



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Determinación de la actividad antibacteriana y antiplaca de los extractos y compuestos aislados de la pulpa del fruto de *Psidium friedrichsthalianum*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
Q.F.B. PAULINA ITZEL LÓPEZ RIVERA

TUTOR: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA

CD. DE MÉXICO, MARZO 2016



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:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dra. María Alejandra Rojas Molina
Secretario:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Q.F.B. Paulina Itzel López Rivera
Sustentante

Dr. José Fausto Rivero Cruz
Tutor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas me permitió continuar y enriquecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado (No. Becario 308771).

Al Dr. J. Fausto Rivero por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación y por la revisión del escrito.

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo necesario para emitir observaciones, comentarios y correcciones al manuscrito presente.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por el apoyo técnico para la realización de los ensayos microbiológicos.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros solicitados durante el proyecto.

Orgullosamente UNAM

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

*A mi familia, que siempre me ha apoyado y acompañado
a lo largo de este camino.*

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN.....	VIII
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 BIOPELÍCULAS	1
1.1.1 <i>Definición y generalidades</i>	1
1.1.2 <i>Estructura y Composición</i>	2
1.1.3 <i>Características de las biopelículas</i>	4
1.1.4 <i>Etapas de Formación</i>	5
1.1.5 <i>Infecciones humanas asociadas a las biopelículas</i>	8
1.2 CARIES DENTAL	8
1.3 GÉNERO <i>PSIDIUM</i>	10
1.4 <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i>	11
1.4.1 <i>Sinonimia</i>	11
1.4.2 <i>Taxonomía</i>	12
1.4.3 <i>Descripción</i>	13
1.4.4 <i>Distribución geográfica</i>	15
1.4.5 <i>Usos</i>	17
1.4.6 <i>Reportes sobre P. friedrichsthalianum</i>	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	20
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	24
3.2 TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL VEGETAL	24
3.3 PROCEDIMIENTOS GENERALES DE ANÁLISIS.....	25
3.3.1 <i>Análisis cromatográficos</i>	25
3.3.2 <i>Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas</i>	26

3.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANOL-AGUA (70:30)	26
3.4.1 Fraccionamiento primario	26
3.4.2 Fraccionamiento secundario	27
3.4.3 Separación de los compuestos activos en las fracciones A2 – A4 ...	28
3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	30
3.5.1 Microorganismos de prueba	30
3.5.2 Evaluación del extracto metanol-agua (70:30) de <i>Psidium friedrichsthalianum</i> mediante la prueba de difusión en agar	30
3.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	32
3.5.4 Efecto sobre el crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> ...	34
3.5.5 Efecto sobre la producción de ácido de <i>S. mutans</i>	35
3.5.6 Evaluación de los compuestos de prueba sobre la formación de la biopelícula producida por <i>S. mutans</i>	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANOL-AGUA (70:30) DE <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> MEDIANTE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR	39
4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	40
4.3 EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	45
4.4 EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO	48
4.5 EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE PRUEBA SOBRE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA PRODUCIDA POR <i>S. MUTANS</i>	51
4.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	54
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sustancias de la matriz polimérica extracelular en diferentes dimensiones. ...	3
Figura 2. Diagrama que representa las distintas etapas de desarrollo de una biopelícula desde la fase de adherencia inicial y la maduración gradual, hasta la biopelícula completamente desarrollada	7
Figura 3. Colonización bacteriana en la formación de una biopelícula	10
Figura 4. Árbol de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	13
Figura 5. Hojas de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	14
Figura 5. Flores de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	14
Figura 7. Fruto de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	15
Figura 8. Distribución de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	16
Figura 9. Localización y distribución climática en Tabasco.....	24
Figura 10. Fruto desecado de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	25
Figura 11. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	29
Figura 12. Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano. ...	33
Figura 13. Prueba de difusión en agar para el extracto metanol-agua (70:30)	39

Figura 14. Efecto del disolvente (DMSO) sobre el crecimiento de *S. mutans* 46

Figura 15. Efecto de diferentes compuestos sobre el crecimiento de *S. mutans*..... 47

Figura 16. Efecto de los compuestos y extractos estudiados sobre la producción de ácido de *Streptococcus mutans* en un medio sin glucosa 49

Figura 17. Efecto de los compuestos y extractos estudiados sobre la producción de ácido de *Streptococcus mutans* en un medio enriquecido con glucosa 50

Figura 18. Efecto sobre la formación de la biopelícula por *S. mutans* utilizando el ensayo de cristal violeta. 52

Figura 19. Espectro RMN-¹H del ácido gálico (1), DMSO-*d*₆, 400MHz..... 55

Figura 20. Espectro RMN-¹H del ácido elágico (2), DMSO-*d*₆, 400MHz..... **¡Error!**

Marcador no definido.

Figura 21. Espectro RMN-¹H de la quercetina (3), DMSO-*d*₆, 400MHz**¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Sinónimos y nombres vernáculos de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	11
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	12
Cuadro 3. Fraccionamiento primario.....	27
Cuadro 4. Controles para el ensayo biológico	34
Cuadro 5. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) del extracto metanol-agua (70:30) de <i>P. friedrichsthalianum</i>	41
Cuadro 6. Determinación de la CMI (mg/mL) de las fracciones primarias.....	42
Cuadro 7. Determinación de la CMI (mg/mL) de las fracciones secundarias	43
Cuadro 8. Determinación de la CMI (mg/mL) de los compuestos aislados	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHI	Infusión cerebro corazón (<i>Brain-heart infusion</i>)
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHX	Digluconato de clorhexidina
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
d	Doble
dd	Doble de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EM	Espectroscopía de masas
EMF	Extracto metanol-agua (70:30) del fruto de la guayaba agria
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
EV	Electrón-voltios
FBF	Fracción butanólica del fruto de la guayaba agria
FeCl ₃	Tricloruro de hierro
g	Gramos
GTFs	Glucosiltransferasas
h	Horas
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
J	Constante de acoplamiento
m	metros
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ND	No determinado
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno

Abreviatura	Significado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
t	tiempo
TMS	Trimetilsilano
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
UFC	Unidades formadores de colonias
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μL	Microlitros

RESUMEN

Existen evidencias epidemiológicas que demuestran que las biopelículas tienen un papel relevante en el desarrollo de enfermedades infecciosas como enfermedades de la cavidad oral.

La caries dental, por ejemplo, es una enfermedad relacionada con la formación de biopelículas que continúa afectando a la mayoría de la población mundial. *Streptococcus mutans* juega un rol clave en la patogénesis de esta enfermedad ya que sus factores de virulencia le permiten colonizar las superficies dentales de manera efectiva y modular la transición de biopelículas no patogénicas a biopelículas cariogénicas. Por lo tanto, las estrategias dirigidas a inhibir la viabilidad y virulencia de *S. mutans* deben ser precisas y selectivas.

A pesar de la ausencia de estudios en los que se examine la composición y actividad biológica de *Psidium friedrichsthalianum*, se ha propuesto que la guayaba agria comparte muchas de las propiedades farmacológicas de *P. guajava* (actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmódica, antidiabética, anticancerígena y antimicrobiana, entre otras). Lo cual la convierte en una opción para la prevención o tratamiento de los padecimientos antes mencionados.

En este marco de referencia, se propuso la investigación de la composición química y la actividad biológica de las fracciones y los compuestos aislados a partir de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum*). El material vegetal fue sometido a un proceso de maceración para obtener el extracto metanol-agua (70:30). Después, se realizaron varios procesos de fraccionamiento utilizando disolventes de diferente

polaridad. El fraccionamiento biodirigido del extracto derivó en el aislamiento de tres compuestos: ácido gálico (1), ácido elágico (2), y quercetina (3).

La evaluación de la actividad biológica se llevó a cabo realizando diferentes ensayos. En el caso de la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se encontró que tanto la quercetina como el ácido elágico tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*; mientras que el ácido gálico solamente es activo frente a *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Al evaluar la capacidad inhibitoria de formación de biopelícula, se determinó que el extracto metanol-agua (70:30) inhibe dicha formación en un 33 %, mientras que la fracción butanólica la inhibe en un 66 % a una concentración de 0.1 mg/mL y en un 80 % a una concentración de 1.0 mg/mL.

Finalmente, se determinó que la fracción butanólica, el extracto metanol-agua (70:30) y la quercetina (0.1 mg/mL) inhiben la fase de crecimiento exponencial de la bacteria estudiada. Mientras que en el caso del ácido gálico y elágico pudo observarse una inhibición parcial del crecimiento bacteriano en las dos concentraciones utilizadas.

En conclusión, los resultados obtenidos permiten proponer al extracto de la guayaba agria como una fuente de compuestos con actividad sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

1. ANTECEDENTES

1.1 Biopelículas

1.1.1 Definición y generalidades

En la naturaleza, las bacterias no viven como colonias puras de células dispersas; sino que existen en consorcios, adheridas a interfaces o unas con otras (Flemming y Wingender, 2010) formando comunidades sésiles capaces de responder y adaptarse a cambios en el ambiente o llevar a cabo tareas altamente especializadas similares a las de organismos multicelulares (Karunakaran *et al.*, 2011).

Las biopelículas o “biofilms” bacterianos son descritos como células irreversiblemente unidas, embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y adheridas a una superficie o a un tejido vivo (Castrillón, 2010).

Las comunidades que conforman las biopelículas poseen microambientes totalmente diferentes, tales como variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos, permitiendo nichos adecuados a todas las especies (Negroni, 2009).

También es importante mencionar que los organismos asociados en una biopelícula frecuentemente exhiben una mayor resistencia que sus contrapartes de vida libre debido a que la estructura de la biopelícula puede restringir la penetración de agentes antimicrobianos, los cuales se fijan en la matriz del exopolisacárido provocando una

reducción en la concentración del antibiótico y brindando protección contra los mecanismos inmunológicos del hospedero (Samaranayake, 2011).

1.1.2 Estructura y Composición

En la mayoría de las biopelículas, los microorganismos representan menos del 10 % de la masa seca, mientras que la matriz puede constituir cerca del 90 %. La matriz es el material extracelular, principalmente producido por los propios microorganismos, en el que las células se encuentran embebidas. Se compone de un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros –conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS)– que forma el andamio para la arquitectura tridimensional de la biopelícula y es responsable de la adhesión a superficies de la misma (Flemming y Wingender, 2010). En dicha matriz también pueden encontrarse proteínas, ácidos nucleicos, fibrina y calcio (Negroni, 2009).

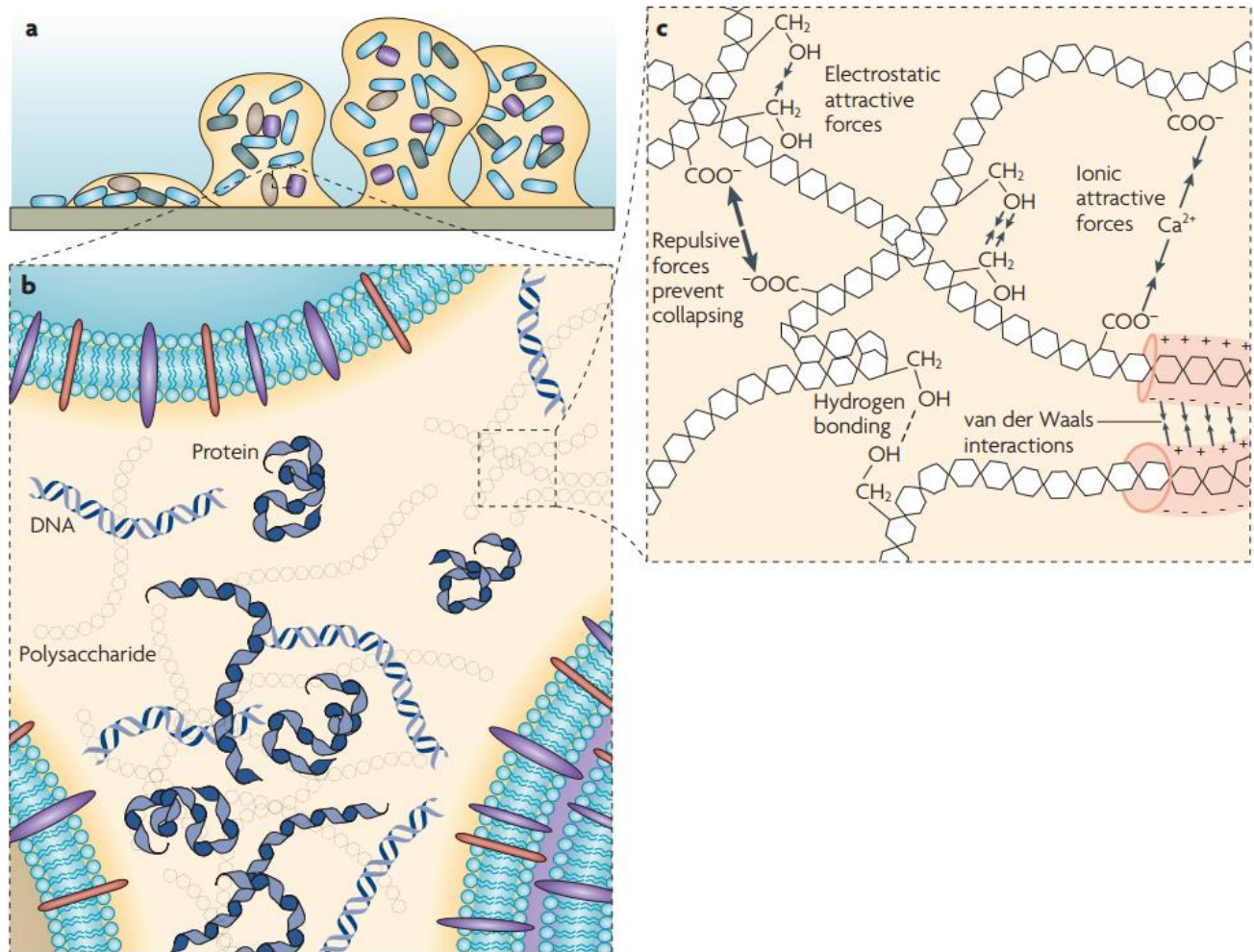


Figura 1. Sustancias de la matriz polimérica extracelular en diferentes dimensiones. Modificada de Flemming, 2010. **a)** Modelo de una biopelícula bacteriana unida a una superficie sólida. La formación de la biopelícula se inicia con la unión de una célula a una superficie. Se forman microcolonias través de la división de la bacteria, y la producción de la matriz de la biopelícula se inicia. Otras bacterias pueden ser reclutadas. **b)** Los principales componentes de la matriz – polisacáridos, proteínas y ADN– se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo, creando diferencias entre las regiones de la matriz. **c)** Interacciones fisicoquímicas débiles entre los biopolímeros dominan la estabilidad de la matriz de EPS.

1.1.3 Características de las biopelículas

La Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (2009) describe una serie de características que confieren a las biopelículas algunas de sus propiedades relevantes.

- **Heterogeneidad fisiológica:** Dentro de la biopelícula se puede observar un rango muy amplio de microorganismos, separados unos de otros por distancias mínimas; se pueden encontrar en ambientes muy diferentes en cuanto al contenido de nutrientes del medio, tensión de O₂, tensión de CO₂, pH, etc. Por lo tanto, células de la misma especie bacteriana pueden tener estados fisiológicos diferentes y también se pueden encontrar especies bacterianas diferentes con distintas necesidades fisiológicas. Esta heterogeneidad explica, en parte, la mayor resistencia de las bacterias cuando crecen en una biopelícula.
- **Fenotipos en la biopelícula:** Cuando las bacterias crecen en la biopelícula, manifiestan un fenotipo diferente al que se observa cuando crecen en forma planctónica. Los fenotipos de las bacterias que crecen en la biopelícula les confieren una mayor resistencia a los antimicrobianos, y ésta se mantiene incluso cuando las bacterias se desprenden de la biopelícula.
- **Señales en la biopelícula:** Los microorganismos de la comunidad conviven, cooperan y se comunican por sistemas de señales denominados “*quorum sensing*” que regulan la expresión de genes, la producción de factores de virulencia o la estructura de la propia biopelícula (Negroni, 2009).

- **Capacidad adaptativa:** En condiciones desfavorables, la biopelícula puede involucionar a estadios anteriores, pudiendo desarrollarse nuevamente cuando las condiciones sean propicias.

1.1.4 Etapas de Formación

Colonización y Adhesión reversible de microorganismos

La etapa inicial de la formación de una biopelícula comienza cuando las bacterias de forma individual se adhieren a una superficie. La capacidad de una bacteria de realizar este acontecimiento inicial es controlada por factores ambientales como los niveles de nutrientes, temperatura, pH y factores genéticos, incluyendo la presencia de genes que codifican para estructuras de movilidad, así como sensores ambientales y adhesinas (O'Toole *et al.*, 2000).

Adhesión irreversible

Después de la interacción inicial bacteria-superficie, los microorganismos comienzan a dividirse formando una monocapa, para posteriormente formar microcolonias. Durante la formación de la microcolonia, las bacterias experimentan cambios en la morfología con una marcada expresión de proteínas a diferencia de su contraparte en crecimiento planctónico (Sauer *et al.*, 2004).

En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula en donde se forma una estructura tridimensional con canales acuosos. Este sistema de canales permite establecer un vínculo con el medio externo permitiendo la entrada de nutrientes y la salida de metabolitos tóxicos

para las bacterias. La composición del EPS es diferente en cada organismo (Rocha Gracia, 2006); incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (Uzcudun, 2004).

Maduración de la biopelícula

La siguiente etapa del desarrollo de la biopelícula corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. La densidad global y la complejidad de la biopelícula aumentan a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante (Díaz, 2011).

Desprendimiento

Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación de la biopelícula (Uzcudun, 2004).

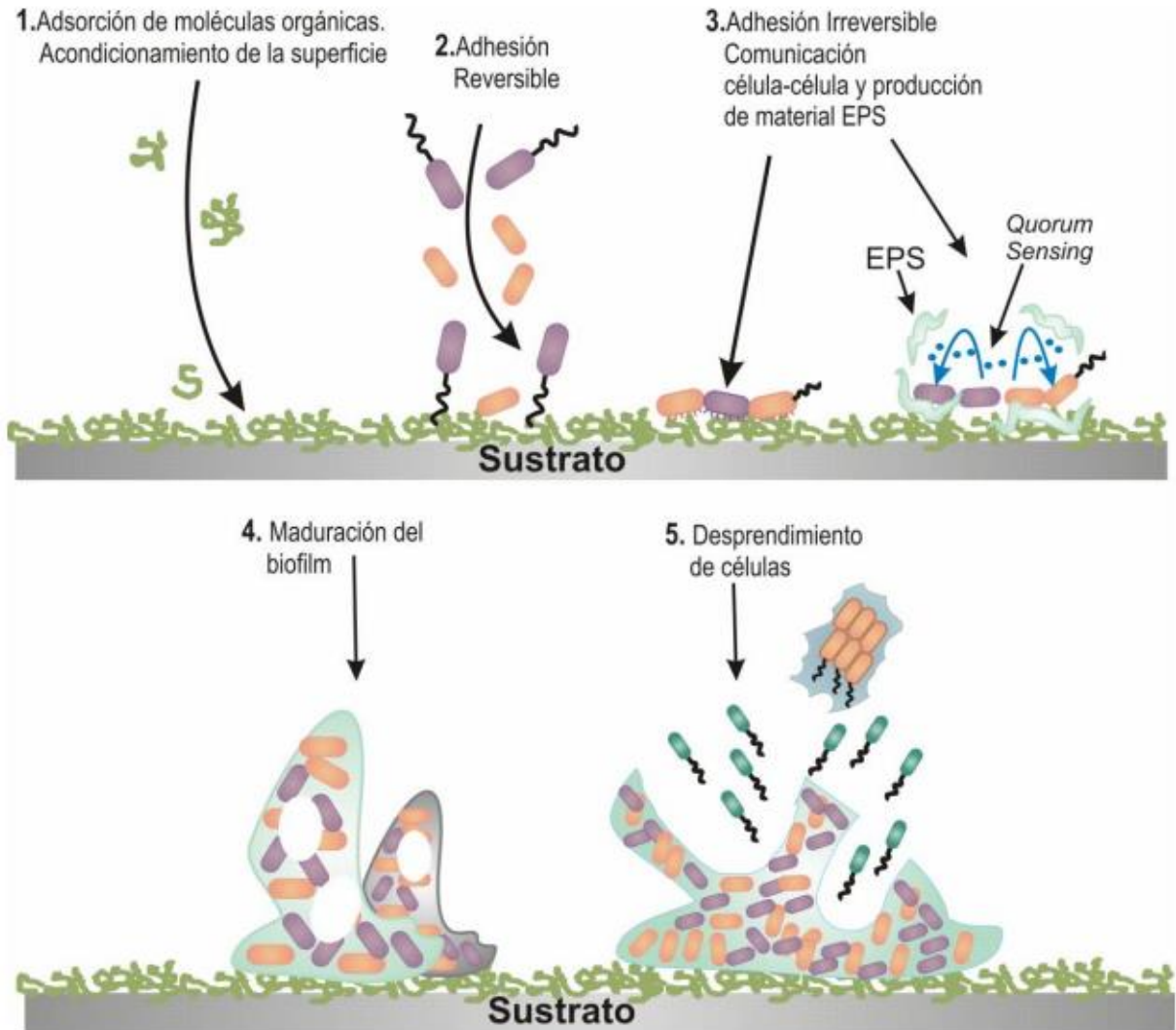


Figura 2. Diagrama que representa las distintas etapas de desarrollo de una biopelícula desde la fase de adherencia inicial y la maduración gradual, hasta la biopelícula completamente desarrollada. Adaptada de Díaz, 2011.

1.1.5 Infecciones humanas asociadas a las biopelículas

Algunos estudios recientes, afirman que más del 60 % de todas las infecciones microbianas son causadas debido a la formación de una biopelícula, además se les atribuye el 60 % de las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad. La biopelícula juega un papel importante en diversas enfermedades ocasionando que éstas se vuelvan crónicas y por ende, la causa de infecciones recurrentes tales como endocarditis, otitis media, prostatitis bacteriana crónica, fibrosis quística por neumonía y periodontitis, entre otras (Rocha Gracia, 2006). Las bacterias también forman biopelículas sobre dispositivos médicos, lo cual puede derivar en infecciones crónicas asociadas a polímeros (Götz, 2002).

1.2 Caries dental

La caries dental se puede definir como una enfermedad microbiológica infecciosa que resulta en la destrucción localizada de los tejidos duros calcificados dentarios (esmalte, dentina, cemento). Es causada por la producción de ácidos por las bacterias y se manifiesta por el oscurecimiento y reblandecimiento progresivo de dichos tejidos, con su posterior pérdida (Palma-Cárdenas y Aguilera, 2007).

Varios microorganismos son esenciales en la patogénesis de la caries dental. Sin embargo, se ha prestado más atención a la familia de los estreptococos debido a su capacidad para sintetizar polisacáridos extracelulares (glucanos y fructanos), a partir de sacarosa, mediante las enzimas dextransucarasa y fructosiltransferasa. Los glucanos son críticos en la formación de la placa dental ya que son insolubles en agua y poseen

la capacidad para promover la adherencia sobre superficies sólidas (Hamada y Slade, 1980).

En la concepción actual de la etiopatogenia de la caries, cambios medioambientales orales generan predominancia de algunas especies bacterianas con potencial acidogénico, necesario para la generación de las lesiones. Las especies tradicionalmente asociadas con lesiones de caries incluyen a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces spp.* y *Lactobacillus spp.*, entre otras (Giacaman *et al.*, 2013).

El principal agente etiológico de la caries dental es *S. mutans*; su rol patogénico implica la iniciación de la desmineralización del esmalte de la caries coronal y de la superficie de la raíz en las caries radiculares. Su presencia es ubicua en la boca, tanto en placa como en saliva de adultos y adultos mayores. Por otro lado, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) es uno de los colonizadores tempranos de la biopelícula oral. Este microorganismo constituye aproximadamente el 15 % de la microflora oral, lo que se traduce en altos recuentos de *S. sanguinis* en saliva (Giacaman *et al.*, 2013).

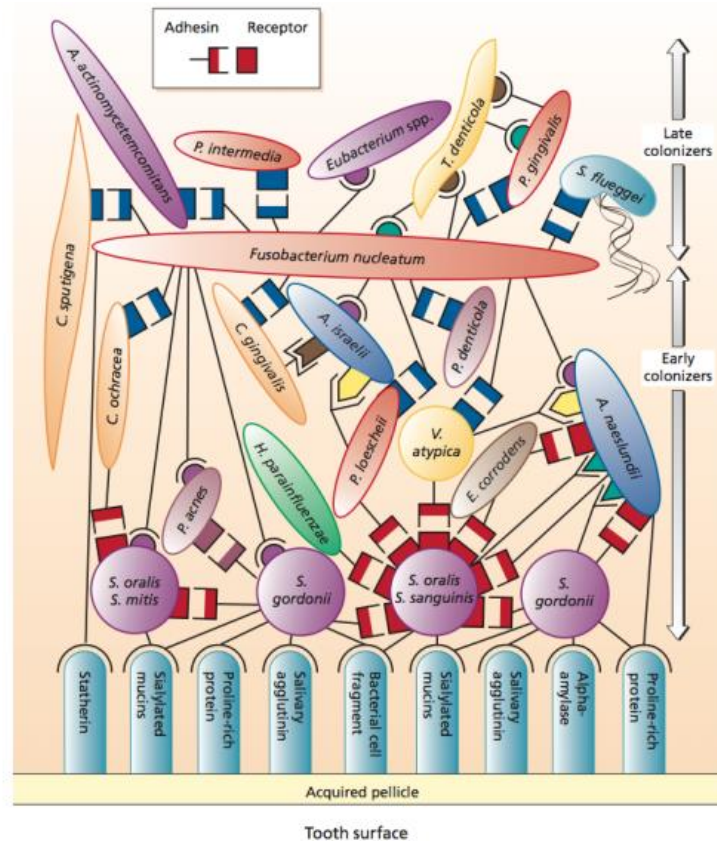


Figura 3. Colonización bacteriana en la formación de una biopelícula. Adaptado de Kolenbrander, 2002.

1.3 Género *Psidium*

El género *Psidium* consiste de aproximadamente 150 especies, pero solamente alrededor de 20 producen frutas que se consumen comúnmente. La especie más ampliamente cultivada es la guayaba común (*Psidium guajava* L.). Otras especies que también son extensamente cultivadas incluyen la guayaba fresa (*Psidium cattleianum* Sabine), la guayaba brasileña (*Psidium guineense* Sw.) y la guayaba agria o de Costa Rica (*Psidium friedrichsthalianum*) (Mani et al., 2011).

1.4 *Psidium friedrichsthalianum*

1.4.1 Sinonimia

A continuación se enlista el nombre científico de la guayaba agria, así como los sinónimos y nombres vernáculos de la misma (Lim, 2012, Cordero *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Sinónimos y nombres vernáculos de *Psidium friedrichsthalianum*

Nombre científico	<i>Psidium friedrichsthalianum</i> (O. Berg) Niendenzu
Sinónimos	<i>Calyptropsidium friedrichsthalianum</i> O. Berg
Nombres vernáculos	<p>Colombia: Guayaba agria</p> <p>Costa Rica: Cas, Cas ácida, Cas ácido</p> <p>Ecuador: Guayaba del choco</p> <p>El Salvador: Arrayán, Arrayan</p> <p>Francia: Goyavier de Costa Rica, Goyavier du Costa Rica</p> <p>Alemania: Cas, Kostarika-Guave</p> <p>Guatemala: Guayaba ácida</p> <p>Honduras: Guayaba agria, Guayaba de choco, Guayaba de Costa Rica, Guayaba de Danto</p> <p>México: Guayaba Montés, Guayaba agria</p> <p>Nicaragua: Guayaba agria, Guayaba del fresco</p> <p>Panamá: Guayaba agria, Guayaba de agua</p>

1.4.2 Taxonomía

Enseguida se muestra la clasificación taxonómica de *Psidium friedrichsthalium* (Missouri Botanical Garden, 2015).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Psidium friedrichsthalium*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Myrtaceae</i>
Subfamilia	<i>Myrtoideae</i>
Tribu	<i>Myrteae</i>
Género	<i>Psidium</i>
Especie	<i>P. friedrichsthalium</i> (O.Berg) Nied

1.4.3 Descripción

El árbol de *P. friedrichsthalianum* tiene un tamaño de 6 a 10 m de altura presenta copas ramificadas angulares, a menudo con cuatro alas, rojizo oscuras y finamente pubescentes. La corteza es color café rojizo con manchas grisáceas (Cordero *et al.*, 2003) como se muestra en la **Figura 4**. Las hojas (**Figura 5**) son puntiagudas y tienen forma elíptica u oval, presentan un color verde oscuro. Son lisas en el haz y más pálidas en el revés. Tienen entre 5–12 cm de largo y 1–2 cm de ancho (Lim, 2012).



Figura 4. Árbol de *Psidium friedrichsthalianum*.



Figura 5. Hojas de *Psidium friedrichsthalianum*.

Las flores (**Figura 6**) generalmente crecen en solitario, pero también crecen en grupos de dos o tres. Tienen un tamaño promedio de 2.5 cm de ancho, con cinco pétalos color blanco, de textura cerosa, fragantes y numerosos estambres (hasta 300) (Lim, 2012).



Figura 6. Flores de *Psidium friedrichsthalianum*.

Los frutos (**Figura 7**) son de forma redonda u oval, con un tamaño de 3–6 cm de diámetro, de cáscara verde amarillenta, con una areola en el sitio donde está el cáliz. Tienen una pulpa suave, blanca, muy ácida que envuelve las semillas aplanadas, las cuales miden aproximadamente 5 mm de largo (Cordero *et al.*, 2003).



Figura 7. Fruto de *Psidium friedrichsthalianum*. Imagen obtenida del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, 2015.

1.4.4 Distribución geográfica

El árbol de *P. friedrichsthalianum* es originario de Mesoamérica (Baraona, 1995), usualmente crece en zonas de bosque húmedo tropical y subtropical, a lo largo de quebradas, cerca de las costas o tierra adentro (Cordero *et al.*, 2003). Es una especie distribuida desde el sur de México, a través de América Central, hasta Colombia y Venezuela. También ha sido introducida en California y Florida (Geilfus y Bailón, 1994).

Psidium friedrichsthalianum crece desde el nivel del mar hasta 800 m de altitud. El árbol es sensible al clima frío y no soporta las heladas (Lim, 2012) ni las zonas con sequía prolongada (Cordero *et al.*, 2003). En México, esta especie se cultiva en los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Tabasco (Sánchez-Vindas, 1990).



Figura 8. Distribución de *Psidium friedrichsthalianum*. Obtenida de Discover Life, 2015.

1.4.5 Usos

Las hojas de *P. friedrichsthalianum* se han utilizado contra los malestares de la artritis y disentería. Sin embargo, comúnmente se usan para dar sabor al té de hierbas, golosinas, refrescos y jaleas en general (Sánchez-Vindas, 1990).

Los frutos se consumen en forma de jugo y se emplean para elaborar dulces y jaleas. Son más aromáticos y con un sabor más ácido que la guayaba común (Pino *et al.*, 2002).

La guayaba agria se consume en su mayoría, en estado maduro. Principalmente se comercializa como fruta fresca y pulpa concentrada que es procesada y distribuida para su venta a fabricantes de helados, restaurantes y comercios locales (Cordero *et al.*, 2003). La producción proviene de pequeñas plantaciones, a veces asociadas con otros cultivos principales, y de árboles aislados en potreros o solares. El árbol se cultiva principalmente en Costa Rica y Nicaragua, donde los frutos son ampliamente comercializados (Baraona, 1995). En México se le encuentra principalmente de forma silvestre y su fruto es poco conocido.

1.4.6 Reportes sobre *P. friedrichsthalianum*

A pesar del sabor característico del fruto, la composición de los compuestos volátiles de *P. friedrichsthalianum* no ha sido ampliamente estudiada. Diferentes autores (Pino *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2001; Chyau *et al.*, 1992; Vernin *et al.*, 1998) han analizado los compuestos volátiles de otras especies de *Psidium*, encontrando que los compuestos dominantes son terpenoides.

En un estudio realizado por Pino y colaboradores (2002) se identificó mediante GC-MS un amplio número de terpenos y derivados terpénicos en el fruto de la guayaba agria; los compuestos caracterizados incluyen el (*E*)- β -cariofileno, α -terpineol, α -pineno, α -selineno, β -selineno, δ -acdineno, 4,11-selinadieno y α -copaeno. Muchos de los compuestos encontrados en esta fruta contribuyen de manera importante al aroma tropical característico de otras especies de guayabas. Asimismo, dicho estudio (Pino *et al.*, 2002) reveló que el sabor típico de la guayaba agria, frecuentemente descrito como un sabor ácido y altamente frutal, se debe a la presencia de ésteres alifáticos y compuestos como el α -terpineol y el linalool. Muchos de los ésteres identificados en esta fruta, también se han encontrado en otras frutas tropicales tales como la guayaba común, la guayaba fresa, la papaya, la fruta de la pasión y la guanábana.

La guayaba común (*P. guajava*) frecuentemente se incluye en el grupo de las “superfrutas” (Sanda *et al.*, 2011) y algunos estudios reportan que sus hojas y frutos poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiespasmódica hepatoprotectora, antígenotóxica, antiplasmódica, antidiabética y anticancerígena (Gutierrez *et al.*, 2008). Ya que *P. friedrichsthalianum* es una especie altamente relacionada con *P. guajava*, algunos grupos de investigación (Flores *et al.*, 2013) proponen la guayaba agria comparte algunas de las propiedades farmacológicas antes mencionadas. Sin embargo, existen pocos reportes donde se examinen las propiedades biológicas o la composición de esta especie.

En un estudio realizado por Flores y colaboradores (2013) se examinó el efecto terapéutico potencial de los extractos de *P. friedrichsthalianum* en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), encontrando que la fracción de etilacetato

mostraba la mayor actividad antioxidante en comparación con la fracción butanólica, la fracción hexánica y el extracto crudo. Asimismo, se determinó la presencia de compuestos fenólicos tales como 1-*O-trans*-cinamoil- β -*D*-glucopiranososa, ácido elágico, miricetina, quercitrina y quercetina en dicha fracción.

Finalmente, en un estudio previo realizado por Miranda y colaboradores (2012) se describe el efecto de los extractos etanólico y hexánico preparados a partir de las hojas de *P. friedrichsthalianum* sobre el crecimiento de las bacterias patógenas *S. typhimurium* y *S. aureus*. Los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico tuvo la mejor actividad biológica en la prueba de difusión en agar, ya que en ese caso se obtuvieron los mayores halos de inhibición (9.53 y 13.38 mm) para *S. typhimurium* y *S. aureus*.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar los padecimientos que la aquejan (Mitscher, 2000). El conocimiento de recursos naturales con fines medicinales, adquirido empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el desarrollo de diversas áreas como la terapéutica, la farmacéutica, la farmacología y la medicina, así como de la industria cosmética y alimentaria. Este vasto cúmulo de conocimientos ha tenido un gran impacto en el campo de las ciencias médicas y en la farmacéutica al contribuir en la identificación y desarrollo de nuevos y potentes agentes medicinales (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

Debido a la automedicación y al uso indiscriminado de algunos antibióticos, la prevalencia de organismos patógenos resistentes es cada vez mayor. Además, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad, lo que implica la aparición de tratamientos más costosos, peligrosos e invasivos. Estas razones han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas a partir de fuentes naturales que permitan combatir los procesos infecciosos que afectan a la mayor parte de la población.

En la última década, el estudio de los productos naturales ha tomado mayor relevancia debido a que muchos países desarrollados han mostrado interés creciente en los sistemas alternativos o complementarios de la medicina, con el consiguiente aumento del comercio internacional de medicamentos herbarios y otros tipos de medicamentos tradicionales (OMS, 2010). Dichos productos se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades tales como, ansiedad, cefaleas,

insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, hiperlipidemias, artrosis, dispepsia, gastritis, afecciones inflamatorias e infecciosas de piel y mucosas, resfriado, sinusitis, entre otras (Castillo-García, 2007).

En este contexto, existen evidencias epidemiológicas que demuestran que las biopelículas tienen un papel relevante en el desarrollo de enfermedades infecciosas (Rocha Gracia, 2006), como enfermedades de la cavidad oral.

La caries dental, por ejemplo, es una enfermedad oral relacionada con la formación de biopelículas que continúa afectando a la mayoría de la población mundial (Marsh, 2003). A pesar de que otros microorganismos adicionales pueden estar involucrados, *Streptococcus mutans* juega un rol clave en la patogénesis de la enfermedad.

Esta bacteria es capaz de (i) producir y tolerar ambientes ácidos; (ii) sintetizar glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa mediante la acción de glucosiltransferasas (GTFs); y (iii) adherirse fuertemente a la película adquirida en las superficies dentales (Quivey, 2000 y Bowen, 2011). La combinación de estos factores de virulencia permite a *S. mutans* colonizar las superficies dentales de manera efectiva y modular la transición de biopelículas no patogénicas a biopelículas cariogénicas, lo cual deriva en la formación de caries (Jeon, 2011). Por lo tanto, las estrategias dirigidas a inhibir la viabilidad y virulencia de *S. mutans* deben ser precisas y selectivas para la prevención de la caries dental. Los estudios en los que se utilizan plantas para prevenir o tratar enfermedades orales tales como la caries dental han recibido bastante atención debido al uso de agentes quimioterapéuticos comerciales anti-caries como la clorhexidina y el triclosán; cuyo uso tiene varios efectos secundarios tales como

manchas en los dientes, alteraciones en el sentido del gusto, aparición de resistencia bacteriana e incluso resultar en reacciones anafilácticas (Ban, 2012). También existen reportes que indican que la clorhexidina es citotóxica para los fibroblastos gingivales y para las células del epitelio gingival (Sakaue, *et al.*, 2016).

Existen algunos informes en los que se reporta que las hojas y frutos de *Psidium guajava* han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmódica, antidiabética, anticancerígena y antimicrobiana, entre otras (Gutierrez *et al.*, 2008).

A pesar de la ausencia de estudios en los que se examine la composición y actividad biológica de *Psidium friedrichsthalianum*, se ha propuesto que la guayaba agria comparte muchas de las propiedades farmacológicas de *P. guajava* (Flores *et al.*, 2013). Lo cual la convierte en una opción para la prevención o tratamiento de los padecimientos antes mencionados.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad biológica en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum*. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Preparar el extracto metanol-agua (70:30) de los frutos desecados de *P.friedrichsthalianum*
2. Evaluar la actividad del extracto metanol-agua (70:30) de los frutos de *P.friedrichsthalianum* sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* utilizando la prueba de difusión en agar.
3. Fraccionar el extracto activo, empleando para ello, procesos de partición y métodos cromatográficos convencionales, para conseguir el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica.
4. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
5. Evaluar cuantitativamente el efecto del extracto activo y de los compuestos aislados sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* usando el método de microdilución en placa de 96 pozos.
6. Evaluar el efecto de los compuestos aislados sobre la producción de ácido de *S. mutans*
7. Determinar el efecto de los extractos obtenidos y de los compuestos aislados sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans*.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Recolección del material vegetal

El fruto de *Psidium friedrichsthalianum*, fue recolectado en Villahermosa, Tabasco en mayo del 2013. El material vegetal fue autenticado por la M. en C. Judith Espinosa de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Una muestra de herbario se conserva en la UJAT.



Figura 9. Localización y distribución climática en Tabasco. Obtenida de INEGI, 2015.

La localidad de Villahermosa se encuentra en el estado de Tabasco, donde el clima es en su mayoría cálido húmedo.

3.2 Tratamiento previo del material vegetal

El material vegetal se sometió a un proceso de limpieza mediante la eliminación de impurezas visibles; tales como hojas, residuos vegetales, insectos y cualquier material

extraño. Posteriormente, las muestras se refrigeraron para su adecuada conservación hasta el momento del análisis.



Figura 10. Fruto desecado de *Psidium friedrichsthalianum*.

3.3 Procedimientos generales de análisis

3.3.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre DIAION HP-20, Amberlita XAD16 y Sephadex LH-20 (Fluka).

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) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm y 315 nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica (a 100 °C) o con FeCl₃.

Las separaciones cromatográficas en placa preparativa se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck de 20 × 20 cm y 2 mm de espesor.

3.3.2 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico (IE) a 70 EV y el analizador másico de tiempo de vuelo (TOF).

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$ y acetona- d_6 , según el caso. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.

3.4 Obtención del extracto metanol-agua (70:30)

El material vegetal (900 g) se sometió a un proceso de molienda y se extrajo mediante maceración utilizando una mezcla de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30) durante un periodo de 72 horas. Posteriormente, el extracto obtenido se filtró y concentró a presión reducida. Finalmente se pesó el extracto total seco (187 g).

3.4.1 Fraccionamiento primario

El extracto obtenido se suspendió en agua desionizada y se sometió a una partición secuencial, utilizando como disolventes hexano (3 x 500 mL), acetato de etilo (3 x 500 mL) y 2-butanol (3 x 500 mL). Este proceso permitió la obtención de cuatro fracciones (**F-I**: hexano, **F-II**: acetato de etilo, **F-III**: 2-butanol, **F-IV**: acuosa), las cuales fueron concentradas a presión reducida. En el siguiente cuadro se muestran las cantidades obtenidas para cada una de las fracciones.

Cuadro 3. Fraccionamiento primario

Fracción primaria	Cantidad obtenida (g)
hexano (F-I)	0.010
acetato de etilo (F-II)	19.3
2-butanol (F-III)	113.1
acuosa (F-IV)	50.7

3.4.2 Fraccionamiento secundario

Una porción de 10 g de la fracción F-II (acetato de etilo) se sometió a un nuevo fraccionamiento en una columna abierta, utilizando DIAION HP-20 como adsorbente y eluyendo con un gradiente de H₂O a MeOH (100:0 a 0:100).

Este proceso permitió la obtención de 30 fracciones, las cuales se reunieron por similitud cromatográfica para dar lugar a un total de seis fracciones (2A – 2F).

Por otro lado, 10 g de la fracción III (2-butanol) se disolvieron en agua y se sometieron a un fraccionamiento secundario en una columna abierta, en el que se utilizó Amberlita XAD16 como adsorbente y como eluyente un gradiente de H₂O a MeOH (100:0 a 0:100). De este proceso se recolectaron seis fracciones (3A – 3F).

La fracción 3C se sometió a un nuevo proceso de fraccionamiento en una columna abierta, utilizando Sephadex LH-20 con metanol como eluyente; lo que permitió la

recolección de 30 nuevas fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica, dando lugar a cinco fracciones (A1 – A5).

3.4.3 Separación de los compuestos activos en las fracciones A2 – A4

En la fracción A2 precipitó un sólido beige se caracterizó por RMN-H¹ y EM como ácido elágico (**2**).

Por otro lado, mediante una cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) fue posible aislar ácido gálico (**1**) y quercetina (**3**) a partir de las fracciones A3 y A4, respectivamente. Para este proceso se utilizó tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico/metanol (3:3:0.8:0.2) como sistema de elución. Los compuestos se identificaron mediante RMN-H¹ y EM.

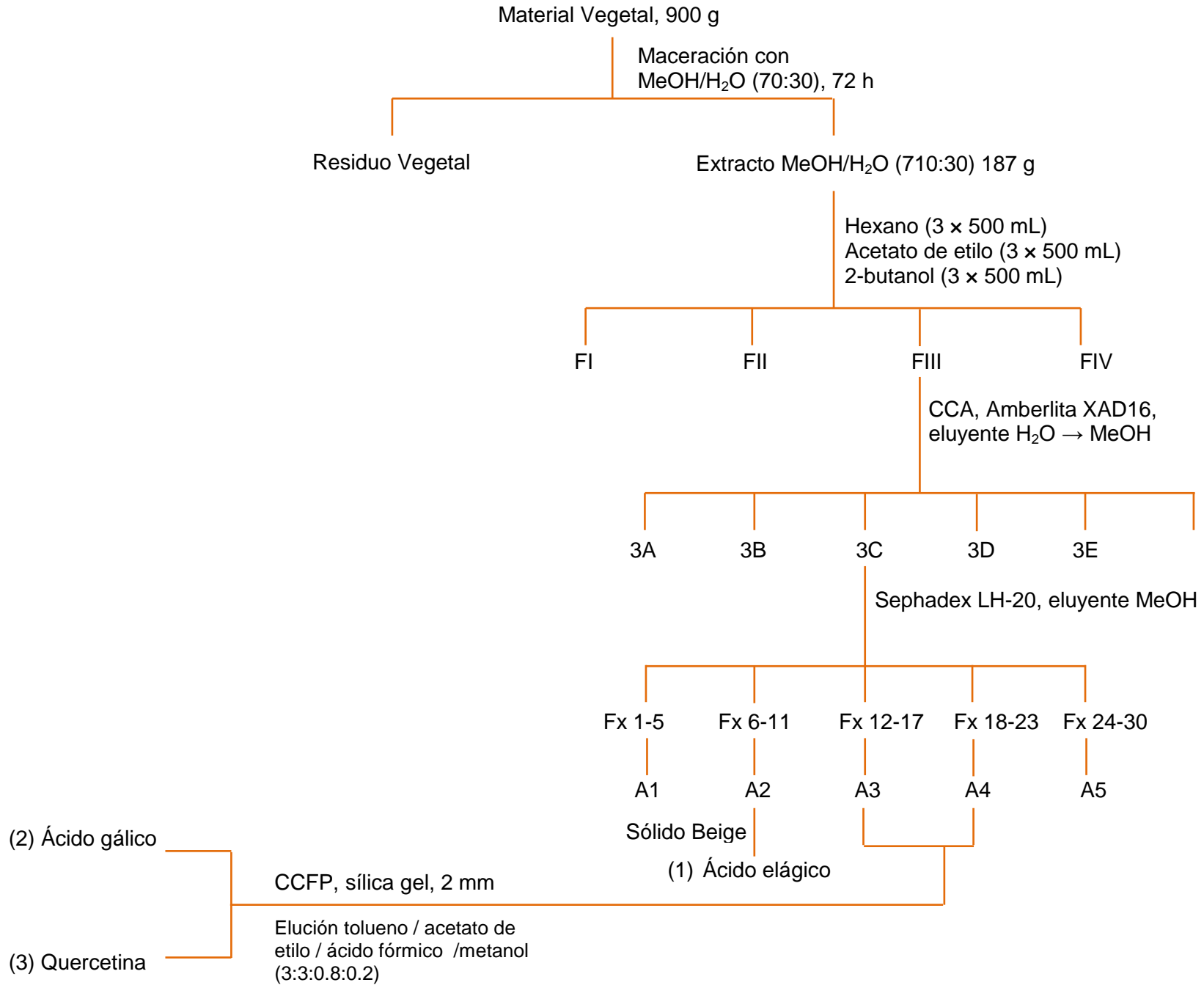


Figura 11. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico de *Psidium friedrichsthalianum*

3.5 Evaluación de la actividad biológica

3.5.1 Microorganismos de prueba

Como modelo de estudio se utilizaron las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* (ATCC 10499), *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*. Para reactivar las bacterias se inocularon 50 µL de una suspensión de bacterias en glicerol en 5 mL de caldo BHI y se incubaron los tubos por un periodo de 24 h, a 37°C. Posteriormente, se verificó el crecimiento y la pureza de cada cepa mediante pruebas bioquímicas.

3.5.2 Evaluación del extracto metanol-agua (70:30) de *Psidium friedrichsthalianum* mediante la prueba de difusión en agar

La prueba de difusión en agar se llevó a cabo con el propósito de evaluar la capacidad del extracto metanol-agua (70:30) de la guayaba agria para inhibir el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*. Esta prueba se realizó siguiendo la metodología descrita por Rodríguez (2011).

a) Reactivación de la cepa. Se tomaron 100 µL del cultivo conservado en glicerol de cada cepa de *Streptococcus* a evaluar (*S. oralis*, *S. sanguinis* o *S. mutans*), 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 µL 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 (DO) de 0.01 y, de esta manera alcanzar una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de la bacteria a utilizar durante el ensayo.

b) Preparación de las muestras a evaluar. El extracto metanol-agua (70:30) del fruto de *Psidium friedrichsthalianum* se solubilizó agregando 5 mL de agua destilada y sonicando a temperatura ambiente (Hernández 2011).

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 hasta 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 de ensaye con tapón. Finalmente, los tubos se esterizaron 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 y en los pozos formados se agregó medio de cultivo BHI como control negativo, digluconato de clorhexidina al 0.12 % como control positivo, agua y Tween® 80 como controles de disolvente, y el extracto a una concentración de 2000 µg/mL. De las cepas ajustadas a 1×10^6 UFC/mL, se tomaron 40 µL de la cepa de *S. mutans*, y 500 µL de las cepas *S. sanguinis* y *S. oralis* para inocularse en la sobrecapa fundida. El medio inoculado se vertió sobre la placa con las torres de

cristal previamente colocadas. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente, y posteriormente se retiraron las torres de cristal dejando pequeños pozos sobre el agar. En los pozos se agregaron 80 μL del compuesto a diferentes concentraciones y los controles antes mencionados.

3.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Un inóculo de cada una de las cepas antes mencionadas fue resembrado en caldo BHI e incubado durante 4 horas, posteriormente, la suspensión de células se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL utilizando un espectrofotómetro (Agilent, modelo 8453E).

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rivero-Cruz y colaboradores (2012), utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. El valor de CMI fue definido como la concentración mínima del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento bacteriano en el pozo de dilución. A continuación se describe brevemente la técnica antes mencionada.

En cada uno de los pozos se colocaron 100 μL de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI). En la primera línea se adicionó el compuesto de prueba (100 μL), del cual se realizaron diluciones seriadas. Después se agregaron 80 μL de medio de cultivo con sacarosa al 1 % (m / v) en todos los pozos. Posteriormente se adicionaron 20 μL del microorganismo de prueba (*S. mutans*, *S. oralis* o *S. sanguinis*), previamente ajustado a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

A continuación se esquematiza la distribución de cada uno de los pozos.

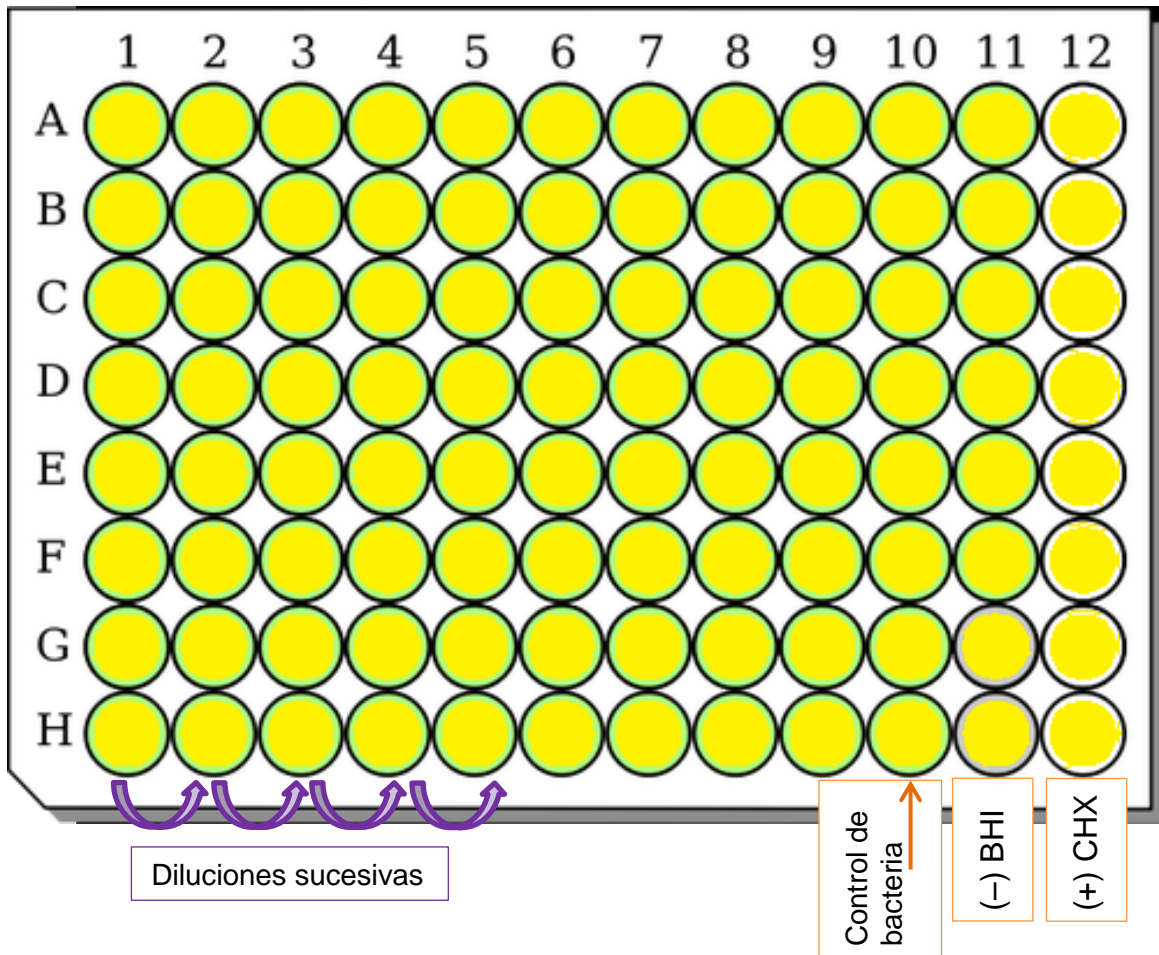


Figura 12. Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.

Se utilizaron diferentes controles, tal como se muestra en el **Cuadro** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

Cuadro 4. Controles para el ensayo biológico

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba
Control de disolvente*	Con inóculo bacteriano	–
Control negativo	Con inóculo bacteriano	
Control de esterilidad	Sin inóculo bacteriano	
Control positivo	Con inóculo bacteriano	digluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%

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

Finalmente, las placas se incubaron en condiciones aerobias durante 24 horas a 37 °C en una incubadora Labnet 211DS. El crecimiento se estimó espectroscópicamente ($\lambda = 660 \text{ nm}$) después de 24 horas utilizando un lector de placas. La CMI se determinó por triplicado para cada compuesto o fracción de prueba.

3.5.4 Efecto sobre el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans*

Este ensayo se realizó en orden de evaluar el efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* de las fracciones activas, así como de los compuestos aislados. Para el caso de los últimos, se utilizaron concentraciones sub-CMI en cada uno de los ensayos. Para esta determinación se empleó una modificación de la metodología descrita por Wei y colaboradores (2006).

Para cada uno de los ensayos se utilizaron matraces con 30 mL de un cultivo de *S. mutans* ajustado a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente, se añadieron los compuestos de prueba, los cuales se evaluaron a una concentración de 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL en el caso de los compuestos puros y a una concentración de 0.1 mg/mL en el caso del extracto metanol-agua (70:30) y de la fracción butanólica.

Finalmente, los matraces se incubaron en condiciones aerobias durante un periodo de 7 horas a 37 °C en una incubadora Labnet 211DS. El crecimiento se estimó espectroscópicamente ($\lambda = 600$ nm) en un espectrofotómetro (Agilent, modelo 8453E) tomando alícuotas de 1 mL en intervalos de 30 minutos.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, utilizando digluconato de clorhexidina al 0.12 % como control positivo y el cultivo bacteriano sin tratamiento como control de crecimiento. Como control de disolvente se utilizó DMSO en una concentración de 5 % (v/v) y 2.5 % (v/v).

3.5.5 Efecto sobre la producción de ácido de *S. mutans*

La determinación del efecto de las concentraciones sub-CMI de los compuestos de prueba sobre la producción de ácido *S. mutans* se realizó de acuerdo a la metodología de Ciardi *et al.* (1981). A tubos de ensayo con aproximadamente 5 mL de medio de cultivo se les adicionó un inóculo de la bacteria *S. mutans*. Posteriormente los tubos se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Después, los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 2.5 % (v/v) y se adicionaron en una concentración de 0.1 mg/mL.

Los tubos se incubaron en condiciones aerobias durante un periodo de 24 horas a 37 °C. Se tomaron lecturas de pH antes y después del periodo de incubación.

El efecto sobre la producción de ácido de *S. mutans* también se evaluó empleando medio de cultivo enriquecido con sacarosa al 1 % (m/v) siguiendo la metodología antes descrita.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, utilizando digluconato de clorhexidina al 0.12 % como control positivo y el cultivo bacteriano sin tratamiento como control de crecimiento.

3.5.6 Evaluación de los compuestos de prueba sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans*

Un inóculo de la cepa de *S. mutans* se resembró en caldo BHI y se incubó durante 4 horas, posteriormente, la suspensión celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL utilizando un espectrofotómetro.

Para la determinación del efecto de los compuestos de prueba sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans* se empleó una modificación a la metodología descrita por Nassar *et al.* (2012), utilizando placas estériles de poliestireno de 12 pozos.

En cada uno de los pozos se colocaron 2 mL de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con sacarosa al 1 % (m / v) y posteriormente se inocularon con 100 μ L de la suspensión celular de *S. mutans*.

Como control positivo se utilizó digluconato de clorhexidina al 0.12 % y como control negativo se utilizó el cultivo bacteriano sin tratamiento. Como control de disolvente se utilizó DMSO en una concentración de 2.5 % (v / v). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las placas se incubaron en condiciones aerobias durante 48 horas a 37 °C. Después del tiempo de incubación las placas se lavaron con agua desionizada con el fin de remover las células no adheridas. La biopelícula fue fijada adicionando 1 mL de formaldehído al 10 % (v / v). Las placas se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de este periodo, el formaldehido fue removido.

Posteriormente, se añadieron 200 µL de cristal violeta (0.4 %) a cada pozo; las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de cristal violeta fue removida y 250 µL de isopropanol se adicionaron en cada pozo. La absorbancia se determinó a 565 nm en un lector de placas.

El 100 % de adhesión fue definido como la absorbancia correspondiente al control negativo (sin tratamiento). Con base en los resultados de absorbancia de los pozos con los diferentes tratamientos, se calcularon los porcentajes de inhibición de cada compuesto de prueba.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto se realizó el estudio químico del extracto metanol-agua (70:30) del fruto de *Psidium friedrichsthalianum* y la determinación de su efecto sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

El fruto de la guayaba agria se seleccionó con base en sus usos en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos intestinales y como agente antiséptico y astringente (Sánchez-Vindas, 1990). Sin embargo, existe poca evidencia documentada del efecto de la guayaba agria sobre el crecimiento de bacterias patógenas.

Los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* fueron desecados y sometidos a un proceso de maceración para obtener el extracto metanol-agua (70:30). Después, se realizó un proceso de fraccionamiento primario a partir del extracto utilizando disolventes de diferente polaridad. Este proceso permitió la obtención de cuatro fracciones (F01 – F04). Posteriormente, se realizó la prueba de difusión en agar al extracto metanol-agua (70:30) y a la fracción butanólica. A continuación, se determinó la concentración mínima inhibitoria, la capacidad inhibitoria de formación de biopelícula, la capacidad inhibitoria de la producción de ácido y el efecto sobre el crecimiento de bacterias cariogénicas.

Por otra parte, el extracto metanol-agua (70:30) de *P. friedrichsthalianum* fue sometido a un estudio químico y los compuestos aislados se identificaron por sus

constantes espectroscópicas y espectrométricas. Se evaluó la actividad antibacteriana de los mismos, utilizando los ensayos antes mencionados.

4.1 Evaluación del extracto metanol-agua (70:30) de *Psidium friedrichsthalianum* mediante la prueba de difusión en agar

La prueba de difusión en agar se llevó a cabo con el propósito de evaluar la capacidad del extracto metanol-agua (70:30) de la guayaba agria para inhibir el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

Los resultados obtenidos del ensayo de difusión en placas de agar permitieron determinar que el extracto MeOH/H₂O (70:30) de los frutos de la guayaba inhibían el crecimiento de las bacterias *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. mutans* 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 para el extracto MeOH/H₂O (70:30) fueron comparables a los determinados para el control positivo digluconato de clorhexidina (0.12 %). En la **Figura 13** se muestran los halos de inhibición de la prueba de difusión en agar.

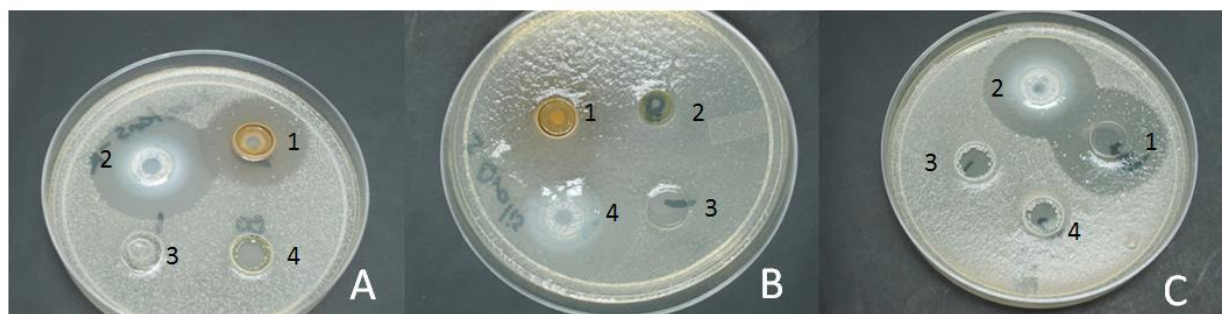


Figura 13. Prueba de difusión en agar para el extracto metanol-agua (70:30): A) *S. mutans*, B) *S. oralis*, C) *S. sanguinis*. Los números indican 1) extracto metanol-agua (70:30), 2) control positivo: digluconato de clorhexidina (0.12 %), 3) control negativo: medio de cultivo BHI, 4) control disolvente: agua y Tween® 80.

4.2 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las bacterias empleadas en el estudio antimicrobiano fueron *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*. Pertenecen al género *Streptococcus* y se caracterizan por presentar una disposición en cadena así como tinción Gram (+). Constituyen un grupo complejo que probablemente sea la causa de más enfermedades y que provoque una diversidad de dolencias mayor que cualquier otro grupo de bacterias (Tortora *et al.*, 2007).

Los microorganismos empleados son bacterias cariogénicas primarias ya que forman la placa dental por adhesión a la superficie dental mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986).

Respecto a la técnica empleada, Reller y Weinstein (2009) señalan que la microdilución se considera un buen método para probar de manera rápida y simultánea un gran número de muestras.

En primer lugar se procedió a determinar las CMIs para el extracto metanol-agua (70:30), los resultados obtenidos indican que el extracto de los frutos de la guayaba agria inhibe el crecimiento de las bacterias seleccionadas en un rango de 0.5 a 2.0 mg/mL. La bacteria que presentó la mayor sensibilidad fue *S. sanguinis* y la más resistente fue *S. mutans*. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Kinghorn y colaboradores para la berberina (2005). El control positivo utilizado fue el digluconato de clorhexidina (CHX). Las CMIs obtenidas para este agente antibacteriano fueron de 0.016 y 0.032 mg/mL para las bacterias seleccionadas. En el **Cuadro 5** se resumen las CMIs calculadas para las bacterias empleadas.

Cuadro 5. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) del extracto metanol-agua (70:30) de *P. friedrichsthalianum*

	CMI (mg/mL)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
Extracto metanol-agua (70:30)	2.0	1.0	0.5
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

Estos resultados permitieron confirmar que el extracto metanol-agua (70:30) derivado de los frutos de guayaba inhibe el crecimiento de las bacterias de prueba, por lo que se procedió a realizar un fraccionamiento primario tal y como se describió con anterioridad.

Se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria para cada una de las fracciones obtenidas en el proceso antes mencionado obteniendo los resultados presentados en el siguiente cuadro.

Cuadro 6. Determinación de la CMI (mg/mL) de las fracciones primarias

Fracciones	CMI (mg/mL)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
hexano (F-I)	ND	ND	ND
acetato de etilo (F-II)	4.0	4.0	3.3
2-butanol (F-III)	1.0	1.0	1.0
acuosa (F-IV)	> 8.0	> 8.0	> 8.0
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

ND: No determinada

En este caso la fracción de 2-butanol (**F-III**) presentó la mayor actividad antibacteriana (CMIs de 1.0 mg/mL en cada uno de los casos), por lo que el fraccionamiento secundario se continuó a partir de esta fracción. De este proceso de obtuvieron 6 fracciones: **3-A** (6.8650 g), **3-B** (1.3106 g), **3-C** (0.7929 g), **3-D** (0.8370 g), **3-E** (0.1681 g), **3-F** (0.0785 g).

Las CMIs obtenidas para las fracciones secundarias estuvieron en un rango entre 0.5 y 2.0 mg/mL, siendo la fracción **3C** activa contra *S. oralis* y *S. sanguinis*, pero no frente a *S. mutans*.

Cuadro 7. Determinación de la CMI (mg/mL) de las fracciones secundarias

Fracciones	CMI (mg/mL)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
3A	4.0	1.0	1.0
3B	2.0	0.5	2.0
3C	1.4	0.7	1.0
3D	2.0	0.5	2.0
3E	2.0	0.5	1.0
3F	2.0	0.5	1.0
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

Los resultados mostraron que la fracción con mayor actividad fue la **3C**, por lo que de manera análoga al procedimiento anterior, esta fracción fue seleccionada para continuar con un nuevo fraccionamiento, a partir del cual, se aislaron tres compuestos: ácido gálico, ácido elágico y quercetina.

También se realizó la evaluación del potencial antibacteriano de dichos compuestos sobre el crecimiento de tres bacterias del grupo *Viridans*: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*; determinando la CMI mediante un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos y obteniendo los siguientes resultados.

Cuadro 8. Determinación de la CMI (mg/mL) de los compuestos aislados

	CMI (mg/mL)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
ácido gálico	0.5	2.0	0.5
ácido elágico	0.25	0.5	0.5
quercetina	0.5	1.0	1.0
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

Ríos y colaboradores (1988) consideran que un extracto vegetal es activo si su CMI es menor o igual a 1.0 mg/mL cuando se utiliza el método de microdilución en placa. Con base en este criterio se determinó la actividad de cada uno de los compuestos evaluados.

Finalmente, se encontró que tanto la quercetina como el ácido elágico tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las tres bacterias evaluadas; mientras que el ácido gálico solamente es activo frente a *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Por último, es importante destacar que las bacterias cariogénicas se encuentran implicadas en diversos padecimientos entre los cuales se puede destacar por su frecuencia a la endocarditis bacteriana. Esta enfermedad tiene alta morbilidad y mortalidad y en el 90% de los casos se aíslan a partir de pacientes infectados tres grupos de bacterias, que comparten la capacidad de adherirse al endocardio: *Staphylococci*, *Streptococci* y *Enterococci* (López *et al.*, 2005).

4.3 Efecto sobre el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans*

Este ensayo se realizó en orden de evaluar el efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* de las fracciones activas, así como de los compuestos aislados. Para el caso de los últimos, se utilizaron concentraciones sub-CMI en cada uno de los ensayos. Para esta determinación se empleó una modificación de la metodología descrita por Wei y colaboradores (2006). Para ello, se construyó una curva temporal en la que se tomaron lecturas de absorbancia cada 30 minutos en un intervalo de 7 horas.

En primer lugar, se construyó una curva de crecimiento sin aplicar tratamiento alguno, con el fin de conocer el comportamiento normal de *S. mutans* y tenerlo como referencia para futuras comparaciones.

Se empleó digluconato de clorhexidina (0.12 %) como control positivo; determinando que ésta inhibe totalmente el crecimiento de *S. mutans*. Posteriormente, se construyeron las curvas correspondientes al control de disolvente utilizando DMSO en una concentración de 2.5 y 5 % (v / v).

Los resultados mostrados en **Figura 14** permiten concluir que el crecimiento de *S. mutans* no se ve afectado por el DMSO en una concentración del 2.5 %, pero en cambio se ve disminuido al adicionar el disolvente al 5 %. Una vez realizada esta determinación, se construyeron las curvas temporales para los extractos obtenidos y los compuestos aislados; utilizando como disolvente DMSO al 2.5 % (v/v).

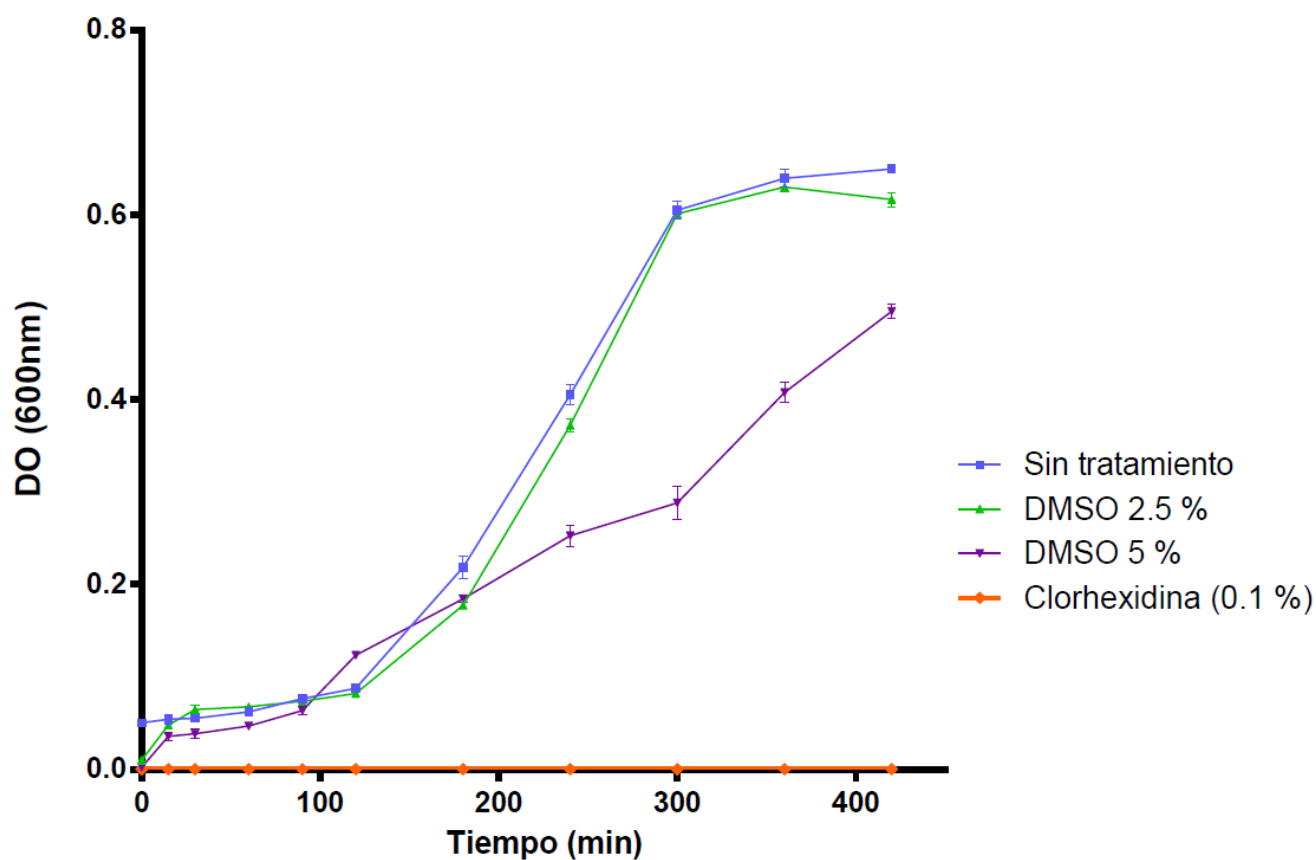


Figura 14. Efecto del disolvente (DMSO) sobre el crecimiento de *S. mutans*

En el caso de los compuestos aislados se probaron dos concentraciones sub-CMI (0.1 y 0.05 mg/mL), mientras que para el caso de los extractos se probó solamente una concentración de 0.1 mg/mL.

En primer lugar, la actividad antimicrobiana de los compuestos estudiados contra *S. mutans* fue menos potente que la del digluconato de clorhexidina, el cual es un antimicrobiano clínicamente utilizado.

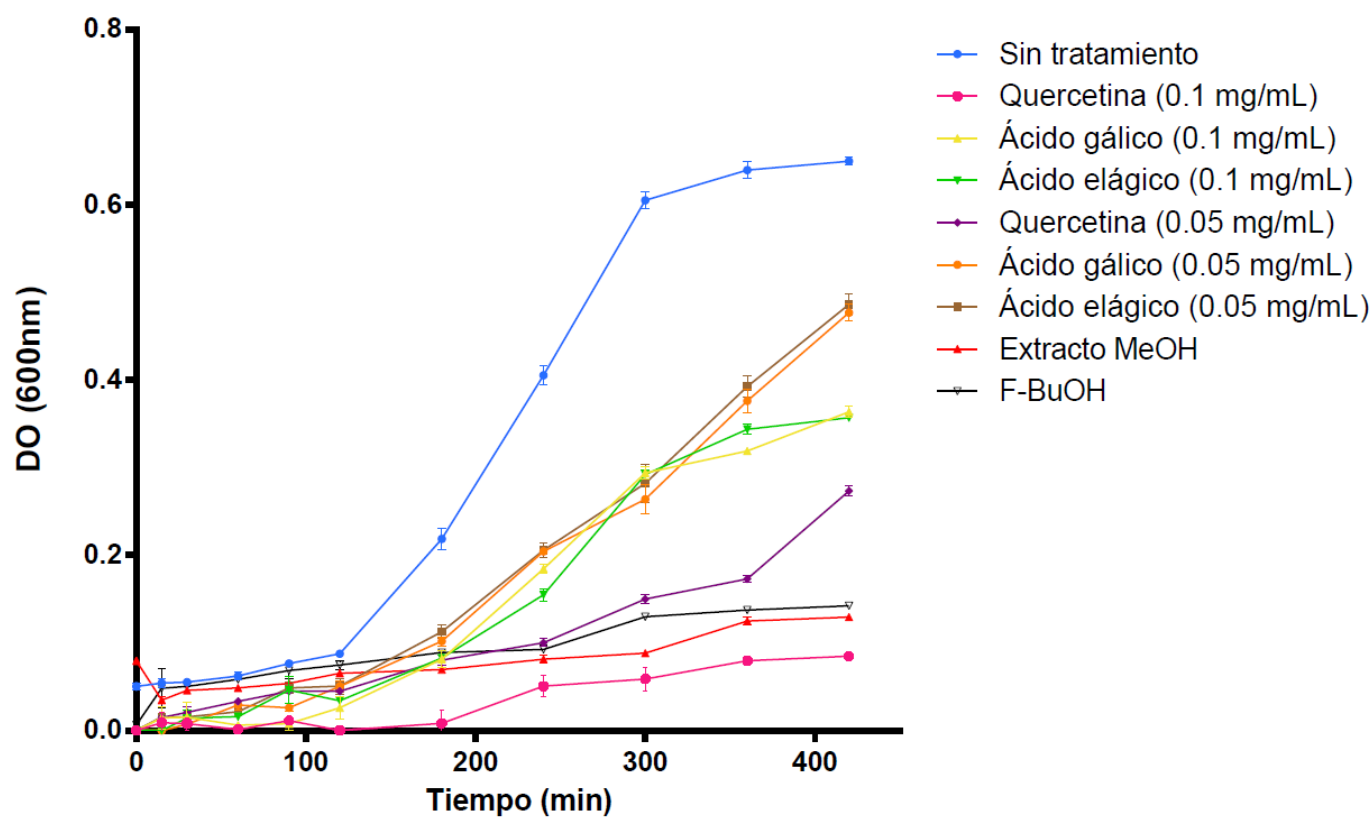


Figura 15. Efecto de diferentes compuestos sobre el crecimiento de *S. mutans*

Los resultados presentados en la [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.](#) muestran que en el caso de la fracción butanólica y el extracto metanol-agua (70:30), la tasa de crecimiento de la bacteria se mantiene prácticamente sin alteraciones durante las primeras dos horas de exposición, siendo comparable al comportamiento de las bacterias no tratadas. Sin embargo, después del tiempo transcurrido la bacteria no presenta la fase de crecimiento exponencial.

Asimismo, es posible notar que el efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* tanto de la fracción butanólica como del extracto metanol-agua (70:30), es comparable al efecto que tiene la quercetina (0.1 mg/mL) sobre dicha bacteria. Mientras que en el caso del ácido gálico y elágico pudo observarse una inhibición parcial del crecimiento bacteriano en las dos concentraciones estudiadas.

4.4 Efecto sobre la producción de ácido

Los resultados obtenidos en el ensayo realizado para determinar el efecto de cada uno de los compuestos y extractos estudiados en concentraciones sub-CMI (0.1 mg/mL) después de un periodo de incubación de 24 horas, se muestran a continuación.

Tanto la capacidad para generar ácido, como la capacidad para funcionar a un pH bajo, parecen ser los principales rasgos fisiológicos asociados con la cariogenicidad de *S. mutans* (Prabu, 2006).

En el caso de la

Figura 16, se puede observar que en un medio de cultivo que no ha sido enriquecido con glucosa, la adición de quercetina (0.1 mg/mL) inhibe parcialmente la producción de ácido de *S. mutans* con respecto al control.

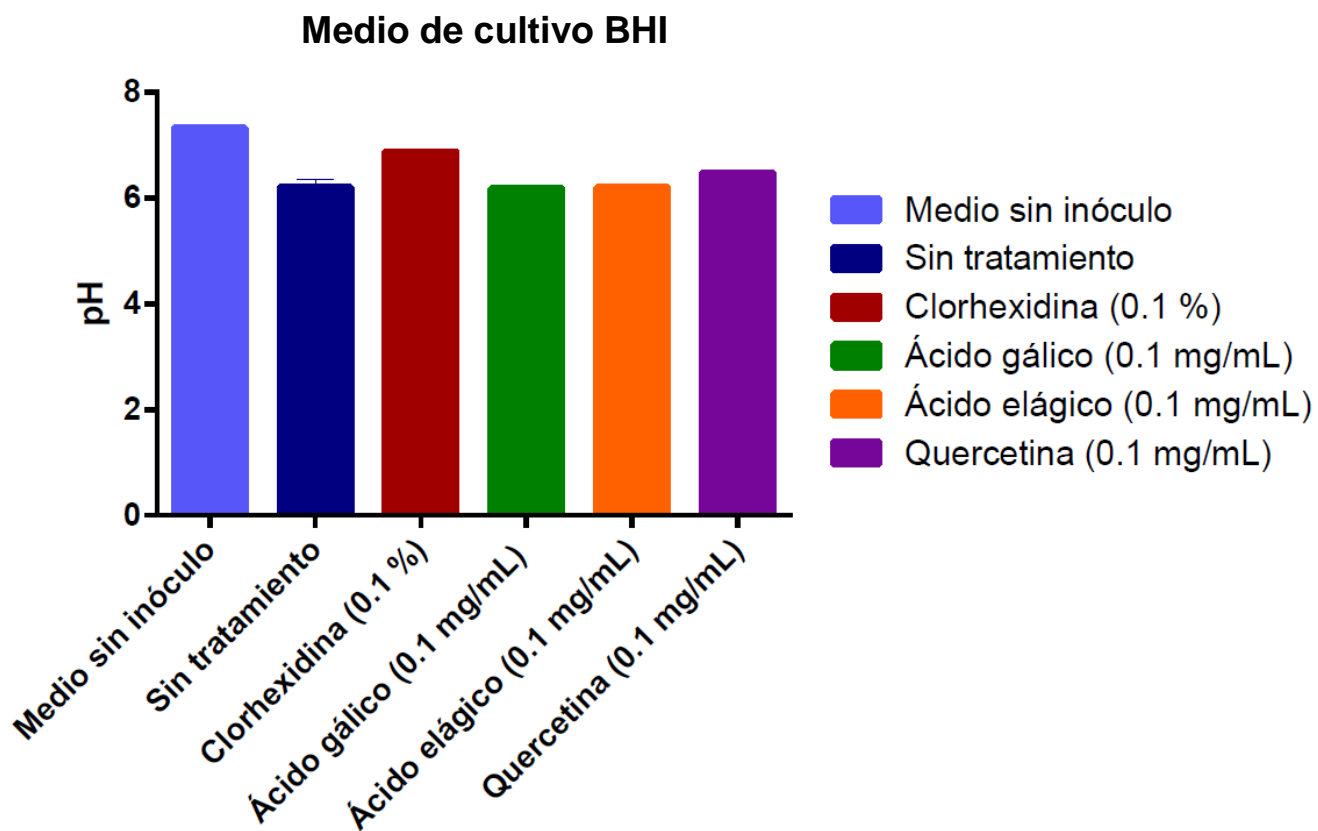


Figura 16. Efecto de los compuestos y extractos estudiados sobre la producción de ácido de *Streptococcus mutans* en un medio sin glucosa

Mientras que en la

Figura 17 se muestra un comportamiento similar, en el que la adición de quercetina inhibe la producción de ácido de la bacteria estudiada de manera comparable al digluconato de clorhexidina (0.1 %).

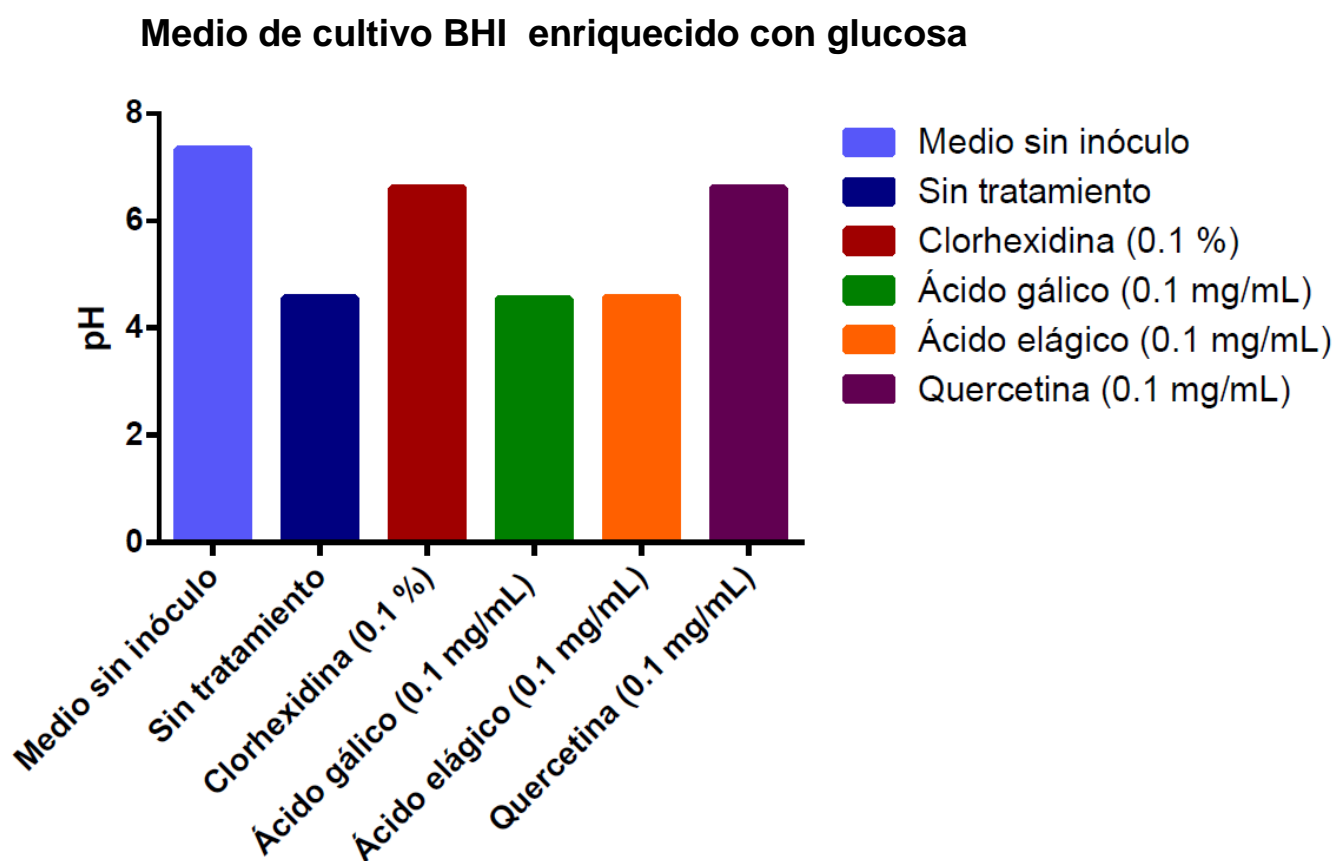


Figura 17. Efecto de los compuestos y extractos estudiados sobre la producción de ácido de *Streptococcus mutans* en un medio enriquecido con glucosa

4.5 Evaluación de los compuestos de prueba sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans*

Para la determinación del efecto del extracto metanol-agua (70:30) del fruto de la guayaba agria (EMF) y de la fracción butanólica (FBF) sobre la formación de la biopelícula monoespecie producida por la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* se utilizó el ensayo de cristal violeta. Como resultado, se observó una inhibición de la formación de la biopelícula dependiente de la concentración. En la **Figura 18** se observan las diferencias en la formación de la biopelícula producida por *S. mutans* a concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/mL de la fracción butanólica y a una concentración de 1.0 mg/mL del extracto del fruto de la guayaba agria. En la fila D se observa el control de esterilidad, el control bacteriano (sin tratamiento, crecimiento del 100%) y el control de disolvente.

Como se mencionó con anterioridad, la determinación del efecto sobre la formación de la biopelícula por la especie *S. mutans* se realizó empleando una modificación a la metodología descrita por Nassar *et al.*, (2012). En este método se consideró a la medida de absorbancia del carril sin tratamiento como el 100 % de adhesión, y tomando este resultado como referencia, se calcularon los porcentajes de inhibición para los diferentes tratamientos.

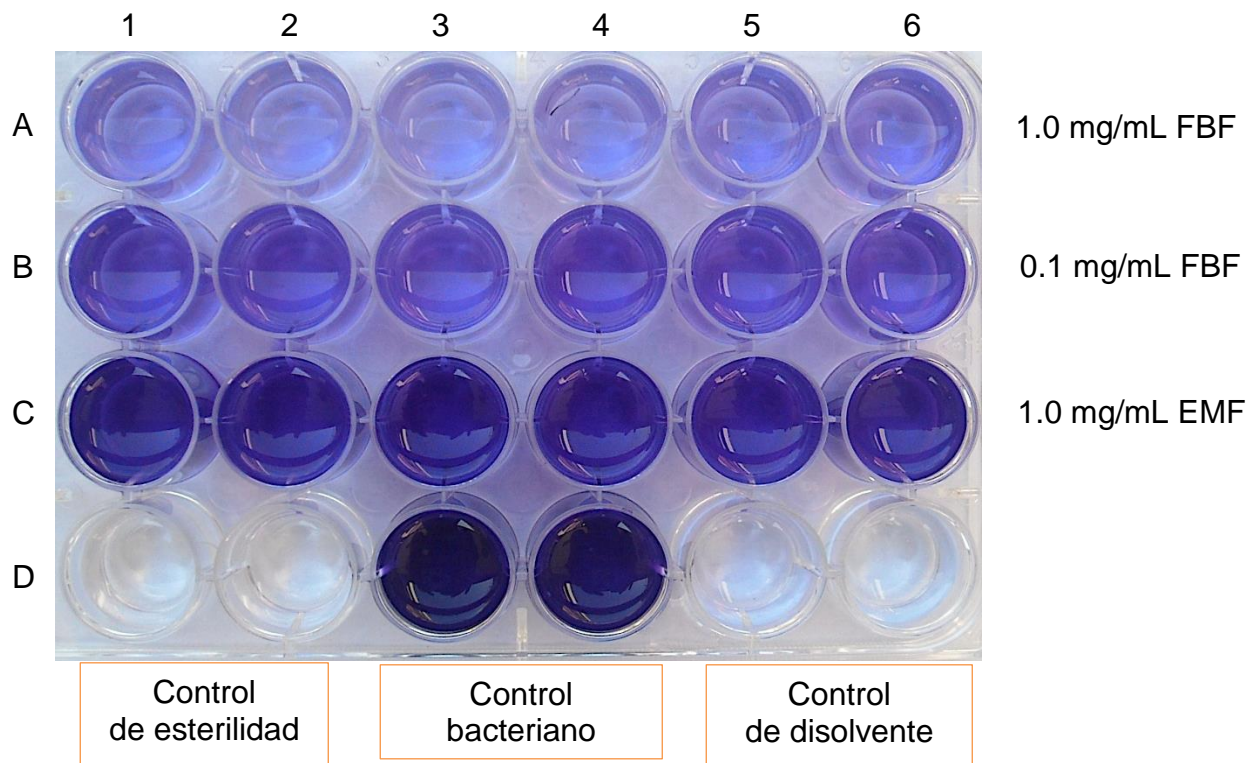


Figura 18. Efecto sobre la formación de la biopelícula por *S. mutans* utilizando el ensayo de cristal violeta.

Como resultado de este ensayo, se obtuvo que el extracto metanol-agua (70:30) inhibió la formación de la biopelícula en un 33 %, mientras que el porcentaje de inhibición para la fracción butanólica fue de 66 % a una concentración de 0.1 mg/mL y de 80 % a una concentración den 1.0 mg/mL.

Posteriormente, se determinó el efecto de los compuestos sobre la formación de la biopelícula a concentraciones de 0.05 mg/mL y 0.1 mg/mL utilizando la misma estrategia experimental descrita para el extracto y la fracción butanólica. Los resultados obtenidos indican que a las concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/mL sólo la quercetina inhibe la formación de la biopelícula en un 18% y 25%, respectivamente. Los ácidos

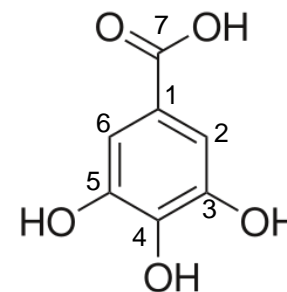
elágico y gálico no tuvieron efecto sobre la formación de biopelícula a la concentración de 0.05 mg/mL y a 0.1 mg/mL no fue posible medir el efecto debido a la falta de solubilidad de los compuestos y a la formación de precipitados. Sin embargo, es importante mencionar que estudios previos han determinado que los ácidos elágico y gálico inhiben a las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*.

De manera general, *S. mutans* es visto como un agente primario en la patogénesis dental (Bowen, 2002; Beighton, 2005). Esta bacteria sintetiza glucanos extracelulares a partir de la sacarosa mediante la utilización de glucosiltransferasas (GTFs) (Loesche, 1986; Bowen, 2002). Los glucanos promueven la acumulación de estreptococos cariogénicos (y otros microorganismos orales) en la superficie dental, y son críticos para la formación e integridad estructural de las biopelículas (Cury *et al.*, 2000; Marsh, 2004).

Gran número de estudios, sugieren que algunos productos naturales con alto contenido de polifenoles (entre los que se encuentra la quercetina, el ácido gálico y el ácido elágico), como el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) (Duarte, 2006), *Camellia sinensis* (Hamilton-Millet, 2001), *Cistus incanus* (Wittpahl, 2015), y algunos propóleos (Barrientos, 2013), entre otros; no sólo poseen propiedades biológicas que representan grandes beneficios para la salud, sino que tienen importantes efectos sobre los factores de virulencia de *S. mutans* ya que actúan impidiendo la formación de biopelículas y coagregados bacterianos al inhibir la actividad de las GTFs, así como la adherencia de los microorganismos a diferentes superficies (Weis *et al.*, 2002, Steinberg *et al.* 2004; Yamanaka *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005).

4.6 Identificación de los compuestos aislados

El estudio químico del fruto de *P. friedrichsthalianum* condujo al aislamiento de tres compuestos: ácido gálico (**1**), ácido elágico (**2**), y quercetina (**3**). Los cuales fueron identificados mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Napolitano, 2012). A continuación se presentan los datos de RMN¹H para cada compuesto.



1H	δ (J Hz)
2, 6	6.93 (1H, s)
7	12.4 (1H, s)

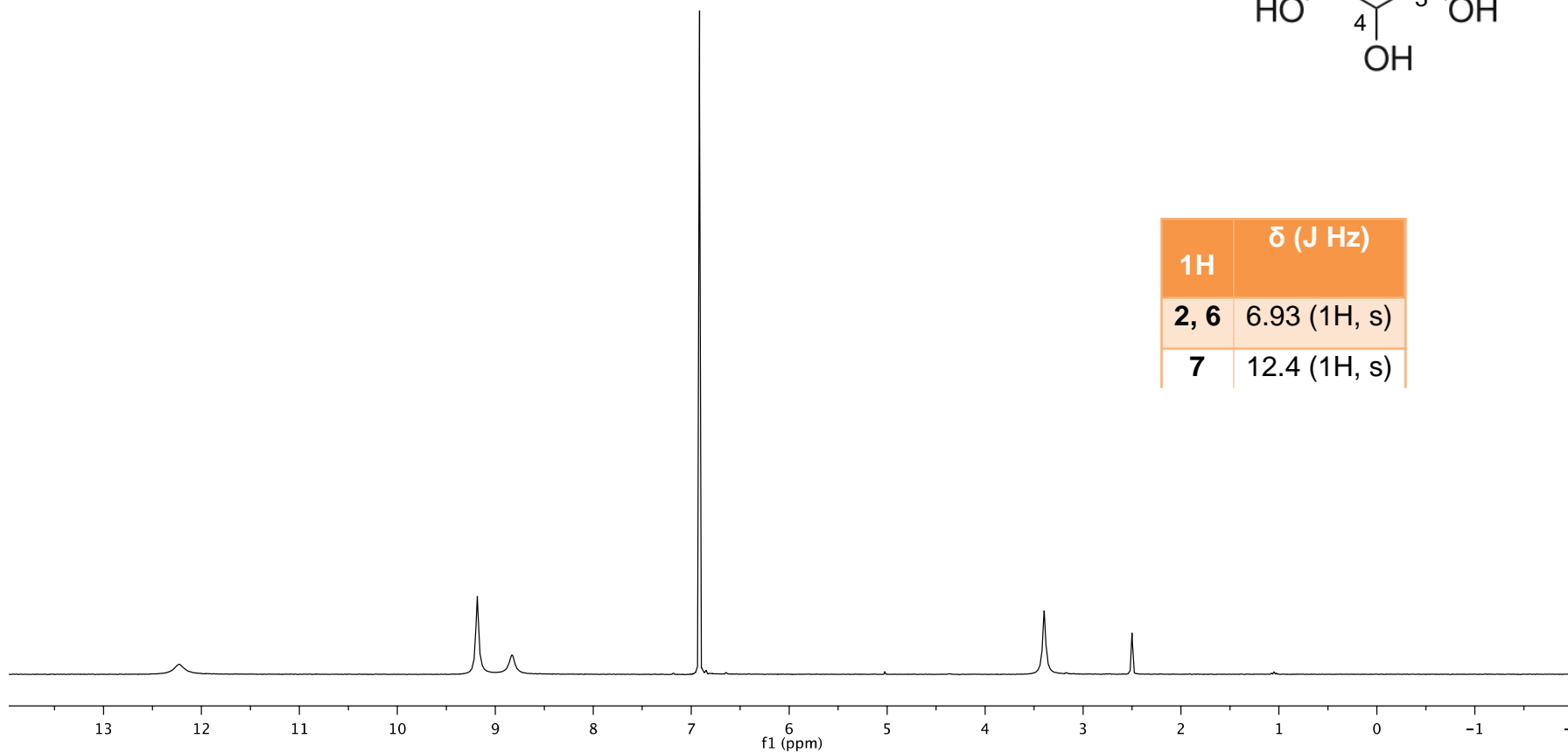
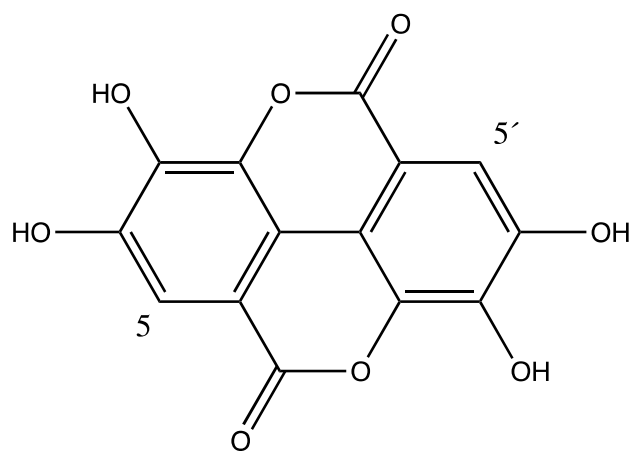


Figura 19. Espectro RMN-¹H del ácido gálico (1), DMSO-*d*₆, 400MHz.



1H	δ (J Hz)
5, 5'	7.44 (1H, s)

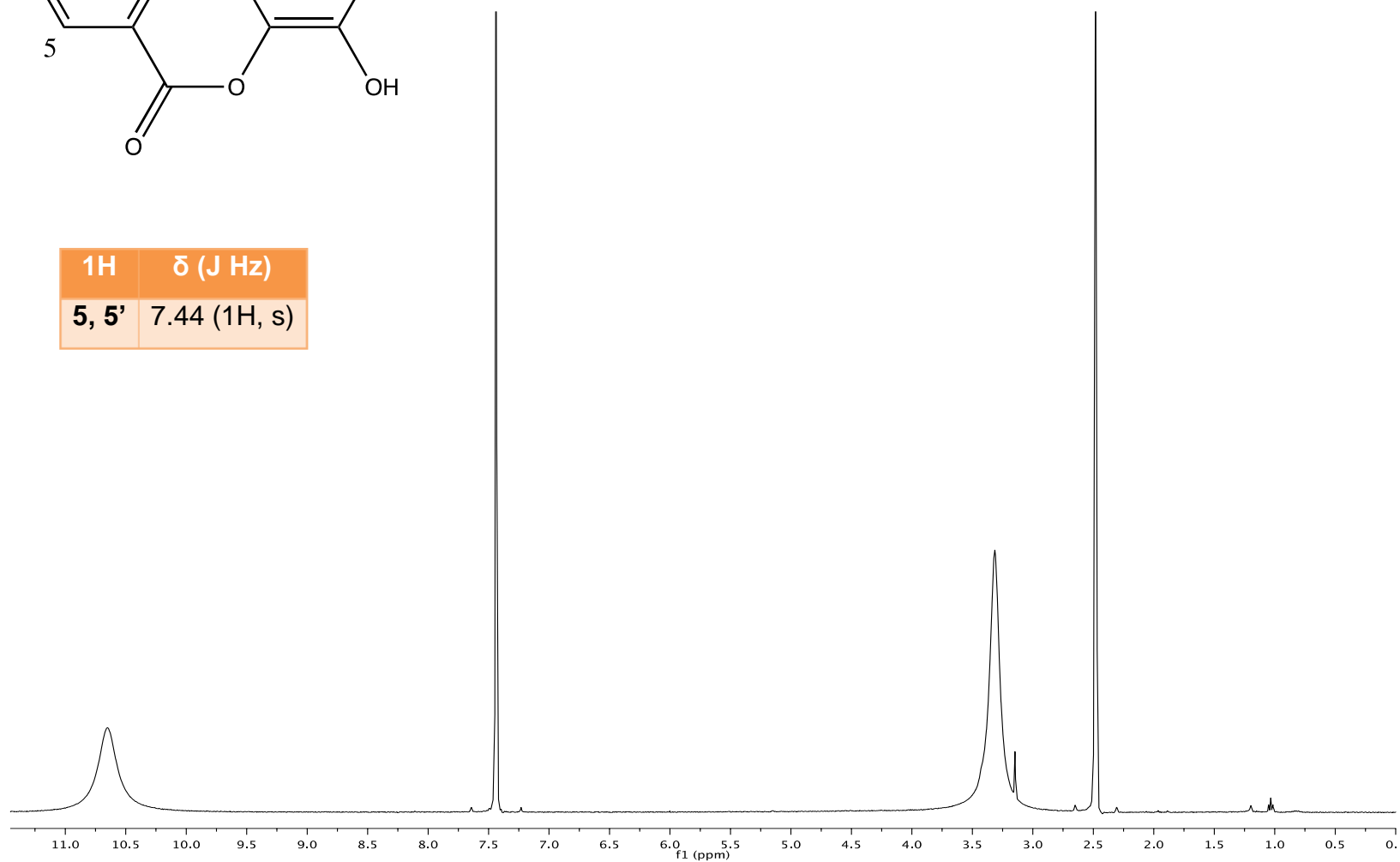
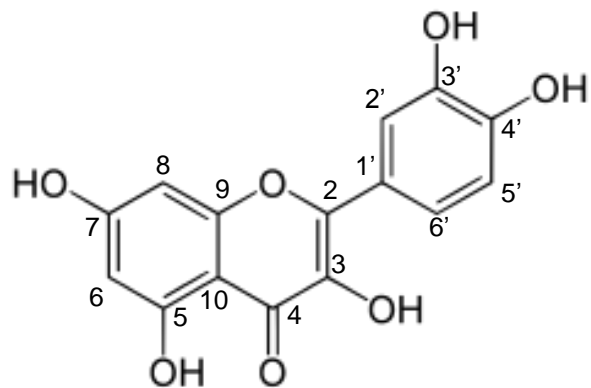


Figura 20. Espectro RMN-¹H del ácido elálgico (2), DMSO-*d*₆, 400MHz.



1H	δ (J Hz)
5	12.49 (1H, s)
6	6.18 (1H, d, $J = 4.0$ Hz)
8	6.41 (1H, d, $J = 4.0$ Hz)
2'	7.68 (1H, d, $J = 4.0$ Hz)
5'	6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
6'	7.54 (1H, dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz)

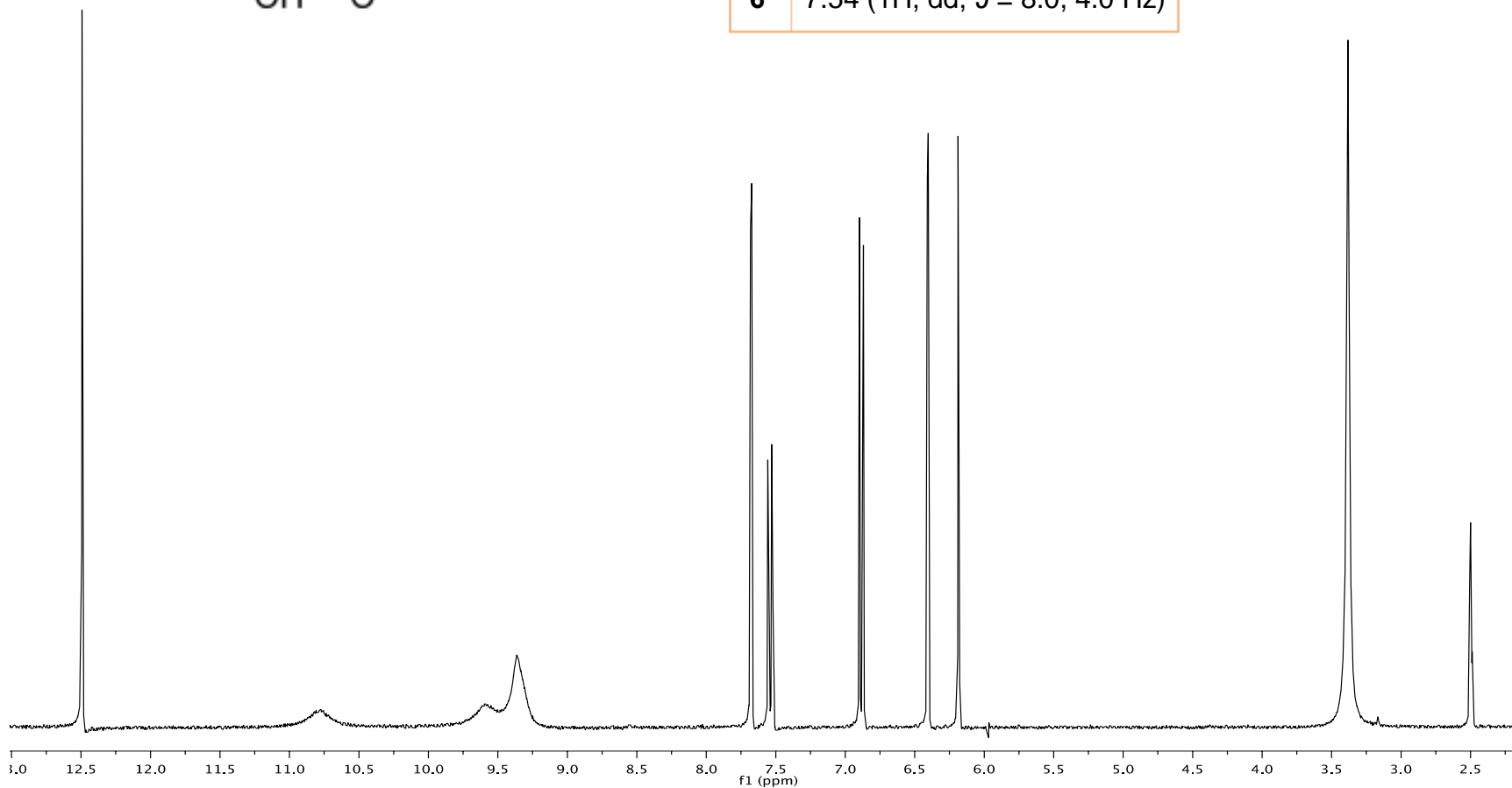


Figura 21. Espectro RMN- ^1H de la quercetina (3), DMSO- d_6 , 400MHz

CONCLUSIONES

El estudio químico del fruto de *Psidium friedrichsthalianum* recolectado en Villahermosa, Tabasco, permitió el aislamiento de los compuestos polifenólicos: ácido gálico (**1**), ácido elágico (**2**) y quercetina (**3**).

Por otro lado, la prueba de difusión en agar permitió determinar que el extracto MeOH/H₂O (70:30) del fruto de la guayaba agria 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, los cuales son comparables a los determinados para el control positivo digluconato de clorhexidina (0.12 %).

Se determinó que las CMI's del extracto metanol-agua (70:30) del fruto de la guayaba agria (EMF) para *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* se encuentran en un rango de entre 0.5 y 2.0 mg/mL, lo cual permitió confirmar que el EMF posee actividad antibacteriana. Al realizar un fraccionamiento primario, se determinaron las CMI's para cada una de las fracciones obtenidas, estableciendo que la fracción butanólica (**F-III**) posee la mejor actividad, ya que su CMI es de 1 mg/mL para todas las bacterias de prueba. De manera análoga se realizó un fraccionamiento secundario y se determinó que la fracción **3C** es la más activa al presentar CMI's en un rango de 0.5 a 1.5 mg/mL. Finalmente, la evaluación de los compuestos aislados, estableció que la quercetina y el ácido elágico son activos contra las tres bacterias estudiadas, ya que sus CMI's se encuentran en un rango de 0.25 a 1.0 mg/mL, mientras que el ácido gálico solamente es activo frente a *S. mutans* y *S. sanguinis* con CMI's de 0.5 mg/mL.

En cuanto al efecto sobre el crecimiento bacteriano de *S. mutans*, se determinó que la fracción butanólica, el extracto metanol-agua (70:30) y la quercetina (0.1 mg/mL) inhiben la fase de crecimiento exponencial de la bacteria estudiada. Mientras que en el caso del ácido gálico y elágico pudo observarse una inhibición parcial del crecimiento bacteriano en las dos concentraciones utilizadas.

Asimismo, se determinó que en un medio de cultivo que no ha sido enriquecido con glucosa, la adición de quercetina (0.1 mg/mL) inhibe parcialmente la producción de ácido de *S. mutans* con respecto al control, mientras que en un medio enriquecido con glucosa, la quercetina inhibe la producción de ácido de manera comparable al digluconato de clorhexidina (0.12 %).

Finalmente, al evaluar el efecto del EMF y la fracción butanólica sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans*, se determinó que el primero inhibe dicha formación en un 33 %, mientras que la FBF la inhibe en un 66 % a una concentración de 0.1 mg/mL y en un 80 % a una concentración de 1.0 mg/mL.

Los resultados obtenidos permiten proponer al extracto metanol-agua (70:30) de la guayaba agria como una fuente de compuestos con actividad sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

PERSPECTIVAS

- Determinar el mecanismo mediante el cual el extracto metanol-agua (70:30) de los frutos de la guayaba agria y los compuestos aislados inhiben la formación de biopelícula mono especie producida por *Streptococcus mutans*.
- Determinar el efecto del extracto y de los compuestos puros sobre un número más amplio de bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras.
- Determinar el efecto del extracto y los compuestos puros sobre las bombas de eflujo de bacterias resistentes a antibióticos.
- Aislar los componentes minoritarios presentes en la fracción butanólica derivada del extracto metanol-agua (70:30) de los frutos de la guayaba agria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ban, S.H., Kim, J.E., Pandit, S., Jeon, J.G., 2012. Influences of *Dryopteris crassirhizoma* extract on the viability, growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Molecules* 17: 9231–44.
- Baraona, M., 1995. Desarrollo del jocote (*Spondias purpurea* L.) y del cas (*Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedz) En el bosque húmedo premontano de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 6: 23–31.
- Barrientos, L., Herrera, C.L., Montenegro, G., Ortega, X., Veloz, J., Alvear, M., Cuevas, A., Saavedra, N., Salazar, L.A., 2013. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 577–585.
- Beighton, D., 2005. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 33: 248–255.
- Bowen W. H., Koo H., 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research* 45: 69–86.

- Bowen, W.H., 2002. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13: 126–131.
- Castillo-García, E., Martínez-Solís, I., 2007. *Manual de fitoterapia*. Elsevier, Barcelona, España.
- Castrillón, L., 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Revista Mexicana* 54: 14–24.
- Chyau, C.C., Chen, S.Y., Wu, C.M., 1992. Differences of volatile and nonvolatile constituents between mature and ripe guava (*Psidium guajava* Linn.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 846–849.
- Ciardi, J.E., Rosenthal, A.B. and Bowden, W.H., 1981. Rapid quantitative determination of the effect of antiplaque agents and antisera on the growth, acid production and adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 60: 756–762.
- Cordero, J., Boshier, D., Barrance, A., 2003. *Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Oxford Forestry Institute, 813–816.

- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J.P., Hernández-Arroyo, M., Artega-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J.F., 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica* 15: 123–136.
- Cury, J.A., Rebelo, M.A., Derbyshire, M.T., Tabchoury, C.P., 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Research* 34: 491–497.
- Diaz, C., 2011. Descripción de biofilm, desarrollo e importancia de su estudio. Impacto de las técnicas de micro-nanofabricación en sistemas biológicos. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Facultad de Ciencias Exactas, 4–14.
- Duarte, S., Gregoire, S., Singh, A., Vorsa, N., Schaich, K., Bowen, W., Koo, H., 2006. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 257: 50–56.
- Duarte, S., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Schobel, B.D., Nino-de-Guzman, P., Bowen, W.H., Koo, H., 2005. Influence of cranberry on virulence factors associated with dental caries. *Journal of Dental Research* 84: (spec issue A): 2791.

- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623–633.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.-B., Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., Foronjy, R.F., D'Armiento, J.M., Kennelly, E.J., 2013. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chemistry* 141: 889–895.
- Geilfus, F., Bailón, P., 1994. El árbol al servicio del agricultor. Volumen 2. Guía de especies. Enda-Caribe, 167.
- Giacaman, R.A., Muñoz-Sandoval, C., Bravo González, E., Farfán-Cerda, P., 2013. Cuantificación de bacterias relacionadas con la caries dental en saliva de adultos y adultos mayores. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 6: 71–74.
- Götz, F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43: 1367–1378.
- Gutierrez, R.M.P., Mitchell, S., Solis, R.V., 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 1–27.

- Hamada, S., Slade, H.D., 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews* 44: 331–384.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 2001. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Medical Microbiology* 50: 299–302.
- Jeon, J.G., Rosalen, P.L., Falsetta, M.L., Koo, H. 2011. Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Research* 45: 243–263.
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., Biggs, C., 2011. “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1869–1881.
- Kinghorn, D., Roberts, S.K., Wu, C.D., 2005. Composition containing berberine or a derivative thereof and an antimicrobial agent or an antibiotic agent, and their use for treating oral pathogens and other disorders. Patent WO 2004093876 A2.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.S., Foster, J.S., Palmer, R.J.Jr., 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 486–505.

- Lim, T.K., 2012. *Psidium friedrichsthalianum*, Edible Medicinal And Non Medicinal Plants. Springer Netherlands, 681–683.
- Loesche, W.J., 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews 50: 353–380.
- López, J., San-Román, J.A., Revilla, S., Vilacosta, I., Luaces, M., Sarriac, C., Gómez, I., Fernández-Avilés, F., 2005. Perfil clínico, ecocardiográfico y pronóstico de las endocarditis izquierdas por *Streptococcus viridans*. Revista Especialidades en Cardiología 58: 153–158.
- Mani, A., Mishra, R., Thomas, G., 2011. Elucidation of Diversity among *Psidium* Species using Morphological and SPAR methods. Journal of Phytology 3: 53–61.
- Marsh P.D., 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 149: 279–294.
- Miranda-Cruz, E., Centurión-Hidalgo, D., Alor-Chávez, M.d.J., Espinosa-Moreno, J., Velázquez-Martínez, J.R., 2012. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11: 354–361.

- Mitscher, L., 2000. Some Transpacific Thoughts on the Regulatory Need for Standardization of Herbal Medical Products. *Journal of Food and Drug Analysis* 8: 229–234.
- Napolitano, J.G., Lankin, D.C., Chen, S.N., Pauli, G.F., 2012. Complete ¹H NMR spectral analysis of ten chemical markers of Ginkgo biloba. *Magnetic Resonance in Chemistry: MRC* 50:569–75.
- Nassar, H.M., Li, M., Gregory, R.L., 2012. Effect of Honey on *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 536–540.
- Negroni, M., 2009. *Microbiología Estomatológica*. Ed. Médica Panamericana, Segunda Edición, 275–295.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology* 54: 49–79.
- Palma-Cárdenas, A., Aguilera, F.S., 2007. Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica. Editorial Thomson, 153–157.

- Pino, J.A., Marbot, R., Vázquez, C., 2001. Characterization of Volatiles in Strawberry Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5883–5887.
- Pino, J.A., Marbot, R., Vazquez, C., 2002. Characterization of Volatiles in Costa Rican Guava [*Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu] Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6023–6026.
- Pino, J.A., Ortega, A., Rosado, A., 1999. Volatile Constituents of Guava (*Psidium guajava* L.) Fruits from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 11: 623–628.
- Prabu, G.R., Gnanamani, A. Sadulla, S. 2006. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1364–5072.
- Quivey, R.G., Jr., Kuhnert, W.L., Hahn, K., 2000. Adaptation of oral *streptococci* to low pH. *Advances in Microbial Physiology* 42: 239–274.
- Reller, L.B. y Weinstein, M., 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical and Infectology Disease* 49: 1749–1755.

- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23: 127–149.
- Rivero-Cruz, J.F., 2012. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology* 141: 860–865.
- Rocha Gracia, R.d.C., 2006. Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero II. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, 27–44.
- Rodríguez, C., 2011. Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Sakaue, Y., Domon, H., Oda, M., Takenaka, S., Kubo, M., Fukuyama, Y., Okiji, T., Terao, Y., 2016. Anti-biofilm and bactericidal effects of magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. *Microbiology and Immunology* 60:10–6.
- Samaranayake, L., 2011. Essential Microbiology for Dentistry. Elsevier Health Sciences UK, 271–274.

- Sánchez-Vindas, P., 1990. *Myrtaceae*. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A.C. University of California 62: 117–118.
- Sanda, K.A., Grema, H.A., Geidam, Y.A., Bukar-Kolo, Y.M., 2011. Pharmacological Aspects of *Psidium guajava*: An Update. International Journal of Pharmacology 7: 316–324.
- Sauer, H., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., Gilbert, P., 2004. Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. Journal of Bacteriology 186: 7312–7326.
- Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración, 2009. Manual de Higiene Bucal, Editorial Médica Panamericana, 1–7.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E.L., 2004. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54: 86–89.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2007. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina 332–333.
- Uzcudun, I., 2004. Biofilms bacterianos. Actualidad Sociedad Española de Microbiología 37: 14–18.

- Vernin, G., Vernin, C., Pieribattesti, J.C., Roque, C., 1998. Analysis of the Volatile Compounds of *Psidium cattleianum* Sabine Fruit from Reunion Island. *Journal of Essential Oil Research* 10: 353–362.
- Wei, G.-X., Campagna, A., Bobek, L., 2006. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 1100–1109.
- Weiss, E.L., Lev-Dor, R., Sharon, N., Ofek, I., 2002. Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42: 285–292.
- Wittpahl, G., Kölling-Speer, I., Basche, S., Herrmann, E., Hannig, M., Speer, K., Hannig, C., 2015. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Medica Journal*.
- Yamanaka, A., Kimizuka, R., Kato, T., Okuda, K., 2004. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral *streptococci* and biofilm formation. *Molecular Oral Microbiology* 19: 150–154.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Discover Life a través de [<http://www.discoverlife.org/>]
- INEGI a través de [<http://www.inegi.org.mx>]
- Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales a través de [<http://www.stri.si.edu/>]
- Missouri Botanical Garden a través de [<http://www.missouribotanicalgarden.org/>]
- OMS a través de [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>] Salud Bucodental. Nota informativa N°318. Febrero de 2007