

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPUESTOS MARCADORES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
LA ESPECIE *Byrsonima crassifolia* L. (Malpighiaceae) H. B. K.**

**T E S I S   M A N C O M U N A D A  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A N :  
BENÍTEZ MONTUFAR GUADALUPE  
CASIMIRO ZAMORA XÓCHITL**

**MÉXICO, D.F.**

**2007**

**JURADO ASIGNADO:**



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.

Presidente      Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
Vocal            Dra. Rachel Mata Essayag  
Secretario      Dr. José Fausto Rivero Cruz  
1er. Suplente   Q.F.B. Sergio Ismael Martínez Luis  
2do. Suplente   Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124. Edificio E.  
Facultad de química. UNAM.

Asesor:

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentantes:

---

Benítez Montufar Guadalupe

---

Casimiro Zamora Xóchitl

**AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por nuestra formación como profesionistas.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz por el tiempo invertido en este trabajo y hacer realidad este proyecto de investigación, por guiarnos con paciencia en nuestro camino hasta la culminación de esta meta.

Un agradecimiento especial a la Dra. Rachel Mata Essayag como fuente de inspiración y apoyo en este proyecto de investigación. Gracias por sus valiosos consejos para la realización de esta tesis.

Este trabajo se realizó con el apoyo económico de los proyecto PAPIIT IN208207.

Al personal técnico de la USAI por el registro y análisis de los distintos espectros utilizados en el presente proyecto.

A los investigadores que convivieron con nosotras en el laboratorio 124, por sus consejos, ayuda y por compartirnos su experiencia.

A la Dra. Christine D. Wu del Departamento de Periodontología de la Universidad de Illinois en Chicago por la determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados.

A la Dra. Esperanza Carcaché de Blanco del Departamento de Farmacia Práctica de la Universidad Estatal de Ohio en Columbus por el registro de los espectros de FAB modalidad positiva.

## INDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABLAS</b>	
<b>LISTA DE DIAGRAMAS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 COMPUESTOS MARCADORES	3
2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS	5
2.2.1 Definición	5
2.2.2 Tipos y formas de infección	5
2.2.3 Impacto de las enfermedades infecciosas en la actualidad.	6
2.2.4 Enfermedades infecciosas en México	7
2.2.5 Enfermedades orales de origen microbiano.	8
2.2.6 Compuestos antimicrobianos aislados de plantas	13
2.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Byrsonima</i>	16
2.3.1 Estudios fotoquímicos previos del género <i>Byrsonima</i>	16
2.4 <i>Byrsonima crassifolia</i> L. (Malpighiaceae)	23
2.4.1 Características fotoquímicas y etnobotánicas de la especie.	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	37
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	39
4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES	39
4.1.1 Análisis cromatográficos	39
4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	39
4.2 MATERIAL VEGETAL	40
4.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	40
4.3.1 Preparación del extracto íntegro de la corteza de <i>B. crassifolia</i> .	40
4.3.2 Fraccionamiento primario del extracto.	41
4.3.2.1 Obtención del compuesto JR-K001 ( $\beta$ -amirina)	42
4.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción D005	42
4.3.3.1 Obtención del compuesto JR-K002 (ácido betulínico)	43
4.3.3.2 Obtención del compuesto JR-K005 (ácido oleanólico)	43

4.3.3.3 Obtención del compuesto JR-K003 ((-)-epicatequina)	43
4.3.3.4 Obtención del compuesto JR-K007 (quercetina)	44
4.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción FIII	44
4.3.4.1 Obtención del compuesto JR-K004 (betulina)	45
4.3.5 Fraccionamiento terciario de la fracción FI	45
4.3.5.1 Obtención del compuesto JR-K006 ( $\beta$ -sitosterol)	46
4.4 SINTESIS DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO OLEANÓLICO	47
4.4.1 Acetilación del ácido oleanólico	47
4.4.2 Metilación del ácido 3-acetiloleanólico	47
4.4.3 Metilación del ácido oleanólico	48
4.4.4 Preparación de la sal sódica del ácido oleanólico.	48
4.5 ENSAYO BIOLÓGICO	48
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>6. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i>	23
2	Distribución de la especie <i>Byrsonima crassifolia</i> en México	24
3	Compuestos aislados de la fracción activa D005	52
4	Estructura de los derivados del ácido oleanólico	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Morbilidad hospitalaria por principales grupos de causas de egresos 2002, 2003, 2004 en la República Mexicana	7
2	Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades 2000 a 2004 en la República Mexicana	8
3	Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas	14
4	Metabolitos secundarios encontrados en el género <i>Byrsonima</i>	17
5	Características etnobotánicas y taxonómicas de <i>Byrsonima crassifolia</i>	25
6	Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie <i>Byrsonima crassifolia</i>	26
7	Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción D005 por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i>	42
8	Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción FIII por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 obtenida a partir del extracto de la corteza de <i>B. crassifolia</i> .	45
9	Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción FI por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de <i>B. crassifolia</i>	46
10	Resumen del fraccionamiento cuaternario de la fracción FI-IX por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de <i>B. crassifolia</i> .	46
11	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto de las fracciones sobre las bacteria <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	50
12	Actividad antimicrobiana (CMI) de los compuestos aislados y derivados	53

	del ácido oleanólico sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	
13	Actividad antimicrobiana (CMI) de los derivados del ácido oleanólico sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	54

### LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama		Página
1	Proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto total de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> .	41



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
cm	Centímetro
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en Capa Fina
δ	Desplazamiento químico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CG	Cromatografía de gases
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Doblete
dd	Doblete dobleteado
EM-FAB	Espectroscopia de masas de bombardeo de Átomos rápido
EM-IE	Espectroscopia de masas de Impacto Electrónico
F.M.	Fórmula Molecular
°C	Grado centígrado
g	Gramo
HPTLC	Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficiencia
hrs	Horas
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro

min	Minuto
MHz	Mega Hertz
m	Multiplete
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
P.M.	Peso Molecular
p.f.	Punto de fusión
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singulete
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas con fines curativos data de tiempos inmemoriales y ha constituido el principal recurso para procurar la salud de la población, incluso en la actualidad siguen representando una proporción considerable de los remedios que se utilizan. A principios del siglo XX con el desarrollo de la química y de complejos sistemas de síntesis orgánica, aparecieron medicamentos con moléculas puras sintetizadas en el laboratorio, muchas de ellas a partir de plantas medicinales o de la purificación de éstas. Algunos vegetales también se emplean para la extracción de constituyentes inactivos que son transformados químicamente en ingredientes activos de los medicamentos. También hay una proporción considerable de medicamentos que contienen extractos totales o semi-purificados de las porciones terapéuticamente activas de las plantas medicinales (hojas, raíces, semillas, etc.), principalmente porque no se ha logrado purificar o demostrar la sustancia activa principal o más frecuentemente porque su acción terapéutica no depende de una única sustancia, sino de la sinergia de varios componentes (COFEPRIS, 2005).

En todo el mundo, incluyendo a México, la medicina tradicional incorpora en su arsenal terapéutico el uso de plantas medicinales cuya utilidad y método de preparación y administración se transmite muchas veces en forma verbal. En poblaciones de Asia, África y Latinoamérica este tipo de medicina se utiliza frecuentemente para atender las necesidades primarias de salud. En este aspecto China e India son probablemente los países más importantes porque sus médicos se preparan formalmente en esta disciplina; se estima que alrededor de 40% de los habitantes de China, o sea más de 500 millones de personas, se atienden regularmente con este sistema (COFEPRIS, 2005; Leonti et al., 2001).

Algunos países han reglamentado la medicina herbolaria y sus productos formales se han recopilado en las farmacopeas correspondientes, catálogos u otras publicaciones. En Asia destaca China con 5000 años de tradición de medicina herbolaria ahora formal; y en Europa, Alemania cuenta con una farmacopea herbolaria extensa (COFEPRIS, 2005)

En México existe ya una Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos publicada en el año 2001 que incluye monografías de plantas o de las partes que se usan en los medicamentos herbolarios (COFEPRIS, 2005).

La proliferación de productos naturales en el comercio nacional depende sobre todo de la creencia de que son inocuos, ya que “si son naturales no pueden hacer daño”. Este equívoco lo fomenta la publicidad que capitaliza la idea. Aunque el perfil de seguridad generalmente es muy favorable, algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional poseen efectos tóxicos suficientemente marcados para que hayan sido regulados; por ejemplo: en los Estados Unidos de América, en 1980 se prohibieron 36 plantas (FDA, 1980). En México, en 1999 se prohibió el uso de 76 plantas en la elaboración de infusiones y en suplementos alimenticios debido a su toxicidad (Diario Oficial de la Federación, 1999); en España, en 2004 se limitó el uso de 197 plantas (Boletín Oficial del Estado Ministerio de Sanidad y Consumo, 2004). En resumen, los productos naturales pueden en algunos casos ser nocivos para la salud y no son necesariamente inocuos.

La investigación de los productos naturales está generalmente basada en información etnobotánica y muchos de los fármacos usados hoy en día fueron desarrollados a partir de plantas medicinales usadas en sociedades indígenas (Leonti et al., 2001). Más importante aún es el estudio de estos recursos para contribuir a un mejor cuidado de la salud en zonas marginadas, lo cual se ha convertido en un objetivo central de la investigación etnofarmacológica moderna (Leonti et al., 2001). Aunque generalmente se asume que las plantas medicinales usadas por las culturas indígenas tienen efectos benéficos para la salud, existe poca evidencia empírica que corrobore esta idea. La mayor parte de la investigación etnofarmacéutica de los años recientes se ha dirigido a una mejor comprensión de los efectos farmacológicos de las plantas medicinales individuales (Leonti et al., 2001)

México, al igual que otras naciones, utiliza una amplia variedad de terapia herbolaria tradicional. En diferentes regiones del país hay plantas que se utilizan para tratar diversos padecimientos y algunas de ellas tienen evidencia de su eficacia y seguridad. Sin embargo, muy pocas han sido sujeto de una investigación formal que: identifique las sustancias marcadoras útiles para estandarizarlas, precisen sus diversos componentes, estudie sus actividades terapéuticas *in vitro* o en animales de experimentación (o ambos), valore la eficacia y la seguridad de la parte “activa” de la planta o de sus extractos o componentes identificados, y que la lleve a ser el principio activo de una formulación farmacéutica (COFEPRIS, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 COMPUESTOS MARCADORES

Los compuestos marcadores se definen como constituyentes presentes en una especie que son característicos de la misma y que pueden ser usados para garantizar la calidad de los productos naturales (Eisner et al., 2001).

Los compuestos marcadores son poderosas herramientas para asegurar la calidad y la reproducibilidad lote a lote de productos derivados de plantas medicinales. De acuerdo con la legislación europea, los compuestos marcadores poseen las siguientes características:

- Son productos característicos del metabolismo secundario; están presentes en cantidad suficiente tanto en la materia prima como en el producto terminado.
- La identificación y cuantificación de los mismos debe ser posible mediante el empleo de técnicas analíticas convencionales (CG, CLAE y HPTLC).
- Deben de ser estables bajo las condiciones de almacenamiento y estar disponibles comercialmente; si éste último no fuese el caso, los marcadores deben ser de fácil separación a partir de sus fuentes naturales (Bone et al., 2001; Flaster y Lassiter et al., 2004; Reif et al., 2004; Sharpless et al., 2004; WHO, 1999).

Los usos más relevantes de los compuestos marcadores son:

#### **-Identificación:**

Cuando éstos se detectan en un material vegetal ayudan a confirmar la identidad del mismo debido a que se encuentran restringidos a pocas especies o a una sola parte de la planta.

### **-Detección de la adulteración:**

Cuando se sabe que una planta suele adulterar a otra, se buscan los compuestos marcadores de ésta para corroborar o descartar la adulteración.

### **-Indicadores de calidad del producto durante la manufactura, manejo y almacenamiento:**

Durante los procesos de manufactura, manejo y almacenamiento el material vegetal suele ser expuesto al calor, humedad, oxígeno o contaminación microbiana. Estos factores pueden causar la pérdida de ciertas propiedades del material vegetal e incluso su descomposición. La presencia de los compuestos marcadores y su cuantificación son herramientas que permiten un análisis objetivo de la calidad del producto y su manipulación.

### **-Control de calidad de mezclas de plantas:**

A través del uso de compuestos marcadores es posible cuantificar el contenido de una planta en una mezcla de ellas; para ello es necesario cuantificar el compuesto marcador contenido en la materia prima antes de mezclarla con otros materiales y posteriormente utilizar este dato como control.

### **-Vida de anaquel:**

La vida de anaquel del producto puede determinarse monitoreando la degradación de los compuestos marcadores.

### **-Control de la actividad farmacológica:**

Cuando los compuestos marcadores poseen la actividad farmacológica atribuida a la planta, el análisis de éstos puede ayudar a asegurar que cada lote del producto tendrá el mismo efecto biológico.

## **2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

### **2.2.1 Definición**

Una infección es un proceso de invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en un tejido o parte del cuerpo, dando lugar a síntomas que pueden ser leves y afectar localmente un tejido o incluso desencadenar una serie de reacciones celulares y mecanismos de toxicidad que lleven a la muerte (Restrepo et al., 2003).

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos, el hospedero humano y el medio ambiente. La capacidad inmune y no inmune del hospedero para defenderse, la susceptibilidad genética, el medio ambiente con sus factores físicos, culturales y económicos; y la capacidad de los microorganismos de causar infección mediante sus factores virulentos, son variables que determinan la frecuencia, el predominio y el control de las enfermedades infecciosas en la población humana (Restrepo et al., 2003).

### **2.2.2 Tipos y formas de infección**

Los microorganismos pueden producir infecciones localizadas o generalizadas. Algunas infecciones, como el sarampión, la malaria, la fiebre tifoidea y la fiebre amarilla, afectan todo el organismo mientras que otras como la faringitis o la otitis, comprometen un solo órgano o sistema del cuerpo (FUNCEI, 2004).

Las infecciones más frecuentes, incluido el resfrío común, son locales y afectan el tracto respiratorio superior. Otros sitios comunes de infección son el aparato digestivo, los pulmones, el sistema reproductivo y urinario, los ojos y los oídos. Las infecciones locales pueden ser graves y causar enfermedades serias si afectan órganos vitales como el corazón, el cerebro o el hígado y además, pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y provocar síntomas generalizados (Koneman et al., 1999; FUNCEI, 2004).

Las vías más comunes por las cuales los agentes infecciosos ingresan en el cuerpo son: contacto directo con una superficie contaminada, contacto piel a piel, inhalación de microorganismos aerobios, ingestión de agua o comida contaminadas, heridas, por medio

de vectores tales como los insectos, contacto sexual sin protección, y transmisión de madre a hijo durante el pasaje por el canal de parto (FUNCEI, 2004).

### **2.2.3 Impacto de las enfermedades infecciosas en la actualidad.**

El desarrollo de un gran número de medicamentos antimicrobianos ha tenido un papel importante en la lucha contra las enfermedades infecciosas. En menos de un siglo, el promedio de vida en los países industrializados ha aumentado de 50 a más de 70 años, la mortalidad infantil ha disminuido casi el 75% y muchas enfermedades, algunas de ellas fatales, han desaparecido o son fácilmente curables. En este sentido, el progreso médico ha tenido un rol muy importante. Sin embargo, a pesar de los numerosos avances logrados en la erradicación y el control de muchas infecciones, el ser humano permanece aún vulnerable frente a un amplio rango de enfermedades, de las cuales las enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes son una de las principales causas de muerte entre las personas de bajos recursos económicos (Gibbons et al., 2004).

Por otro lado, algunos microorganismos se han tornado resistentes debido a que los antimicrobianos suelen ser mal utilizados y cuanto más se recurre a ellos, es más probable que surjan nuevas familias de microorganismos resistentes. Este problema se manifiesta en infecciones que presentan una resistencia cada vez mayor a los antibióticos y, por lo tanto, son más difíciles de curar. Aunado a lo anterior, algunos factores, como la superpoblación y la facilidad actual para viajar a diferentes regiones del mundo, favorecen la propagación de los agentes infecciosos como nunca antes. Grandes rebrotes epidémicos de viejas enfermedades como el Cólera, la Malaria, el Dengue, y las enfermedades nuevas como el SIDA, Tuberculosis resistente a la quimioterapia y enfermedades persistentes, son algunos de los ejemplos de este panorama (FUNCEI, 2004).

En los países en desarrollo estas enfermedades siempre han sido un problema epidemiológico importante y desde hace tiempo el tema ha recobrado inusitada vigencia en la agenda de las políticas públicas debido a su impacto en la carga de morbilidad y mortalidad, por lo que las enfermedades infecciosas se consideran un enorme desafío técnico, político y organizacional al que los gobiernos dirigen una gran cantidad de estrategias y recursos con la finalidad de fortalecer las capacidades de previsión y respuesta por parte de la población (SSA, 2005; FUNCEI, 2004).



## 2.2.4 Enfermedades infecciosas en México

La Secretaría de Salud ha dado a conocer estadísticas acerca de la prevalencia de enfermedades en México, entre ellas destacan las diferentes enfermedades infecciosas. A continuación, en la Tabla 1, se presenta la morbilidad hospitalaria por principales grupos de causas de egresos en el período 2002-2004 en la República Mexicana. Así mismo, en la Tabla 2, se muestra la tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades en el período 2000-2004.

**Tabla 1.** Morbilidad hospitalaria por principales grupos de causas de egresos 2002, 2003 y 2004 en la República Mexicana.

<b>Grupos principales de causas de egresos</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>Total</b>	<b>4 228 621</b>	<b>4 353 429</b>	<b>4 416 313</b>
Causas maternas <sup>a</sup>	1 432 021	1 457 133	1 477 902
<b>Enfermedades digestivas</b>	<b>437 117</b>	<b>460 369</b>	<b>472 082</b>
<b>Enfermedades del sistema genitourinario</b>	<b>306 043</b>	<b>318 600</b>	<b>327 503</b>
Enfermedades cardiovasculares	209 658	221 538	222 589
Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	183 089	184 881	182 734
<b>Infecciones respiratorias</b>	<b>147 962</b>	<b>136 755</b>	<b>155 592</b>
Fracturas	137 803	142 664	145 347
<b>Enfermedades infecciosas y parasitarias</b>	<b>143 322</b>	<b>145 127</b>	<b>138 527</b>
Tumores malignos	124 978	129 535	135 708
Otras causas de contacto con los servicios de salud	132 311	131 992	132 376
Diabetes mellitus	120 577	126 684	128 036
<b>Enfermedades respiratorias</b>	<b>122 892</b>	<b>128 046</b>	<b>126 743</b>
Otros tumores	107 236	114 633	118 085
Enfermedades del sistema músculo esquelético	50 294	105 257	107 517
Trastornos mentales y enfermedades del sistema nervioso	81 941	83 408	83 199
Otras causas	491 377	466 807	462 373

NOTA:

<sup>a</sup>

FUENTE:

Con base en el último año se consideran las quince principales causas de egreso hospitalario.

Se refiere a las causas relacionadas al embarazo, parto y puerperio.

SSA. *Boletín de Información Estadística. Daños a la salud. Volumen II.* Núm. 22, 23 y 24. México, D.F.

**Tabla 2.** Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades en la República Mexicana (2000 a 2004)

(Por 100 mil habitantes)	2000	2001	2002	2003	2004
<b>Causa de casos nuevos de enfermedad</b>					
<b>Infecciones respiratorias agudas</b>	<b>29 427.3</b>	<b>27 980.5</b>	<b>28 874.3</b>	<b>25 948.9</b>	<b>24 581.3</b>
<b>Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas</b>	<b>5 203.3</b>	<b>5 283.3</b>	<b>5 250.2</b>	<b>4 684.0</b>	<b>4 535.5</b>
<b>Infección de vías urinarias</b>	<b>2 967.1</b>	<b>3 240.5</b>	<b>3 276.0</b>	<b>3 154.2</b>	<b>3 228.2</b>
Úlceras, gastritis y duodenitis	1 284.1	1 393.5	1 413.6	1 281.7	1 365.7
Amebiasis intestinal	1 353.4	1 237.8	1 124.8	972.6	792.2
<b>Otitis media aguda</b>	<b>614.6</b>	<b>643.2</b>	<b>693.9</b>	<b>695.6</b>	<b>675.3</b>
Hipertensión arterial	401.4	407.8	418.8	478.2	529.8
Otras helmintiasis	735.2	646.5	580.6	524.4	498.0
Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	287.2	291.3	308.6	365.0	384.0
Varicela	377.1	235.5	282.7	307.0	365.8
<b>Gingivitis y enfermedad periodontal</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>276.0</b>	<b>350.0</b>
<b>Candidiasis urogenital</b>	<b>302.5</b>	<b>325.8</b>	<b>354.8</b>	<b>346.3</b>	<b>330.9</b>
Asma y estado asmático	261.0	275.2	274.6	289.1	289.5
Intoxicación por picadura de alacrán	ND	221.7	231.7	233.4	218.5
<b>Faringitis y amigdalitis estreptocócicas</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>573.9</b>	<b>201.7</b>

NOTA: Con base en el último año se consideran los quince principales casos nuevos de enfermedades.

ND No disponible.

FUENTE: SSA. SUIVE. Dirección General de Epidemiología. www.dgepi.salud.gob.mx (24 de febrero del 2006).

### 2.2.5 Enfermedades orales de origen microbiano.

Enfermedades orales, incluyendo caries dentales, enfermedades periodontales (enfermedades de las encías, mandibulares y de los tejidos que soportan las dientes) y pérdidas de los dientes afectan a más personas que otra enfermedad en el mundo (Wu et al., 2002). Millones de personas en México y en el mundo padecen de estas enfermedades y desórdenes de la cavidad oral, las cuales resultan en sufrimiento y dolor; dificultad para hablar, masticar y/o tragar, por lo tanto se reflejan en detrimento de la nutrición, de la salud en general, y en casos extremos provocan la muerte (Gift et al., 1992; American Cancer Society, 1998). Muy cerca de la gripa común, las enfermedades dentales son la mayor causa de la pérdida de días de trabajo o de escuela, lo cual tiene un impacto negativo en la productividad y en la habilidad para aprender de los niños (Nacional Institute for Dental Research, 2005; Bloom et al., 1992). Las enfermedades o desórdenes orales pueden impactar significativamente la salud en general de las personas. Investigaciones recientes han demostrado que las bacterias orales pueden contribuir a incrementar el riesgo de ataques del corazón, infartos, enfermedades del pulmón y se les puede asociar con

nacimientos prematuros (Beck et al., 1998). La quimioterapia o radioterapia para el tratamiento del cáncer pueden dañar severamente las glándulas salivales dando como resultado boca seca con un incremento de las caries y otras infecciones orales (Bachia et al., 2004; Binkley et al., 2004; Doyle et al., 2005).

Los tratamientos para las enfermedades dentales y orales pueden ocasionar endocarditis infectivas con un porcentaje de mortalidad de 50%. La diabetes no controlada puede incrementar también el riesgo de enfermedades periodontales (Nacional Institute for Dental Research, 2005). En los pacientes con SIDA las infecciones orales fúngicas no solo afectan la salud en general, sino también amenazan sus vidas (Hollister et al., 1993; Kirkpatrick et al., 1998; Reichart et al., 2003). Así, la prevención efectiva de enfermedades orales puede tener un efecto significativo en la salud y bienestar de la población en general. Aún cuando la introducción del fluoruro ha resultado en la reducción de caries dentales, éstas continúan siendo la enfermedad infecciosa más común y especialmente prevalente en los niños y personas con xerostomía (boca seca) (Madinier et al., 1997; Nacional Institute of Dental Research, 2005). En adultos se ha determinado que la incidencia de caries en las raíces de los dientes se incrementa dramáticamente con la edad (Winston y Bhaskar, 1998). Por esta razón, el control de las caries es una de las tareas más importantes de la salud pública y todo indica que continuará así en un futuro cercano (Nacional Institute for Dental Research, 2005).

La flora en la cavidad oral está compuesta por bacterias, hongos y levaduras; de estos organismos las bacterias representan la mayor parte. En la boca se han identificado aproximadamente 350 especies de bacterias y este número continúa incrementándose debido a los avances recientes en biología molecular. Uno de los factores que permiten la existencia de esta cantidad de bacterias es el gran número de ambientes *intra*-orales presentes. En la cavidad oral se pueden encontrar diferentes poblaciones en la mucosa, en las superficies paraqueratinizadas de la mucosa (detrás de los labios y los carrillos, el paladar, la parte inferior de la lengua y de la boca), y en tejidos altamente queratinizados (interior del paladar, tejidos gingivales visibles adyacentes a los dientes y en el dorso de la lengua). Los dientes por si mismos contienen grupos de microorganismos, en las superficies adyacentes a la gingiva, en las superficies cubiertas por la gingiva (*gingival sulcus*) y dentro de las superficies irregulares de los dientes. Si se encuentran presentes, las prótesis

para reemplazar los dientes ofrecen nichos. Muchos de los microorganismos orales se encuentran presentes en la saliva, que es excretada por las glándulas sublinguales, submandibulares y las pequeñas glándulas accesorias ubicadas en los labios, los carrillos y el paladar.

Dentro de los grupos más representativos de bacterias que se encuentran presentes en la boca podemos mencionar a los siguientes: estreptococos (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis*), micrococos, peptoestreptococos, lactobacilos, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Veionella*, *Phorphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichium*, *Wolinella*, *Selenomonas* y *Treponema*. El grupo *mutans* de los estreptococos (SM), que se encuentra principalmente en la placa dental, se encuentra fuertemente implicado como uno de los agentes etiológicos de las caries dentales en humanos y animales de laboratorio (Petersen et al., 2004).

Estudios epidemiológicos indican la presencia de *Streptococcus mutans* en al menos el 90% de las muestras aisladas a partir de caries dentales en humanos, *Streptococcus sobrinus* representa la segunda especie detectada más común de estreptococos encontrados (Petersen et al., 2004; Phan et al., 2004). Entre los factores de virulencia más comunes de SM se pueden incluir la producción de ácidos y la habilidad para sintetizar glucanos adhesivos a partir de la sacarosa de la dieta utilizando glucosiltransferasas (GTF) y facilitando la formación de la placa dental así como su adhesión a la superficie de los dientes (Freedman et al., 1983; Curtiss et al., 1985; Loesche et al., 1986).

Además de las caries dentales, la gingivitis (inflamación de las encías) y las enfermedades periodontales afectan a cerca de la mitad de las personas entre los 18 y los 64 años (Rusell et al., 1998). Las enfermedades periodontales pertenecen al grupo de enfermedades inflamatorias crónicas ocasionadas por bacterias Gram-negativas anaeróbicas específicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* y otros) las cuales activan los mecanismos inmuno-inflamatorios en los tejidos periodontales; todo esto conduce a la destrucción del colágeno y el hueso que soporta los dientes (Genco et al., 1992; Rusell et al., 1998; Scannapeico et al., 2004). Lo anterior se manifiesta en la clínica como un enrojecimiento en la gingiva, desprendimiento de los tejidos blandos de los

dientes para producir bolsas periodontales, incremento de la movilidad de los dientes, pérdida de la habilidad para masticar y pérdida de los dientes (Genco et al, 1992).

La periodontitis se presenta en diferentes grados en los individuos (Tenouvo et al., 1987; Petersen et al., 2004). Las formas intermedias y medias de esta enfermedad son las que se encuentran ampliamente distribuidas entre la población, mientras que la forma más severa y destructiva afecta a aproximadamente el 10% de la población teniendo como resultado una severa morbilidad y mortalidad de los dientes antes de la edad madura. Como se ha mencionado previamente *Streptococcus mutans* es considerado uno de los agentes primarios que ocasiona las caries dentales. Sus principales factores de virulencia incluyen la adhesión, la producción de ácidos y la tolerancia a la acidez (Steinberg et al., 2004; 2005; Yamanaka et al., 2004). Esta bacteria produce glucosiltransferasas y sintetiza glucanos a partir de la glucosa (en particular glucanos insolubles en agua), los cuales actúan como mediadores de la adherencia de *S. mutans* y otras bacterias de la flora a la superficie de los dientes y contribuye a la formación de la placa dento-bacteriana. Las biocapas de la placa dental han sido implicadas como el factor etiológico primario de las caries dentales y enfermedades periodontales (Yamanaka et al., 2004).

Las biocapas, biofilms o biopelículas bacterianas se encuentran entre las comunidades de bacterias más extendidas en la naturaleza. Las podemos encontrar sobre las rocas, los tubos de metal que conducen agua u otros líquidos, en los forrajes que consumen los animales, los cálculos renales, la placa dentobacteriana y los lentes de contacto (Yamanaka et al., 2004; Wirtlin et al., 2005).

La mayoría de las bacterias (y algunos hongos) cuando se encuentran en ambientes poco favorables crecen como biocapas, incluidas en una matriz y adheridas a superficies. En las biocapas las bacterias difieren profundamente de las bacterias planctónicas o flotantes libres, las cuales producen las infecciones agudas, las que conocemos con los métodos tradicionales de la microbiología y combatimos con fagocitos, anticuerpos, vacunas y antibióticos. Consterton define a las biocapas como: comunidad de microbios construida por células irreversiblemente unidas a un sustrato o entre sí: embebidas en una matriz extracelular de sustancias polimerizadas producidas por ellas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y transcripción de genes. Las colonias que crecen en un medio sólido como el agar forman matriz extracelular pero no

son biocapa porque conservan el fenotipo de planctónica y no tienen en la colonia o libres, la resistencia característica de la comunidad sésil (Wilson et al., 1996; Wirtlin et al., 2005).

Las biocapas están formadas por un 15% de células y un 85% de matriz extracelular, generalmente polisacáridos; pueden contener también proteínas, ácidos nucleicos, restos de plaquetas, fibrina y calcio. En esta comunidad heterogénea y de estructura compleja, los microorganismos conviven, cooperan y se comunican por sistemas de señales (*quorum sensing*) que dirigen el fenotipo y regulan la expresión de genes que nunca se expresan en las formas planctónicas y que son los causantes de la resistencia a los antibióticos, al estrés ambiental y a las defensas del huésped (Hull et al., 1980; Kitagaki et al., 1983; Loesche et al., 1986).

Cuatro criterios se han propuesto para calificar a una biocapa como agente etiológico de una infección: la bacteria patógena está asociada a una superficie o adherida a un sustrato; el examen directo muestra las bacterias en cúmulos, incrustadas en una matriz propia o formada por componentes del huésped; la infección es localizada y, finalmente, la infección es resistente a los antibióticos pese a la sensibilidad de las formas planctónicas de la infección (Hull et al., 1980; Kitagaki et al., 1983; Loesche et al., 1986).

Los biofilms están implicados en las infecciones crónicas, lentas y resistentes a los tratamientos; se forman en superficies de tejidos naturales e implantes artificiales y explican características de las infecciones de válvulas cardíacas nativas o protésicas, prótesis articulares, catéteres diversos, cánulas, derivaciones ventrículo-peritoneales, DIUs, tubos endo-traqueales, etc., que son colonizados por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida* y otros oportunistas (Kinniment et al., 1996; Wilson et al., 1996; Steinberg et al., 2005).

Las endocarditis infecciosas de las válvulas cardíacas nativas están causadas, en su mayoría, por estreptococos y estafilococos comensales de la piel y de la boca. Las favorecen el daño mecánico del endotelio por turbulencia y el consecutivo depósito de plaquetas y fibrina (Hollister et al., 1993; Goh et al., 2003; Guan et al., 2003).

Actualmente, se realiza un extenso esfuerzo en la búsqueda de agentes anti-placa (Badria et al., 2004; Wu et al., 2004). Estos agentes incluyen: clorhexidina, antibióticos, iones metálicos, enzimas, substitutos del azúcar, extractos de sanguinaria y aceites esenciales, entre otros. El modo de acción más frecuente es la reducción de la formación de

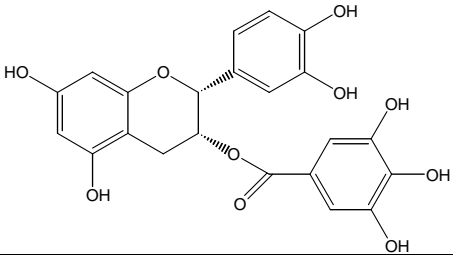

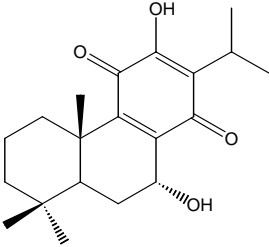
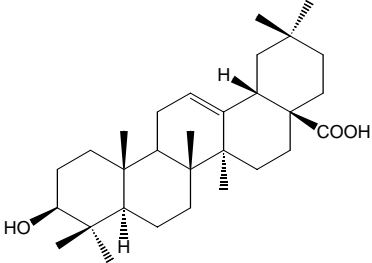
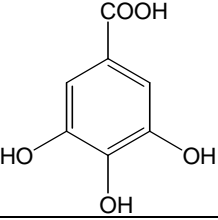
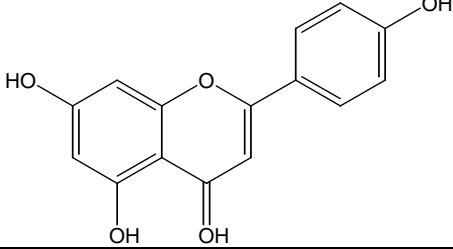
la placa por acción directa, es decir; interferencia con procesos de la placa bacteriana (Scheie et al., 1989). A la fecha, sólo unos cuantos de estos compuestos han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), entre ellos podemos mencionar a la clorhexidina, fluoruro estanososo, triclosan y combinación de aceites esenciales (ingredientes activos del Listerine). Sin embargo, estos agentes no son ideales y presentan una serie de efectos colaterales, por ejemplo: el uso de clorhexidina y fluoruro estanososo, aún a bajas concentraciones puede ocasionar el manchado de los dientes (Li et al., 1998; Wu et al., 2002; Enwonwu et al., 2002; Badria et al., 2004). Por otro lado, aunque los antibióticos tópicos ofrecen una alternativa como coadyuvantes a las terapias de limpieza periodontal, su presencia en dentífricos o enjuagues bucales puede ocasionar hipersensibilidad o la aparición de bacterias resistentes; por estas razones los antibióticos no son los agentes antiplaca más apropiados. Todas estas desventajas justifican la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes más seguros para los consumidores y que presenten una mayor efectividad (Maguire et al., 1996).

#### **2.2.6 Compuestos antibacterianos aislados de plantas.**

Hasta ahora, hay pocas entidades químicas derivadas de las plantas que posean actividad antibacteriana y sean de uso clínico, sin embargo, las plantas deben considerarse como una fuente de diversidad química de compuestos antibacterianos ya que poseen habilidad excepcional de biosintetizar agentes citotóxicos (Gibbons et al., 2004).

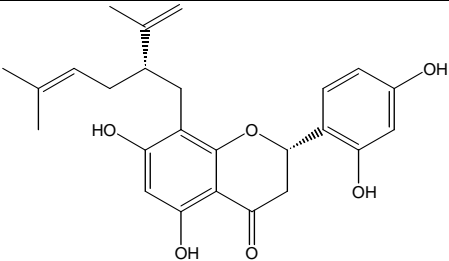
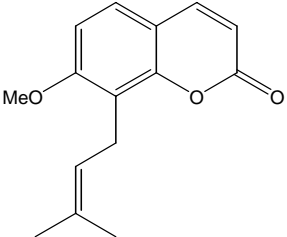
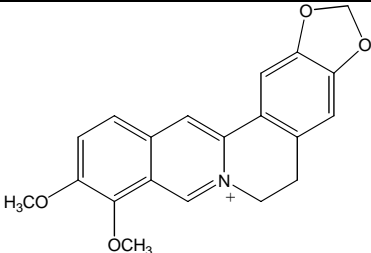
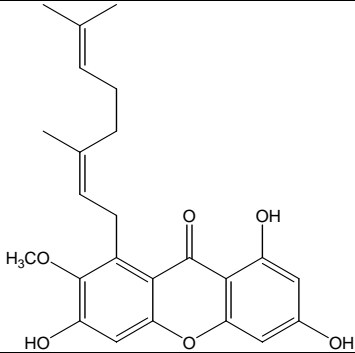
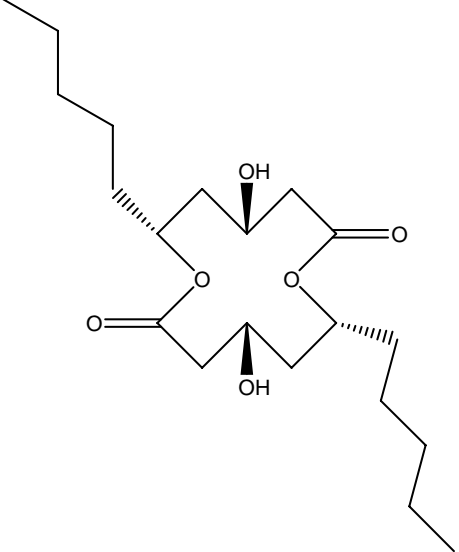
En la Tabla 3 se dan ejemplos de los compuestos antibacterianos que se han aislado de plantas.

**Tabla 3.** Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas.

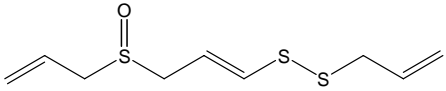
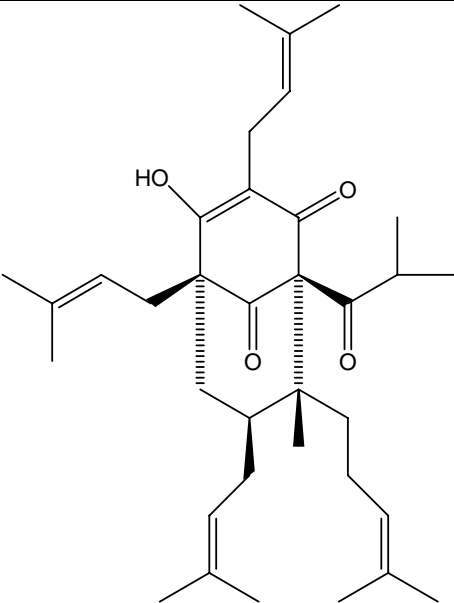
Clase de Compuesto	Nombre del compuesto	Planta de la que se obtuvo	Estructura	Actividad
Flavonoide	galato de epicatequina	<i>Camellia sinensis</i>		Revierte resistencia a meticilina en estafilococos volviéndolos sensibles (destruye la pared celular). CMI 280 µg/mL
Monoterpenoide	1,8-cineol	<i>Melaleuca alternifolia</i>		Estafilococos, <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMI 2 µg/mL
Diterpenoide	horminona	<i>Salvia blepharochlaena</i>		<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> . CMI 1.5-10 µg/mL
Triterpenoide	ácido oleanólico	<i>Periploca laevigata</i>		<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S.aureus</i> (CMI 8 µg/mL), <i>S.aureus</i> resistente a meticilina (CMI 16 µg/mL) <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fenólico simple	ácido gálico	<i>Camellia sinensis</i>		<i>S.aureus</i> susceptible (CMI 15.7 µg/mL) y resistente a meticilina (CMI 62.5 µg/mL)
Flavona	apigenina	<i>Matriarca chamomilla</i>		<i>S.aureus</i> susceptible (CMI 3.9 µg/mL) y resistente a meticilina (CMI 62.5 µg/mL)



**Tabla 3.** Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas (continuación).

Flavanona	soforaflavona G	<i>Sophora flavescens</i>		<i>S.aureus</i> resistente a meticilina
Cumarina	osteol	<i>Prangos pabularia</i>		<i>S.aureus</i> resistente a meticilina. CMI 31.25 µg/mL
Alcaloide	berberina	<i>Hydrastis canadensis</i>		<i>Staphylococcus sp.</i> CMI 31 µg/mL
Policétido (xantona)	rubraxantona	<i>Garcinia dioica</i>		Más potente ( <i>in Vitro</i> ) anti- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente (CMI 1.25 µg/mL) y sensibles (CMI 0.313 µg/mL) a meticilina obtenido a partir de plantas.
Lactona	verbalactona	<i>Verbascum undulatum</i>		<i>S.aureus.</i> CIM 62.5 µg/mL

**Tabla 3.** Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas (continuación).

Compuestos sulfurados	ajoeno	Común en las especies del género <i>Allium</i>		<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Mycobacterium</i> y <i>Streptomyces</i> CMI 16 µg/mL
Acilfloroglucinos	hiperiforina	<i>Hypericum perforatum</i>		Actividad <i>in Vitro</i> contra <i>S.aureus</i> resistente a penicilina y meticilina CMI 0.1 a 1 µg/mL

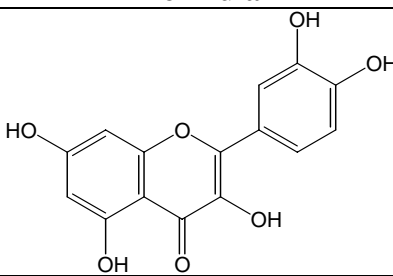
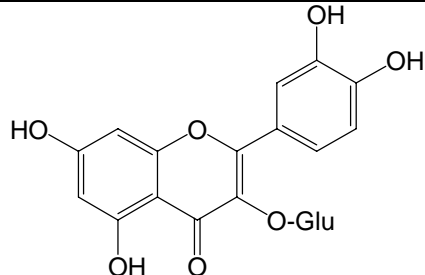
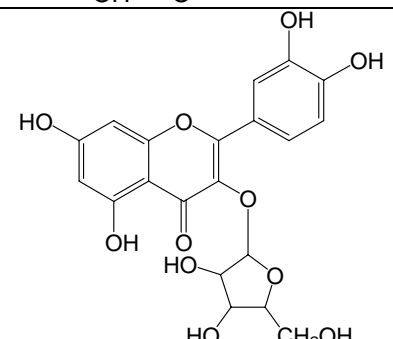
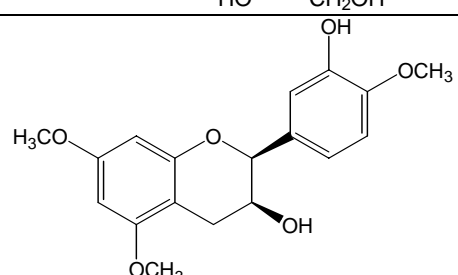
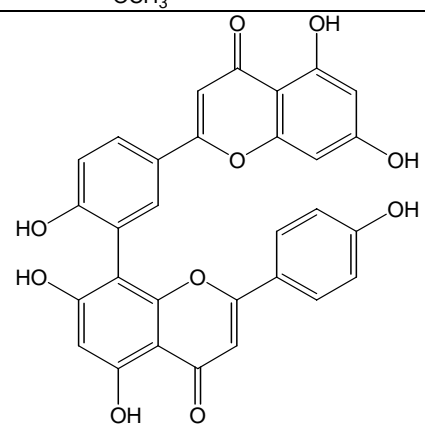
### 2.3 CARACTERISTICAS DEL GÉNERO *Byrsonima*

El género *Byrsonima* está compuesto por aproximadamente 150 especies, pertenece a la familia Malpighiaceae y se encuentra distribuido desde México hasta América del Sur, se le atribuyen propiedades antiasmáticas, antipiréticas, antieméticas, diuréticas, espasmogénicas, antimicrobianas y antivirales. También se utiliza en el tratamiento de úlceras gástricas, diarrea e infecciones cutáneas (Sannomiya et al., 2005; Martínez et al., 1989)

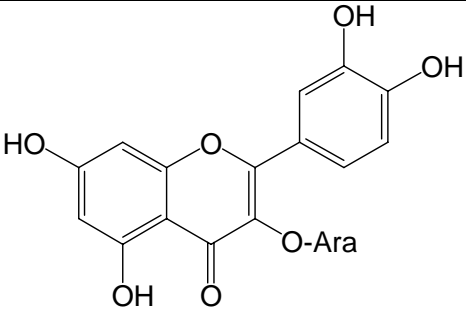
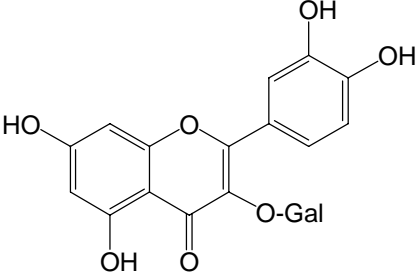
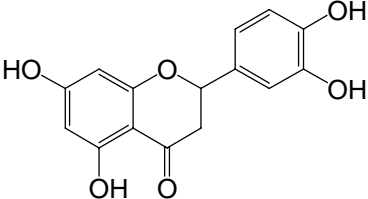
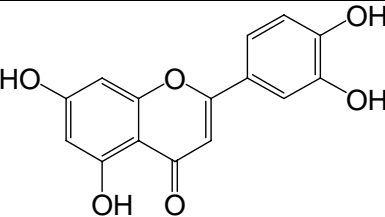
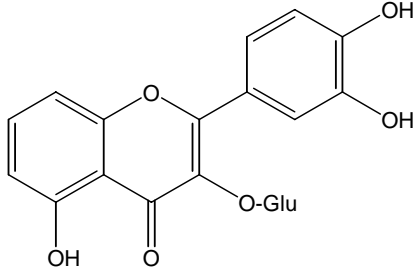
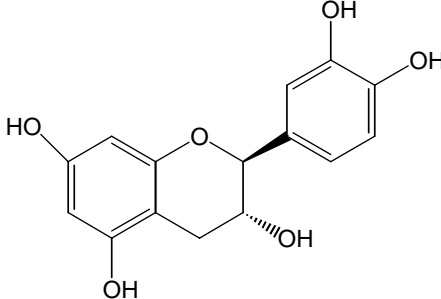
#### 2.3.1 Estudios fitoquímicos previos del género *Byrsonima*.

El género *Byrsonima* ha sido objeto de estudios fitoquímicos previos. Estos estudios han permitido el aislamiento de compuestos de tipo flavonoide, compuestos aromáticos simples, esteroides, triterpenoides y aminoácidos no aromáticos. Los compuestos aislados durante estos estudios sobre el género *Byrsonima* se ilustran en la Tabla 4.

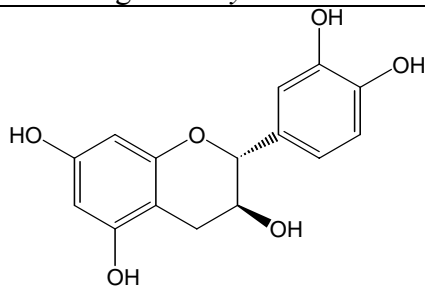
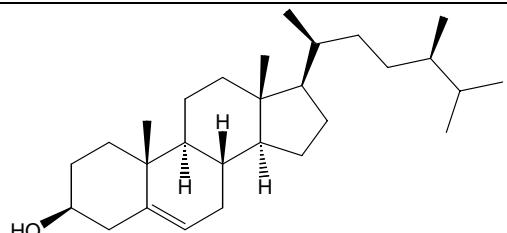
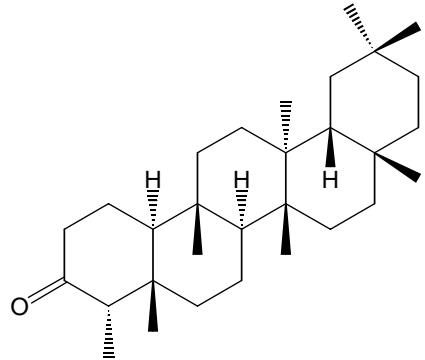
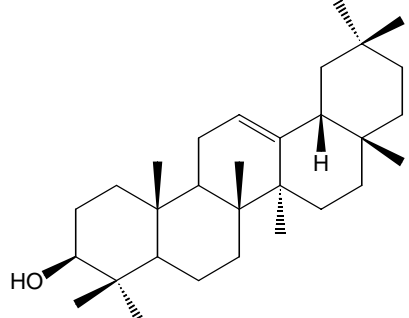
**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

FLAVONOIDES			
Especie	Nombre químico	Fórmula	Referencia
<i>B. microphylla</i> <i>B. verbascifolia</i>	quercetina		Berger et al., 1998 Doce et al., 1980
<i>B. verbascifolia</i>	isoquercetina		Doce et al., 1980
<i>B. verbascifolia</i>	3-arabinosilquercetol		Doce et al., 1980
<i>B. microphylla</i>	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3'-hidroxi-4', 5, 7-trimetoxi-flavan-3-ol		Aguiar et al., 2005
<i>B. crassa</i>	amentoflavona		Sannomiya et al., 2004 Sannomiya et al., 2005

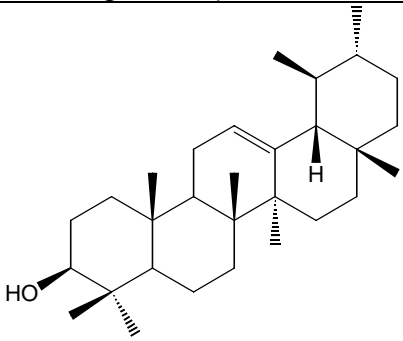
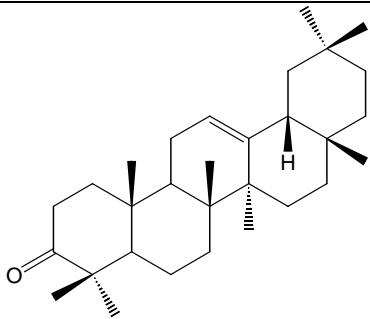
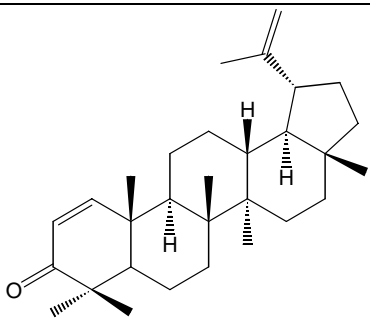
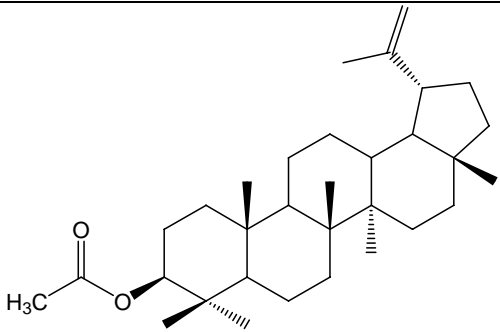
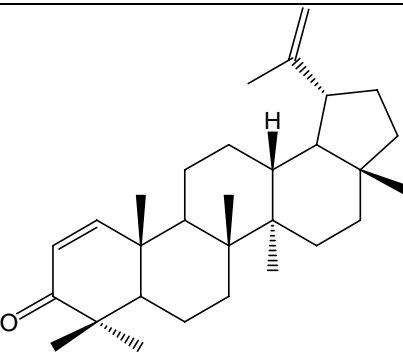
**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

<i>B. crassa</i>	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosiloxi quercetina.		Sannomiya et al., 2004
<i>B. crassa</i>	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosiloxi quercetina		Sannomiya et al., 2004
<i>B. variabilis</i>	3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavanona		Aragao et al., 1990
<i>B. variabilis</i>	3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona		Aragao et al., 1990
<i>B. variabilis</i>	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3', 4', 5-trihidroxiflavona		Aragao et al., 1990
<i>B. crassa</i>	(-)-epicatequina.		Sannomiya et al., 2005

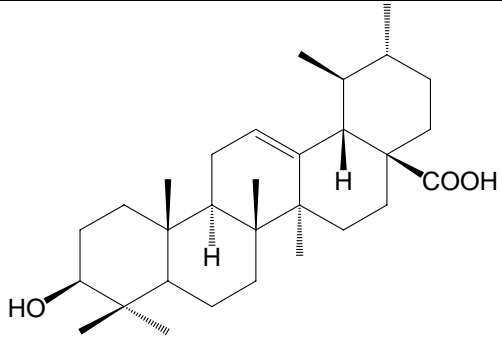
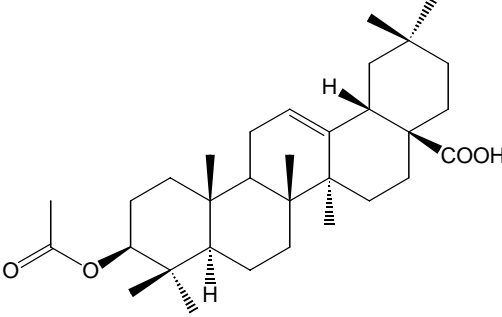
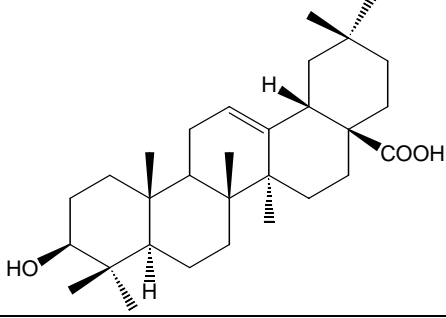
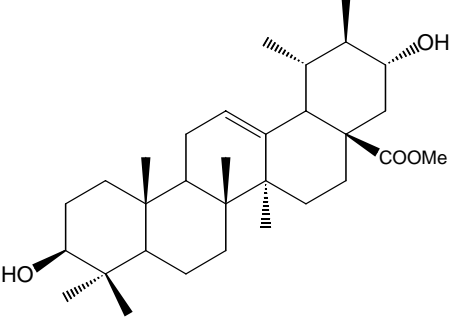
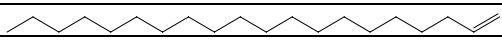
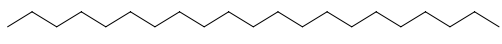
**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

<i>B. crassa</i>	(+)-catequina		Sannomiya et al., 2005
<b>ESTEROIDES</b>			
Especie	Nombre químico	Fórmula	Referencia
<i>B. verbascifolia</i>	$\beta$ -sitosterol		Gottlieb et al., 1975
<b>TERPENOIDES</b>			
Especie	Nombre químico	Fórmula	Referencia
<i>B. verbascifolia</i>	friedelina		Gottlieb et al., 1975
<i>B. verbascifolia</i> <i>B. intermedia</i>	$\beta$ -amirina		Gottlieb et al., 1975 Dosseh et al., 1980 Bonzani et al., 1970

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

<i>B. verbascifolia</i>	$\alpha$ -amirina		Doce et al., 1980
<i>B. verbascifolia</i>	$\beta$ -amirenona		Gottlieb et al., 1975
<i>B. microphylla</i>	$\Delta^1$ -lupenona		Aguiar et al., 2005
<i>B. verbascifolia</i>	3-O-acetil-lupeol		Gottlieb et al., 1975
<i>B. verbascifolia</i>	glochidona [1, 20 (29)-lupadien-3-ona]		Gottlieb et al., 1975

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

<i>B. verbascifolia</i>	ácido ursólico		Doce et al., 1980
<i>B. verbascifolia</i>	ácido 3-O-acetiloleanólico		Gottlieb et al., 1975
<i>B. verbascifolia</i> <i>B. microphylla</i>	ácido oleanólico		Doce et al., 1980 Mendes et al., 1999
<i>B. microphylla</i>	3 $\beta$ , 21 $\alpha$ -dihidroxi-urs-12-en-28-oato de metilo		Mendes et al., 1999
<b>ALIFÁTICOS</b>			
<i>B. verbascifolia</i>	1-eicoseneno		Doce et al., 1980
<i>B. verbascifolia</i>	heneicosano		Doce et al., 1980

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios encontrados en el género *Byrsonima*

ANTRAQUINONAS			
<i>B. microphylla</i>	3-hidroxi-2-metoxi-8, 8',10-trimetil-8H-antracen-1,4,5-triona		Aguiar et al., 2005
<i>B. microphylla</i>	3,7-dihidroxi-2-metoxi-8, 8',10-trimetil-7, 8-dihidro-6H-antracen-1,4,5-triona		Aguiar et al., 2005
COMPUESTOS AROMATICOS SIMPLES			
<i>B.intermedia</i>	pirogalol		Bonzani et al., 1970
<i>B. microphylla</i>	galato de metilo		Mendes et al., 1999
OTROS COMPUESTOS			
<i>B. microphylla</i>	(2S*,10aR*)-2,8-dihidroxi-6-metoxi-1, 1, 7-trimetil-2, 3, 10, 10α-tetrahidro-1H-fenantren-9-ona		Aguiar et al., 2005
<i>B. variabilis</i>	galato de etilo		Aragao et al., 1990



## 2.4 *Byrsonima crassifolia* L. (Malpighiaceae)

### 2.4.1 Características fitoquímicas y etnobotánicas de la especie

La especie *Byrsonima crassifolia* (Figura 1) se usa desde tiempos prehispánicos en Chiapas y Oaxaca con fines curativos. Se utiliza principalmente contra la diarrea aunque también se indica en otros desórdenes de tipo digestivo como disentería, dolor de estómago, “empacho”, falta de digestión, bilis y estreñimiento. En el tratamiento de estos padecimientos se emplea la corteza en cocimiento por vía oral.



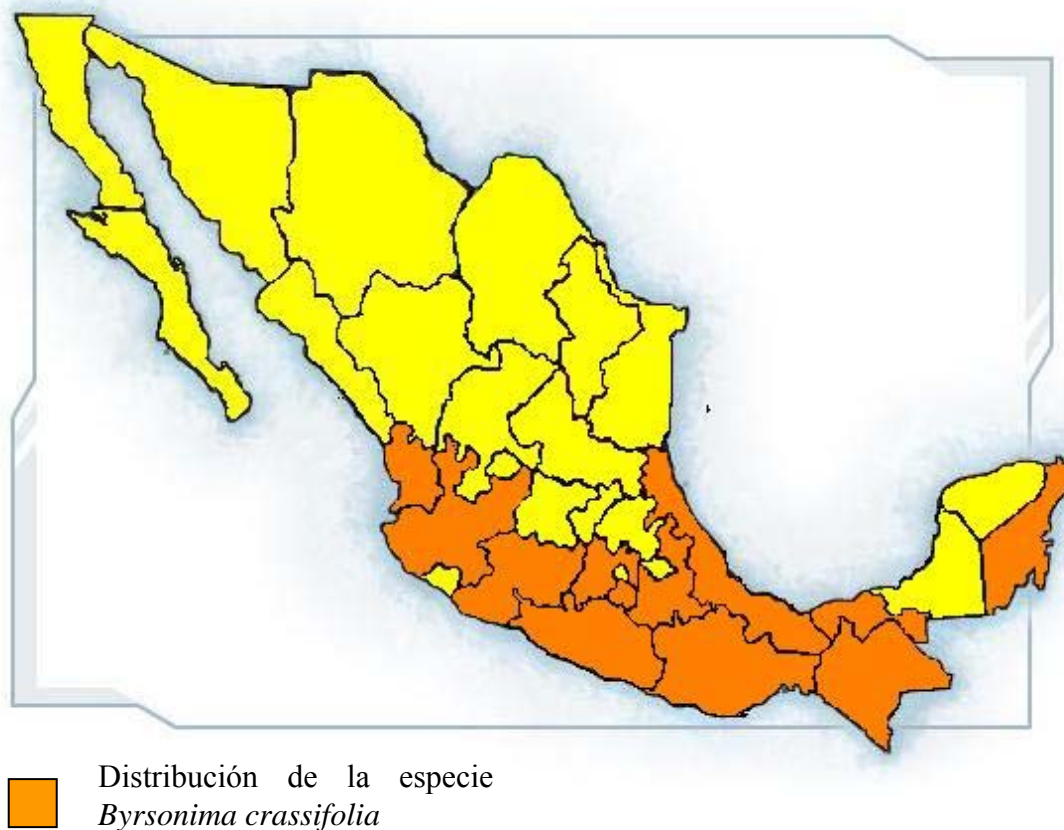
**Figura 1. Corteza de *Byrsonima crassifolia***

En Guatemala, es una de las cinco especies de plantas más utilizadas para combatir enfermedades bacterianas (Cáceres et al., 1990), protozoarias (Cáceres et al., 1998) e infecciones dérmicas (Cáceres et al., 1993).

Un estudio realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reveló que *B. crassifolia* es una de las 10 plantas más utilizadas para combatir desordenes gastrointestinales (Béjar et al., 1991). Se indicó para el tratamiento de diarrea, disentería y adicionalmente para inducir el parto y tratar estomatitis.

*Byrsonima crassifolia* es nativa de América tropical desde el sur de México hacia Centroamérica. En la Figura 2 se ilustra el mapa de la distribución de *B. crassifolia* en la República Mexicana (Argueta , 1994).

**Figura 2.** Distribución de la especie *Byrsonima crassifolia* en México



La mayor actividad de esta planta se presenta en los extractos obtenidos con acetona y etanol. Presenta actividad contra, *C. albicans*, *C.krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* (Cáceres et al., 1999). Su actividad antifúngica ha sido recientemente atribuida a las proantocianidinas y galato de proantocianidinas (Xian-guo et al., 1993).

Algunos extractos de raíz, tallo, hojas y corteza han mostrado actividad antimicrobiana contra *S. pyogenes* (Cáceres et al., 1990), *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhi*, *Shigella flexneri*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* y *M. luteus* (Martínez et al., 1999).

Las decocciones de la corteza y las flores se utilizan en el tratamiento de enfermedades respiratorias e infecciones en las mucosas (Guzmán et al., 1975; Díaz et al., 1977; Morton et al., 1987; Ronquillo et al. 1988).

La corteza es rica en taninos (20 a 30%), flavonoides, polifenoles y triterpenoides (Morton et al., 1987; Glasby et al., 1991); su tintura es activa contra bacterias Gram (+) y Gram (-) (Cáceres et al., 1990 y 1991), mientras que la decocción es activa contra

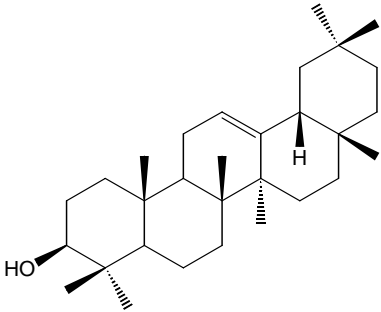
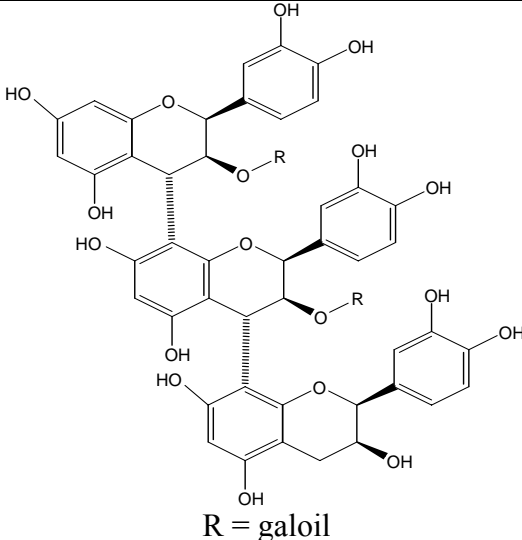
dermatofitos y tiene actividad fungistática (Cáceres et al., 1991). Por otra parte, el extracto de hojas de *Byrsonima crassifolia* demostró una actividad moderada contra *Trypanosoma cruzi* (Cáceres et al., 1998). En la Tabla 5 se resumen sus principales características etnobotánicas y taxonómicas.

**Tabla 5.** Características etnobotánicas y taxonómicas de *Byrsonima crassifolia*.

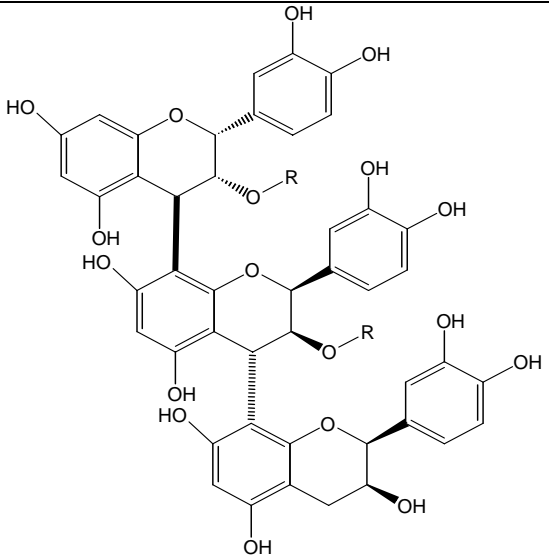
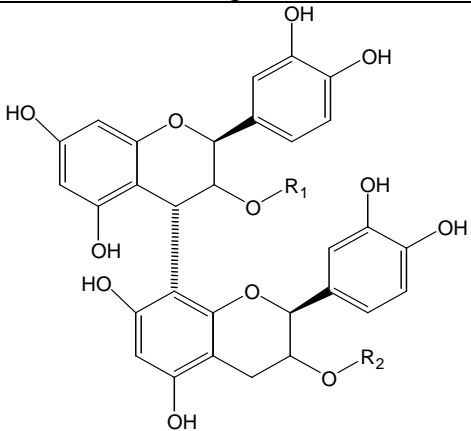
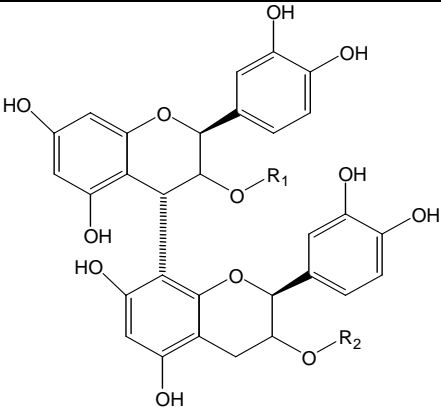
<b>Familia</b>	Malpighiaceae
<b>Nombre científico</b>	<i>Byrsonima crassifolia</i>
<b>Nombres vulgares</b>	tax, nanche, nance, nantzinquáhuítl (Martínez et al. 1989), nance dulce, nanche amarillo, nanche de fruto grande, nanche dulce. Chiapas: chi (tzeltal/tzotzil), flor de kastiya, lantzinté, nantzi (tzotzil), natzin (tzeltal), nandzin, nantzin. Guerrero: nanchi, nanatsin, nantzinxócotl, nance agrio. Michoacán: changungo, enanchi. Nayarit: huatzi (cora). Oaxaca: nadam aong wean. Puebla: sokonantsin kiui (totonaco) sokonanx (tepehua), xoconance tanzet (nahua). Quintana Roo: chí (maya). Veracruz: nanchin, nandzin. Yucatán: chí' (maya) (Argueta, 1994)
<b>Descripción</b>	Arbusto ó árbol de 5 a 10 m de altura, con ramas delgadas y corteza parda oscura y rugosa. Tiene hojas ovado elípticas, enteras de 4 a 10 cm de largo que están provistas de pelos amarillos en el reverso. Las flores se producen en racimos terminales de color amarillo o rojizo. El fruto es globuloso, inmaduro es verde y astringente, mientras que al madurar es de color amarillo oscuro; siendo entonces aromático y agridulce. Tiene una sola semilla (Martínez et al., 1989; Argueta, 1994).
<b>Distribución</b>	Originaria de América tropical, habita áreas con climas cálido, semicálido y templado, frecuentemente en terrenos pedregosos y arenosos. En México (Figura 2): Nayarit, Guerrero, Michoacán, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Morelos y Oaxaca (Argueta, 1994; Martínez et al., 1989; 1999).
<b>Usos</b>	Se utiliza contra la diarrea y desórdenes de tipo digestivo como disentería, dolor de estómago, empacho, falta de digestión, bilis y estreñimiento. En problemas ginecológicos como infecciones de la matriz e inflamación de los ovarios, evita el aborto y facilita el parto, y se aplica en afecciones de la piel, contra la sarna, granos y clavillos; en combinación con corteza de cedro se utiliza para lavar heridas. Otros usos medicinales atribuidos a esta planta son el tratamiento de afecciones renales, dolor de cintura, resfriado, diabetes, para apretar encías, heridas y mordedura de serpientes, así como propiedades antipiréticas y astringentes (Argueta, 1994).

De la especie *Byrsonima crassifolia*, diversos autores han caracterizado diferentes compuestos, en la Tabla 6 se ilustran las estructuras de estos compuestos.

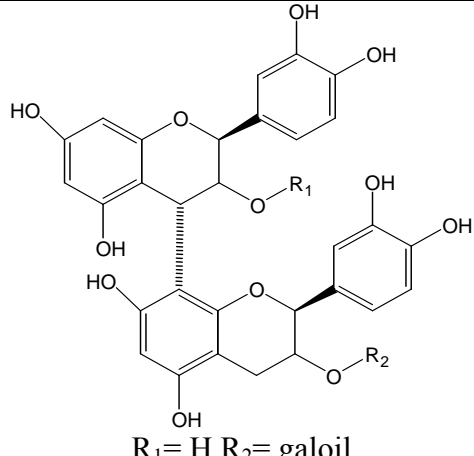
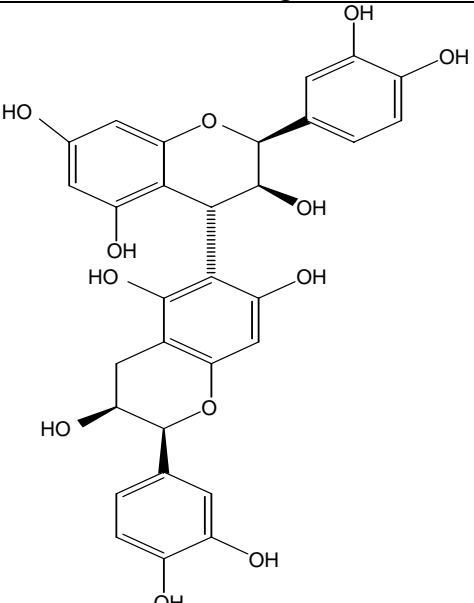
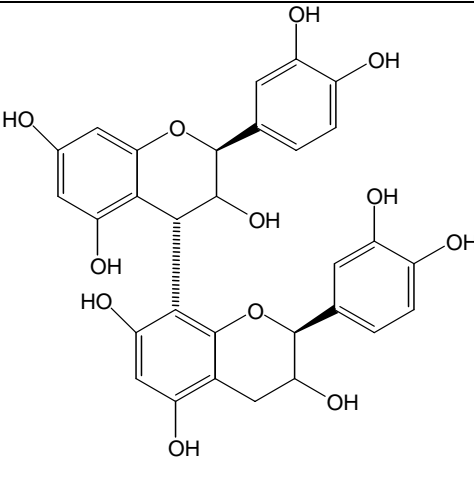
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

<b>CORTEZA</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Referencia</b>
<b>TERPENOIDES</b>		
$\beta$ -amirina		Djerassi et al.,
<b>TANINOS</b>		
(3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina-[4 $\alpha$ →8]-3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina-[4 $\alpha$ →8]-(+)-epicatequina	 <p style="text-align: center;">R = galoil</p>	Geiss et al., 1995

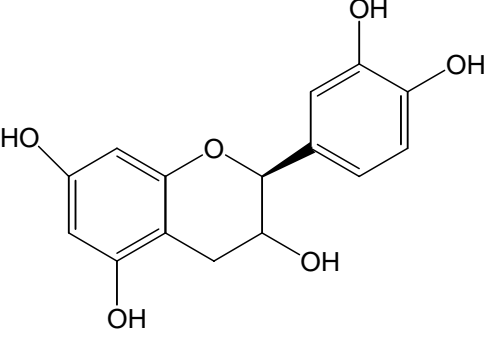
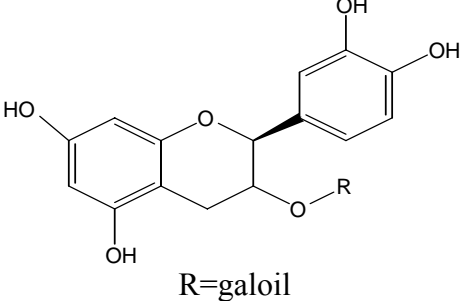
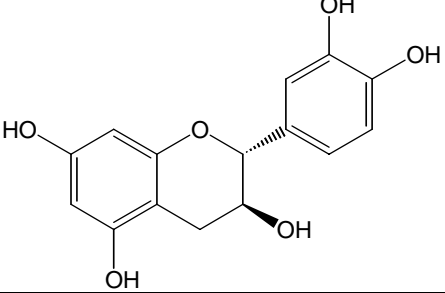
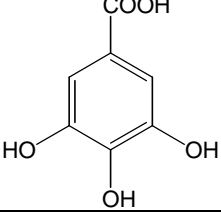
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

<p>(3-<i>O</i>-galoil(-)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-3-<i>O</i>-galoil(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-(+)-epicatequina</p>	 <p>R = galoil</p>	<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>3-<i>O</i>-galoil(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-3-<i>O</i>-galoil(+)-epicatequina</p>	 <p>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = galoil</p>	<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>(3-<i>O</i>-galoil(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-(+)-epicatequina</p>	 <p>R<sub>1</sub> = galoil R<sub>2</sub> = H</p>	<p>Geiss et al., 1995</p>

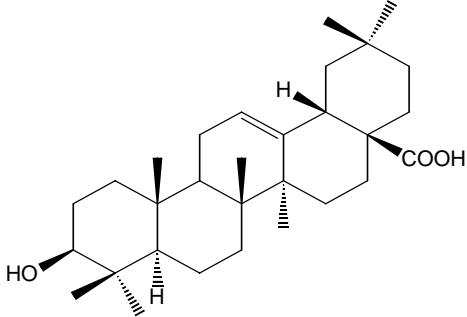
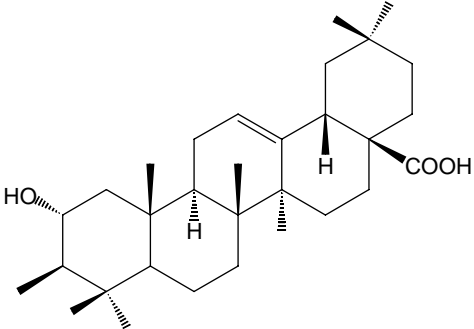
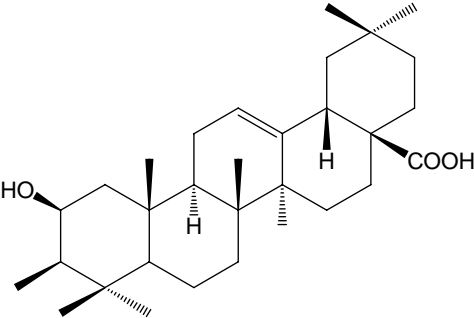
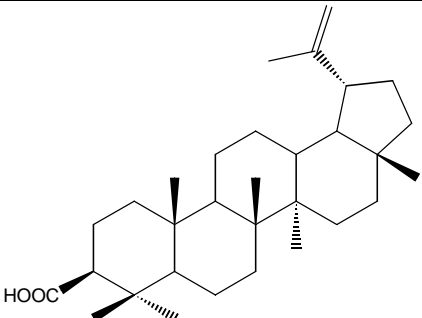
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

<p>3-<i>O</i>-galoil-(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-3-<i>O</i>-galoil-(+)-epicatequina</p>	 <p><math>R_1 = H</math> <math>R_2 = \text{galoil}</math></p>	<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→6]-(+)-epicatequina</p>		<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>(+)-epicatequina-[4<math>\alpha</math>→8]-(+)-epicatequina</p>		<p>Geiss et al., 1995</p>

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

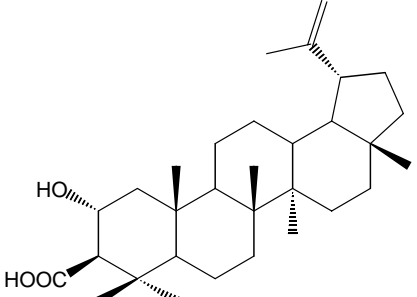
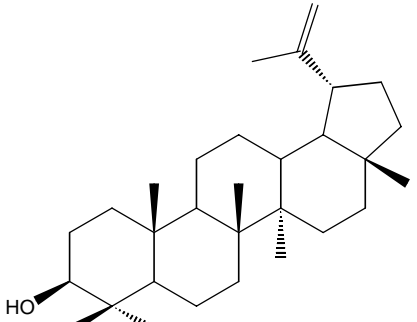
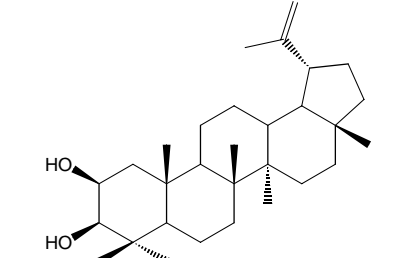
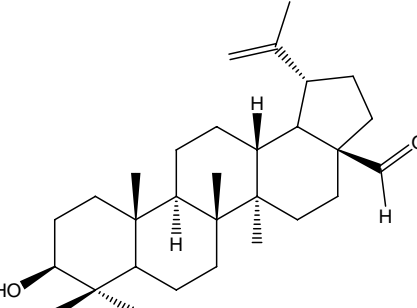
<p>(+)-epicatequina</p>		<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>3-<i>O</i>-galoil-(+)-epicatequina</p>	 <p>R=galoil</p>	<p>Geiss et al., 1995</p>
<p>catequina</p>		<p>Geiss et al., 1995</p>
<p><b>COMPUESTOS AROMÁTICOS SIMPLES</b></p>		
<p>Ácido gálico</p>		<p>Geiss et al., 1995</p>

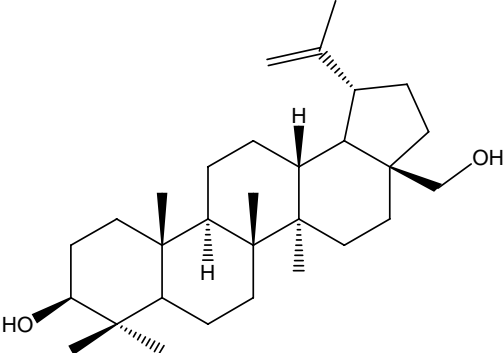
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

<b>HOJAS</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Referencia</b>
<b>TERPENOIDES</b>		
ácido oleanólico		Rastrelli et al., 1997
ácido 2- $\alpha$ -hidroxi-oleanólico		Berger et al., 1998
ácido 2- $\beta$ -hidroxi-oleanólico		Berger et al., 1998
ácido lupeanólico		Berger et al., 1998

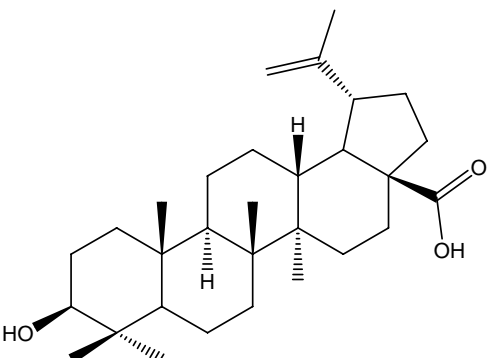
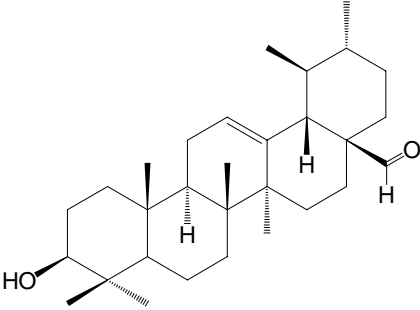
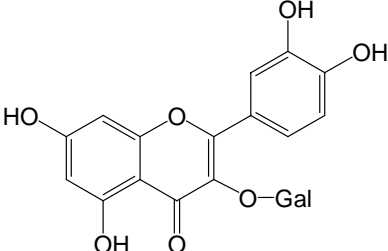
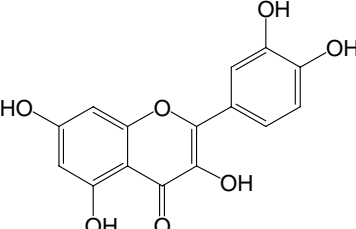


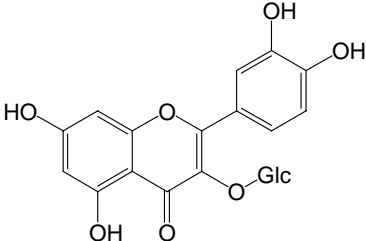
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

<p>ácido 2-<math>\alpha</math>-hidroxilupeanólico</p>	 <p>The structure shows a complex pentacyclic triterpene skeleton. It features a carboxylic acid group (HOOC) at the C-2 position and a hydroxyl group (HO) at the C-3 position. The molecule is highly substituted with methyl groups and a dimethylallyl side chain at the C-19 position.</p>	<p>Berger et al., 1998</p>
<p>lupeol</p>	 <p>The structure shows the same pentacyclic triterpene skeleton as lupeonic acid, but with a hydroxyl group (HO) at the C-3 position instead of a carboxylic acid group. It is substituted with methyl groups and a dimethylallyl side chain at the C-19 position.</p>	<p>Rastrelli et al.,1997</p>
<p>2-<math>\beta</math>-hidroxilupeol</p>	 <p>The structure shows the same pentacyclic triterpene skeleton, but with hydroxyl groups (HO) at both the C-2 and C-3 positions. It is substituted with methyl groups and a dimethylallyl side chain at the C-19 position.</p>	<p>Rastrelli et al.,1997</p>
<p>betulinaldehído</p>	 <p>The structure shows the same pentacyclic triterpene skeleton, but with a hydroxyl group (HO) at the C-3 position and an aldehyde group (CHO) at the C-28 position. It is substituted with methyl groups and a dimethylallyl side chain at the C-19 position.</p>	<p>Bejar et al., 1995</p>

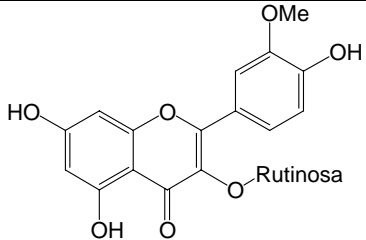
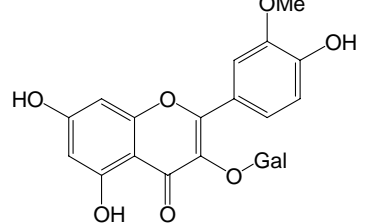
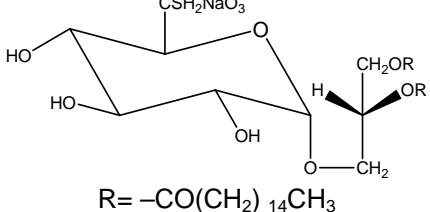
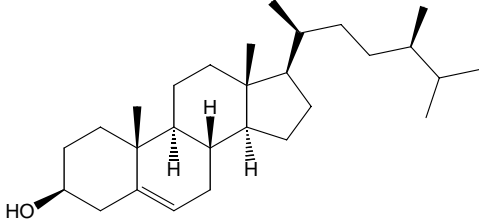
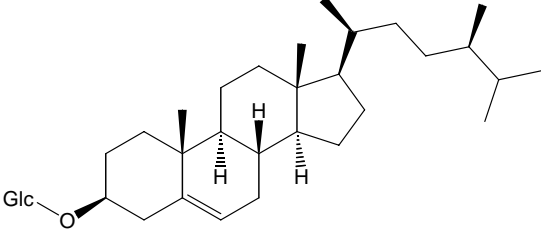
betulina		Bejar et al., 1995
----------	--	-----------------------

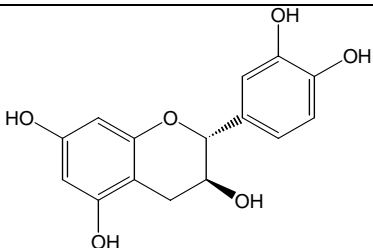
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

ácido betulínico		Bejar et al., 1995
ursenaldehído		Bejar et al., 1995
<b>FLAVONOIDES</b>		
quercetina 3-O-β-D-galactósido		Berger et al., 1998
quercetina		Bejar et al., 1995

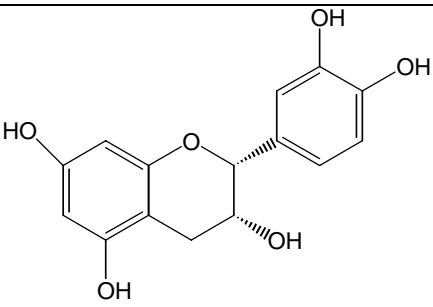
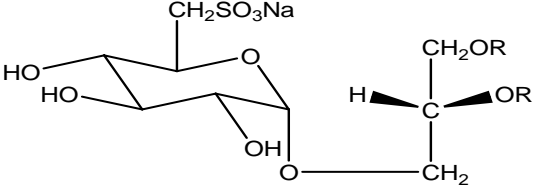
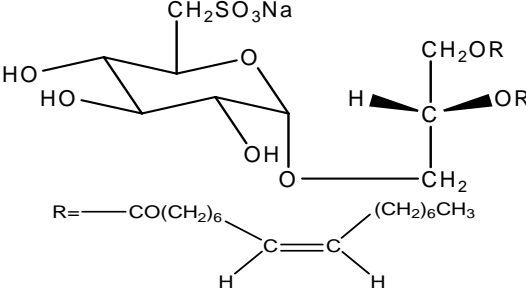
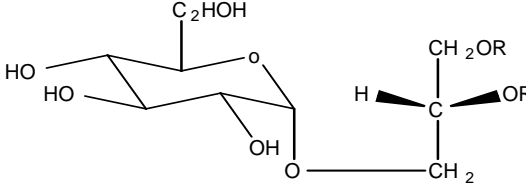
isoquercetina		Berger et al., 1998
---------------	---	---------------------

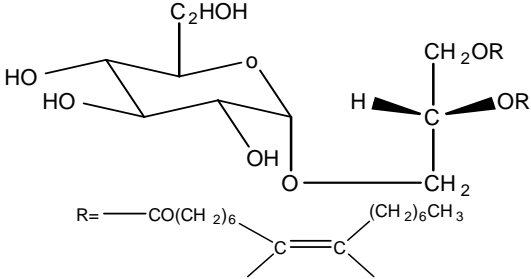
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

isorhamnetina 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-rutinósido		Berger et al., 1998
isorhamnetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactósido		Berger et al., 1998
1,2-di- <i>O</i> -palmitoil-3- <i>O</i> -(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol	 <p style="text-align: center;"><math>R = -CO(CH_2)_{14}CH_3</math></p>	Rastrelli et al., 1997
<b>ESTEROIDES</b>		
$\beta$ -sitosterol		Bejar et al., 1995
$\beta$ -D-glucositosterol		Bejar et al., 1995
<b>TANINOS</b>		

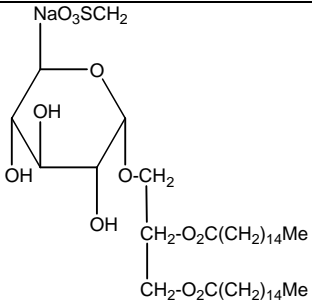
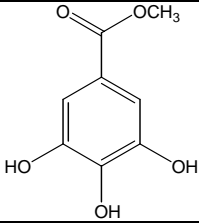
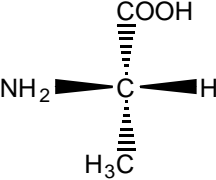
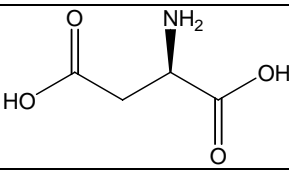
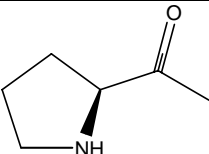
(+)catequina		Rastrelli et al.,1997
--------------	--	-----------------------

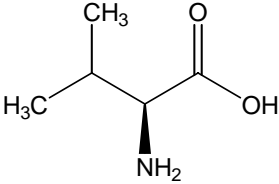
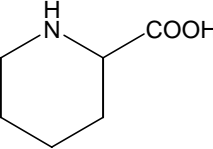
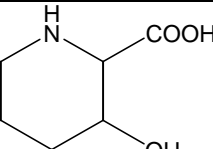
**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

(-)-epicatequina		Rastrelli et al.,1997
<b>GLICÓSIDOS VARIOS</b>		
1,2-di- <i>O</i> -miristoil-3- <i>O</i> -(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol	 <p style="text-align: center;"><math>R = \text{---CO(CH}_2\text{)}_{12}\text{CH}_3</math></p>	Rastrelli et al.,1997
1,2-di- <i>O</i> -(8-hexadecenil)-3- <i>O</i> -(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol	 <p style="text-align: center;"><math>R = \text{---CO(CH}_2\text{)}_6\text{---C=C---(CH}_2\text{)}_6\text{CH}_3</math></p>	Rastrelli et al.,1997
1,2-di- <i>O</i> -palmitoil-3- <i>O</i> -( $\beta$ -D-glucopiranosil)-glicerol	 <p style="text-align: center;"><math>R = \text{---CO(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3</math></p>	Rastrelli et al.,1997

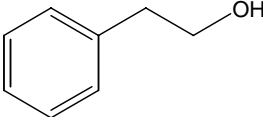
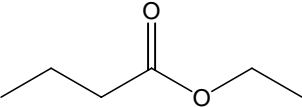
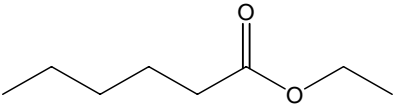
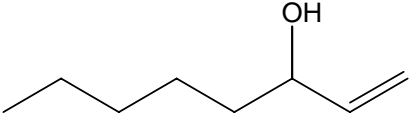
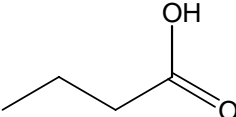
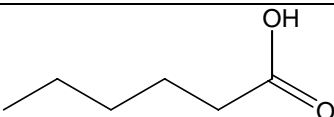
1,2-di- <i>O</i> -(8-hexadecenil)-3- <i>O</i> -(β-D-glucopiranosil)-glicerol		Rastrelli et al., 1997
--	--	------------------------

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

sulfonoglicolípido		Amarquaye et al., 1994
<b>COMPUESTOS AROMÁTICOS SIMPLES</b>		
Metil galato		Bejar et al., 1995
<b>AMINOACIDOS Y COMPUESTOS NITROGENADOS</b>		
alanina		Bejar et al., 1995
ácido aspártico		Bejar et al., 1995
prolina		Bejar et al., 1995

valina		Bejar et al., 1995
ácido piperólico		Bejar et al., 1995
ácido 5-hidroxipiperólico		Bejar et al., 1995

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios encontrados en diversas partes de la especie *Byrsonima crassifolia*.

FRUTO		
Nombre químico	Fórmula	Referencia
<b>COMPUESTOS AROMÁTICOS SIMPLES</b>		
alcohol feniletílico		Rezende et al., 2003
<b>COMPUESTOS ALIFÁTICOS</b>		
butanoato etilo		Rezende et al., 2003
hexanoato etilo		Rezende et al., 2003
1-octen-3-ol		Rezende et al., 2003
ácido butírico		Rezende et al., 2003
ácido hexanoico		Rezende et al., 2003

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años los productos herbolarios han tenido un nuevo auge en el mundo occidental incluyendo a México, debido a que el público general, e incluso algunos expertos los consideran efectivos y con pocos efectos secundarios. El problema es que muchos de éstos no tienen suficientes evidencias de su eficacia y seguridad, no cumplen con lo necesario para ser considerados como medicamentos y se comercializan como suplementos alimenticios, cometiendo fraudes al consumidor por ineficaces o constituyendo riesgos a la salud por posibles efectos adversos (SSA, 2005).

En el año 2001 la Secretaría de Salud publicó la primera Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos con el objeto de dar a conocer los métodos de análisis y las especificaciones técnicas que deberían cumplir las plantas y los fitomedicamentos derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios. Con esto, la Secretaría de Salud deja clara la intención de que la industria farmacéutica cuente con un respaldo que le permita introducir nuevos productos de origen vegetal al mercado bajo condiciones de calidad adecuados para el consumo humano.

Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria de nuestro país, las monografías de especies autóctonas o introducidas pero de uso médico tradicional resultaron muy limitadas en cantidad y calidad, por el simple hecho de que no se dispone de la información suficiente para integrarlas. En consecuencia, los centros de investigación en el área de la salud, incluyendo las universidades, deben generar la información necesaria para conformar las monografías de las plantas medicinales más utilizadas en nuestro país.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial establecer los compuestos marcadores de la especie *Byrsonima crassifolia* y determinar su potencial antimicrobiano contra bacterias causantes de enfermedades en la cavidad oral. Los resultados obtenidos son parte de la información necesaria para elaborar la monografía de la planta medicinal, la cual eventualmente puede incorporarse a la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Para el cumplimiento del objetivo de este proyecto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ❖ Búsqueda bibliográfica de los antecedentes de estudios químicos y biológicos realizados con *Byrsonima crassifolia* L. (Malpighiaceae)
- ❖ Aislar los componentes mayoritarios del extracto metanólico de *B. crassifolia* y elucidar las estructuras de dichos compuestos.
- ❖ Establecer los compuestos marcadores del extracto metanólico de *B. crassifolia*.
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana potencial de la especie *B. crassifolia* contra bacterias causantes de infecciones orales.



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES**

#### **4.1.1 Análisis cromatográficos**

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kiesegel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía en columna de exclusión se realizó usando 100 g de Sephadex LH-20 (General Electric), de 50 cm de altura y 3.7 cm de diámetro, y se eluyó de forma isocrática con metanol. Así mismo se realizaron cromatografías utilizando gel de sílice fase reversa Bakerbond C<sub>18</sub> (tamaño de partícula 0.040 mm, Baker).

Los análisis de cromatografía en capa fina analítica (ccf), se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución. La ccf se realizó sobre placas de aluminio con diferentes dimensiones, recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm), y posteriormente se revelaron con sulfato cérico amoniacal, seguido de calentamiento (110 °C aprox.) hasta la visualización de los compuestos.

Las cromatografías preparativas en capa delgada se realizaron en placas de vidrio (20 cm x 20 cm) recubiertas de gel de sílice (60-254, Merck, 0.25mm de espesor).

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

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns, y no se encuentran corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla modelo 1605 marca Perkin-Elmer, o en un aparato Nicolet FT-5X en pastilla o en película. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se determinaron en un aparato JEOL JMS-SX102A Hewlett-Packard 5890 serie II mediante introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de Carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 300 y 75 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron en CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD y los

desplazamientos químicos se designaron en unidades  $\delta$  (ppm), referidas al tetrametilsilano (TMS).

Los análisis arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

## **4.2 MATERIAL VEGETAL**

La recolección del material vegetal (corteza) de *Byrsonima crassifolia*, se efectuó en Juchitán, Oaxaca por la QFB Araceli Pérez Vázquez en Abril de 2005. Una muestra del material vegetal de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

La identificación de las especies estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

## **4.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Byrsonima crassifolia***

### **4.3.1 Preparación del extracto íntegro de la corteza de *B. crassifolia***

El proceso de desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente. Una vez seco se molió en un molino de cuchillas modelo Willey 4.

El extracto total se preparó utilizando 480 g de corteza seca y molida mediante un proceso de maceración utilizando metanol por espacio de 240 horas de la siguiente manera: dos extracciones con metanol de 72 horas cada una, y una tercera extracción de 96 horas. Al finalizar este procedimiento se realizaron dos extracciones más con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 1:1. Para cada caso se utilizaron 4 L de disolvente o mezcla de disolventes.

Todos los extractos se mezclaron por presentar un perfil cromatográfico semejante. El extracto resultante se filtró y se concentró al vacío obteniéndose 104.375g de un residuo color café oscuro.

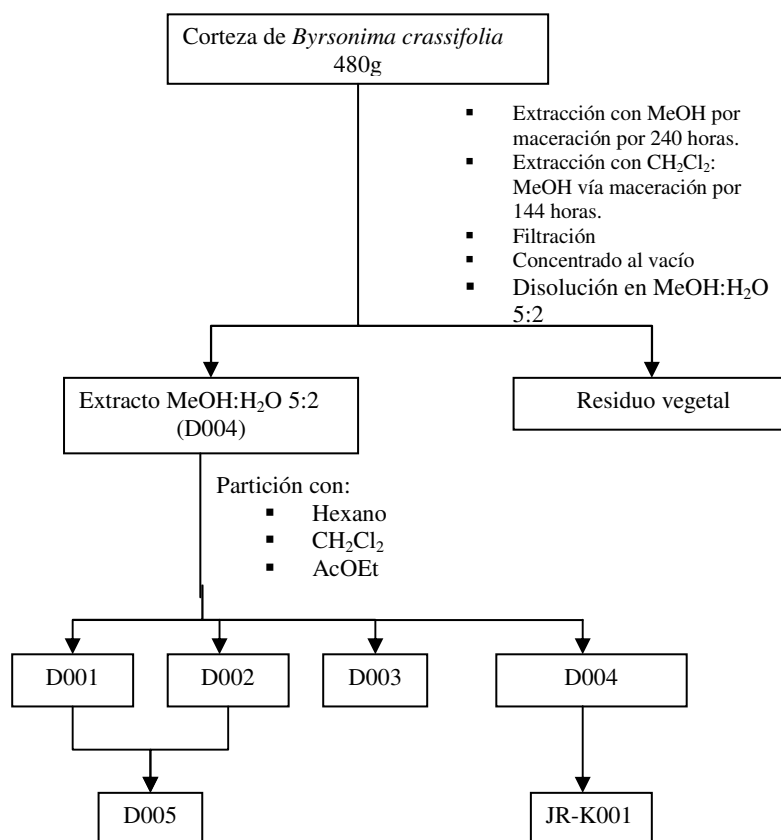
### **4.3.2 Fraccionamiento primario del extracto**

El extracto total se sometió a un proceso de partición disolviéndolo previamente en una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 5:2 (D004). De esta solución se realizaron 3 extracciones con hexano (D001). Posteriormente D004 se extrajo de manera sucesiva con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (D002) y AcOEt (D003).

Al finalizar este proceso de partición se obtuvieron 4 fracciones: hexánica (D001), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (D002), AcOEt (D003) y metanol acuoso (D004). Éstas se concentraron en un rotaevaporador y se analizó su perfil cromatográfico mediante ccf empleando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1 como eluyente. Las fracciones D001 y D002 mostraron semejanza cromatográfica por lo cual se combinaron para dar origen a la fracción secundaria D005.

En el Diagrama 1 se sintetiza el proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto de *Byrsonima crassifolia*

**Diagrama 1.** Proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto total de la corteza de *Byrsonima crassifolia*.



#### 4.3.2.1 Obtención del compuesto JR-K001 (β-amirina).

El residuo obtenido de la fase de metanol acuoso (Diagrama 1), se intentó disolver en MeOH para ser trasvasado hacia un vial. Al adicionar el MeOH se formó un precipitado blanco, parcialmente soluble en MeOH caliente. Este precipitado se separó utilizando filtración al vacío y se identificó como  $\beta$ -amirina por comparación con una muestra auténtica.

#### 4.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción D005.

La fracción D005 (6.8898 g, Diagrama 1) fue sometida a un fraccionamiento cromatográfico en una columna de gel de sílice (375g), utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetona (diversas proporciones de polaridad creciente). Este proceso generó 67 fracciones de 250 mL cada una, las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose 11 conjuntos de fracciones secundarias. En la Tabla 7 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción D005.

**Tabla 7.** Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción D005 por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de *B. crassifolia*.

Fracciones	Eluyente (s)	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
1 - 19	hexano-acetona	90:10	1 – 3	FI
20 - 27	hexano-acetona	85:15	4 – 5	FII
28 - 33	hexano-acetona	80:20	6 – 16	FIII
34 - 42	hexano-acetona	70:30	17 – 29	FIV
43 - 47	hexano-acetona	60:40	30 – 38	FV
48 - 52	hexano-acetona	50:50	39 – 40	FVI
53 - 62	hexano-acetona	30:70	41 – 44	FVII
63 - 67	acetona	100	45 – 46	FVIII
			47 – 51	FIX
			52 – 60	FX
			61 – 67	FXI

##### 4.3.3.1 Obtención del compuesto JR-K002 (ácido betulínico).

En la fracción secundaria FII (Tabla 7) se observó la formación de cristales blancos, éstos se separaron mediante filtración al vacío y fueron sometidos a múltiples lavados utilizando MeOH con el objetivo de limpiarlos ya que el compuesto resultó ser soluble en metanol y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Este compuesto se identificó mediante métodos espectroscópicos como ácido betulínico y por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura (Solichin et al., 1980; Mahato et al., 1994). **Ácido betulínico:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, piridina-*d*<sub>5</sub>) δ<sub>H</sub> 4.95 (1H, s, H-29a), 4.78 (1H, s, H-29b), 3.50 (2H, m, H-19, H-3), 2.67 (1H, m, H-13, H-16), 2.25 (2H, sa, H-15, H-19), 1.79 (3H, s, H<sub>3</sub>-30), 1.56 (4H, sa, H-6, H-16, H-21, H-22), 1.41 (5H, sa, H-6, H<sub>2</sub>-7, H-9, H-11), 1.23 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.06 (6H, s, H<sub>3</sub>-26, H<sub>3</sub>-27), 1.02 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.83 (3H, s, H<sub>3</sub>-25). FAB (positivo) *m/z* 465 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### 4.3.3.2 Obtención del compuesto JR-K005 (ácido oleanólico).

En la fracción secundaria FV (Tabla 7) se observó la formación de un precipitado amorfo de color blanco, este se separó mediante filtración al vacío. Este compuesto se identificó mediante métodos espectroscópicos como ácido oleanólico por comparación con una muestra auténtica y de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura (Seebacher et al., 2003). **Ácido oleanólico:** polvo blanco; IR (film) ν<sub>max</sub> 3429, 2960, 1450, 1363 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, piridina-*d*<sub>5</sub>) δ<sub>H</sub> 5.50 (1H, s, H-12), 3.44 (1H, dd, *J* = 6.8 Hz, H-3), 3.29 (1H, dd, H-18, ), 1.32 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 1.25 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.05 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.99 (3H, s, H<sub>3</sub>-29), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-25); FAB (postivo) *m/z* 479 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### 4.3.3.3 Obtención del compuesto JR-K003 ((-)-epicatequina)

En la fracción secundaria FX (Tabla 7) se observó la formación de un precipitado color amarillo oscuro, éste se separó mediante filtración al vacío y se sometió para ser limpiado a múltiples lavados utilizando diferentes disolventes. Este compuesto se identificó mediante métodos espectroscópicos como (-)-epicatequina por comparación de sus

constantes espectroscópica y espectrométricas con aquellas descritas en la literatura para la (-)-epicatequina (Schroeter, H. et al., 2006). (-)-**epicatequina**:  $[\alpha]_D -16$  (MeOH), RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  6.81 (1H, d,  $J=1.8, 2'$ ), 6.78 (1H, dd,  $J= 6.9, 3.0, 5'$ ), 6.75 (1H, d,  $J= 6.9, 3.0, 6'$ ), 5.96 (1H, d,  $J= 2.4, 6$ ), 5.93 (1H, d,  $J= 2.4, 8$ ), 4.83 (1H, s, 2), 4.21 (1H, m, 3), 2.73 (1H, dd,  $J= 16.5, 4.3, 4\beta$ ), 2.73 (1H, dd,  $J= 16.5, 4.3, 4\alpha$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  158.0 (C-7), 157.9 (C-5), 157.6 (C-9), 146.0 (C-3'), 145.9 (C-4'), 132.4 (C-1'), 119.5 (C-2'), 115.9 (C-6'), 115.4 (C-5'), 110.2 (C-10), 96.5 (C-6), 96.0 (C-8), 80.0 (C-3), 67.5 (C-2), 29.5 (C-4).

#### 4.3.3.4 Obtención del compuesto JR-K007 (quercetina).

Los análisis de cromatografía en capa fina de la fracción secundaria FIX (Tabla 7) revelaban la presencia de un compuesto contaminado. Esta fracción se lavó en repetidas ocasiones con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , posteriormente se realizó una cromatografía preparativa en capa delgada. Este proceso permitió el aislamiento y caracterización de la quercetina. El compuesto JR-K007 se identificó por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas en la literatura para la quercetina (Breitmaier et al., 1990). **Quercetina**: polvo amarillo;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 175.8 (C-4), 163.8 (C-7), 160.9 (C-9), 156.2 (C-5), 147.6 (C-4'), 147.0 (C-2), 145.0 (C-3'), 135.6 (C-3), 122.2 (C-1'), 120.1 (C-6'), 115.7 (C-5'), 115.4 (C-4'), 103.1 (C-10), 98.1 (C-6), 93.2 (C-8).

#### 4.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción FIII

La fracción secundaria FIII (0.8503 g, Tabla 7) fue recromatografiada utilizando una columna abierta empacada con 100 g de Sephadex LH-20 que se eluyó de forma isocrática con metanol. Este proceso generó un total de 15 fracciones de 25 mL cada una, las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica obteniéndose diez conjuntos de fracciones terciarias. Este proceso se resume en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción FIII por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 obtenida a partir del extracto de la corteza de *B. crassifolia*.

Fracciones	Eluyente	Fracciones combinadas	Clave
1 - 15	metanol	1	FIII-I
		2 - 4	FIII-II
		5 - 6	FIII-III
		7 - 8	FIII-IV
		9 - 10	FIII-V
		11	FIII-VI
		12 - 13	FIII-VII
		14	FIII-VIII
		15	FIII-IX

#### 4.3.4.1 Obtención del compuesto JR-K004 (betulina)

Los análisis de cromatografía en capa fina de la fracción secundaria FIII-VIII (Tabla 8) revelaban la presencia de un compuesto contaminado. Esta fracción se hizo pasar a través de un embudo empacado con gel de sílice fase reversa para eliminar los pigmentos utilizando MeOH como disolvente. Posteriormente se llevó a cabo el mismo procedimiento, utilizando carbón activado en lugar de la sílica fase reversa con el mismo objetivo. Del filtrado obtenido se obtuvo un polvo amorfo de color blanco que se separó mediante filtración al vacío. El compuesto obtenido se identificó como betulina por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas descritas en la literatura (Solichin et al., 1980; Mahato et al., 1994). **Betulina:** polvo amorfo de color blanco;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, piridina- $d_5$ )  $\delta_{\text{H}}$  4.95 (1H, s, H-29a), 4.78 (1H, s, H-29b), 3.50 (2H, m, H-19, H-3), 2.67 (1H, m, H-13, H-16), 2.25 (2H, sa, H-15, H-19), 1.79 (3H, s, H<sub>3</sub>-30), 1.56 (4H, sa, H-6, H-16, H-21, H-22), 1.41 (5H, sa, H-6, H<sub>2</sub>-7, H-9, H-11), 1.23 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.06 (6H, s, H<sub>3</sub>-26, H<sub>3</sub>-27), 1.02 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.83 (3H, s, H<sub>3</sub>-25); FAB (positivo)  $m/z$  479  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

#### 4.3.5 Fraccionamiento terciario de la fracción FI

La fracción secundaria FI (1.8273 g, Tabla 7) fue recromatografiada utilizando una columna abierta empacada con 90g de gel de sílice y empleando como eluyente una mezcla de hexano-isopropanol en diversas proporciones de polaridad creciente. Este proceso

generó un total de 73 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica obteniéndose doce conjuntos de fracciones terciarias. Este proceso se resume en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción FI por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de *B. crassifolia*.

Fracciones	Eluyente (s)	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
1 – 25	hexano-isopropanol	99.0:1.0	1 – 6	FI-I
			7 – 10	FI-II
			11 – 13	FI-III
26 – 34	hexano-isopropanol	98.5:1.5	14 – 20	FI-IV
			21 – 24	FI-V
			25 – 29	FI-VI
35 – 40	hexano-isopropanol	98.0:0.20	30 – 37	FI-VII
			38 – 42	FI-VIII
			43 – 45	FI-IX
41 – 73	hexano-isopropanol	90:10	46 – 54	FI-X
			55 – 62	FI-XI
			63 – 74	FI-XII

#### 4.3.5.1 Obtención del compuesto JR-K006 ( $\beta$ -sitosterol)

La fracción terciaria FI-IX (1.5369g, Tabla 9) fue recromatografiada utilizando una columna abierta empacada con 90 g de gel de sílice y empleando como eluyente una mezcla de hexano-isopropanol en diversas proporciones de polaridad creciente. Este proceso generó un total de 25 fracciones de 25 mL cada una, las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica obteniéndose cuatro conjuntos de fracciones cuaternarias. Este proceso se resume en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Resumen del fraccionamiento cuaternario de la fracción FI-IX por cromatografía en columna de gel de sílice obtenida a partir del extracto de la corteza de *B. crassifolia*.

Fracciones	Eluyente (s)	Proporción	Fracciones combinadas	Clave
1 - 25	hexano-isopropanol	15:1	1 – 8	FI-IX-I
			9 – 20	FI-IX-II
			21 – 23	FI-IX-III
			24 – 25	FI-IX-IV



De la fracción cuaternaria FI-IX-I (Tabla 10) precipitó de manera espontánea un sólido cristalino el cual fue identificado por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas como el  $\beta$ -sitosterol.

#### **4.4 Síntesis de los derivados del ácido oleanólico.**

##### **4.4.1 Acetilación del ácido oleanólico.**

A una solución de ácido oleanólico (20mg) en piridina (1.5 mL), se le adicionaron 10 equivalentes de anhídrido acético y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (0.5 mg). El progreso de la reacción se monitoreó mediante ccf y cuando la reacción se completó, la solución se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), y se lavó sucesivamente con HCl 1 N ( $3 \times 10$  mL), solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 10$  mL), y agua ( $3 \times 10$  mL), y por último se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó a sequedad. La mezcla resultante se purificó mediante ccf preparativa utilizando gel de sílice y hexano-acetato de etilo (10:3). El derivado acetilado del ácido oleanólico se obtuvo como un sólido en forma de agujas sin color (18.9 mg,  $R_f$  0.64); RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ):  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (1H, s, H-12), 3.44 (1H, dd,  $J = 6.8$  Hz, H-3), 3.29 (1H, dd, H-18), 1.32 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 1.25 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.05 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.99 (3H, s, H<sub>3</sub>-29), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-25); FAB (positivo)  $m/z$  479  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (Kashiwada et al., 2000; Hirchi et al., 2003).

##### **4.4.2 Metilación del ácido 3-acetiloleanólico.**

El derivado acetilado del ácido oleanólico fue tratado con un exceso de una solución etérea fresca de diazometano para obtener así el ester metílico del ácido 3-acetiloleanólico. La mezcla resultante se purificó mediante ccf preparativa utilizando gel de sílice y se eluyó con una mezcla de hexano- acetato de etilo (10:1). El derivado se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco (18.9 mg,  $R_f$  0.43); RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ )  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (1H, s, H-12), 3.44 (1H, dd,  $J = 6.8$  Hz, H-3), 3.29 (1H, dd, H-18), 1.32 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 1.25 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.05 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.99 (3H, s, H<sub>3</sub>-29), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-25); FAB (positivo)  $m/z$  479  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (Hirchi et al., 2003).

#### 4.4.3 Metilación del ácido oleanólico.

El ácido oleanólico (20.0 mg) se disolvió en una mezcla de éter etílico y metanol y se le adicionó en exceso una solución etérea de diazometano. El producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando 5 gramos de gel de sílice y se eluyó con una mezcla de hexano-acetato etilo (10:2). El compuesto se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco (19.5 mg,  $R_f$  0.54); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (4.08);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, piridina- $d_5$ )  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (1H, s, H-12), 3.44 (1H, dd,  $J = 6.8$  Hz, H-3), 3.29 (1H, dd, H-18, ), 1.32 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 1.25 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.05 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 0.99 (3H, s, H<sub>3</sub>-29), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-25); FAB (positivo)  $m/z$  479  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (Zhu et al., 2001).

#### 4.4.4 Preparación de la sal sódica del ácido oleanólico.

Una solución del ácido oleanólico (50 mg) se trató con 2 mL de una solución 1 N de NaOH en  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}$  (1:1) a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se eliminó la acetona por evaporación y la solución resultante se sometió a un proceso de purificación utilizando MCI-gel CHP20P (Sulpelco), y se lavó con agua hasta eliminar todo el exceso de NaOH. Por último se eluyó la columna con metanol obteniéndose la sal sódica del ácido oleanólico puro. La sal se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco; p. f. 257-260; FAB (positivo)  $m/z$  495  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 524  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (Zhu et al., 2001).

#### 4.5 Ensayo biológico

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de *Byrsonima crassifolia* se eligieron 2 microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por ser éstos patógenos orales causantes de caries dentales y enfermedades periodontales respectivamente. Estas cepas fueron obtenidas del Departamento de Periodontología del Colegio de Odontología de la Universidad de Illinois en Chicago (University of Illinois at Chicago). Se utilizaron caldo infusión de cerebro-corazón (Difco, Sparks, MD) y medio soya tripticaseína suplementado

con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02µg/mL), hemina (5 µg/mL), y nitrato de potasio (0.02%), para crecer a *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente.

La actividad antimicrobiana de los compuestos (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI) se evaluó utilizando un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos (Fisher Scientific, Itasca, IL). Los cultivos de cada especie incubados a lo largo de la noche se centrifugaron (10 000 rpm, 10 min), se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy, Rochester, NY). Cada pozo contenía *S. mutans*  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL ó *P. gingivalis*  $5 \times 10^6$  UFC/mL, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se utilizaron muestras por triplicado para cada concentración de prueba.

Los controles utilizados consistieron en medio de cultivo inoculado y sin compuestos de prueba mientras que el blanco contenía únicamente medio de cultivo sin inocular. Todas las placas se incubaron 37°C bajo condiciones atmosféricas adecuadas [*S. mutans* se incubó en condiciones aerobias mientras que *P. gingivalis* se incubó en una cámara de crecimiento anaerobio (Forma Scientific Inc. Marietta, OH) en 10 % H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>], el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A<sub>660</sub> nm) después de 24 y 48 hrs utilizando un lector de placas (Power Wave 200 Microplate Scanning Spectrophotometer, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT).

El valor de CMI para cada microorganismo analizado se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 A<sub>660</sub> nm. Se utilizó gluconato de clorhexidina (CHX) como control positivo (Sigma, St. Louis, MO) mostrando valores de CMI de 1.25 µg/mL contra *S. mutans* y 0.312 µg/mL contra *P. gingivalis*.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *B. crassifolia* se realizó con base en el amplio uso de esta especie en la medicina tradicional. Como se describe en la Tabla 5, uno de los múltiples usos tradicionales de la especie *B. crassifolia* es el tratamiento de infecciones orales, por lo que este estudio se enfocó biológicamente en esa dirección y durante la realización de los ensayos biológicos preliminares se estableció que el extracto preparado a partir de la corteza *B. crassifolia* inhibe el crecimiento de las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*, agentes etiológicos de las caries y de las infecciones periodontales, respectivamente. La determinación del potencial antibacteriano del extracto de la corteza de *B. crassifolia*, se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita por la Dra. Christine Wu y colaboradores (Li et al., 1998). Los resultados de esta evaluación indicaron que el extracto total preparado a partir de la corteza de *B. crassifolia* presentaba una concentración mínima inhibitoria de 780.1 y de 620.3  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente (Tabla 11). Se considera que un extracto vegetal es activo para *S. mutans* y *P. gingivalis* si la CMI es menor a 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Wu et al., 2002; Li et al., 1998)

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

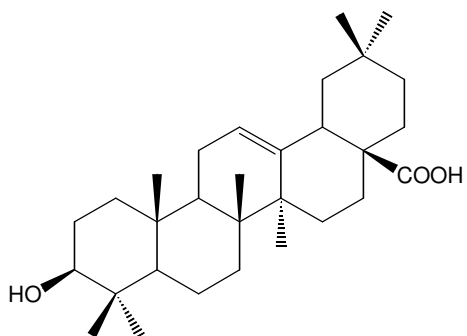
Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Hexano (D001)	670.5	520.8
CHCl <sub>3</sub> (D002)	560.7	470.3
AcOEt (D003)	350.1	400.0
metanol acuoso (D004)	>1000	>1000
extracto total	780.1	620.3
D005	690.5	560.4
CHX <sup>b</sup>	1.2	0.3

<sup>a</sup>Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

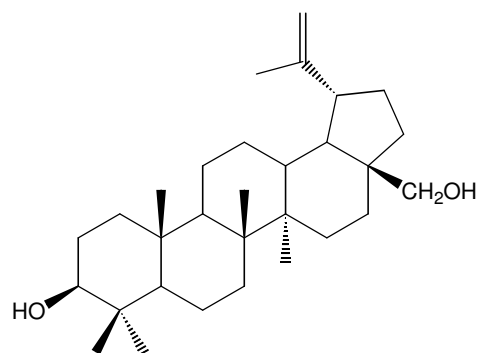
<sup>b</sup>CHX: gluconato de chlorhexidina.

Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de la corteza de *B. crassifolia* con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada para el extracto total (Tabla 11). Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad biológica del extracto original.

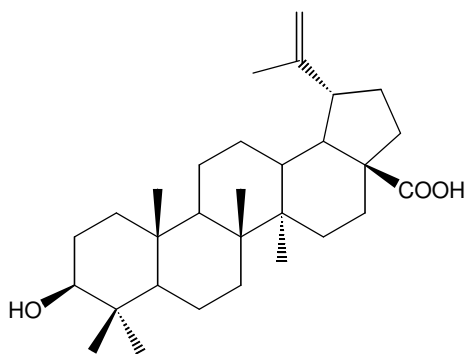
La preparación del extracto activo en gran escala se realizó mediante un proceso de maceración, tal como se indicó en la Parte Experimental (4.3.1). Posteriormente, el extracto resultante se sometió a un fraccionamiento con disolventes de diferente polaridad. De este fraccionamiento se obtuvo la fracción activa D005 (CMI= 690.5 y 560.4  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), la cual fue sometida a sucesivas recromatografías. Este proceso permitió aislar y determinar la estructura química de los triterpenoides ácido oleanólico, ácido betulínico, betulina, los flavonoides (-)-epicatequina y quercetina y el esteroide  $\beta$ -sitosterol (Figura 3). Todos los compuestos fueron caracterizados por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura y por comparación directa con muestras auténticas. En la Figura 3 se muestran las estructuras de los compuestos aislados.



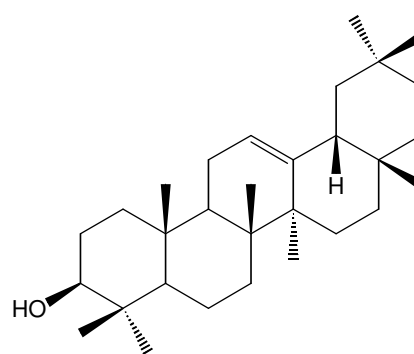
**ácido oleanólico (1, JR005)**



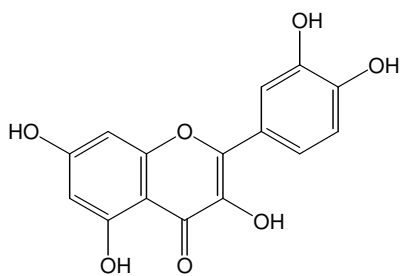
**betulina (2, JR004)**



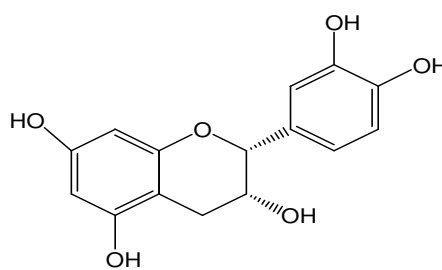
**ácido betulínico (3, JR002)**



**β-amirina (4, JR001)**



**quercetina (5, JR-K007)**



**epicatequina (6, JR003)**

**Figura 3.** Compuestos aislados de la fracción activa D005.

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de las evaluaciones de los compuestos aislados de la fracción activa D005. La epicatequina (**6**) presentó la mejor actividad antibacteriana con una CMI de 25.0 y 90.2  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Al comparar la actividad antibacteriana de los compuestos restante con la obtenida para el control positivo clorhexidina, podemos apreciar que presentan una menor actividad contra las bacterias de prueba presentando CMI dentro del rango entre 450.3 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans* (Tabla 12). Para el caso de *P. gingivalis* el rango de CMIs que se determinaron para cada compuesto se encuentran entre 250 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 12).

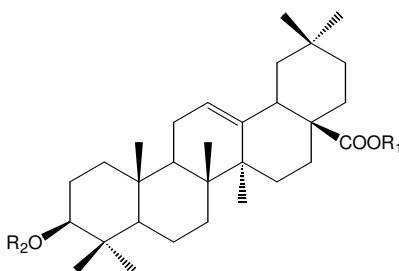
**Tabla 12.** Actividad antimicrobiana (CMI) de los compuestos aislados y derivados del ácido oleanólico sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<b>1</b>	625.0	488.2
<b>2</b>	488.2	250.0
<b>3</b>	>1000	>1000
<b>4</b>	>1000	>1000
<b>5</b>	450.3	320.6
<b>6</b>	25.0	90.2
CHX <sup>b</sup>	1.2	0.3

<sup>a</sup>Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

<sup>b</sup> CHX: gluconato de chlorhexidina.

Con la finalidad de incrementar la actividad observada por el ácido oleanólico (**1**) y debido a las cantidades importantes que se lograron aislar se propusieron una serie de modificaciones sencillas con la finalidad de determinar si los derivados presentaban una mejor actividad. Al preparar los derivados del ácido oleanólico (**1**) y evaluarlos se observó que sólo la sal sódica (**1e**, Figura 4, Tabla 13) del ácido oleanólico presentaba una mejor actividad que el producto natural. En la Figura 4 se muestran los derivados realizados y en la Tabla 13 las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada uno de los derivados preparados.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>1a</b>	H	CH <sub>3</sub> CO
<b>1b</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO
<b>1c</b>	CH <sub>3</sub>	H
<b>1e</b>	Na <sup>+</sup>	H

**Figura 4.** Estructura de los derivados del ácido oleanólico.

**Tabla 13.** Actividad antimicrobiana (CMI) de los derivados del ácido oleanólico sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Muestra	CMI (µg/mL) <sup>a</sup>	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<b>1<sup>a</sup></b>	78.6	1000
<b>1b</b>	781.2	>1000
<b>1c</b>	1000	1000
<b>1e</b>	7.8	3.9
CHX <sup>b</sup>	1.2	0.3

<sup>a</sup>Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

<sup>b</sup>CHX: gluconato de chlorhexidina.



## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta investigación representa una contribución al conocimiento de la especie *Byrsonima crassifolia*, planta medicinal utilizada ampliamente en las prácticas médicas tradicionales del centro y sur de México (Argueta, 1994).

Así, el estudio químico biodirigido del extracto preparado a partir de la corteza de la *Byrsonima crassifolia* permitió el aislamiento y caracterización de cuatro triterpenoides [ $\beta$ -amirina, ácido oleanólico, ácido betulínico y betulina], dos flavonoides [quercetina y epicatequina] y el esteroide  $\beta$ -sitosterol.

La quercetina (**5**), el ácido oleanólico (**1**), la betulina (**2**), el ácido betulínico (**3**), la epicatequina (**6**) y la  $\beta$  amirina (**4**) se encuentran en cantidad suficiente en la materia prima, son estables, se pueden identificar y cuantificar por medio de técnicas analíticas convencionales. Sin embargo, estos compuestos no pueden ser considerados como compuestos marcadores debido a que poseen una amplia distribución en la naturaleza y esto restringe su utilidad como marcadores de la especie.

Por otro lado, de los compuestos aislados en el presente estudio solo la epicatequina (**6**) presentó una actividad antimicrobiana significativa sobre el crecimiento de *S. mutans* y *P. gingivalis*. El triterpeno ácido oleanólico (**1**) y el flavonoide la quercetina (**5**) presentaron actividad antimicrobiana moderada (Tabla 13).

La presencia del ácido oleanólico, la quercetina y la epicatequina puede estar relacionada con sus usos tradicionales como agente antiséptico y para el tratamiento de infecciones en la boca y en la piel (Martínez, 1989; Argueta, 1994). En este contexto es bien conocido que el ácido oleanólico es un potencial inhibidor de la síntesis de glucanos insolubles (SGI) de *S. mutans* (Kozai et al., 1999; Sasazuka et al., 1995; Herrera et al., 2006). Además, este compuesto ha demostrado actividad antiinflamatoria, antitumoral, hepatoprotectora, citotóxica, antidiabetogénica, antibacteriana y e inhibidora del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Sasazuka et al., 1995; Herrera et al., 2006). Por otra parte, la epicatequina tiene propiedades antiulcéricas, antiinflamatorios, astringentes, antisépticas y antiamibianas comprobadas, lo que podría explicar el empleo de la corteza para el tratamiento de infecciones (Calzada et al., 2000; Lin et al., 2001).

La sal sódica del ácido oleanólico (**1e**) presenta una mayor actividad que el producto natural sobre el crecimiento de las especies de prueba. En este caso las CMI fueron de 7.8 y 3.9 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente.

Aunque la clorhexidina presenta una CMI considerablemente menor a la de los productos naturales aislados en esta investigación (CMI = 1.25 and 0.312 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente) este compuesto presenta desventajas tales como el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto lo cual limita su uso en el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral (Quirynen et al., 2000).

## 7. PERSPECTIVAS

El presente trabajo de investigación realizado sobre la especie *Byrsonima crassifolia* representa solo una pequeña contribución al estudio sobre la química y la actividad antimicrobiana de esta especie. Sin embargo, es necesario generar mayor cantidad de información científica sobre esta especie. Es por ello que a partir de este trabajo hemos formulado las siguientes perspectivas:

- Continuar con el estudio fitoquímico conducente a realizar el aislamiento de compuestos que puedan ser asignados marcadores de la especie.
- Realizar ensayos de toxicidad para el extracto y los compuestos aislados.
- Determinar el mecanismo de acción mediante el cual el extracto y los compuestos aislados de esta planta producen el efecto antimicrobiano.
- Continuar la síntesis total o parcial de compuestos análogos más potentes de los terpenoides aislados, de la epicatequina y de la quercetina.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Aguiar, R. M., David, J. P., David, J. M. (2005). Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry*, **66**, 2388-2392.
2. Amarquaye, A., Che, C., Bejar, E., Malone, M. H., Fong, H. (1994). A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Medica*, **60**, 85-86.
3. American Cancer Society (2005). Cancer Facts and Figures. Atlanta, Georgia, ACS 1998.
4. Aragao, P., De Toledo, J. B., Morais, A., Braz, R. (1990). Natural substances isolated from *Stigmaphyllon tomentosum* and *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, **13**, 254-259. Colombia
5. Argueta, A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, 56-59
6. Badria, F. A.; Zidan, O. A. (2004). Natural Products for Dental Caries Prevention. *Journal of Medicinal Food*. **7**, 381-384.
7. Bejar, E., Amarquaye, A., Che, C., Malone, M., Fong, H. (1995). Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *International Journal of Pharmacognosy*, **33**, 25-32.
8. Bejar, E., Malone, M. (1993). Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia* a medicinal tree from Mexico. Part I. *Journal of ethnopharmacology*, **39**, 141 – 158.
9. Berger, I., Barrientos, A., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter, C., Kubelka, W. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of ethnopharmacology*, **62**, 107-115
10. Binkley, C., Furr, L. A., Carrico, R., McCurren, C. (2004). Survey of oral care practices in US intensive care units. *American Journal of Infectology and Control*, **32**, 161-9.
11. Bloom, B., Gift, H. C., Jack, S. S. (1989). Dental services and oral health, United States. *Vital Health*.

12. Statistics [10] No. 183. 1992. DHHS publication No. (PHS) Hyattsville, Maryland. National Center for Health Statistics, 93-1511.
13. Bone, K. (2001). Standardized extracts: Neither poison nor panacea. *HerbalGram*, **53**, 50-55.
14. Bonzani, J. (1970). Gallic acid, pyrogallol, and pyrocatechine in *Byrsonima intermedia latifolia*. *Revista de Farmacia e Bioquímica da Universidade de Sao Paulo*, **8**, 187-92.
15. Bonzani, J. (1970).  $\beta$ -Amyrin in roots of *Byrsonima intermedia*. *Revista de Farmacia e Bioquímica da Universidade de Sao Paulo*, **8**, 53-67.
16. Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Sanidad y Consumo. (2004). Orden por el que se establece la lista de plantas cuya venta al público queda prohibida o restringida por razón de su toxicidad.
17. Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., Aguilar, L. (1990). Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders.1. Screening of 84 Plants against Enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, **30**, 55-73.
18. Cáceres, A., López, B., Giron, M., Logemann, H. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatophytic infeccions. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **40**, 207-213.
19. Cáceres, A., López, B., Juarez, X., Del Águila, J., García, S. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatophytic infeccions. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **31**, 263-276
20. Calzada, F. (2000). Proantocianidinas del tipo A y flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Coniza filaginoides* (DC) Hieron (Asteraceae). UNAM, Facultad de Química, México, D.F. Tesis de Doctorado.
21. COFEPRIS. Hacia una política farmacéutica integral para México. Secretaría de Salud. México, D.F., 2005.
22. Goh, C. T., Taweechaisupapong, S., Taylor, K. G., Doyle, R. J. (2000). Polycarboxylates inhibit the glucan-binding lectin of *Streptococcus sobrinus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1**, 111-116.

23. Cox, P.A., Balick, M.J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Sci. Amer.* 82-97.
24. Diario Oficial de la Federación, (15 de diciembre de 1999). Acuerdo por el que se determinan las plantas prohibidas o permitidas para té, infusiones y aceites vegetales comestibles.
25. Dosseh, C., Moretti, C., Tessier, A. M., Delaveau, P. (1980). Chemical study on the leaves of *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex Juss. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **14**, 136-42.
26. Doyle, M. J., Hunter-Rinderle, S. J., Glandorf, W. M., White, D. J. (2003). Promoting whole body health with topical oral compositions containing antimicrobials, *U.S. Pat. Appl. Publ.* **4**, 12- 17.
27. Eberhard, B., Wolfgang, V. (1990). Carbon – 13 NMR Spectroscopy. High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. 3a ed. *Verlagsgesellschaft*, 453
28. Eisner, S. (2001). Guidance Documents for the Manufacture and Sale of Botanical Extracts. Use of Marker Compounds in Manufacturing and Labeling Botanically Derivates Dietary Supplements. American Herbal Products Association. USA.
29. Enwonwu C. O., Phillips, R. S., Falkler, W. A. (2002). Nutrition and oral infectious diseases: state of the science. *Compendium of continuing education in dentistry*, **23**, 431-4
30. Fabricant, D.S., Fransworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Enviromental Health Perpectives*, **109**, 69-74.
31. FDA Compliance policy guides, 1980.
32. Flaster, T. y Lassiter, J. (2004). Quality control herbal preparations: using botanical references standards for proper identification. *HerbalGram*, **63**, 32-37.
33. Freedman, M., Tanzer, J. E. S., Allenspach, P. (1983). Colonization and virulence of *Streptococcus sobrinus*: the roles of glucan-association phenomena revealed by the use of *mutans*, Information Retrieval, Inc., Washington, D. C.
34. FUNCEI Fundación Centro de Estudios Infecto-biológicos (2004). Buenos Aires Argentina. Home page: <http://www.funcei.org.ar/contenido.aspx?idContenido=4>

35. Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D. (1995). Proanthocyanidins whit (+)-epicatechin Units from *Byrsonima crassifolia* Bark. *Phytochemistry*, **39** (3), 635-643.
36. Gift, H. C., Reisine, S. T., Larash, D. C. (1992). The Social Impact of Dental Problems and Visits. *American Journal of Public Health*, **86**, 1663-1668.
37. Glenco, R. J. (1992). Host Responses in Periodontal Diseases: current concepts. *Journal of Periodontology*, **63**, 338-355.
38. Gottlieb, O., Henriques, P., Taveira, M. (1975). Terpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. *Pytochemistry*, **14**, 1456.
39. Guan, Y. H., Lath, D. L., de Graaf, T., Lilley, T. H., Brook, A. H. (2003). Moderation of Oral Bacterial Adhesion Onsaliva-coated hydroxyapatite by polyaspartate. *Journal of Applied Microbiology*.
40. Heinrich, Michael. (2003). Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of old Diseases or a better understanding of Indigenous Cultures?. *Current topics in Medicinal Chemistry*, **31**, 141-154.
41. Herrera, M. D., Rodriguez, R., Ruiz, V. (2006). Functional Properties of Pentacyclic Triterpenes contained in "Orujo" olive oil. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2**, 45-49.
42. Heyl, G., Heil, H., Festschr. A. (1926). Cortex of *Byrsonima crassifolia*. 62-71.
43. Hichri, F., Jannet, H. B., Cheriaa, J., Jegham, S., Mighri, Z. (2003). Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and other natural triterpenic compounds. *C.R.Chimie*, **6**, 473-483.
44. Hirchi, F.; Jannet, H. B.; Cheriaa, J.; Jegham, S.; Mighri, Z. (2003). Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and other natural triterpenic compounds. *C. R. Chimie* **6**, 473-483.
45. Hollister, M. C., Weintraub, J. A. (1993). The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *Journal of Dental Education*.
46. Houghton, P.J. (1999). Roots of remedies: Plants, people and pharmaceuticals. *Chem Ind.* **1**, 15-19
47. Hull P. S. (1980). Chemical inhibition of plaque. *J. Clin Periontol.* **47**, 7431-7442
48. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, web pages:  
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=msal04&c=3354>  
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=msal06&c=3357>

49. Kashiwada, Y., Nagao, T., Hashimoto, A., Ikeshiro, Y., Okabe, H., Cosentino, L. M., Lee, K.L. (2000). Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-*O*-acyl ursolic acid derivatives. *Journal of Natural Products*, **63**, 1619-1622.
50. Kinniment, S. L., Wimpenny, J. W. T., Adams, D., Marsh, P. D. (1996). The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *Journal of Applied Bacteriology*, **2**, 120-125.
51. Kirkpatrick, W. R., Revankar, S. G., McAtee, R. K. (1998). Detection of *Candida dubliniensis* oropharyngeal samples from HIV infected patients in North America by primary CHRO Magar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Micro.*, **36**, 3007-3012.
52. Kitagaki, K., Natsumae, A., Ghoda, A. (1983). Efficacy of therapeutic agents against gingivitis and periodontal disease: in vitro antibacterial activity against strictly anaerobic periodontopathic bacteria. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, **11**, 451.
53. Kozai, K., Suzuki, J., Okada, M., Nagasaka, N. (1999). Effect of oleanolic acid-cyclodextrin inclusion compounds on dental caries by *in vitro* experiment and rat-caries model. *Microbios*, **97**, 179-188.
54. Koneman, Elmer W et al. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 73-74, 123-125.
55. Leonti, M. (2001). Ethnopharmacology of the Popolucá Mexico: an evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 1653-1669.
56. Li, X.-C., Van-Der, P., Wu, C.D. (1998). Binaphthalenone glycosides from African chewing sticks, *Diospyros lycioides*. *Journal of Natural Products*, **61**, 817-820.
57. Lin, J.-K., Tsai, S.-H., Lin-Shiau, S.-Y. (2001). Antiinflammatory and antitumor effects of flavonoids and flavanoids. *Drugs of future* **26**, 145-152.
58. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology. Reviews*. **50**, 353-380.
59. López, A., Hudson, J. (2001). Antiviral and antimicrobial activity of colombian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, **77**, 189-196.
60. Madinier I; Jehl-Pietri C; Monteil R A. (1997). Drug-induced xerostomia. *Annales de Medecine Interne*, **148**, 398-405.



61. Maguire A., Rugg-Gunn A. J., Butler, T. J. (1996). Dental health of children taking antimicrobial and non-antimicrobial liquid oral medication long-term. *Caries Research*, **1**, 16-21.
62. Mahato, S., Kundu, A. (1994). CNMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*, **37** (6), 1517-1575.
63. Markham, K. R. (1976). C NMR of Flavonoids – II. Flavonoids other than Flavone and Flavonol Aglycones. *Tetrahedron*, **32**, 2607-2612.
64. Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6ª ed. Ediciones Botas. México, 226-227.
65. Martínez, M., González, A.R., Cazares, L., Moreno, M.N., García, A.N. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. *Journal of ethnopharmacology*, **66**, 79-82.
66. Mendes, C., Cruz, F., David, J., Nascimento, I., David, J. (1999). Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Química Nova* **22**, 185-188.
67. National Institute of Cancer Research NIDCR.  
Disponível em <http://www.nidcr.nih.gov/>
68. Petersen, P. J., Wang, T. Z., Dushin, R. G., Bradford, P. A. (2004). Comparative in vitro activities of Ac98-6446, a novel semisynthetic glycopeptide derivative of the natural product mannopeptimycin, and other antimicrobial agents against Gram-positive clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 739-746.
69. Quirynen, M., Teughels W., De Soete M., Van Steenberghe, D. (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology*, **28**, 72-90.
70. Rastrelli, L., Tommasi, N., Berger, I., Cáceres, A., Saravia, A., Simone, F. (1997). Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, **45**, 647-650.
71. Reichart, P. A. (2003). Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, and sarcoma. *Medical Microbiol. Immunol.*, **192**, 165-169.
72. Reif, K., Sievers, H. y Steffen, J.P. (2004). The role of chemical reference Standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials –A European perspective. *HerbalGram*, **63**, 38-43.

73. Restrepo, A.M. (2003). Enfermedades infecciosas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas 6ª ed. 4-7 Colombia.
74. Rezende, C.M., Fraga, S. (2003). Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**, 425-428.
75. Russell, M. W. (1998). Future strategies to control oral infections. Editor(s): Guggenheim, B.; Shapiro, S. Oral Biology at the Turn of the Century: Misconceptions, Truths, Challenges and Prospects, Proceedings of the Conference on the Occasion of the 30th Anniversary of the Founding of the European Research Group of Oral Biology (ERGOB), Interlaken, Switzerland, **20-23**, 239-246.
76. Sannomiya, M., Fonseca, V. B., Da Silva, M. A., Rocha, L., Dos Santos, L. C., Hiruma, C. A., Brito, A. R., Vilegas, W. (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 1-6.
77. Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Coelho, R. G., Dos Santos, L. C., Hiruma, C. A., Souza, A., Vilegas, W. (2004). Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of Chromatography*, **1035**, 47-51.
78. Sasazuka, T., Kameda, Y., Endo, M., Suzuki, H., Hiwatachi, K. (1995). Water-soluble oleanolic acid. Production, inhibition of insoluble glucan synthesis and antibacterial action. *Seito Gijutsu Kenkyu Kaishi*, **43**, 63-67.
79. Scannapieco F. A. (2004). Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease?. *Compendium Continuing Education in Dentistry*, **25**, 16-25.
80. Sharpless, K. E., Sander, L., Wise, S., Nguyen Pho, A., Lyon, R., Ziobro, G., Betz, J. (2004). Development of standard reference materials for the analysis of dietary supplements. *HerbalGram*. **63**, 44-47.
81. Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. (2003). Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C resonances of oleanolic acid, 18α-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **41**, 636-638.

82. Sholichin, M., Yamasaki, K., Kasai, R., Tanaka, O. (1980). Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lupine-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid. *Chem. Pharm. Bull*, **28**, 1006-1008.
83. Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E. I. (2005). Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *25*, 247-251.
84. The Merck Index. 13<sup>th</sup> edition. Merck & CO. INC. 2001
85. World Health Organization, WHO (1998). Quality Control methods for medicinal plants materials. Geneva.
86. Wilson, M. (1996). Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology*, **44**, 79-87.
87. Wirthlin, M. R., Chen P. K., Hoover, C. I. (2005). A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. *J. Periodontol.*, *9*, 1443-9.
88. Wu, Christine D., Wei, Guo-Xian. (2002). Tea as a functional food for oral health, *Nutrition*, **18**, 443-444.
89. Yamanaka, Ayumi. (2004). Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Shika Gakuho*, **104**, 115-119.
90. Zhang, Y., Jayaprakasam, B., Seeram, N. (2004). Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 228 -233.
91. Zhu, Y-M., Shen, J.-K., Wang, H.-K., Cosentino, M., Lee, K.-H. (2001). Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 3115-3118.