



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**“Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos presentes en la infusión y el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina* (capulín)”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CUEVAS NIETO GLORIA**



México D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Vocal:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
Secretario:	Dra. Gloria Díaz Ruiz
1er. suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazón
2do. suplente:	M. en C. José Alberto Rivera Chávez

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Conjunto E.

Facultad de Química, UNAM.

Asesor

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Supervisor Técnico

---

Q. Georgina Artemisa Duarte  
Lisci

Sustentante

---

Cuevas Nieto Gloria

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A mi tutor, el Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su constante asesoría durante el trabajo experimental y escrito.

Al personal técnico de la USAI de la Facultad de Química, especialmente a la Q. Georgina A. Duarte Lisci, quien realizó la supervisión técnica del presente proyecto de tesis.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz, por la revisión del trabajo escrito.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, por su apoyo personal y académico.

Al subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, por el apoyo económico otorgado durante el presente proyecto de tesis.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), a través del proyecto: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205709-3.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Estructura dental .....	3
2.2 Caries dental .....	4
2.2.1 Definición de caries dental .....	4
2.2.2 Descripción del proceso carioso .....	5
2.2.3 Etiología.....	6
2.2.4 Principales microorganismos implicados en la caries dental.....	9
2.2.5 Tratamientos empleados para la caries .....	14
2.2.6 Estrategias para la prevención de las caries dentales.....	16
2.3 Biopelículas dentales .....	17
2.3.1 Etapas de formación de la biopelícula dental .....	19
2.3.2 Inhibición de la biopelícula cariogénica.....	20
2.4 Antecedentes de la especie <i>Prunus serotina</i> Ehrh .....	21
2.4.1 Descripción botánica .....	21
2.4.2 Nombres comunes .....	22
2.4.3 Sinónimos.....	22
2.4.4 Distribución geográfica.....	22
2.4.5 Antecedentes etnobotánicos .....	23
2.4.6 Composición química .....	26
2.5 Aceites esenciales.....	35
2.5.1 Definición.....	35
2.5.2 Métodos de extracción .....	36
2.5.2.1 Hidrodestilación.....	36
2.5.2.2 Métodos <i>headspace</i> (fase gaseosa) .....	37
2.5.2.3 Vaporización directa.....	41
2.5.2.4 Extracción a alta presión con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	41
2.5.3 Métodos de separación .....	43
2.5.3.1 Cromatografía de gases.....	43
2.5.3.2 HPLC .....	44
2.5.4 Métodos de identificación.....	45
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	48

4. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
4.1. Procedimientos generales.....	50
4.1.1 Análisis cromatográficos .....	50
4.2 Material vegetal .....	51
4.3 Estudio químico de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	51
4.3.1 Preparación del aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	51
4.3.2 GC-MS-TOF del aceite esencial .....	51
4.3.3 Análisis por HS-SPME-GC-MS-TOF de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	53
4.3.4 Identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial y los volátiles separados utilizando la microextracción en fase sólida.....	55
4.3.5 Preparación de la infusión de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	56
4.3.5.1 Fraccionamiento primario a partir de la infusión .....	56
4.3.5.2 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción 1-FA .....	57
4.3.5.3 Aislamiento del hiperósido a partir de la fracción secundaria 1-FA-3.....	57
4.4 Ensayo biológico .....	58
4.4.1 Microorganismo de prueba.....	58
4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
6. CONCLUSIONES.....	78
7. PERSPECTIVAS .....	79
8. REFERENCIAS.....	80
ANEXO I.....	85
ANEXO II.....	87
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
d	Doblete
DB-5	(5%- fenil)-metilpolisiloxano
dd	Doble doblete
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DVB/CAR/PDMS	Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano
g	Gramo
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografía de gases)
°C	Grado Celsius
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza o en la fase gaseosa)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
m	Metro
MeOH	Metanol
µg	Microgramo
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
NaCl	Cloruro de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
rpm	Revoluciones por minuto
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TOF	<i>Time of flight</i> (Tiempo de vuelo)
UFC	Unidad formadora de colonias
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i> (Farmacopea de los Estados Unidos de América)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución bacteriana en la cavidad oral.....	9
<b>Tabla 2.</b> Agentes antibacterianos más empleados para tratar la caries dental.....	15
<b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios obtenidos de la especie <i>Prunus serotina</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> Comparación de <i>headspace</i> estática y <i>headspace</i> dinámica.....	39
<b>Tabla 5.</b> Condiciones del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial .....	52
<b>Tabla 6.</b> Condiciones del análisis HS-SPME-GC-MS-TOF .....	54
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la obtención de los índices de retención (Índices de Kovats).. .....	55
<b>Tabla 8.</b> Fracciones 1-FA obtenidas del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 (2.5 × 40 cm) .....	57
<b>Tabla 9.</b> Controles para el ensayo biológico .....	59
<b>Tabla 10.</b> Compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) .....	64
<b>Tabla 11.</b> Contenido de grupos funcionales identificados en el aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> , mediante GC-MS-TOF y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats) .....	68
<b>Tabla 12.</b> Estructuras de los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de <i>Prunus serotina</i> (capulín) y su abundancia relativa .....	70
<b>Tabla 13.</b> Constituyentes volátiles en las hojas de <i>Prunus serotina</i> , identificados a partir de la metodología HS-SPME-GC-MS-TOF y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats) .....	73
<b>Tabla 14.</b> Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial, la infusión y compuestos presentes en el aceite esencial y en la infusión de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura dental.....	3
<b>Figura 2.</b> Factores involucrados en el desarrollo de la caries .....	8
<b>Figura 3.</b> Representación de la biopelícula dental.....	17
<b>Figura 4.</b> Modelo espacio-temporal de la colonización bacteriana en la cavidad oral.....	18
<b>Figura 5.</b> Flores y hojas de <i>Prunus serotina</i> Ehrh.....	21
<b>Figura 6.</b> Distribución de <i>Prunus serotina</i> Ehrh., en la República Mexicana .....	23
<b>Figura 7.</b> <i>Headspace</i> estática.....	37
<b>Figura 8.</b> <i>Headspace</i> dinámica.....	38
<b>Figura 9.</b> Sistema purga y trampa .....	39
<b>Figura 10.</b> a) Microextracción en fase sólida, en fase gaseosa (HS-SPME) y b) Transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico .....	41
<b>Figura 11.</b> Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	42
<b>Figura 12.</b> Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases .....	44
<b>Figura 13.</b> Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	45
<b>Figura 14.</b> Diagrama de bloques de un instrumento GC-MS .....	47
<b>Figura 15.</b> Fraccionamiento de la infusión de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	56
<b>Figura 16.</b> Estructura del hiperósido.....	58
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .....	62
<b>Figura 18a.</b> Espectro de masas del benzaldehído (t <sub>r</sub> 213.643 s) obtenido experimentalmente; 93.3% de similitud.....	63
<b>Figura 18b.</b> Espectro de masas del benzaldehído en la biblioteca del instrumento.....	63
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en las hojas de la especie <i>Prunus serotina</i> , utilizando como técnica de preparación de la muestra la microextracción en fase sólida, en la fase gaseosa (HS-SPME).....	71
<b>Figura 20a.</b> Espectro de masas del benzaldehído (t <sub>r</sub> 200.794 s) obtenido experimentalmente; 87.6 % de similitud.....	72
<b>Figura 20b.</b> Espectro de masas del benzaldehído en la biblioteca del instrumento.....	72

**Figura 21.** Cromatograma que incluye los compuestos identificados en la muestra (hojas de *P. serotina*, capulín) obtenida por HS-SPME y la serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) ..... 74

## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional (Indo-americana, China, homeopática, etc.), llamada complementaria o alternativa, se utiliza cada vez más, tanto en países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, en paralelo con la medicina alopática (Duarte, 2003). La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente ochenta por ciento de la población mundial utiliza medicina tradicional para resolver sus problemas primarios de salud (Trivedi, 2006).

La medicina complementaria o alternativa se emplea, principalmente, para evitar métodos invasivos, efectos secundarios, toxicidad de terapias farmacológicas alopáticas, o bien, alcanzar niveles de calidad de vida que no son posibles con las terapias convencionales. Otras razones, para el uso de la medicina tradicional, son: la facilidad de acceso y costos moderados en los servicios (Berenzon-Gorn, *et al.*, 2006).

Se estima que setenta mil plantas son utilizadas en la medicina tradicional alrededor del mundo. De acuerdo al Instituto Nacional Indigenista, en México, hay más de 3015 especies de plantas empleadas con fines medicinales (Argueta *et al.*, 1994). Por ello, es evidente la necesidad de identificar los componentes químicos de las plantas medicinales y desarrollar procedimientos de control de calidad de las mismas, del extracto o cualquier formulación que contenga un componente fitoquímico (Daniel, 2006). En este sentido la OMS ha desarrollado una serie de lineamientos para asegurar la calidad de las plantas utilizadas con fines curativos que incluyen estudios de identidad, seguridad y eficacia terapéutica (Trivedi, 2006).

En este contexto, se plantea la problemática de la caries dental. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la caries dental es un problema de salud



pública en los países industrializados, especialmente en los países en vías de desarrollo (WHO, 2007). La caries dental, aunque no se considera que ponga en peligro la vida (Burnett, 1990), es la enfermedad infecciosa, de etiología multifactorial, más común en humanos, siendo *Streptococcus mutans* el principal agente etiológico (Balakrishnan, *et al.*, 2000).

El tratamiento de elección para las enfermedades infectocontagiosas utiliza principalmente antibióticos. Sin embargo, con el uso de estos medicamentos aparecen bacterias resistentes debido al uso indiscriminado por profesionales de la salud, personal no autorizado para la dispensación y la población en general, quien emplea la automedicación para reducir gastos en la atención médica (Okeke, *et al.* 1999). En el mundo, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos producen gastos millonarios debido a costos por el tratamiento, ausencia laboral y muerte (Herdman, 1995).

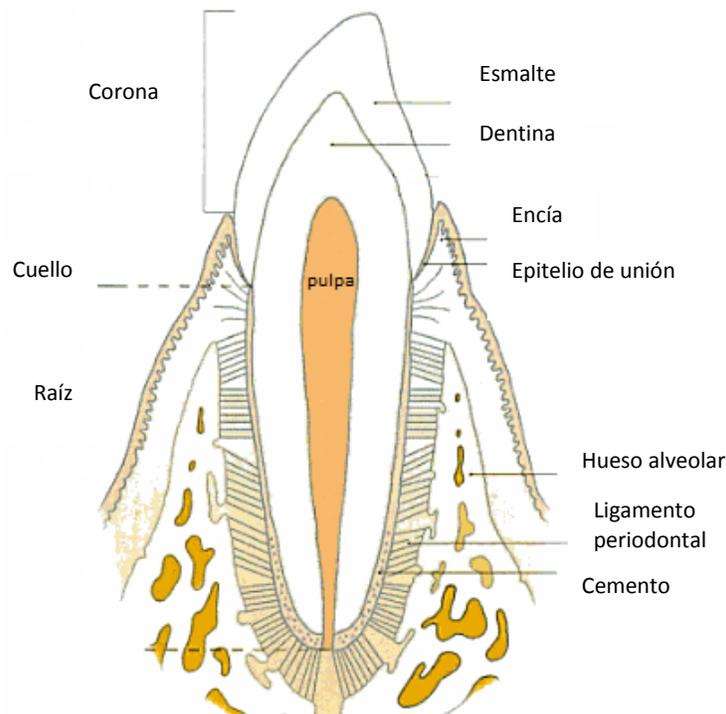
La resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos antibióticos han propiciado la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos en diversas fuentes, como las plantas medicinales. En este sentido, los estudios de actividad antimicrobiana de extractos de plantas y productos vegetales han demostrado que las plantas representan una fuente potencial de nuevos agentes antiinfecciosos (Al-Bayati, 2008).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estructura dental

Un diente maduro está conformado por los siguientes tejidos: pulpa, dentina, cemento y esmalte (Burnett, 1990) (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura dental (modificado de Gómez y Campos, 2009).

La pulpa es un tejido conectivo abastecido por arterias, venas, vasos linfáticos y nervios que sirven como un órgano sensorial (dolor) de los dientes. La pulpa tiene otras funciones como recibir nutrientes y eliminar los productos catabólicos. Envolviendo y protegiendo físicamente a la pulpa se encuentra la dentina, un tejido colágeno calcificado parecido al hueso, perforado uniformemente por innumerables túbulos más o menos paralelos de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La dentina se define como un producto terminal de la calcificación en una matriz de tejido conectivo formada por células denominadas odontoblastos. Los odontoblastos forman una barrera de dentina secundaria (reparadora) en respuesta a la irritación resultante de las lesiones cariosas, de los procedimientos quirúrgicos, de la erosión y del desgaste. La dentina consta de tres fases: 13% de la fase acuosa, 68% de una fase inorgánica, hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), que se encuentra depositada en una fase orgánica (red de fibrillas colágenas). Esta última constituye el 19%.

La dentina radicular (dentina de la raíz) está cubierta por una capa gruesa de 20 a 200  $\mu\text{m}$  de tejido calcificado tipo óseo, cemento, el cual a su vez está cubierto por células especializadas (cementoblastos) derivadas del ligamento periodontal. El cemento proporciona el ancla para las fibras de los ligamentos periodontales a los dientes; también puede remodelar según las necesidades, para acomodar los dientes a las presiones oclusales variantes.

A su vez, la dentina está cubierta por grosores variantes de esmalte, el tejido más duro y más altamente calcificado encontrado en el cuerpo, que carece de mecanismos homeostáticos (Burnett, 1990). El esmalte está constituido por tres fases: 96 % de fase inorgánica (hidroxiapatita cristalina), 3% de la fase acuosa y 1% de la fase orgánica (proteína del esmalte) (Gómez y Campos, 2009).

## **2.2 Caries dental**

### **2.2.1 Definición de caries dental**

El término general de caries (del latín declinar; podredumbre; descomposición seca) se refiere a la destrucción progresiva y localizada en los dientes (Burnett, 1990). Según la OMS, la caries dental se puede definir como proceso patológico, localizado, de origen externo, que se inicia tras la erupción dentaria y que



determina un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad (Paredes, *et al.*, 2006).

Las lesiones cariosas se inician por la desmineralización de la superficie externa del esmalte debido a los ácidos orgánicos producidos localmente por las bacterias que fermentan los depósitos de los carbohidratos de la dieta. Con la pérdida progresiva del mineral de los dientes y la destrucción secundaria de la proteína del diente por la acción bacteriana se forman cavidades. Si este proceso continúa y no es atendido se destruye la mayor parte del diente, conduciendo con frecuencia a infecciones de la pulpa del diente e infecciones de los tejidos circundantes (Burnett, 1990).

### **2.2.2 Descripción del proceso carioso**

La lesión primaria y esencial de la caries es la desmineralización de la superficie externa del esmalte, permitiendo la infección bacteriana en la dentina. La lesión se expande rápidamente hacia los lados a través de las conexiones cruzadas entre los túbulos. La destrucción posterior del esmalte, se produce como resultado de la diseminación lateral del proceso destructivo en la dentina, lo cual finalmente deja sin soporte al esmalte que rodea al punto de la penetración inicial, que se rompe fácilmente. Mientras tanto, la matriz colágena de la dentina casi siempre desarrolla lisis asociada a proliferación bacteriana masiva.

Si no es detenida por esclerosis (oclusión de los túbulos por mineralización), la formación de dentina de reparación o métodos dentales de reparación, la invasión bacteriana de los túbulos, finalmente penetra la pulpa. Esta última se infecta y se inflama y por ultimo desarrolla necrosis (Burnett, 1990). La inflamación de la pulpa puede extenderse al tejido periapical (Cohen, 2002). La inflamación y necrosis del tejido periapical (alrededor de la raíz del diente), conduce a la formación de un absceso. El absceso periapical es una acumulación de pus en los tejidos, la cual produce inflamación y edema en la zona gingival que se observa como una



elevación ovoide de la encía (Lindhe, 2009). Este absceso puede extenderse al hueso esponjoso y establecer fístulas, que son vías de drenaje o comunicación anormal entre dos superficies revestidas de epitelio, debidas a la destrucción del tejido interpuesto entre ambas (Sapp, *et al.*, 2005), permitiendo la supuración o evacuación de exudado inflamatorio hacia la cavidad bucal (Burnett, 1990).

### 2.2.3 Etiología

La caries es una enfermedad de etiología multicausal en la que diversos factores participan directa o indirectamente produciendo condiciones favorables para el comienzo y desarrollo del proceso patológico. Se reconocen factores tanto intrínsecos como extrínsecos, entre los primeros encontramos el estado anatómico y funcional de los tejidos de la cavidad bucal, composición y cantidad de saliva, y el sistema inmunológico; entre los segundos, podemos mencionar la condición socioeconómica y cultural, hábitos y conductas de higiene bucal, elevado consumo de azúcares fermentables en alimentos y bebidas, disponibilidad de sustratos requeridos por microorganismos específicos, etc. (Bojanich, *et al.*, 2003). A continuación se describen los factores involucrados directamente en la aparición de la caries:

- **Estructura dental:** algunas áreas de un mismo diente son más susceptibles al ataque de la caries que otras, posiblemente por las diferencias en el contenido mineral (Samaranayake, 2006).
- **Nivel de flujo y composición de la saliva:** la saliva permite eliminar restos de alimentos por lavado mecánico, tiene capacidad reguladora del pH, permitiendo neutralizar los ácidos producidos por la placa bacteriana, y es un fluido supersaturado de iones calcio y fosforo, los cuales son importantes en la remineralización (Samaranayake, 2006). Además, las IgAs (inmunoglobulinas secretoras tipo A), presentes en la saliva, actúan como primer agente en la defensa inmunológica de la mucosa oral interfiriendo la colonización de dichas superficies por las células bacterianas

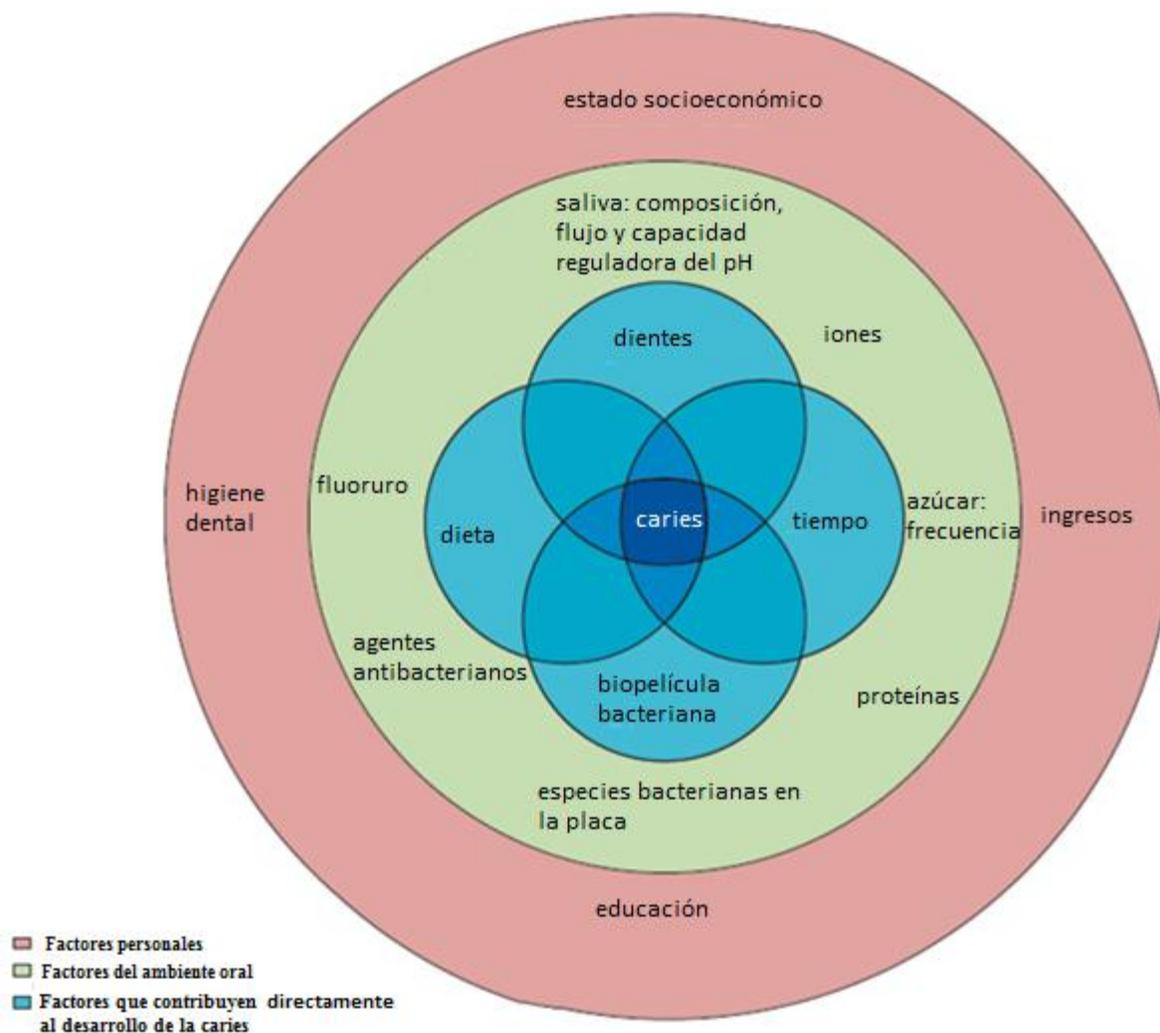


al favorecer la aglutinación; se unen a adhesinas, enzimas de superficie y toxinas. Por otra parte, las glicoproteínas salivales participan en la adherencia bacteriana, entre estas se reconocen mucinas, proteínas ricas en prolínas, fibronectina, amilasa, estaterina y cistatina. Dichas moléculas sufren una modificación conformacional cuando son adsorbidas en la superficie del diente y exponen sitios específicos para interactuar con las proteínas bacterianas (Bojanich, *et al.*, 2003).

- **Dieta (ingesta de carbohidratos fermentables):** se ha observado prevalencia de caries en poblaciones que tienen dietas altas en sacarosa. Por otra parte, estudios en humanos y animales demuestran que la sacarosa es el azúcar más cariogénico (existen otros azúcares que también son cariogénicos como la glucosa y fructosa, aunque en menor grado que la sacarosa). La sacarosa es altamente soluble y difunde fácilmente en la placa dental, actuando como sustrato para la producción de polisacárido extracelular y ácidos (Bojanich, *et al.*, 2003).
- **Microorganismos de la bioplaca dental (biopelícula):** los microorganismos que forman la placa dental son un prerrequisito para el desarrollo de la caries. La adherencia de los microorganismos a las superficies de la cavidad oral constituye la etapa inicial para la colonización y posterior desarrollo de infecciones. La misma depende de las características estructurales del microorganismo (adhesinas) y del polimorfismo de los receptores del huésped (glicoproteínas y proteínas salivales) en la cavidad bucal (Bojanich, *et al.*, 2003).

La interrelación de estos factores y el tiempo, simultáneamente, provocan la aparición de la caries (Figura 2) (Samaranayake, 2006).





**Figura 2.** Factores involucrados en el desarrollo de la caries (modificado de Selwitz, *et al.*, 2007).

En relación al mecanismo, el factor químico más importante en la lesión de la caries es su acidez prevalente (pH de 5.2 o menor), la cual es de un grado suficiente para la desmineralización en el medio oral. La solubilidad de la hidroxiapatita incrementa cuando incrementa la acidez del medio oral (Burnett, 1990).

**2.2.4 Principales microorganismos implicados en la caries dental**

La microbiota oral es un ecosistema complejo que contiene una gran variedad de especies microbianas (bacterias, hongos, micoplasmas y protozoarios) y posiblemente virus. Las bacterias son el grupo predominante; existen más de 350 especies bacterianas cultivables (Samaranayake, 2006) en constante interrelación y dinamismo, donde los cocos Gram-positivos son predominantes (Hamada y Slade, 1980) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución bacteriana en la cavidad oral (Hamada y Slade, 1980).

Grupo bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco gingival
Cocos Gram-positivos facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos Gram-positivos anaerobios	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos Gram-negativos anaerobios	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos Gram-negativos facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos Gram-positivos facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos Gram-positivos anaerobios	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos Gram-negativos facultativos	ND	3.2	2.3	1.2
Bacilos Gram-negativos anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Los datos se expresan como un porcentaje de la cuenta total cultivable en condición anaeróbica. Los datos entre paréntesis se expresan como porcentaje de la cuenta total de estreptococos facultativos. ND: No detectado.



Las evidencias actuales indican que algunas bacterias como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp., y *Actinomyces* spp., son más importantes que otros grupos bacterianos en el inicio y progresión de la caries (Samaranayake, 2006). A continuación se describen estos grupos bacterianos.

### ***Streptococcus mutans***

El término *Streptococcus mutans* se aplica para nombrar a un grupo de siete diferentes especies (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. rattus*, *S. macacae* y *S. downei*) y ocho serotipos (a-h), basados en la especificidad antigénica de los carbohidratos en su pared celular. *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f) y *S. sobrinus* (serotipos d y g) son las especies más comunes encontrados en humanos, donde el serotipo c es el más prevalente, seguidos por d y e (Samaranayake, 2006).

*S. mutans* son cocos Gram-positivos agrupados en cadena, no móviles, no esporulados y catalasa negativos. Pueden presentar  $\alpha$  y  $\gamma$  hemólisis en agar sangre (Rocha, *et al*, 2004). Se denomina *mutans* debido a su frecuente transición de coco a cocobacilo. *S. mutans* es el microorganismo más importante en el inicio de la caries (Samaranayake, 2006). La evidencia de *Streptococcus mutans* como agente etiológico de la caries, incluye lo siguiente:

- La inmunización de animales, con serotipos específicos de *S. mutans* reduce significativamente la incidencia de la caries (Samaranayake, 2006).
- Se ha logrado aislar *S. mutans* en superficies dentales que han desarrollado caries. Existe correlación entre la presencia de *S. mutans* en saliva y placa dental y la prevalencia de las caries (Samaranayake, 2006).
- Entre sus factores de virulencia destacan:
  - a) Acidogénesis: rápidamente metaboliza los azúcares por la vía glicolítica, así se alcanza el pH crítico de desmineralización de 4.5-5.5. *S. mutans*



presenta distintos mecanismos enzimáticos para el transporte de azúcares al interior de la célula, donde sufren un proceso de fermentación y producción de ácidos, principalmente ácido láctico. Por lo menos se conocen catorce sistemas de transporte fosfotransferasas (PTS) específicos para diferentes azúcares y cinco sistemas de transporte del tipo ABC (ATP Binding cassette), incluido un sistema de metabolismo de múltiples azúcares (MSM) (Negroni, 2009).

- b) Acidofilia: la acidificación de la biopelícula, producto de la fermentación de carbohidratos, favorece el crecimiento de *S. mutans* y al mismo tiempo inhibe el de microorganismos comensales, como *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. oralis*; esta situación es posible gracias a la presencia de la bomba transportadora de protones  $H^+$  que posee *S. mutans* en su membrana celular, denominada F<sub>0</sub> F<sub>1</sub> ATPasa, la cual funciona para mantener el pH intracelular. También posee un sistema enzimático que le permite utilizar aminoácidos para convertir protones en aminas. Solo *S. mutans* puede producir ácidos, a partir de la fermentación de azúcares, a pH 4.4; desarrollar pH 4.8 y sobrevivir bajo estas condiciones de estrés (Negroni, 2009).
- c) Síntesis de polisacáridos extracelulares (PEC): *S. mutans* produce y segrega al medio tres tipos de enzimas, exoenzimas, denominadas glucosiltransferasas (Gtfs, Gtf B, Gtf C, Gtf D) (Negroni, 2009). Las Gtfs catalizan la síntesis de los polisacáridos extracelulares, a partir de la sacarosa, los cuales constituyen la matriz de la placa dental (Bojanich A., *et al.*, 2003). Antes de que la sacarosa penetre en la célula un porcentaje de ella es transformado por las exoenzimas de *S. mutans* (glucosiltransferasas) que la rompen y transfieren cada fracción de hexosa a una molécula receptora y forman polímeros que difunden en el medio vecino o permanecen asociados con la célula. Estos polímeros son: dextranos (glucanos solubles, que constituyen una reserva extracelular de azúcar) y mutanos (glucanos insolubles). En los glucanos solubles



predominan los enlaces alfa (1-6) y en los insolubles los enlaces alfa (1-3). Los mutanos son difíciles de degradar y más adhesivos (estimulan los fenómenos de adhesión y agregación bacteriana) (Negroni, 2009).

- d) Síntesis de polisacáridos intracelulares (PSI): la célula almacena glucógeno, como reserva alimentaria, el cual, ante la falta de ingreso de azúcar por vía exógena con la dieta, puede metabolizarse por la acción de la glucogenofosforilasa (Negroni, 2009).
- e) Síntesis de proteínas, lectinas que ligan el glucano (Glucan binding proteins o Gbps): *S. mutans* produce por lo menos cuatro tipos distintos de Gbps (Gbps A, Gbps B, Gbps C, Gbps D), las cuales son proteínas extracelulares, normalmente asociadas a su pared celular. Las Gbps juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Negroni, 2009).
- f) Adhesinas: *S. mutans* presenta adhesinas de superficie de la familia de adhesinas Spa también llamada de antígeno I/II (SpaP, Pac o P1) que participan en el proceso de adherencia a las glicoproteínas salivales y a otros microorganismos (Negroni, 2009).
- g) Proteína asociada a la pared celular (Wap A): le permite adherirse a las piezas dentarias, pero su papel en la cariogénesis no es claro (Negroni, 2009).
- h) Bacteriosinas: *S. mutans* produce diversas bacteriosinas, mutacinas, que participarían en un proceso de competencia microbiana. Las mutacinas inhiben a los microorganismos comensales competidores como *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *S. sobrinus* y otras especies de estreptococos del grupo *mutans* (Negroni, 2009).



### ***Lactobacillus* spp.**

Son bacilos Gram-positivos, catalasa negativos, microaerófilos, acidúricos (ácido-tolerantes), y tienen un pH óptimo de crecimiento de 5.5-5.8. Las principales especies en la cavidad oral son: *L. casei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*. Pueden participar en el inicio y progresión de la caries. Las evidencias que demuestran lo anterior son (Samaranayake, 2006):

- Están presentes en lesiones cariosas mientras que su número en la placa dental de individuos sanos es bajo.
- Existe una correlación positiva entre su presencia en la placa dental y la saliva y la incidencia de la caries.
- Su habilidad para crecer en medios con bajo pH (debajo de pH 5) (aciduricidad) y producir ácido láctico (acidogenicidad) que propicia la desmineralización dental.
- Puede sintetizar polisacáridos intracelulares y extracelulares, a partir de sacarosa.
- Algunas cepas producen caries en ratas gnotobióticas (libres de gérmenes).

El género *Actinomyces* spp., ha sido aislado de lesiones cariosas y se ha asociado principalmente con el desarrollo de caries de superficie de raíz (o del cemento radicular). *Actinomyces* spp., son bacilos, Gram-positivos, anaerobios y pleomórficos. Las especies que se encuentran en la cavidad oral son: *A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus* y *A. naeslundii* (Samaranayake, 2006).



Los factores de cariogenicidad de los *Actinomyces* pueden ser resumidos de la siguiente manera (Negroni, 2009):

1. Pueden formar ácidos distintos del láctico, como ácido butírico y ácido propiónico.
2. Producen polisacáridos a partir de la sacarosa.
3. Poseen fimbrias que les permiten adherirse y agregarse a otras especies.

### 2.2.5 Tratamientos empleados para la caries

Los antisépticos más empleados para tratar y prevenir la caries son la clorhexidina, triclosan, timol, fluoruros, entre otros (Tabla 2). La clorhexidina (bisguanida catiónica) altera el equilibrio osmótico de la membrana celular, favorece la formación de una vesícula y precipitación del citoplasma. La clorhexidina tiene las siguientes ventajas: es altamente efectiva contra bacterias Gram-positivas, posee baja toxicidad y fuerte capacidad de adherirse a la mucosa oral (Negroni, 2009). Adicionalmente, la clorhexidina es capaz de inhibir la producción de enzimas esenciales como las glucosiltransferasas. Por otro lado, este tratamiento tiene como desventajas la tinción de los dientes, la lengua, las restauraciones y prótesis dentales, dolor de la mucosa oral, e irritación de las papilas gustativas (Libério, 2009).

En el tratamiento de la caries también se ha empleado el remplazo microbiológico, un ejemplo de este tipo de control es el de *Veillonella* spp., que por ser un microorganismo no fermentador de azúcares, basa todo su metabolismo en compuestos como el ácido láctico. De esta manera *Veillonella* spp., al utilizar el ácido disponible en determinado microambiente oral, puede evitar la acidificación del medio y por lo tanto se inhibe el proceso de desmineralización de las superficies dentales (Bhatia, *et al.*, 2003).



**Tabla 2.** Agentes antibacterianos más empleados para tratar la caries dental.

Agente antibacteriano	Mecanismo de acción	Referencia
Gluconato de clorhexidina	<p>Altera la integridad de la membrana celular bacteriana (incrementa su permeabilidad); las moléculas catiónicas del gluconato de clorhexidina interactúan con los grupos fosfato de la membrana bacteriana (los grupos fosfato otorgan carga negativa a la membrana celular bacteriana).</p> <p>Produce la precipitación del citoplasma bacteriano por formación de complejos fosfatados.</p> <p>Se une a las superficies bucales, de las que se libera lentamente, prolongándose su acción antibacteriana.</p>	Negroni, 2009
Fluoruros	<p>Inhiben el metabolismo energético celular. El fluoruro cruza la membrana plasmática e interfiere en el ciclo de Krebs, al combinarse con la enzima enolasa, alterando el metabolismo intracelular de carbohidratos.</p> <p>Inhibe la adherencia bacteriana, por modificación de las cargas electrostáticas en la superficie del esmalte y por competencia en la captación de calcio con el ácido lipoteicoico de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. El fluoruro se une al calcio de la saliva (quelación) e impide que éste actúe como puente en la colonización inicial a la película adquirida por los microorganismos (fuertemente electronegativos).</p>	Negroni, 2009
Triclosán	<p>Disrupción de la membrana bacteriana a través del bloqueo de la síntesis de lípidos. El triclosán bloquea el sitio activo de la enzima llamada proteína reductasa transportadora de enoil-acil necesaria para la construcción de la membrana celular.</p>	McMurray, 1998
Timol	<p>Desestabilización de la membrana citoplasmática.</p>	Xu, 2008
Nitrofuranos	<p>Inhibición de la síntesis de ADN e inhibición de enzimas vinculadas al metabolismo energético en las bacterias.</p>	Cabello, 2007



## 2.2.6 Estrategias para la prevención de las caries dentales

En la prevención de la caries dental se han planteado diferentes estrategias:

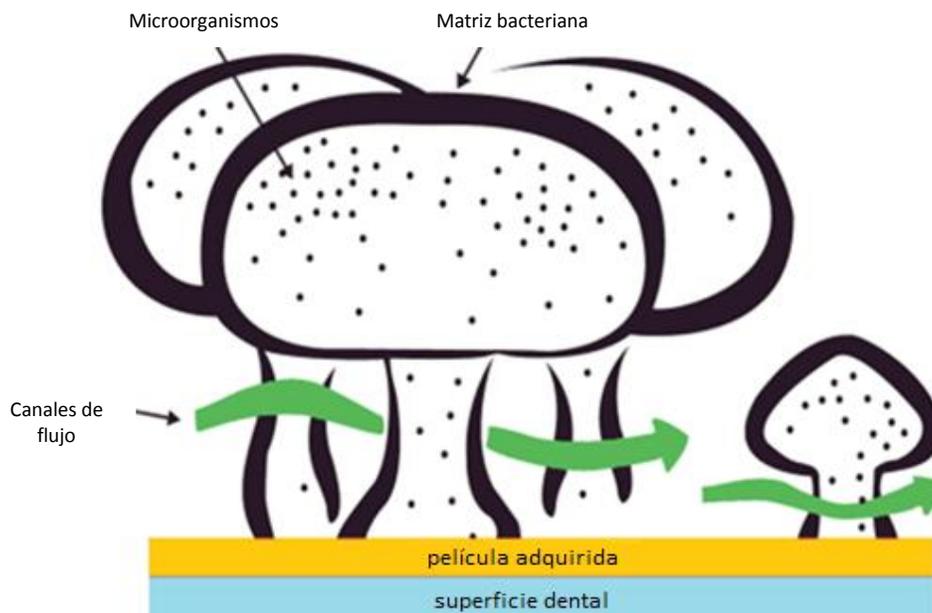
- **Control de la dieta:** disminución del consumo de carbohidratos fermentables o utilización de sustitutos de azúcar (por ejemplo sorbitol, xilitol o licasina) que no pueden ser metabolizados por las bacterias que forman la placa dental para producir ácidos. Están disponibles dos tipos de azúcares, los azúcares con valor calórico, por ejemplo, polialcoholes como sorbitol, xilitol y licasina (preparado de almidón) y azúcares no nutritivos (edulcorantes), por ejemplo sacarina y aspartame (Samaranayake, 2006).
- **Fluoración:** El fluoruro sustituye los grupos hidroxilo en la hidroxiapatita, formando la fluoroapatita. Promueve la remineralización del esmalte y la dentina (Samaranayake, 2006).
- **Selladores:** Protegen áreas sensibles (fisuras) de los dientes que pueden ser potenciales rutas de infección (Samaranayake, 2006).
- **Control de la flora cariogénica:**
  - a) Por inmunización: se han utilizado antígenos asociados a la pared celular (antígenos I y II) o glucosiltransferasas (enzimas extracelulares) de *S. mutans*, los cuales han resultado efectivos para reducir la caries inducida experimentalmente en ratas y monos (inmunización activa). La inmunización activa produce la inhibición de la colonización del esmalte por incremento en la actividad fagocitaria al promover la secreción de IgA (inmunoglobulina A) e IgG (inmunoglobulina G). Estudios experimentales muestran que la aplicación tópica de anticuerpos monoclonales contra el antígeno I/II de *S. mutans* evita la recolonización de estos organismos (Samaranayake, 2006).



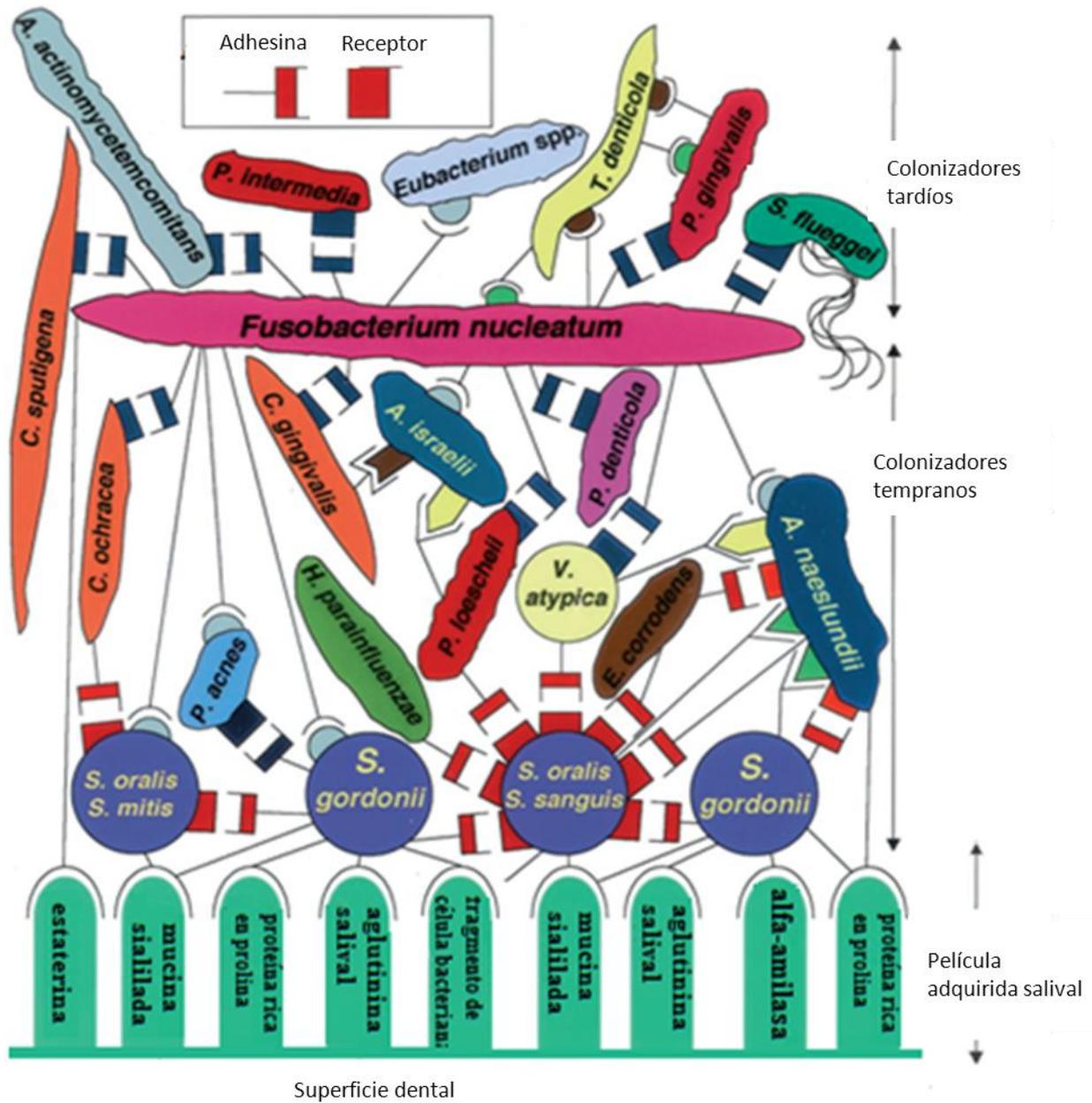
- b) Higiene bucodental: Técnicas de limpieza mecánica (uso de cepillo dental e hilo dental) (Samaranayake, 2006).
- c) Agentes antibacterianos: La clorhexidina al 0.2 y 0.12% es el más efectivo agente para el control de placa dental (Negroni, 2009).

## 2.3 Biopelículas dentales

Una biopelícula dental se define como una comunidad compleja y funcional de una o más especies bacterianas asociadas entre sí, rodeadas en una matriz de exopolisacárido, unidas unas a otras o a una superficie dental (Samaranayake, 2006) de forma tal que unas colaboran en el desarrollo de otras bacterias (Figura 3 y 4). Las diferentes comunidades exhiben una cooperación metabólica, por ejemplo con el intercambio de nutrientes. Las comunidades que conforman las biopelículas poseen microambientes totalmente diferentes: variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos; permitiendo nichos adecuados a todas las especies (Negroni, 2009).



**Figura 3.** Representación de la biopelícula dental (Dumitrescu, *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Modelo espacio-temporal de la colonización bacteriana en la cavidad oral. Las cepas bacterianas que se muestran en la figura son: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loeschelii*, *Propionibacterium acnes*, *Selenomonas flueggei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Treponema spp.*, y *Veillonella atypica* (Kolenbrander, et al., 2002).



Los microorganismos en la biopelícula son más resistentes a los antibióticos que sus contrapartes planctónicas (formas de vida libre) debido a que la estructura de una biopelícula puede restringir la penetración del agente antimicrobiano, el cual se fija a la matriz de exopolisacárido en la biopelícula (provocando una reducción en la concentración de antibiótico) o inhibe los microorganismos en la superficie de la biopelícula, dejando a las células en las profundidades de la biopelícula relativamente poco afectadas.

Otros factores que contribuyen a la resistencia bacteriana en la biopelícula son: las diferencias de potencial eléctrico y pH dentro de la matriz de la biopelícula, las cuales pueden activar o inactivar un fármaco, la baja actividad metabólica de las bacterias en la biopelícula que promueve el desarrollo de fenotipos tolerantes a los antibióticos y los mecanismos de respuesta inmune, los cuales no pueden atravesar la biopelícula bacteriana (Samaranayake, 2006).

### **2.3.1 Etapas de formación de la biopelícula dental**

Existen 6 etapas que llevan a la formación de la biopelícula dental (Samaranayake, 2006):

I. Formación de la película adquirida salival. Una delgada capa de glicoproteínas salivales se deposita en la superficie del diente durante su exposición al medio bucal (las bacterias orales inicialmente se adhieren a la película salival y no directamente al esmalte).

II. Transporte. Las bacterias se aproximan a la vecindad de la superficie del diente por medio del flujo natural de la saliva, el movimiento browniano o la quimiotaxia.

III. Interacciones de largo alcance. Incluye interacciones fisicoquímicas entre la superficie de la célula microbiana y la película adquirida salival. La interacción de fuerzas de Van der Waals y repulsión electrostática producen una fase de adhesión reversible.



IV. Interacciones de corto alcance. Consiste en reacciones estereoquímicas entre las adhesinas en la superficie bacteriana y receptores en la película adquirida salival. Esta fase es irreversible en la cual los microorganismos se fijan a la superficie del diente.

V. Coagregación o Coadhesión. Nuevas bacterias se unen a la primera generación de células que se unieron previamente; estas pueden ser del mismo género o diferente género compatible.

VI. Formación de la biopelícula. El proceso anterior continúa hasta la formación de la biopelícula, el cual se vuelve más complejo conforme pasa el tiempo.

### **2.3.2 Inhibición de la biopelícula cariogénica**

Los polisacáridos extracelulares permiten superar fuerzas repulsivas, logrando la adherencia de los microorganismos. El dilmopinol (aminoalcohol de bajo peso molecular) actúa sobre los dextranos en la matriz extracelular al bloquear su síntesis y reducir la viscosidad.

La adherencia de *S. mutans*, por medio de adhesinas, a proteínas de la película adquirida puede ser impedida por compuestos que contengan un grupo amino primario como galactosamina, manosamina y espermina, los cuales son análogos de adhesinas, capaces de bloquear receptores (Negroni, 2009).



## 2.4 Antecedentes de la especie *Prunus serotina* Ehrh.

### 2.4.1 Descripción botánica

Capulín es el nombre común con el que se conoce al árbol y al fruto que crece en las serranías mexicanas y en otras regiones del continente americano. *Prunus serotina* Ehrh., pertenece a la familia *Rosaceae* y corresponde a una especie compuesta por un gran número de variedades y subespecies (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999).

*Prunus serotina* Ehrh. sp. *capuli*, es un árbol que mide de 10 a 15 m de altura, de corteza rojiza o café, hojas verdes, lanceoladas y bordes aserrados. Las flores del capulín se agrupan en racimos, y son de color blanco (Figura 5), mientras que su fruto es globuloso de color rojo oscuro o negro, de 1.5 cm de diámetro, de sabor dulce y astringente, con una sola semilla. Florece de enero a marzo y fructifica entre los meses de mayo y agosto (Martínez, 1944; Lara y Márquez, 1996).



**Figura 5.** Flores y hojas de *Prunus serotina* Ehrh (Fotografía proporcionada por el Dr. José Fausto Rivero Cruz).

## 2.4.2 Nombres comunes

Los nombres comunes con los que se conoce a la especie *P. serotina*, en México son: Capuli (D.F.), Capolli (Estado de México), Capollin (Estado de México y Puebla), Capulín, Capulín blanco, Ceraso (Baja California Sur), Cereso (Michoacán), Cerezo (Chiapas), Shengua, Xenhua, Chencua y Chengua (purépecha, Michoacán), Cusabi, Usabi (tarahumara, Chihuahua), Det-sé, deze y Gooto (otomí, Hidalgo), Jeco y Guasiqui (guarigio, Chihuahua), Pa ksmuk (mixe, Oaxaca), Pate y Chimal-ma-u (chontal, Oaxaca), Sacatón (Jalisco), T-mundaya (mixteco), Taunday (zapoteco), Tzu'uri (cora, Nayarit) y Elocapolin (náhuatl) (Lara y Márquez, 1996). Otros nombres comunes de *P. serotina* que se utilizan en diversas partes del mundo son: cerezo negro americano, cerezo salvaje, cerezo de aves y cereza ron (Estados Unidos de América) (Olszewska, 2007), cerezo criollo (Venezuela), y cerezo de los andes (Colombia) (Ordaz-Galindo, *et al.*, 1999).

## 2.4.3 Sinónimos

*Prunus capuli* Cav.; *Prunus salicifolia* Kunth; *Prunus serotina* Ehrenb. subs *capulí* (Cav.) McVaugh (Argueta, *et al.*, 1994).

## 2.4.4 Distribución geográfica

*Prunus serotina* Ehrenb. spp. *capulí* (Cav.) McVaugh, es originario de América boreal y habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde los 1000 a los 3900 metros sobre el nivel del mar. Es una planta silvestre cultivada en huertos familiares, asociada a bosques tropicales, caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, bosque de pino y bosque mixto de pino-encino (Argueta, *et al.*, 1994). El



capulín también crece en zonas de Europa que tienen un clima continental, donde se ha convertido en una especie naturalizada localmente (Olszewska, 2007).

*P. serotina* se encuentra distribuida en toda la República Mexicana (Figura 6), en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Lara y Márquez, 1996).



**Figura 6.** Distribución de *Prunus serotina* Ehrh., en la República Mexicana (Lara y Márquez, 1996).

### 2.4.5 Antecedentes etnobotánicos

El árbol y el fruto de *P. serotina* han sido usados como alimento y medicina tradicional desde tiempos prehispánicos. En Morelos, Hidalgo y en el Estado de México, se prepara un jarabe a partir del fruto de capulín, que se toma por cucharadas; el cocimiento de las hojas se ingiere cada cuatro horas o el cocimiento de la corteza se ingiere tres veces al día para el tratamiento de la tos. Mientras que en el Distrito Federal, para el tratamiento de la tos se prepara una infusión con las hojas, aunque también se puede añadir hojas de durazno, tejocote

y manzana. En Hidalgo y Estado de México, se emplea el capulín para aliviar a los enfermos de “empacho” entre los mixes, zapotecas y totonacos.

En casos de diarrea y dolor abdominal se cuecen raíz, corteza y hojas de capulín, con miel de abeja a punto de jarabe que se toma cada seis horas, o se hierven a fuego lento el fruto, hojas y azúcar hasta formar un jarabe, el cual se deja enfriar, se cuela, se le agrega limón (*Citrus aurantifolia*) y finalmente alcohol. Este preparado se administra tres veces al día. La propiedad antidiarreica es efectiva y ha producido algunas curaciones usando el cocimiento de la corteza al 5%, administrando al día 100 gramos divididos en dos tomas (Martínez, 1944). Las ramas se utilizan como agente fortificante para hojearse en el temazcal (Argueta, *et al.*, 1994).

En Sonora se describe el uso de las hojas y la corteza para tratar la diarrea, el catarro, las nubes en los ojos y las fiebres periódicas. También se utiliza esta planta en otras afecciones respiratorias, además de disentería, insomnio y aljorra (Argueta, *et al.*, 1994). La aljorra es una enfermedad dermatológica propia de recién nacidos y lactantes, caracterizada por la presencia de salpullido en la cara y en el cuerpo (Mellado y Zolla, 1994).

En México, el fruto es consumido fresco o en conserva. Por fermentación puede obtenerse del fruto una bebida alcohólica. En los mercados suelen venderse tamales de capulín que se preparan mezclando la pulpa del fruto con masa de maíz o harina, sometiéndola a la cocción por vapor (Martínez, 1959).

En el siglo XVI, Martín de la Cruz lo señala como útil para el tratamiento de dermatosis y dispepsia y como agente antipruriginoso. El código Florentino, menciona su uso para los ojos irritados. Francisco Hernández, en el mismo siglo, lo señala como “sedante, tónico, el cocimiento de la corteza cura los disentéricos, el polvo de la misma disuelve las nubes, aclara la vista, alivia las inflamaciones de los ojos y suaviza la lengua reseca por exceso de calor” (Argueta, *et al.*, 1994).



Francisco Ximénez, siguiendo a Hernández, dice: “el cocimiento de su corteza puesto al sol y tomado en cantidad de una onza cura las cámaras de sangre, el polvo de la misma disuelve las nubes en los ojos, clarifica la vista y cura las inflamaciones, ablanda y humedece la lengua cuando está seca por calor” (Martínez, 1944).

A fines del siglo XIX, la sociedad Mexicana de Historia Natural lo indicó como antipalúdico. En la Farmacopea Mexicana de 1896, se indica el uso de la corteza en infusión a la dosis de 4 g en 500 mL de agua como antidisentérica. En Datos para la Materia Medica Mexicana, en el año de 1898, se refiere su uso en el tratamiento de la disentería, nubes en los ojos, la inflamación y como antipalúdico.

Para el siglo XX Alfonso Herrera comenta: “es sedativo y narcótico”. En 1934, Maximino Martínez describe a la especie como agente antidiarreico, antiespasmódico, antipalúdico, antidisentérico, para tratar la neumonía y las enfermedades del sistema respiratorio. Luis Cabrera, en 1943, consigna la especie para tratamiento de abscesos, como antiblenorrágico, antiespasmódico y analgésico. Finalmente la Sociedad Farmacéutica de México (en el año de 1952) lo cita como antidiarreico, antipalúdico, astringente, eupéptico, para tratar gastritis atónica, sedante cardiaco, sedante de la circulación y sedante en catarros bronquiales, laríngeos y tónicos (Argueta, *et al.*, 1994).

La corteza de *P. serotina* se utiliza en los EE.UU. (aparece por primera vez en la USP en 1820) y en Inglaterra (aparece en la Farmacopea Británica en el año de 1863). En estas farmacopeas se describe su uso para el tratamiento de la tos irritante, la bronquitis y el asma, como ingrediente principal del jarabe de cereza silvestre (Evans, 2002).

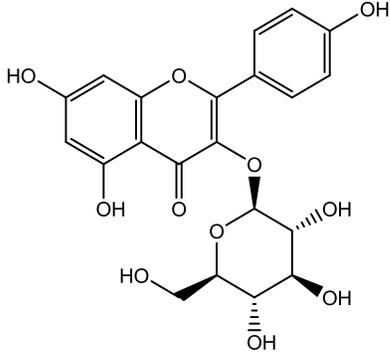
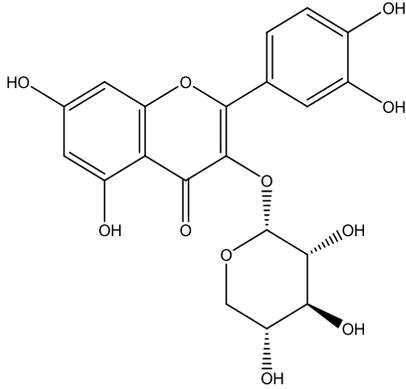
Los extractos de *P. serotina* recientemente se han sido reportados con actividad antioxidante significativa (Olszewska, 2007).



2.4.6 Composición química

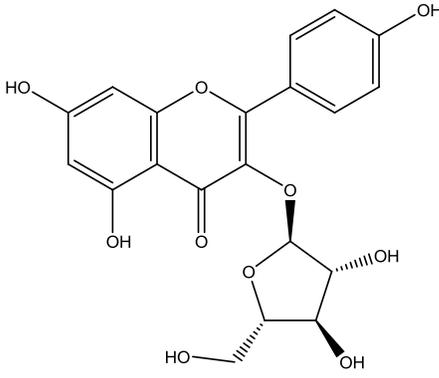
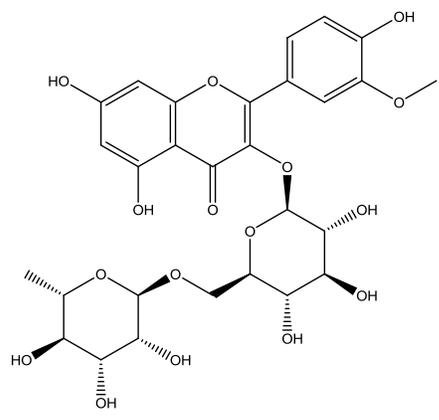
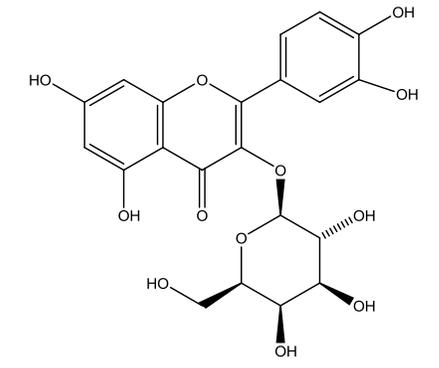
En la especie *P. serotina* se han aislado metabolitos pertenecientes a las categorías de flavonoides, glucósidos cianogénicos y terpenoides indicados en la Tabla 3 (Olszewska *et al.*, 2008; Ordaz-Galindo, *et al.*, 1999; Santamour, *et al.*, 1998; Horsley y Meinwald, 1981).

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina*.

Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O-β-D-glucopiranosido de campferol (astragalina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-β-D-xilopiranosido de quercetina (reynoutrina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b

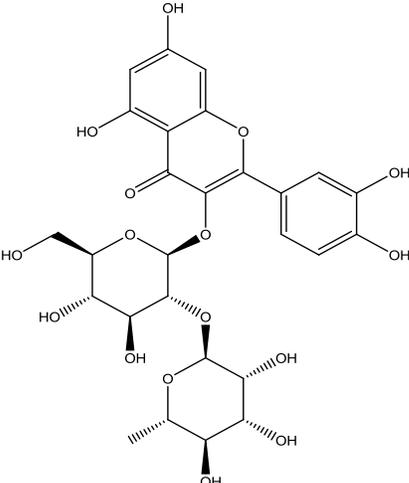
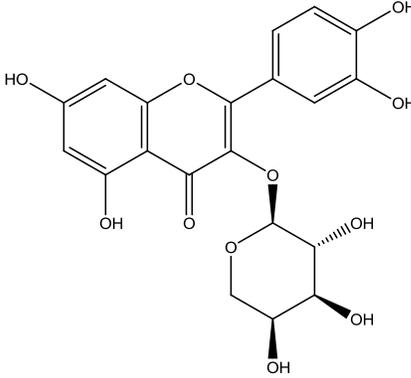
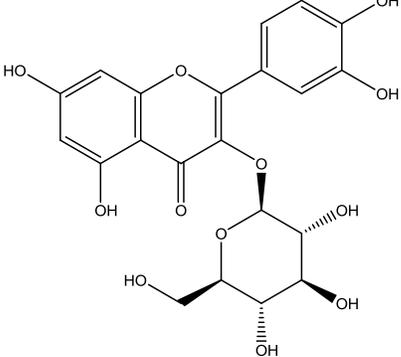


**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O- $\alpha$ -L-arabino- furanósido de campferol (juglanina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-(6''-O- $\alpha$ -L- ramnopiranosil)- $\beta$ -D- glucopiranosido de isorhamnetina (narcissina)	Olszewska, 2005a Olszewska, 2005b
Hojas		3-O- $\beta$ -D-galactósido de quercetina (hiperósido)	Ibarra- Alvarado, <i>et</i> <i>al.</i> , 2009

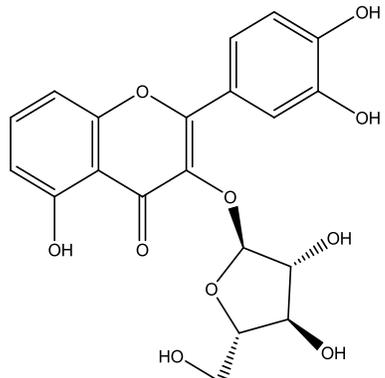
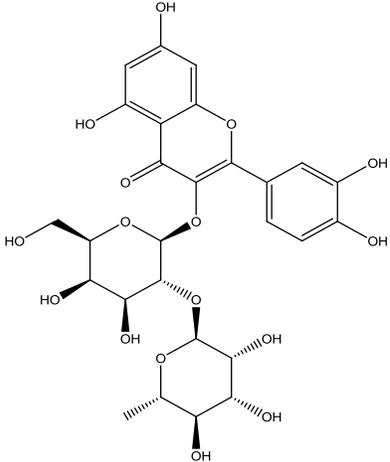
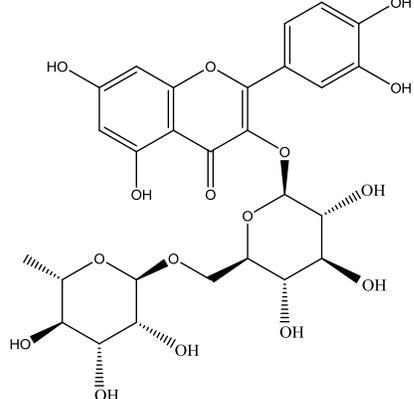


**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

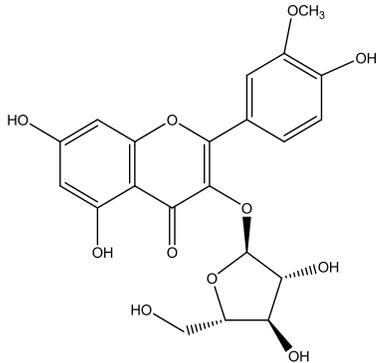
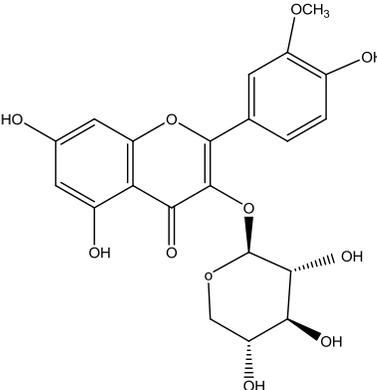
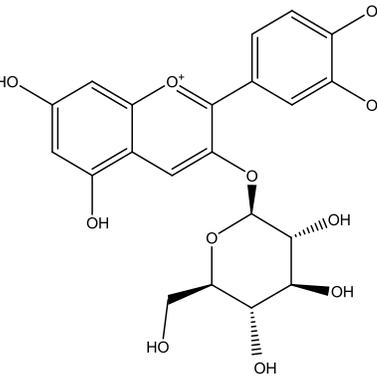
Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O-(2''-O-α-L-ramnopiranosil)-β-D-glucopiranosido de quercetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-α-L-arabino-piranosido de quercetina (juajaverina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-β-D-glucopiranosido de quercetina (isoquercetina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b



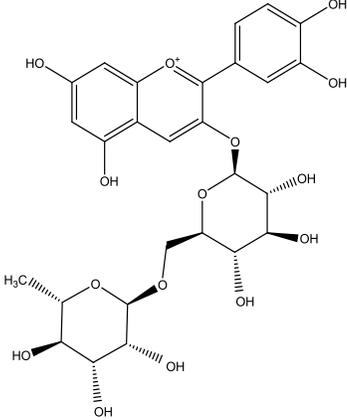
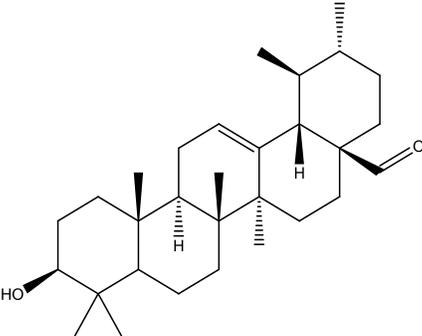
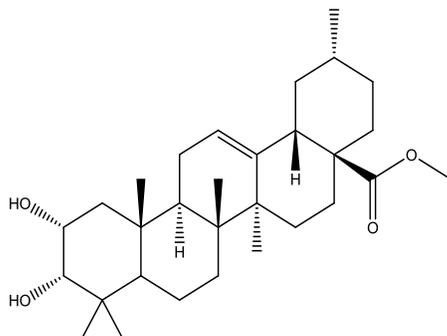
**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O- $\alpha$ -L-arabino- furanósido de quercetina (avicularina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-(2''-O- $\alpha$ -L- ramnopyranosil)- $\beta$ -D- galactopiranosido de quercetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-rutinósido de quercetina (rutina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

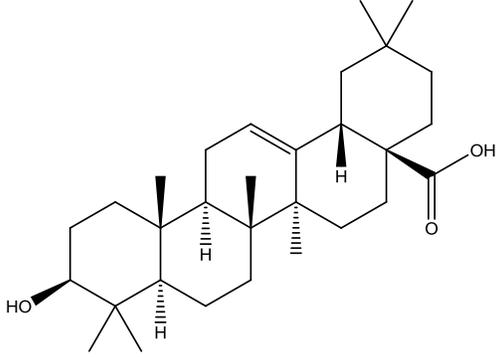
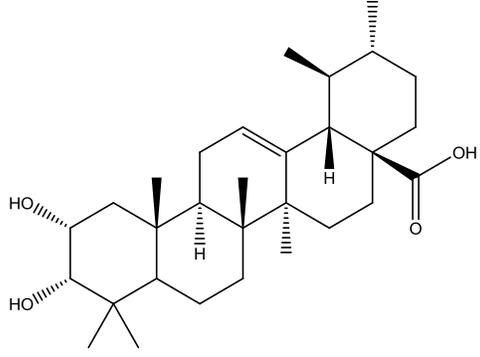
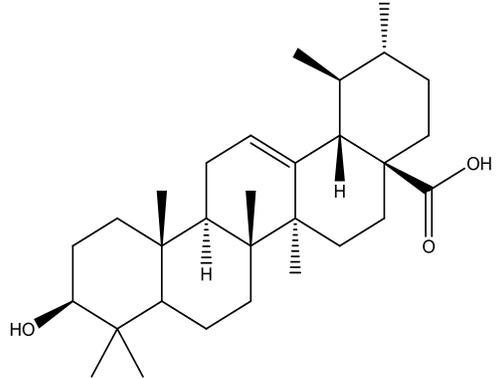
Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O- $\alpha$ -L-arabino- furanósido de isoramnetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O- $\beta$ -D- xilopiranosido de isoramnetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-glucósido de cianidina	Ordaz-Galindo <i>et al.</i> , 1999

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Flavonoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O-rutinósido de cianidina	Ordaz-Galindo, <i>et al.</i> , 1999
Triterpenoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		aldehído ursólico	Biessels <i>et al.</i> , 1974
Hojas		2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroxi-urs-12-en-28-ato de metilo	Biessels., <i>et al.</i> , 1974

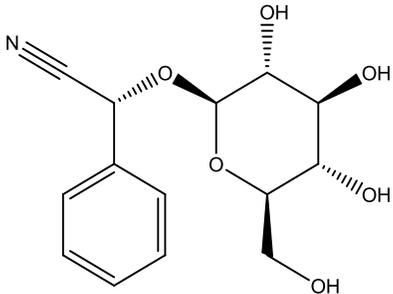
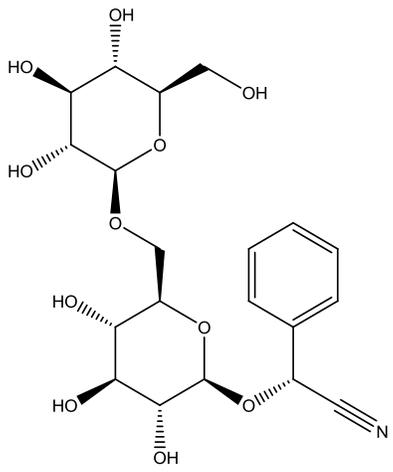
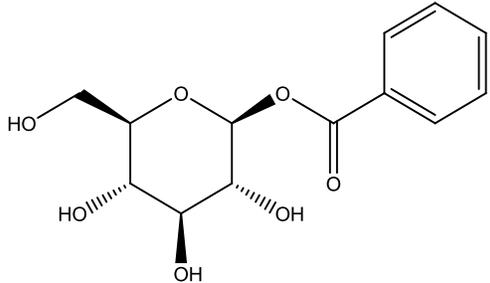


**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Triterpenoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		ácido oleanólico	Olszewska, 2008
Hojas		ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroxiurs-12-en-28-oico (ácido 2 $\alpha$ -hidroxiursólico, ácido corosólico)	Olszewska, 2008
Hojas		ácido ursólico	Olszewska, 2008

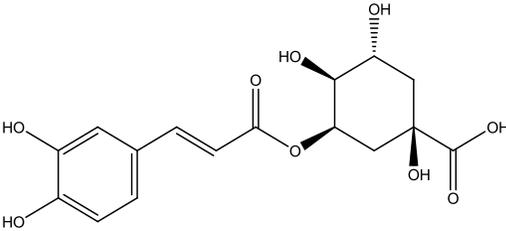


**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Glucósidos Cianogénicos			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Semillas Corteza		prunasina	Santamour <i>et al.</i> ,1998
Semillas		amigadalina	Santamour <i>et al.</i> ,1998
Compuestos Aromáticos Simples			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		1-benzoato $\beta$ -D- glucopiranososa (glucosa 1- benzoato)	Horsley y Meinwald, 1981



**Tabla 3.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina* (continuación).

Fenilpropanoides			
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		ácido-5-O- cafeoilquinico (ácido clorogénico)	Olszewska, 2007

Las hojas contienen aceite esencial, grasa sólida, resina ácida de funciones glucosídicas, amigdalina, un alcaloide de constitución desconocida, ácido tánico, glucosa, principios pépticos, colorantes, clorofila y sales minerales siendo los constituyentes más importantes la amigdalina y el alcaloide. Las hojas frescas desarrollan ácido cianhídrico en contacto con el agua (Martínez, 1944). En las hojas también se han detectado flavonoides (glucósidos de campferol, quercetina, isorhamnetina y cianidina), ácido clorogénico (Olszewska, 2008), derivados de urs-12-en-28-al-3-beta-ol, el compuesto aromático  $\beta$ -D-glucopiranos-1-benzoato (Horsley y Meinwald, 1981) y prunasina (Santamour, *et al.*, 1998).

En el aceite esencial de las hojas se han encontrado alcohol bencílico, benzaldehído, alcohol cinámico, y cinamaldehído, como compuestos mayoritarios (Ibarra-Alvarado, *et al.*, 2009).

De la corteza se ha obtenido, por destilación, ácido cianhídrico, un aceite esencial análogo al que producen las almendras amargas, almidón, resina, taninos, ácido gálico, materia grasa, materia colorante roja, cal, hierro y potasa (Martínez, 1959). En la corteza, también se ha encontrado, ácido benzoico, ácido *p*-cumarico y prunasina, cuya hidrólisis produce glucosa, benzaldehído y ácido cianhídrico (Evans, 2002). Se ha reportado que el aceite esencial de la corteza a la dosis de



dos gotas produjo la muerte de un gato en menos de cinco minutos (Martínez, 1944).

El análisis de los frutos ha dado el siguiente resultado: humedad (73.74%), cenizas (0.73%), albuminoides (2.98%), glucosa (17.74%), sacarosa (1.23%), grasa (0.16%) y celulosa (1.54%) (Martínez, 1959). En el fruto se han detectado antocianinas (Olszewska, 2008) como 3-O-glucósido de cianidina y 3-O-rutinósido de cianidina (Ordaz-Galindo, 1999).

## 2.5 Aceites esenciales

### 2.5.1 Definición

Los aceites esenciales se clasifican como metabolitos secundarios de las plantas (Linskens y Jackson, 1991) y se definen como mezclas complejas de compuestos volátiles. Los aceites esenciales están constituidos por hidrocarburos tales como los terpenos, específicamente monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ) (Bertucco y Vetter, 2001), hidrocarburos alifáticos (lineales, ramificados, saturados y no saturados) de bajo peso molecular (Dorman y Deans, 2000) e hidrocarburos oxigenados como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y éteres (Bertucco y Vetter, 2001). Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y contribuyen al olor y sabor característico de las plantas. El mecanismo de acción de estos compuestos en contra de las bacterias no está completamente elucidado, pero se especula que involucra una perturbación en la membrana (Griffin *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 1997).

Los aceites esenciales son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella y poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. Son solubles en disolventes orgánicos y sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada (Cerpa, 2007).



## 2.5.2 Métodos de extracción

### 2.5.2.1 Hidrodestilación

Los usos de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación son muy amplios, como aditivos e insumos en perfumería, la industria farmacéutica y cosmética y en la industria alimentaria (Cerpa, 2007).

El término hidrodestilación, se usa para definir el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso de agua en forma de vapor saturado a presión atmosférica, donde la materia prima está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor, mientras que, cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado destilación por arrastre de vapor. Conforme el vapor entra en contacto con la materia prima se libera el aceite esencial debido a su volatilidad. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del hidrodestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental (Cerpa, 2007).

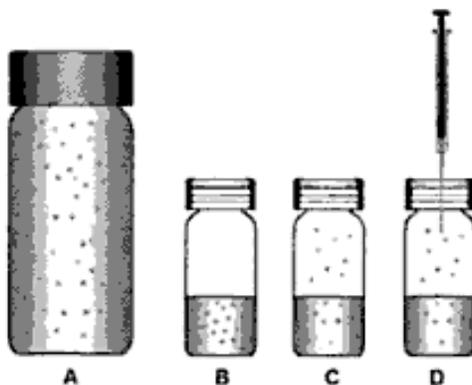
Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles siguen la ley de Dalton sobre las presiones parciales, la cual dice que “cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo, y la suma de las presiones de cada uno es igual a la presión total del sistema”. Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor de cada líquido es igual a la presión atmosférica. Si se realiza una separación por arrastre de vapor de agua y se trabaja a presión atmosférica, se podrá separar un producto de mayor punto de ebullición que el del agua a una temperatura inferior a 100 °C (García, *et al.*, 2001).



La principal desventaja de la hidrodestilación es que puede producir alteraciones en los componentes del aceite esencial, como la hidrólisis de compuestos tipo éster, debido a la temperatura del proceso (Bertucco y Vetter, 2001).

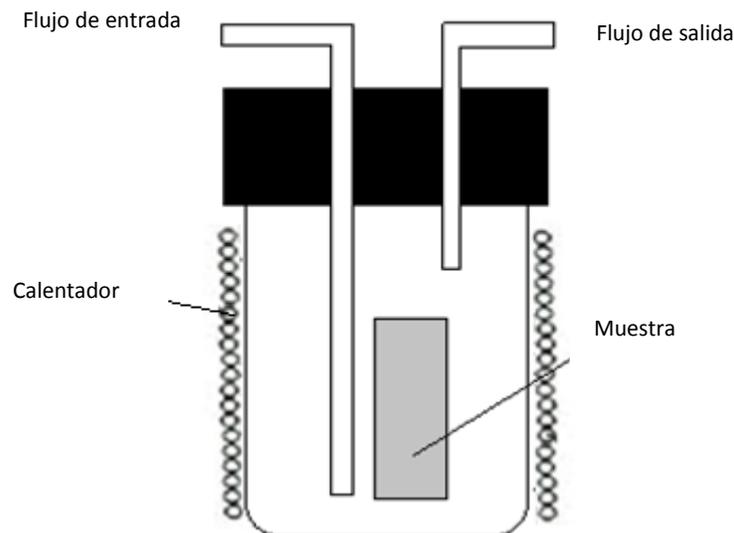
### 2.5.2.2 Métodos *headspace* (fase gaseosa)

Se dividen en tres categorías: *headspace* estática, *headspace* dinámica y método de purga y trampa. En los tres casos los compuestos volátiles de un material sólido o líquido son muestreados de una atmósfera gaseosa adyacente a la materia prima. En la técnica *headspace* estática o al equilibrio (Figura 7), se toma una alícuota directamente de la atmósfera gaseosa adyacente a la muestra problema, y posteriormente es inyectada al cromatógrafo de gases (Marsili, 2002). Esta técnica se emplea cuando los analitos tienen una alta presión de vapor y comúnmente se utiliza para analizar compuestos volátiles de bajo peso molecular. Tiene como ventajas el bajo costo, eliminación de disolventes y la sencilla preparación de la muestra. Sin embargo carece de sensibilidad (Marsili, 2002).



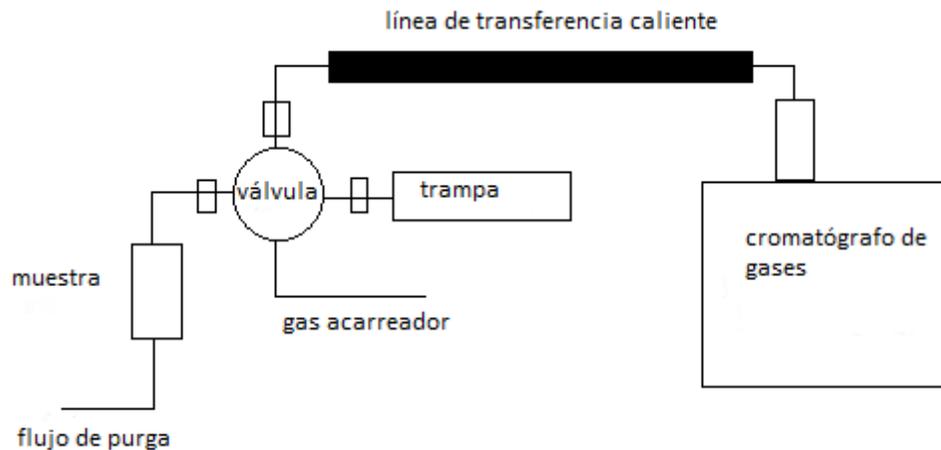
**Figura 7.** *Headspace* estática. A) La muestra se colecta en un contenedor sin espacio sobre el líquido para evitar la pérdida de compuestos volátiles en la fase gaseosa. B) Una alícuota de la muestra es colocada en un vial con *headspace* (espacio de cabeza o fase gaseosa) y se coloca un septo sobre el vial. C) Los compuestos volátiles en la fase líquida establecen un equilibrio con la fase gaseosa. D) Se remueve una alícuota de la fase gaseosa con una jeringa herméticamente cerrada, la cual es inyectada dentro del cromatógrafo de gases (Pawliszyn, 2002).

La técnica de *headspace* dinámica (Figura 8) es un método continuo de extracción en el cual los analitos orgánicos son concentrados en la fase gaseosa y posteriormente se transfieren al sistema cromatográfico. La atmósfera alrededor de la muestra es barrida constantemente por el flujo de un gas acarreador, permitiendo la concentración de la muestra (el flujo constante evita el establecimiento de un equilibrio entre la muestra y la fase gaseosa, favoreciendo que una mayor cantidad de analito sea transferido a la fase gaseosa) (Marsili, 2002).



**Figura 8.** *Headspace* dinámica (Marsili, 2002).

El término de purga y trampa se refiere a análisis de muestras líquidas por burbujeo del gas de la purga a través de la muestra líquida. Durante la colección de la muestra, el gas acarreador fluye del recipiente de muestra, a través de la válvula, hacia la trampa (donde se condensa o se adsorbe el analito en un material sólido) posteriormente el gas acarreador fluye hacia la trampa, que es calentada para volatilizar los compuestos orgánicos y finalmente son transferidos hacia el sistema cromatográfico (Figura 9) (Marsili, 2002).



**Figura 9.** Sistema purga y trampa (Marsili, 2002).

Las técnicas de *headspace* dinámica y purga y trampa tienen las mismas ventajas que *headspace* estática, incluyendo eliminación del solvente, automatización y sencilla preparación de la muestra. Además, la etapa de trampa, incrementa la sensibilidad (Marsili, 2002), permitiendo el análisis de compuestos volátiles hasta en partes por trillón (ppt) (Pawliszyn, 2002). Sin embargo, las técnicas de *headspace* dinámica y purga y trampa tienen la desventaja de requerir un alto grado de instrumentación (Marsili, 2002). En la Tabla 4 se resumen las características de *headspace* estática y *headspace* dinámica.

**Tabla 4.** Comparación de *headspace* estática y *headspace* dinámica (Pawliszyn, 2002).

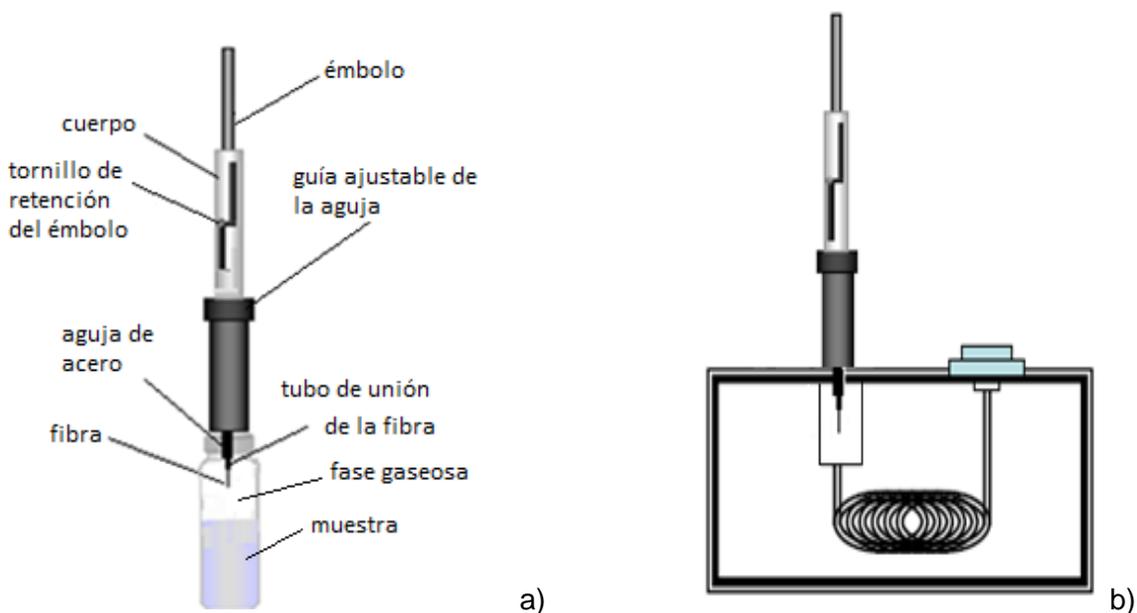
	<i>headspace</i> estática	<i>headspace</i> dinámica (purga y trampa)
Rango de concentración	Partes por billón. Recuperación parcial de analito.	Partes por trillón. Se recupera la mayoría del analito.
Automatización	Manual con una jeringa herméticamente cerrada hasta equipos automatizados que manejan alrededor de 10 muestras.	Equipos automatizados de purga y trampa que manejan hasta 70 muestras.
Mantenimiento	Mínimo.	La trampa debe ser limpiada.
Aplicaciones comunes	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Etanol en sangre.</li> <li>2. Solventes residuales en productos farmacéuticos.</li> <li>3. Saborizantes en alimentos.</li> <li>4. Compuestos volátiles en bebidas, aguas residuales y suelos.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Monómeros en polímeros.</li> <li>2. Saborizantes en alimentos</li> <li>3. Compuestos volátiles en bebidas, aguas residuales y suelos.</li> </ol>

Una modificación del muestreo en el *headspace* estático es la microextracción en fase sólida (Duque, 2005). La microextracción en fase sólida es una técnica analítica que incorpora las etapas de muestreo, extracción y enriquecimiento (o concentración de la muestra) en un solo paso, sin requerir el uso de disolventes orgánicos (Sánchez, 2007).

La microextracción en fase sólida, en fase gaseosa (o espacio de cabeza) (EC-MEFS) que por sus siglas en inglés también se denomina HS-SPME (*Headspace Solid-Phase Microextraction*), es una técnica que permite extraer analitos volátiles inmersos en matrices complejas, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas para su posterior identificación.

La microextracción en fase sólida, en fase gaseosa consta de dos etapas: a) la adsorción de los compuestos volátiles presentes en algún material adsorbente (como el silicón), y b) la transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico (Figura 10) (Hinshaw, 2003). La ventaja de utilizar esta técnica es que disminuye la formación de artefactos (hidrólisis de ésteres o rearreglos de hidrocarburos), es un método sensible (Linskens y Jackson, 1991), elimina el uso de disolventes y la muestra es fácil de preparar (Marsili, 2002).





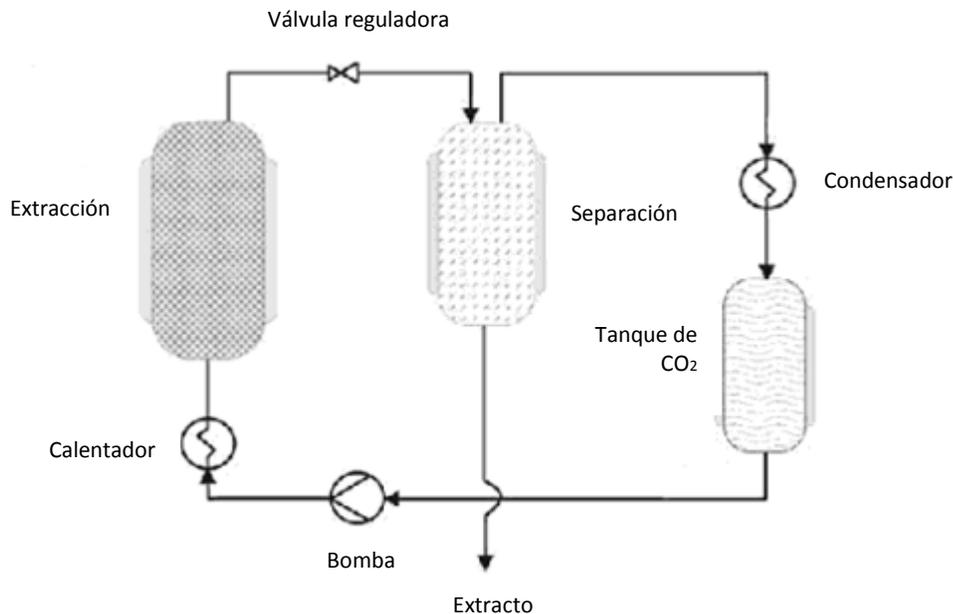
**Figura 10.** a) Microextracción en fase sólida, en fase gaseosa (HS-SPME). La extracción se lleva a cabo en el espacio de cabeza (o en la fase gaseosa) del vial por encima de la muestra. De este modo los analitos viajan, en primer lugar, de la muestra al espacio de cabeza y posteriormente se adsorben en la fibra. b) Transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico (modificado de Sánchez, 2007).

### 2.5.2.3 Vaporización directa

El vaporizador está conectado al cromatógrafo de gases. La muestra se calienta a 250 °C por 60 segundos. Después de la vaporización los componentes volátiles son arrastrados por el gas acarreador hacia la columna capilar del cromatógrafo de gases (Linskens y Jackson, 1991).

### 2.5.2.4 Extracción a alta presión con CO<sub>2</sub> supercrítico

Se extraen los compuestos volátiles, normalmente a 32-60 °C, a una presión de 74 a 120 bar, la cual incrementa el poder del disolvente (Figura 11) (Bertucco y Vetter, 2001).



**Figura 11.** Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. La muestra sólida se coloca en el extractor y se le hace pasar un flujo de CO<sub>2</sub> supercrítico (las condiciones de temperatura y presión son establecidas previamente mediante el calentador y la bomba, respectivamente). El CO<sub>2</sub> supercrítico y los compuestos disueltos son transportados al tanque de separación, donde son sometidos a cambios en la presión y la temperatura. Finalmente, el CO<sub>2</sub> regresa al tanque para ser reutilizado (modificado de Marsili, 2002).

El principio de la extracción a alta presión se basa en el hecho de que un gas en la región supercrítica se comporta como un líquido, tiene mayor fuerza de disolvente que los disolventes líquidos y posee baja viscosidad (que se traduce en alta difusión en la muestra).

El CO<sub>2</sub> se utiliza porque es no flamable, está disponible en alta pureza, es químicamente estable, no corrosivo y tiene un punto de ebullición bajo (lo cual permite removerlo fácilmente del extracto). En condiciones supercríticas, el CO<sub>2</sub> es un solvente lipofílico. Se considera que el CO<sub>2</sub> líquido o supercrítico existe a presiones superiores de 7.3 MPa y 31.2 °C (Marsili, 2002).

La ventaja de la extracción de componentes volátiles, presentes en una muestra, mediante CO<sub>2</sub> líquido o supercrítico, es que la muestra no sufre degradación

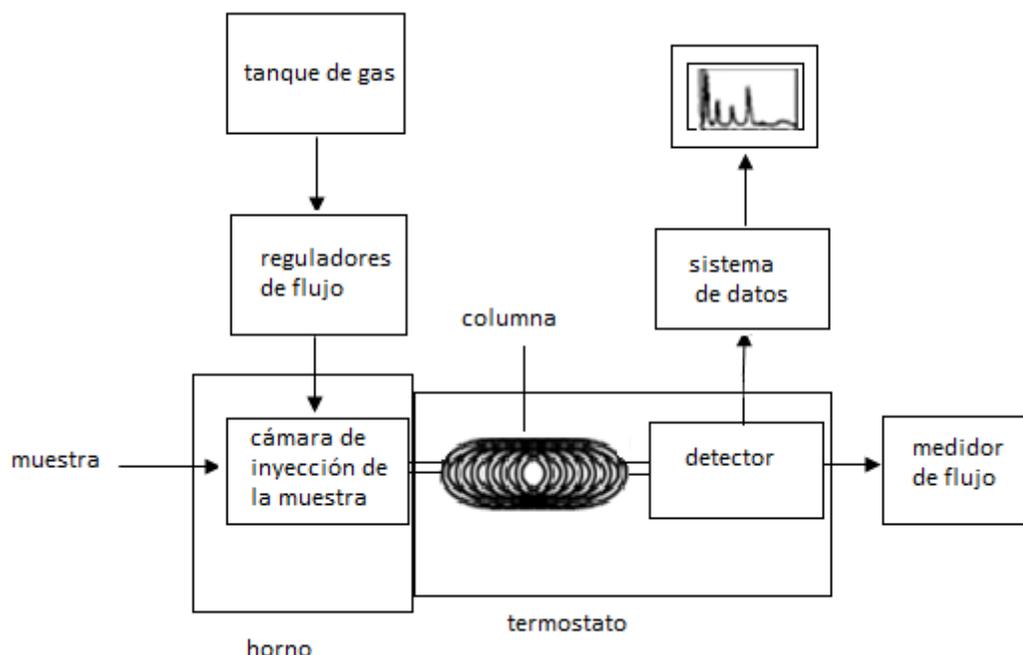
térmica (Linskens y Jackson, 1991) o la contaminación por el uso de disolventes (Doneanu y Anitescu, 1998).

### **2.5.3 Métodos de separación**

#### **2.5.3.1 Cromatografía de gases**

Se emplea para componentes volátiles, químicamente estables (Baquero, 2006). En la Figura 12 se observa el diagrama de un cromatógrafo de gases. Existen dos tipos de cromatografía: la cromatografía gas-líquido y la cromatografía gas-sólido. En la primera el analito vaporizado se reparte entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un relleno sólido inerte o en las paredes de un tubo capilar, mientras que la cromatografía de gas-sólido se basa en una fase estacionaria sólida en la que la retención de los analitos ocurre por adsorción. La cromatografía de gas-sólido tiene aplicación limitada debido a la retención semipermanente de moléculas activas o polares y la obtención de picos de elusión con colas muy notables (la formación de colas es el resultado de la naturaleza no lineal del proceso de adsorción). La elusión en cromatografía de gases se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte que transporta las moléculas del analito a través de la columna (Skoog, *et al.*, 2008).





**Figura 12.** Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases (modificado de Skoog, *et al.*, 2008).

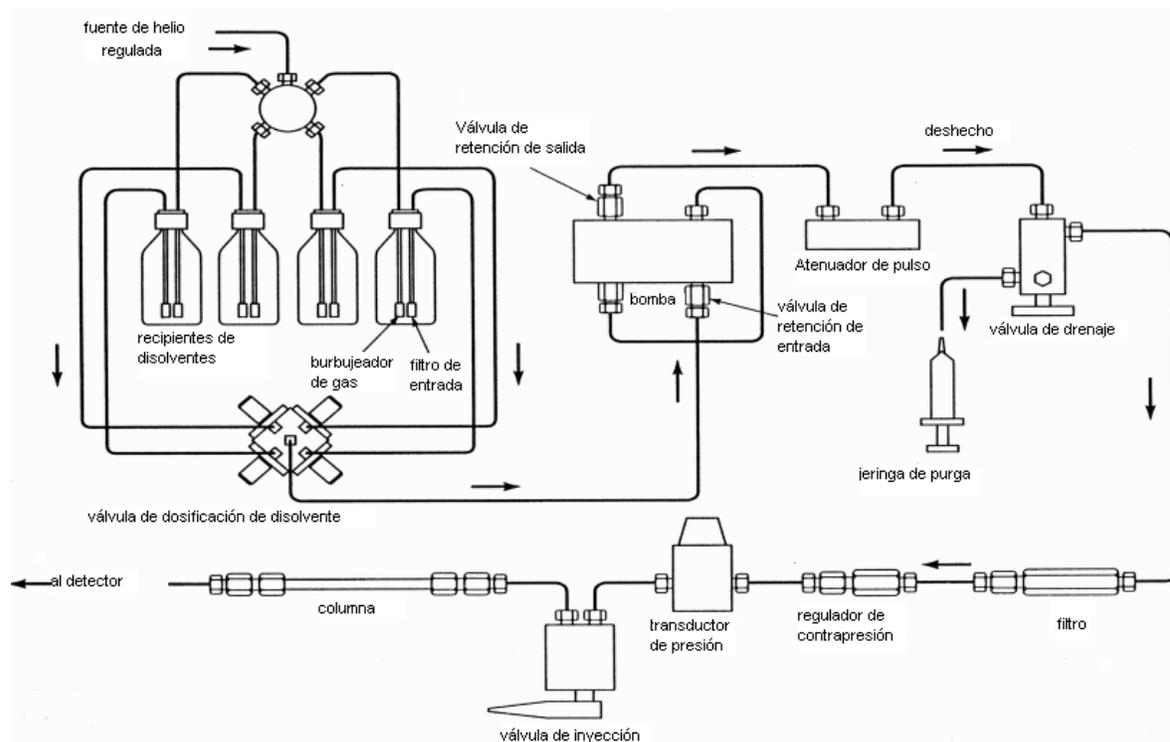
### 2.5.3.2 HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés *High-Performance Liquid Chromatography*, se emplea para realizar una separación preparativa de los compuestos del aceite esencial y su posterior análisis por RMN-<sup>1</sup>H (Resonancia magnética nuclear protónica) y RMN-<sup>13</sup>C (Resonancia magnética nuclear de carbono-13), también se utiliza en la cuantificación de estos compuestos (Linskens y Jackson, 1991).

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un tipo de cromatografía en columna en la cual la fase estacionaria se compone de partículas finamente divididas (tamaños de partícula de 3-10 µm) y la fase móvil se introduce a través de las partículas mediante presión elevada (de hasta 6500 libras por pulgada cuadrada), para lograr una velocidad de flujo satisfactoria. Los tipos de cromatografía de líquidos de alta resolución suelen clasificarse según el



mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria. Éstos comprenden: (1) cromatografía de reparto o de líquido-líquido, (2) cromatografía de adsorción o líquido-sólido, (3) cromatografía de intercambio de iones o iónica, (4) cromatografía de exclusión molecular, (5) cromatografía de afinidad y (6) cromatografía quiral (Skoog, *et al.*, 2005). En la Figura 13 se observa el diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.



**Figura 13.** Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Skoog, *et al.*, 2005).

## 2.5.4 Métodos de identificación

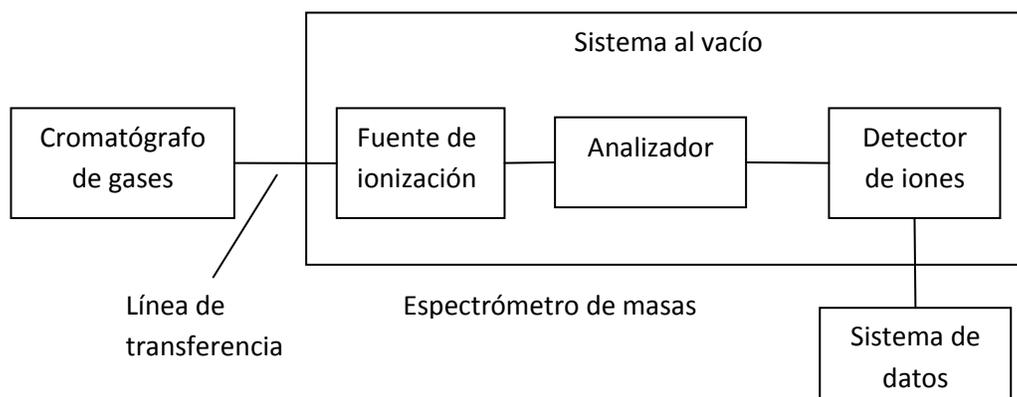
Para identificar los compuestos presentes en los aceites esenciales se utilizan las técnicas de retención cromatográfica (por ejemplo Índices Kovats), Espectroscopia de ultravioleta (UV), Espectroscopia de infrarrojo (IR), Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H), Resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) y Espectrometría de masas (MS) (Linskens y Jackson, 1991). A continuación se describe el índice de retención de Kovats.

Ervin Kovats propuso por primera vez el índice de retención en 1958 para identificar solutos a partir de los cromatogramas (Skoog, *et al.*, 2008). El índice de retención relaciona el tiempo de retención de un soluto con los tiempos de retención de los alcanos lineales (Harris, 2001). Por definición el índice de retención de un alcano normal es igual a 100 veces el número de carbonos del compuesto sin considerar el relleno de la columna, la temperatura u otras condiciones cromatográficas (Skoog, *et al.*, 2008). Cuando una serie homóloga de *n*-alcanos es separada por cromatografía de gases, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación es controlada principalmente por las diferencias en la presión de vapor (diferencias en el punto de ebullición) (Monroe, *et al.*, 2009). Los índices de retención para compuestos que no sean alcanos normales varían cientos de unidades de índice de retención dependiendo de la columna que se utilice (Skoog, *et al.*, 2008), porque estos índices dependen de la fase estacionaria, pero no dependen de otras variables como dimensiones de la columna, temperatura o velocidad de flujo del gas acarreador (Rouessac, 2007).

La ventaja del sistema de los índices de retención es que se basa en materiales de referencia fáciles de conseguir y que abarcan un amplio intervalo de puntos de ebullición. Existen bibliotecas de datos que incluyen los índices de retención de diversos compuestos con diferentes tipos de columnas, permitiendo la búsqueda del índice de retención del compuesto de interés y la identificación de este compuesto con una computadora de escritorio. Si se aplican los datos de retención de dos o más columnas cromatográficas se mejoran las oportunidades de identificar de manera correcta un compuesto desconocido. Las columnas se pueden utilizar en experimentos separados o conectadas en tándem. El uso de dos o más columnas en serie se llama cromatografía multidimensional. La combinación de cromatografía de gases con varios detectores espectroscópicos, en particular la espectrometría de masas, mejora sin lugar a dudas la identificación de los componentes (Skoog, *et al.*, 2008).



La cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas (GC-MS) (Figura 14) es la técnica principal para separar e identificar compuestos volátiles en mezclas (Skoog, *et al.*, 2008). La espectrometría de masas mide la relación masa-carga ( $m/z$ ) de los iones que se producen a partir de la muestra. En el espectrómetro de masas las moléculas de la muestra entran a la fuente de ionización, que ioniza la muestra. Las fuentes de ionización de la muestra rompen los enlaces de químicos en las moléculas de la muestra, produciendo los iones moleculares y moléculas no ionizadas. Los fragmentos y moléculas sin carga normalmente son eliminados en la fuente de iones por bombas de vacío. Después los iones moleculares se dirigen al analizador, el cual sirve para dividir los iones según sus valores de  $m/z$ . Posteriormente, los iones separados se detectan y el sistema de análisis de datos genera una gráfica de intensidad de los iones frente al valor  $m/z$  (Skoog, *et al.*, 2005).



**Figura 14.** Diagrama de bloques de un instrumento GC-MS (Skoog, *et al.*, 2005).



## 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades de la cavidad oral, como la caries dental, representan un problema de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo. Se ha calculado que entre un 60% y 90% de los escolares de todo el mundo tienen caries dental (WHO, 2004). En el año 2001, en México, se reportó que el 58% de los niños de 12 años padecían caries dental (SSA, 2006).

El impacto negativo de las enfermedades orales sobre la salud de la población es muy importante ya que les ocasionan dolor, deterioro funcional y disminución de la calidad de vida. Por otra parte, los tratamientos de estas enfermedades son costosos y se calcula que representan entre el 5 y 10% de los costos de salud en los países industrializados, y van más allá de estos recursos en los países en vías de desarrollo (WHO, 2004).

La caries dental es la enfermedad infecciosa más común en humanos, en la que *Streptococcus mutans* es el principal agente causal (Balakrishnan, *et al.*, 2000). El tratamiento de elección para esta enfermedad utiliza principalmente antibióticos, sin embargo, con el uso de estos medicamentos aparecen bacterias resistentes, principalmente por su uso indiscriminado (Marshall y Arenas, 2003). La aparición de bacterias resistentes requiere el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos que inhiban los mecanismos de resistencia. En este sentido las plantas poseen la habilidad de sintetizar agentes antimicrobianos que las protegen de los microorganismos patógenos en su entorno (Gibbons, 2005), lo cual las convierte en una opción para la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en obtener, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana de algunos compuestos presentes en el aceite esencial y en la



## JUTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

infusión de las hojas de la especie *Prunus serotina* contra la bacteria patógena *Streptococcus mutans*. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Preparar el aceite esencial a partir de las hojas frescas de *Prunus serotina*, mediante un proceso de hidrodestilación.
- Separar y caracterizar los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas mediante la técnica GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats).
- Extraer, separar y caracterizar los compuestos volátiles presentes en las hojas de *Prunus serotina* mediante la técnica HS-SPME-GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats).
- Preparar la infusión a partir de las hojas desecadas de *Prunus serotina*.
- Realizar fraccionamientos a partir de la infusión, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición. Esta actividad permitirá la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Aislar los compuestos activos a partir de las fracciones primarias y/o secundarias de la infusión.
- Identificar los compuestos activos presentes en la infusión mediante la comparación de sus tiempos de retención y puntos de fusión con estándares de referencia.
- Evaluar la actividad antibacteriana de la infusión, el aceite esencial y de algunos compuestos presentes en la infusión y en el aceite esencial, de las hojas de la especie *Prunus serotina*, contra la bacteria patógena de la cavidad oral *Streptococcus mutans*.



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Procedimientos generales

#### 4.1.1 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con diferentes agentes cromógenos (vainillina sulfúrica al 1% y anisaldehído) seguidos de calentamiento (aproximadamente 110 °C) hasta la visualización completa de los compuestos.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre Sephadex LH-20 (Fluka Chemie GmbH, con dimensiones de 2.5 cm de diámetro x 40 cm de longitud) y 100% de metanol como fase móvil.

El análisis de los compuestos presentes en el aceite esencial y los volátiles obtenidos mediante la microextracción en fase sólida se realizó en un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas, empleando un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) el cual fue acoplado a un espectrómetro (LECO Pegasus 4D TOF). En la cromatografía de gases se utilizó una columna capilar DB-5 (10 m de longitud x 0.18 mm de diámetro interno x 0.18 µm de grosor de película) y helio de alta pureza, como gas portador.



## 4.2 Material vegetal

Las hojas frescas de *Prunus serotina* fueron recolectadas en los jardines de Ciudad Universitaria, México, D.F., el 2 de agosto de 2010. Se recolectaron 1.3 kg de hojas frescas de *Prunus serotina*, de las cuales, 1 kg fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente, y se destinaron a la preparación de la infusión, mientras que el resto de las hojas frescas se utilizaron para la preparación de las esencias y el análisis por HS-SPME. Se depositó una muestra de referencia en el Herbario de Querétaro (QMEX).

## 4.3 Estudio químico de las hojas de *Prunus serotina*

### 4.3.1 Preparación del aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina*

La preparación de las esencias se realizó mediante hidrodestilación (2 L de H<sub>2</sub>O), por un periodo de 4 horas, a partir del material vegetal fresco (200 g). El aceite esencial se separó del destilado mediante partición con 50 mL de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La técnica de partición se realizó por triplicado y la fase orgánica resultante se concentró a presión reducida. Posteriormente, el aceite esencial fue secado con sulfato de sodio anhidro. Mediante este proceso se obtuvieron 100 mg de aceite esencial. Finalmente, el aceite esencial se almacenó hasta su posterior análisis a 4°C, en un frasco ámbar.

### 4.3.2 GC-MS-TOF del aceite esencial

El análisis del aceite esencial se realizó en un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). En la Tabla 5 se enlistan las condiciones de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizadas para el análisis del aceite esencial.



## PARTE EXPERIMENTAL

**Tabla 5.** Condiciones del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial.

Cromatografía de gases (GC)	Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos.
	Cromatógrafo de gases utilizado	Marca: Agilent, Modelo: 6890N
	Columna capilar	DB-5 (10 m × 0.18 mm di × 0.18 μm)
	Temperatura del inyector	300 °C
	Temperatura programada del horno	Temperatura inicial: 40 °C (1minuto) Velocidad: 20 °C/minuto Temperatura final: 300 °C (5 minutos)
	Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
	Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
	Volumen de inyección	1 μL
	Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
Espectrometría de masas (MS)	Temperatura de la línea de transferencia	250 °C
	Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
	Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
	Adquisición espectral	20 espectros/segundo
	Retraso/encendido del filamento	0 minutos
	Intervalo masas	33-400u
	Temperatura de la cámara de ionización	200 °C
	Compuesto de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)



### 4.3.3 Análisis por HS-SPME-GC-MS-TOF de las hojas de *Prunus serotina*

La microextracción se realizó empleando la fibra de 50/30  $\mu\text{m}$  de Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), marca Supelco (lote: P340030, número de catálogo: 573-48-U). Inicialmente, se limpió la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases a una temperatura de 300 °C durante 50 minutos para obtener el cromatograma del blanco. Para realizar la microextracción se empleó aproximadamente 6.25 g de la pulpa homogeneizada, 5 mL de agua y 20 mg de NaCl, los cuales se colocaron en un vial de 40 mL con septo de PTFE (politetrafluoroetileno o teflón). El vial se agitó a una temperatura de 45 a 50 °C y la fibra para la microextracción se expuso en el espacio de la cabeza (fase gaseosa) del vial para adsorber los analitos durante 60 minutos.

Posteriormente, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo de gases, para realizar la desorción (tiempo de desorción de 3 minutos). El análisis de los componentes volátiles de las hojas se realizó en un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). En la Tabla 6 se enlistan las condiciones de la cromatografía de gases y espectrometría de masas utilizadas para el análisis de los compuestos volátiles en las hojas de *P. serotina*.



## PARTE EXPERIMENTAL

**Tabla 6.** Condiciones del análisis HS-SPME-GC-MS-TOF.

Microextracción en fase sólida, en la fase gaseosa (HS-SPME)	Microfibra utilizada	2cm 50/30 $\mu$ m DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U.
	Tiempo de exposición de la fibra	60 minutos.
	Temperatura de la muestra	45-50 °C (baño de agua)
	Posición de la fibra en la extracción	En la fase gaseosa o espacio de cabeza (HS)
Cromatografía de gases (GC)	Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos.
	Cromatógrafo de gases utilizado	Marca: Agilent, Modelo: 6890N
	Columna capilar	DB-5 (10 m $\times$ 0.18 mm di $\times$ 0.18 $\mu$ m)
	Temperatura del inyector	300 °C
	Temperatura programada del horno	Temperatura inicial: 40 °C (1minuto) Velocidad: 20 °C/minuto Temperatura final: 300 °C (5 minutos)
	Tipo de inyección	Splitless (sin división de flujo)
	Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
	Volumen de inyección	1 $\mu$ L
	Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
Espectrometría de masas (MS)	Temperatura de la línea de transferencia	250 °C
	Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
	Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
	Adquisición espectral	20 espectros/segundo
	Retraso/encendido del filamento	0 minutos
	Intervalo masas	33-400u
	Temperatura de la cámara de ionización	200 °C
	Compuesto de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)



#### 4.3.4 Identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial y los volátiles separados utilizando la microextracción en fase sólida

Se identificaron los compuestos mediante comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del instrumento y la base de datos electrónica NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, versión 2.0). Por último, para corroborar la identidad de los compuestos se utilizó la metodología de Kovats, en la cual se calculan los índices de retención de los compuestos por inyección, de una solución que contiene una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) o hidrocarburos lineales (SIGMA-ALDRICH) como estándares, a las mismas condiciones a las cuales fueron analizadas las muestras de aceite esencial y los compuestos volátiles obtenidos en la microextracción en fase sólida (Tabla 7). Finalmente se compararon los índices de retención obtenidos experimentalmente, con los de la biblioteca electrónica NIST, versión 2.0.

**Tabla 7.** Condiciones para la obtención de los índices de retención (Índices de Kovats).

Cromatografía de gases (GC)	Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos.
	Cromatógrafo de gases utilizado	Marca: Agilent, Modelo: 6890N
	Columna capilar	DB-5 (10 m × 0.18 mm di × 0.18 μm)
	Temperatura del inyector	300 °C
	Temperatura programada del horno	Temperatura inicial: 40 °C (1minuto) Velocidad: 20 °C/minuto Temperatura final: 300 °C (5 minutos)
	Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
	Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
	Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
	Volumen de inyección	0.2 μL



#### 4.3.5 Preparación de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*

La infusión de las hojas se preparó a partir del material vegetal seco y molido (500 g), el cual fue extraído con 1 L de agua a ebullición por un periodo de 20 minutos. Posteriormente, el material vegetal se separó por filtración y el extracto resultante se concentró al vacío (en un rotaevaporador marca Heidolph, a 60 °C y 60 rpm).

##### 4.3.5.1 Fraccionamiento primario a partir de la infusión

El extracto fue sometido a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición utilizando como disolventes: hexano, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y acetato de etilo (AcOEt). Las fracciones 1-FH (fracción hexánica), 1-FD (fracción de diclorometano) y 1-FA (fracción de acetato de etilo), se concentraron al vacío (en un rotaevaporador marca Heidolph, a 60 °C y 60 rpm), obteniéndose los residuos, de color verde oscuro para la fracción hexánica, amarillo-café para la fracción de diclorometano y ámbar para la fracción de acetato de etilo, ésta última, con un precipitado amarillo (Figura 15).

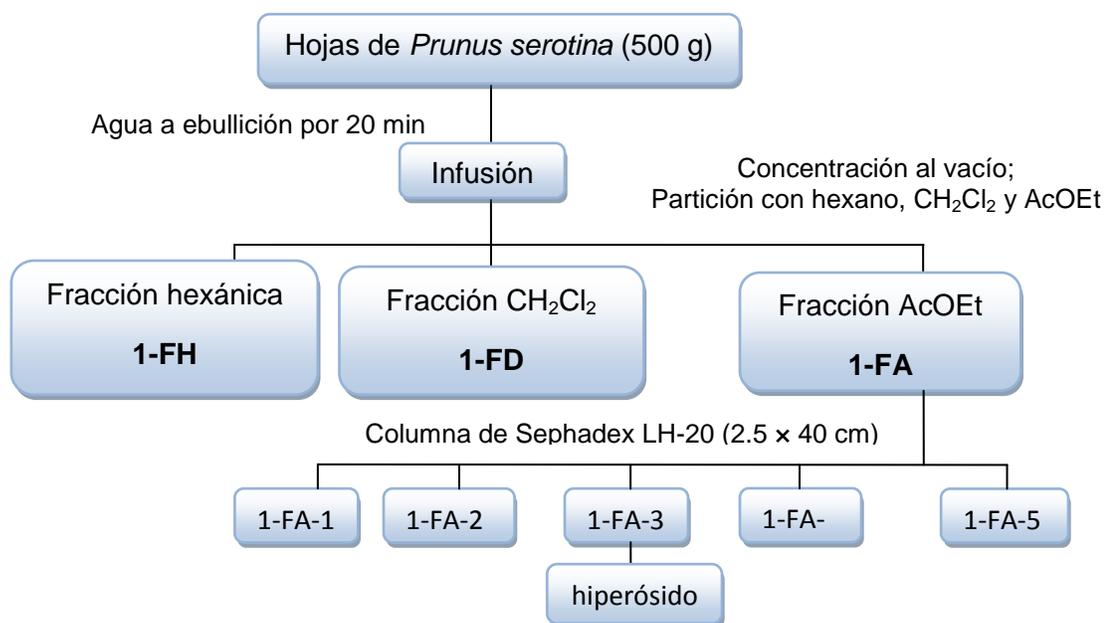


Figura 15. Fraccionamiento de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*.



#### 4.3.5.2 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción 1-FA

La fracción 1-FA se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una columna de Sephadex LH-20 (2.5 × 40 cm) y como fase móvil MeOH. Se colectaron fracciones de 100 mL cada una. Este procedimiento permitió la obtención de 30 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose finalmente 5 fracciones combinadas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Fracciones 1-FA obtenidas del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 (2.5 × 40 cm).

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave asignada
MeOH (Proporción: 100%)	1-5	1-FA-1
	6-10	1-FA-2
	11-16	1-FA-3
	17-21	1-FA-4
	22-30	1-FA-5

Nota: La verificación de la pureza de los compuestos se realizó por CCF.

#### 4.3.5.3 Aislamiento del hiperósido a partir de la fracción secundaria 1-FA-3

A partir de la fracción 1-FA-3 (1.1155 g) se precipitó un sólido amarillo con punto de fusión 235-236 °C (43.5 mg). Este sólido se identificó como hiperósido (Figura 16) mediante la comparación de su tiempo de retención y su punto de fusión con un estándar de referencia (SIGMA-ALDRICH).



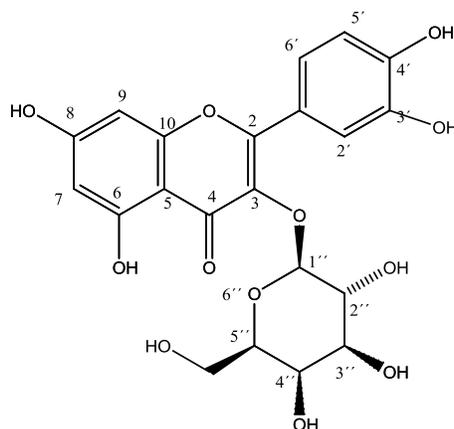


Figura 16. Estructura del hiperósido

**hiperósido [3-O-β-D-galactósido de quercetina]:** Sólido cristalino de color Amarillo, p.f. 222-226 °C; RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): (500 MHz) δ, ppm: 7.63 (1H, dd, *J*=2.2 y 8.5 Hz, H-6'), 7.48 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.36 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 5.34 (1H, d, *J*=7.7 Hz, H-1''), 3.61 (1H, d, *J*=3.2 Hz, H-4''), 3.53 (1H, dd, *J*=8.0 y 9.3 Hz, H-2''), 3.42 (1H, dd, *J*=5.6 y 10.1 Hz, H-6''); RMN-<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 177.56 (C-4), 164.11 (C-7), 161.23 (C-5), 156.32 (C-2 y C-9), 148.35 (C-4'), 144.73 (C-3'), 133.75 (C-3), 121.76 (C-6'), 121.28 (C-1'), 116.20 (C-5'), 115.30 (C-2'), 103.92 (C-10), 102.31 (C-1''), 98.65 (C-6), 93.53 (C-8), 75.74 (C-5''), 73.42 (C-3''), 71.28 (C-2''), 68.07 (C-4''), 60.56 (C-6'') (Olszewska, 2005a).

## 4.4 Ensayo biológico

### 4.4.1 Microorganismo de prueba

El microorganismo de prueba utilizado para determinar la actividad antibacteriana de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*, de las fracciones, del compuesto aislado, del aceite esencial y los compuestos presentes en el aceite, fue *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), quien es el principal agente causal de caries.

Para el crecimiento óptimo la bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI) y soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%).



#### 4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad antibacteriana de los compuestos y extractos, se determinó mediante un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se utilizó una cepa de *S. mutans* conservada en glicerol a -64°C. Previamente, se incubó el cultivo bacteriano por 24 h, en caldo BHI, para reactivar la cepa, después se resembró en caldo BHI, y se cultivó por 4 horas, posteriormente, la suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro (marca Agilent, modelo 8453E) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. En cada pozo se colocó el medio de cultivo (100 µL), y en el primer canal se adicionó el compuesto de prueba (100 µL), del cual se realizaron diluciones seriadas. Después se agregó medio de cultivo con 1% de sacarosa (80 µL). Posteriormente se adicionó  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *S. mutans* (20 µL). La CMI se determinó por duplicado para cada compuesto o fracción de prueba. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en una incubadora Labnet 211DS. En la Tabla 9 se muestran los controles utilizados para el ensayo biológico.

**Tabla 9.** Controles para el ensayo biológico.

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control de disolvente*	Con inóculo	-	37 °C
Control negativo	Con inóculo	-	37 °C
Blanco	Sin inóculo	-	37 °C
Control positivo	Con inóculo	Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%	37 °C

\*El disolvente utilizado fue agua: DMSO (80:20); -: sin compuesto de prueba



## PARTE EXPERIMENTAL

---

La bacteria *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente ( $A_{660 \text{ nm}}$ ) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas. El valor de CMI para *S. mutans* se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento bacteriano en el pozo de dilución.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *Prunus serotina* se realizó en base al criterio etnomédico, debido a su amplio uso en la medicina tradicional de México. Las hojas de *Prunus serotina* se emplean para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio como neumonía y tos. Mediante el presente proyecto de investigación se pretendió obtener, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana de algunos compuestos presentes en el aceite esencial y en la infusión de las hojas de la especie *Prunus serotina* contra la bacteria patógena *Streptococcus mutans*, el cual es el principal microorganismo asociado al inicio y desarrollo de la caries.

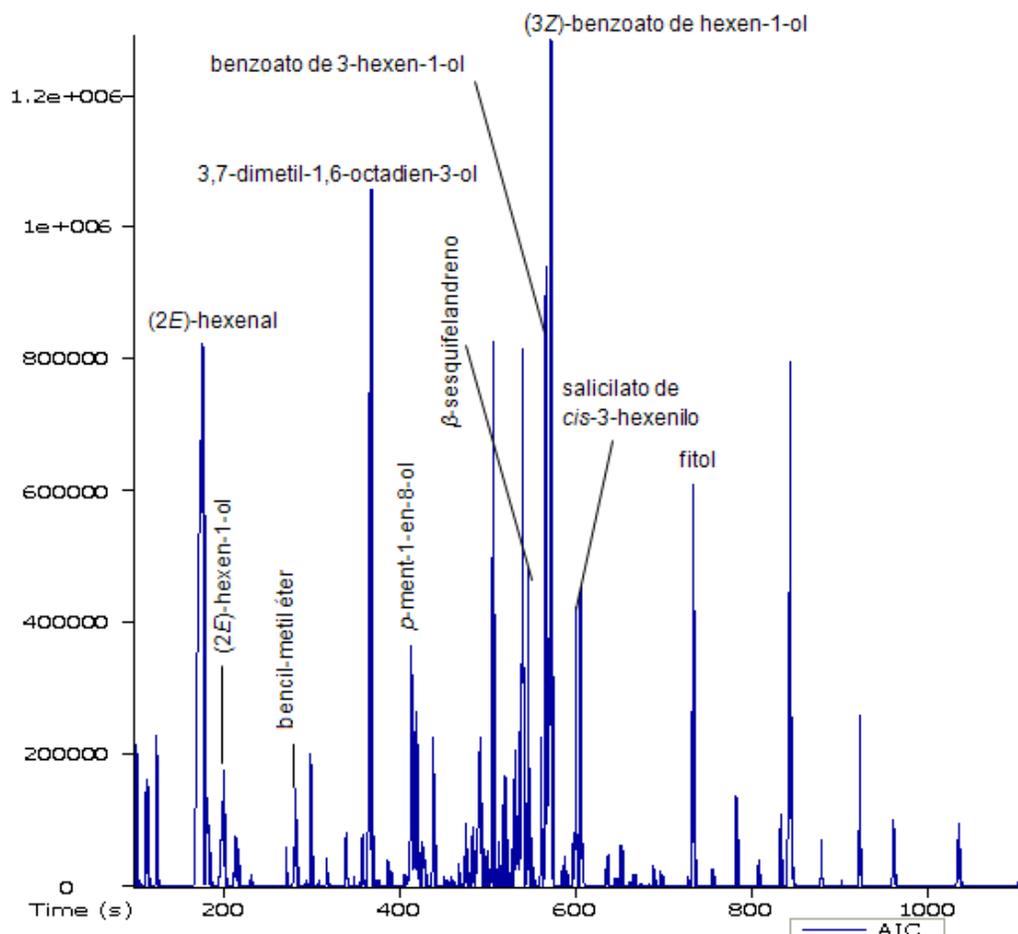
Después de preseleccionar la especie, se preparó el aceite esencial de las hojas frescas de *Prunus serotina* mediante la técnica de hidrodestilación. El aceite obtenido se analizó mediante la técnica de GC-MS-TOF. Por otra parte, se identificaron los compuestos volátiles de las hojas de *Prunus serotina* mediante la técnica de HS-SPME-GC-MS-TOF. Con la finalidad de identificar inequívocamente los compuestos encontrados mediante las anteriores metodologías, se compararon los índices de retención experimentales con los de la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0). Después se preparó una infusión, de las hojas desecadas a temperatura ambiente, y se realizó el estudio químico, que permitió el aislamiento flavonoide hiperósido. Finalmente se evaluó la actividad antibacteriana contra la bacteria *S. mutans*, utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos, de la infusión, del flavonoide hiperósido, del aceite esencial, y de los siguientes compuestos presentes en el aceite esencial (estándares SIGMA-ALDRICH): benzaldehído, alcohol bencílico, bencil-metil éter y bencil éter. La CMI (concentración mínima inhibitoria) obtenida para el aceite esencial fue de 336.25 µg/mL, mientras que para la infusión fue de 1000 µg/mL. La CMI de los



compuestos puros evaluados se encuentra en un rango de 250 a 2450.2 µg/mL. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

## 5.1 Identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina*.

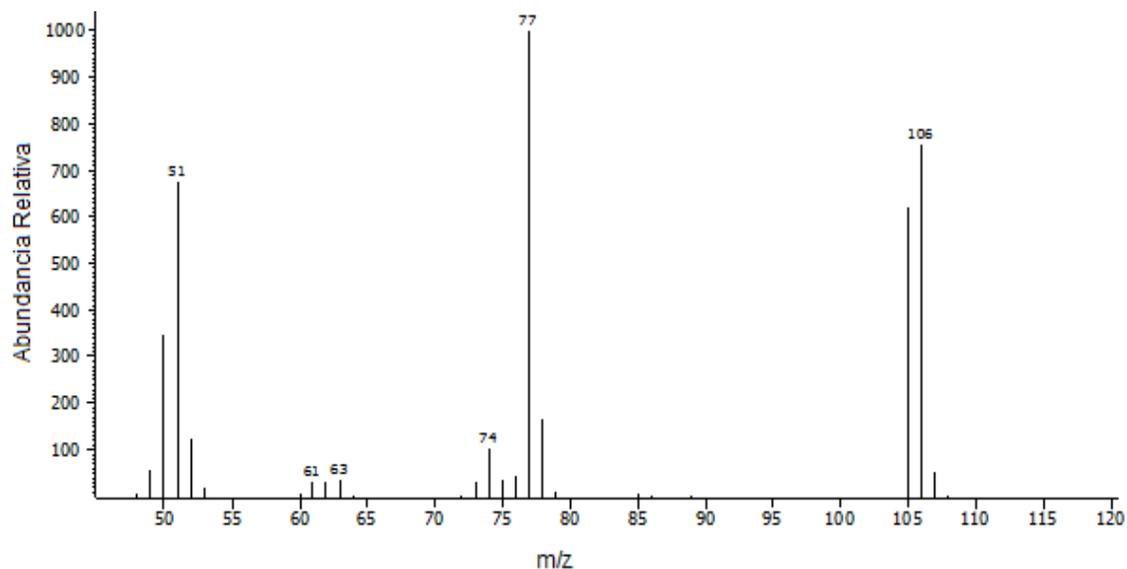
El análisis del aceite esencial se realizó en un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). En la Figura 17, se muestra el cromatograma obtenido del aceite esencial de las hojas de *P. serotina*, donde se observan los compuestos mayoritarios que fueron identificados.



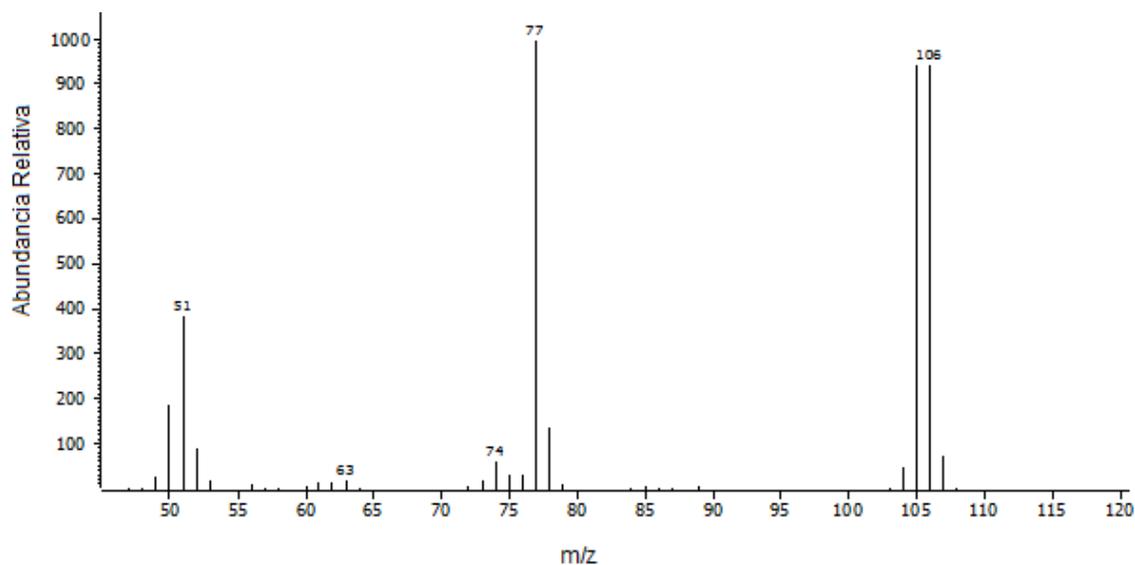
**Figura 17.** Cromatograma de los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 18a., se observa, como ejemplo, un espectro de masas obtenido para el benzaldehído, el cual fue comparado con la biblioteca del instrumento y la base de datos electrónica NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, versión 2.0) para determinar la similitud entre los espectros.



**Figura 18a.** Espectro de masas del benzaldehído ( $t_r$ , 213.643 s) obtenido experimentalmente; 93.3 % de similitud.



**Figura 18b.** Espectro de masas del benzaldehído en la biblioteca del instrumento.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS-TOF) se identificaron 56 compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina* (Tabla 10). Por otra parte se co-eluyó la muestra con una serie de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) para determinar los índices de retención (Índices de Kovats) de los compuestos separados. Finalmente para corroborar la identidad de los compuestos separados se compararon los índices de retención (Índices de Kovats) obtenidos experimentalmente con los de la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0).

**Tabla 10.** Compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina* mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats).

Pico #	Nombre	IK <sub>exp.</sub>	IK <sub>teo.</sub>	Área (%)	t <sub>r</sub> (s)	Similitud	Método de identificación
1	(2Z)-penten-1-ol	800	768	0.19934	100.693	931	MS/IK
3	1-hexen-3-ol	803	779	0.029105	104.043	879	MS/IK
5	hexanal	812	819	0.22232	113.143	938	MS/IK
7	butil éster del ácido acético	822	830	0.52373	124.243	907	MS/IK
9	(2E)-hexenal	873	845	10.719	176.993	963	MS/IK
10	3-hexen-1-ol	878	856	0.78163	182.843	950	MS/IK
11	1,3-dimetil-benceno	881	873	0.082468	186.143	936	MS/IK
12	(2E)-hexen-1-ol	895	887	2.4432	200.743	923	MS/IK
13	o-xileno	906	891	0.037132	211.293	902	MS/IK
14	benzaldehído	974	963	0.16297	213.643	933	MS/IK

IK<sub>exp.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) experimental; IK<sub>teo.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) teórico; t<sub>r</sub>: tiempo de retención; MS: Espectrometría de masas; IK: Índice de Kovats.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 10.** Compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina* mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) (continuación).

Pico #	Nombre	IK <sub>exp.</sub>	IK <sub>teo.</sub>	Área (%)	t <sub>r</sub> (s)	Similitud	Método de identificación
15	ciclohexanona	912	897	0.30276	216.693	924	MS/IK
16	2-butoxi-etanol	929	909	0.2461	231.893	937	MS/IK
19	bencil metil éter	986	984	2.007	282.243	854	MS/IK
28	2-pentil-furano	1010	996	0.0028927	299.793	798	MS/IK
33	(2E,4E)-heptadienal	1040	1029	0.18279	316.093	906	MS/IK
36	alcohol bencílico	1081	1052	0.53385	338.243	907	MS/IK
38	cis-linaloloxido	1098	1087	0.080032	347.543	856	MS/IK
43	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	1136	1112	3.5304	367.893	913	MS/IK
45	(2E,4E)-octadienal	1142	1115	0.0056339	371.493	898	MS/IK
48	alcohol feniletílico	1152	1118	0.033356	376.843	950	MS/IK
50	nitrilo de bencilo	1173	1140	0.12725	388.143	897	MS/IK
52	(2E,2Z)-nonadienal	1178	1159	0.080262	390.943	953	MS/IK
54	(2E)-hexenil éster de ácido butanoico	1214	1191	0.023478	408.893	784	MS/IK
56	salicilato de metilo	1219	1192	0.0040601	411.043	950	MS/IK
58	p-ment-1-en-8-ol	1226	1197	1.1693	414.243	926	MS/IK
61	2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxaldehído	1243	1224	0.12848	421.543	784	MS/IK

IK<sub>exp.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) experimental; IK<sub>teo.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) teórico; t<sub>r</sub>: tiempo de retención; MS: Espectrometría de masas; IK: Índice de Kovats.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 10.** Compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina* mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) (continuación).

Pico #	Nombre	IK <sub>exp.</sub>	IK <sub>teo.</sub>	Área (%)	t <sub>r</sub> (s)	Similitud	Método de identificación
62	(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	1254	1239	0.21149	426.343	883	MS/IK
68	2,4-decadienal	1324	1328	0.042482	456.293	882	MS/IK
69	dodecanal	1332	1389	0.06075	459.893	885	MS/IK
70	(2E,4E)-decadienal	1348	1330	0.22011	466.843	903	MS/IK
71	2-metoxi-4-vinilfenol	1349	1324	0.22232	467.343	906	MS/IK
78	<i>trans</i> -β-damascenona	1402	1391	0.90717	490.043	859	MS/IK
80	(2Z)-trideceno	1410	-	0.095038	492.993	937	MS
84	(Z,E)-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetreno	1434	1462	0.079862	501.893	889	MS/IK
85	β- <i>trans</i> -cariofileno	1445	1455	2.1552	506.243	917	MS/IK
87	aromadendreno	1463	1464	0.1598	512.843	920	MS/IK
91	(1S- <i>exo</i> )-2-metil-3-metilen-2-(4-metil-3-pentenil)-biciclo[2.2.1]heptano	1483	1465	0.71376	520.143	835	MS/IK
92	[1S-(1α,4α,5α)]-1,8-dimetil-4-(1-metiletetil)-espiro[4.5]dec-7-eno	1490	1468	0.34599	522.793	838	MS/IK
94	[s-(E,E)]-1-metil-5-metilen-8-(1-metiletetil)-1,6-ciclodecadieno	1501	1496	0.095671	526.993	829	MS/IK
95	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benceno	1508	1500	0.32553	529.643	732	MS/IK
98	[2R-(2α,4α,8α)]-1,2,3,4,4α,5,6,8α-octahidro-4α,8-dimetil-2-(1-metiletetil)-naftaleno	1518	1517	0.15836	533.143	868	MS/IK

IK<sub>exp.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) experimental; IK<sub>teo.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) teórico; t<sub>r</sub>: tiempo de retención; MS: Espectrometría de masas; IK: Índice de Kovats.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 10.** Compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina* mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) (continuación).

Pico #	Nombre	IK <sub>Exp.</sub>	IK <sub>Teo.</sub>	Área (%)	t <sub>r</sub> (s)	Similitud	Método de identificación
101	hidroxitolueno butilado	1534	1516	0.64059	539.143	818	MS/IK
105	(1 <i>S-cis</i> )-1,2,3,5,6,8 $\alpha$ -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	1545	1530	0.081255	543.543	886	MS/IK
106	$\beta$ -sesquifelandreno	1552	1531	1.4846	545.893	853	MS/IK
109	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	1592	1566	0.64303	560.893	824	MS/IK
110	benzoato de 3-hexen-1-ol	1605	1572	2.2964	565.593	878	MS/IK
112	hexil éster del ácido benzoico	1611	1596	0.87198	567.493	887	MS/IK
115	(3 <i>Z</i> )-benzoato de hexen-1-ol	1626	1581	4.9141	572.093	827	MS/IK
116	bencil éter	1665	1650	0.14958	584.543	887	MS/IK
125	salicilato de <i>cis</i> -3-hexenilo	1730	1701	1.0379	605.093	859	MS/IK
126	$\alpha$ -bisabolol	1732	1771	0.57908	605.893	879	MS/IK
127	benzoato de bencilo	1823	1775	0.1724	634.243	941	MS/IK
129	miristato de isopropilo	1862	1832	0.054752	645.943	905	MS/IK
131	éster de 2-feniletil ácido benzoico	1914	1860	0.049748	661.843	930	MS/IK
134	3,5,11,15-tetrametil-1-hexadecen-3-ol	1991	1461	0.028064	684.993	892	MS/IK
138	fitol	2169	2128	2.1946	734.393	904	MS/IK

IK<sub>Exp.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) experimental; IK<sub>Teo.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) teórico; t<sub>r</sub>: tiempo de retención; MS: Espectrometría de masas; IK: Índice de Kovats.



Los compuestos de tipo aldehído identificados en el aceite esencial son mayoritarios (Tabla 11). Dentro de estos encontramos aldehídos alifáticos de cadena larga como (2*E*)-hexenal, (2*E*, 4*E*)-heptadienal, (2*E*, 4*E*)-octadienal, (2*E*, 2*Z*)-nonadienal, 2,4-decadienal, dodecanal, (2*E*, 4*E*)-decadienal y aldehídos aromáticos como el benzaldehído.

**Tabla 11.** Contenido de grupos funcionales identificados en el aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina*, mediante GC-MS-TOF y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats).

Grupo Funcional	Área (%)
Aldehídos	11.70
Ésteres	9.95
Hidrocarburos terpénicos	8.01
Terpenos Oxigenados	8.57
Alcoholes	5.13
Éteres	2.16
Cetonas	1.68
Aromáticos	0.25
Alquenos	0.10
Heterociclos	0.01

Los aldehídos tienen un papel importante en la protección de la planta contra infecciones bacterianas y su mecanismo de acción incluye la alteración de proteínas, principalmente en la membrana celular bacteriana. En este sentido, los hidrocarburos alifáticos de cadena larga han demostrado poseer una notable actividad contra el crecimiento de bacterias y hongos (Bisignano, *et al.*, 2001).



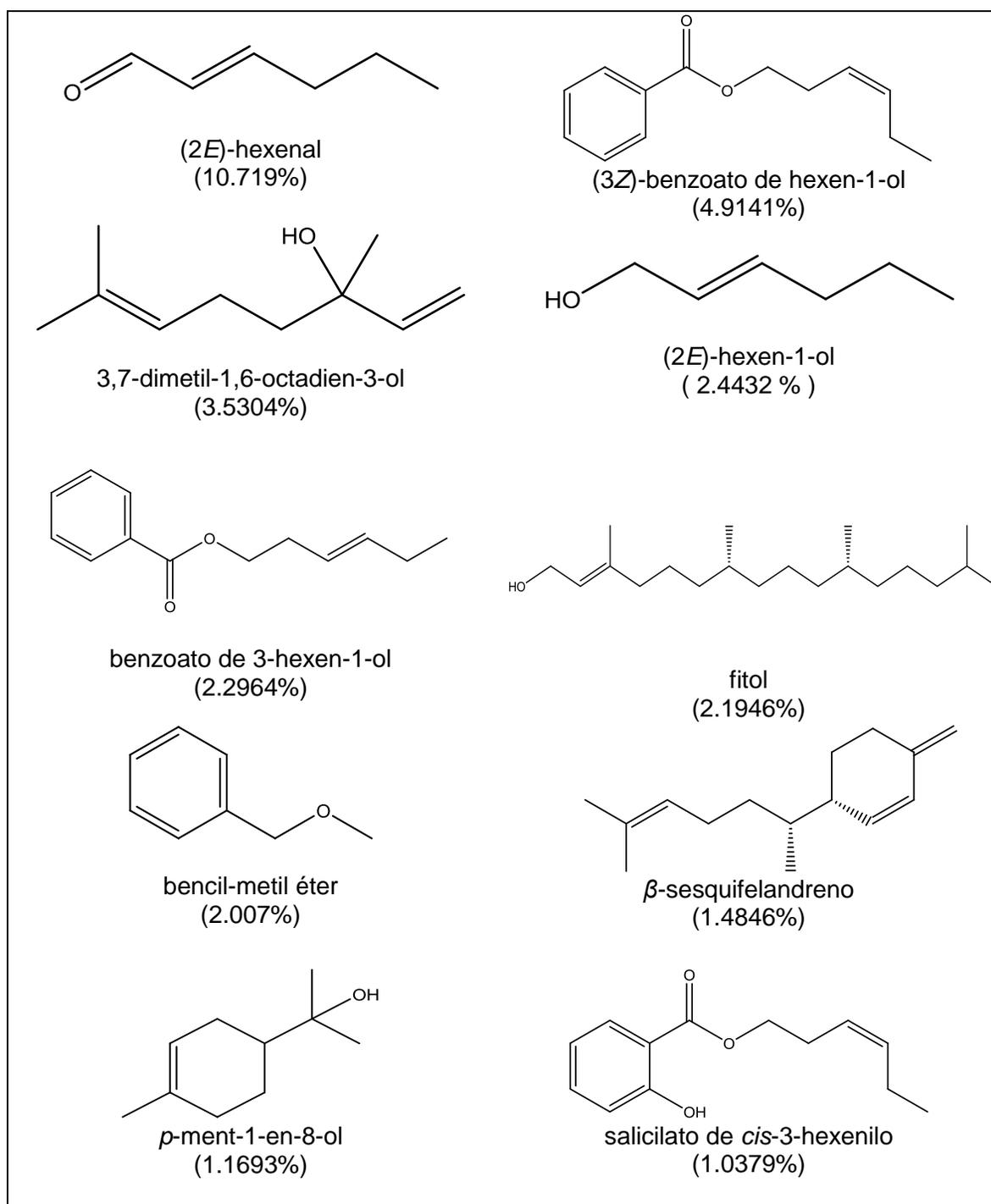
Los compuestos mayoritarios en el aceite esencial identificados mediante GC-MS-TOF son los siguientes: 2*E*-hexenal (10.71 %), (3*Z*)-benzoato de hexen-1-ol (4.91%), 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (3.53%), (2*E*)-hexen-1-ol (2.44%), trans- $\beta$ -benzoato de 3-hexen-1-ol (2.30%), fitol (2.19%), bencil metil éter (2.01%),  $\beta$ -sesquifelandreno (1.48%), *p*-ment-1-en-8-ol (1.17%) y salicilato de *cis*-3-hexenilo (1.04%) (Tabla 12).

El compuesto mayoritario, (2*E*)-hexenal, ha sido reportado con actividad antibacteriana contra bacterias como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Algunos estudios muestran que este compuesto es útil en la erradicación de *Helicobacter pylori* (agente causal de la gastritis). No está claro el mecanismo de acción de este compuesto, sin embargo el (2*E*)-hexenal puede reaccionar con grupos nucleofílicos de las moléculas biológicas (Lanciotti, *et al.*, 2003).



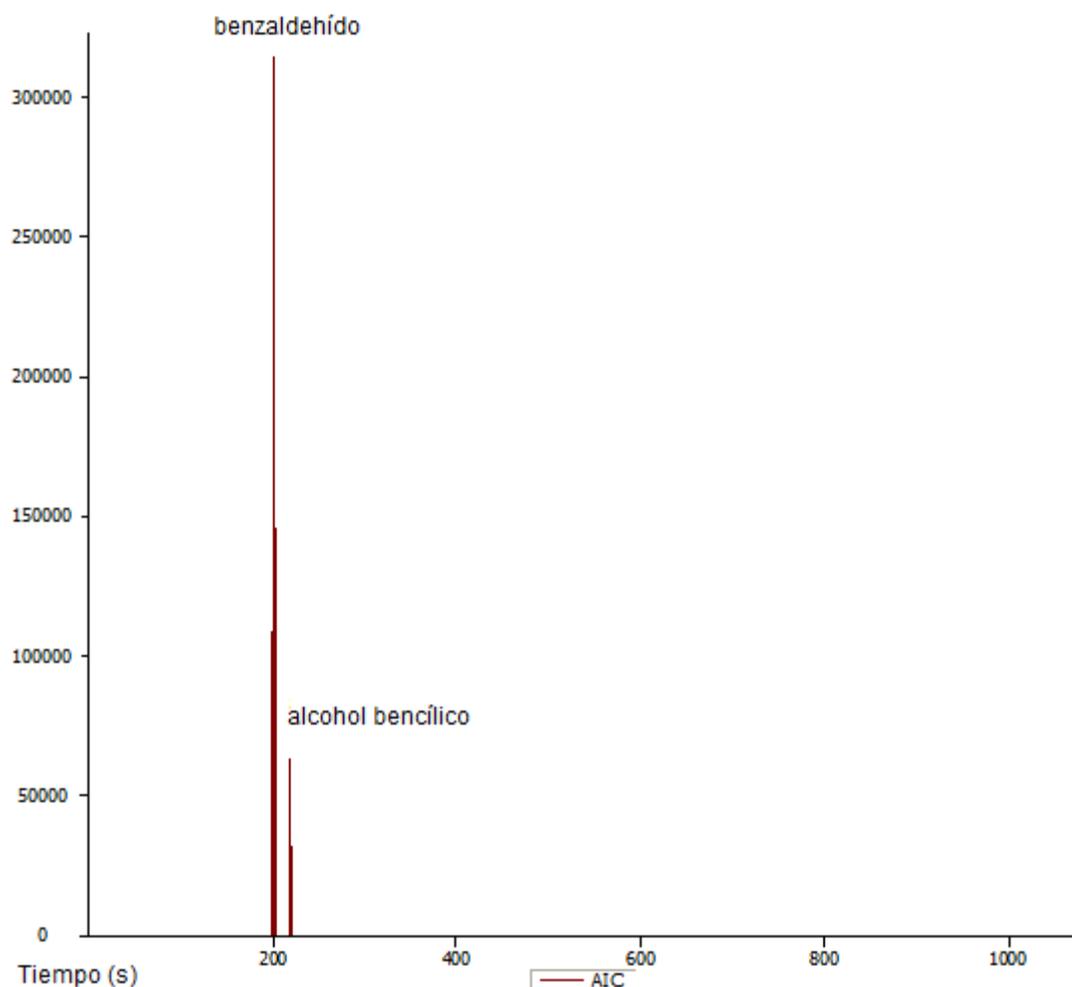
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 12.** Estructuras de los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Prunus serotina* (capulín) y su abundancia relativa.



## 5.2 Identificación de los compuestos volátiles presentes en las hojas de *Prunus serotina*, obtenidos mediante la técnica HS-SPME.

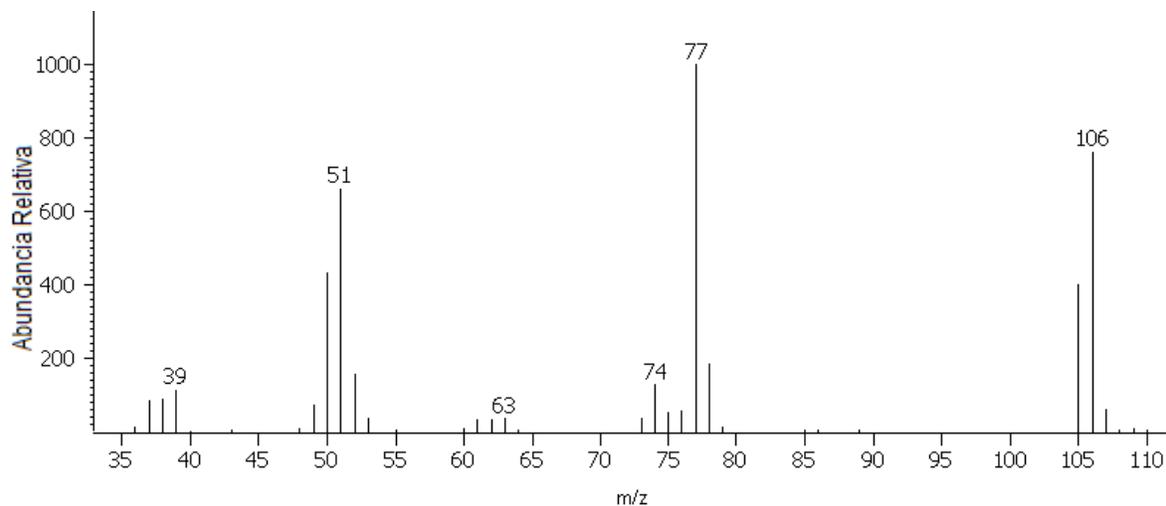
Después de realizar la microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (o *headspace*), se realizó el análisis de los compuestos volátiles en un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). En la Figura 19 se muestra el cromatograma de los compuestos volátiles presentes en las hojas de la especie *Prunus serotina*, obtenido después de realizar la microextracción en fase sólida.



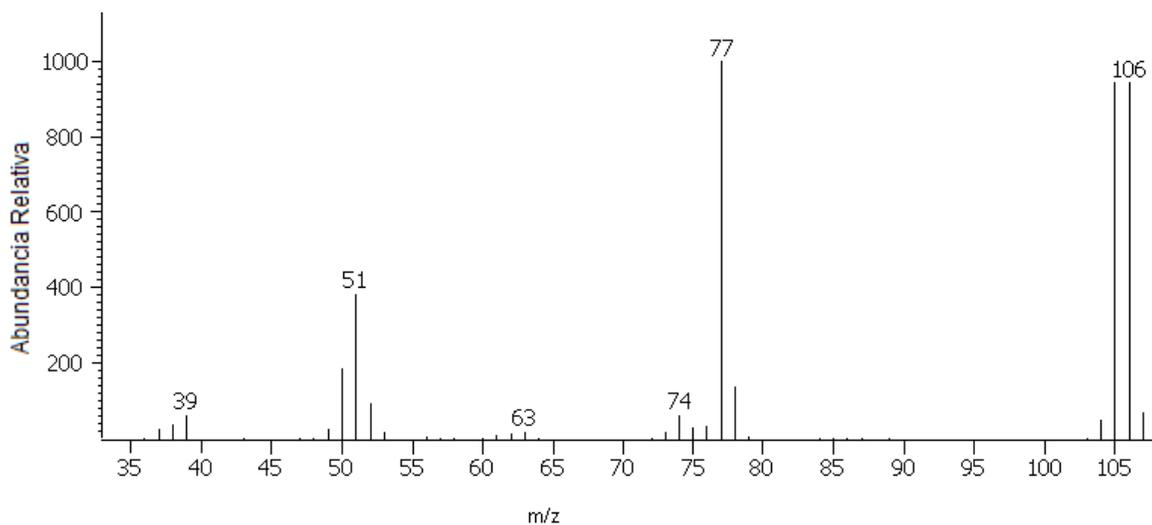
**Figura 19.** Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en las hojas de la especie *Prunus serotina*, utilizando como técnica de preparación de la muestra la microextracción en fase sólida, en la fase gaseosa (HS-SPME).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 20a., se observa, como ejemplo, un espectro de masas obtenido para el benzaldehído, el cual fue comparado con la biblioteca del instrumento para determinar la similitud entre ambos espectros. Mediante esta técnica fueron identificados el benzaldehído y el alcohol bencílico como los dos componentes mayoritarios (Tabla 13).



**Figura 20a.** Espectro de masas del benzaldehído ( $t_r$  200.794 s) obtenido experimentalmente; 87.6% de similitud.



**Figura 20b.** Espectro de masas del benzaldehído en la biblioteca del instrumento.



**Tabla 13.** Constituyentes volátiles de las hojas de *P. serotina*, identificados a partir de la metodología HS-SPME-GC-MS-TOF y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats).

Pico #	Nombre	IK <sub>Exp.</sub>	IK <sub>Teo.</sub>	Area (%)	t <sub>r</sub> (s)	Similitud	Método de identificación
1	benzaldehído	974	963	94.03	200.794	876	MS/IK
2	alcohol bencílico	1081	1052	5.9696	218.294	907	MS/IK

IK<sub>exp.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) experimental; IK<sub>teo.</sub>: índice de retención (Índice de Kovats) teórico; t<sub>r</sub>: tiempo de retención; MS: Espectrometría de masas; IK: Índice de Kovats.

Por otra parte para calcular los índices de retención de los compuestos separados se inyectó en el cromatógrafo de gases (Marca: Agilent, Modelo: 6890N) una mezcla de *n*-alcanos (mezcla de parafinas SIGMA-ALDRICH) como estándares externos (Anexo II).

Las mezclas de parafinas son ampliamente utilizadas debido a que son no polares y químicamente inertes. Los índices de retención de los *n*-alcanos son independientes del relleno de la columna, la temperatura u otras condiciones cromatográficas. El cálculo de los Índices de retención de Kovats para los *n*-alcanos (alcanos normales) pertenecientes a la mezcla de parafinas se realiza con la siguiente ecuación (Pérez, 2008):

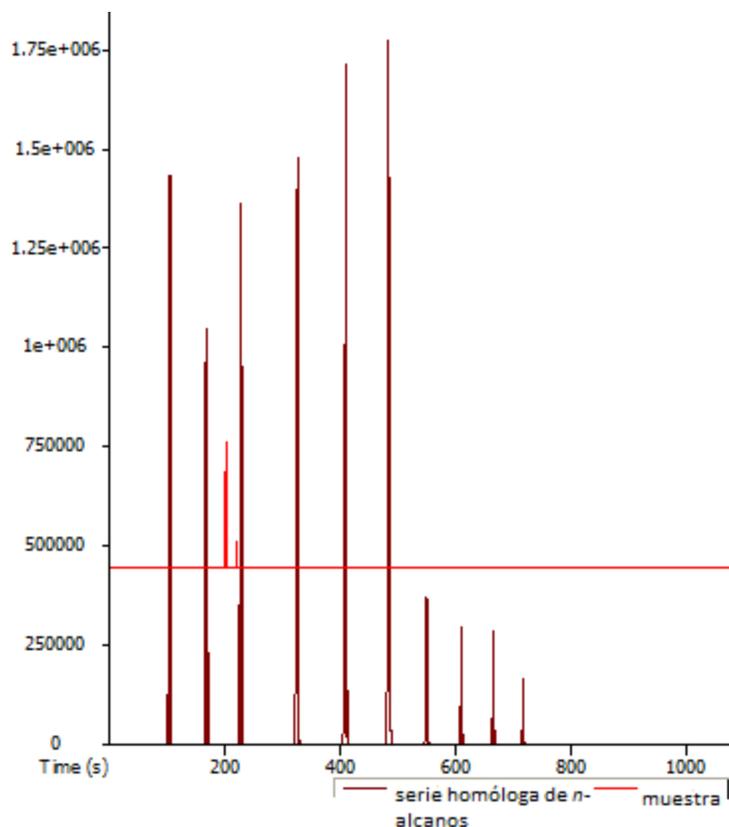
$$I=100n$$

Donde:

*I*: Índice de Kovats del hidrocarburo, *n*=número de átomos de carbono.

En la Figura 21, se muestra el cromatograma que incluye los compuestos identificados en la muestra y la serie homóloga de *n*-alcanos. El Índice de retención de Kovats para un compuesto desconocido presente en la muestra (que no pertenece a la serie homóloga) se puede determinar cuando este compuesto se encuentra flanqueado por dos alcanos normales en el cromatograma (Rouessac, 2007).





**Figura 21.** Cromatograma que incluye los compuestos identificados en la muestra (hojas de *P. serotina*, capulín) obtenida por HS-SPME y la serie homóloga de *n*-alcanos ( $C_8$ - $C_{24}$ ).

Puesto que se utilizó un programa de temperatura programada para la separación de los analitos en la cromatografía de gases, los índices de retención de los picos desconocidos se calcularon con la siguiente ecuación (Baquero, 2006):

$$I = \left[ \frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

Donde:

$I$  = Índice de Kovats,  $n$  = número de átomos de carbono del alcano más corto,  $N$  = número de átomos de carbono en el alcano más largo,  $z$  = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más corto y el más largo,  $t_r$  = tiempo de retención.

### 5.3 Estudio químico de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*

A partir de la infusión de las hojas de *Prunus serotina* se realizó el estudio químico, el cual consistió en un fraccionamiento primario de la infusión por métodos de partición con los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo. Este procedimiento permitió el aislamiento de tres fracciones primarias: 1-FH (rendimiento: 0.0213%), 1-FD (rendimiento: 0.0228%) y 1-FA (rendimiento: 0.231%), de las cuales, la fracción de acetato de etilo fue sometida a un fraccionamiento secundario, empleando para ello una columna abierta de Sephadex LH-20 (2.5 × 40 cm). El fraccionamiento secundario permitió el aislamiento del flavonoide hiperósido (fracción 1-FA-3), con un rendimiento de 0.00870% y punto de fusión de 235-236 °C, el cual se identificó mediante la comparación de su punto de fusión y tiempo de retención en cromatografía en capa fina (ver procedimientos generales) con un estándar de referencia (SIGMA-ALDRICH). Este compuesto ha sido previamente aislado en la especie *Prunus serotina* (Martínez, 2007).

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios, a los que se les han atribuido diversas propiedades biológicas como antioxidantes (Van Acker, *et al.*, 1996) antibacterianos, antifúngicos y antivirales (Cushnie y Lamb 2005). Específicamente, el hiperósido ha sido reportado con actividad vasorelajante, dependiente de la concentración, en aorta aislada de rata, justificando el uso de la planta como antihipertensivo (Ibarra-Alvarado, *et al.*, 2009).



### 5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de algunos compuestos presentes en el aceite esencial y la infusión.

La bacteria *Streptococcus mutans* demostró ser sensible a la infusión (CMI de 1000 µg/mL) y al aceite esencial de *Prunus serotina* (CMI de 336.25 µg/mL) (Tabla 14). Es importante señalar que un extracto o fracción se considera activa cuando se obtienen dosis letales menores de 1000 µg/mL (Rivero, *et al.*, 2008).

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Prunus serotina* puede ser atribuida a su hidrofobicidad, la cual le permite interaccionar con los lípidos de la membrana celular bacteriana, desestabilizándola e incrementando su permeabilidad (Burt, 2004).

En el aceite esencial se lograron identificar los siguientes compuestos: benzaldehído, alcohol bencílico, bencil-metil éter y bencil éter. Estos compuestos a su vez han sido reportados como constituyentes mayoritarios del aceite esencial en estudios previos de *Prunus serotina* (Ibarra-Alvarado, *et al.*, 2009; Martínez, 2007). Por consiguiente se decidió evaluar la actividad antibacteriana de estos compuestos, para contribuir al conocimiento de la actividad biológica de *Prunus serotina*.

De los compuestos evaluados el hiperósido (CMI de 250 µg/mL) y el bencil-metil éter (CMI de 618.6 µg/mL) demostraron poseer la mayor actividad contra la bacteria de estudio (Tabla 14). Sin embargo un compuesto puro se considera activo cuando la concentración mínima inhibitoria es menor a 200 µg/mL (Rivero-Cruz, *et al.*, 2008).

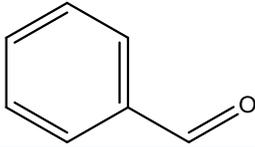
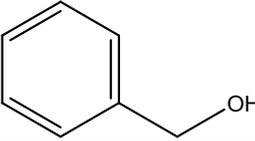
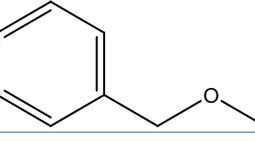
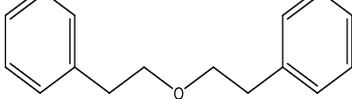
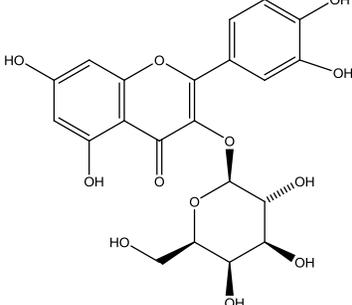
Puesto que las concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos presentes en el aceite esencial son mayores, en comparación con la CMI del



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aceite esencial, se plantea que estos compuestos presentes en el aceite esencial actúan en forma sinérgica, contribuyendo a la actividad del aceite esencial.

**Tabla 14.** Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial, la infusión y compuestos presentes en el aceite esencial y la infusión de las hojas de *Prunus serotina*.

Muestra o Compuesto	Estructura	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>Streptococcus mutans</i>
AEPS	-	336.25
benzaldehído		2450.2
alcohol bencílico		1188
bencil-metil éter		618.6
bencil éter		1287
Infusión	-	1000
hiperósido		250

AEPS: Aceite Esencial de *Prunus serotina*; CMI: Concentración mínima inhibitoria. Se utilizó Gluconato de clorhexidina como control positivo (CMI: 0. 938  $\mu\text{g/mL}$ ).



## 6. CONCLUSIONES

Se identificaron 56 compuestos volátiles en las hojas de *Prunus serotina* mediante la técnica de hidrodestilación seguida de cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS-TOF) y la comparación de los índices de retención (Índices de Kovats) experimentales con los de la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0).

La preparación del aceite esencial por hidrodestilación y su análisis por GC-MS-TOF permitió la identificación de los siguientes compuestos mayoritarios en las hojas de *Prunus serotina*: (2*E*)-hexenal (10.71 %), (3*Z*)-benzoato de hexen-1-ol (4.91%), 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (3.53%), (2*E*)-hexen-1-ol (2.44%), trans- $\beta$ -benzoato de 3-hexen-1-ol (2.30%), fitol (2.19%), bencil metil éter (2.01%),  $\beta$ -sesquifelandreno (1.48%) y *p*-ment-1-en-8-ol (1.17%).

Se identificaron 2 compuestos volátiles mayoritarios (benzaldehído y alcohol bencílico) en las hojas de *Prunus serotina* mediante la técnica de microextracción en fase sólida, seguida del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS-TOF) y la comparación de los índices de retención (Índices de Kovats) experimentales con los de la biblioteca electrónica NIST, versión 2.0.

El aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina* presentó actividad sobre el crecimiento de la especie patógena de la cavidad oral *Streptococcus mutans* (CMI de 336.25  $\mu\text{g/mL}$ ). Por otra parte los compuestos volátiles evaluados (benzaldehído, alcohol bencílico, bencil-metil éter, bencil éter) presentaron CMIs de 618.6 a 2450.2  $\mu\text{g/mL}$ .

El estudio químico de la infusión (CMI de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) permitió el aislamiento del flavonoide hiperósido, el cual fue identificado mediante la comparación con un estándar de referencia y presentó una CMI de 250  $\mu\text{g/mL}$ .



## 7. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto del aceite esencial de las hojas de *P. serotina* sobre la agregación y formación de la placa dentobacteriana.
- Determinar la actividad antibacteriana, de otros compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina*, contra la bacteria *Streptococcus mutans*.
- Comprobar el efecto antidiarreico de las hojas de *P. serotina*, mediante las siguientes actividades:
  1. Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial y la infusión de las hojas de *P. serotina*, contra bacterias patógenas del tracto gastrointestinal.
  2. Evaluar la actividad relajante sobre íleo de rata, del aceite esencial y la infusión de las hojas de *P. serotina*.
- Desarrollar un método de cromatografía de gases para cuantificar los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina*.



## 8. REFERENCIAS

1. Al-Bayati, F., Sulaiman, K. (2008) In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* L. Extracts against some isolated oral pathogens in Iraq *Turk J Biol.*, 32: 57-62.
2. Argueta, A., y Gallardo, M. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I y II, México, Instituto Nacional Indigenista, 319-320, 1786.
3. Balakrishnan, M., Simmonds, R., Tagg R. (2000) Dental caries is a preventable infectious disease *Australian Dental Journal*, 45(4): 235-245.
4. Baquero, M. (2006) Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 1.
5. Berenzon-Gorn, S., Ito-Sugiyama, E., Vargas-Guadarrama, L. (2006) Enfermedades y padeceres por los que se recurre a terapeutas tradicionales de la ciudad de México *Salud Pública de México*, 48(1): 45-56.
6. Bertucco, A., y Vetter, G. (2001) High pressure process technology: fundamentals and applications, Elsevier, The Netherlands, 547-549.
7. Bhatia, R., y Ichhpujani, R. L. (2003) Microbiology for dental students, 3 ed., Yapee, India, 262
8. Biessels, H., et al., (1974) Triterpenes of *Prunus serotina* and *Prunus lusitanica* *Phytochemistry*, 13: 203-207.
9. Bisignano, G., et al., (2001) In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*, 198: 9-13.
10. Bojanich A., Calamari S.E., Cornejo L.S., Barembaum S., Virga, C., Dorransoro, S. (2003) Efecto de polímeros sobre los niveles de IgAs anti *Streptococcus mutans* y la producción de dextranos de *Streptococcus mutans* autóctonos (estudio in vitro e in vivo) *Avances en Odontoestomatología*, 19(5): 225-232.
11. Burnett, G. (1990) Manual de microbiología y enfermedades infecciosas de la boca, 2 ed., Limusa, México, 323-340.
12. Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
13. Cabello, R. (2007) Microbiología y parasitología humana, Médica Panamericana, México, 52.



14. Cerpa, M. (2007) Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización (Tesis Doctoral), Universidad de Valladolid, España, 1-21.
15. Cohen, S., y Burns, R. (2002) Vías de la pulpa, 8 ed., Elsevier, España, 27.
16. Cushnie, T., y Lamb, A. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
17. Daniel, M. (2006) Medicinal plants: chemistry and properties, Science Publishers, India, 1-3.
18. Doneanu C., y Anitescu, G. (1998) Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil *Journal of Supercritical Fluids*, 12: 59-67.
19. Dorman, H., y Deans, S. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
20. Duarte, B. (2003) Medicina occidental y otras alternativas: ¿Es posible su complementariedad? reflexiones conceptuales *Cad. Saúde Pública*, 19(2): 635-643.
21. Dumitrescu, A., Inagaki, K., Kawamura, M. (2010) Etiology and pathogenesis of periodontal disease, Springer, Germany, 2-15.
22. Duque, C., y Morales, A. (2005) El aroma frutal de Colombia, Univ. Nacional de Colombia, Colombia, 276.
23. Evans, W. C. (2002) Trease and Evans Pharmacognosy, 15 ed., W.B. Saunders, China, 328-329.
24. García, C., *et al.*, (2001) Química orgánica, experimentos con un enfoque ecológico, fomento editorial UNAM, México, 82-84.
25. Gibbons, S. (2005) Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents *Phytochemistry Reviews*, 4: 63–78.
26. Gómez, M., y Campos, A. (2009) Histología, embriología e ingeniería tisular, 3 ed., Médica Panamericana, México, 293.
27. Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., Leach, D. N. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 322–332.
28. Hamada, S., y Slade, H. (1980) Biology, Immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* *Microbiological Reviews*, 44(2): 331-384.
29. Harris, D. (2001) Análisis químico cuantitativo, 2 ed., Reverté, España, 661.



30. Herdman, R. (1995) Impacts of antibiotic-resistant bacteria, Office of Technology Assessment Congress of the United States, U.S.A., 6.
31. Hinshaw, J. V. (2003) Solid-Phase Microextraction. GC Connections. U.K., 2-5.
32. Horsley, S., y Meinwald, J. (1981) Glucose-1-benzoate and prunasin from *Prunus serotina* *Phytochemistry*, 20: 1127-1128.
33. Ibarra-Alvarado, *et al.*, (2009) Vasorelaxant Constituents of the Leaves of *Prunus serotina* "Capulín" *Rev. Latinoamer. Quím.*, 37(2): 164-173.
34. Kolenbrander, P., Andersen, R., Blehert, D., Eglund, G., Foster, J., Palmer, R. (2002) Communication among oral bacteria *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 486–505.
35. Lanciotti, R., *et al.*, (2003) Application of hexanal, (*E*)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2958-2963.
36. Lara, O. F., y Márquez, A. C. (1996) Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 27.
37. Libério, S., *et al.*, (2009) The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1): 1-9.
38. Lindhe, J. (2009) Periodontología clínica e implantología odontológica, Volumen 1, 5 ed., Médica Panamericana, España, 500.
39. Linskens, H., y Jackson, J. (1991) Modern methods of plants analysis. Essential oils and waxes. Vol. 12, Springer-Verlag, Germany, 82-96, 310-313.
40. Marshall, S., y Arenas, G. (2003) Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 6(3): 233-243.
41. Marsili, R. (2002) Flavor, fragrance, and odor analysis, CRC Press, U.S.A., 25-31, 157-159.
42. Martínez, A. (2007) Estudio químico y biológico de la infusión y del extracto hexánico de las Hojas de *Prunus serotina* Ehrh. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México, 41-48.
43. Martínez, M. (1944) Las plantas medicinales de México, 3 ed., Botas, México, 60-61.
44. Martínez, M. (1959) Plantas útiles de la flora mexicana, Botas, México, 129-130.
45. McMurray, L., Oethinger M., Levy, S.B. (1998) Triclosan targets lipid synthesis *Nature*, 394: 531-532.



46. Mellado, V., y Zolla, C. (1994) La medicina tradicional de los pueblos indígenas de México, Vol. 2, Instituto Nacional indigenista, México, 545.
47. Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. (1997) Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean pseudognaphalium* (Asteraceae) *J. Ethnopharmacol.*, 58: 85–88.
48. Monroe, H., McNair, J., Miller, M. (2009) *Basic Gas Chromatography*, 2 ed., Wiley, USA, 60.
49. Negroni, M. (2009) *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*, 2 ed., Medica Panamericana, Argentina, 250-253, 262-271, 275-307.
50. Okeke, I., Lamikanra, A., y Edelman, R. (1999) Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries *Emerging Infectious Diseases*, 5(1): 18-27.
51. Olszewska, M. (2005a) Flavonoids from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 62(2): 127-133.
52. Olszewska, M. (2005b) High-Performance Liquid Chromatographic identification of flavonoid monoglycosides from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 62(6): 435-441.
53. Olszewska, M. (2008) Optimization and validation of an HPLC-UV method for analysis of corosolic, oleanolic, and ursolic acids in plant material: application to *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica*, 20(4): 643–659.
54. Olszewska, M. (2007) Quantitative HPLC analysis of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica*, 19: 253-269.
55. Ordaz-Galindo, A., *et al.*, (1999) Purification and identification of capulin (*Prunus serotina* Ehrh.) anthocyanins *Food Chemistry*, 65(2): 201-206.
56. Paredes, V., Paredes, C., Mir Plana, C. (2006) Prevalencia de la caries dental en el niño inmigrante: estudio comparativo con el niño autóctono *An Pediatr.*, 65(4): 337-41.
57. Pawliszyn, J. (2002) *Sampling and sample preparation for field and laboratory*, Elsevier, The Netherlands, 280-281.
58. Pérez, A. (2008) *Compuestos fitotóxicos de la especie medicinal Hofmeisteria Schaffneri* (A. Gray) R.M. King and H. Robinson (Asteraceae) (Tesis Doctoral), Universidad Nacional Autónoma de México, México, 84-86.



59. Rivero-Cruz, J., *et al.*, (2008) Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens *Phytochemistry Letters*, 1(3): 151-154.
60. Rocha, R., *et al.*, (2004) Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 129.
61. Rouessac, F., y Rouessac, A. (2007) Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, 2 ed., John Wiley and Sons Ltd., Great Britain, 56.
62. Samaranayake, L. (2006) Essential microbiology for dentistry, 3 ed., Churchill Livingstone, China, 115-118, 255-282.
63. Sánchez, L. (2007) Estudio de la fotodegradación de compuestos orgánicos mediante microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas (Tesis Doctoral), Univ. Santiago de Compostela, España, 20-24.
64. Santamour, Jr. (1998) Amygdalin in *Prunus* leaves *Phytochemistry*, 47(8): 1537-1538.
65. Sapp, J., Eversole, L., Wysocki, G. (2005) Patología oral y maxilofacial contemporánea, 2 ed., Elsevier, España, 86-88.
66. Secretaria de Salud (2006) Encuesta nacional de caries dental, 2001. SSA, México, 138.
67. Selwitz, R., Ismail, A., Pitts, N. (2007) Dental caries *Lancet*, 369: 51–59.
68. Skoog, D., *et al.*, (2005) Fundamentos de química analítica, 8 ed., Thomson, México, 967-969, 986-987.
69. Skoog, D., Holler, F., Crouch, S. (2008) Principios de análisis instrumental, 6 ed., Cengage Learning Editores, México, 789,790.
70. Trivedi, P.C. (2006) Medicinal plants: traditional knowledge, K. International Pvt. Ltd., India, 1-2.
71. Van Acker, S., *et al.*, (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids *Free Radical Biology & Medicine*, 20(3): 331-342.
72. WHO, 2004. The World Oral Health Report, revisado el 7 de febrero de 2011: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/en/>
73. WHO, 2007. Oral Health, revisado el 7 de febrero de 2011: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>
74. Xu, J., *et al.*, (2008) The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli* *Letters in Applied Microbiology*, 47: 174–179.

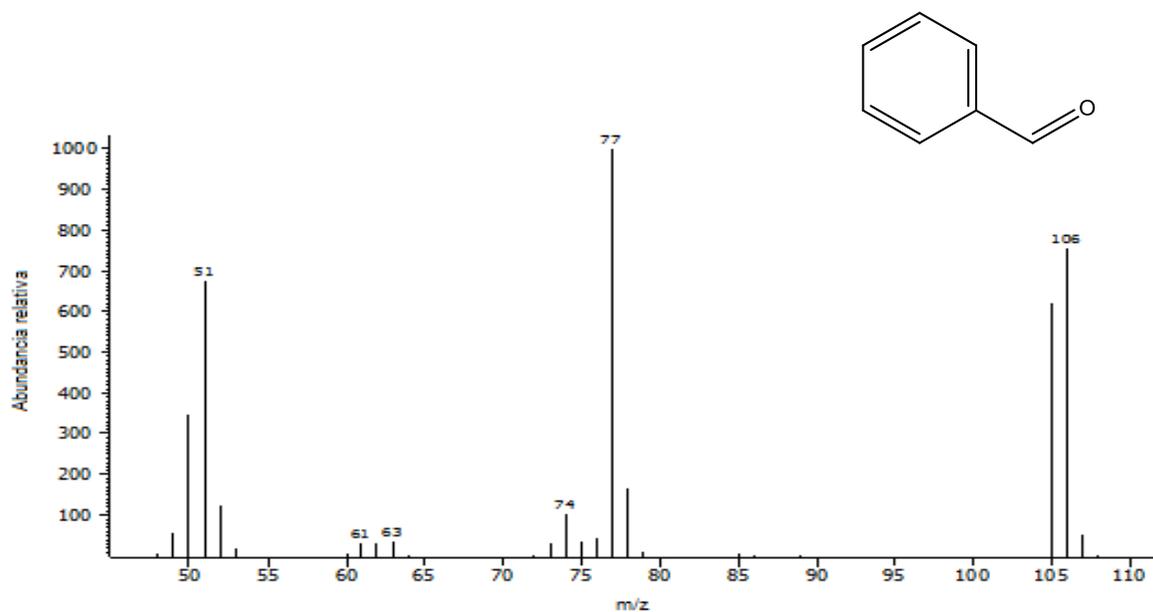


## ANEXO I

Espectros de masas de algunos constituyentes identificados en el aceite esencial de las hojas de *P. serotina* a los cuales se les determinó la actividad antibacteriana, contra la bacteria patógena de la cavidad oral *Streptococcus mutans*.

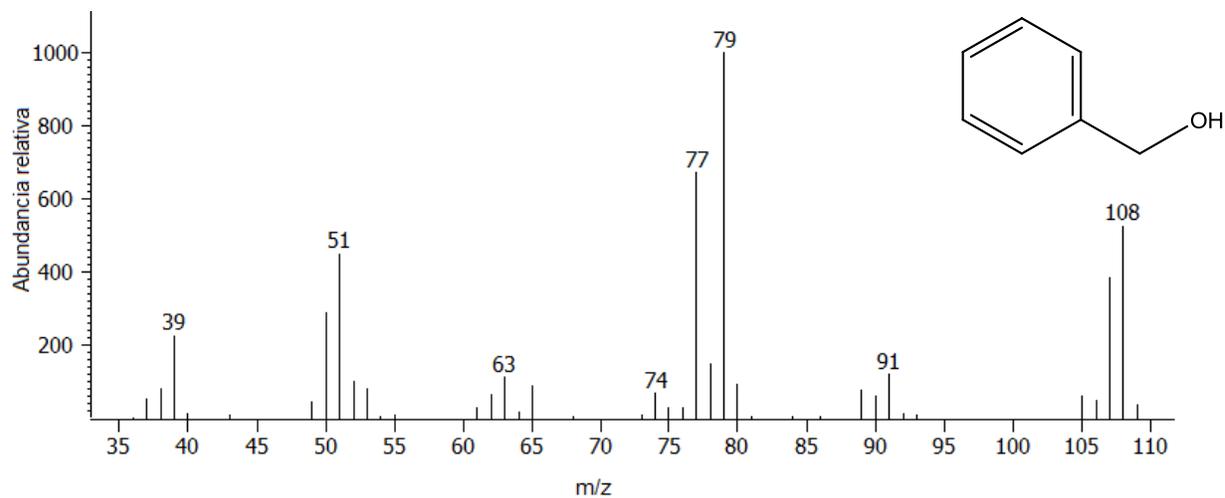
benzaldehído

$t_r$ : 213.643 s

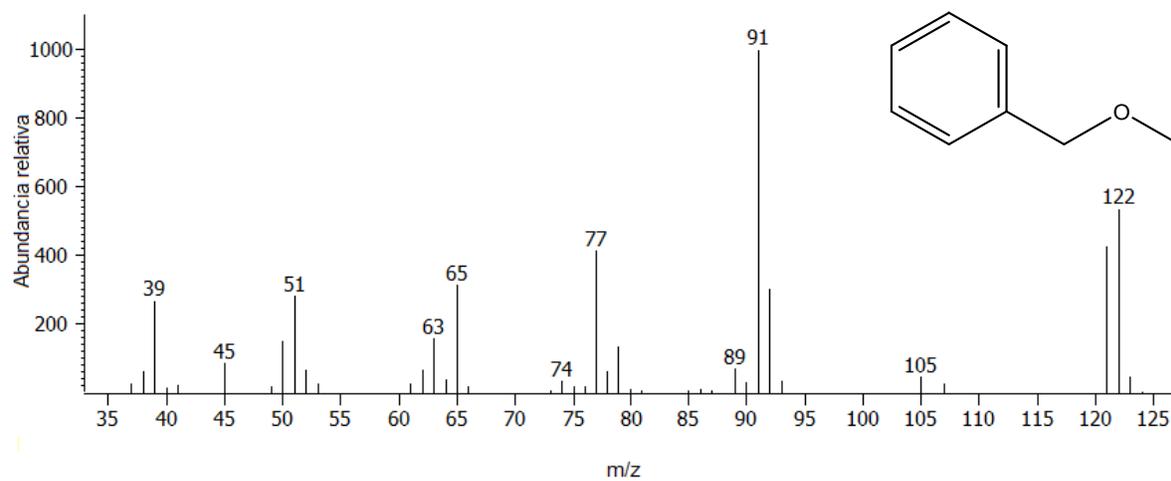


alcohol bencílico

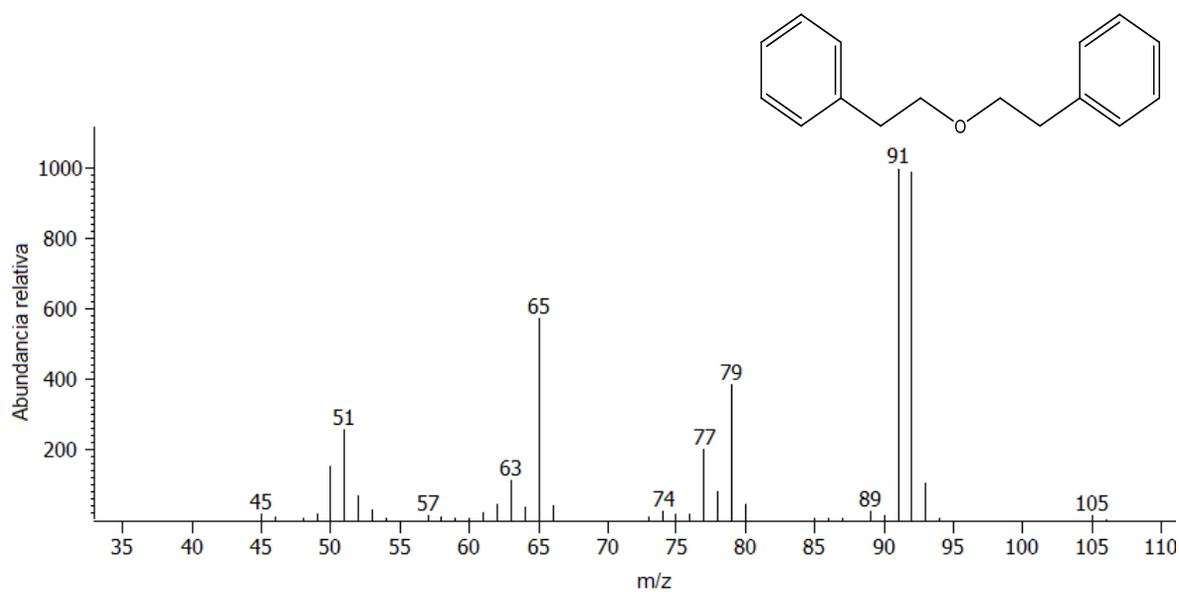
$t_r$ : 338.243 s



metil-bencil éter

t<sub>r</sub>: 282.24

bencil éter

t<sub>r</sub>: 584.543 s

## ANEXO II

Cromatograma de la serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) que se empleó para determinar los Índices de Kovats (ver condiciones del análisis en la Tabla 7).

