



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación del efecto antibacteriano del extracto metanólico de la corteza del árbol *Bursera simaruba* recolectada en el estado de Jalisco”

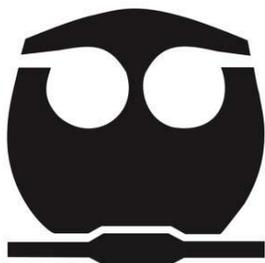
T E S I S

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

PRESENTA:

POLSKA MIROSLAVA VARA MASTACHE

MÉXICO, D.F. ABRIL AÑO 2015





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. en C. José Manuel Méndez Stivalet

Vocal: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Secretario: Dra. Gloria Díaz Ruiz

1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio Donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111. Edificio E, Departamento de Farmacia de la
Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

Asesor

José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Polska Miroslava Vara Mastache



AGRADECIMIENTOS.





DEDICATORIAS.





CONTENIDO

Lista de abreviaturas.	VII
Lista de Figuras.	VIII
Lista de cuadros y diagramas.	X
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1. La cavidad oral como hábitat de microorganismos.	3
2.2. Microbiota presente en la cavidad oral.	3
2.3. Infecciones odontogénicas.	5
2.4. Streptococcus del grupo viridans como determinante de patogenicidad.	7
2.5. Placa dental: Biofilms.	9
2.6. Proceso de formación de la caries dental.	11
2.7. Tratamiento terapéutico de la infección odontogénica.	14
2.8. Antibióticos utilizados contra las infecciones de la cavidad oral.	16
2.9. Resistencia a los antibióticos.	19
2.10. México y su enorme riqueza en medicina tradicional.	20
2.11. Investigación realizada sobre la familia <i>Burseraceae</i>	22
2.12. Compuestos biológicamente activos en el género <i>Bursera</i>	25
2.13. El árbol medicinal palo mulato (<i>Bursera simaruba</i>).	28
3. JUSTIFICACIÓN.	32
4. OBJETIVOS.	33
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	34
5.1. Recolección de la muestra vegetal.	34
5.2. Métodos generales de análisis.	34
5.2.1. Análisis cromatográficos.	34
5.2.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.	34
5.3. Preparación de la muestra.	35
5.3.2. Obtención del extracto metanólico.	35
5.4. Pruebas microbiológicas.	35
5.4.1. Estandarización del método.	35
5.4.2. Evaluación del extracto metanólico de la corteza de <i>Bursera simaruba</i> mediante la prueba de difusión en agar.	36
5.4.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	37
5.4.4. Inhibición de la formación de biocapa por <i>Streptococcus mutans</i>	38
5.5. Estudio químico.	39
5.5.1. Separación de sólidos inorgánicos.	39
5.5.2. Fraccionamiento primario por CCA.	40





6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	43
6.1. Obtención del extracto.....	44
6.2. Evaluación del extracto crudo.	44
6.3. Fraccionamiento primario por CCA.	45
6.4. Identificación de los compuestos aislados a partir de las fracciones 35-69 y 70-81.....	46
6.5. Actividades descritas para los triterpenoides separados.....	47
6.6. Determinación del efecto del extracto crudo sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral, prueba de difusión en agar.	49
6.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones obtenidas.....	51
6.8. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por <i>Streptococcus mutans</i>	53
7. CONCLUSION.	56
8. PERSPECTIVAS	57
9 . BIBLIOGRAFÍA.	58





Lista de abreviaturas.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo
Ac	Acetona
B.	<i>Bursera</i>
Cm	Centímetro
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMIs	Concentraciones mínimas inhibitorias
CCA	Cromatografía de columna abierta
D.O.	Densidad óptica
Δ	Desplazamiento químico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
CHx	Gluconato de clorhexidina
°C	Grado centígrado
G	Gramo
Hex	Hexano
H	Hora
BHI	Infusión Cerebro Corazón
L	Litro
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
m s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
Mg	Miligramo
Min	Minuto
Nm	Nanómetro
QS	Quórum sensing
Rpm	Revoluciones por minuto
S.	<i>Streptococcus</i>
SGV	<i>Streptococcus</i> del grupo <i>viridans</i>
Ta	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
UFC	Unidad formadora de colonias





Lista de Figuras.

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Microbiota de la cavidad oral de acuerdo a su localización.	5
2.	Enfermedad Periodontal (encías) incluye la Gingivitis y Periodontitis, provocando desordenes Inflamatorios muy serios.	6
3.	Ampliación de 10000x del patrón de adherencia de células <i>S. mutans</i> en la superficie dental mostrando su agrupación, morfología y tamaño uniforme de células.	8
4.	Esquema mostrando las etapas del proceso de formación del biofilm.	10
5.	Uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, código de la Cruz Badiano.	21
6.	Uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, código de la Cruz Badiano.	21
7.	Expansión histórica de <i>Bursera</i> en México. La distribución de <i>Bursera</i> fue dividida en 10 sub zonas geográficas.	23
8.	<i>Bursera linanoe</i> y <i>Bursera hintonii</i> Bullock. A. rama con hojas y frutos; B. bracteola; C. flor masculina en vista externa; D. flor masculina desprovista de un segmento del cáliz, de 2 pétalos y de 5 estambres; E. flor femenina en vista externa; F. flor femenina desprovista de 2 segmentos del cáliz, de 2 pétalos y de varios estaminodios; G. Hueso.	24
9.	Características de <i>Bursera simaruba</i> . A. rama con hojas e inflorescencias masculinas; B. ramilla de inflorescencia femenina; C. flor masculina; D. flor femenina; E. corte longitudinal de la flor femenina; F. 2 frutos.	28
10.	Columna abierta sobre gel de sílice.	41
11.	Cromatoplaqa comparativa utilizando los estandares de α y β -amirinas (1 y 2), ácido ursólico (3), <i>epi</i> -lupeol (4) comparadas con las fracciones 35-69 (A) y 70-81 (B).	45





Lista de Figuras.

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
11.	Estructura química de α -amirina (1) (3- α -hidroxi-urs-12-eno) y β -amirina (2) (3- β -hidroxi-urs-12-eno).	46
12.	Estructura química del ácido ursólico (3).	47
13.	Estructura química del <i>epi</i> -lupeol (4).	48





Lista de cuadros y diagramas.

CUADRO	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Microorganismos implicados en las infecciones odontogénicas y sus opciones de tratamiento terapéutico.	15
2.	Antimicrobianos indicados en infecciones odontógenas mixtas de la cavidad oral.	19
3.	Componentes en el cromatograma del aceite de ramas de <i>B. graveolens</i> .	25
4.	Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género <i>Bursera</i> .	26
4.	Continuación. Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género <i>Bursera</i> .	27
5.	Descripción del árbol medicinal <i>Bursera simaruba</i> .	29
6.	Fraccionamiento primario, utilizando cromatografía de columna abierta del extracto metanólico de la corteza de <i>Bursera simaruba</i> .	40
7.	Efecto de inhibitorio del extracto crudo sobre el crecimiento de las bacterias del grupo <i>viridans</i> .	44
8.	Resultados del fraccionamiento primario.	45
9.	Resultados obtenidos para cada bacteria probada, de acuerdo a sus halos de inhibición en mm.	50
10.	Efecto inhibitorio de las fracciones 35-69 y 70-81 de la CCA primaria, sobre el crecimiento de las bacterias: <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> y <i>S. sanguinis</i> .	
11.	Efecto de Triterpenos en el porcentaje de viabilidad sobre las bacterias estudiadas	51
12.	Porcentaje de viabilidad de <i>Streptococcus mutans</i> después de 24 h de exposición a los 3 terpenos mencionados, en una concentración celular inicial ajustada a 10^6 UFC/mL	51
DIAGRAMA	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Desarrollo experimental desde la corteza cruda hasta las pruebas microbiológicas.	41





1. INTRODUCCIÓN.

Las infecciones de la cavidad bucal son un problema de salud pública frecuente y motivo constante de prescripción antibiótica; el 10% de los antibióticos se emplean para tratar este problema. Así mismo, su relación con ciertas enfermedades sistémicas (cardíacas, endocrinas, pulmonares, etc.) confiere a estas patologías una importancia vital (Machuca, 2000). Desde el nacimiento del individuo, la cavidad bucal está expuesta a innumerables microorganismos presentes en el ambiente, estos se convierten en residentes, y se ven favorecidos por las condiciones fisiológicas y nutricionales de este. Podemos clasificar a las infecciones bacterianas en dos grandes grupos: odontógenas y no odontógenas. Las infecciones odontógenas (infecciones que afectan al diente y a los tejidos periodontales) son la caries dental, pulpitis, absceso periapical, gingivitis, periodontitis, pericoronaritis, osteítis e infecciones de los espacios aponeuróticos e involucran a diversos agentes bacterianos. Las no odontogénicas son infecciones de la mucosa oral y de las glándulas salivales (Nolte *et al.*, 2001). Algunos de los principales patógenos de la cavidad oral son: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

La caries es la destrucción localizada de los tejidos dentales provocada por la fermentación bacteriana de los carbohidratos de la dieta, en un período de tiempo. Representa el foco de partida primario en la mayoría de las infecciones odontogénicas. Una vez instalada la caries, el único tratamiento es restaurativo (Maestre, 2004). El agente antimicrobiano utilizado va a depender del patógeno que produce la enfermedad, debido el aumento de la prevalencia de resistencias bacterianas observado durante los últimos años y, en concreto, la proliferación de cepas productoras de betalactamasas debido al uso irracional de antibióticos, por ello se buscan nuevas alternativas para el tratamiento de estos padecimientos.

Los productos naturales representan un medio primario para la obtención de principios activos y como fuentes en el desarrollo de medicamentos. Una etapa importante en el descubrimiento de los principios activos consiste en identificar





remedios tradicionales de uso reconocido por criterios etnomédicos para el tratamiento de padecimientos determinados (Campos-Soto, 2006).

En México alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005).

El palo mulato (*Bursera simaruba*), de amplia distribución en el mundo, es un árbol nativo de México, se encuentra desde el sur de Tamaulipas a Quintana Roo en la vertiente del Golfo y desde Sinaloa a Chiapas en el Pacífico (abarca la zona árida del sur de EU hasta el norte de Nicaragua) (Osterling y Barnhorst, 1995). Esta especie es sumamente abundante como elemento primario en las selvas altas (Chavelas y Devall, 1998). La corteza externa es muy escamosa y se le puede identificar en campo por su color rojizo, es una de las plantas medicinales que tienen reputación tradicional para tratar diversas enfermedades relacionadas con el cáncer y la inflamación. Las hojas y la corteza contienen una resina pegajosa y aromática que posee numerosas virtudes medicinales. La corteza también se emplea para hacer lavativas, su decocción se toma como agua contra disentería, dolor de estómago, tos ferina o para acelerar la evolución del sarampión (Campos, 2006).

Otras propiedades de palo mulato se emplean en casos de diarrea, dolor de muelas, infección intestinal, padecimientos hepáticos, tos, males venéreos, granos, salpullido, calor de la vejiga, mal de orín, baños para después del parto, bajar de peso, eliminar coloradillas y garrapatas, contra hidropesía y veneno de víboras (Martínez, 1994). Se utiliza comúnmente entre los zapotecos, mixes y totonacos para curar la disentería (Téllez, 1989).





2. ANTECEDENTES.

2.1. La cavidad oral como hábitat de microorganismos.

La cavidad oral es un complejo ecosistema compuesto por más de 650 especies bacterianas. Las distintas zonas que conforman esta cavidad constituyen ecosistemas: mucosa, superficies dentales, biopelícula, surco gingival y saliva. La boca está continuamente bañada por la saliva, manteniendo una temperatura de 35-36 °C a un pH de 6.75-7.25, condiciones óptimas para el crecimiento de muchos microorganismos. La saliva influye profundamente en la ecología de la boca; por ejemplo, su composición iónica promueve sus propiedades de amortiguación y su capacidad para remineralizar el esmalte. Por otro lado, los componentes orgánicos (glicoproteínas y proteínas) pueden influir en el establecimiento y selección de la microbiota oral, al favorecer la adhesión de ciertos organismos a través de la formación de una película selectiva acondicionadora sobre la superficie del esmalte, o la eliminación de bacterias a través del aclaramiento salival, también puede actuar como nutriente endógeno. Así mismo, la saliva contiene componentes de la inmunidad innata y adquirida lo que le da la capacidad de inhibir directamente algunos microorganismos exógenos (Scannapieco, 1994).

2.2. Microbiota presente en la cavidad oral.

En la cavidad bucal se desarrolla una microbiota característica que varía enormemente en las diferentes comunidades humanas, la cual es habitualmente comensal y mantiene un equilibrio armónico con el hombre (Medisan, 2012).

La boca es similar a otros hábitats en el cuerpo ya que posee una comunidad microbiana residente diversa, pero característica, se estima que existen más de 700 tipos de microbios que pueden ser aislados de la boca, pero más de un 50% de éstos actualmente no puede cultivarse en cultivo puro en el laboratorio (Wilson, 2005).





Los microorganismos orales residentes obtienen sus nutrientes principalmente de fuentes endógenas, como aminoácidos, proteínas y glicoproteínas de la saliva y del fluido crevicular gingival; el metabolismo de estos sustratos conduce a pequeños y lentos cambios en el pH local. La saliva juega un papel importante en mantener el pH oral en neutralidad, lo que es óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos asociados a la salud bucal (Marsh *et al.*, 2009).

La composición de la microflora oral varía significativamente en distintas superficies dentro de la boca (por ejemplo, lengua, mucosa bucal y los dientes), debido a las diferencias en las condiciones ambientales, esto da oportunidad a las bacterias de colonizar cada sitio, lo que hace hincapié en el vínculo que existe entre las características del hábitat y los organismos que son capaces de establecerse y predominar en cualquier sitio de la boca (Marsh, 2000).

En efecto, la cavidad bucal está permanentemente colonizada por una microbiota bacteriana residente que se organiza en ecosistemas donde se encuentran especies que, en ocasiones, pueden comportarse como patógenos. En el momento del nacimiento, la mucosa de la boca es a menudo estéril, pero puede contaminarse durante el paso a través del conducto vaginal. De 4 a 12 horas después del nacimiento se establecen *Streptococcus viridans* como miembros más prominentes de la flora residente (Jawetz *et al.*, 2009).

Durante los primeros meses de vida se añaden estafilococos aerobios, diplococos Gram negativos, difteroides y ocasionalmente lactobacilos. Cuando comienza la dentición se establecen espiroquetas anaerobias, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, especies de *Rothia* y *Capnocytophaga*, así como algunos vibriones anaerobios y lactobacilos. En los adultos se encuentran especies de actinomicosis, en amígdalas y encías, las principales características de las bacterias es su capacidad de adaptación evolutiva a distintos medios y condiciones fisicoquímicas (Savage *et al.*, 2009). En la Figura 1 se ejemplifican el tipo de bacterias presentes en la cavidad oral de acuerdo a su localización.



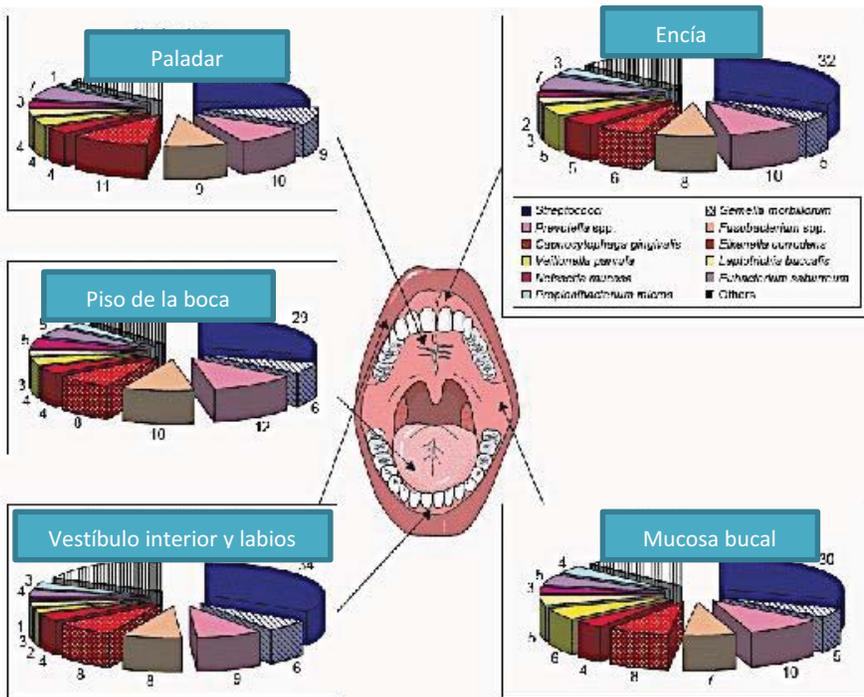


Figura 1. Microbiota de la cavidad oral de acuerdo a su localización (Wilson, 2008).

2.3. Infecciones odontogénicas.

En el origen de la infección bacteriana, como las periodontitis, está el inicio del proceso infeccioso y los mecanismos que conducen al desarrollo de signos y síntomas de la enfermedad. El resultado de la interacción entre bacterias y huésped, lo determinan las características que favorecen el establecimiento de las primeras dentro del segundo y su habilidad para lesionarlo, en oposición a los mecanismos de defensa de dicho huésped (Díaz *et al.*, 2012).

Las patologías periodontales incluyen todas las alteraciones de cualquier origen, que ataquen los tejidos del periodonto (Bascones, 1998). Las infecciones mixtas que afectan a la cavidad bucal pueden clasificarse en dos grandes grupos en función de su origen: a) Infecciones odontogénicas (infecciones que afectan al diente y a los tejidos periodontales): Como la caries, pulpitis, absceso periapical, gingivitis, periodontitis, pericoronaritis, osteítis e infección de los espacios aponeuróticos; estas son responsables de la mayoría de las prescripciones de antibióticos en el campo de la odontología, afectan a individuos de todas las edades (Poveda *et al.*, 2007). Dicha infección tiene como origen las estructuras que forman el diente y el periodonto (tejidos que rodean y soportan los dientes,





que está conformado por: Encía, cemento dentario, ligamento periodontal y hueso alveolar). Puede originarse por causas dentales, periodontales, traumáticas, pero en el 90% de los casos la causa es la caries dental. En su progresión espontánea afectará a los huesos maxilares, buscando la salida hacia la cavidad bucal, perforando la cortical (normalmente la vestibular) y el periostio, en la Figura 2 se ejemplifica la enfermedad periodontal comparada con un diente saludable (Pihlstrom *et al.*, 2005). Se denomina primaria cuando se localiza cerca de la región periapical afectada en principio, y secundaria cuando se comprometen estructuras más alejadas de los maxilares (espacios faciales y cervicales, o aún más alejadas como pulmón o endocardio). Y b) Infecciones no odontogénicas: infecciones de la mucosa oral, infecciones de las glándulas salivales, etc. (Poveda *et al.*, 2007).

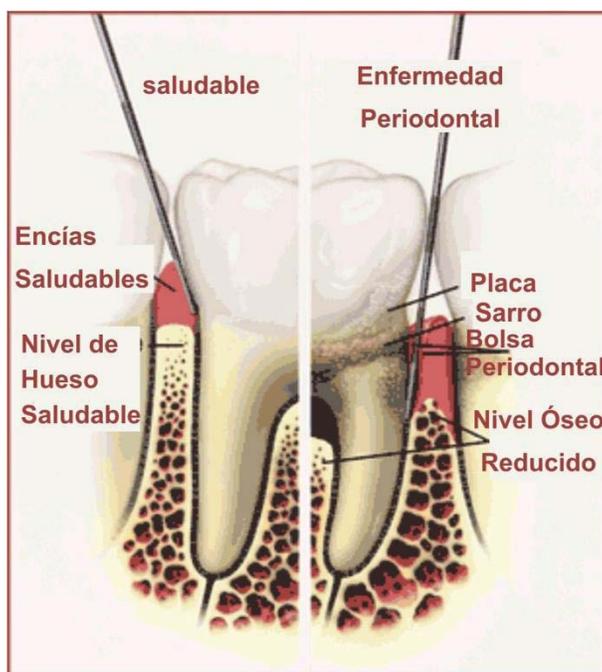


Figura 2. Enfermedad Periodontal (encías) incluye la Gingivitis y Periodontitis, provocando desordenes inflamatorios muy serios (Núñez, 2013).

La evidencia científica ha puesto de manifiesto una relación entre algunas infecciones bucales graves y determinadas enfermedades sistémicas de carácter cardiovascular (Offenbacher *et al.*, 1998), pulmonar y endocrino (diabetes mellitus) así como con alteraciones en la gestación (Loesche, 1997). Debido a esta





asociación entre infección y otras enfermedades sistémicas, es fundamental evitar en lo posible las infecciones orales o identificarlas y tratarlas de forma rápida y adecuada. En ocasiones, una infección odontogénica puede extenderse y dar lugar a infecciones polimicrobianas en otras localizaciones, como el paladar, el sistema nervioso central (absceso cerebral), el endocardio (endocarditis), etc (Gay-Escoda y Berini, 2004).

2.4. *Streptococcus* del grupo *viridans* como determinante de patogenicidad.

El género *Streptococcus* son cocos Gram positivos que se disponen en parejas o cadenas. La mayoría de las especies son aerobios/anaerobios facultativos, algunas son capnófilas (solo crecen en presencia de CO₂) y otras anaerobias estrictas. Se caracterizan por unas necesidades de cultivo exigentes, siendo necesarios medios enriquecidos, habitualmente con sangre para su crecimiento. Es un grupo de microorganismos que se ha caracterizado por numerosos y continuos cambios taxonómicos entre los diferentes grupos (Arnáiz *et al.*, 2014).

Los *Streptococcus viridans* representan a un grupo de 24 especies descritas actualmente, son principalmente alfa-hemolíticos en agar sangre de carnero (Ruoff *et al.*, 2003). Está formado por los grupos:

1. *Streptococcus* grupo *milleri/anginosus*: Pertenecen al grupo de *Streptococcus* de “colonia pequeña”. Aglutinan con los grupos A, C, F y G de Lancefield. Está formado por las especies *S. intermedius*, *S. anginosus* y *S. constellatus*.
2. *Streptococcus* grupo *mitis*: Son gamma-hemolíticos y forman parte de la flora comensal de la boca. *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguis* son las especies más comunes. *S. pneumoniae* también forma parte de este grupo, pero por sus características clínicas se estudia de forma separada (Arnáiz *et al.*, 2014).

Estos cocos Gram positivos son comensales de la cavidad oral, tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal y genitourinario. A pesar de la baja patogenicidad, pueden causar endocarditis infecciosa, lo que contribuyen a la formación de un absceso polimicrobiano, y la posterior invasión del torrente sanguíneo durante el





estado de neutropenia. La infección del torrente sanguíneo por lo general se presenta en los pacientes con cáncer con mucositis y neutropenia debido a toxicidad relacionada con la quimioterapia antineoplásica. En estos pacientes, los estudios han encontrado que *Streptococcus viridans*, se encuentran entre los más comunes microorganismos aislados en las muestras de bacterias (Johnson *et al.*, 2005). Las bacteriemias causan una considerable morbilidad y mortalidad en estos pacientes; del 6 al 12% (Johnson *et al.*, 2005). Los *Streptococcus viridans* más comunes que causan bacteriemia neutropénica han sido *S. oralis*, *S. mitis* y *S. salivarius* (Ruoff *et al.*, 2003). En la Figura 3 se muestra el factor de adherencia de *S. mutans*, una de las bacterias más patógenas en la cavidad oral.

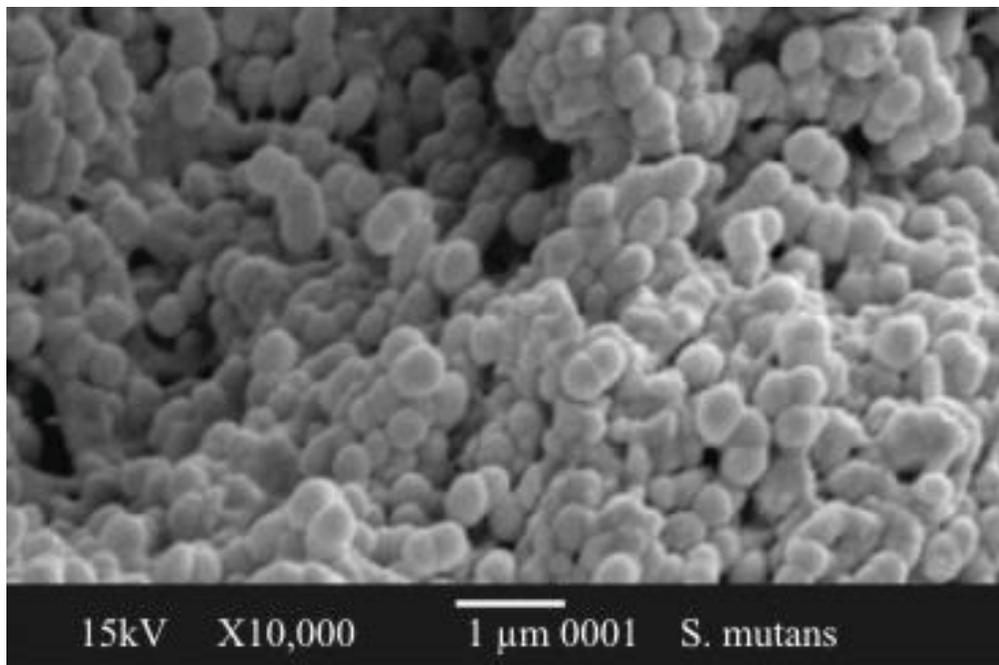


Figura 3. Ampliación de 10000x del patrón de adherencia de células *S. mutans* en la superficie dental mostrando su agrupación, morfología y tamaño uniforme de células (Baena *et al.*, 2005).





2.5. Placa dental: Biofilms.

Las más diversas colecciones de microorganismos orales se encuentran en los biofilms localizados en los dientes (placa dental) (Wilson, 2005). Una pequeña muestra obtenida de la placa dental contiene en promedio, entre 12 y 27 especies de bacterias diferentes (Aas *et al.*, 2005). Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza (Sutherland, 2001). Un ejemplo cotidiano de biofilm lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microorganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos, en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente (Stoodley *et al.*, 2002).

La etapa inicial del proceso de formación de este es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria (Toole *et al.*, 2000). La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues





muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtIE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria (Cucarella *et al.*, 2001). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar (Toledo-Arana *et al.*, 2001).

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a los hongos entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del este. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm, en la Figura 4 se esquematiza el proceso de formación de este (Costerton *et al.*, 2000).

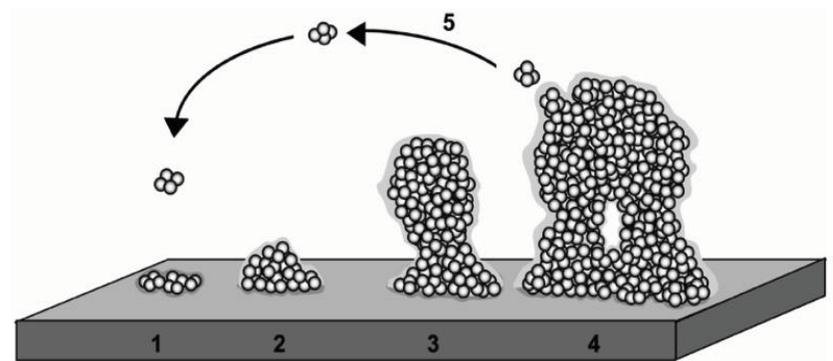


Figura 4. Esquema mostrando las etapas del proceso de formación del biofilm (Costerton y Stewart, 2000).





2.6. Proceso de formación de la caries dental.

Es considerada como un padecimiento de la civilización moderna, se han realizado innumerables estudios que nos revelan que nuestra sociedad actual y el aumento de la caries dental se hallan en asociación constante y que las tribus primitivas son relativamente libres de este padecimiento (Hospital General de México, 2012). La caries es una enfermedad infecciosa crónica y transmisible, con una etiología compleja y multifactorial (Qin *et al.*, 2008). Su prevalencia a nivel mundial ha mostrado cifras variables, oscilando entre el 3,6 y el 15,3% en países desarrollados, pero en países en vías de desarrollo estas cifras ascienden hasta un 67,7% (Tang *et al.*, 2005).

Entre los factores etiológicos se incluyen: alimentación frecuente con alto contenido azucarado, en niños el uso de chupón impregnado con miel, azúcar y zumos de frutas, consumo exagerado de hidratos de carbono, mala higiene oral y reducción del flujo salival (Mohebbi *et al.*, 2008). Otros factores relacionados con la caries son: predisposición genética, hábitos nutricionales, educación y nivel socioeconómico de las personas. El *Streptococcus mutans* se señala como el principal responsable bacteriano de la caries. Se ha observado una transmisión vertical bacteriana de la madre al niño, encontrándose esta bacteria en niños a los 6 meses de edad. Un niño cuya madre tenga altos niveles de *S. mutans* en boca tiene riesgo de adquirir el microorganismo más pronto que un niño cuya madre tenga unos niveles más bajos siendo el principal causante de caries en edad temprana (Choi *et al.*, 2009).

Streptococcus mutans y algunos lactobacilos forman parte de la placa bacteriana y son capaces de producir ácido láctico y propiónico, los que actúan desmineralizando y desestructurando la superficie externa del esmalte (Hernández *et al.*, 1998).

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental. Para la colonización bacteriana, es imprescindible la





formación previa de una fina película de proteínas salivales sobre la superficie del diente: el ya mencionado biofilm. La interacción se produce en cierta medida a través de cargas electrostáticas. La carga eléctrica de las proteínas se relaciona con la presencia de grupos ionizables en sus aminoácidos constituyentes (Duque *et al.*, 2006).

Estudios recientes indican que la unión de las bacterias al biofilm y entre sí, no puede ser explicada solamente por uniones electrostáticas, sino que se ha evidenciado la acción de moléculas de naturaleza proteica en la superficie de las bacterias, denominadas adhesinas, que se unen a las proteínas salivales las cuales actúan como receptores y facilitan la adherencia bacteriana. Esto es posible por el fenómeno de reconocimiento molecular. Se ha observado que mientras mayor es la capacidad de adherencia del microorganismo, mayor es la experiencia de caries dental (Duque *et al.*, 2006).

En el caso del *Streptococcus mutans*, los factores de virulencia más involucrados en la producción de caries son:

- 1. Acidogenicidad:** El *Streptococcus* puede fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- 2. Aciduricidad:** Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- 3. Acidofilicidad:** El *Streptococcus mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
- 4. Síntesis de glucanos y fructanos:** por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes (Hidalgo *et al.*, 2007).

Las glucosiltransferasas catalizan la hidrólisis de dos moléculas de sacarosa en sus monosacáridos constituyentes: la alfa-D-glucosa y la beta-D-fructuosa. Las moléculas de glucosa resultantes, son polimerizadas por enlaces alfa (1-6), alfa (1-





4) o alfa (1-3) y forman los glucanos extracelulares bacterianos y se liberan dos moléculas de fructuosa. De acuerdo con las características de solubilidad de su producto, las glucosiltransferasas se clasifican en: GTF-S, las que sintetizan el dextrano, un glucano que posee predominantemente uniones lineales alfa (1-6), es soluble en agua y de aspecto globular, GTF-I sintetiza un glucano insoluble y fibrilar con predominio de uniones alfa (1-3) y la GTF-SI sintetiza ambos tipos de glucanos (Duque *et al.*, 2006).

El *Streptococcus mutans* secreta los tres tipos de glucosiltransferasas. Al producto de la GTF-I y la GTF-SI, con predominio alfa (1-3), se le denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la placa dental. De esta manera la capacidad de producir mutano, está involucrada en el poder cariogénico del *Streptococcus mutans* (Duque *et al.*, 2006).

5. Producción de dextranasa: Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y la mutanasa. Estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan así el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de la misma. Por tanto, los glucanos extracelulares pueden ser utilizados por las bacterias como fuente de energía. Además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano (Duque *et al.*, 2006).

6. Sustrato cariogénico: Dentro de los factores que favorecen el desarrollo de la caries dental, uno de los más estudiados es el consumo excesivo de azúcares simples. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre caries y carbohidratos refinados o azúcares, especialmente, la sacarosa o azúcar común. Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis (Cid *et al.*, 2008).





La sacarosa formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque el *Streptococcus mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa (Cid y Morales, 2008).

2.7. Tratamiento terapéutico de la infección odontogénica.

La infección odontogénica debe ser abordada desde tres ámbitos terapéuticos que son complementarios entre sí. El tratamiento etiológico odontológico, que frecuentemente incluirá actuaciones quirúrgicas de mayor o menor envergadura; el tratamiento sistémico de soporte, que abarca un amplio espectro desde el manejo sintomático del dolor al control de la inflamación pasando por medidas físicas, hidratación, control de la temperatura, equilibrio de la glucemia, etc. Por último, salvo en situaciones excepcionales, debe ser aplicado un tratamiento antimicrobiano con criterios de racionalidad y eficiencia (Cianco, 2000).

De manera general, el tratamiento antimicrobiano debería indicarse siempre que el proceso lleve asociada una clínica evidente de la actuación de un agente infeccioso. El tratamiento con antimicrobianos de las infecciones odontogénicas tiene por objetivo evitar la extensión local y la contigüidad de la infección, reducir el inóculo bacteriano en el foco infeccioso y prevenir las complicaciones derivadas de la diseminación hematógena (Slots *et al.*, 2000). Dependiendo de las características del proceso y del paciente, el tratamiento óptimo de una determinada infección podría requerir antimicrobianos sistémicos o locales (Jorgensen *et al.*, 2000).

El éxito terapéutico sobre la infección odontogénica radica en el control de la biopelícula y, por lo tanto, de los microorganismos implicados. Las opciones terapéuticas disponibles, a veces combinadas, son las siguientes (De Vicente-Rodríguez, 2004).





- Tratamiento odontológico (obturación, endodoncia, tartrectomía, etc.).
- Tratamiento quirúrgico (drenaje de abscesos, desbridamiento de tejidos, exodoncias, etc.).
- Tratamiento antimicrobiano.
- Tratamiento sistémico de soporte (analgésicos, antiinflamatorios, etc.).

El efecto de las técnicas de desbridamiento mecánico-quirúrgicas sobre la biopelícula es fundamentalmente de tipo cuantitativo, por lo que existe el riesgo de persistencia de odontopatógenos y de recurrencia del proceso. Por ello en algunas situaciones debe complementarse con tratamiento antibiótico, que además de la cantidad, modifica la composición cualitativa de la placa, en el Cuadro 1 se ejemplifican algunas opciones terapéuticas de acuerdo a la infección (Maestre, 2004).

Cuadro 1. Microorganismos implicados en las infecciones odontogénicas y sus opciones de tratamiento terapéutico (Brescó-Salinas *et al.*, 2006).

PROCESO	LOCALIZACIÓN	BACTERIAS IMPLICADAS	OPCIONES TERAPEÚTICAS
Caries	Esmalte, dentina, cemento y pulpa dental	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Actinomyces spp</i> <i>Lactobacillus spp</i>	Eliminación mecánica Exodoncia
Pulpitis	Tejidos de la pulpa dental	<i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Eliminación mecánica, drenaje Biopulpectomía AB (si inmunodepresión o profilaxis) - Amoxicilina + clavulánico - Clindamicina
Gingivitis	Encías: tejidos blandos que rodean el diente	<i>Campylobacter rectus</i> <i>Actinomyces spp</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>E. corrodens</i> <i>Capnocytophaga spp</i> <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Leve:</i> Clorhexidina 0,2% tópica Clindamicina gel tópico <i>GUN:</i> Clorhexidina 0,2% tópica AB: -Amoxicilina + clavulánico -Metronidazol <i>G. estreptocócica = GUN</i>
Periodontitis	Tejidos de sostén del diente (periodonto)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythensis</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Streptococcus spp</i>	Tartrectomía Clorhexidina 0,2% tópica o clindamicina/ minociclina gel tópico AB cuando está indicado (Tabla III) - Amoxicilina + clavulánico - Metronidazol - Clindamicina
Absceso periapical	Tejidos periapicales	<i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Prevotella oralis melaninogenica</i> <i>Fusobacterium spp</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Bacteroides</i> <i>Streptococcus spp</i>	Drenaje quirúrgico y desbridamiento AB: - Amoxicilina + clavulánico - Clindamicina - Penicilina + Metronidazol
Pericoronaritis	Tejidos que rodean el diente parcialmente erupcionado, sobre todo terceros molares inferiores.	<i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium spp</i> <i>P. intermedia melaninogenica</i> <i>Eubacterium</i> <i>Streptococcus spp</i>	Desbridamiento y drenaje AB: - Amoxicilina + clavulánico - Clindamicina - Claritomicina o Azitromicina





2.8. Antibióticos utilizados contra las infecciones de la cavidad oral.

El antibiótico ideal para tratar una infección debe reunir una serie de características, como son: a) actividad frente a los microorganismos implicados en el proceso infeccioso; b) adecuados parámetros farmacocinéticos (buena penetración y difusión en el lugar de la infección); c) buena tolerancia y pocos efectos adversos y d) una posología que pueda facilitar el cumplimiento del tratamiento (Liñares *et al.*, 2003).

El componente polimicrobiano de la infección odontogénica hace recomendable en muchos casos la utilización de antibióticos con actividad frente a bacterias aerobias y anaerobias, de amplio espectro y a dosis altas, siendo a veces necesario utilizar combinaciones que consigan un espectro de actividad mayor y adecuada al tipo de infección. La duración del tratamiento antibiótico depende del tipo de infección, de la extensión del proceso y del antibiótico elegido. A grandes rasgos, la duración oscila entre 5 y 10 días o dicho de otra manera, el tratamiento debe prolongarse hasta 3 ó 4 días después de la desaparición de las manifestaciones clínicas (Bascones *et al.*, 1994).

Los más utilizados en la infección odontógena son: betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina y fluorquinolonas (Bascones *et al.*, 2004).

•**Betalactámicos:** Son fármacos bactericidas, activos en la fase de crecimiento bacteriano, útiles en el tratamiento de la fase aguda de los procesos odontogénicos y para la prevención de las complicaciones (Maestre *et al.*, 2007).

La penicilina G (parenteral), la fenoximetilpenicilina (oral) y la amoxicilina, presentan buena actividad frente a patógenos aerobios facultativos y anaerobios por lo que se consideran de elección en las infecciones mixtas de la cavidad bucal. De las tres la más indicada es la amoxicilina, ya que presenta un espectro mayor que la penicilina y una mejor absorción entérica que la ampicilina. Son efectivas frente a los *Streptococcus viridans*, sin embargo cada vez son más numerosas las bacterias productoras de betalactamasas, especialmente de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* que las hacen resistentes, pero





además, en aquellas que aún continúan siendo sensibles, la CMI es elevada. Es por esta causa que la asociación de una penicilina con un inhibidor de betalactamasas como el ácido clavulánico ha pasado a ser el fármaco de elección en un gran número de estos procesos y que la tendencia sea aumentar la dosis para alcanzar la CMI (Maestre, 2004).

Las cefalosporinas orales, presentan una escasa actividad sobre bacterias Gram negativas anaerobias y no ofrecen ninguna ventaja sobre la penicilina y sus derivados en el tratamiento de las infecciones odontogénicas (Liñares, 2003).

•**Macrólidos:** Fundamentalmente eritromicina, espiramicina, claritromicina y azitromicina, son antibióticos bacteriostáticos, que presentan una alta proporción de resistencia a las bacterias más habituales de las infecciones odontógenas, por lo que no se consideran de primera línea en este tipo de infecciones. De ellos, la azitromicina es el de mayor absorción oral, con una buena farmacocinética y más activo frente a los anaerobios Gram negativos (Khemaleelakul *et al.*, 2002). La claritromicina es la que presenta una mayor actividad *in vitro* frente a los anaerobios facultativos Gram positivos, no obstante se considera un antibiótico en investigación dado que su CMI no ha sido establecida (Maestre, 2004).

•**Tetraciclinas:** Bacteriostáticos de amplio espectro. De ellos, minociclina y doxiciclina son los que poseen mejor actividad sobre las bacterias anaerobias, pero cada vez más limitada como consecuencia del aumento en los niveles de resistencia, por ello ninguno debe ser considerado fármaco de primera elección en las infecciones odontógenas (Maestre, 2004). La más utilizada es la doxiciclina, sobre todo en algunos casos de periodontitis donde predomina la especie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Su uso no se recomienda durante el embarazo, lactancia materna y en niños menores de 13 años, por su alta afinidad por el tejido óseo y dental. También se ha descrito la efectividad de la aplicación tópica de gel de minociclina en la fase aguda de la periodontitis, fase en la que predominan las bacterias *Bacteroides forsythus* y *Porphyromonas gingivalis* (Liñares, 2003).





- **Metronidazol:**

Es un fármaco bactericida muy activo frente a las bacterias anaerobias Gram negativas y las espiroquetas, pero con escasa actividad frente a cocos Gram positivos anaerobios y aerobios orales. Puede ser de elección en la gingivitis ulcerativa necrotizante (GUN), en la enfermedad periodontal crónica y en la angina de Vincent. No se recomienda su empleo durante el embarazo (Bascones *et al.*, 2004). Suele administrarse asociado con otros antibióticos activos frente a bacterias aerobias Gram positivas, como: penicilina V, amoxicilina, amoxicilina clavulánico o espiramicina (pseudomembranosa), limita su uso recomendándose para el tratamiento de infecciones odontogénicas graves o en los casos en que la penicilina ha fracasado. La clindamicina tópica en gel es útil en el tratamiento de la periodontitis en fase aguda y evita los efectos adversos asociados a la administración oral (Maestre *et al.*, 2007).

- **Fluorquinolonas:** El levofloxaciono y moxifloxacino son menos rentables que otros antibióticos, además la resistencia de los *Streptococcus viridans* frente a levofloxaciono es elevada (> 50%). La fluorquinolonas no se deberían utilizar en estas infecciones (Kuriyama *et al.*, 2000).

- **Clindamicina:** Sigue siendo el fármaco de elección en pacientes alérgicos a betalactámicos por su buena absorción, la baja incidencia de resistencias bacterianas y la alta concentración que alcanza en el tejido óseo. Este antibiótico se muestra muy efectivo frente a anaerobios facultativos y estrictos, incluyendo las cepas productoras de betalactamasas. Alcanza altas concentraciones alveolares y la actividad bactericida clínicamente se logra con la dosis habitualmente recomendada (Maestre, 2004). Así se describen CMI muy bajas frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*. No es activa frente a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Capnocytophaga spp* y más de un 25% de los *Streptococcus* del grupo *viridans* presentan resistencia de alto nivel, no superable con altas dosis de antibiótico. Existe propensión a causar colitis asociada a los antibióticos, en el Cuadro 2 se muestran algunos antimicrobianos utilizados (Bascones *et al.*, 2004).





Cuadro 2. Antimicrobianos indicados en infecciones odontógenas mixtas de la cavidad oral (Kuriyama *et al.*, 2000).

Infecciones odontógenas mixtas de cavidad oral	Fármaco/s de elección (Vía oral y/o tópica)	Alternativa (Vía oral y/o tópica)
Gingivitis marginal	Clorhexidina 0,2% tópica	Timol 1% tópico Povidona-yodada
Gingivitis ulceronecrosante	Amoxicilina-ácido clavulánico + clorhexidina tópica	Metronidazol + clorhexidina tópica
Periodontitis juvenil localizada	Doxiciclina oral + clorhexidina 0,2% tópica	Minociclina oral + clorhexidina 0,2% tópica
Enfermedad periodontal del adulto	Amoxicilina-ácido clavulánico o metronidazol + clorhexidina tópica o minociclina gel tópica	Clindamicina + clorhexidina tópica o povidona-yodada
Pulpitis aguda	Amoxicilina-ácido clavulánico	Clindamicina
Absceso periodontal	Amoxicilina-ácido clavulánico	Clindamicina
Pericoronaritis	Amoxicilina-ácido clavulánico	Clindamicina o claritromicina

2.9. Resistencia a los antibióticos.

El aumento en la prevalencia de resistencia bacteriana ha hecho que antibióticos útiles en el pasado no lo sean tanto en la actualidad, al igual que ciertas posologías. En este sentido, en los últimos 10-15 años se ha duplicado el número de microorganismos resistentes de la cavidad bucal (Walker, 2000). Como ejemplo hay estudios que han puesto de manifiesto la presencia de especies productoras de betalactamasas en el 74-88% de pacientes con periodontitis (Herrera *et al.*, 2000). De la misma manera, a lo largo de los últimos años y al igual que ha ocurrido con otros patógenos como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, los niveles de resistencia de varias especies de *Streptococcus* del grupo *viridans* tanto en macrólidos como con betalactámicos y en clindamicina se han incrementado de forma notable (Aracil *et al.*, 2002). Mientras que en el caso de los macrólidos un aumento de dosis no se traduciría en una mejor cobertura frente a las cepas resistentes, en el caso de los betalactámicos este aumento de dosis sí puede conllevar una mejor cobertura (Prieto *et al.*, 2002).

Por eso es de suma importancia la búsqueda de tratamientos alternativos para la prevención de dichos padecimientos para evitar su formación y prevalencia.





2.10. México y su enorme riqueza en medicina tradicional.

De acuerdo con estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas por 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Se estima que anualmente en todo el mundo se facturan 60 000 millones de dólares por concepto de comercialización de medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales. La OMS reconoce que no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas mismas y su uso racional, ni la seguridad, eficacia y calidad de sus principios activos, pues a pesar de que persiste un arraigado uso de la medicina tradicional, su aplicación ha superado fronteras ancestrales de países y culturas (OMS, 2010).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial, en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, después de China que tiene registradas 5000 (Muñeton, 2009). Aproximadamente el 15% de la flora total tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005).

Los principios activos se deben a los compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamentos y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Por ejemplo, las plantas muy jóvenes o muy viejas tienen menor concentración de principios activos; los suelos ácidos favorecen a las plantas productoras de alcaloides y la humedad del suelo tiene un efecto directo sobre la concentración de estos compuestos. Una sola planta medicinal puede contener de 8 a 10 principios activos, lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza. Estos compuestos





químicos se extraen por diferentes procedimientos. Para que una planta conserve sus propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas de recolección, desecación, almacenamiento y finalmente de presentación como infusiones, extractos o cápsulas, entre otras (Ocegueda *et al.*, 2005).

El uso de productos a base de plantas medicinales, ha existido desde la época precolombina (Figuras 5 y 6) y ha pervivido hasta nuestros días en cada mercado popular a lo largo y ancho del territorio mexicano. Se pueden encontrar expendios de plantas medicinales de diversa índole contra cualquier padecimiento humano. El INEGI menciona que en México existen alrededor de 10 millones de indígenas sin acceso a la medicina “occidental”, quienes recurren a la Medicina Tradicional para sobrevivir (Mendoza y Figueroa, 2006).



Figura 5 y 6. Uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, códice de la Cruz Badiano (Afanador *et al.*, 2012).





2.11. Investigación realizada sobre la familia *Burseraceae*.

Burseraceae agrupa más de un centenar de especies de plantas leñosas, cuya distribución se restringe al continente americano, en particular a la mitad septentrional de su porción intertropical, pues se extiende desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos (Rzedowski y Kruse, 2004).

Su centro de diversidad se localiza en México, de donde hasta la fecha se conocen unas 80 especies más o menos definidas, el total real del grupo en nuestro país posiblemente sobrepase las 100 especies. El género es relativamente bien conocido taxonómicamente, y se ha dividido en dos secciones, *Bursera* y *Bullockia* (Becerra, 2003). *Bursera* es altamente adaptada a las condiciones cálidas y secas del bosque seco tropical. Todas sus especies son de hoja caducas, los que están presentes en los bosques tropicales húmedos incluidos los subhúmedos. La mayoría de las especies son sensibles al frío, y sus distribuciones son limitadas por temperaturas de congelación. Como con otros miembros de estos bosques, muchas especies de *Bursera* tienen troncos succulentos, y algunos muestran un tronco colorido que exfolia hojas de papel, como escamas coloridas, este rasgo es el responsable del nombre Azteca "cuajjotes," que significa "árbol leproso" que se sigue aplicando en la actualidad a estos árboles en algunas regiones de México (Becerra, 2005).

Los representantes de *Bursera* son mayormente árboles o algunas veces arbustos, de hoja decidua, que constituyen un elemento característico pocas veces dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1800 m. Solamente una especie, *B. simaruba* llega a ser componente de ambientes más húmedos y puede prosperar en bosques tropicales subcaducifolios y perennifolios. Varias prosperan en matorrales xerófilos y algunas llegan a ascender a elevaciones cercanas a 2400 m s.n.m., penetrando en ocasiones a áreas con bosques de encino y de coníferas. Dadas estas afinidades ecológicas, la mayor diversidad de las especies mexicanas de *Bursera* se





establece en la vertiente pacífica de la República (Figura 7), con su máxima concentración en la cuenca del río Balsas (Rzedowski y Kruse, 1979).

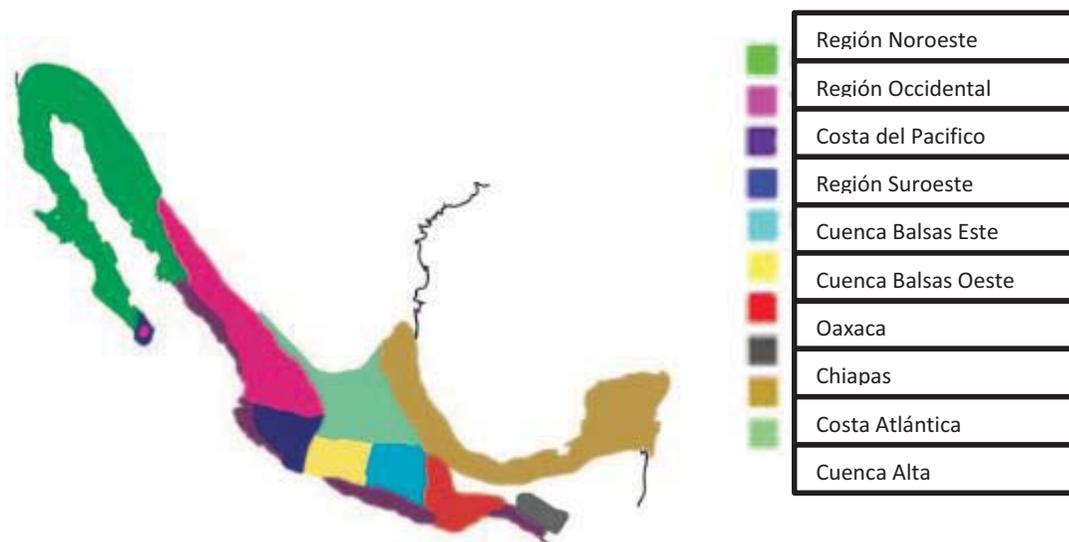


Figura 7. Expansión histórica de *Bursera* en México. La distribución de *Bursera* fue dividida en 10 sub zonas geográficas (Becerra, 2005).

Dentro del contexto del actual sistema de nomenclatura, la primera especie de *Bursera* se describió en 1753. Sin embargo, el proceso de una apropiada distinción y circunscripción del género dilató cerca de otros 100 años. En 1762, la planta fue rebautizada una vez más y situada como miembro de *Bursera*, nombre nuevo que se dedicó a Joachim Burser (1603-1689), médico y botánico alemán (Rzedowski *et al.*, 2004).

Taxonómicamente son árboles o a veces arbustos caducifolios, resinoso-aromáticos, dioicos o polígamo-dioicos, rara vez hermafroditas; la corteza externa de las partes lignificadas provista de una capa de clorénquima, la del tronco a menudo rojiza o amarillenta y exfoliante, otras veces gris, lisa y sin exfoliarse, las ramillas abreviadas (braquiblastos) comúnmente presentes; hojas sin estípulas, a menudo dispuestas en forma de roseta en los extremos de los braquiblastos, otras veces alternas y esparcidas sobre ramas jóvenes y vigorosas, a las hojas normales les anteceden en aparición una o varias rosetas de catafilos, de forma oblonga, lanceolada o triangular, y también es frecuente que las primeras hojas en





aparecer sean trifolioladas o con un número de foliolos más reducido que el común para la especie; en forma de panículas, racimos, cimas, glomérulos, las flores solitarias por reducción, casi siempre unisexuales, rara vez funcionalmente hermafroditas, pequeñas, trímeras a pentámeras; cáliz profundamente dividido, sus lóbulos abiertos en el botón; los pétalos por lo general más largos que el cáliz, blanquecinos, amarillentos, verdosos o rojizos; estambres dos veces más numerosos que los pétalos, dispuestos en dos series iguales o en ocasiones algo desiguales a veces parcial o totalmente dividido en 2 ramas, estigmas 2 ó 3; fruto en forma de drupa ovoide, elipsoide a esférica, biconvenxa un poco asimétricamente trígona, al principio carnoso pero luego coriáceo y tardíamente dehiscente por medio de 2 ó 3 valvas, hueso parcial o totalmente cubierto por un pseudoarilo que al abrirse el fruto suele ser rojo, anaranjado o amarillento, pero por lo común pronto se torna gris o blanquecino; semilla por lo general una sola en cada fruto en la Figura 8 se dan algunos ejemplos (Andrés-Hernández y Espinosa, 2002).

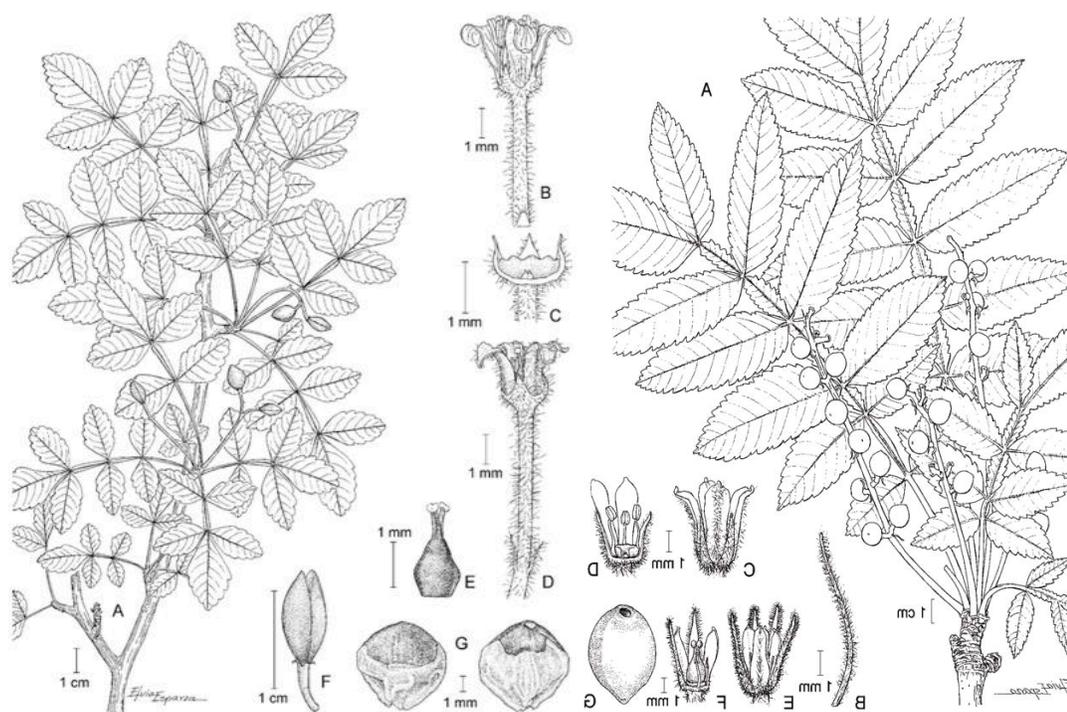


Figura 8. *Bursera linanoe* y *Bursera hintonii* Bullock. A. rama con hojas y frutos; B. bracteola; C. flor masculina en vista externa; D. flor masculina desprovista de un segmento del cáliz, de 2 pétalos y de 5 estambres; E. flor femenina en vista externa; F. flor femenina desprovista de 2 segmentos del cáliz, de 2 pétalos y de varios estaminodios; G. Hueso (Rzedowski *et al.*, 2004).





2.12. Compuestos biológicamente activos en el género *Bursera*.

Muchas plantas del género *Bursera* son de importancia en la medicina tradicional, y tiene varios usos domésticos en la región central de México, donde cerca de 70 especies son endémicas y aproximadamente 18 crecen abundantemente (Hernández *et al.*, 2012). Especies de la familia *Burseraceae* deben su valor económico a los aceites esenciales, terpenos, esteroides y a los lignanos en sus resinas. Estudios fitoquímicos de diferentes especies del género *Bursera* han permitido el aislamiento de triterpenos, bilignanos y flavonoides (Peraza y Peña, 1992). Durante el proceso de aislamiento, se obtuvieron en forma pura los triterpenos lupeol, *epi*-lupeol, epiglutinol, α -amirina y β -amirina (Peraza *et al.*, 1995).

Por ejemplo en los estudios realizados a los extractos obtenidos de la corteza de *B. graveolens*, se reporta presencia de triterpenos tetracíclicos: el ácido β -elemónico, etc. Y la actividad antimicrobiana, en los extractos etanólicos de las cortezas y hojas de *B. graveolens* contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*; y antiinflamatoria frente a indometacina en el Cuadro 3 se nombran algunos de los compuestos aislados (Leyva *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Componentes en el cromatograma del aceite de ramas de *B. graveolens* (Leyva *et al.*, 2007).

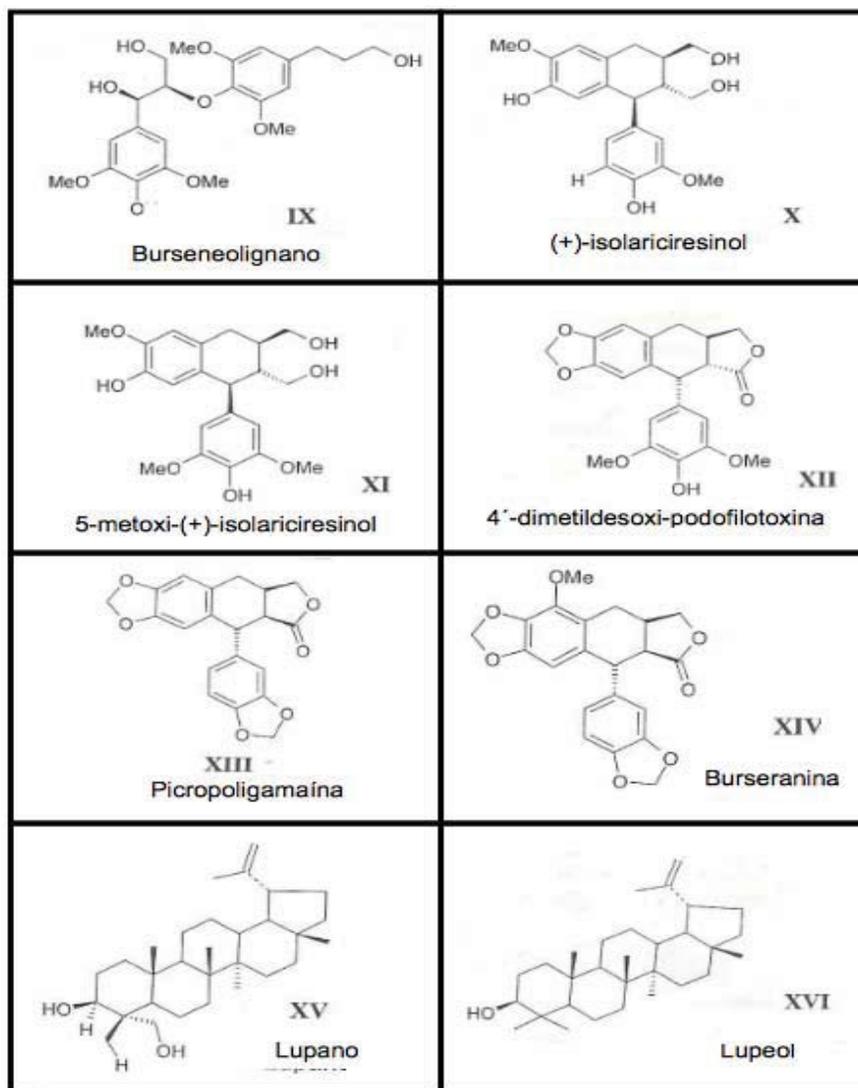
Pico. No	Tr.	Abundancia (%)	Compuesto
1	4,603	4,84	D-Limoneno
2	10,044	0,69	2-Ciclohexen-1-ol,2-metil-5-(1-metil)
3	10,602	1,06	Fenchona
4	13,483	3,02	1,2-Ciclihexanodiol,1-metil-4-(1-metiletienil)
5	16,001	0,35	α -Copaeno
6	16,185	6,09	3,4-metilenoxiacetofenona
7	17,360	1,98	Espatulenol
8	17,552	70,82	Viridiflorol
9	17,811	2,67	6-isopropenil-4,8 α -dimetil-1,2,3,6,7,8,8 α -octahidronaftalen-2-ol
10	18,177	2,91	Naftaleno-1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4-7-dimetil-1
11	18,332	5,53	α -Cadinol





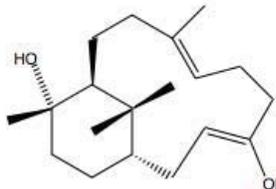
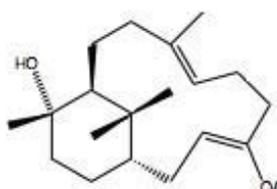
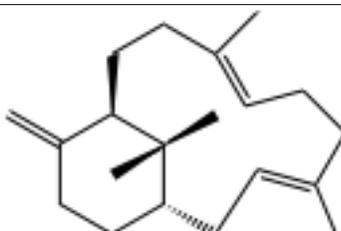
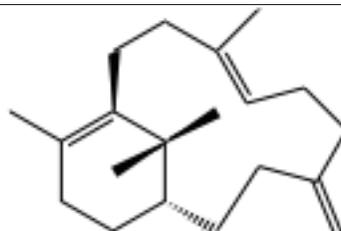
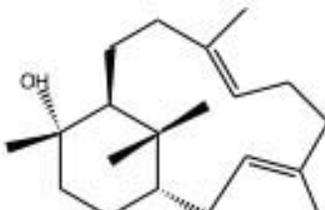
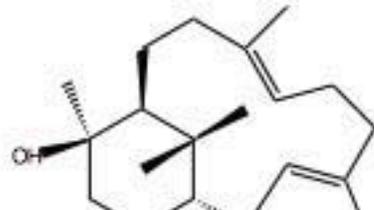
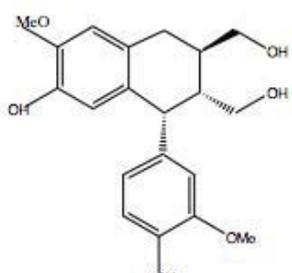
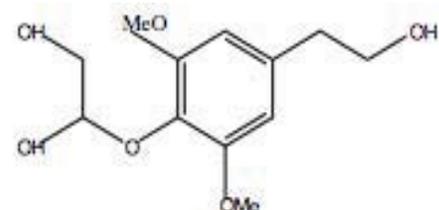
En cuanto a los estudios que se han realizado para especies del género *Bursera* se han logrado identificar diversos componentes químicos, entre los cuales se encuentra el 3',4',5,7-tetrahidroxi-flavonol, que debido a su estructura química es posible que sea uno de los compuestos que atribuyen su capacidad antioxidante. Otros compuestos que pueden contribuir a la actividad antioxidante de las especies de *Bursera* son los lignanos y neolignanos, que son compuestos fenólicos, dichos compuestos son: burselignano, burseneolignano, (+)-isolariciresinol y 5-metoxi-(+)-isolariciresinol, en el Cuadro 4 se encuentran algunas estructuras aisladas (Campos, 2006).

Cuadro 4. Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género *Bursera* (Campos, 2006).





Cuadro 4. Continuación. Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género *Bursera* (Campos, 2006).

 <p>(+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>	 <p>20 acetato (+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>
 <p>(+)-verticilan-3,7,12(18)-trieno</p>	 <p>(-)-verticilan-4(20),7,11-trieno</p>
 <p>(1S,3E,7E,11S,12S)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol</p>	 <p>(1S,3E,7E,11S,12R)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol</p>
 <p>Burselignano</p>	 <p>Bursefenilpropano</p>





2.13. El árbol medicinal palo mulato (*Bursera simaruba*).

Se encuentra desde la Sierra de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo en la vertiente del Golfo y desde Sinaloa hasta la Depresión Central de Chiapas en el Pacífico a una altitud de 0 a 1,200-1,800 m. Abarca los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Requiere de un clima tropical o subtropical, de una precipitación anual media entre 500 y 1,400 (3,000) mm y una temperatura de 18 a 27 °C. Prospera tanto en terrenos llanos como en laderas escarpadas pero se desarrolla mejor en los llanos fértiles. Habita sobre suelos derivados de rocas sedimentarias marinas y sobre suelos calcáreos. Suelos: café pedregoso, café-arcilloso, arcilloso, somero, rocoso, arenoso, rico en materia orgánica, litosol, vertisol, oxisol. En la Figura 9 y Cuadro 5 se muestran algunas características de palo mulato (CONABIO, 2009).



Figura 9. Características de *Bursera simaruba* A. rama con hojas e inflorescencias masculinas; B. ramilla de inflorescencia femenina; C. flor masculina; D. flor femenina; E. corte longitudinal de la flor femenina; F. 2 frutos (Rzedowski *et al.*, 2004).





Cuadro 5. Descripción del árbol medicinal *Bursera simaruba* (CONABIO, 2009).

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Nombre tradicional	Cohuite (Ver.); Copalillo (Pue.); Chaca (Tamps., Ver., Yuc.); Chachah, chakah, Hukúp (l. maya, Yuc.); Chacaj (l. tojolabal, Chis.); Lon-sha-lac (l. chontal, Oax.); Tzaca (l. huasteca, S.L.P.); Tusun, Ta'sun (l. totonaca, Pue.); Yala-guito (l. zapoteca, Oax.); Chicohuiste, Chocohuite, Chocogüite, Chohuite (Chis.); Jiote, Jiote colorado, Quiote (Sin.); Piocha Tamps.); Tzaca (l. huasteca, S.L.P.); Mulato, Songolica, Zongolica (Oax.); Palo colorado (Sin.); Palo jiote (Ver., Tab., Oax.); Palo mulato (Nay., Chis., Tab., Oax.); Palo retino, Suchicopal (Tab.).
Forma	Árbol resinoso, caducifolio de 5 a 20 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 40 a 80 cm (hasta 1 m).
Copa/Hojas	Copa irregular y dispersa (follaje ralo). Cuando el árbol crece en terrenos abiertos, sus ramas se extienden y forman una copa ancha y abierta. Hojas compuestas, alternas, con 3 a 13 folíolos lanceolados u oblongos a obovados o elípticos, de 4 a 9 cm de largo por 1.8 a 3.5 cm de ancho, margen entero, membranáceos a cartáceos de color verde oscuro y a menudo brillantes en el haz.
Tronco/Ramas	Tronco con una ligera y característica torcedura en forma de "S" en su parte media o superior, con pocas ramas gruesas y torcidas. El tronco es fornido y con frecuencia se bifurca a 2 m del suelo. Contrafuertes insinuados en la base, 3 a 6 por tronco.
Corteza	Corteza lisa, rojiza y se despega en jirones (exfoliante). Durante la época de sequía el árbol continúa su actividad fotosintética mediante los cloroplastos localizados en la corteza expuestos a la luz una vez desprendida la corteza.
Flor(es)	Panículas tirsiformes terminales o pseudoracimos, de 6 a 13 (hasta 20 a 28) cm de largo incluyendo el pedúnculo; con flores masculinas individuales, con 4 a 5 pétalos rosados, verde- amarillentos o blancos. Flores femeninas con solo tres pétalos.
Fruto(s)	Cápsula trivalvada con sólo el exocarpio dehiscente, de 10 a 15 mm de largo, en infrutescencias de 4 a 9 cm y hasta 15 cm de largo, globosa u ovoide, de 7 a 10 (15) mm de diámetro, triangular, moreno rojiza, dehiscente. En el árbol se mantiene durante varios meses exhibiendo las semillas. 1 ó 2 semillas por fruto.
Semilla(s)	Semillas de 8 a 10 mm de largo por 7 a 8 mm de ancho y 5 a 6.5 mm de grueso, amarilla, angulosa, triangular al corte transversal, con arilo rojo cubriéndola totalmente.





Los principales usos domésticos que se le dan a *Bursera simaruba* son los siguientes (CONABIO, 2009):

-Adhesivo (exudado de resina): La resina se usa como sustituto de la cola y como cemento para pegar piezas rotas de loza, vidrio y porcelana.

-Aromatizante (exudado de resina): Exudado y frutos aromáticos. La resina aromática es conocida como “chibou”, resina de “cachibou” o resina “gomart”. Hervida en agua y endurecida se usa a manera de copal como incienso.

-Artesanal (madera): La madera es blanda y ligera por lo que es muy apreciada para la elaboración de artesanías, juguetes y artículos torneados. Combustible [madera]. Leña y carbón. La madera tiene un alto contenido de humedad pero cuando esta bien seca se usa como leña de ignición por su alta flamabilidad.

-Construcción (madera): Construcción rural (viviendas), construcciones interiores. No es apropiada para uso externo.

-Forrajero (hoja, vástago, fruto, semilla): Planta forrajera para cría de animales dentro de un solar.

-Industrializable (madera, exudado de resina): Pulpa para papel y fabricación de barnices y lacas.

-Insecticida (exudado de resina): La resina aromática exudada de la corteza se usa para repeler insectos.

-Maderable (madera): Especie maderable con posibilidades comerciales. Madera suave, su gravedad específica es de 3 0.32 g/cm. Se puede trabajar con facilidad y se le puede dar un fino acabado. Uso potencial: cocinas integrales, acabados de interiores, suelas de zapatos, viruta excélsior, muebles rústicos, cajas y embalajes, postes, cercas, chapa, triplay, cerillos, construcción de canoas, centros para madera terciada, abatelenguas, tableros aglomerados, palillos, guacales, tablas, toneles, carpintería, ebanistería en genera y patrones debido a que su estabilidad dimensional es excelente.





-Medicinal (fruto, flor, hoja, corteza): La infusión del cocimiento de la madera se utiliza para bajar de peso. Fruto, flor: antidiarreico, mordedura de serpiente. Planta: resfriado, disentería, diarrea, fiebre, hongos en la piel, mal de viento, antimicótica, purgante y sudorífica. Hoja: tosferina y e sarampión, antiasmático, acelerador de parto, encías infectadas, evacuaciones con sangre, diurética, amigdalitis, comezón, úlceras (enfermedades venéreas), antiinflamatorio (rodillas), para fiebre intestinal, analgésico (dolor de cabeza, estómago y muelas). Corteza: antipirético (calentura), hemorragia nasal, dolor muscular, remedio para el hipo, limpieza de heridas, inflamación de ovarios, picadura de araña hemorragia nasal, dolor muscular (CONABIO, 2009).

Sus ramas, la flor, el fruto y la resina se usan con fines medicinales por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, entre otras. Esta especie también se ha utilizado como afrodisiaca, diaforética, diurética, expectorante, purgativa, galactogoga, antiséptica y repelente de insectos. En la medicina tradicional, la infusión de la corteza de *B. simaruba* se utiliza para adelgazar o en el tratamiento de úlceras estomacales; sin embargo, el proceso de ebullición provoca la liberación de taninos que pueden tener efectos tóxicos (Campos, 2006).

Desde la antigüedad los mayas denominaban a este árbol *chakáh*, lo empleaban para curar la irritación cutánea causada por el *chechén* (*Metopium brownei*, árbol que produce dermatitis al tacto) el cual crece casi siempre cerca del primero. Existen varias leyendas mayenses respecto al origen de ambos árboles, una de ellas cuenta que en la antigüedad dos guerreros, uno bondadoso llamado Kinch y el otro perverso llamado Tizic, lucharon a muerte por el amor de una joven de nombre Nicté-Há con funesto desenlace para ambos. Los dioses les concedieron la gracia de volver al mundo de los mortales convertidos en árboles para contemplar a su amada: Tizic sería un *chechén* y Kinch un *chacáh*. Finalmente Nicté-Há moriría de pena y los dioses la convertirían en una flor (Monteoliva y Carvajal, 2014).





3. JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones odontogénicas son un problema creciente y grave de la sociedad moderna, debido a que existen decenas de tratamientos farmacéuticos (en su mayoría antibióticos), para suprimir los daños provocados por estas bacterias, el uso excesivo de estos medicamentos (el 10% de los antibióticos totales vendidos) ha generado que los microorganismos se hagan paulatinamente más resistentes, provocado que los tratamientos para contrarrestarlos sean cada vez más costosos, dolorosos, largos, invasivos, etc. Aunado a esto, estas infecciones pueden llegar a otros órganos vitales provocando afecciones cada vez mayores que pueden llegar a provocar la muerte (Machuca *et al.*, 2000).

Por lo cual, es necesario la búsqueda de tratamientos preventivos para evitar la formación de estos problemas. Sabemos que México es el segundo país a nivel mundial con mayor diversidad de plantas con propiedades medicinales, muchas de las aplicaciones de estas son para evitar la proliferación de infecciones provocadas por bacterias. El árbol medicinal *Bursera simaruba*, cumple con una larga historia de referencias de uso tradicional sobre diversos padecimientos, lo que lo hace un excelente candidato y posible productor de estas tan buscadas alternativas, por ello se eligió una parte abundante y expuesta como lo es la corteza, con la cual se realizaran los ensayos y análisis necesarios, para identificar posibles compuestos con actividad biológicamente activa sobre las bacterias patógenas de la cavidad oral: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Por último, este es un árbol prolífico a lo largo del país y de considerables proporciones, puede estar al alcance de personas con recursos limitados, siendo el factor económico uno de los principales puntos a favor de esta investigación. De igual manera el renombre que tiene por si mismo, lo hace ser confiable para las personas que lo necesiten utilizar.





4. OBJETIVOS.

4.1. General.

- Determinar la actividad sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba*, recolectada en la estación de Biología Chamela (EBCh) del Estado de Jalisco.

4.2. Particulares.

- a) Preparar el extracto metanólico a partir de la corteza triturada de *Bursera simaruba*.
- b) Determinar el efecto inhibitorio del mismo sobre el crecimiento de bacterias de la cavidad oral: *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* utilizando la prueba de difusión en agar.
- c) Realizar el fraccionamiento primario del extracto activo, empleando métodos cromatográficos y procesos de partición.
- d) Evaluar cuantitativamente el efecto de fracción activo obtenido en el proceso de partición, sobre el crecimiento de las bacterias: *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.
- e) Determinar el efecto del compuesto mayoritario presente en el extracto sobre el desarrollo de la biocapa monoespecie formada por *Streptococcus mutans*.
- f) Identificar los compuestos químicos mayoritarios presentes en las fracciones obtenidas.





5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1. Recolección de la muestra vegetal.

La corteza del árbol *Bursera simaruba* se recolecto en la estación de Biología Chamela (EBCh), dependencia del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada en el estado de Jalisco, la cual fue autenticada por la bióloga Irma Acosta del Instituto de Ecología. Una muestra de referencia se conserva en el laboratorio 111 del Conjunto E, del departamento de Farmacia en la Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria.

5.2. Métodos generales de análisis.

5.2.1. Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) utilizando como sistema de elución 8:1:1 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt). Se observaron bajo luz UV a $\lambda=254$ nm, 302 nm y 365 nm. Posteriormente se revelaron con anisaldehído sulfúrico y vainillina sulfúrica.

Se utilizo cromatografía en columna abierta (CCA) de vidrio sobre gel de sílice.

5.2.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.

Los análisis espectroscópicos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) en el edificio B de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz respectivamente. Las muestras se disolvieron con piridina-*d*₅ y CHCl₃. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.





Los espectros de masas se generaron en un equipo DFS (High Resolution Magnetic Sector MS) por impacto electrónico (IE) a 70 eV.

5.3. Preparación de la muestra.

Se molieron en una trituradora de 1er y 2do nivel durante 4 horas, 1774.4 g de corteza cruda de *Bursera simaruba*, quedando totalmente molida en finas trizas, este equipo se encuentra en el laboratorio de beneficio de minerales perteneciente a la carrera de Ingeniería Químico Metalúrgico de la Facultad de Química, la cual esta bajo el cargo del Ingeniero Huerta.

5.3.2. Obtención del extracto metanólico.

Los 1774.4 g de corteza molida se introdujeron en un garrafón de vidrio de 20 litros al cual se le añadieron 4 litros de metanol durante una semana, siendo esta la primer maceración, el metanol de esta mezcla se filtro un embudo Büchner al vacío, este se concentro en un rotavapor al vacío a 60 °C, a 60 rpm, el extracto obtenido se concentro en metanol. El proceso de maceración se repitió por duplicado, teniendo un rendimiento final de 15.2674 g de extracto crudo de la corteza.

5.4. Pruebas microbiológicas.

5.4.1. Estandarización del método.

Se estandarizaron las células de las cepas de *Streptococcus* a una cuenta microbiana de 1×10^6 UFC/mL, para realizar la evaluación de los compuestos y la prueba de difusión en agar. Se inocularon 100 μ L del cultivo conservado en glicerol en 5 mL de caldo BHI, se incubaron a 37 °C durante 18 horas, se tomaron 100 μ L de este cultivo y se inocularon nuevamente en 5 mL de caldo BHI, el cual se incubo a 37 °C durante 4 horas.





5.4.2. Evaluación del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba* mediante la prueba de difusión en agar.

La prueba de difusión en agar se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto metanólico de *Bursera simaruba* sobre el crecimiento de las bacterias: *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

En este método se observa la inhibición del crecimiento de microorganismos por el extracto y sustancias de prueba. El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Rodríguez (2011).

- a) **Reactivación de la cepa:** Se tomaron 100 μ L del cultivo conservado en glicerol de cada cepa de *Streptococcus* a evaluar (*S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*), se agregaron a viales con 5 mL de medio de cultivo BHI (Infusión cerebro-corazón), los cuales se incubaron a 37 °C durante 17 horas. Se tomaron 100 μ L de este nuevo cultivo y se inocularon en 5 mL de medio BHI, se incubaron nuevamente a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una densidad óptica (D.O.) de 0.01 y de esta manera alcanzar una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de las bacterias a utilizar durante el ensayo.
- b) **Preparación de la muestra a evaluar:** La muestra a evaluar fue el extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba*. Dada la naturaleza química de la muestra a valorar, se solubilizaron de acuerdo a la metodología empleada por Hernández (2012), agregando 5 mL de agua destilada y 0.86 mL de Tween® 80, sonicando a temperatura ambiente.
- c) **Preparación de la placa con medio BHI:** Se preparó medio de cultivo BHI (según las instrucciones del fabricante) adicionándole 1.7% de agar comercial Bacto® para solidificar el medio. La mezcla homogénea se esterilizó a 121 °C y 1 atm durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó





enfriar a 40 °C para distribuir en cajas Petri de vidrio, colocando 10 mL en cada una y dejando enfriar a temperatura ambiente hasta solidificar. Para comprobar la esterilidad del medio, las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

- d) **Preparación de sobrecapa de medio BHI:** Se preparó medio BHI (según las instrucciones del fabricante) adicionándole 0.8% de agar comercial Bacto® para solidificar el medio. La mezcla homogénea se distribuyó en proporciones de 7 mL a tubos con tapón. Finalmente, los tubos se esterilizaron a 121 °C y 1 atm durante 15 minutos.
- e) **Colocación de las muestras en los pozos:** En la placa de agar BHI se colocaron las torres de cristal estériles y en los pozos formados, se agregó para el control negativo (agua y Tween® 80), control positivo (clorhexidina al 0.12%), y el extracto a concentraciones de 1000, 1500 y 2000 µg/mL. De las cepas ajustadas a 1×10^6 UFC/mL se tomaron 40 µL de la cepa de *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* para inocularse en la sobrecapa fundida. El medio inoculado se vertió sobre la placa con las torres de cristal previamente colocadas. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, se retiraron las torres de cristal quedando pequeños pozos sobre el agar. En los pozos se agregaron 80 µL de compuesto a diferentes concentraciones y los controles positivo y negativo. Los resultados obtenidos se miden en mm de acuerdo al tamaño del halo de inhibición siendo considerada positiva la que forme un halo en el que ya no aparezca crecimiento de la bacteria a tratar.

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

Se realizó el primer ensayo biológico utilizando el extracto crudo metanólico, mediante la técnica de microdilución en placa de 96 pozos, sobre el crecimiento de las bacterias: *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Se tomaron 16 mg del extracto metanólico crudo, los cuales se





diluyeron en 900 μL de agua destilada más 100 μL de DMSO, para realizar el ensayo se siguieron los siguientes pasos:

- a) Se llenaron todos los pozos de la placa con 100 μL de caldo BHI (con ayuda de una pipeta multicanal).
- b) En la primer fila de pozos se colocaron 100 μL del extracto metanólico crudo, teniendo ahora un total de 200 μL (100 μL de caldo BHI más 100 μL del extracto metanólico).
- c) Con la pipeta multicanal, desde el primer pozo se mezcló cuidadosamente con el émbolo, se tomaron 100 μL , los cuales se pasaron a la segunda fila de pozos, y así consecutivamente hasta la fila 10 con el objetivo de ir disminuyendo la concentración inicial de nuestro extracto metanólico.
- d) Posteriormente la fila del control negativo se colocaron 100 μL de caldo BHI (Aquí se tenían en total 200 μL de caldo BHI)
- e) A continuación en la siguiente fila se añadieron 80 μL DE CHx (control positivo).
- f) Se agregaron 80 μL de caldo BHI en los pozos de las primeras 10 filas.
- g) Se añadieron 20 μL de la bacteria correspondiente (*Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* respectivamente) en todas las filas, exceptuando la fila del BHI (control negativo).
- h) En todos los pozos al final se tuvieron 200 μL .
- i) Después las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en una incubadora VWR Shymphony, para favorecer el crecimiento de las bacterias antes mencionadas.
- j) Para finalizar se observó por densidad óptica el crecimiento de las bacterias en los diferentes pozos con las diferentes concentraciones, se observa menor turbidez en los pozos en los que hay mayor MIC.

5.4.4. Inhibición de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, siguiendo la técnica de cuantificación de cristal violeta propuesta por Hwang y Rukayadi (2006).





- a) Se agregaron 100 μ L de caldo BHI en cada pozo.
- b) Después se añadieron 100 μ L del extracto metanólico crudo.
- c) Se realizaron las respectivas microdiluciones seriadas exceptuando el pozo control negativo (BHI) y el pozo control positivo (Digluconato de clorhexidina).
- d) En cada pozo se agregaron 80 μ L de caldo BHI.
- e) Se añadieron en cada pozo exceptuando el control negativo, 20 μ L de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* (1×10^6 UFC/mL).
- f) Se incubó a 37 °C por 72 horas.
- g) Transcurrido el tiempo se lavaron los pozos con agua desionizada para eliminar a las bacterias que no lograron adherirse, esto se realizó por triplicado.
- h) Se agregaron 100 μ L de etanol (96%) en cada pozo, esta se dejó secar por 20 minutos y posteriormente se tiró.
- i) Se añadieron 200 μ L de cristal violeta (0.4%) para teñir a las bacterias que lograron adherirse, se dejó incubar a temperatura ambiente por 45 min.
- j) La placa se lavó con agua desionizada y se agregaron 200 μ L de etanol al 96%, se dejó reposar por 45 min a temperatura ambiente.
- k) Se transfirieron 100 μ L a otra placa con el fin de quitar el excedente.
- l) Se observaron los resultados a una absorbancia de 565 nm, en donde hay menor formación de Biofilm se ve menos morado.

5.5. Estudio químico.

5.5.1. Separación de sólidos inorgánicos.

Los 15.2674 g de extracto metanólico crudo obtenidos, se concentraron con metanol en el rotaevaporador al vacío a 60 °C, a 60 rpm, se formó un polvo blanco, el cual aún mostraba partes amarillas y verdes (posiblemente pigmentos), por lo que se procedió a hacer un filtrado utilizando un embudo Büchner al vacío, el polvo blanco que quedó en el papel filtro se lavó con metanol frío. Este quedó totalmente blanco teniendo un rendimiento de 1.7003 g.





5.5.2. Fraccionamiento primario por CCA.

El metanol frío obtenido, se concentro en el rotaevaporador al vacío a 60 °C, a 60 rpm, quedando un extracto de color café el cual fue resuspendido con metanol, y se tuvo un rendimiento de 9.1854 g.

Posteriormente a estos 9.1854 g de extracto limpio se le agregaron 20 mL de metanol, más 10 mL de dicloro y 15 mL de una mezcla de dicloro/acetona, se agregó silica, formándose una textura de gránulos muy finos, se colocaron en la campana para evaporar el disolvente presente, el polvo fino que quedo se midió en una probeta teniendo un volumen de 24 mL de silica con el extracto (la silica se torno de un color café).

Se monto una columna abierta de vidrio sobre gel de sílice en la cual se realizó una serie de fraccionamientos primarios por partición con disolventes.

Se le agregó 1 L de una mezcla de disolventes en una proporción de 8:1:1 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt), el cual se dejo correr por toda la columna, se empezaron a recolectar fracciones de 250 mL. A partir de la fracción 19 se empezó a incrementar el gradiente de polaridad al agregar a la mezcla de 8:1:1 más 10 mL de MeOH, la cual se fue incrementando cada 5-15 fracciones dependiendo de las similitudes cromatográficas que presentaban, hasta tener una mezcla de disolventes de 8:1:1 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt) más 90 mL de MeOH. En el Cuadro 6 se resume el fraccionamiento primario del extracto metanólico de la corteza del árbol *Bursera simaruba* en el que se obtuvieron 81 fracciones. En la Figura 10 se muestra la columna de vidrio abierta sobre gel de sílice utilizada.





Cuadro 6. Fraccionamiento primario, utilizando cromatografía de columna abierta del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba*.

FRACCIÓN(ES)	DISOLVENTE(S)	PROPORCIÓN
1-10	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	8:1:1
19-23	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:1
24-27	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:2
28-34	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:3
35-40	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:4
41-48	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:5
49-62	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:6
63-69	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:7
70-76	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:8
77-81	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH	8:1:1:9



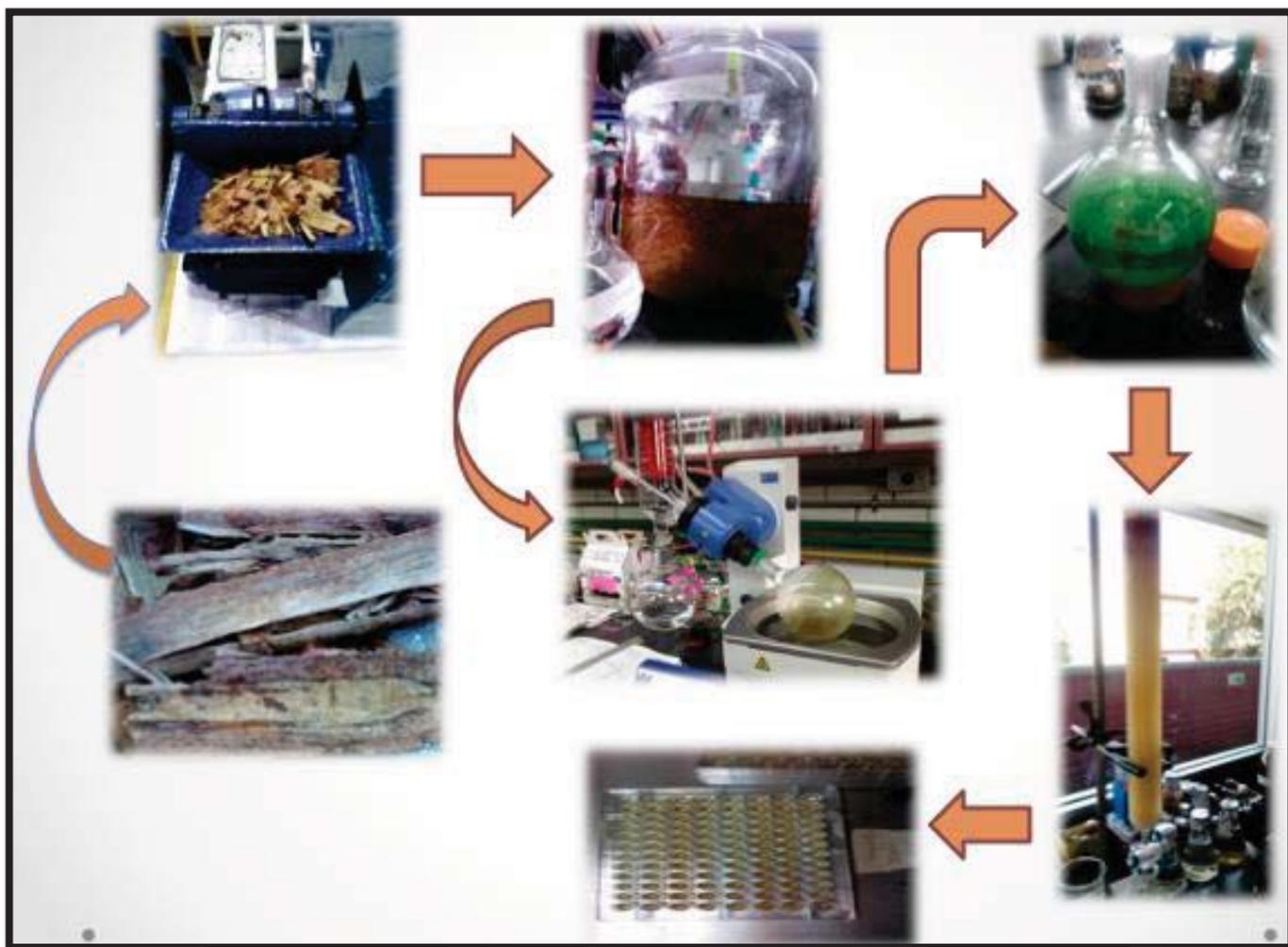
Figura 10. Columna abierta sobre gel de sílice.





En el Diagrama 1 se ejemplifica todo el proceso que se realizó desde la corteza cruda antes de la molienda, hasta la evaluación de la actividad biológica.

Diagrama 1. Desarrollo experimental desde la corteza cruda hasta las pruebas microbiológicas.





6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente proyecto de investigación se realizó el estudio químico y biológico de la corteza del árbol *Bursera simaruba* recolectado en la estación de Biología Chamela (EBCh), dependencia del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada en el estado de Jalisco, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Las plantas se han empleado desde tiempos ancestrales con fines medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, incluidas las de naturaleza infecciosa. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, los humanos dependieron de ellas para el tratamiento de sus enfermedades (Castro, 2006).

En este trabajo se demuestra que el uso empírico de las plantas en medicina tradicional sigue siendo un buen punto de partida para la selección y el estudio de las propiedades farmacológicas de sus extractos. Por otra parte, la ausencia de estudios científicos anteriores sobre la actividad antimicrobiana de esta especie justifica la investigación realizada. Palo mulato (*Bursera simaruba*) ha demostrado a lo largo de la historia gran cantidad de usos terapéuticos; Nicolás Monardes, en el siglo XVI, relata en su obra *Herbolaria de Indias* que se emplea para el reumatismo, artritis, tullimiento de las articulaciones, rigidez, dolor; para numerosas enfermedades de la piel, tales como la aparición de llagas purulentas, lepra, erupciones acuosas, así como cualquier acumulación de líquido o agua en el organismo. En el siglo XX, Maximino Martínez la refiere para abscesos, como antierotática, antidisentérica, para enfermedades venéreas, hemorragias del estómago, gastroenteritis e hidropesía (Cowan, 1983).

De igual manera se utiliza de diferentes formas para bajar la fiebre o calentura. La cocción de la corteza se toma como agua de uso contra disentería, dolor de estómago, tos ferina o para acelerar la evolución del sarampión (Campos, 2006).





También se emplean en casos de calor en el estómago, diarrea, dolor de muelas, infección intestinal, padecimientos hepáticos, pujos, tos, males venéreos, granos, salpullido, calor de la vejiga, mal de orín, baños para después del parto, bajar de peso, eliminar coloradillas y garrapatas, contra hidropesía y veneno de víboras (Martínez, 1994; Argueta *et al.*, 1994 y Campos, 2006). Un de los principales usos de la corteza es como compresa sobre heridas y no se encontraron reportes en la literatura sobre el efecto de esta planta sobre el crecimiento de *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

6.1. Obtención del extracto.

Para realizar el estudio se recolectó la corteza del árbol *Bursera simaruba*, una vez limpia y molida se obtuvieron 1774.4 g de corteza, los cuales fueron macerados a temperatura ambiente con MeOH por dos semanas, de este proceso se obtuvo un rendimiento de 15.2674 g de extracto crudo.

6.2. Evaluación del extracto crudo.

Se tomo una muestra del extracto crudo y seguido de esto se realizó la siguiente prueba microbiológica para evaluar la CMI de el extracto metanólico crudo de *Bursera simaruba*.

Las bacterias empleadas en el estudio pertenecen al género *Streptococcus viridans* que representan a un grupo de 24 especies descritas, son cocos Gram positivos que se disponen en parejas o cadenas. La mayoría de las especies son aerobios/anaerobios facultativos y otras anaerobias estrictas (Arnáiz *et al.*, 2014).

Estos cocos Gram positivos son comensales de la cavidad oral, tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal y genitourinario. Son consideradas como cariogénicas primarias, ya que forman la placa dental por adhesión a la superficie dental mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares (Hernández, 1998).

Se realizó la evaluación biológica haciendo microdiluciones sucesivas, utilizando una placa de 96 pozos. La técnica de microdilución en placa se considera un método rápido y efectivo para analizar varias muestras simultáneamente, obteniendo las CMIs para las especies bacterianas estudiadas de acuerdo a Reller





y Weinstein (2009). En el Cuadro 7 se encuentran los CMI obtenidas para este ensayo a partir del extracto crudo de la corteza de *Bursera simaruba*.

Cuadro 7. Efecto de inhibitorio del extracto crudo sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.

FRACCIÓN	CMI (mg/mL) <i>S. mutans</i>	CMI (mg/mL) <i>S. oralis</i>	CMI (mg/mL) <i>S. sanguinis</i>
Extracto crudo	4.0	2.0	2.0
Digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

Las CMI obtenidas se consideran altas y su efecto inhibitorio bajo de acuerdo a los límites reportados en la literatura por Ríos y *et al.*, (1988). En esta fuente bibliográfica se considera que un extracto vegetal es activo cuando su CMI es menor a 1.0 mg/mL utilizando el método de microdilución en placa, pero tratándose de extractos vegetales crudos, se ha observado que con valores de CMI entre 2.5 y 8.0 mg/mL se ha logrado el aislamiento de compuestos antimicrobianos con buena actividad (Navarro y Delgado, 1999). Bajo este criterio se consideró que el extracto metanólico era activo con CMI en un rango de 4.0 y 2.0 mg/mL para el panel de bacterias utilizado.

6.3. Fraccionamiento primario por CCA.

Los resultados obtenidos de los ensayos preliminares permitieron seleccionar al extracto del palo mulato para realizar su estudio químico. El fraccionamiento primario utilizando una columna abierta, gel de sílice como adsorbente y como fase móvil 8:1:1 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt), incrementando la polaridad añadiendo MeOH hasta un a proporción de 8:1:1:9 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH). Este proceso permitió la obtención de 81 fracciones de 250 mL, las cuales se agruparon con base en su similitud cromatográfica, resultando en total de 7 fracciones combinadas (en el Cuadro 8 se resume el fraccionamiento primario). En las fracciones 35-69 y 70-81 precipitaron en forma espontánea





polvos de color blanco, estos se recrystalizaron, en la fracción 35-69 se encontró mayoritariamente la mezcla de α y β -amirinas (**1** y **2**). La fracción 70-81 se suspendió en diclorometano y se separó el ácido ursólico (**3**) que era insoluble del *epi*-lupeol (**4**) que se concentró en las aguas madres.

Cuadro 8. Resultados del fraccionamiento primario del extracto metanólico de la corteza del árbol *Bursera simaruba*.

Fracción agrupada	Disolvente/Proporción	Observaciones/Peso
1-9	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt/8:1:1 mL	Cristales blancos/0.0605 g
10-16	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH/8:1:1:.1 mL	Cristales blancos/0.0538 g
17-23	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH/8:1:1:.1 mL	Cristales blancos/0.0846 g
24-27	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH/8:1:1:.2 mL	Cristales blancos/0.1012 g
28-34	Hex:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt:MeOH/8:1:1:.3 mL	Cristales blancos/0.0981 g
35-69	Hex:CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH/8:1:1:.8 mL	Polvo blanco/0.3846 g
70-81	Hex:CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH/8:1:1:.9 mL	Polvo blanco/1.2177 g

6.4. Identificación de los compuestos aislados a partir de las fracciones 35-69 y 70-81.

La identificación de los compuestos aislados se realizó mediante la comparación de sus espectros de RMN (¹H y ¹³C) y sus espectros de masas. Este proceso permitió la identificación de los triterpenoides α y β -amirinas (**1** y **2**), ácido ursólico (**3**) y *epi*-lupeol (**4**). Por otra parte, se realizó un análisis por CCF, utilizando como sistema de elución 8:1:1 (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt) y como agente cromógeno vainillina sulfúrica. Este proceso permitió confirmar la presencia de los triterpenoides α y β -amirinas (**1** y **2**), ácido ursólico (**3**) y *epi*-lupeol (**4**). En la Figura 11 se ilustra la CCF para las fracciones 35-69 (A) y 70-81 (B) con los estándares auténticos de **1-4**.



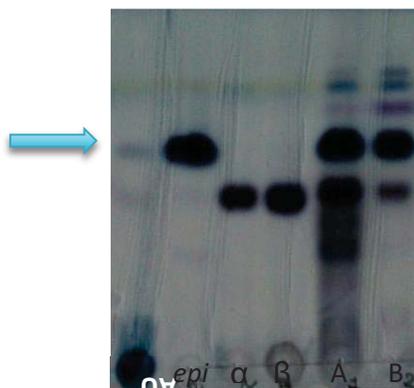


Figura 11. Cromatoplaqa comparativa utilizando los estandares de α y β -amirinas (1 y 2) ácido ursólico (3) y *epi*-lupeol (4) comparadas con las fracciones 35-69 (A) y 70-81 (B).

6.5. Actividades descritas para los triterpenoides separados.

Los triterpenoides pentacíclicos α -amirina (1) y β -amirina (2) son una mezcla de isómeros, los cuales se encuentran frecuentemente en plantas medicinales, las propiedades descritas a estos compuestos permiten explicar de manera parcial el uso de estas especies medicinales (Hernández *et al.*, 2012). En estudios previos a estos compuestos se les han determinado efectos antinociceptivos y antiinflamatorios, principalmente a través de la regulación de mediadores proinflamatorios, la reducción de la degranulación de mastocitos y trans migración de células inflamatorias (Medeiros *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2004 y Oliveira *et al.*, 2005). Otros estudios han descrito que las propiedades farmacológicas de las α y β -amirinas son debidas a su capacidad para interactuar con el sistema cannabinoide (Chicca *et al.*, 2012 y Da Silva *et al.*, 2011). Por otra parte, estos terpenos han mostrado actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* contra bacterias, hongos, virus y cáncer (Díaz-Ruiz *et al.*, 2012). Es importante destacar que en la literatura existen abundantes ejemplos de plantas medicinales que contienen amirinas, por ejemplo *Strobilanthes callosus*, que es reconocida por sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (Singh *et al.*, 2002). De igual manera sobre la modulación de la inflamación periodontal aguda mediante la reducción de la infiltración de neutrófilos, el estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias TNF- α que sugiere que podrían ser útiles como





agentes terapéuticos para el tratamiento de la gingivitis y periodontitis (Pinto *et al.*, 2008).

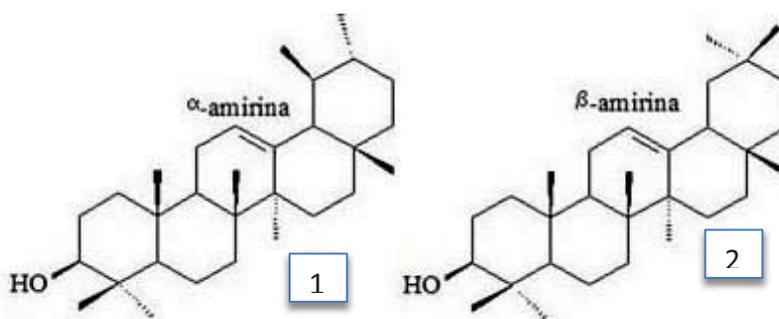


Figura 12. Estructura química de α -amirina (1) (3- α -hidroxi-urs-12-eno) y β -amirina (2) 4(3- β -hidroxi-urs-12-eno) (Duarte *et al.*, 2014).

El ácido ursólico (3) también conocido como urson, prunol, micromerol y malol (ácido (3 β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico) es un triterpenoide pentacíclico que puede encontrarse en la naturaleza en forma de aglicona o de ácido libre, ha sido aislado de numerosas especies con diversos orígenes filogenéticos formando parte fundamentalmente de la cera que recubre frutos y hojas (Muhammed y Nujoma, 1999). Entre las familias en las que ha sido reportada su presencia está la familia *Solanaceae* (Watson y Dallwitz, 1996).

Este y sus derivados han demostrado tener una variada actividad antimicrobiana, tales como la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, microorganismos Gram negativos y *Microsporium lenosum* (Zaletova *et al.*, 1986). Fue identificado como uno de los componentes activos del Romero para inhibir el crecimiento de algunas bacterias y levaduras asociadas con los alimentos (Collins y Charles, 1987). Se ha comprobado su potencial como anticancerígeno, antiinflamatorio, antiviral, además, ha sido empleado como agente emulsionante en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimentos (Wang *et al.*, 1992).



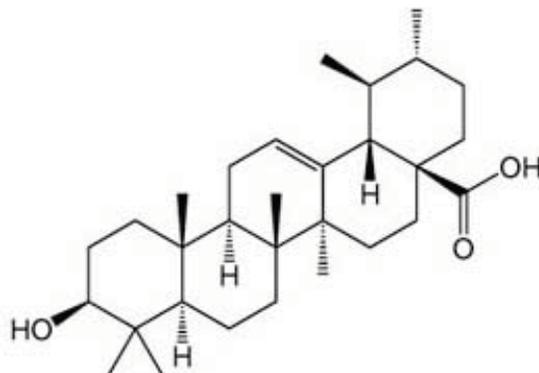


Figura 13. Estructura química del ácido ursólico (3) (Liu, 2005).

Por otra parte, el triterpenoide *epi-lupeol* (4) posee actividades antimicrobianas, antineoplásicas y antiinflamatorias (Manzano *et al.*, 2012;). Se ha documentado su presencia en el extracto metanólico del tallo de *Bursera graveolens*, que demostró una notable actividad inhibitoria contra en células humanas de fibrosarcoma HT1080 (Tsutomu *et al.*, 2005).

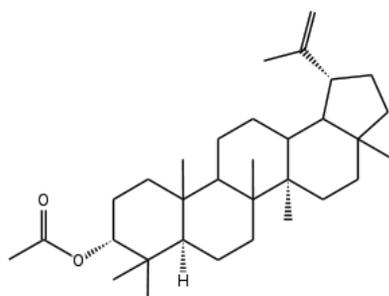


Figura 14. Estructura química del *epi-lupeol* (4) (Itoh *et al.*, 1982).

6.6. Determinación del efecto del extracto crudo sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral, prueba de difusión en agar.

El método utilizado en primer lugar fue el de difusión en agar, posteriormente se cuantificó la concentración mínima inhibitoria utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y el método de cristal violeta para evaluar el efecto inhibitorio de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

Los resultados obtenidos del ensayo de difusión en placas de agar permitieron determinar que el extracto metanólico de la corteza de palo mulato, inhibía el





crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* a una concentración de 2.0 mg/mL con halos de inhibición en un rango de 0.5 a 2.5 mm. Los halos de inhibición obtenidos del extracto (2.0 mg/mL) fueron comparables a los determinados para el control positivo de digluconato de clorhexidina (0.12%). En el Cuadro 9 se indican los diámetros obtenidos para cada bacteria.

Cuadro 9: Resultados obtenidos para cada bacteria probada, de acuerdo a sus halos de inhibición en mm.

BACTERIA/MUESTRA	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
<i>S. mutans</i>	0.5 mm
<i>S. oralis</i>	2.5 mm
<i>S. sanguinis</i>	1.0 mm
Digluconato de clorhexidina	2 mm

El digluconato de clorhexidina presenta una menor CMI. Este compuesto es un agente antimicrobiano tópico que se utiliza en los enjuagues bucales recomendados para el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal (Ercan *et al.*, 2004). El espectro antibacteriano de la clorhexidina es amplio y tiene actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus como el VIH y hongos. Su mecanismo de acción es desestabilizar y penetrar las membranas de las células bacterianas, precipita el citoplasma y interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular (Polanco *et al.*, 2011).

Se sabe que los enjuagues orales de clorhexidina pueden ocasionar decoloración de los dientes y tinción del dorso de la lengua, de los empastes, o de otros integrantes de la boca. La coloración puede observarse a partir de la primera semana del tratamiento, después de seis meses de tratamiento regular con clorhexidina, aproximadamente el 50% de los pacientes muestran una apreciable coloración de la superficie de los dientes, siendo esta más pronunciadas en los pacientes con mayor cantidad de placa, de igual manera los pacientes pueden





experimentar alteraciones del gusto, parotiditis (inflamación de las glándulas salivares con obstrucción del conducto parótido) sobre todo en niños de diez a dieciocho años tratados con este, se han descrito casos de irritación de la lengua (Vademécum, 2003 y Zamany *et al.*, 2003).

Debido a estos efectos adversos la búsqueda de compuestos naturales activos es necesario, para sustituir el uso de enjuagues hechos a base de digluconato de clorhexidina, el extracto metanólico de palo mulato presenta halos de inhibición para las bacterias de prueba, por lo que podría llegar a ser utilizado para dicho fin.

6.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones obtenidas.

Se evaluarán todas las fracciones obtenidas en el fraccionamiento primario por CCA, las fracciones agrupadas 1-9, 10-16, 17-23 y 24-27 presentarán un CMI mayor a 2.0 mg/mL aunado a que tenían muy bajo rendimiento, por lo cual no se siguió con su investigación. Se seleccionaron las fracciones 35-69 y 70-81 ya que poseen la presencia de triterpenoides α y β -amirina (**1** y **2**), ácido ursólico (**3**) y *epi*-lupeol (**4**). Se realizó el ensayo biológico haciendo microdiluciones sucesivas, utilizando una placa de 96 pozos para cuantificar la CMI, utilizando las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* obteniendo los resultados contenidos en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Efecto inhibitorio de las fracciones 35-69 y 70-81 de la CCA primaria, sobre el crecimiento de las bacterias: *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

FRACCIÓN	CMI (mg/mL) <i>S. mutans</i>	CMI (mg/mL) <i>S. oralis</i>	CMI (mg/mL) <i>S. sanguinis</i>
35-69	2.0	2.0	2.0
70-81	2.0	2.0	2.0
Digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

Es importante mencionar que los CMIs son mayores a los obtenidos para el control positivo (CHx) y para los reportados en la literatura tratándose de





extractos vegetales, se ha observado que con valores de CMI entre 2.5 y 8.0 mg/mL se han provocado el aislamiento de compuestos antimicrobianos fuertes (Navarro y Delgado, 1999). Por consiguiente se encuentran dentro del rango para ser considerados extractos vegetales activos.

Por otra parte, Díaz-Ruiz y colaboradores (2012) reportan la actividad de α y β -amirinas sobre el crecimiento de las bacterias *S. salivarius*, *S. Sanguinis*, *S. oralis* y *S. mutans*, en este ensayo los triterpenos y sus esteres sintetizados fueron aislados del copal y la corteza del nanche, en los que la actividad biológica estaba relacionada con la concentración de los tres terpenos utilizados para los experimentos. En general, α -amirina fenilacetato fue el más activo, especialmente en concentraciones más altas, excepto contra *S. sanguinis*, para lo cual α -amirina es ligeramente más activa en todas las concentraciones probadas. Para *S. oralis*, la actividad de inhibición de α -amirina fenilacetato fue excepcional en todas las concentraciones, mostrando un máximo de crecimiento del 3% en la concentración más baja (10 μ g/mL). El alto efecto bacteriostático mostrado por α -amirina fenilacetato contra los microorganismos responsables de la caries dental en una concentración inicial de bacterias de 1×10^6 UFC/mL indico su actividad en una concentración de bacterias inferior (1×10^3 UFC/mL) con las mismas concentraciones de fenilacetato como antes, esto se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 11. Efecto de Triterpenos en el porcentaje de viabilidad sobre las bacterias estudiadas (Díaz-Ruiz *et al*, 2012).

Compuesto	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. oralis</i>
α -amirina	68-56%	56-20%	95-47%
β -amirina	68-57%	90-63%	100-46%
α -amirina fenilacetato	86-12%	83-48%	3-1%

En cuanto a *S. mutans* la viabilidad celular fue similar para todas las concentraciones (alrededor del 60%), con excepción de las 1.0 μ g/mL, donde la viabilidad fue del 33%, lo cual se muestra en el Cuadro 11, indicando la capacidad de los terpenoides sobre *S. mutans*





Cuadro 11. Porcentaje de viabilidad de *Streptococcus mutans* después de 24 h de exposición a los 3 terpenos mencionados, en una concentración celular inicial ajustada a 10^6 UFC/mL (Díaz-Ruiz *et al*, 2012).

Concentración de terpenos ($\mu\text{g/mL}$)					
Compuesto	10	53.33	100	533.33	1000
α -amirina	62	46	25	25	16
β -amirina	72	61	58	46	37
α -amirina fenilacetato	19	16	12	12	9

6.8. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por *Streptococcus mutans*.

Streptococcus mutans forma parte de la placa bacteriana y es capaz de producir ácido láctico y propiónico, los que actúan desmineralizando y desestructurando la superficie externa del esmalte (Hernández, 1998). De igual manera tiene la capacidad de producir mutano, su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la placa dental, dándole el poder cariogénico a este (Duque *et al.*, 2006). La formación de biofilms bacterianos es decisiva para la aparición de enfermedades de la cavidad oral como lo son las caries (Nishimura *et al.*, 2012).

Para realizar el estudio se empleó a *S. mutans* debido a lo ya mencionado, siendo la bacteria con mayor capacidad para formar biofilms del género *Streptococcus* (Jaykus *et al.*, 2009). Además, esta bacteria tiene como característica principal la producción de exopolisacáridos que contribuyen a la adherencia y a la evasión de la respuesta inmune (Abranches *et al.*, 2009).

En este estudio, se evaluó el efecto sobre la formación del biofilm del ácido ursólico (3). En primer lugar se procedió a estandarizar el ensayo, lo cual consistió en evaluar que medio de cultivo era más conveniente para inducir la formación del biofilm por *S. mutans*. Este proceso se realizó ya que en la literatura, existe cierta controversia, ya que algunos autores proponen el empleo de MEM





(Medio Esencial Minimo) que es un medio utilizado para el cultivo de células y otros sugieren el empleo de BHI (Infusión Cerebro Corazón). Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio indican que existe una diferencia en la formación del biofilm utilizando los medios de cultivo antes mencionados, debido a que el *S. mutans* no formó biofilm cuando se utilizó el medio D-MEM. Las densidades ópticas obtenidas fueron de 0.010 a las 24 horas. Por otra parte, cuando se utilizó el medio de cultivo BHI se obtuvo una buena formación del biofilm con lecturas de D.O. de 0.530 a las 24 horas. Por último, se evaluó el tiempo óptimo en la expresión de biofilms a tres tiempos de incubación (6, 12 y 24 h). El tiempo idóneo para la formación de biofilms fué a las 24 horas con el medio BHI.

El ensayo de inhibición de formación del biofilm se realizó por duplicado en dos ensayos independientes, para el tratamiento estadístico se decidió eliminar el valor más alto y el más bajo con el propósito de dar mayor consistencia a los resultados. Para definir el porcentaje de inhibición de la formación del biofilm, se considero como un 100% (formación de biofilm) la lectura en D.O. mostrada por el control sin tratamiento. Los resultados obtenidos indicaron que el ácido ursólico (3) a una concentración de 2 mg/mL inhibió en un 49% la formación del biofilm.

En la literatura esta reportada la actividad antibacteriana del ácido ursólico (3) contra *Staphylococcus aureus* (CMI= 8.0 µg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI= 4.0 µg/mL), pero es inactivo contra cepas resistentes a antibióticos como *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus sp.* resistente a vancomicina (Fontay *et al.*, 2008). En otro estudio se encontraron CMI de 62.5, 47, 259 y 4 µg/mL contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente (Shai *et al.*, 2008). Otra actividad relevante que se le ha demostrado, es su efecto contra diversas cepas de *M. tuberculosis*. Se sabe que la pureza de los compuestos tiene una relación directamente proporcional respecto a su actividad biológica; sin embargo, para el caso de la actividad antimicobacteriana *in vitro* del ácido ursólico se ha encontrado que cuando tiene gran pureza (98.6%) presenta una CMI superior a la que presenta con pureza de





69.6%, los valores de CMI son $>256 \mu\text{g/mL}$ y $65 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Jaki *et al.*, 2008).

El principio de la formación del biofilm se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el mecanismo conocido como quórum sensing (QS). Las bacterias mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde permanecen y conviven. Los mecanismos de comunicación, le permiten reconocer cuando se alcanza el umbral o nivel de presencia, para desarrollar nuevas funciones, especialmente un comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento, útil para las tareas que adquieren en el mecanismo de QS (Nowak *et al.*, 2009). Esta capacidad denominada detección de quórum sensing, la desarrollan a través de la secreción y detección de las moléculas autoinducidas que se acumulan en un espacio dependiente de la densidad poblacional y del espacio de convivencia (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2009). Cuando las concentraciones de la molécula autoinducida o molécula señal, llegan a una determinada concentración, se activa un mecanismo de detección de quórum al cual responden las células, lo que permite a las bacterias, modular sus comportamientos, incrementar la eficacia y adecuación para el medio ambiente logrando una serie de beneficios que dependen de la presencia o ausencia de otras células o de ellas mismas (Williams *et al.*, 2009).

Las características de esa comunidad en condiciones de QS, desarrollan el control de detección de comunidad en la superficie, incluyendo la posibilidad de lograr la fijación a los sustratos, la producción de polímeros extracelulares, la síntesis de biosurfactante, la esporulación, la competencia, la bioluminiscencia, la secreción de nutrientes, la síntesis de compuestos y la producción de factores de virulencia (Duan *et al.*, 2009). Posiblemente el mecanismo de acción de estos triterpenoides es rompiendo el proceso de señalización de otras bacterias que convivan en el mismo ambiente, lo cual puede ser explotado para interrumpir actividades reguladas por *quórum sensing* como la patogenicidad (Teplitski *et al.*, 2000).





7. CONCLUSION.

La investigación realizada representa una contribución al conocimiento de las propiedades biológicas de *Bursera simaruba*, un árbol de amplio uso en la medicina tradicional mexicana.

Los resultados obtenidos en el ensayo de difusión en placas de agar, permitieron determinar que el extracto metanólico de la corteza del palo mulato inhibe el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* a una concentración de 2.0 mg/mL con halos de inhibición en un rango de 0.5 a 2.5 mm.

El estudio fitoquímico del extracto de la corteza del palo mulato permitió el aislamiento de los de triterpenoides conocidos α y β -amirinas (**1** y **2**), ácido ursólico (**3**) y *epi*-lupeol (**4**) y un precipitado inorgánico que se encuentra en proceso de caracterización.

Los triterpenoides α y β -amirinas (**1** y **2**), ácido ursólico (**3**) y el *epi*-lupeol (**4**) presentaron un efecto débil sobre el crecimiento del panel de las bacterias utilizado con CMI de 2.0 mg/mL para cada una de ellas.

Por otro lado, el triterpenoide ácido ursólico inhibió la formación del biofilm por *S. mutans* en un 49% a una concentración de 2 mg/mL.





8. PERSPECTIVAS.

- ✚ Preparar derivados de los compuestos obtenidos con la finalidad de mejorar su actividad antibacteriana.
- ✚ Determinar las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para el extracto y los compuestos aislados.
- ✚ Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y realizar fracciones secundarias, con la finalidad de aislar los compuestos que estén presentes, y posteriormente determinar su actividad biológica.
- ✚ Seguir con el proceso de caracterización del compuesto inorgánico obtenido.





9 . BIBLIOGRAFÍA.

- ◆ Aas JA.; Paster BJ.; Stokes LN. (2005). *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol; 43 (11): pp. 5721–5732.
- ◆ Abranches J.; Zeng L.; Bélanger M.; Rodrigues P.; Simpson J.; Progulske A.; Bume R. (2009). *Invasion of human coronary artery endotelial cells by Streptococcus mutans OMZ175*. Oral Immunol, 24: pp.141-145.
- ◆ Afanador Llach MJ. (2012). *Nombrar y dibujar la naturaleza del Nuevo Mundo: Códice Badiano*. Algarabía (97): pp. 87–91.
- ◆ Amores R.; Calvo A.; Maestre JR.; y Martínez HD. (2004). *Probióticos*. Revista Española de Quimioterapia, 17(2): pp.131-139.
- ◆ Andrés Hernández AR.; y Espinosa Organista D. (2002). *Morfología de plántulas de Bursera Jacq. ex L. (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas*. Bol. Soc. Bot. Méx. 70: pp. 5-12.
- ◆ Aracil B.; Miñanbres M.; Oteo J.; Torres C.; Gómez-Garces JL.; Alos JI. (2002). *High prevalence of erythromycin resistant and clindamycin susceptible (M phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of mef genes in commensal bacteria*. J Antimicrob Chemother; 48: pp. 587-595.
- ◆ Argueta V.; Cano A.; Rodarte ME. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo I (1-583). México D.F. Instituto Nacional Indigenista, 1100: pp. 772-1099.
- ◆ Arnáiz García AM.; Salas Venero C.; y Negueruela García B. (2014). *Infecciones por Streptococcus*. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Microbiología. Unidad de Hospitalización Domiciliaria. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. Cantabria, España Medicine; 11(59): pp. 3463-3476.
- ◆ Baena MT.; Moreno MMV.; Franco MF.; Adalpe BB.; Quindos G.; Sanches VLO. (2005). *Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus*





mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. Med. Oral Patol; 10 (1): pp. 27-39.

- ◆ Bascones A.; Aguirre JM.; Bermejo A.; Gay-Escoda C.; González-Moles MA. (2004). *Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 9: pp. 363-376 .
- ◆ Bascones A.; Manso FJ. (1994). *Tratamiento de las infecciones orofaciales de origen bacteriano*. Infecciones orofaciales. Diagnóstico y tratamiento. Madrid: Avances Médico-Dentales: pp. 89-116.
- ◆ Bascones Martínez A. (1998). *Etiopatogenia de la enfermedad periodontal*. En: Tratado de Odontología. T3. Madrid: Trigo Ediciones: pp. 3319-3330.
- ◆ Becerra JX. (2003) *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: pp. 300–309.
- ◆ Becerra JX. (2005). *Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest*. Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721. Edited by José Sarukhaán, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico.
- ◆ Branda SS.; Vik S.; Friedman L.; Kolter R. (2005). *Biofilms: the matrix revisited*. Trends Microbiol; 13: pp. 20-26.
- ◆ Brescó Salinas M.; Costa Riu N.; Berini-Aytés L.; Gay Escoda C. (2006). *Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 11: pp. 70-75.
- ◆ Campos Soto LM. (2006). *Estudio fitoquímico de la resina de Bursera simaruba (palo mulato)*. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Querétaro.
- ◆ Carretero ME.; Lopez Perez JL.; Abad MJ.; Bermejo P.; Tillet S.; Israel A.; Noguera PB. (2010). *Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from Bursera simaruba (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves*. Med.
- ◆ Castro Méndez I. (2006). *Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria*.





Editorial. Rev Cubana Plant Med; 11 (2).

- ◆ Chavelas PJ.; y Devall MS. (1998). *Bursera simarouba*. Sarg. In: *Useful tress of the tropical region of North America*. North American Forestry Commission. No. 3: pp. 31-40.
- ◆ Chicca A.; Marazzi J.; Gertsch J. (2012). *The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors*. British Journal of Pharmacology, 167: pp. 1596–1608.
- ◆ Choi EJ.; Lee SH.; Kim YJ. (2009). *Quantitative real-time polymerase chain reaction for Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples and its association with early childhood caries*. Int J Paediatr Dent, 19: pp. 141–147.
- ◆ Cianco SG. (2000). *Antiseptics and antibiotics as chemotherapeutic agents for periodontitis management*. Compend Contin Educ Dent; 21: pp. 59-62.
- ◆ Cid María del Carmen M.; Morales JM. (2008). *Ingestión de azúcares en niños menores de 1 año*. Revista Médica Electrónica. 28 (1): pp. 113-116.
- ◆ Collins MA.; y Charles HP. (1987). *Antimicrobial activity of camosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of Rosmarinus ofcinalis*. Food Microbiology 4: pp. 311-315.
- ◆ CONABIO. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México*. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.
- ◆ Costerton JW.; Stewart PS. (2000). *Biofilms and device-related infections*. Persitent Bacterial Infections. Washintong: American Society of Microbiology: pp. 423-439.
- ◆ Cucarella C.; Solano C.; Valle J.; Amorena B.; Lasa I.; Penades JR. (2001). *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation*. J Bacteriol; 183: pp. 2888-2896.
- ◆ Cowan CP. (1983). *Flora de Tabasco*. Listados Floríst. México 1: pp. 1–123.





- ◆ Da Silva KA.; Paszcuk AF.; Passos GF.; Silva ES.; Bento AF.; Meotti FC.; Calixto JB. (2011). *Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice*. Pain, 152: pp. 1872–1887.
- ◆ De Vicente-Rodríguez JC. (2004). *Celulitis maxilofaciales*. Med Oral Patol Oral Sir Bucal; 9 Suppl: S126-S138.
- ◆ Díaz-Ruiz Gloria.; Hernández Vázquez Liliana.; Luna Héctor.; Wachter Rodarte María del Carmen.; Navarro Ocaña Arturo. (2012). *Growth Inhibition of Streptococcus from the Oral Cavity by α -Amyrin Esters*. Molecules; Vol. 17 Issue 11: p. 12603.
- ◆ Duan K.; Sibley CD.; Davidson CJ.; Surette MG. (2009). *Chemical interactions between organisms in microbial communities*. Contrib Microbiol: 16: pp. 1-17.
- ◆ Duarte BHS.; Cascaes MM.; Guilhon GMSP.; Andrade HHA.; Zoghbi MGB. (2014). *Triterpenos e fenólicos das folhas. De Myrcia rufipila (Myrtaceae)*. Produtos Naturais; ISBN 978-85-85905-10-1.
- ◆ Duque de Estrada J.; Pérez JA.; Hidalgo I. (2006). *Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar*. Rev. Cub. Estomatología. 43 (1), Jan-Mar.
- ◆ Ercan E.; Ozekinci T.; Atakul F.; Gul K. (2004). *Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study*. J Endod: 30: pp. 84-87.
- ◆ Fontay S.; Grare, M.; Mayer J.; Finance C.; Duval R. (2008). *Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectives indexes*. J Ethnopharmacol: pp. 272-276.
- ◆ Gabriel Hernández Marcos. (1998). *Cuide su boca*. Editorial Everest, S.A. Impreso en España.
- ◆ Gay-Escoda C.; Berini Aytés L. (2004). *Tratado de Cirugía Bucal*. Tomo I. Madrid: Ergon.





- ◆ Hernández JE.; Boland J.; Rosencrance G.; Albarracin C. (1998). *Bacteremia due to Streptococcus zooepidemicus associated with an abdominal aortic aneurysm*. W. V. Med. J. 94: pp. 90-92
- ◆ Hernández Vázquez L.; Palazon J.; Navarro Ocaña A. (2012). *The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A review of sources and Biological Activities*. In *Phytochemicals, A Global Perspective of the Role in Nutrition and Health*; Venketeshwer, R., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia: pp. 487–501.
- ◆ Herrera D.; Van Winkelhoff AJ.; Dellelijm-Kippuw N.; Winkel EG.; Sanz M. (2000). *Betalactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and the Netherlands*. J Clin Periodontol; 27: pp. 520-525.
- ◆ Hidalgo I.; Duque de Estrada J.; Pérez JA. (2007). *La caries dental. Algunos de los factores relacionados con su formación en niños*. Rev. Cub. Estomatología.; 23 (3): pp. 56-61.
- ◆ Hospital General de México, "Eduardo Liceaga". *Guías diagnósticas de estomatología*. (2012). Consultado el día 5 de septiembre del 2014. [http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/estomato/1cariesdental.pdf].
- ◆ Hwang K.; y Rukayadi Y. (2006). *In vitro activity of xanthorrhizol against Streptococcus mutans biofilms*. Letters in Applied Microbiology, 42: pp. 400-404.
- ◆ Itoh T.; Tani H.; Fukushima K.; Tamura T.; Matsumoto T. (1982). *Structure-Retention Relationship of Sterols and Triterpene Alcohols in Gas Chromatography on a Glass Capillary Column*; 234, 1: pp. 65-76.
- ◆ Jaki BU.; Franzblau SG.; Chadwick LR.; Lankin DC.; Zhang F.; Wang Y.; Pauli GF. (2008). *Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid*. J Nat Prod; 71: pp. 1742-1748.





-
- ◆ Jaykus LA.; Wang HH.; Schlesinge LS. (2009). *Food-borne microbes: shaping the host ecosystem*. American Society of Microbiology-Press. Washington, USA: p. 124.
 - ◆ Jawetz E.; Melnick J.; Adelberg E. (2009). *Microbiología Médica*. 14 ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno: p. 145.
 - ◆ Jerzy Rzedowski.; Medina Lemus R.; Calderón de Rzedowski G. (2004). *Las especies de Bursera (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México)*. Acta Botanica Mexicana, 66: pp. 23-151.
 - ◆ Johnson CC.; y Tunkel AR. (2005). *Viridans streptococci, groups C and G streptococci, and Gemella morbillorum*. Principles and practice of infectious diseases, 6th ed. Churchill Livingstone, Inc., Philadelphia: pp. 2434-2451.
 - ◆ Jorgensen MG.; Slots J. (2000). *Practical antimicrobial periodontal therapy*. Compend Contin Educ Dent; 21: pp. 111-116.
 - ◆ Khemalelakul S.; Baumgartner JC.; Pruksaorn S. (2002). *Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 94: pp. 746-755.
 - ◆ Kuriyama T.; Karasawa T.; Nakagawa K. (2000). *Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 90: pp. 600-608.
 - ◆ Leyva M.; Martínez JR.; Stashenko E. (2007). *Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de Bursera graveolens (Burseraceae) de Colombia*. J Sci Tech; 131 (33): pp. 201-223.
 - ◆ Liñares J.; Martín-Herrero JE. (2003). *Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplantarias*. Av Periodon Implantol; 15,3: pp. 139-147.
 - ◆ Liu, J. (2005). *Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives*. J. Ethnopharmacol: pp. 100-192.





- ◆ Loesche WJ. (1997). *Association of the oral flora with important medical diseases*. Curr Opin Periodontol; 4: pp. 21-28.
- ◆ Machuca M.; Espejo J.; Gutiérrez L.; Herrera J. (2000). *Análisis de la prescripción antibiótica en una farmacia comunitaria*. Pharm Care Esp; 2: pp. 411-419.
- ◆ Maestre JR.; Bascones A.; Sánchez P. (2007). *Enfermedad periodontal, odontopatógenos y perfil de resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados como tratamiento o profilaxis en odontología en España*. Rev Esp Quimioterap; 20 (1): pp. 61-67.
- ◆ Maestre JR. (2004). *Opciones terapéuticas en la infección de origen odontogénico*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 9 Suppl: S19-S31.
- ◆ Manzano S.; Bailey B.; Girodias JB. (2012). *Impact of procalcitonin on the management of children aged 1 to 36 months presenting with fever without source: a randomized controlled trial*. Am J Emerg Med. Jul; 28 (6): pp. 647–653.
- ◆ Marsh PD.; Martin MV. (2009). *Oral microbiology*. 5th edition. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone.
- ◆ Marsh PD. (2000). *Role of the oral microflora in health*. Microb Ecol Health Dis; 12: pp. 130–137.
- ◆ Martínez M. (1994). *Regeneración natural y diversidad de especies arbóreas en selvas húmedas*. Boletín de la Sociedad Botánica de México; 54: pp. 179-224.
- ◆ Medeiros R.; Otuki MF.; Avellar MC.; Calixto JB. (2007). *Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. European Journal of Pharmacology: pp. 227–235.
- ◆ Mendoza Patiño N.; y Figueroa-Hernández JL. (2006). *Herbolaria*. Rev Fac Med UNAM 48(6): pp. 248-249.





- ◆ Monteoliva Ml.; Carbajal A. (2014). *Chechén y Chaca*. Blog Conociendo Yucatán. Consultada el día 15 de febrero del 2015. [<http://conociendoyucatan.jimdo.com/2014/12/28/chechén-y-chacá/>].
- ◆ Moslehi-Jenabian S.; Gori K.; Jespersen L. (2009). *AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of Lactobacillus spp.* Int J Food Microbiol; 15; 135 (3): pp. 295-302.
- ◆ Mohebbi SZ.; Virtanen JI.; Murtomaa HM.; Vahid Golpayegani MM. (2008). *Vehkalahti Mothers as facilitators of oral hygiene in early childhood.* Int J Paediatr Dent, 18: pp. 48–55.
- ◆ Muhammed M.; y Nujoma Y. (1999). *Ursolic acid, its importance in skin & hair beautification and protection.* Sabinsa Corporation.
- ◆ Muñeton Pérez Patricia. (2009). *Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo.* Revista Digital Universitaria. 10 de septiembre, vol. 10, No. 9. Consultado: 14 de febrero del 2015. [<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>].
- ◆ Navarro V.; Delgado G. (1999). *Two antimicrobial alkaloids from Bocconia arborea.* Journal of Ethnopharmacology, 66 (2): pp. 223-226.
- ◆ Nishimura J.; Jaito T.; Yoneyama. H.; Bai L.; Okumura K.; Isogai E. (2012). *Biofilm Formation by Streptococcus mutans and Related Bacteria.* Advances in Microbiology, 2: pp. 208-215.
- ◆ Nolte William A. (2001). *Microbiología Odontológica.* Editorial Interamericana, cuarta edición: pp. 206-641.
- ◆ Nowak M; Kurnatowski P. (2009). *Biofilm caused by fungistructure, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs.* Wiad Parazytol; 55 (1): pp.19-25.
- ◆ Núñez Núñez Angélica Ma. (2012). *Guía de prevención de enfermedades periodontales.* México. Consultado el día 13 de Enero del





2015. [<http://www.implantesperiodoncia.com.mx/prevencion-de-las-enfermedades-periodontales>].

- ◆ Ocegueda S.; Moreno E.; y Koleff P. (2005). *Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica*. CONABIO. Biodiversitas 62: pp.12-15.
- ◆ Offenbacher S.; Beck J. (1998). *Periodontitis: A potential risk factor for spontaneous preterm birth*. Compend Contin Educ Dent; 19: pp. 32-39.
- ◆ Oliveira FA.; Lima Junior RC.; Cordeiro WM.; Vieira Junior GM.; Chaves MH.; Almeida FR.; Silva RM; Santos VS. (2004). *Rao Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus* *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78: pp. 719–725.
- ◆ Oliveira FA.; Chaves MH.; Almeida FR.; Lima RC.; Silva RM.; Maia JL.; Brito GA.; Santos VS. (2005). *Rao Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice*. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: pp. 103–108.
- ◆ Organización Mundial de la Salud. (2001–2010). *Promoting the Role of Traditional Medicine in Health Systems: a Strategy for the African Region* Harare, Organización Mundial de la Salud, 2000 (documento de referencia AFR/RC50/Doc.9/R).
- ◆ Osterling WL.; y Barnhorst AV. (1995). *Distribution of Bursera simaruba over three habitats of varying moisture availability*. *Dartmouth studies in tropical ecology*: pp. 25-26.
- ◆ Peña Sisto M.; Peña Sisto L.; Díaz Felizola Á.; Torres Keiruz D.; La O Salas N. (2008). *La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas*. *Rev Cub Estoma tol*.
- ◆ Peraza S.; Peña L. (1992). *Isolation of picropolygamain from the resin of Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*. Vol. 55: pp. 1768-1771.





-
- ◆ Peraza S.; Salazar N.; Peña L. (1995). *A new triterpene from the resin of Bursera simaruba*. Journal of Natural Products. Vol. 58: pp. 271-274.
 - ◆ Pihlstrom BL.; Michalowicz BS.; Johnson NW. (2005). *Periodontal diseases*. Lancet 366: pp.1809–1820.
 - ◆ Pinto HSA.; Pinto LMS.; Cunha GMA.; Chaves MH.; Santos FA.; Rao VS. (2008). *Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a pentacyclic triterpene from Protium heptaphyllum in rat model of acute periodontitis*. Inflammopharmacology, 16: pp. 48–52.
 - ◆ Polanco Castillo J.; Villalobos Huerta MA.; Mercado Hernández BM.; Peña Jiménez CM.; Baños Galeana CO. (2011). *Capítulo 4: Asepsia y antisepsia*. Introducción a la cirugía. México: McGraw-Hill. ISBN 978-607-02-2469-0: pp. 49–60
 - ◆ Poveda-Roda R.; Bagan JV.; Sanchis Bielsa JM.; Carbonell Pastor E. (2007). *Antibiotic use in dental practice: A review*. Medicina Oral Patología Oral, Cirujía Bucal; 12:1: pp. 86-92.
 - ◆ Prieto J.; Martín-Herrero JE.; García-Rey C. (2002). *Relación entre consumo de antibióticos y selección de resistencia en el género Streptococcus*. Medicina Preventiva; 8: pp. 23-30.
 - ◆ Qin M.; Li J.; Zhang S.; Ma W. (2008). *Risk factors for severe early childhood caries in children younger than 4 years old in Beijing, China*. Pediatr Dent, 30: pp. 122–128.
 - ◆ Ríos JL.; Recio MC.; Villar A. (1988). *Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literatura*. Journal of Ethnopharmacology, 23: pp. 127-149.
 - ◆ Reller L.; y Weinstein M. (2009). *Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices*. CID, 49: pp.1749-1755.
 - ◆ Rodríguez C. (2011). *Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol*. (Tesis de Licenciatura), Facultad de Química, UNAM.





-
- ◆ Ruoff KL.; Whiley RA.; y Beighton D. (2003). *Streptococcus*. In P. (ed.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C: pp. 405-421.
 - ◆ Russell AD.; Day MJ. (1993). *Antibacterial activity of chlorhexidine*. J Hosp Infect; Dec 25; 4: pp. 229-238.
 - ◆ Rzedowski J.; y Kruse H. (1979). *Algunas tendencias evolutivas en Bursera (Burseraceae)*. Taxon 28: pp.103-116.
 - ◆ Savage A.; Eaton KA.; Moles DR.; Needleman AP. (2009). *Asystematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease*. J Clin Periodontol; 36(6): pp. 458-467.
 - ◆ Scannapieco FA. (1994). *Saliva-bacterium interaction in oral microbial ecology*. Crit Rev Oral Biol Med; 5: pp. 203-248.
 - ◆ Shai LJ.; McGaw LJ.; Aderogba MA.; Mdee LK.; Eloff JN. (2008). *Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from Curtisia dentata (Burm.f) C.A. Sm. leaves*. J Ethnopharmacol; 119: pp. 238-244.
 - ◆ Singh B.; Sahu PM.; Sharma MK. (2002). *Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from Strobilantes callosus Ness*. Phytomedicine, 9: pp. 355–359.
 - ◆ Slots J.; Jorgensen MG. (2000). *Efficient antimicrobial treatment in periodontal maintenance care*. J Am Dent Assoc; 131: pp.1293-1304.
 - ◆ Stoodley P.; Sauer K.; Davies DG.; Costerton JW. (2002). *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol; 56: pp. 187-209.
 - ◆ Sutherland I. (2001). *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology; 147: pp. 3-9.
 - ◆ Tang C.; Quinonez RB.; Hallett K.; Lee JY. (2005). *Whitt Examining the association between parenting stress and the development of early childhood caries* . Community Dent Oral Epidemiol, 33: pp. 454–460.





-
- ◆ Téllez EF.; Cabrera Cano E.; Linares y Bye R. (1989). *Las plantas de Cozumel. Guía botánico-turística de la Isla Cozumel, Quintana Roo*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ◆ Teplitski M.; Robinson JB.; y Bauer WD. (2000). *Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: pp. 637-648.
 - ◆ Toledo-Arana A.; Valle J.; Solano C.; Arrizubieta MJ.; Cucarella J.; Lamata M. (2001). *The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation*. *Appl Environ Microbiol*; 67: pp. 4538-4545.
 - ◆ Toole G.; Kaplan HB.; Kolter R. (2000). *Biofilm formation as microbial development*. *Annu Rev Microbiol*; 54: pp. 49-79.
 - ◆ Tsutomu Nakanishi.; Yuka Inatomi.; Hiroko Murata.; Kaori Shigeta.; Naoki Iida.; Akira Inada.; Jin Murata.; Miguel Angel Perez Farrera.; Munekazu Iinuma.; Toshiyuki Tanaka.; Shogo Tajima.; Naoto Oku. (2005). *A New and Known Cytotoxic Aryltetralin-Type Lignans from Stems of Bursera graveolens*. *Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 53: pp. 229-231.
 - ◆ Vademécum Internacional Medicom. (2003). *Medimedia-Medicom*, S.A. Madrid.
 - ◆ Walker CB. (2000). *The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal pathogens*. *Periodontol* 2000; 10: pp. 79-88.
 - ◆ Wang B.; y Jiang ZH. (1992). *Studies on oleanolic acid*. *Chinese Pharmaceutical Journal* 27: pp. 393-397.
 - ◆ Watson L.; y Dallwitz MJ. (1996). *The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*.
 - ◆ Wilson M. (2005). *Microbial inhabitants of humans. Their ecology and role in health and disease*. Cambridge (UK): Cambridge University Press.





-
- ◆ Wilson M. (2008). *Bacteriology of Humans. An Ecological Perspective*. Blackwell Publishing: p. 351.
 - ◆ Williams P.; Camara M. (2009). *Quorum sensing and environmental adaptation in Pseudomonas aeruginosa: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules*. *Curr Opin Microbiol*; 12 (2): pp. 182-191.
 - ◆ Zaletova NI.; Shchavlinskii AN.; Tolkachev ON. (1986) *Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity*. *Chemical Abstracts* 106, 18867e.
 - ◆ Zamany A.; Safavi K.; Spanberg L. (2003). *The effect of clorhexidine as an endodontic disinfectant*. *Oral Radiol Endod*; 96: pp. 578-581.

