109	0.4119	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>
Octanoato de etilo	253.809	0.63977	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>

**Cuadro 10.** Principales componentes volátiles presentes en el fruto de *Spondias purpurea* (continuación).

Compuesto	Tiempo de retención (s)	Área (%)	Fórmula
Salicilato de metilo	255.909	0.81894	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Decanal	259.109	1.3512	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O
3-piridincarboxilato de etilo	264.809	1.7201	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
3-Isopropiliden-5-metil-hex-4-en-2-ona	265.309	0.81268	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
Geranilviniléter	280.009	0.60038	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O
2-Decanona	295.809	0.78391	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O
(Z)-5-(1-propenil)-1,3-benzodioxol	296.009	0.81288	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
3,7-Dimetil-2,6-octadienoato de metilo	307.609	0.73234	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
Ciclopentaundecanoato de metilo	308.009	0.73849	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
α-Cubebeno	329.209	2.324	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Z,Z,Z-1,4,6,9-Nonadecatetraeno	329.409	2.3386	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>
Butanoato de butilo	329.709	2.3386	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
1-(2,6,6-Trimetil-1,3-ciclohexadien-1-il)- 2-buten-1-ona	331.809	1.182	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O
Cariofileno	346.809	0.27584	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
7,11-Dimetil-3-metilen-1,6,10-dodecatrieno	358.709	0.83908	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Acetato de serverogenina	376.109	0.51525	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno	376.709	1.0435	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
α-Farneseno	378.209	0.29982	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Aromadendreno	391.009	0.20551	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Cis-α-bisaboleno	391.409	0.20551	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
α-Calacoreno	393.109	0.057541	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>
3,7,11-Trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	401.009	3.8931	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
Tridecanoato de metilo	518.309	0.74268	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Ácido n-hexadecanoico	532.009	0.54903	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
4,4'-(1-metiletiliden)bis-fenol	599.209	0.57515	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>





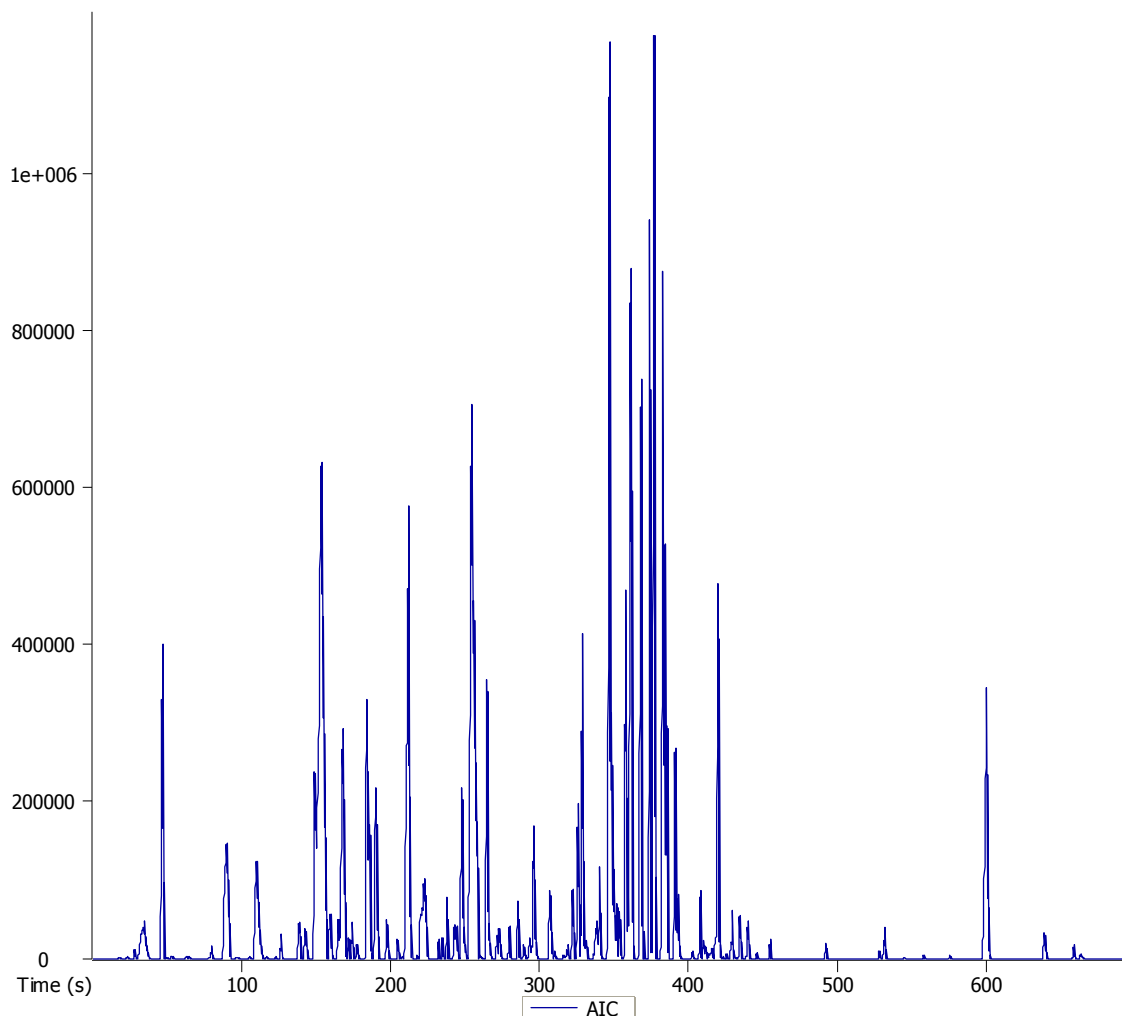
**Figura 14.** Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en los frutos de *S. purpurea*.

**Cuadro 11.** Principales componentes volátiles presentes en las hojas de *Spondias purpurea*.

Compuesto	Tiempo de retención (s)	Área (%)	Fórmula
2-Etilfurano	34.378	0.84324	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O
$\alpha$ -(1-aminoetil)-(R*,R*)-Bencenmetanol	47.678	1.402	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO
2-Metilpiridina	79.878	0.94944	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N
1-(2-Propeniloxi)-(E)-1-propeno	88.278	7.5361	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
2-Hexenal	88.878	6.5651	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
3-Hexen-1-ol	90.678	3.766	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O
3,3'-Oxibis-1-propeno	96.678	1.6513	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
Heptanal	110.378	1.1727	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O
Benzaldehído	143.578	0.99512	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O
3,3-Dimetil-1-tiocianato-2-butanona	152.978	2.1681	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NOS
6-Metil-5-hepten-2-ona	153.678	3.1483	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O
(E)-2-Hexen-4-in-1-ol	154.978	1.9192	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O
Trans-2-(2-pentenil) furano	156.178	0.90863	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
3-Etil-1,4-hexadieno	160.178	1.172	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub>
(E,E)-2,4-Heptadienal	168.278	1.3362	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O
$\alpha$ -Felandreno	174.578	0.38752	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Alcohol bencílico	184.378	1.1626	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O
2-Metil-6-metilen-2-octeno	186.278	1.2458	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>
(Z)-2-(1-pentenil) furano	186.778	0.56455	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
(E)-2-Octenal	190.278	1.1785	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O
1-Acetamido-2-nitroguanidina	190.778	0.67534	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
3,5-Dimetil-1-hexeno	197.878	0.66778	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>
2,6-Bis(diazo) adamantano	210.978	0.49126	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>
Ácido hexanoico	211.878	1.0814	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Nonanal	212.378	2.587	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O
6-Metil-(E)-3,5-heptadien-2-ona	213.178	0.46385	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O
4-Metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol,	248.278	0.56972	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
2-Hidroxibenzoato de etilo	254.278	0.95084	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
Salicilato de metilo	256.578	1.9682	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-carboxaldehído	265.178	0.77831	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
Eugenol	322.478	0.28179	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Ilngano	326.278	0.44046	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\alpha$ -Cubebeno	329.078	0.71769	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Cariofileno	347.378	2.3385	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>

**Cuadro 11.** Principales componentes volátiles presentes en las hojas de *Spondias purpurea* (continuación).

Compuesto	Tiempo de retención (s)	Área (%)	Fórmula
6,10-Dimetil-( <i>E</i> )-5,9-undecadien-2-ona	358.378	0.83678	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O
3,7-Dimetil-1,3,7-octatrieno	361.278	2.3447	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Cis-4,5-bis(cianometil)ciclohexeno	367.978	0.85787	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>
1-Metil-5-metilen-8-(1-metiletil)-1,6-ciclodecadieno	368.578	2.1153	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
1,2,3,4,4a,5,6,8a-Octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletenil)-naftaleno	374.578	2.2067	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
6-Etil-2-metildecano	376.478	0.51971	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
Octahidro-1,4,9,9-tetrametil-1H-3a,7-metanoazuleno	376.778	1.0442	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>
Decahidro-4a-metil-1-metilen-7-(1-metiletiliden) naftaleno	377.178	3.0274	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno	377.478	3.0016	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
1-Metil-5-metilen-8-(1-metiletil)-1,6-ciclodecadieno	383.078	1.625	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
1,2,3,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno	384.478	1.0162	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
1,2,3,4-Tetrahydro-1,1,6-trimetilnaftaleno	386.078	0.70466	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub>
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno	391.178	0.57877	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimetil-2(4H) benzofuranona	391.578	0.57877	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
$\alpha$ -Calacoreno	393.378	0.17806	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>
2,6-Bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-oxopropil) fenol	420.478	1.069	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
4,4'-(1-Metiletiliden)bis- fenol,	600.378	1.7353	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>

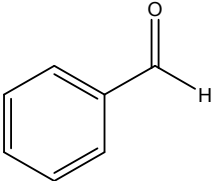
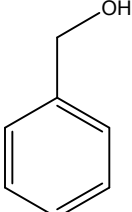
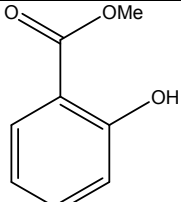
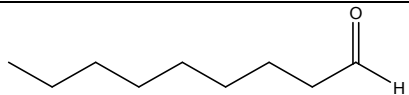


**Figura 15.** Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las hojas de *S. purpurea*.

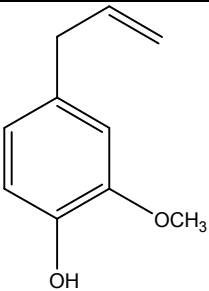
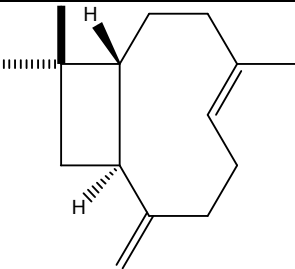
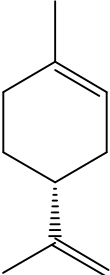
### **5.2.1. Actividad antibacteriana de los principales componentes volátiles detectados en los frutos y las hojas de *S. purpurea* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis***

Se realizó el ensayo biológico para evaluar la actividad antibacteriana de los principales compuestos identificados por SPME de los frutos y las hojas de *S. purpurea*, utilizando estándares comerciales. El cuadro 12 resume las CMI así como la estructura de los compuestos probados.

**Cuadro 12.** Actividad antibacteriana (CMI) de los principales componentes volátiles presentes en *S. purpurea* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Compuesto	Estructura	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Benzaldehído		>1000	>1000
Alcohol bencílico		506	253
Salicilato de metilo		266	67
Nonanal		848	106

**Cuadro 12.** Actividad antibacteriana (CMI) de los principales componentes volátiles presentes en *S. purpurea* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* (continuación).

Compuesto	Estructura	CMI (µg/ml)	
		<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Eugenol		42	21
β-Cariofileno		620	128
D- Limoneno		256	128
CHX*		3.7	1.2

\*CHX: gluconato de clorhexidina

## VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La información científica generada en esta investigación representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie *Spondias purpurea* que es utilizada en la medicina tradicional mexicana. Es importante destacar que este estudio representa la primera investigación sobre los huesos y la pulpa de los frutos del ciruelo rojo conducente al aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica descrita para esta especie.

El aislamiento del ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**) constituye una aportación original al conocimiento de la química de la especie *Spondias purpurea* ya que representa el primer reporte sobre su presencia.

El ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**) presentó la mejor actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* con concentraciones mínimas inhibitorias de 35 µg/ml y 17.5 µg/ml, respectivamente. Los ácidos anacárdicos ha sido aislados previamente de especies de la familia Anacardiaceae y de Ginkgo biloba (Choi *et al.*, 2004) y se les atribuyen propiedades antibacterianas (Kubo *et al.*, 1993a; 2003; Kasemura *et al.*, 2002), antitumorales (Kubo *et al.*, 1993b), moluscicida (Corthout *et al.*, 1994), inhibidores de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Irie, 1996) y de la tirosinasa (Kasemura *et al.*, 2002).

Cabe señalar que aunque la clorhexidina es uno de los agentes más empleados para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por bacterias de la cavidad oral y presenta una actividad biológica mayor que el ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**), presenta desventajas tales como el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto (Quiryneen *et al.*, 2000).

## VII. PERSPECTIVAS

Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias obtenidas que no se analizaron en el presente proyecto.

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto total de los huesos de *Spondias purpurea*.

Utilizar al ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8'-enil]-benzoico (**2**) como modelo para la síntesis total o parcial de compuestos análogos con mayor actividad biológica contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Realizar extracciones selectivas del ácido anacárdico aislado para determinar sus efectos sobre la agregación, la inhibición de las glucosiltransferasas y la formación de la placa dentobacteriana.

Separar los constituyentes minoritarios de la mezcla de ácidos anacárdicos con la finalidad de determinar su estructura química y su actividad biológica de manera individual.



**VIII. BIBLIOGRAFÍA**

Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (4), 1407-1417.

Argueta A. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo I (1-583). México: Instituto Nacional Indigenista, pp 457 y 458.

Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 114 (1), 72-77.

Ceva-Antunes, P. M. N., Ribeiro-Bizzo, H., Silva, A. S., Carvalho, C. P. S., Antunes O. A. C. (2006). Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LTW*, 39, 436-442.

Choi, Y. H., Choi, H. K., Peltenburg-Looman, A. M. G., Lefeber, A. W. M., Verpoorte, R. (2004). Quantitative analysis of ginkgolic acids from *Ginkgo* leaves and products using <sup>1</sup>H-NRM. *Phytochemical Analysis*, 15, 325-330.

Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H., Hwang, J.K. (2006). Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 13, 261-266.

Coates, N. J., Gilpin, M. L., Gwynn, M. N., Lewis, D. L., Milner, P. H., Spear, S. R., Tyler, J. W. (1994). A novel  $\beta$ -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. *Journal of Natural Products*, 57, 654-657.

CONABIO, información de *Spondias purpurea* disponible en: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/4-anaca6.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/4-anaca6.pdf)

Corthout, J., Pieters, L., Claeys, M., Geerts, St., Vanden-Berghe, D., Vlietinck, A. (1994). Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Medica*, 60, 460-463.

da Silva- Leitão, D. P., da Silva-Filho, A. A., Morseli-Polizello, A. C., Kenupp-Bastos, J., Cropanese-Spadaro, A. C. (2004). Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27 (11), 1834-1839.

Devulapalle, K. S., Gómez de Segura, A., Ferrer, M., Alcalde, M., Mooser, G., Plou, F. J. (2004). Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research*, 339, 1029-1034.

Hinshaw, J. V. (2003) Solid-Phase Microextraction. *GC Connections*.

Irie, J., Murata, M., Homma, S. (1996). Glycerol 3-phosphate dehydrogenase inhibitors, anacardic acids, from *Ginkgo biloba* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 5, 3016-3020.

Itokawa. H., Totsuka, N., Nakahara, K., Maezuru, M., Takeya, K., Kondo, M., Inamatsu, M., Morita, H. (1989). A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 645-657.

Kasemura, K., Nomura, M., Tada, T., Fujihara, Y., Shimomura, K. (2002). Antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of 6-[(8Z)-8-pentadecenyl]salicylic acid derivatives. *Journal of Oleo Science*, 51 (10), 637-642.

Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M. (1993a). Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41, 1016–1019.

Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A. (1994), Naturally occurring antiacne agents. *Journal of Natural Products*, 57 (1), 9-17.

Kubo, I., Nihei, K., Tsujimoto, K. (2003). Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7624-7628.

Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P., Komatsu, S. (1993b). Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41, 1012–1015.

Kubo, J., Lee, J.R., Kubo, I. (1999). Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47, 533–537.

Liu, Y., Abreu, P. J. M. (2006). Long chain alkyl and alkenyl phenols from roots of *Orozoa insignis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (3), 527-532

Martínez M., León de Pinto G., Bozo de González M., *et. al.* (2008). New structural features of *Spondias purpurea* gum exudates. *Food Hydrocolloids*, 22, 1310-1314.

Martínez, M. (1996), *Las plantas medicinales de México*. México: Editorial Botas, pp 396-398.

Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 147-154.

Murata, M., Irie, J., Homma, S. (1997). Inhibition of lipid synthesis of bacteria, yeast and animal cells by anacardic acid, glycerol-3-phosphate dehydrogenase inhibitors from ginkgo. *Food Sci. Technol.*, 30, 458-463.

Murphy-Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

Nagabhushana, K. S., Shobha, S. V., Ravindranath, B. (1995). Selective ionophoric properties of anacardic acids. *Journal of Natural Products*, 58, 807-810.

Osawa, K., Miyazaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., Ooshima, T. (2001). Identification of caristatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J. Dent. Res.* 80 (11), 2000-2004

Prabu, G. R., Gnanamani, A., Sadulla, S. (2006). Guaijaverin-a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 101, 487-495.

Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., van Steenberghe, D. (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology* 28, 72–90.

Rivero-Cruz, J . F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 1, 151-154.

Thimothe, J., Bonsi, I. A., Padilla-Zakour, O. I., Koo H. (2007). Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10200-10207.

Tyman J. H. P. (2001). Chemistry and biochemistry of anacardic acids. *Recent Res. Devel. Lipids*, 5, 125-145.

van Beek, T. A. y Wintermans, M. S. (2001). Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. *Journal of Chromatography A*, 930, 109-117.

Vas, G., Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.