



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO DE LA RESINA Y EL EXTRACTO HEXÁNICO DE
LA CORTEZA DE *Bursera simaruba* (L.) Sarg. DETERMINACIÓN DE
LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

P R E S E N T A :

CLAUDIA PATRICIA VENCES COLIN



México, D. F.

2012



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:	M. e n C. José Manuel Méndez Stivalet
VOCAL:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. Suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Claudia Patricia Vences Colin

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a ella y brindarme la mejor educación para forjarme como profesionista.

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

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

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

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por el apoyo técnico para el crecimiento de las bacterias empleadas en esta investigación y a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por sus comentarios y su ayuda técnica.

DEDICATORIAS

Antes que nada quiero dedicar este trabajo a dos personas muy importantes en mi vida, mis padres, ya que si no se hubieran dado la oportunidad de tenerme, todo esto no hubiera sido posible y que esto es parte de su sueño, que una más de sus hijas se titule.

A mi **mamá**, por su gran empeño y apoyo para poder cumplir con uno de mis sueños, y a enseñarme que es lo que uno puede hacer con un poco de responsabilidad y compromiso hacia uno mismo.

A mi **papá**, que a pesar de todo lo vivido siempre has estado ahí, gracias por la constancia de tu apoyo cuando más lo necesite y por nunca irte tan lejos de mi corazón.

A ambos les agradezco demasiado, creo que jamás podre pagar les todo lo que han hecho por mí, solo me queda decirles que los amo con todo mi corazón, que les agradezco, todo lo que ahora soy, ya que ello lo he logrado gracias a los dos y a su gran esfuerzo, por querer algo mejor para sus hijos.

A mis hermanos: **Ale, Mary, Ray y Lety**, por que este logro también es suyo, ya que cada uno en su momento y a su manera me han apoyado en todo este largo camino recorrido, por los buenos y malos momentos vividos, por sus innumerables buenos ejemplos como: ser muy emprendedora y creativa, muy noble y complicada, Inteligente pero rockero, alegre y muy fuerte, así como los malos pero divertidos ejemplos, para mi han sido los mejores hermanos, no encuentro palabras para decirles cuanto los quiero y admiro, mi vida no sería la misma sino estuvieran conmigo.

A mi tía **Mago**, que siempre han estado ahí apoyándome de diferentes maneras, enseñándome desde mi infancia que uno debe de ser humilde, feliz (su sonrisa es muy bonita) que uno lucha todos los días por lo que más se quiere (Chisty), sin importar que vaya a pasar después.

A mi tía **Mela**, que siempre han sido un ejemplo muy marcado desde mi infancia, que no importa la edad para seguir aprendiendo cosa nuevas, tratando siempre de ser la mejor.

A la **Familia Hurtado Hernández**, por todo el apoyo brindado en los momentos más difíciles de mi vida, siempre tuvieron un buen consejo para mí, muchas gracias hay cosas que no sé si algún día pueda llegar a pagárselas. Así como a Ezequiel Estrada por la ayuda de sus consejos de edición de esta tesis.

A **ViKi, Raúl, Nirvana, Santiago, Raúl, Karen, Cristina, Diana, Jesús, Carlos**: muchas gracias por los bonitos momentos compartidos y nada me emociona más que ver que cada uno cumpla sus sueños, aunque algunos sueños cuestan más que otros. Pero espero formar parte de alguno de sus sueños y si entre esos está algo parecido a esto no me desagradaría ayudarlos a cumplirlos. Siempre estoy a disposición de dar asesorías para los exámenes finales, extraordinarios o pasar sus exámenes ordinarios, ya saben donde encontrarme.

Y por último, no por eso menos importante mi **“Coach Raxel”** que sin sus acordes musicales no estaría en este momento de mi vida, gracias por todos los momentos vividos, por enseñarme a sonreír, a querer y amar a todos tal como son, a darme valor para enseñarme que tan lejos puedo llegar, por motivarme a pesar de las circunstancias, y subirme en este bote con el único objetivo, el ser feliz. Es el viaje más largo que he emprendido, pero hasta ahora ha sido el más hermoso de mi vida.

A todos mis compañeros de carrera, Jazmin, Yalil, Amadaí, Lalo, Olga, **Jessica, Iván, Miguel**, Juan, Juanita, Kenia, Alma, Nayeli, Areli y Flor por los buenos momentos compartidos durante la carrera.

A mis compañeros del Lab. 111, Jazmin Piñon, por ser como una guía en el laboratorio, Gabriela Zarco por ayudarme incondicionalmente y resolver todas mis dudas, Veronica Egas por su apoyo moral así como a Iliana, Wilber, Carolina, Abihud, Nayeli, Paola, Elba, Janet, Guadalupe, Gustavo, Marlen, Marlen, por los buenos momentos compartidos y enseñarme que el gremio de los QFB's es totalmente otra cosa.

Y para cerrar con broche de oro a **Julia Alavardo y Bulmara Salazar**, quienes me enseñaron con sus pláticas, que las plantas son más que eso, que curan las enfermedades y heridas que uno adquiere a lo largo de la vida, y creo que este proyecto más que obtener mi título profesional ha sanado cada una de mis heridas, muchas gracias por sus conocimientos.

Gracias a todos, por fin termine!!!

ÍNDICE

LISTAS DE ABREVIATURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Caries dental.....	3
2.1.1. Definición y Generalidades.....	3
2.1.2. Microorganismos de la cavidad oral.....	4
2.2. <i>Streptococcus mutans</i>	5
2.2.1. Generalidades del grupo.....	5
2.2.2. Biopelícula.....	6
2.2.3. Formación de biopelícula.....	7
2.2.4. Inhibición química de las biopelículas.....	8
2.3. Agentes antimicrobianos.....	11
2.4. Funciones generales de los fitoquímicos.....	11
2.5. <i>Bursera simaruba</i>	15
2.5.1. Generalidades y distribución.....	15
2.5.2. Sinonimias botánicas y clasificación científica.....	16
2.3.3. Descripción del árbol de <i>Bursera simaruba</i>	16
2.4. Copal.....	18
2.4.1. Definición.....	18
2.5. Resina.....	18
2.5.1. Definición.....	18
2.5.2. Obtención.....	19
2.5.2. Composición de la resina de <i>B. simaruba</i>	20
2.5.3. Usos de la resina.....	20
2.6. Corteza.....	21
2.6.1. Definición de corteza.....	21
2.6.2. Características de la corteza de <i>Bursera simaruba</i>	21
2.6.3. Usos de la corteza de <i>Bursera simaruba</i>	21
2.7. Usos y propiedades medicinales <i>Bursera simaruba</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS.....	26

4.1. Objetivo General.	26
4.2. Objetivos Particulares.	26
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
5.1. Procedimientos generales.....	27
5.1.2. Análisis cromatográficos.	27
5.1.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrometrías.	27
5.2. Material Vegetal.	28
5.3. Estudio químico de la corteza <i>B. simaruba</i>	28
5.3.1. Proceso de extracción de la corteza.	28
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto total obtenido a partir de la corteza de <i>B. simaruba</i>	28
5.3.3. Fraccionamiento secundario de la corteza.	29
5.3.4. Obtención y purificación del triterpeno epilupeol a partir de la fracción IIC.	29
5.4. Estudio químico de la resina de <i>B. simaruba</i>	31
5.4.1. Proceso de extracción de la resina.	31
5.4.2. Fraccionamiento primario del extracto obtenido resina de <i>B. simaruba</i>	31
5.4.3. Fraccionamiento secundario de la resina.	32
5.4.4. Obtención y purificación del triterpeno epilupeol a partir de la fracción FR6.	32
5.4.4. Obtención y purificación del triterpeno α -amirina a partir de la fracción FR10.	33
5.5. Ensayo biológico.....	33
5.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	35
5.5.2. Procedimiento general del ensayo.	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	52
8. PERSPECTIVAS.....	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CFR	Cromatografía fase reversa
OMS	Organización Mundial de la Salud
GTF's	Glucosiltransferasas
FTF's	Fructosiltransferasas
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
CHX	gluconato de clorhexidina
MeOH	Metanol
UV	Ultravioleta
mg	Miligramo
ml	Mililitros
μl	Microlitros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
d	Doblete
dd	Doble doblete
dt	Doblete tripleteado
td	Triplete dobleteado
s	Singulete
m	Multiplete
t	Triplete

LISTA DE TABLAS

No. Tabla	Contenido	No. Página
1.	Características de un agente antiplaca ideal.	9
2.	Funciones generales de los fitoquímicos en las plantas	12
3.	Compuestos de origen natural con actividad contra <i>Streptococcus mutans</i> .	13 y 14
4.	Clasificación científica de <i>Bursera simaruba</i> . Tomado de Instituto de Ciencias Naturales, 2012.	16
5.	Usos terapéuticos y medicinales reportados para “palo mulato”.	22 y 23
6.	Fraccionamiento secundario de la corteza de <i>Bursera simaruba</i> .	29
7.	Fraccionamiento primario de la resina de <i>Bursera simaruba</i> .	31
8.	Fraccionamiento secundario de la resina de <i>B. simaruba</i> .	32
9.	Controles para el ensayo biológico.	36
10.	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones de la corteza sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i>	38
11.	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones de la resina sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> .	39
12.	Constantes espectrométricas de β -amirina	41
13.	Constantes espectrométricas de <i>epi</i> -lupeol	44
14.	Constantes espectrométricas de α -amirina	47

LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

No. Figura	Contenido	No. Página
1.	Representación esquemática de la iniciación de la caries. Adaptado de Prieto Gutiérrez, 2006.	4
2.	Diagrama de las etapas de la formación de la biopelícula. Tomado de Svensäter <i>et al.</i> , 2004.	8
3.	Distribución natural de <i>Bursera simaruba</i> , en América Latina. Adaptado de Francis, 1990.	15
4.	Vistas del árbol (a) y frutos (b) de <i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. Adaptado de Rojas, 2006.	17
5.	Tronco (c) y corteza (d) de <i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. Adaptado de Rojas, 2006.	18
6.	Ejemplo de extracción de resina. Adaptado de Langenheim, 2003.	19
7.	Compuestos aislados de la resina y el extracto hexánico de la corteza de <i>B. Simaruba</i>	40
8.	Estructura química de β -amirina.	41
9.	Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) β -amirina.	42
10	Espectro de ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) β -amirina.	43
11.	Estructura química de epilupeol.	44
12.	Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) epilupeol.	45
13.	Espectro de ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) epilupeol.	46
14.	Estructura química de α -amirina.	47
15.	Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) α -amirina.	48
16.	Espectro de ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) α -amirina.	49
17.	Espectro de EMIE obtenido para el compuesto β -amirina.	50
18.	Espectro de EMIE obtenido para el compuesto epilupeol.	50
19.	Espectro de EMIE obtenido para el compuesto α -amirina.	51
No. Diagrama	Contenido	No. Página
1.	Fraccionamiento de la corteza de <i>B. simaruba</i> .	30
2.	Fraccionamiento de la resina de <i>B. simaruba</i> .	34



1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales y su estudio con fines terapéuticos nos recuerda el inicio de la historia de la humanidad, cuando el hombre en busca de alimento y salud, aprendió a reconocer las plantas venenosas de las que no lo eran; transmitiendo el conocimiento de generación en generación (Hernández,1981), en forma verbal y escrita por medio de papiros, tablas de barro cocido, pergaminos, tratados de plantas, finalmente trabajos impresos, farmacopeas y mas recientemente sistemas digitales de información. Los registros más antiguos se encuentran en Egipto, China e India y revelan que el uso de plantas medicinales figura en la historia más primitiva (Trease, 1991). El empleo terapéutico de este tipo de plantas se basa en diversas preparaciones entre las que destacan las infusiones, cocimientos, emplastos, ungüentos y aceites; mediante la aplicación de estos se favorece la cura de algún padecimiento (Cortéz *et al.*, 2004).

En México se estima que existen cerca de 3,103 especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional mexicana, de las cuales casi un tercio (1,024) son empleadas para tratar malestares del tracto digestivo, 473 especies para padecimientos estomacales, 247 para enfermedades respiratorias y 277 para enfermedades cutáneas (KaKuko *et al.*, 2005; Argueta *et al.*, 1994; Aguilar *et al.*, 1994). Datos de la Organización Mundial de la Salud señalan que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica.

Un problema de salud publica muy importante a tomar en cuenta para tener una buena calidad de vida, son las enfermedades de la cavidad bucal. Esto resulta evidente ya que algunos estudios que comprueban que el 95% de la población mundial se encuentra afectada por las caries dentales (Aguilera *et al.*, 2004) y que los países en vías de desarrollo como México con una población de aproximadamente 100 millones de personas, de las cuales más del 90% de la población padece caries dental, además de otras patologías bucales de alta prevalencia como la enfermedad periodontal, el cáncer bucal y las maloclusiones (Salgado, 2013).



Resaltando que el consumo de azúcares especialmente entre comidas se ha evidenciado como un factor de riesgo en la aparición de caries (Carrero *et al.*, 2005; Burt, 2002; Tuger *et al.*, 2003; Burt *et al.*, 2001) provocando que la bacteria responsable de la caries -*Streptococcus mutans*- aproveche la presencia de carbohidratos produciendo ácido y la subsecuente desmineralización del esmalte de los dientes (Aguilera *et al.*, 2004).

Partiendo de que la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, desde aquellos que pueden acceder a costosos tratamientos de salud hasta las personas de escasos recursos o de origen indígena, se busca como una alternativa al tratamiento de la caries bucal el uso de la corteza y resina de la *Bursera simaruba*, la cual es conocida en la medicina tradicional como un remedio para tratar enfermedades como calor en el estómago, diarrea, dolor de muelas, infección intestinal, padecimientos hepáticos, males venéreos, infecciones bucodentales, etc. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2012), debido a las propiedades para tratar infecciones bucodentales se determinará su posible actividad antibacteriana contra la bacteria *Streptococcus mutans*.



2. ANTECEDENTES

2.1 Caries dental.

2.1.1. Definición y Generalidades.

La etiopatogenia de la caries fue propuesta por W. Miller en 1882; según Miller el factor más importante en la patogenia de la enfermedad era la capacidad de un gran número de bacterias bucales con capacidad de producir ácidos a partir de hidratos de carbono de la dieta (Negroni, 2009).

La caries es una enfermedad transmisible e infecciosa de origen multifactorial, dinámica, crónica, localizado, pos-eruptivo. Este proceso presenta tres etapas: la unión inicial del microorganismo al esmalte dental a fin de iniciar la colonización, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos, seguida de la acumulación y formación de un ecosistema bien organizado que permita el metabolismo bacteriano cuyo resultado es la formación de ácidos que desmineralizan la superficie dental, que termina en la destrucción de los tejidos duros del diente como son el esmalte, dentina y cemento (Prieto, 2006).

El desarrollo de una lesión cariosa se inicia por la desmineralización de la superficie externa del esmalte debido a los ácidos orgánicos producidos localmente por las bacterias que fermentan los carbohidratos de las dietas. 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). En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de la iniciación de la caries.

En estudios previos realizados por van Houte se determinó la existencia de *Streptococos* que no pertenecen al grupo *mutans*, asociándoles con algunas lesiones de caries dental en humanos, lo cual nos indica la posibilidad de que otras especies estén involucradas ocasionalmente en el proceso de la enfermedad (Prieto, 2004; van Houte, 1994).

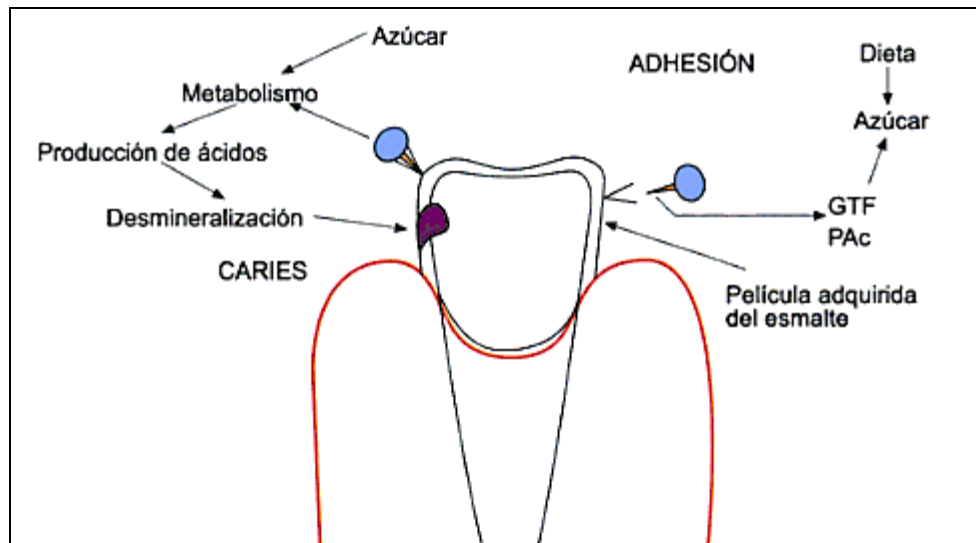


Figura 1. Representación esquemática de la iniciación de la caries.
Adaptado de Prieto Gutiérrez, 2006.

2.1.2. Microorganismos de la cavidad oral.

La cavidad oral se considera un ecosistema abierto donde existe una variedad de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras; algunos son considerados nativos entre los cuales predominan los anaerobios pertenecientes a los géneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Gemella* y *Porphyromonas* o aerobias (*Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*). Los microorganismos se retienen en la boca por medio de comunidades microbianas en diferentes nichos, por medio de su capacidad de adherencia a superficies epiteliales o adamantinas, de manera mecánica en: fosas, fisuras de los dientes, en el espacio virtual entre la encía y el diente denominado surco gingival (Takahashi, 2005). Otros microorganismos logran el acceso a la boca pero no se instalan en ella y se denominan transitorios. El desarrollo de bacterias patógenas u oportunistas (especies de *Actinomyces*, *Prevotella intermedia*, etc.), así como hongos (*Candida sp.*, *Histoplasma capsulatum*), virus (*Herpes simplex*, papilomavirus) y parásitos (*Entamoeba gingivalis*, *Tichomonas tenax*) se ven favorecidas en la cavidad bucal si el equilibrio imperante se ve alterado por las condiciones debidas de una enfermedad o la intervención odontológica, como la extracción de una pieza dental o limpieza bucal (Prieto, 2004).



2.2. *Streptococcus mutans*.

2.2.1. Generalidades del grupo.

Streptococcus mutans es una bacteria cariogénica incitadora de la caries, Gram positivo capaz de metabolizar un rango de carbohidratos mayor que cualquier otro microorganismo Gram positivo, fue aislado e identificado por J. Kilian Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presentan: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino. Esta bacteria es anaerobia facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si este no está presente también puede sobrevivir, aunque su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis; sus medios de vida son el tracto respiratorio, gastrointestinal y bucal del hombre; crecen a una temperatura de 37°C, y se pueden ver afectadas con respecto a la ausencia y exceso de carbohidratos (Koneman *et al.*, 2008). Los componentes de la pared celular del *S. mutans* son: polisacáridos, ácidos teicoicos, glucosiltransferasas y proteínas de unión a carbohidratos (lectinas), y están asociadas a estructuras de las bacterias como fimbrias, capsulas, pilis (Rocha, *et al.*, 2004).

La mayoría de las cepas de *S. mutans* fermentan al manitol, sorbitol entre otros azúcares y sintetizan polímeros azucarados como lo son: glucanos solubles (dextranos), glucanos insolubles (mutanos) y fructanos solubles (levanos), por medio de enzimas extracelulares asociadas con la pared celular de *S. mutans*, glucosiltransferasa (GTF's) y fructosiltransferasa (FTF's), que parten la molécula de sacarosa en monosacáridos; los grupos glucosídicos y fructosídicos son transferidos a receptores de glucanos y fructanos respectivamente. La producción de fructosa se utiliza como sustrato para el crecimiento de las bacterias, mientras que la glucosa se polimeriza para formar una malla de glucano, así como ácido láctico que daña el esmalte; la malla, conjuntamente con una gran población de *S. mutans*, otras bacterias y residuos orgánicos, dan lugar a la formación de la placa dental que se adhiere tan firmemente a la superficie de los dientes (Ingraham *et al.*, 2004).

Marsh en estudios experimentales en animales demostró que la habilidad de inducir caries dental no es una propiedad exclusiva de una especie, estableciendo que los Streptococos del grupo



mutans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) y los lactobacilos son bacterias cariógenas más agresivas. Sin embargo, el *S. mutans* no siempre comprende la porción mayoritaria de la microflora inicial en las lesiones y enfermedades bucales, pero su número se incrementa considerablemente conforme las enfermedades progresan (Prieto, 2004; Marsh, 1999).

La capacidad patogénica del *S. mutans* se fundamenta principalmente en sus propiedades adhesivas, así como de su capacidad acidofílica, acidogénica y acidúrica, además de otros mecanismos que incrementan su virulencia durante el proceso cariogénico (Gamboa *et al.*, 2004). Como ya lo mencionamos, los microorganismos tienden de forma natural a adherirse a superficies bióticas y abióticas para multiplicarse, y sumergirse en una matriz viscosa, formando colonias microbianas conocidas como biopelículas y en este caso *S. mutans* no es la excepción.

2.2.2. Biopelícula.

El término *biofilm* se introdujo en 1978 por J. William Costerton. El *biofilm*, biopelícula, es una formación de agregados bacterianos, usualmente existentes como comunidades cercanamente asociadas que se adhieren a una variedad de superficies naturales o artificiales, en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota (Pérez, 2005). Suele estar compuesto de 20-30 especies bacterianas distintas. La película contiene albúmina, lisozima, glicoproteínas, fosfoproteínas, lípidos y componentes del fluido gingival. Otras características tales como pH, nutrientes, fuerza iónica, y temperatura juegan un papel importante en el rango de microorganismos unidos a los sustratos (Rocha *et al.*, 2004). Los estudios sobre las biopelículas han demostrado que son de naturaleza orgánica y comienzan a formarse minutos después de la exposición, por lo que continúan formándose por varias horas.



2.2.3. Formación de biopelícula.

En la formación de la biopelícula interviene una combinación de fuerzas físico-iónicas, hidrófobas, de Van der Waals y además se detecta fijación de hidrógeno entre la superficie dentaria y los componentes orgánicos e inorgánicos de la saliva. El esmalte limpio tiene más grupos accesibles de fosfatos que iones calcio. La adsorción de moléculas en esta superficie engloba la interacción de los grupos fosfatos con los iones de calcio de la saliva para formar puentes de carga negativa (carboxil-fosfato-sulfato y ácido siálico). Las células microbianas se integran a través de una matriz polimérica extracelular, mezcla de polisacáridos, proteínas y DNA secretado por ellas; estas sustancias permiten que la biopelícula funcione como sistema (Negroni, 2009). Con base a la bibliografía consultada se resume la formación de la biopelícula en la caries en las siguientes fases:

Fase I (adhesión): Se da la formación de biopelícula adquirida sobre la superficie del diente, compuesta fundamentalmente por glicoproteínas y anticuerpos. Esta película modifica la carga y la energía libre de la superficie dentaria debido a las fuerzas fisicoquímicas entre las bacterias y la superficie del diente recubierta, incluyendo fuerzas de Van der Waals, lo que favorece la adhesión bacteriana que una vez que perciben una superficie, proceden a formar una unión activa vía apéndices, como fimbrias, flagelos o pilli (Nazar, 2007). Las bacterias que se unen inicialmente, son *Streptotoccus mutans* y el *lactobacillus* (Enrile, 2009).

Fase II (crecimiento): La bacteria una vez adherida comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia, se da la formación de una monocapa sobre la superficie. A medida que las colonias aumentan sobre la superficie se construye la matriz de la biopelícula que se despliega de forma tridimensional (Nazar, 2007).

Fase III (desprendimiento): Inmediatamente después que la biopelícula obtuvo la maduración de algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se libera la matriz para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación y desarrollo de la biopelícula. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas a la biopelícula o procesos



activos inducidos por él (Nazar, 2007), aunque la tasa de desprendimiento de los conglomerados bacterianos no está clara, debido a que el número de microorganismos en la fase planctónica (saliva) promedio es de diez hasta millones por mililitro. Por lo tanto, el desprendimiento de los microorganismos se debe considerar como un proceso continuo durante el desarrollo de la biopelícula (Svensäter *et al.*, 2004). En la Figura 2 se ilustran las etapas de formación de la biopelícula.

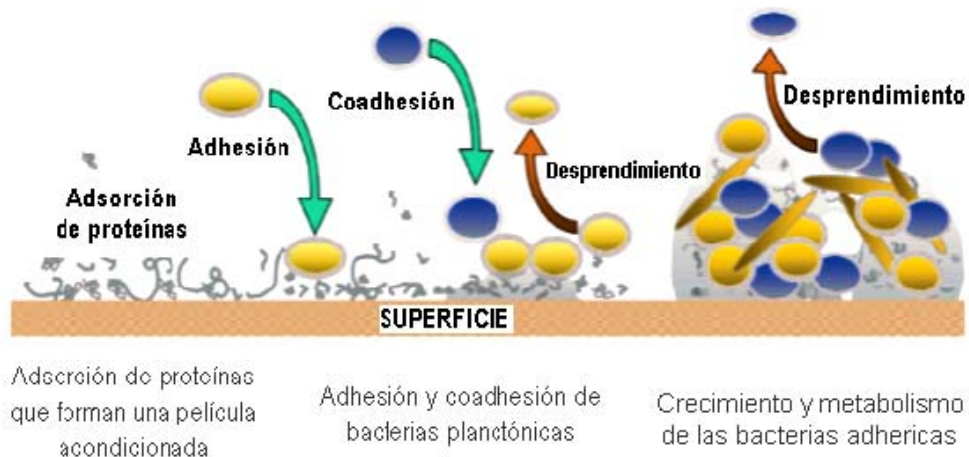


Figura 2. Diagrama de las etapas de la formación de la biopelícula.
Tomado de Svensäter *et al.*, 2004.

2.2.4. Inhibición química de las biopelículas.

Debido a la resistencia que opone la biopelícula a la acción de los antimicrobianos, el control químico resulta poco efectivo. La eliminación exagerada de microbiota bucal puede determinar la colonización y proliferación de microorganismos oportunistas, tales como *Candida* y coliformes. Hasta el momento no se ha logrado el antimicrobiano ideal (Negroni, 2009). En la Tabla 1 se resumen las características idóneas de un agente antibacteriano.



Tabla 1. Características idóneas de un agente antibacteriano.

a) Debe eliminar rápidamente la placa organizada.
b) Debe inhibir la formación de nueva placa.
c) No debe de ser toxico.
d) No debe poseer efectos secundarios adversos.
e) Debe tener características organolépticas aceptables.
f) Debe poseer sustentividad.
g) No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o del hospedador.
h) No debe originar resistencia bacteriana.
i) Debe alterar en forma mínima la microbiota asociada con la salud.
j) No debe ser carcinogénico.

Según Negroni, existen susceptibilidades con respecto a los antimicrobianos respecto a su capacidad de actuar para inhibir la formación de biopelículas que origina la caries. Estas son:

a) Cargas y superficies libres de energía.

Tanto las bacterias como las superficies de la cavidad bucal poseen cargas eléctricas. Las fuerzas repulsivas encontradas en una interfase constituyen la electrocinética o “potencial Zeta”. En las bacterias este potencial puede ser determinado por medio de su movilidad electroforética. Los “potenciales zeta” de las bacterias aumentan con una hidrofobicidad decreciente, en tanto que las bajas cargas de superficie y la alta hidrofobicidad favorecen la adherencia bacteriana. Un agente que al ser liberado localmente puede aumentar la carga en las bacterias o de las superficies bucales o ambas en teoría puede reducir la adherencia bacteriana (Negroni, 2009).

Los preparados con estaño y aminofluoruros aplicados localmente pueden reducir la energía libre de superficie de un esmalte limpio y de la película adquirida, pero poseen baja sustentividad, la



cual es la capacidad de un agente de unirse a distintas localizaciones de la boca, para liberarse lentamente en forma activa manteniendo niveles terapéuticos. Además, la propiedad antimicrobiana del estaño no es clara (Negroni, 2009).

b) Hidrofobicidad de los microorganismos.

La adherencia de algunas especies bacterianas a las piezas dentarias es un ejemplo práctico del fenómeno de hidrofobicidad.

S. sanguinis y *S. mitis* se consideran especies con alta hidrofobicidad que se adhieren fuertemente a películas salivales experimentales; en cambio, *S. mutans* y *S. salivarius* se consideran de baja hidrofobicidad. Se ha demostrado que el catión litio (Li^+) y el ion tiocianato, reducen la adherencia de *S. sanguinis* a la película adquirida en un 81% y un 94%, respectivamente (Negroni, 2009).

El tiocianato de sodio interfiere a nivel de las interacciones receptor-adhesina, posiblemente por solubilizar las proteínas bacterianas presentes en la saliva que participan en la adhesión a la hidroxiapatita (Negroni, 2009).

c) Adhesinas e interacciones específicas.

Las adhesinas, que pertenecen a la superficie de las células bacterianas, interactúan en sitios específicos de la biopelícula con los llamados receptores, facilitando la adhesión en las bacterias. Podría controlarse esta adherencia por medio de análogos de las adhesinas capaces de bloquear receptores.

Por ejemplo, la adherencia de *S. mutans* a proteínas de la película adquirida puede ser impedida por compuestos que contengan un grupo amino primario, como galactosamina, manosa y espermina (Negroni, 2009).



d) **Polisacáridos extracelulares.**

La adherencia de *S. mutans* es posible gracias al glucano extracelular insoluble (mutano); éste puede superar fuerzas repulsivas y adherirse fuertemente al microorganismo. Muchas sustancias apuntan a ellos para lograr su control.

Las dextranasas producidas por el hongo *Penicillium foniculosum* fueron utilizadas para el control de la placa en hámsteres. En seres humanos redujeron el peso seco de la biopelícula, pero no impidieron su formación (Negroni, 2009).

2.3. Agentes antimicrobianos.

Para el control de la placa cariogénica se han evaluado varios agentes antisépticos y antibióticos. Entre los agentes antimicrobianos evaluados en animales con resultados positivos se encuentran penicilina y actinobolina los cuales pueden ser ingeridos; mientras clorhexidina, alexidina, octanidina, minociclina, aminoacridina y derivados de la piperazina son utilizados tópicamente. En estudios realizados en seres humanos se ha demostrado que tanto la clorhexidina como el triclosán reducen la producción ácida de la placa dentobacterial (Barrancos, 2006).

Por otro lado, el fluoruro de sodio es el agente preventivo de la caries más importante utilizado en humanos. Esta sal es un agente capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Hamilton, 1990; Bradshaw *et al.*, 2002).

2.4. Funciones generales de los fitoquímicos.

De acuerdo con la literatura, los fitoquímicos con reconocida actividad antibacteriana pertenecen principalmente a las siguientes clases estructurales: fenoles, terpenoides, alcaloides, lectinas, polipéptidos y poliácetilenos (Cowan *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2004; Copping *et al.*, 2007; Stavri *et al.*, 2007). Se considera que cada clase de productos, además de su función potencial



contra patógenos invasores, posee otras funciones en la fisiología y funcionalidad de la planta. A manera de ejemplo, en la Tabla 2 se enlistan las funciones generales de algunos fitoquímicos en la planta.

Tabla 2. Funciones generales de los fitoquímicos en las plantas

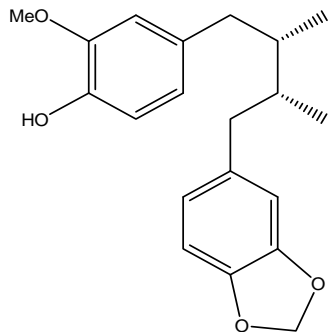
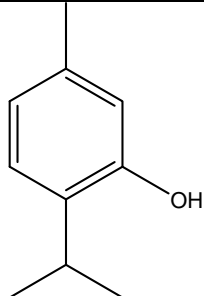
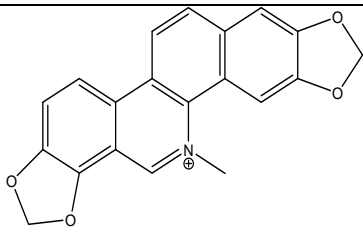
Fitoquímico	Función en la planta	Referencia
Flavonoides, antocianinas, etc	Sirven como pigmentos de atracción en las flores para la polinización y los mecanismos de protección contra los rayos UV.	(Tholl, 2006).
Terpenoides	Por su diversidad y complejidad estructural representan un enorme potencial para mediar las interacciones planta-entorno.	(Tholl, 2006).
Aceites esenciales	Forman parte de los olores de las plantas y sus componentes.	(Cowan, 1999).
Taninos	Poseen una función constitutiva, y se encuentran presentes en casi todas las partes de las plantas: corteza, madera, hojas, frutos y raíces. Estos compuestos son los responsables del sabor astringente de los vinos o de las frutas sin madurar, y como componentes de los colores que se observan en las flores y en las hojas de otoño.	(Scalbert, 1991).
Polipéptidos	Pueden poseer funciones de señalización, funcionando como mensajeros químicos intracelulares.	(Bergey <i>et al.</i> , 1996; Pearce <i>et al.</i> , 2001).

Los compuestos derivados de plantas pueden inhibir el crecimiento de las bacterias mediante mecanismos diferentes a los que presentan los antibióticos utilizados comúnmente en la terapéutica. Se han encontrado diversos registros sobre la actividad antibacteriana de plantas. En diferentes estudios los compuestos aislados de las plantas pueden poseer actividad biológica la cual depende de sus propiedades químicas y estructurales. A continuación se muestran de manera general algunos ejemplos de estos compuestos en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans*.

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Brazilina		<i>Caesalpinia sappan</i>	Xong <i>et al.</i> , 2004
Ácido oleanólico		<i>Vitis vinifera</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2008
Guajaverina		<i>Psidium guajava</i>	Prabu <i>et al.</i> , 2006
Ácido anacárdico C _{15:1}		<i>Anacardium occidentale</i>	Kasemura <i>et al.</i> , 2002
Ácido anacárdico C _{15:3}		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003

Tabla 3. Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans* (Continuación).

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Macelignano		<i>Myristica fragans</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Timol		<i>Thymus vulgaris</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Sanguinarina		<i>Sanguinaria canadensis</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006



2.5. *Bursera simaruba*.

2.5.1. Generalidades y distribución.

Las plantas de la familia Burseraceas se caracterizan por ser árboles o arbustos con sustancias resinosas en casi todos los órganos, presentan canales resiníferos en el interior de la corteza (Robles *et al.*, 2005; Cuatrecasas, 1957; Swart, 1942).

Son ocho los géneros Burserasea representados en América, seis de los cuales son endémicos y entre los que se encuentra el género *Bursera*, que alberga cuatro especies entre ellas *Bursera simaruba* (Cuatrecasas, 1957), esta última se distribuye desde el sur de Florida y las islas Bahamas a través de las Antillas Mayores y Menores y penetrando el norte de América del sur (Francis, 1990; Instituto Geográfico “Augustín Codazzi”, 1997). Crece también en ambas costas del centro de México, a través de la América Central y a lo largo de la costa del Océano Pacífico de las América del Sur casi hasta la línea ecuatorial (Francis, 1990; Pennington, 1968). En la Figura 3 se muestra la distribución de la *Bursera simaruba* en América Latina.



Figura 3. Distribución natural de *Bursera simaruba*, en América Latina.
Adaptado de Francis, 1990.



2.5.2. Sinonimias botánicas y clasificación científica.

Entre las principales sinonimias encontramos las siguientes: *Bursera gummifera* L.; *Pistacia simaruba* L.; *Elaphrium ovalifolium* Schlecht; *Bursera bonairensis*; *Bursera integerrima* (Tul.); *Bursera ovalifolia* (Schltdl.) Engl.; *Bursera subpubescens* (Rose) Engl.; *Elaphrium simaruba* (L.) Rose.; *Elaphrium subpubescens* Rose; *Pistacia simaruba* L. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2012).

Respecto a la clasificación botánica de la *Bursera simaruba*, se muestra la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación científica de *Bursera simaruba*
Tomado de Instituto de Ciencias Naturales, 2012.

Nombre común:	Indio desnudo, Almácigo, Chacá, Palo mulato, Jobo, copalillo, gumbo-limbo, jiñote, caraña, jiñocuabe, etc.
Nombre Científico:	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.
Autor epíteto específico:	(L.) Sarg.
Epíteto Específico:	Simaruba
Reino:	Plantae
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Burseraceae
Género:	Bursera
Phylum:	Magnoliophyta

2.3.3. Descripción del árbol de *Bursera simaruba*.

Es un árbol frondoso de 10 a 30 m de altura, aromático, se distingue fácilmente por la corteza lisa de color castaño rojizo o cobrizo que se desprende en láminas como si fuera papel, exponiendo la corteza interior de color castaño verdoso, con una pequeña torcedura en su parte media o superior. Otras características distintas son: una resina grisácea con sabor a trementina que



emana al hacer incisiones en la corteza; el olor es ligeramente picante o semejante a trementina que desprenden las hojas trituradas, el fruto y las ramitas al ser cortadas (Little, 1907).

Presenta hojas alternadas, compuestas, imparipinadas, de 1-5 pares de folíolos. Las flores son verdosas o amarillas y se disponen en partículas axilares color rojizo. Los frutos son secos dehiscentes, tipo cápsula y se agrupan en ramas; las semillas son aristadas, color naranja al madurar, provistas de un arilo rojo que las cubre totalmente. Las flores y el fruto nacen generalmente en la primavera antes o al mismo tiempo que las hojas nuevas, o a veces en el verano. Pierde sus hojas en la época seca del año. Generalmente son dioicas, es decir, que las flores femeninas y masculinas son producidas por individuos distintos y se desarrollan previa o simultáneamente a las nuevas hojas (Rojas, 2006).

Es una especie que se da en una amplia variedad de climas y condiciones de suelo; prefiere áreas abiertas y vegetación secundaria o bosques intervenidos. Con frecuencia se utilizan en cercas vivas. Su madera es suave, blanca, maleable y se le puede dar un fino acabado, se utiliza para la fabricación de diversos artículos de carpintería así como construcciones de vivienda (Zamora, 2000).

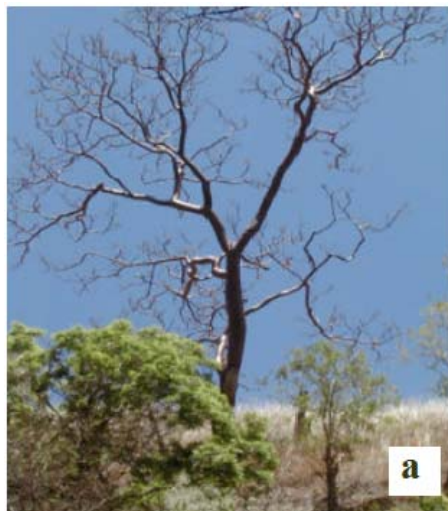


Figura 4. Vistas del árbol (a), frutos (b) de *B. simaruba*. Adaptado de Rojas, 2006.

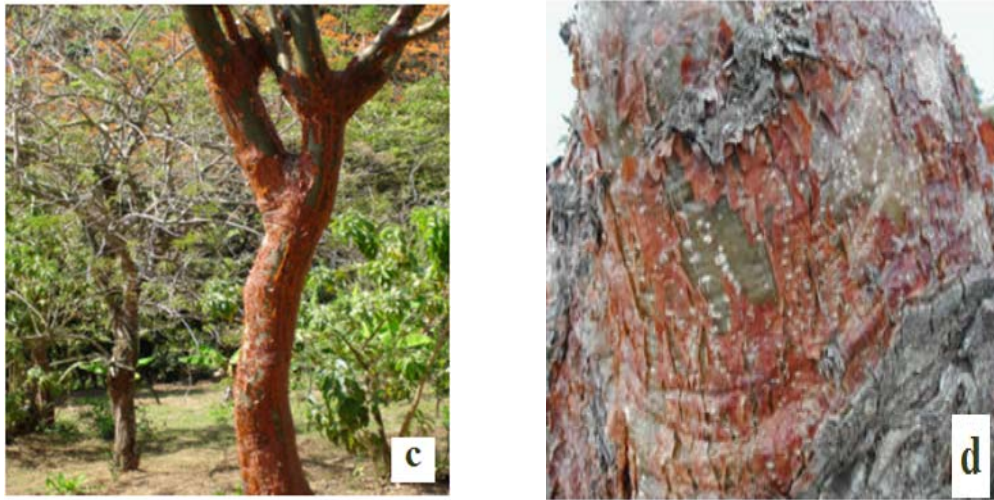


Figura 5. Tronco (c), corteza (d) de *B. simaruba*. Adaptado de Rojas, 2006

2.4. Copal.

2.4.1. Definición.

Los copales pertenecen al género *Bursera*, el cual posee alrededor de 100 especies distribuidas exclusivamente en el continente americano. Derivado del náhuatl “copalli” que después se transformó por los españoles a copal, este término se refiere a todas las resinas usadas por los aztecas, provenientes de árboles de la familia como *Protium*, *Bursera*, *Pinus*, *Liquidambar*. El copal era usado para ritos religiosos y en la medicina herbolaria. Trabajadores del ámbar clasificaron a las resinas que no fosilizaban como copal (Langenheim, 2003).

2.5. Resina.

2.5.1. Definición.

A lo largo de la historia del hombre la definición de resina ha pasado de ser la savia o exudado, que incluyen numerosas sustancias de las plantas, hasta cualquier exudado de la planta que sea pegajoso; y se consideró posteriormente a la resina como un conjunto de sustancias insolubles en agua y que en última instancia endurece cuando es expuesta al aire. Existe una



confusión con respecto a exudados de plantas, incluyendo goma, mucilagos, aceites, ceras y látex. Por medio de diferentes estudios de cromatografía y espectroscopia en los años 1940 y 1950 se pudo cuantificar y conocer su composición química.

2.5.2. Obtención.

La resina es secretada en estructuras de almacenamiento específicas las cuales son de gran importancia para la defensa de la planta, la extracción se lleva a cabo por medio de incisiones de la corteza, para su uso. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de la extracción de la resina (Langenheim, 2003).



Figura 6. Ejemplo de extracción de resina.
Adaptado de Langenheim, 2003.



2.5.2. Composición de la resina de *B. simaruba*.

Diversos estudios han permitido distinguir los diferentes tipos de resinas, mediante las vías de biosíntesis ha sido posible determinar la formación de su composición química. La mayoría de las resinas se componen principalmente por terpenoides volátiles, terpenoides no volátiles, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos y/o terpenoides fenólicos (Langenheim, 2003). La resina de *B. simaruba* incluye una variedad de triterpenos tales como lupeol, epilupeol, epiglutinol, β - y α -amirina y se ha encontrado que picropoligamaina es uno de sus principios activos (Peraza *et al.* 1992; Langenheim, 2003).

2.5.3. Usos de la resina.

La resina en ocasiones se ha utilizado como incienso en ritos religiosos (Stross 1996; Langenheim, 2003), como en las celebraciones de Semana Santa, y día de los Fieles Difuntos; se vende copal en mercados y se encuentran sahumerios en altares de iglesias, pero sobretodo en las ofrendas de los hogares tanto del campo, como de la ciudad.

La resina se usa como medicina tradicional, principalmente en la región de Yucatán para diversas enfermedades (Morton, 1977). Se considera que al inhalar el humo de la resina o tomarla en forma de té, ayuda a aliviar enfermedades respiratorias. Su humo también se utiliza para purificar casas y personas, para pedir salud y bienestar o simplemente porque a la gente le agrada el aroma. El aceite del copal es utilizado en la aromaterapia para tratar ciertas enfermedades, debido a que tienen efectos sobre el sistema cerebral relacionado con las emociones, entre otros efectos (sistema límbico). Mientras que en la industria de la perfumería los monoquiterpenos y sesquiterpenos son utilizados como una fuente de aromas baratos (Ankarfjård *et al.*, 1998).



2.6. Corteza.

2.6.1. Definición de corteza.

Corteza o ritidoma es la capa más externa de tallos y raíces de las plantas leñosas, como los árboles. Es un elemento de gran utilidad en la botánica forestal, así como en la medicina tradicional mexicana, su estructura depende básicamente de la relación entre la velocidad de crecimiento de la madera; la corteza puede llegar a alcanzar cerca del 10-15 % del peso total del árbol (Terence, 2005).

2.6.2. Características de la corteza de *Bursera simaruba*.

La corteza de especies como *Bursera simaruba* se distingue fácilmente por el color de la corteza castaño rojizo y corteza lisa, tiene características de una corteza escamosa, la cual se desprende en piezas semejantes a tejas, de grosor y tamaño variables, las escamas pueden ser bastante pequeñas pero gruesas, en forma de cuñas redondas o conchas que dejan una depresión profunda al desprenderse, a este tipo de corteza se le llama “corteza conchuda” (Terence, 2005). La corteza de *B. simaruba* incluye una variedad de compuestos como: lignanos yatein, β -peltain-O- β -D-glucopiranoside, hinokinín, burselina, picropoligamaina, entre otros (Maldini, 2009).

2.6.3. Usos de la corteza de *Bursera simaruba*.

La corteza es usada como antipirético (calentura), para hemorragia nasal, dolor muscular, remedio para el hipo, limpieza de heridas, inflamación de ovarios, picadura de araña, dolor muscular, etc. Por otro lado, se utiliza para elaborar cajitas artesanales en Olinalá, Guerrero, y los tallados de animales fantásticos o alebirjes en Oaxaca.



2.7. Usos y propiedades medicinales *Bursera simaruba*.

B. simaruba es un árbol medicinal muy arraigado en la cultura popular por su potencial curativo, atribuyéndosele al menos 47 usos posibles. Destaca como un árbol medicinal por su eventual efecto en el tratamiento de la piel, así como en el tratamiento de varios tipos de infecciones e incluso se le atribuyen posibles efectos positivos en enfermedades serias como la diabetes. Los poderes curativos del también llamado “palo mulato”, tienen que ver en el uso de diferentes partes de la planta como lo son: los frutos, flores, hojas, raíces, corteza y resina; para la prevención o tratamiento de diversos problemas de salud de las personas, ya sea en forma de infusiones o en forma de tinturas.

Los estudios previos realizados utilizando extractos orgánicos de la familia Burseracea han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias (Sosa *et al.* 2002), antitumorales (Wickramaratne *et al.*, 1995; Mc Doniel and Cole, 1972; Biannchi *et al.*, 1968; Bianchi *et al.*, 1968; Cole *et al.*, 1969; Peraza *et al.*, 1992; Jolad *et al.*, 1997; Jolad *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1983; Aranya *et al.*, 2005) y actividad antimicrobiana relacionada con la presencia de triterpenos tetracíclicos, (Gray *et al.*, 1997; Robles, 2005). En la Tabla 4, se representan los usos terapéuticos y medicinales para el “palo mulato”.

Tabla 5. Usos terapéuticos y medicinales reportados para “palo mulato”.
Adaptado de Rojas 2006.

Uso reportado	Autor				
	Segleau, 2001	CONABIO, 2005	Rodríguez, 2006	Gupta, 1995	CATIE, 2005
Alergias		*			
Amigdalitis		*			
Bronquitis	*				
Cálculos biliares	*				
Cálculos renales	*				
Cangrena				*	
Cicatrización de heridas				*	



Tabla 5. Usos terapéuticos y medicinales reportados para “palo mulato”.
Adaptado de Rojas 2006. Continuación.

Uso reportado	Autor				
	Segleau, 2001	CONABIO, 2005	Rodríguez, 2006	Gupta, 1995	CATIE, 2005
Cicatrización de ombligo			*	*	
Cutis	*				
Diabetes					*
Diarrea	*	*	*	*	
Disentería		*			*
Diurético			*	*	*
Diviesos	*				*
Dolor de estómago			*	*	
Dolores de cintura	*				
Enfermedades de la piel			*		*
Enfermedades venéreas	*	*		*	*
Erisipela	*				*
Febrífugo	*	*	*	*	
Ganglios inflamados				*	
Gastritis	*		*	*	*
Hemorragias	*				
Hígado	*				
Hipertensión				*	
Impotencia				*	
Infecciones bucodentales	*		*	*	
Infecciones internas	*				
inflamaciones de piel	*				*
Insecticida	*			*	
Lombrices	*				
Resfríos	*	*	*	*	
Salpullido		*	*	*	
Sangrado nasal		*	*	*	*
Papalomoyo	*				
Perder peso	*	*		*	*
Piquetes de insectos	*		*	*	
Piquetes de serpientes	*	*			*
Purgante	*	*	*	*	*
Purificar sangre	*				
Quemaduras de sol	*	*	*	*	



3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de la cavidad oral no siempre son atendidas con la debida seriedad. Es importante destacar que muchos trastornos gastrointestinales tienen como origen una dentadura defectuosa o descuidada. Una simple inspección de la cavidad oral aporta datos valiosos para el diagnóstico y detección de anomalías como las caries, periodontopatías y maloclusiones con factores de riesgo relacionados entre sí o enfermedades infecciosas que radican en inflamaciones gingivales o en una piorrea alveolar.

Además, los programas de salud existentes se enfocan principalmente a la corrección y no a la prevención del problema. Otro de los problemas que se enfrentan, es el uso excesivo y a la automedicación de antibióticos, lo cual ha propiciado la aparición de bacterias resistentes, la disminución en la eficacia de los tratamientos, limitando el rango terapéutico contra patógenos ocasionando que los tratamientos se vuelvan más costosos, invasivos, peligrosos e ineficientes. Las razones antes mencionadas hacen necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En este sentido, los productos naturales representan una opción que ayuda a combatir eficazmente a los microorganismos patógenos de manera accesible a la población. Es importante destacar que estudios previos demuestran el valor de los productos naturales en la prevención y el tratamiento de las enfermedades de la cavidad oral sin ocasionar efectos adversos graves e indeseados.

Por tal razón, es de gran importancia la búsqueda de alternativas de tipo preventivo, procedentes de productos naturales que ayuden a combatir eficazmente a microorganismos que causan enfermedades, sin con ello provocar efectos secundarios en las personas que los ingieran. Considerando la amplia biodiversidad natural que existe en México, surge como opción la medicina tradicional, particularmente las plantas que pudieran reducir la alta incidencia de caries en nuestro país.



Los productos naturales representan una alternativa para la búsqueda de sustancias químicas con mayor eficacia para la prevención de la placa dentobacteriana y de la caries. En este sentido, la *B. simaruba* es utilizada en la medicina tradicional para tratar infecciones de la garganta, dolores de muelas, fuego en la boca, para constipación, vómito, gripe, tos, hepatitis entre otros. Estos antecedentes permiten señalar a la *B. simaruba* como una posible opción ante el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos bacterianos de la cavidad oral.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo general del presente proyecto de investigación, consiste en aislar y evaluar los compuestos que forman parte de la corteza y resina de *Bursera simaruba* que pudieran ser responsables del potencial para inhibir el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.

4.2. Objetivos Particulares.

- i. Aislar y purificar los compuestos a partir del copal (resina de *Bursera*) y del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
- ii. Evaluar el efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* de los compuestos aislados de *Bursera simaruba*.
- iii. Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos generales.

5.1.2. Análisis cromatográficos.

Para realizar el análisis cromatográfico, se llevó a cabo el uso de la cromatografía en capa fina (CCF) tanto de tipo analítica como preparativa. Para el primer caso se utilizaron placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.1 mm de espesor y para la segunda se realizaron sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm (cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck) con un espesor de película de 2 mm, utilizando diversos sistemas de elución en ambos casos.

Las placas se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con distintas soluciones cromogénicas [(anisaldehído sulfúrico al 1%; vainillina sulfúrica al 5% (1g de vainillina + 1ml HCl+ 100 ml de metanol) sulfato cerico amoniacal)], seguido de un calentamiento a 100°C aproximadamente, hasta la visualización de los compuestos.

Se realizó cromatografía en columna abierta (CCA) empleando gel de sílice Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM, empacado en una columna de vidrio(6 x 60 cm), utilizando como sistema de elución diferentes proporciones de disolventes tales como 8:1:1 de (hexano, AcOEt, diclorometano). Por otra parte, se realizó cromatografía fase reversa (CFR) empleando C18, empacado en una columna de (5 x 60 cm), utilizando como sistema de elución metanol puro.

5.1.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrometrías.

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



espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN- ^1H , 400 MHz) y carbono 13 (RMN- ^{13}C , 100 MHz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa, ionización directa a 70 eV. Los espectros RMN se llevaron a cabo utilizando CDCl_3 como referencia reportando los desplazamientos químicos en ppm.

5.2. Material Vegetal.

La corteza y resina de *Bursera simaruba* se compraron en el Mercado de Sonora en la Ciudad de México. Se guardó una muestra de referencia en el laboratorio 111, del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

5.3. Estudio químico de la corteza B. simaruba.

5.3.1. Proceso de extracción de la corteza.

Se utilizaron 0.5 Kg de la corteza *B. simaruba* para la extracción con metanol (1L) mediante un proceso de maceración durante una semana a temperatura ambiente. El proceso se repitió tres veces en un periodo de tiempo de tres semanas. Al término de cada proceso de extracción el material vegetal se filtró y el extracto resultante de coloración café se concentró al vacío para recuperar el disolvente.

5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto total obtenido a partir de la corteza de *B. simaruba*.

El extracto metanólico (13.89 g) se sometió a un proceso de partición con *n*-hexano y una mezcla de metanol:agua (50:50). Como resultado este proceso, se obtuvieron dos fracciones de diferente polaridad, las cuales se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador.



5.3.3. Fraccionamiento secundario de la corteza.

Una porción de 9.027g de la fracción hexánica derivada del extracto de *B. simaruba* se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta sobre gel de sílice y como fase móvil hexano:AcOEt:CH₂Cl₂ (8:1:1). El proceso descrito, permitió la obtención de 78 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica en tres fracciones combinadas (IC, IIC y IIIC). En la Tabla 6 se resume el proceso de fraccionamiento secundario.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la corteza de *Bursera simaruba*

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave asignada
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (8:1:1)	IA-XIA	IC
	XIIA-XVIIA	IIC
	XVIII A-XXXIIA	IIIC

5.3.4. Obtención y purificación del triterpeno epilupeol a partir de la fracción IIC.

La fracción IIC fue sometida a un proceso de recristalización con una mezcla de disolventes de diclorometano y metanol en una proporción (1:1). Este proceso permitió la obtención de unos cristales de color blanco en forma de agujas, que se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como β-amirina.

En el Diagrama 1 se resume el proceso de fraccionamiento del extracto total obtenido a partir de la corteza de *Bursera simaruba*.

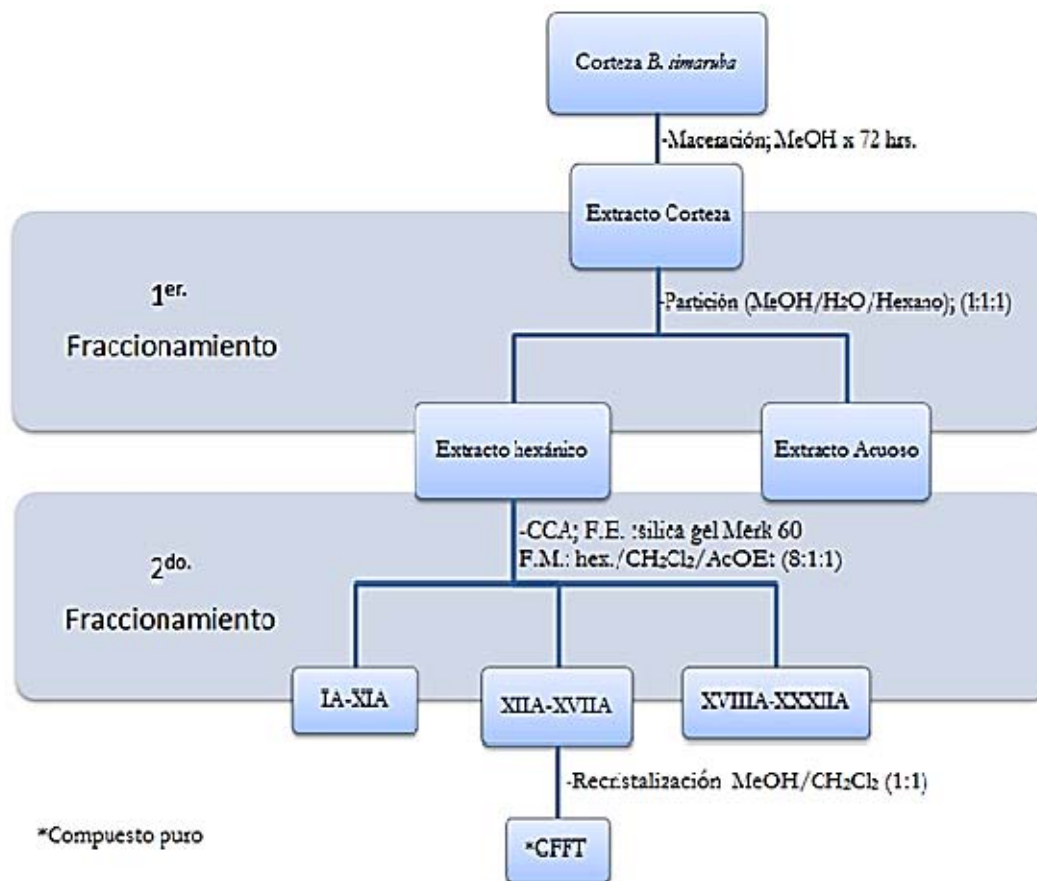


Diagrama 1. Fraccionamiento de la corteza de *B. simaruba*.



5.4. Estudio químico de la resina de *B. simaruba*.

5.4.1. Proceso de extracción de la resina.

Mientras de la resina se utilizó 100 g de resina de la *B. simaruba* para la extracción con *n*-hexano obteniendo dos fracciones una soluble en *n*-hexano y otra insoluble. La fracción soluble se filtró y concentró al vacío, obteniendo un extracto de color blanco. Esta fracción contenía principalmente α -amirina.

5.4.2. Fraccionamiento primario del extracto obtenido resina de *B. simaruba*.

Una porción de 63.4 g de la fracción no soluble en *n*-hexano de la resina se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta sobre gel de sílice y como fase móvil hexano:AcOEt:CH₂Cl₂ (8:1:1). Esto permitió la obtención de 53 fracciones de 500 ml cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica. Obteniendo un total de cuatro fracciones combinadas (FB1, FB2, FB3 y FB4). La Tabla 7 muestra el fraccionamiento primario del extracto hexánico de la resina.

Tabla 7. Fraccionamiento primario de la resina de *Bursera simaruba*

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave Asignadas
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (8:1:1)	F1-F14	FB1
	F15,F16	FB2
	F17-F33	FB3
	F34-F62	FB4



5.4.3. Fraccionamiento secundario de la resina.

Se tomó 1.7 g de la fracción FB3 y se absorbió en sílice, para ser sembrada en una columna de fase reversa C₁₈ como fase estacionaria y metanol como fase móvil. Obteniendo diez fracciones combinadas (FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7, FR8, FR9 y FR10). La Tabla 8 resume el fraccionamiento secundario de esta.

5.4.4 Obtención y purificación del triterpeno epilupeol a partir de la fracción FR6.

Durante la recolección de muestras de la columna C₁₈, al hacer la CCF de las diferentes fracciones, resultó que la fracción FR6 tenía un compuesto puro de coloración blanca que en las diferentes fracciones recolectadas precipitó unos cristales de color blanco en forma de agujas, que se concentró para recuperar el disolvente, que se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como *epilupeol*.

Tabla 8. Fraccionamiento secundario de la resina de *B. simaruba*

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave asignada
MeOH	F1-F5	FR1
	F6,F7	FR2
	F8-F10	FR3
	F11-F13	FR4
	F14-F17	FR5
	F18-F21	*FR6
	F22,F23	FR7
	F24-F28	FR8
	F29-F33	FR9
	F34-F38	FR10



5.4.4 Obtención y purificación del triterpeno α -amirina a partir de la fracción FR10.

Se pesó 25 mg de la FR10 y se disolvió en 10 ml CH_2Cl_2 , para ser aplicada sobre una placa de vidrio de 20 x 20 cm, cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck con un espesor de película de 2 mm como fase estacionaria y como fase móvil hexano/AcOEt/ CH_2Cl_2 en una proporción (8:1:1), se eluyó tres veces entre cada elución se observó al UV en onda larga y onda corta, debido a la ausencia de compuestos cromóforos, se reveló sólo las orillas de la placa, inmediatamente después, se seleccionó la zona deseada para observar la distribución de las bandas en la placa, obteniendo así 4 bandas, de las cuales se retiraron de la placa de vidrio con ayuda de una espátula para posteriormente macerar en una mezcla de disolvente (hexano/ CH_2Cl_2 ; (1:1)) después se filtró el gel de sílice al vacío, finalizando con la concentración de la extracción de cada una de las bandas. Obteniendo así. el compuesto denominado FRB1. Este se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como α -amirina.

El Diagrama 2 resume el proceso de fraccionamiento del extracto total obtenido a partir de la resina de *Bursera simaruba*.

5.5. Ensayo biológico.

Los microorganismos de prueba utilizados para determinar la actividad bacteriana del extracto hexánico de la corteza, resina, las fracciones obtenidas y de los compuestos aislados, fueron *Streptococcus mutans* (ATCC 700611) siendo este un agente causante de caries. Para el crecimiento óptimo de dichas bacterias, se utilizó como medio de cultivo el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI).

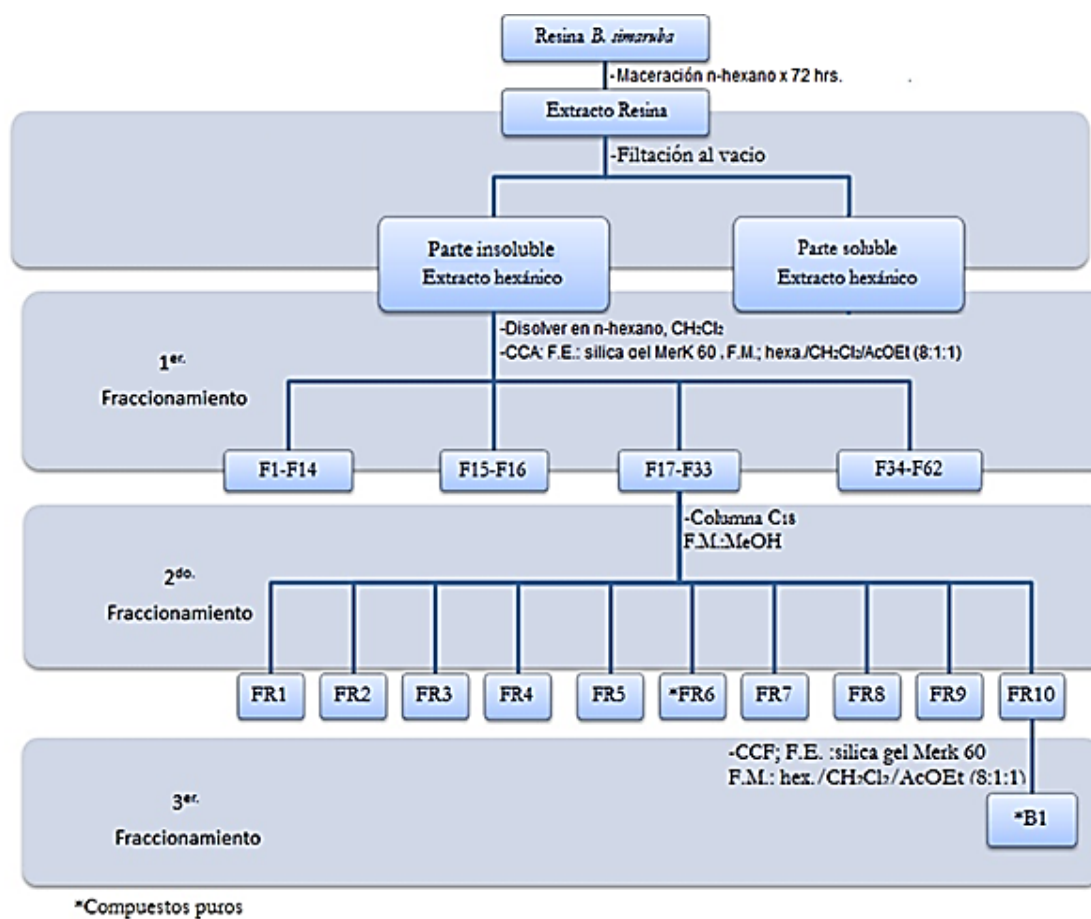


Diagrama 2. Fraccionamiento de la resina de *B. simaruba*.



5.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La actividad bacteriana se determinó con base en un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se incubaron los cultivos de las bacterias por 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 10 000 rpm/10 minutos, se lavaron con buffer de fosfato 0.05 M (PBS, pH 6.8) dos veces para después ser resuspendidas en la misma solución. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y el Estandar de Mac Farland. En cada pozo se colocaron: el medio de cultivo, 5×10^6 UFC/mL de *S. mutans* y el compuesto de prueba en diluciones seriadas. Las muestras se realizaron por duplicado para cada concentración de prueba, utilizando diferentes controles como se muestra en la Tabla 5. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Symphony VWR.

5.5.2. Procedimiento general del ensayo.

Se adicionaron 100 μ l de medio BHI en todos los canales más 100 μ l de los componentes a probar CFFT, FRA6 y BSH2 (en una concentración 1 μ g de muestra en ml de disolvente en nuestro caso se utilizó DMSO) con una concentración de 1000 μ g/mL en el pozo del primer canal, de igual forma se adicionaron 100 μ l del control positivo (gluconato de clorhexidina 0.12%).

Tras lo anterior, se realizaron 12 diluciones seriadas; este proceso se realizó transfiriendo 100 μ l, de pozo en pozo, desechando los últimos 100 μ l, del último pozo para adicionar después 80 μ l de medio con 1% de sacarosa en todos los pozos, y finalmente 20 μ l de suspensión previamente ajustada de *S. mutans* en cada pozo.

Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones aerobias a una temperatura de 37°C, en una incubadora Symphony VWR, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660} nm) utilizando un lector de placas Bio-Rad (A_{660} nm).



El valor de CMI para cada microorganismo utilizado se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 A₆₆₀ nm., comparado con un control positivo que fue CHX al 0.12 %. En la Tabla 9 se muestran los controles utilizados para el bioensayo.

Tabla 9. Controles para el ensayo biológico

	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	Con inóculo	SC	37°C
Blanco	Sin inóculo	SC	37°C
Control positivo	Con inóculo	Clorhexidina (CHX) al 0.12 %	37°C

SC: sin compuesto prueba.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El material de estudio fue seleccionado con base en los estudios reportados en la medicina tradicional. Como se describe en la Tabla 5, uno de los usos tradicionales de la *B. simaruba* es en el tratamiento de las infecciones bucodentales, por lo que este estudio se enfocó biológicamente en esta dirección, y durante la realización de los ensayos biológicos preliminares se estableció que los extractos preparados a partir de la resina y de la corteza de *B. simaruba* inhiben el crecimiento de la bacteria de *S. mutans*. La determinación del potencial antibacteriano del extracto total preparado a partir de la corteza de *B. simaruba*, se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita por el Dr. Rivero Cruz y colaboradores (Rivero-Cruz *et al.*, 2008). Cabe mencionar que un extracto vegetal es considerado activo si presenta una CMI menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Wu *et al.*, 2002; Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

El estudio químico de resina y corteza de la de *B. simaruba* se realizó con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada para los extractos totales (Tabla 11 y Tabla 12). Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad biológica del extracto original. Los resultados de esta evaluación indicaron que el extracto total preparado a partir de la corteza y resina de *B. simaruba* presentaban una concentración mínima inhibitoria de (CMI) 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

La preparación del extracto total de la corteza se realizó utilizando un proceso de maceración, tal como se indicó en la Parte Experimental (5.3.1). Luego, el extracto resultante se sometió a un fraccionamiento por partición con hexano:metanol:agua. De este proceso se obtuvieron dos fracciones: una acuosa y una hexánica. La fracción hexánica fue sometida a una cromatografía en columna abierta que permitió aislar y determinar la estructura química del terpenoide β -amirina. La concentración mínima inhibitoria para este compuesto fue de (CMI) 1000 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans*.



Tabla 10. Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones de la corteza sobre las bacterias *Streptococcus mutans*.

Extracto	CMI ($\mu\text{g}/\text{ML}$) ^a
Extracto total	1 000
Fracción IIC	1 000
*CFFT	1 000

^a Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

* Compuesto puro.

El compuesto CFFT fue caracterizado por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura y con muestras auténticas como la β -amirina (Figura 7). En la Tabla 12 se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno y las constantes de acoplamiento de la β -amirina (1); en las Figuras 9, 10 y 17 los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y EMIEM respectivamente.

La preparación del extracto total de la resina se realizó utilizando un proceso de maceración, tal como se indicó en la Parte Experimental (5.4.1). Después, el extracto resultante se sometió a un fraccionamiento con hexano. De este proceso se obtuvieron dos fracciones una soluble y otra insoluble en hexano. La fracción insoluble en hexano fue sometida a una cromatografía en columna abierta, obteniendo cuatro fracciones combinadas, de las cuales la fracción mayoritaria FB3 con una concentración mínima inhibitoria de 250 (CMI) $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. mutans*.

La fracción FB3 fue sometida a un segundo fraccionamiento cromatográfico, el cual permitió aislar al terpenoide *epi*-lupeol. El triterpenoide se purificó mediante un proceso de recristalización por par de disolventes a partir de la fracción FR6. El *epi*-lupeol se evaluó para conocer su efecto



sobre el crecimiento de la bacteria de prueba y como resultado se observó que inhibía el crecimiento de *S. mutans* con una concentración mínima inhibitoria de (CMI) 1000 µg/mL. Por otra parte, a partir de la fracción FR10 (CMI = 250 µg/mL para *S. mutans*) mediante sucesivas cromatografías se aisló la α -amirina.

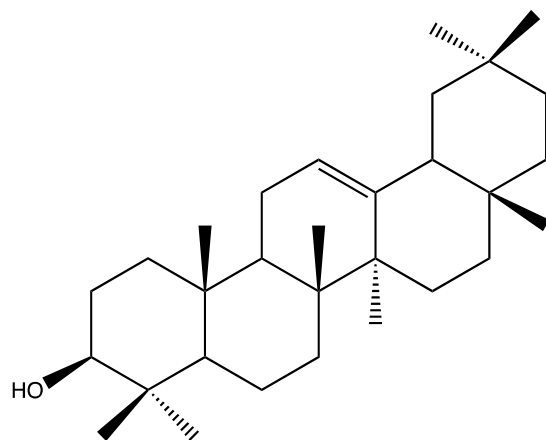
Tabla 11. Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones de la resina sobre las bacterias *Streptococcus mutans*.

Extracto	CMI (µg/ML) ^a
Extracto hexano insoluble	500
FB3 (hexano/CH ₂ Cl ₂)	250
*FR6 (columna C ₁₈)	1 000
FR10 (columna C ₁₈)	250
*B1	1 000

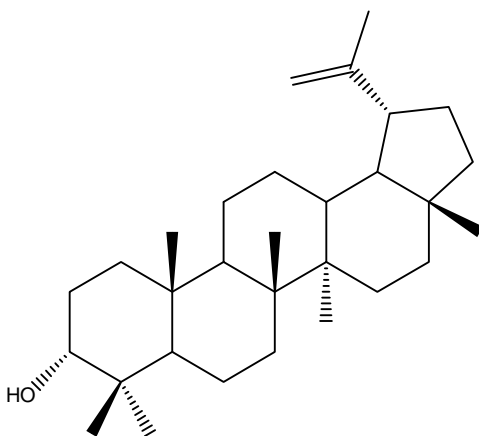
^a Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

* Compuestos puros.

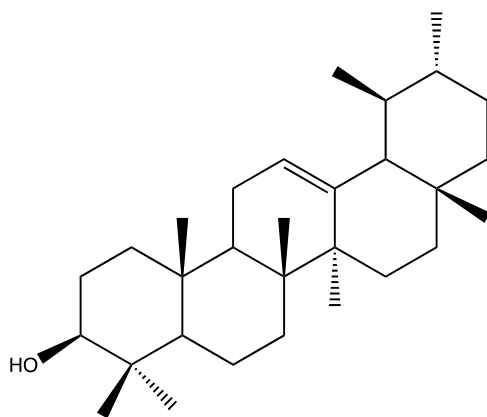
Los compuestos fueron caracterizados siguiendo una estrategia similar a la descrita para la β -amirina. En la Tabla 13 se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno y carbono, así como las constantes de acoplamiento del *epi*-lupeol (2) y en las Figuras 12,13 y 18 se muestran los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y EMIEM respectivamente. Los compuestos mostraron una CMI de 1000 µg/mL para *S. mutans*. En la Tabla 14 se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno y carbono, así como sus constantes de acoplamiento de α -amirina (3), mientras que en las Figuras 15, 16 y 19 se muestran los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y EMIEM respectivamente. En la Figura 7 se muestran las estructuras de los compuestos aislados.



β -amirina (1, CFFT)



epi-lupeol (2, FR6)

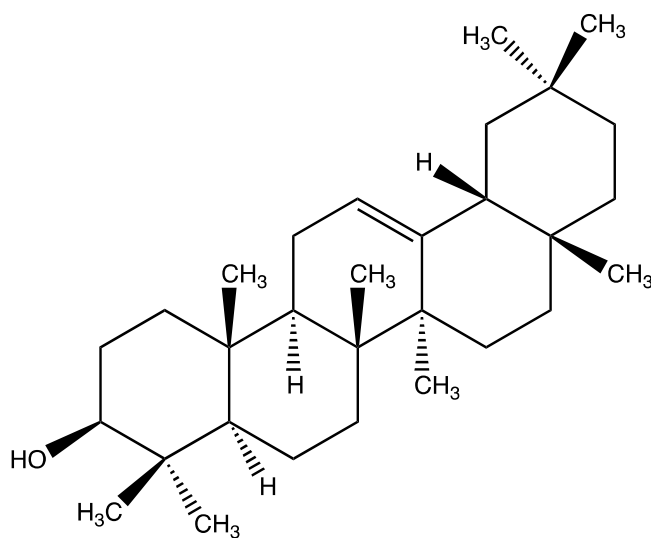


α -amirina (3, B1)

Figura 7. Compuestos aislados de la resina y el extracto hexánico de la corteza de *B. simaruba*.

Tabla 12. Constantes espectrométricas de β -amirina.

Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)	Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)
1	-----	38.95	16	1.75 m	26.33
2	-----	27.41	17	-----	32.66
3	3.24 (dd, $J = 4.4$; 11.1)	79.20	18	1.97 (dd, $J = 3.7$; 13.2)	47.00
4	-----	38.76	19	-----	41.89
5	0.75 (d, $J = 11.04$)	47.81	20	-----	29.86
6	-----	18.55	21	-----	34.9
7	-----	31.25	22	1.88 m	37.31
8	-----	55.35	23	0.77 s	28.27
9	-----	47.40	24	0.88 s	15.67
10	-----	37.12	25	0.74 s	15.67
11	-----	23.70	26	0.95 s	16.98
12	5.20 (t, $J = 3.5$)	121.88	27	1.15 s	26.16
13	-----	145.35	28	0.98 s	28.57
14	-----	39.96	29	0.84 s	32.82
15	2.04 m	27.11	30	0.80 s	23.86

Figura 8. Estructura química de β -amirina.

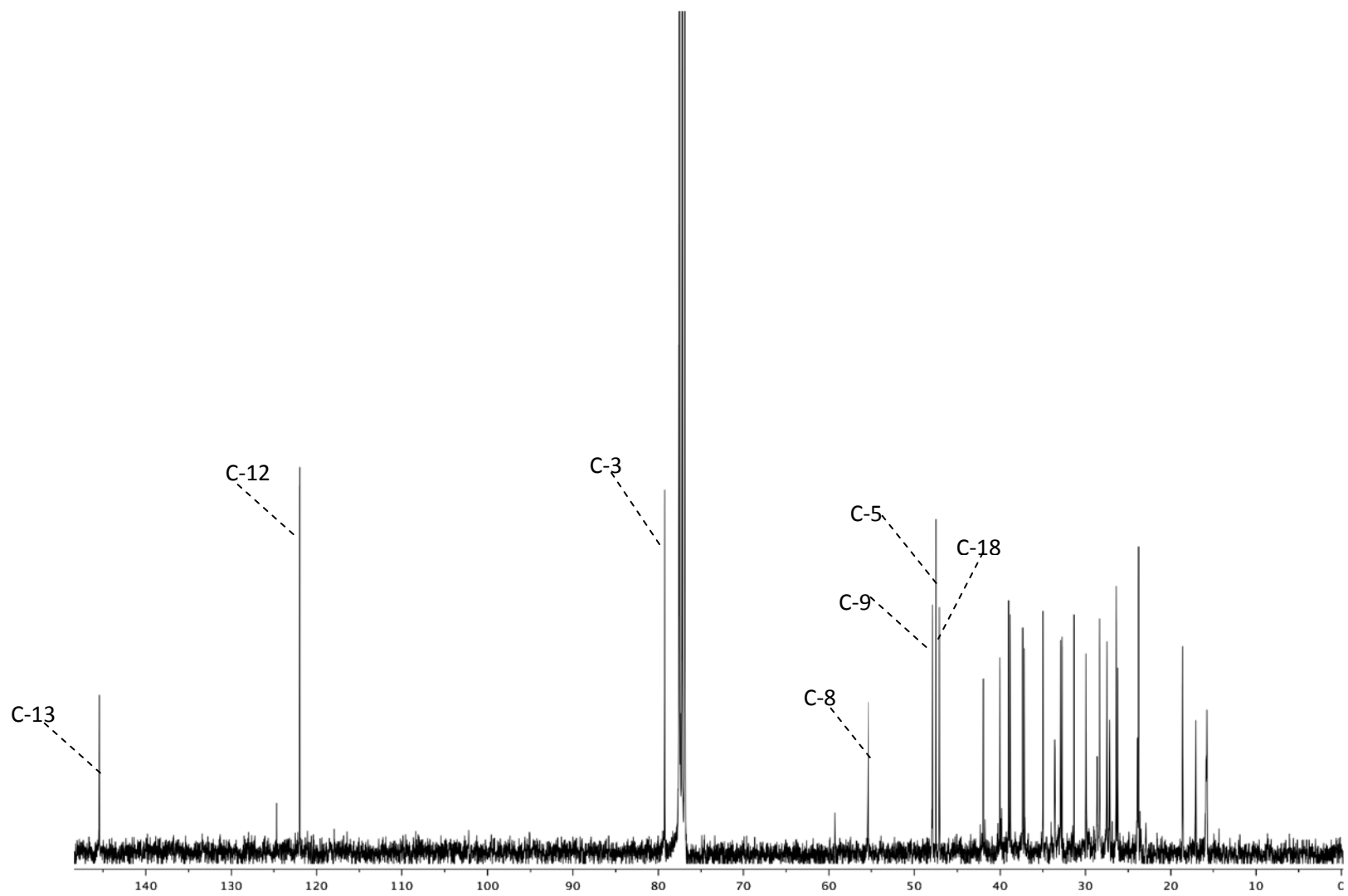


Figura 9. Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) β -amirina.



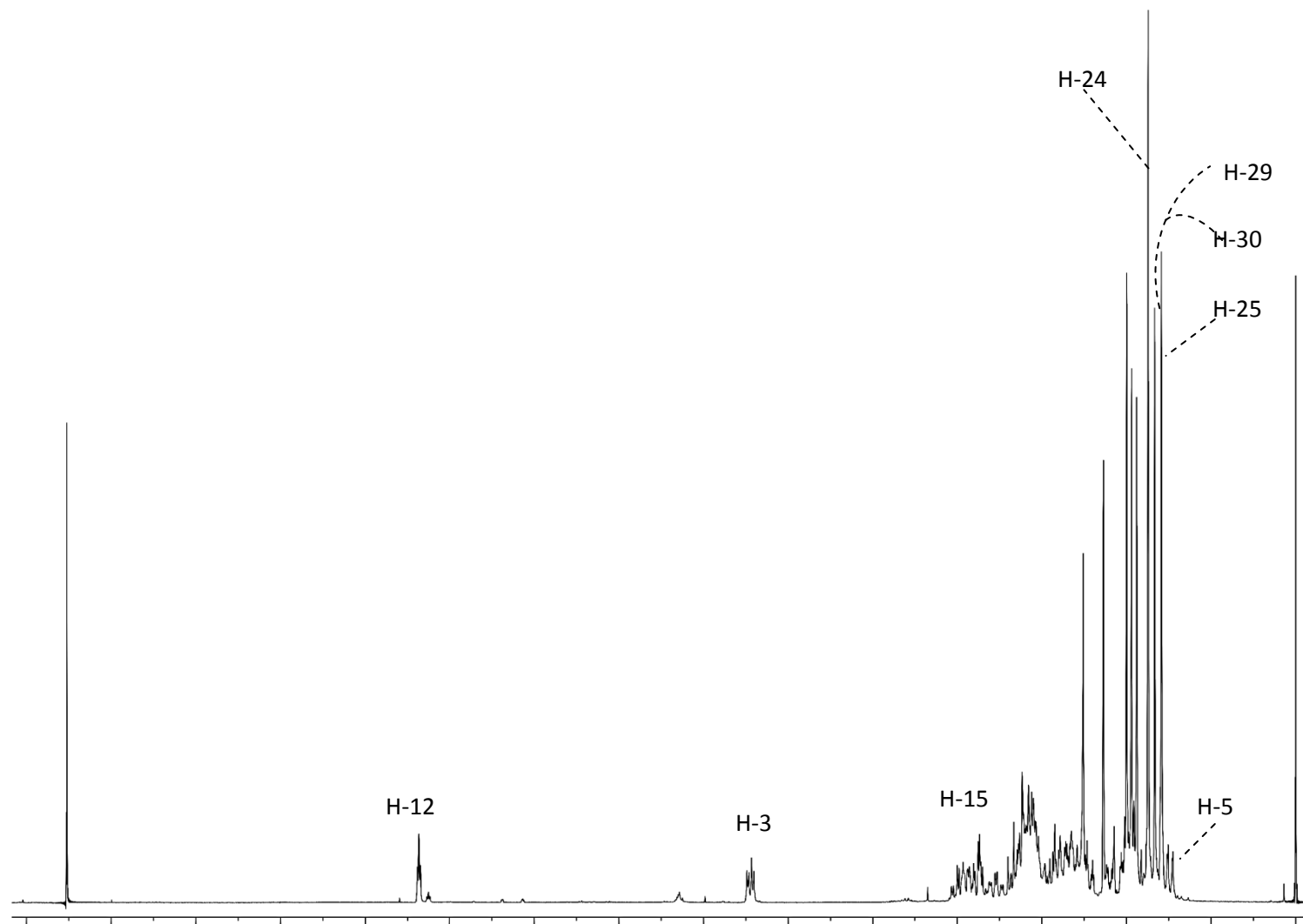
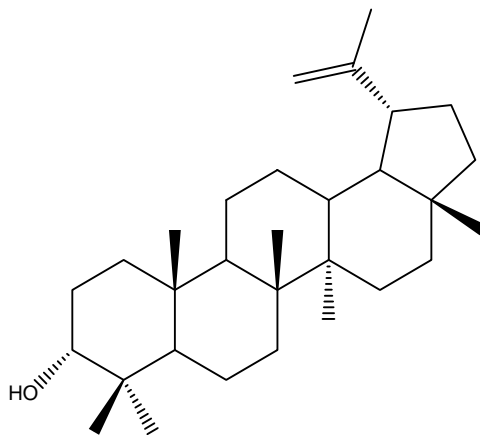


Figura 10. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) β -amirina.



Tabla 13. Constantes espectrométricas de *epi*-lupeol

Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)	Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)
1	-----	30.09	16	-----	35.82
2	-----	34.38	17	-----	43.14
3	3.39 (t, $J=4$)	76.48	18	-----	48.53
4	-----	37.76	19	2.39 (td, $J=5.9; 11.0$)	48.26
5	-----	49.26	20	-----	151.24
6	-----	18.51	21	-----	28.48
7	-----	33.48	22	-----	40.24
8	-----	41.26	23	0.97 s	27.62
9	-----	50.45	24	0.80 s	22.39
10	-----	37.52	25	0.85 s	18.21
11	-----	21.02	26	1.04 s	16.21
12	-----	25.36	27	0.94 s	14.87
13	-----	38.26	28	0.83 s	18.26
14	-----	43.25	29	4.69 & H-29', 4.57 s, ancha	109.52
15	-----	25.64	30	1.69 s	19.52

Figura 11. Estructura química de *epi*-lupeol.

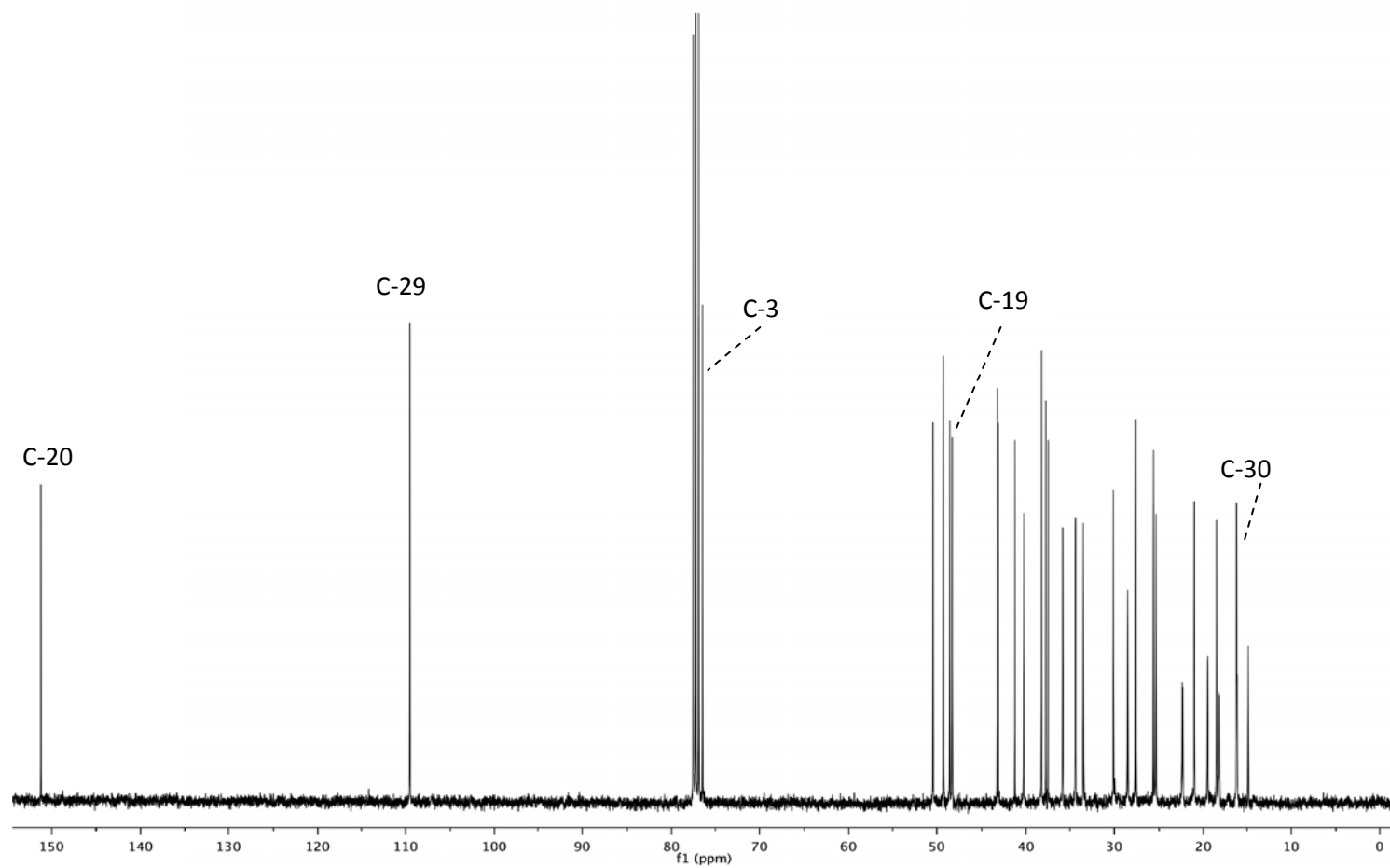


Figura 12. Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) *epi*-lupeol.



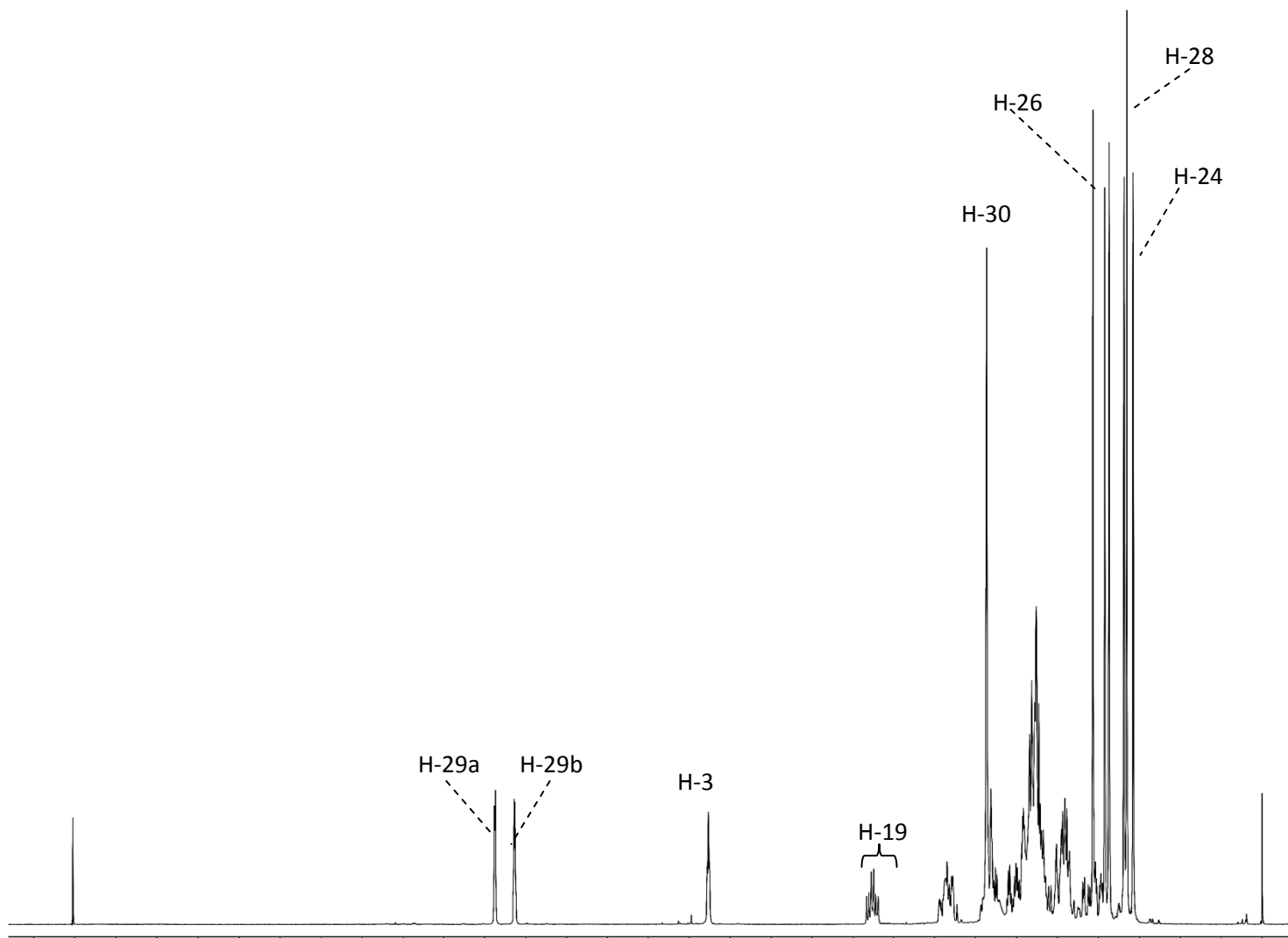
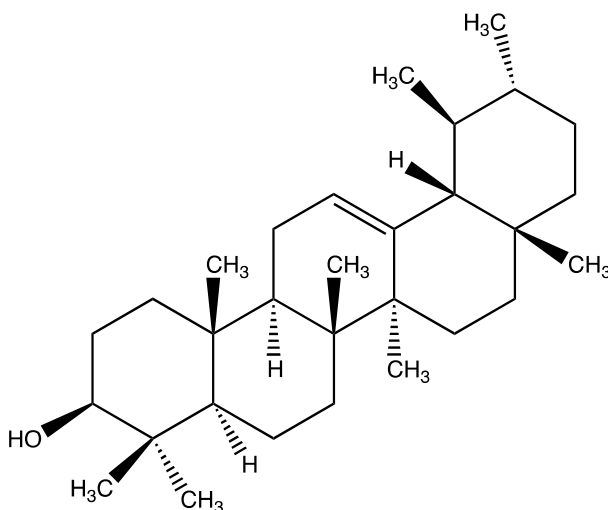


Figura 13. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) *epi*-lupeol



Tabla 14. Constantes espectrométricas de α -amirina.

Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)	Posición	RMN (δ ^1H)	RMN (δ ^{13}C)
1	-----	38.78	16	1.84 (td, $J = 4.5;$ 13.5)	26.61
2	-----	28.73	17	-----	33.74
3	3.24 (dd, $J = 5.0;$ 11.0)	79.04	18	-----	59.05
4	-----	38.76	19	-----	39.60
5	0.74 (d, $J = 11.0$)	55.17	20	-----	39.65
6	-----	18.34	21	-----	31.24
7	-----	32.93	22	1.93 (dt, $J = 3.2;$ 6.9)	41.52
8	-----	40.00	23	0.92 s	28.09
9	-----	47.71	24	0.76 s	15.66
10	-----	36.89	25	0.73 s	15.61
11	-----	23.35	26	0.92 s	16.85
12	5.14 (t, $J = 4$)	124.38	27	1.08 s	23.25
13	-----	139.56	28	0.96 s	28.11
14	-----	42.07	29	0.81 (d, $J = 2.6$)	17.45
15	2.00 (td, $J = 4.5;$ 13.4)	27.26	30	0.74 (d, $J = 7.0$)	21.38

Figura 14. Estructura química de α -amirina.

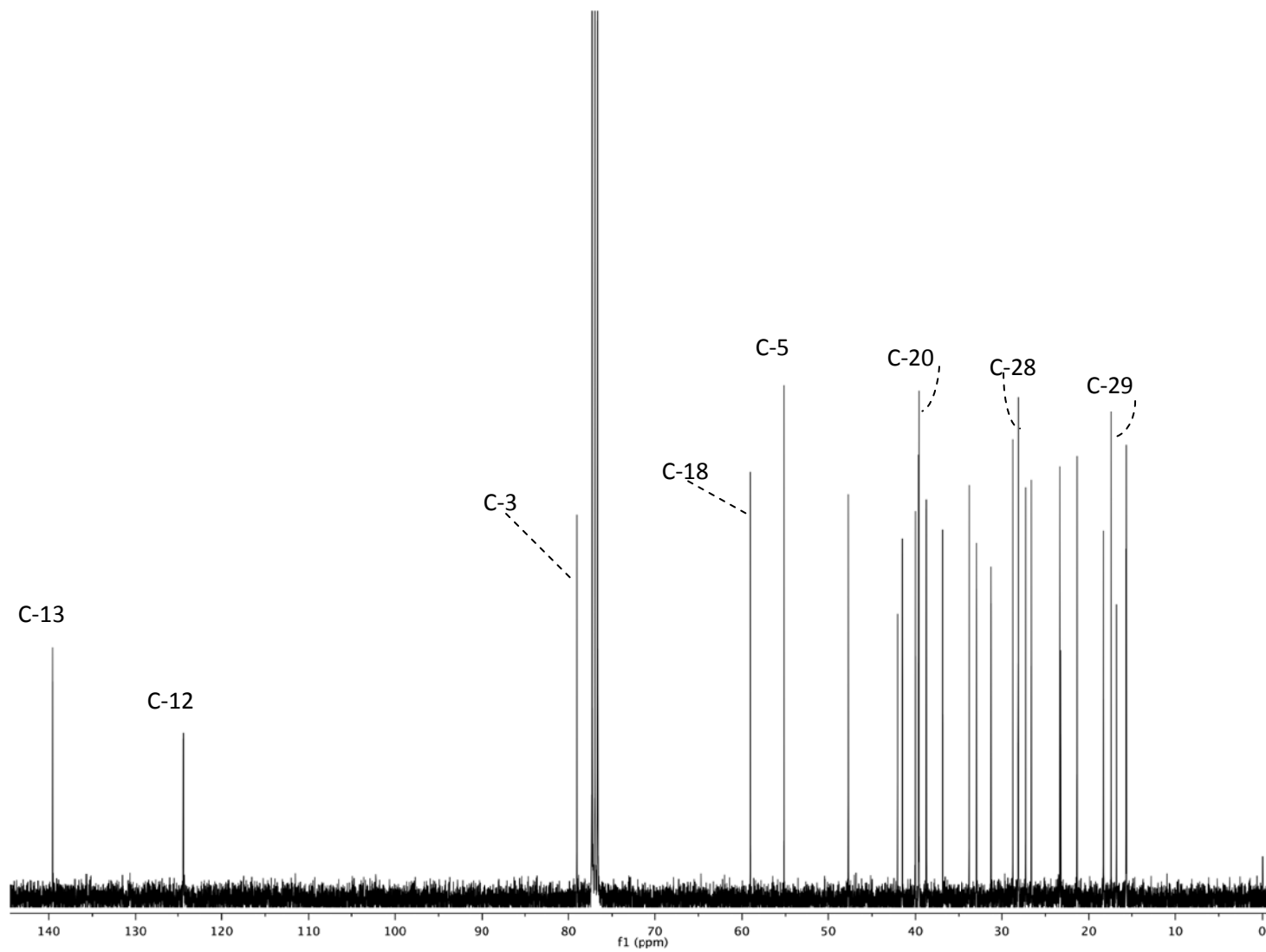


Figura 15. Espectro de ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) α -amirina.



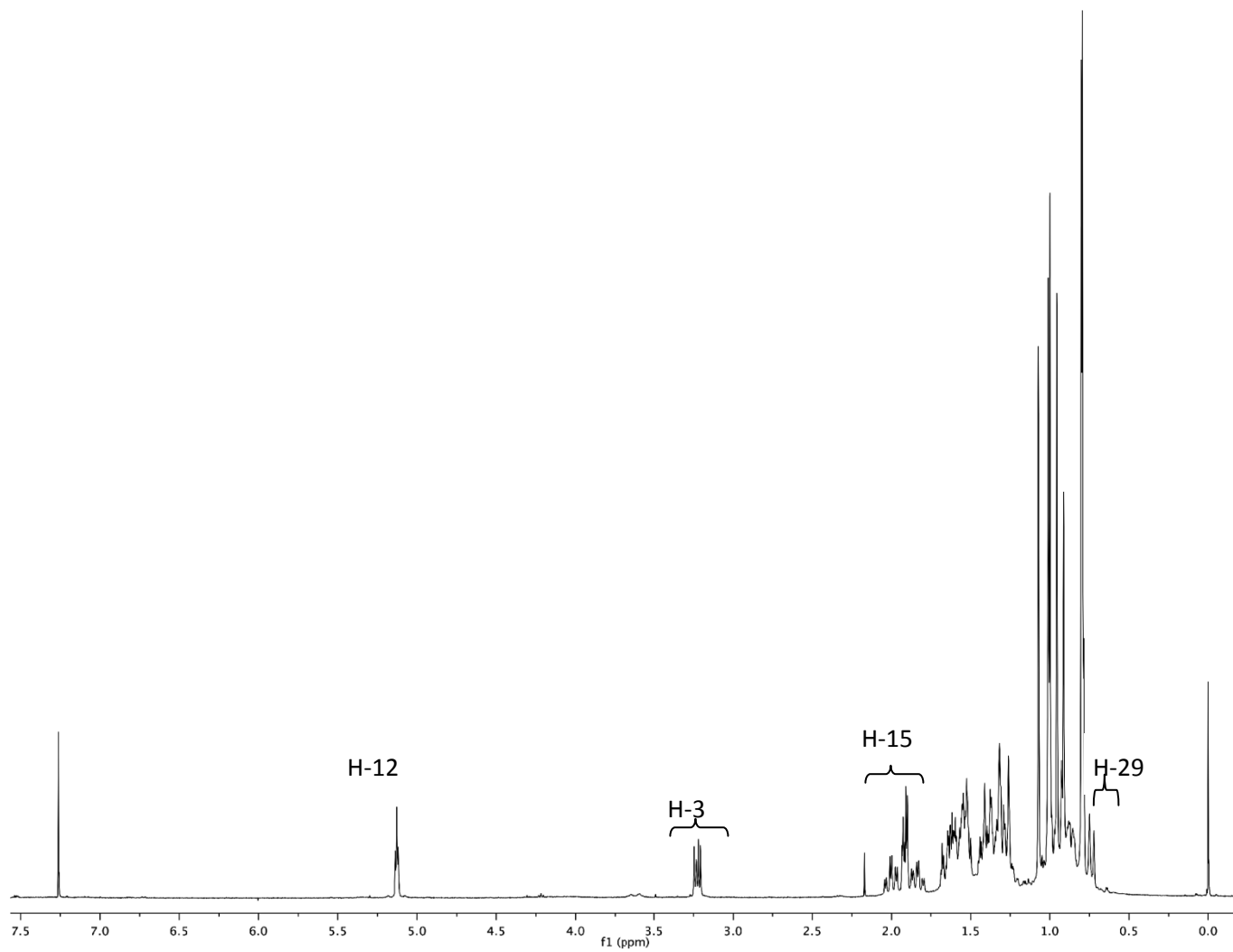


Figura 16. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) α -amirina.



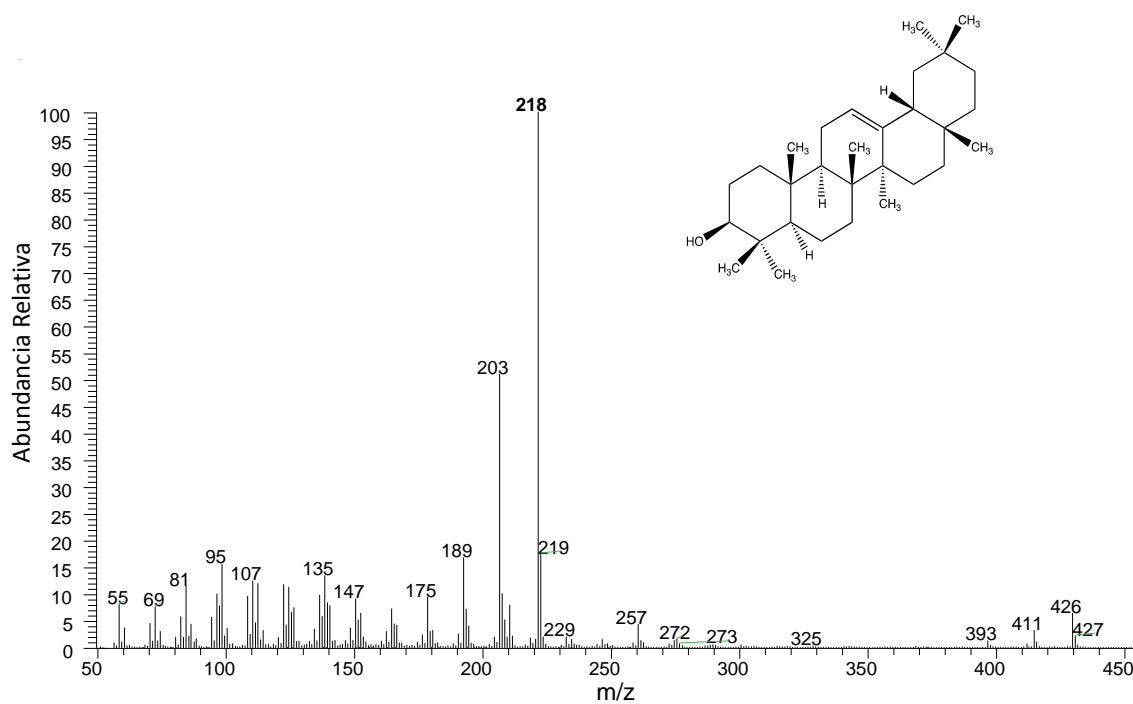


Figura 17. Espectro de EMIE obtenido para el compuesto β -amirina.

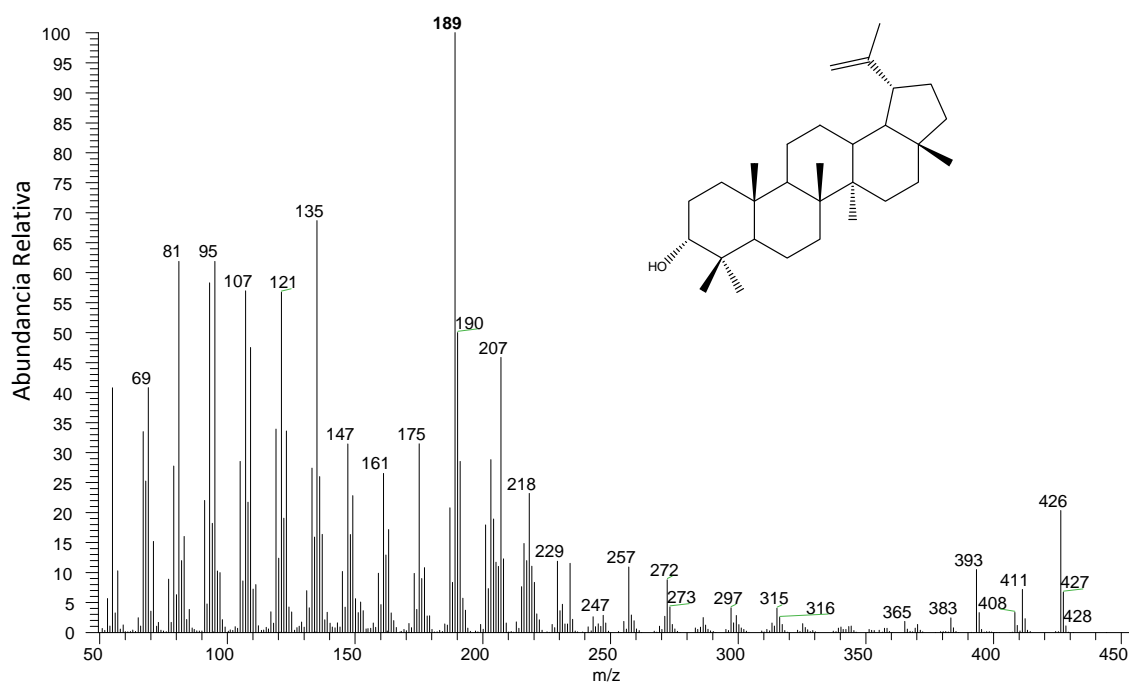
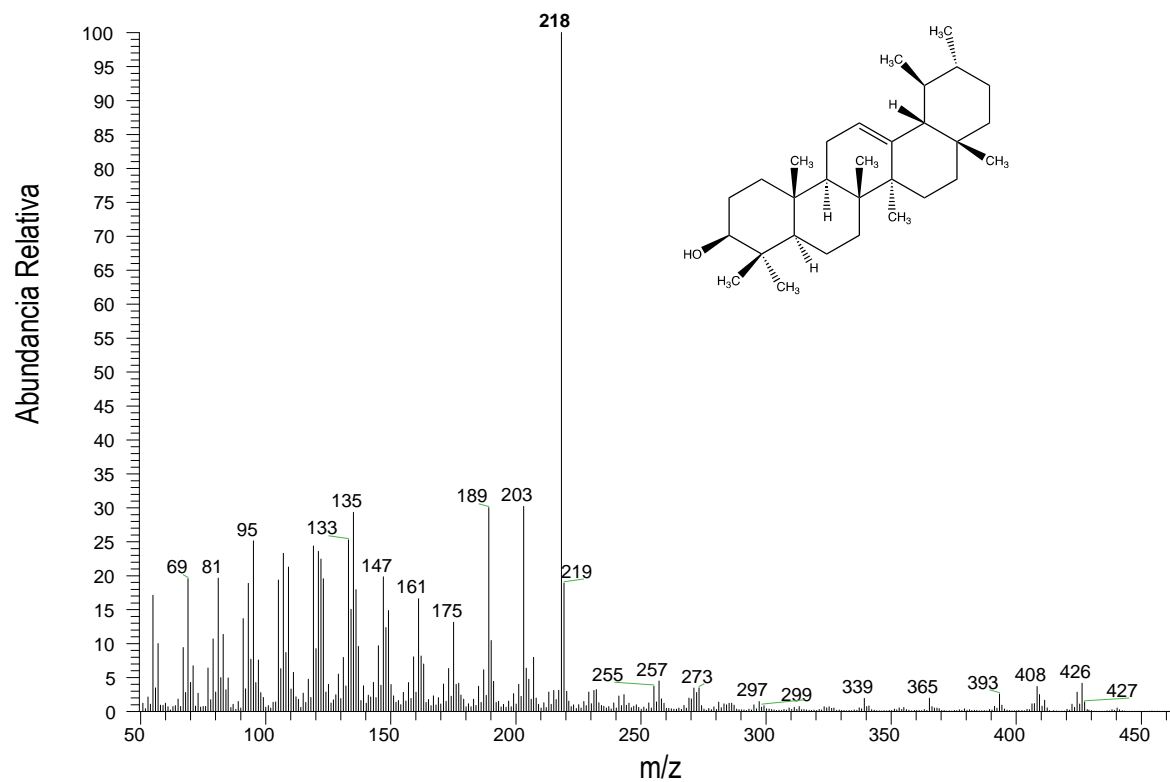


Figura 18. Espectro de EMIE obtenido para el compuesto *epi*-lupeol.Figura 19. Espectro de EMIE obtenido para el compuesto α -amirina.



7. CONCLUSIONES

Esta investigación representa una contribución al conocimiento de la especie *B. simaruba*, planta medicinal utilizada ampliamente en las prácticas médicas tradicionales (Rojas, 2006).

Así, el estudio químico de los extractos preparados a partir de la resina y corteza de *B. simaruba* permitió el aislamiento y caracterización de tres triterpenoides *epi*-lupeol, α -amirina y β -amirina.

El *epi*-lupeol (2) y α -amirina (3) se encuentran en cantidad suficiente en la resina, mientras que β -amirina (1) se encuentra abundantemente en la corteza; todos los compuestos son estables, se pueden identificar y cuantificar por medio de las técnicas analíticas convencionales. Estos compuestos se encuentran dentro de los tipos estructurales triterpenoides comunes de la resina de *B. simaruba*. Aunque α -amirina (3), β -amirina (1) son producidos por otras plantas, estos son conocidos por ser componentes de las resinas generalmente de la familia Burseraceae, por lo cual estos pueden ser considerados como marcadores de la especie (Becerra *et al.* 2001).

Por otro lado, los tres triterpenos aislados en el presente estudio (β -amirina, *epi*-lupeol y α -amirina) inhibieron pobremente el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* en un rango de concentración de 1050 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Es importante mencionar que los compuestos han sido descritos previamente a partir de esta especie y son conocidos por su actividad antiinflamatoria (Carretero, 2008).



8. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo de investigación realizado sobre la especie *Brusera simaruba* representa sólo una pequeña contribución al estudio sobre la química y la actividad antimicrobiana de esta especie. Es por ello que a partir de este trabajo hemos formulado las siguientes perspectivas:

- Continuar con el estudio químico y aislar los compuestos minoritarios que puedan tener una actividad antimicrobiana mayor que la de los terpenoides aislados.
- Establecer el efecto de los extractos derivados de la corteza y resina de *B. simaruba* y de los compuestos puros sobre las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*.
- Realizar la síntesis parcial de compuestos análogos más potentes a partir de los terpenoides aislados (β -amirina, *epi*-lupeol y α -amirina).



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, G.L., Padilla B.P., Aguilar R.R., Frausto E.S., Aceves M.M., Enríquez S.E. (2004). Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas. *Rev. ADM*, 61, 3:85-91.
- Ankarfjård, R., and M. Kegl. (1998). Tapping oleoresin from *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae) in a Lao village. *Economic Botany*, 52: 7-14.
- Aranya J., Hongjie Z., Ghee T. T., Cuiying M., Nguyen V. H., Nguyen M. C., Nuntavan B.,D., Doel S., Harry H.S.F., (2005). Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*, 66: 2745–2751.
- Argueta-Villamar, A., Caro, L.M., Rodarte, M.E. (Eds.), 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto National Indigenista, Mexico.
- Barrancos, M.J., Barrancos, P. (2006). Operatoria dental: integración clínica. Buenos Aries, Médica Panamericana 4ªed, 373-391.
- Becerra, J. X., D. L. Venable, P. H. Evans, and W. S. Bowers. 2001. Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41: 856–876.
- Bergey D.R., Howe G.A., Ryan, C.A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 12053-12058.
- Bianchi, E., Caldwell, M.E., Cole, J.R. (1968). Antitumor agents from *Bursera microphylla*. I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57:696-697.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Revisado en Julio del 2012 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>.
- Bradshaw D., Marsh P., Hodgson R., Visser J. (2002). Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res*, 36:81-86.
- Burnett, G. (1990). Manual de microbiología y Enfermedades Infecciosas de la boca. México, Limusa, 2ª ed., 323-340.



- Burt, B.A. & Pai, S. (2001). Sugar consumption and caries risk: a systematic review. *Journal of Dental Education*, 65:1017-1023.
- Burt, B.A. (2002). Fluoridation and social equity. *Journal of Public Health Dentistry*, 62, 4:195-200.
- Carrero G., Fleitas A.T., Arellano L. (2005). Prevention of dental caries in first permanent molars using dental sealants and fluoride mouthrinsing. *Revista Odontológica de los Andes*, 1:44-53.
- Carretero, M. E., López-Pérez, J.L., Adab, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel A. & Noguera- P., B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fraction from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 116:11-15.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). (2003). *Árboles de Centroamérica; un manual para extensionistas*. Turrialba, CR, CATIE. 1070-1079.
- Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H., Hwang, J.K. (2006). Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 13: 261-266.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, MX) (2005). *Bursera simaruba*. Consultado el 15 Agosto. 2012 en www.conabio.gob.mx/conocimiento/infoespeciesarboles17/burse2m/pdf.
- Copping, L. G., Duke, S. O. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management science*, 63:524-554.
- Cortéz G.V., Macedo J.P., Kernandez A.M, Arteaga A., Espinoza G.D., Rodriguez L.J. (2004). *Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*. *Revista Biomédica*, 15:123-126.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:564-582.
- Cuatrecasas J. (1957). Burseraceae. En *prima flora Colombiana*, 1. *Webbia*, 12:375-441.
- Enrile de R. F., Fuenmayor F.V. (2009). *Manual de higiene bucal*, Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana, 2-7.
- Francis J.K. (1990). *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Almácigo, gumbo limbo. Department of Agricultura, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1-5.
- Gamboa F., Herazo A.B., Martinez M.C. (2004). Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans*



- y su acción acidogénica. *Revista de la Facultad de Ciencias, Universitas Scientiaru*, 9:45-55.
- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product Reports*, 21:263-277.
- Gupta, M.P. (1995). 270 plantas medicinales iberoamericanas. Bogotá, CO, CYTED., 1-173.
- Hamilton I. (1990). Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent. Res*, 69: 660-67.
- Hernández M. R., Gally J. M. (1981). *Plantas medicinales*, Editorial Árbol, 7-9.
- Hernández, J.D., Román, L.U., Espiñeira, J., Joseph N. (1983). Ariensin, a new lignan from *Bursera ariensis*. *Planta Med.*, 47:215–217.
- Ingraham L. J., Ingraham A.C. (2004). *Introduction to Microbiology*. Barcelona, Ed. Reverte., S.A., 800-803.
- Instituto geográfico “Augustín Codazzi”. (1997). Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia. Bogotá, Colombia: Ministerio de Hacienda Crédito Público, 13, 11:238-240.
- Jolad, S.D., Wiedhopf, R.M., Cole, J.R. (1997). Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: isolation of sapelins A and B. *Pharmaceutical Sciences*, 66:889–890.
- Jolad, S.D., Wiedhopf, R.M., Cole, J.R. (1997). Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 50-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *J. of Pharmaceutical Sciences*, 66: 892–893.
- Kakuko Y., Fumiko A., Ariaki N., Hikaru O., Lozada P., López V., Estrada M., Aguilar A., Reyes Chilpa, (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 2:293-9.
- Kasemura, K., Nomura, M., Tada, T., Fujihara, Y., Shimomura, K. (2002). Antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of 6-[(8Z)-8-pentadecenyl]salicylic acid derivatives. *Journal of Oleo Science*, 51 10:637-642.
- Koneman E.W. (2008). *Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color*; Buenos Aires, Editorial; Panamericana, 6°ed, 1690-196
- Kubo, I., Nihei, K., Tsujimoto, K. (2003). Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7624-7628.
- Langenheim, Jean H. (2003). *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany*. Cambridge, 586-588.
- Little, E.L., Wadsworth F.H. Marrarero J. (1907). *Árboles comunes de puerto rico y las islas vírgenes*.



- Universidad de Puerto Rico, 278-280.
- Maldini M., Montoro P., Piacente S., Pizza C. (2009). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70, 5: 641-649.
- Mc Doniel, P.B., Cole, J.R. (1972). Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (burseraceae): isolation and structure determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61:1992–1994.
- Morton, J. F. (1977). *Major Medicinal Plants: Botany, Culture, and Uses*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Nazar J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67:61-69.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología: fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2ªed, 247-263.
- OMS (2011). [Http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/). Revisado el 20 de Junio del 2012
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2012). Oral Health. Revisado el 04 de Julio del 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>
- Pearce G., Moura D.S., Stratmann J., Ryan C.A. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*. 411:817-820.
- Pennington, T.D., Sarukhan, J. (1968). *Árboles tropicales de México*. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Food and Agricultural Organization, 409-413.
- Peraza S.R. and L.M. Peña R.L.M. (1992). Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Natural Products*, 55:1768–1771.
- Pérez Luyo, Ada G. (2005). La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Rev. Estomatol. Herediana*, ene./junio, 15, 1:82-85.
- Prabu, G.R., Gnanamani, A., Sadulla, S. (2006). Guajaverin-a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Applied Microbiology* ISSN. 101:487-495.
- Prieto G. (2006) *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Bogotá. Ed. Pontificia Universidad javeriana, Capitulo 3 :170-182.
- Prieto P.J., Calvo A. (2004). Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los



- antibióticos. *Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 9: 11-18.
- Rivero-Cruz J. Fausto. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *Journal of Ethnopharmacology*, 119:99-103.
- Rivero-Cruz, J. F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 1:151-154.
- Robles J., Torrenegra R., Gray I., Piñeiros C., Ortiz L., Sierra M. (2005). Triterpenos triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileña de Farmacognosia*, 15 4:283-286.
- Rocha, G., Rosal del C., Martínez L., Ygnacio y Lozano- Zarain, Patricia. (Eds). (2004). *Mecanismos de Patogenicidad e interacción. Parásito-Hospedero. Publicación especial de Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.* 128-124.
- Rodríguez, N.H. (2006). *La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. Heredia, CR, EUNA.*, 200-213.
- Rojas R., Freddy. (2006). Árboles que curan: indio desnudo, Kurú: *Revista Forestal, Costa Rica*, 3,9.
- Salgado Valdez, Alberto. *Plan de desarrollo.*(2013). Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología.
- Salinas S., David O. (2009). Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (Mexico), *Polibotánica [online]*, 28:213-225.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Segleau, J. (2001). *Plantas medicinales en el trópico húmedo.* San José, CR, Editorial Guayacán.
- Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altiner, G., Tubaro, A., (2002). Screening of the tropical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81:211-215.
- Stavri, M., Piddock, L. J. V., Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother*, 59:1247-1260.
- Stross, B. (1996). Mesoamerican copal resins. *U Mut Maya*, 6: 177-196.
- Svensäter G, Bergenholtz G. (2004). Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, 9:27-36.
- Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological



- niche and its relationship with oral diseases, International Congress Series, 1284:103-112.
- Terence D. Pennington, José Sarukán, (2005). Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies, México, UNAM-FCE, 3ª edición, pp. 43-72.
- Tholl, D. (2006) Terpene syntheses and the regulation, diversity, and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol.*, 9:297-304.
- Trease, GE y Evans, WC. (1991). *Textbook of Pharmacognosy*, México, D.F., Nueva Editorial Interamericana, S.A. Décimo tercera edición, pp. 3,4,401.
- Tuger D, R. & Van Loveren, D. (2003). Sugar and dental caries. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 4:8815-8925.
- van Houte J., *J Dent Res* (1994). Role of microorganisms in caries etiology. Forsyth Dental Center, Department of Oral Microbiology, Boston, Massachusetts, 73, 3:672-81.
- Wickramaratne, D.B.M., Mar, W., Chai, H., Castillo, J.J., Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica* 61:80–81.
- Wu, C. D; Wei, G. X., (2002). Tea as functional food for oral health. *Nutrition*, 18: 443-444.
- Zamora V., N. (2000). Árboles de la mosquita Hondureña: descripción de 150 especies, COSUDE y TRANSFORMA, pp. 25-27.