



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS
AISLADOS DE LA CORTEZA DE CUACHALALATE
(*Amphipterygium adstringens*) SOBRE
BACTERIAS PATÓGENAS DE LA CAVIDAD
ORAL.**

TESIS

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

PRESENTAN:

ANA LUISA CARRASCO CARRIZOSA

ERIKA RIVERA AMÉZQUITA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. María Isabel Laurents
Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
2do. Suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 126. Edificio E
Facultad de Química UNAM.

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentantes

Ana Luisa Carrasco Carrizosa

Erika Rivera Amézquita

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE DIAGRAMAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Enfermedades orales de origen microbiano	2
2.2. Microorganismos de la cavidad oral	5
2.3 Bioplaca	8
2.3.1. Fases de formación de las bioplasmas	9
2.3.1.1. Acondicionamiento de la superficie	9
2.3.1.2. Adsorción y fijación	10
2.3.1.3. Maduración	10
2.3.1.4. Crecimiento y dispersión	10
2.3.1.5. Resistencia de las bioplasmas	11
2.4 Antecedentes de <i>Amphipterygium adstringens</i> Schiede ex Schlecht (cuachalalate)	12
2.4.1. Actividad biológica de los compuestos aislados de <i>Amphipterygium adstringens</i>	19
2.5 Generalidades sobre los ácidos anacárdicos	21
2.5.1. Actividad biológica de los ácidos anacárdicos	23

	Pág.
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	24
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
4.1 <i>Procedimientos generales</i>	25
4.1.1 Análisis cromatográficos	25
4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	25
4.1.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	26
4.2. Material vegetal	26
4.3. Estudio fitoquímico de <i>Amphyterigium adstringens</i>	26
4.3.1. Preparación del extracto íntegro de la corteza de <i>A. adstringens</i>	26
4.3.2. Fraccionamiento primario de <i>A. adstringens</i>	27
4.3.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII	28
4.3.4. Fraccionamiento secundario de la A FIV	30
4.3.5. Separación mediante CLAE del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (28)	31
4.4. Ensayos biológicos	32
4.4.1. Microorganismos de prueba	32
4.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	32

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1. Caracterización estructural del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)- benzoico (28)	36
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
7. PERSPECTIVAS	47
8. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl	Cloroformo deuterado
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
g	Gramo
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
Hz	Hertz
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Concentración molar
μg	Microgramo
MHz	megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
%	Por ciento

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
t	Triplete
UFC	unidad formadora de colonias
UV	ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1.	Microorganismos aislados de la cavidad oral	5
2.	Compuestos aislados a partir de la corteza de <i>Amphipterygium Adstringens</i>	16
3.	Compuestos activos aislados del cuachalalate	19
4.	Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales	22
5.	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna al vacío del extracto etéreo obtenido de <i>Amphipterygium adstringens</i>	27
6.	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII	29
7.	Fraccionamiento cuaternario de la fracción FIIIa	30
8.	Fraccionamiento secundario de la fracción FIV	31
9.	Actividad antibacteriana (CMI) del extracto de éter de petróleo contra las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	34
10.	Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de la corteza de <i>A. adstringens</i> contra las bacterias <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i>	35
11.	Constantes espectroscópicas en las RMN ¹ H y ¹³ C para el ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (28)	45

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama	Contenido	Pág.
1.	Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto de éter de petróleo de <i>Amphipterygium adstringens</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1.	Índice DMFT alrededor del mundo	4
2.	Factores de riesgo relacionados con la caries dental	5
3.	Mapa de distribución de <i>Amphipterygium adstringens</i> en México	13
4.	Árbol y corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i>	15
5.	Estructuras de los triterpenoides y esterol aislados de la corteza de <i>A. adstringens</i>	36
6.	Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	38
7.	RMN ¹ H del ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	39
8.	RMN ¹³ C del ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	42
9.	Espectro COSY del ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	43
10.	Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	44

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, que han constituido la base para procurar la salud en todo el mundo desde tiempos inmemorables, siguen utilizándose ampliamente y tienen una importancia consistente en el mundo actual. Todos los pueblos del mundo han usado a las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y la gran mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo siguen haciendo uso de ellas (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994). Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar los padecimientos que la aquejan, plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas (Mitscher *et al.*, 2000).

En lo que respecta al uso de plantas con fines curativos, México posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales entre sus variadas prácticas curativas tradicionales o populares. Aproximadamente 62 diferentes grupos étnicos viven en México actualmente, cada uno con su propia cultura, dialecto y repertorio de hierbas medicinales (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994; Lozoya, 1993; Aguilar, 2001).

En México, se estima que existen alrededor de 30,000 especies de plantas y se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas con un potencial terapéutico benéfico e increíblemente sólo el 1% de estas plantas medicinales ha sido estudiado a fondo considerando estas propiedades medicinales potenciales (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994).

De estas especies, se describe un grupo básico de 1000 plantas que han sido empleadas en la medicina tradicional de México durante casi 400 años para el tratamiento de enfermedades comunes como infecciones respiratorias y de la piel, desordenes gastrointestinales, hipertensión, dolor, diabetes o para inducir el sueño o el parto (Lozoya, 1993). En este contexto, tomando en cuenta que las enfermedades de la cavidad oral se encuentran entre las más comunes en México (SSA, 2006), es necesario llevar a cabo mayor investigación sobre plantas con

actividad antibacteriana sobre bacterias que se desarrollan en la cavidad oral. En este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que describe el estudio fitoquímico de la corteza de la especie *Amphymperigium adstringens*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades orales de origen microbiano.

Las enfermedades orales incluyendo caries dental, enfermedades periodontales (enfermedades de las encías, mandibulares y de los tejidos que soportan los dientes) y pérdida de los dientes afectan a más personas en el mundo en comparación con cualquier otra enfermedad (Wu *et al.*, 2002).

En la dentición temporal, la caries suele comenzar a partir de los 3– 4 años, y en la permanente el período de máxima exposición es de los 8 a los 20 años. La caries afecta a la calidad de vida infantil por producir dolor e infecciones que pueden desencadenar enfermedades sistémicas o la destrucción de la pieza dental. Las medidas de prevención primaria de la caries son más eficientes que las recomendaciones frente a las mal oclusiones o los traumatismos. Es una enfermedad multifactorial dependiente de las relaciones entre cuatro importantes grupos de factores: microbianos, huésped, ambientales y de tiempo; así pues, su prevención se basará en actuaciones sobre cada uno de los factores etiológicos para conseguir:

a) Aumentar la resistencia del huésped (flúor, sellado de fisuras y corrección de mal oclusión); b) Reducir el número de microorganismos (control de la placa dental y actuación contra la flora); c) Modificar los factores ambientales adversos (cambios dietéticos); d) Limitar el tiempo de permanencia de los alimentos cariogénicos en la boca (frecuencia de ingestión de alimentos), interviniendo en todos los apartados mediante la educación sanitaria (Gestal *et al.*, 2001).

El estudiar a la boca como un compartimiento aislado del resto del cuerpo es un punto de vista que debe cesar, ya que la salud bucal afecta a la salud general de las personal al causar dolor y sufrimiento al cambiar los hábitos alimenticios, la capacidad de hablar y en general su calidad de vida. Las enfermedades bucales son las más comunes de las enfermedades crónicas y son importantes por su prevalencia, y su impacto sobre los individuos y la sociedad en general, además de que el alto costo de los tratamientos de algunas de estas enfermedades excluye a gran parte de la sociedad. Los factores de riesgo para adquirir enfermedades bucales son bien

conocidos y son comunes para otras enfermedades crónicas, estos factores son: dieta, pobre higiene bucal, tabaquismo, alcoholismo, lastimaduras y estrés (OMS, 2005).

En algunos países, los padecimientos de la cavidad bucal ocupan el cuarto lugar en cuanto a costo de tratamiento. Se estima que su tratamiento representa entre el 5% y el 10% del gasto sanitario de los países industrializados, y está por encima de los recursos de muchos países en desarrollo. La situación para los adultos en países en desarrollo es peor, ya que normalmente sufren de acumulación de enfermedades bucales no tratadas y a pesar de que hay millones de personas en esta situación, los altos costos de los tratamientos necesarios en este tipo de enfermedades complejas es aún mayor que el necesario para tratar a infantes, lo cual se traduce en mayor decaimiento de la salud bucal, mayores costos e intervenciones clínicas inefectivas (OMS, 2005).

Las caries severas afectan a los niños en su calidad de vida: experimentan dolor, molestia física, desfiguramiento, infecciones agudas y crónicas, desordenes alimenticios y de sueño así como aumento en el riesgo de hospitalización, altos costos de tratamientos y pérdida de actividades escolares (OMS, 2005).

Es importante conocer la prevalencia de caries, la salud bucal y la alimentación: pues intervienen en el crecimiento craneofacial, el cáncer oral y la presencia de enfermedades infecciosas. Una condición nutricional deficiente afecta el desarrollo de los dientes y la alimentación, en caso de dietas ricas en carbohidratos, se suma como factor importante en la población bacteriana de la boca, por lo que estos factores pueden favorecer la caries y la enfermedad periodontal. Por otra parte, la implementación de programas de fluoración del agua y la adición de flúor a la leche o la sal, permiten afirmar que un suministro adecuado de este mineral previene el desarrollo de caries dental (Aguilera *et al.*, 2005).

La Figura 1 ilustra los niveles (severidad) de caries dental en niños de 12 años de edad medidos de acuerdo a los índices de decaimiento, pérdida y reparación dental (Decayed, Missing and Filled Teeth index, DMFT); los países en color verde presentan un índice muy bajo de DMFT, mientras que los países en color azul presentan un índice bajo, en color amarillo se muestran los países

con un índice moderado y en color rojo los que tienen un índice alto (Petersen *et al.*, 2005).

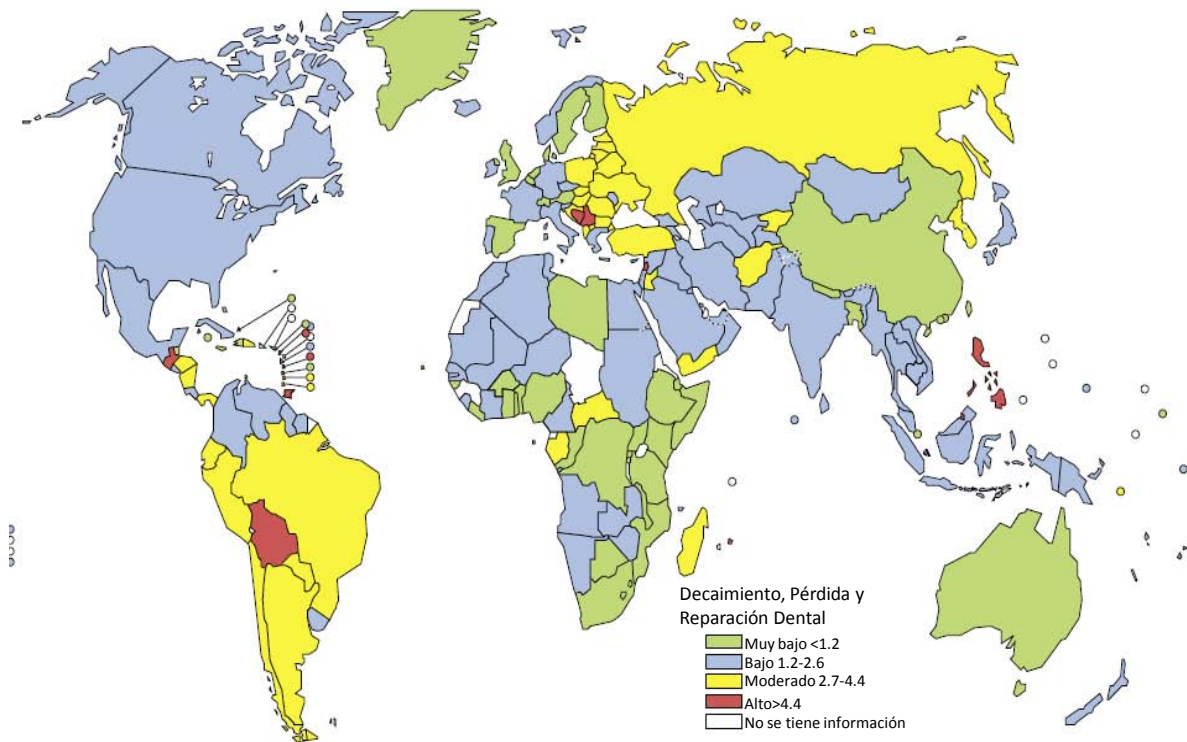


Figura 1. Índice DMFT alrededor del mundo (Petersen *et al.*, 2005).

En décadas pasadas, un gran número de investigaciones han demostrado que la caries se encuentra ligada con aspectos sociales y culturales, la Figura 2, resume los factores de riesgo relacionados con la caries dental. Este modelo está basado en la evidencia disponible de potenciales riesgos socioculturales, los cuales han sido determinados principalmente en países industrializados debido a la alta prevalencia y severidad de esta enfermedad dental.

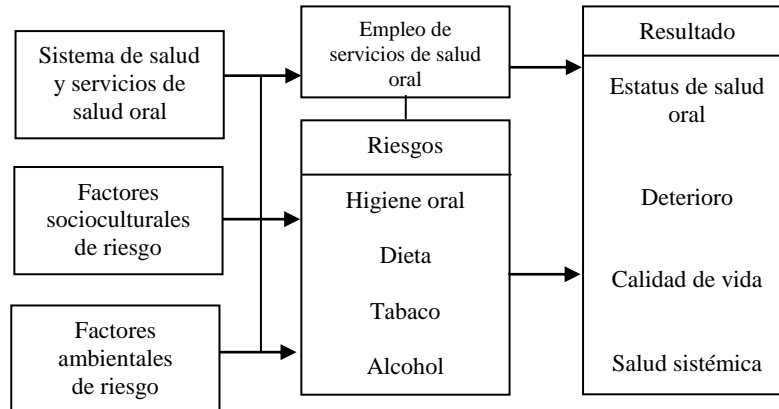


Figura 2. Factores de riesgo relacionados con la caries dental (Petersen, 2005).

2.2. Microorganismos de la cavidad oral

La cavidad oral es uno de los sitios anatómicos más densamente poblados por bacterias, hongos y levaduras; se han aislado alrededor de 500 especies diferentes de microorganismos, de las cuales al menos el 70% corresponden a bacterias y este número continúa incrementándose debido a los avances tecnológicos recientes. En el Cuadro 1 se resumen los diferentes microorganismos que se han aislado de la cavidad oral.

Cuadro 1. Microorganismos aislados de la cavidad oral.

Género	Especie
<i>Abiotrophia</i>	<i>A. Defectiva</i> y <i>A. adiacens</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> **
<i>Actinomyces</i> ***	<i>A. Georgiae</i> , <i>A. gerencseriae</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. adontolyticus</i> *, <i>A. naeslindii</i> * y <i>A. viscosus</i>
<i>Alloicoccus</i>	<i>A. otiditis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Bacteriodes</i>	<i>B. capillosus</i> y <i>B. forsythus</i> **
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. dentium</i> , <i>B. inopinatum</i> y <i>B. denticolens</i>
<i>Bilophila</i>	<i>B. wadsworthia</i>
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i> , <i>C. sputigena</i> y <i>C. ochracea</i>
<i>Cardiobacterium</i>	<i>C. hominis</i>
<i>Centipeda</i>	<i>C. periodontii</i>

Cuadro 1. Microorganismos aislados de la cavidad oral (continuación).

Género	Especie
<i>Clostridium</i>	<i>C. difficile</i> , <i>C. ramnosum</i> , <i>C. sporogenes</i> y <i>C. malenominatum</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. matruchotii</i>
<i>Desulfomonas</i>	<i>D. pigra</i>
<i>Desulfovrio</i>	<i>D. desulfuricans</i>
<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i> **
<i>Entamoeba</i>	<i>E. gingivalis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>E. brachy</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>E. saphenum</i> , <i>E. saburrenum</i> y <i>E. yurii</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. alosis</i> y <i>F. periodonticum</i>
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i> y <i>G. morbillorum</i>
<i>Globicatella</i>	<i>G. sanguis</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>Helcococcus</i>	<i>H. kunzii</i>
<i>Herpexvirus</i>	<i>Herpex simplex</i>
<i>Lactobacillus</i> ***	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. uri</i> , <i>L. casei</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> y <i>L. garniae</i>
<i>Leptotrichia</i> ***	<i>L. buccalis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. messenteroides</i>
<i>Mycoplasma</i>	<i>M. salivarium</i> , <i>M. pneumonie</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. bucale</i> y <i>M. orale</i>
<i>Neisseria</i> ***	<i>N. cinérea</i> , <i>N. elongata</i> , <i>N. laveszens</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. paraelongata</i> , <i>N. polysaccharea</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> (excepcional)
<i>Pediococcus</i>	<i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i> y <i>P. dexnitricus</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>P. niger</i>
<i>Peptostreptococcus</i> ***	<i>P. anaerobius</i> , , <i>P. magnus</i> , <i>P micros</i> , <i>P. indolicus</i> y <i>P. prevotii</i>
<i>Porphyromonas</i> ***	<i>P. gingivalis</i> ** , <i>P. endodontalis</i> y <i>P. catoniae</i>

Cuadro 1. Microorganismos aislados de la cavidad oral (continuación).

Género	Especie
<i>Prevotella</i> ***	<i>P. melaninogenica</i> , <i>P. nigrescens</i> ** , <i>P. corporis</i> , <i>P. intermedia</i> ** , <i>P. loescheii</i> , <i>P. pallens</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. buccalis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. oulorum</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P. zoogloiformans</i> , <i>P. dentalis</i> , <i>P. tanneriae</i> y <i>P. enoeca</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnés</i> , <i>P. avidum</i> , <i>P. propionicus</i> y <i>P. granulosum</i>
<i>Rothia</i>	<i>R. dentocariosa</i>
<i>Selenomonas</i> ***	<i>S. artemidis</i> , <i>S. diana</i> , <i>S. flueggei</i> , <i>S. infelix</i> , <i>S. noxia</i> y <i>S. sputigena</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
<i>Streptococcus</i> ***	<i>S. mutans</i> *, <i>S. rattus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. sobrinus</i> *, <i>S. ferus</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i>
<i>Treponema</i> ***	<i>T. vincentii</i>
<i>Trichomonas</i>	<i>T. tenax</i>
<i>Veillonella</i> ***	<i>V. párvula</i> , <i>V. atypica</i> , <i>V. dispar</i>

* Microorganismos directamente relacionados a la formación de placa dentobacteriana.

** Microorganismos relacionados al desarrollo de enfermedades periodontales.

*** Géneros más representativos de la flora oral (Liébana, 2002)

Estos microorganismos colonizan las superficies orales, en donde forman consorcios microbianos conocidos como placa dentobacteriana o biofilms. Dentro de los microorganismos que forman estos consorcios en la cavidad oral, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* han sido reconocidos como los patógenos responsables de la caries dental y la periodontitis en adultos respectivamente. Sin embargo estos microorganismos no siempre comprenden la porción mayoritaria de la microflora inicial en las lesiones y enfermedades bucales, pero su número se incrementa considerablemente conforme las enfermedades progresan. Las enfermedades orales como la caries dental, periodontitis y mal olor bucal comienzan siempre en la interfase entre el ecosistema microbiano y el tejido del hospedero, en

casos graves estas infecciones orales pueden producir infecciones en órganos adyacentes como enfermedades del aparato respiratorio (Takahashi, 2005).

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio que se produce en los tejidos circundantes de los dientes como respuesta a la formación de la placa dentobacteriana. Esta enfermedad es particularmente común en pacientes con los síndromes de Papillon-LeFevre o de Down, inmunosupresión, fumadores o con mala higiene bucal. La sintomatología clínica casi siempre se asocia al incremento de un determinado número de especies anaerobias en la placa subgingival, por lo que debe considerarse como una enfermedad infecciosa bacteriana crónica (Linares, 2003). Existen una serie de evidencias que respaldan claramente el origen infeccioso de la enfermedad como lo son: a) mejora clínica tras la eliminación de las bacterias subgingivales; b) modelos animales en los que se ha demostrado la destrucción periodontal por bacterias; c) respuesta inmune celular y producción de anticuerpos específicos frente a las bacterias asociadas a periodontitis.

En la enfermedad periodontal no hay una única especie bacteriana implicada, sino varias. Entre las bacterias que se han implicado directamente en la patogenia de la enfermedad periodontal se encuentran: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*. Otras especies bacterianas como *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, etc, tienen un papel menos relevante, aunque ocasionalmente se han relacionado con algunas formas de enfermedad periodontal (Linares, 2003).

2.3 Bioplaca

Las bioplacas son comunidades sésiles, en las que los microorganismos que la conforman se encuentran asociados entre sí y con sustratos sólidos por medio de uniones e inclusiones con una matriz de exopolímeros. Las microcolonias de bacterias que forman las bioplacas, se encuentran encapsuladas en una matriz compuesta de una sustancia polimérica extracelular (SPE) la cual les ayuda a adherirse a las superficies y estabilizarse. La SPE está formada principalmente por polisacáridos y puede

contener solo proteínas y ácidos nucleicos. Estas comunidades tienen un “sistema circulatorio” primitivo compuesto por canales de agua por donde fluyen los nutrientes y se desechan los productos de su metabolismo (Davies, 2003; Gilbert *et al.*, 1997; Watnick *et al.*, 2000).

Las bioplacas pueden encontrarse en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Las bacterias solamente requieren de un medio acuoso y de la presencia de nutrientes para poder formar una bioplaca, se pueden desarrollar sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas. Las bioplacas comienzan a formarse cuando alguna célula individual se adsorbe inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

2.3.1. Fases de la formación de las bioplacas.

La formación de las bioplacas no se lleva a cabo de manera aleatoria, ya que sigue una serie de pasos que permiten su predicción, se han identificado cinco fases: la primera de ellas es la adsorción reversible de la bacteria a la superficie, seguida de la unión irreversible, una primera fase de maduración con crecimiento y división, la fase de producción de exopolímero y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (Piera, 2003).

2.3.1.1. Acondicionamiento de la superficie.

La capacidad de las bacterias de unirse depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices de la misma. Las bioplacas pueden desarrollarse sobre casi cualquier tipo de superficie, gracias a que previamente entran en contacto con la materia orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de adhesión de la bacteria (Piera, 2003).

2.3.1.2. Adsorción y fijación.

La adhesión de las bacterias a los sustratos puede ser activa (por medio de flagelos, pilis, adhesinas, cápsula y cargas superficiales), o pasiva (por gravedad, difusión, y dinámica de fluidos). En pocos minutos, las bacterias libres que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la superficie bacteriana, si esta unión se mantiene el tiempo suficiente se hará permanente e irreversible (Piera, 2003; Dreeszen, 2003).

2.3.1.3. Maduración.

Cuando las bacterias se han unido a la superficie comienza el crecimiento y la división celular, posteriormente se inicia la síntesis de una mezcla de polímeros, de consistencia pegajosa, que es excretada para mantener unidas a las células entre sí y con la superficie. La composición del exopolímero o glicocalix no se conoce de manera exacta, se sabe que consta de polisacáridos de diversos azúcares como: glucosa, fructosa, manosa, *N*-acetilglucosamina, etc. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos. El glicocalix es excretado desde la pared celular bacteriana en formación radicular y se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes. En una bioplaca madura, la mayor parte del volumen está ocupado por la matriz laxante organizada (75–95%), unas pocas bacterias (5–25%), que proporcionan una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua (Piera, 2003).

2.3.1.4. Crecimiento y dispersión.

La colonia bacteriana se encuentra en división continua, y por lo tanto libera periódicamente células que se repartirán, estas células se nombran nuevos colonizadores, y se establecen fácilmente ya que aprovechan los residuos y nutrientes liberados por las primeras bacterias que formaron la

bioplaca, y los utilizan para preparar la nueva superficie. Esta colonización se encuentra relacionada con la evolución y la supervivencia de las bacterias a largo plazo (Piera, 2003).

2.3.1.5. Resistencia de las bioplacas.

Las bioplacas confieren estabilidad ambiental a las bacterias para crecer, además proporcionan protección a los cambios ambientales como: pH, deshidratación, salinidad, agentes antimicrobianos, fagocitosis (Hall–Stoodley *et al.*, 2004).

Una consecuencia de que las bacterias se desarrollen dentro de estos consorcios es la dificultad que implica su control, tanto en el medio ambiente, como en la medicina, ya que la bioplaca tiene una gran resistencia a los agentes químicos (antimicrobianos y antibióticos). Los mecanismos asociados con esta resistencia no son conocidos totalmente, sin embargo se cree que esta característica está relacionada con: i) ambientes de nutrientes modificados y supresión de la velocidad de crecimiento dentro de la bioplaca (disminución de la actividad metabólica disminuye la efectividad de algunos agentes antimicrobianos); ii) interacciones directas entre la matriz exopolimérica y sus constituyentes, disminuyen la difusión y disponibilidad de los compuestos antibacterianos (protección contra superóxidos, metales e inmunoglobulinas por neutralización); iii) el desarrollo de la bioplaca produce la expresión de fenotipos específicos (crecimiento de sub-poblaciones de fenotipos resistentes o persistentes), (Gilbert *et al.*, 1997; Hall–Stoodley *et al.*, 2004).

Cabe señalar que los primeros colonizadores de la bioplaca concentran la materia orgánica de la superficie y la metabolizan, una vez formado el polímero extracelular, la capacidad de retención de nutrientes aumenta, ya que la SPE atrapa nutrientes, y otros microorganismos que se mezclan con los colonizadores primeros. En este medio las sustancias que son inútiles o dañinas para algunas bacterias, pueden ser utilizadas por otras, llevando a que los recursos bioquímicos de las diferentes especies bacterianas adquieran la capacidad de digerir aportes alimentarios que ninguna de ellas podría aprovechar en solitario (Piera, 2003).

2.4 Antecedentes de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (cuachalalate).

El cuachalalate es un árbol endémico de México que pertenece a la familia Anacardiaceae y es ampliamente utilizada con fines terapéuticos a lo largo del país. Mide aproximadamente 8 metros de altura (ver Figura 4), su corteza tiene escamas engrosadas y lenticelas redondas y protuberantes; la parte lisa de la corteza es grisácea y la parte interna tiene una coloración que va de crema rosado a rosa-rojizo, fibrosa, con un exudado blanco cremoso, astringente y de olor picante (FHEUM, 2001). También se conoce con los nombres de palo de rosa, volador, matixeran, quechalalatl, cuachalalatl y cuachalala y es cultivada en la selva baja de los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos y Puebla. Se le ha encontrado en el "Cañón de los Lobos", en la Sierra de Huautla, en los alrededores de Xoxocotla, en los municipios de Yautepec, Yecapixtla, Miacatlán, Coatlán, Puente de Ixtla, Amacuzac, Tlaquiltlenango, Tlaltizapán y Jojutla, entre otros (Olivera-Ortega *et al.*, 1999; Hernández, 1959). La Figura 3 muestra las zonas de la República Mexicana en la que se encuentra *Amphipterygium adstringens* de forma natural.

La palabra "cuachalalate" es la hispanización de "cuauchachalatl", palabra de origen náhuatl. Etimológicamente hablando, el vocablo *cuauchachalatl* se compone de *cuáhuatl* que significa árbol, y *chachalatl*, nombre que designa a cierto pájaro hablador, mejor conocido vulgarmente como chachalaca (*Chamepetes unicolor*, Salvin). Cuachalalate significa literalmente: árbol de la chachalaca (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994).



Figura 3. Mapa de distribución de *Amphipterygium adstringens* en México (Cuevas, 2005).

La corteza se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de fiebre, heridas recientes, hipercolesterolemia, úlceras gástricas, cáncer gastrointestinal y algunas condiciones inflamatorias; también se le atribuyen las cualidades de ser un antibiótico y de disolver cálculos renales. Tal vez por su efecto astringente, la corteza de cuachalalate se emplea en algunos problemas de la sangre y de la circulación (Olivera-Ortega *et al.*, 1999; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994).

La gente le atribuye un efecto purificador y desintoxicante sanguíneo, además de curar las várices. Otros usos reportados para esta corteza en la medicina tradicional mexicana son: tratamiento de las rozaduras de bebés, golpes piquetes de animales venenosos; lavados vaginales cuando se presentan infecciones en esta región del cuerpo, fiebre puerperal, inflamación, infección o caída de la matriz y de ovarios. También es utilizado para malestares digestivos, dolor de estómago, para el hígado, la vesícula, contra la tifoidea y en problemas bucales como dolor de muelas, para endurecer las encías, en casos de estomatitis o fuegos en la boca. Se usa en caso de

afecciones respiratorias, tos, inflamación de las anginas, resfriados, tuberculosis y enfermedades pulmonares. (Olivera-Ortega *et al.*, 1999; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994).

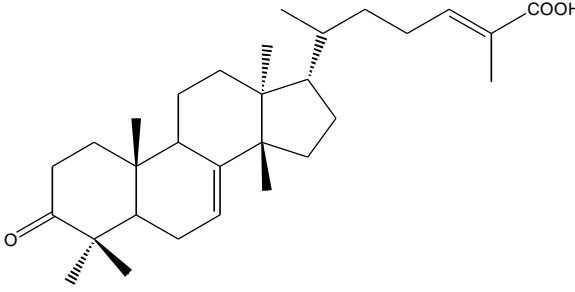
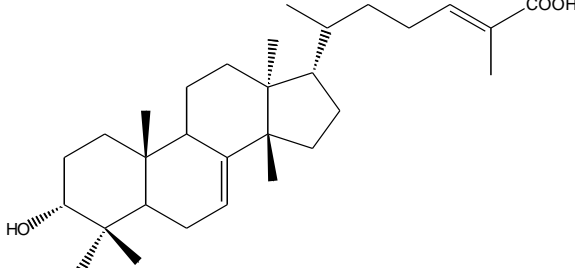
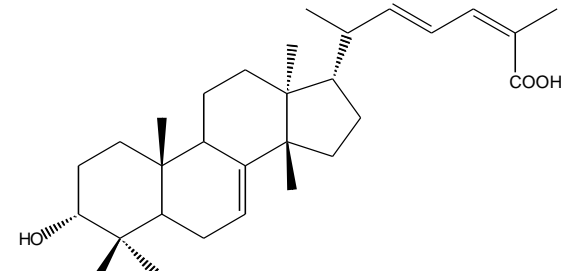
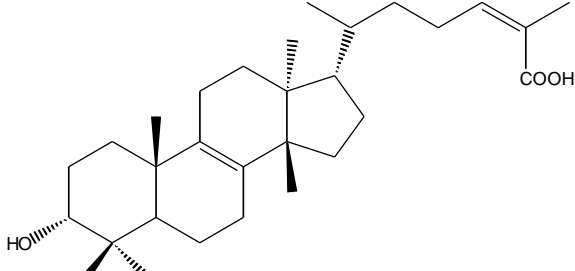
El ácido masticadienónico (**1**) y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) son los principales compuestos de la corteza de *A. adstringens*, siendo ambos compuestos triterpenoides (Navarrete *et al.*, 2006).

Algunas investigaciones indican que otros componentes de la corteza de cuachalalate son los ácidos cuachalalálico (**3**), instipolinácico (**4**), *epi*-oleanólico (**5**) e *iso*-masticadienónico (**6**) (triterpenoides) (Navarrete *et al.*, 2006), además de β -sitosterol (**7**) y tres ácidos alquil anacárdicos (**8-10**). Además se han identificado naftalenos de cadena larga como el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-2-naftoico (**11**), ácido (14b,24E) -3-oxolanosta-7,24-dien-26-oico (**12**) (Rivero-Cruz *et al.*, 2005), otras investigaciones han reportado la presencia del ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico (**13**), ácido 3,7-dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (**14**), 3 α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (**15**), ácido 7-11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico (**16**), ácido 3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7,9-ciclo-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico (**17**), 3 α -hidroxi-11 α , 12 α -epoxi-oleanano-28,13 β -olido (**18**) ocotillona (**19**) (Makino *et al.*, 2003), y ácidos anacárdicos (**20-24**) así como algunos aldehídos anacárdicos (**25-27**) (Mata *et al.*, 1991). Las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en el Cuadro 2.

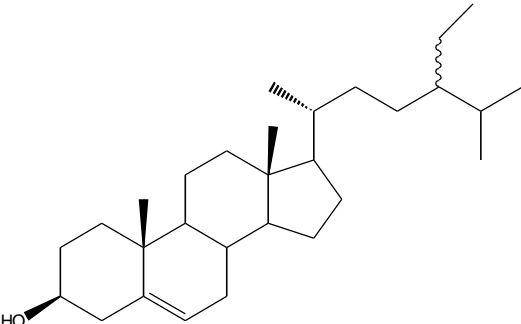
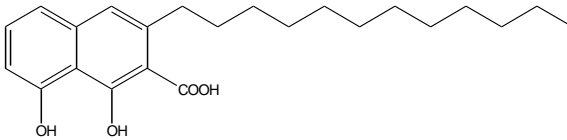
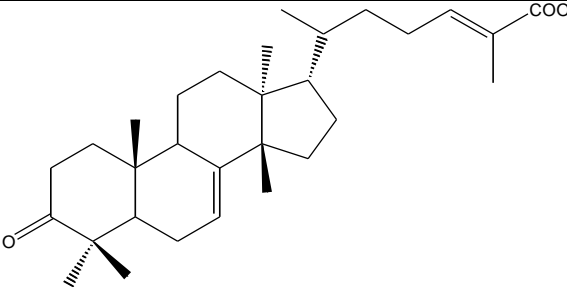
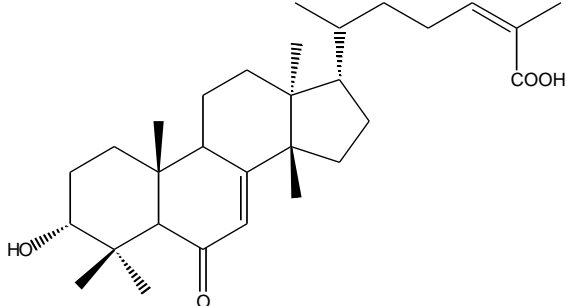
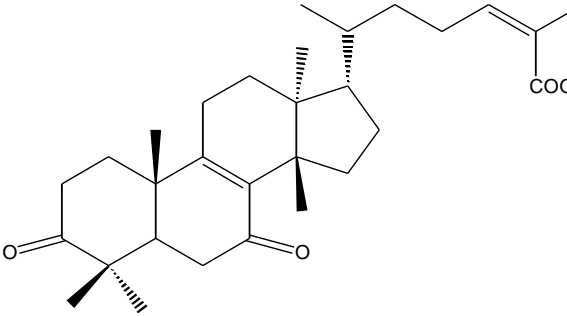


Figura 4. Árbol y corteza de *Amphipterygium adstringens* (CONABIO, 2008).

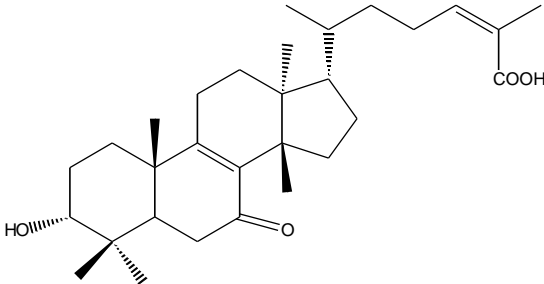
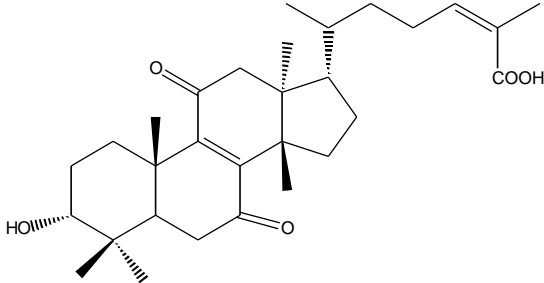
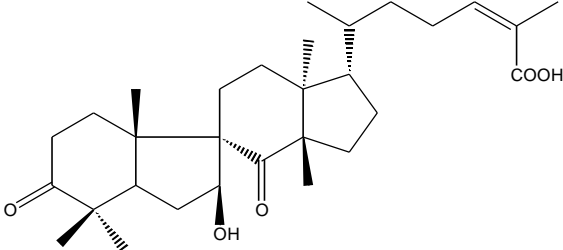
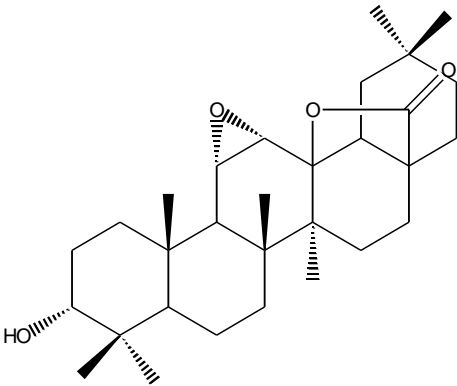
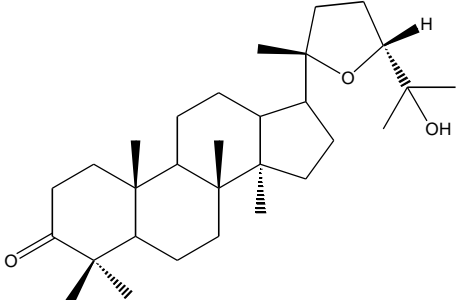
Cuadro 2. Compuestos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

Compuesto	Estructura	Referencia
Ácido masticadienónico (1)		Navarrete <i>et al.</i> , 2006.
Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2)		Navarrete <i>et al.</i> , 2006.
Ácido cuachalalálico (3)		Navarrete <i>et al.</i> , 2006.
Ácido instipolinácico (4)		Navarrete <i>et al.</i> , 2006.
Ácido <i>epi</i> -oleanólico (5)		Navarrete <i>et al.</i> , 2006.

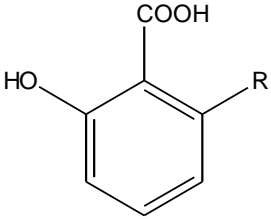
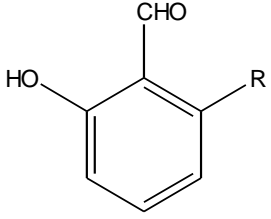
Cuadro 2. Compuestos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (continuación).

Compuesto	Estructura	Referencia
<p>β-sitosterol (7)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ácido 3-dodecil-1,8- dihidroxi-2-naftoico (11)</p>		<p>Rivero <i>et al.</i>, 2005.</p>
<p>Ácido (14b,24E)-3- oxolanosta-7,24-dien- 26-oico (12)</p>		<p>Rivero <i>et al.</i>, 2005.</p>
<p>Ácido 3α-hidroxi-6- oxo-7,24Z- tirucaladien-26-oico (13)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ácido 3,7-dioxo- 8,24Z-tirucaladien-26- oico (14)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>

Cuadro 2. Compuestos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (continuación).

Compuesto	Estructura	Referencia
<p>3α-hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (15)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ácido 7-11-dioxo-3α-hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico (16)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ácido 3,8-dioxo-7β-hidroxi-7,9-ciclo-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico (17)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>3α-hidroxi-11α, 12α-epoxi-oleanano-28,13β-olido (18)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ocotilona (19)</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>

Cuadro 2. Compuestos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (continuación).

Compuesto	Estructura	Referencia
Ácidos anacárdicos (20–24)	 <p>R = (CH₂)₁₄CH₃ (20) R = (CH₂)₁₅CH₃ (21) R = (CH₂)₁₆CH₃ (22) R = (CH₂)₁₈CH₃ (23) R = (CH₂)₁₄-CH=CH-(CH₂)₂CH₃ (24)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1991.
Aldehídos anacárdicos (25-27)	 <p>R = (CH₂)₁₇CH₃ (25) R = (CH₂)₁₉CH₃ (26) R = (CH₂)₂₁CH₃ (27)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1991.

2.4.1. Actividad biológica de los compuestos aislados de *Amphipterygium adstringens*.

Se ha descrito la presencia de diversos compuestos activos aislados a partir de la corteza de *A. adstringens* (cuachalalate), los cuales se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Compuestos activos aislados del cuachalalate.

Compuesto/extracto	Actividad	Referencia
Ácido masticadienónico (1)	Antiinflamatorio Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Navarrete <i>et al.</i> , 2006; Oviedo-Chávez <i>et al.</i> , 2004. Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.

Cuadro 3. Compuestos activos aislados del cuachalalate (continuación).

Compuesto/extracto	Actividad	Referencia
Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2)	Gastroprotector Antiinflamatorio Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Navarrete <i>et al.</i> , 2006; Oviedo-Chávez <i>et al.</i> , 2004.
	Anti- <i>Helicobacter pylori</i>	Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.
Ácido 3-epioleanólico (3)	Gastroprotector	Navarrete <i>et al.</i> , 2006. Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.
β -sitosterol (5)	Gastroprotector	Navarrete <i>et al.</i> , 2006. Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.
Mezcla de ácidos anacárdicos	Inhibidores enzimáticos Antitumorales Antimicrobianos Antiacné Antialimentario	Navarrete <i>et al.</i> , 2006.
Ácido (14b,24E)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oico (10)	Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005.
Ácido (14b,24E)-3-hidroxilanosta-7,24-dien-26-oico	Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005.
Ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico (11)	Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3,7-dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (12)	Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Makino <i>et al.</i> , 2003.
3 α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (13)	Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 7-11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico (14)	Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7,9-ciclo-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico (15)	Citotóxico para células de leucemia (L-12-10)	Makino <i>et al.</i> , 2003.

En estudios recientes sobre la determinación de parámetros de seguridad de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, se clasifica a *Amphiterygium adstringens* como planta no tóxica debido a que presenta una

DL₅₀ > 5000 mg/kg. El extracto de cloroformo-metanol (1:1) de la corteza no presenta efecto mutagénico en la prueba de Ames (Déciga-Campos et al., 2006).

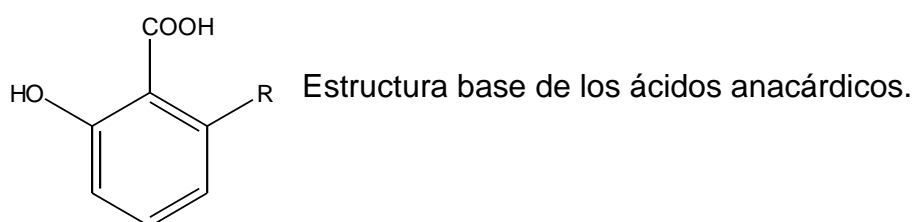
2.5 Generalidades sobre los ácidos anacárdicos.

Los ácidos anacárdicos son metabolitos del tipo ácido 6-alkilsalicílico con cadenas alquílicas saturadas, monoinsaturadas, diinsaturadas y triinsaturadas laterales. Estos compuestos se encuentran como ácidos libres en la naturaleza, y se localizan solo en algunas plantas pertenecientes a la familia Anacardiaceae y en el *Ginkgo biloba*. Históricamente la familia Anacardiaceae representada por *Anacardium occidentale*, ha sido la fuente principal de ácidos anacárdicos utilizados para la investigación (Gellerman et al., 1976; Tyman, 2001).

Los ácidos anacárdicos deben considerarse ácidos grasos en los que el grupo carboxílico ha sido reemplazado por un ácido salicílico. La cadena lateral puede ser una, dos o tres insaturaciones. En algunos de estos compuestos la cadena lateral puede encontrarse entre las series homólogas de C₂ y C₁₇, los ácidos anacárdicos más comunes poseen cadenas laterales de 13, 15 ó 17 carbonos, con una insaturación en C-8 o C-10, aunque también pueden existir con dos o tres insaturaciones en C-8, C-11 y C-8, C-11 y C-14, respectivamente; se sabe que sin excepción presentan configuración Z (Tyman, 2001).

Algunos de los ácidos anacárdicos que se encuentran en la naturaleza se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales.



Fuente*	Compuesto*
<i>Anacardium occidentale</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-(pentadecil)-benzoico (a) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8-enil]-benzoico (b) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11-dienil]-benzoico (c) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11,14-trienil]-benzoico (d)</p> <p>(a) R= (CH₂)₁₄CH₃ (b) R= (CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₅-CH₃ (c) R= (CH₂)₇-CH=CH-CH₂-CH=CH-(CH₂)₂-CH₃ (d) R= (CH₂)₇-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH₂</p>
<i>Pistacia vera</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-(tridecil)-benzoico (e) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-tridec-8-enil]-benzoico (f)</p> <p>(e) R= (CH₂)₁₂-CH₃ (f) R= (CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₃-CH₃</p>
<i>Spondius mombin</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z,Z)-heptadeca-8-,11,14-trienil]-benzoico (g)</p> <p>(g) R= (CH₂)₇-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH₃</p>
<i>Kneama elegans</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-(undecil)-benzoico (h) Ácido 2-hidroxi-6-(tridecil) (e) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-8-enil]-benzoico (i) Ácido 2-hidroxi-6-(ω-fenildecil)-benzoico (j) Ácido 2-hidroxi-6-(ω-fenildodecil)-benzoico (k)</p> <p>(h) R= (CH₂)₁₀CH₃ (i) R= (CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₇CH₃ (j) R= (CH₂)₁₀-Ar (k) R= (CH₂)₁₂-Ar</p>

Cuadro 4. Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales.

Fuente*	Compuesto*
<i>Merulius ssp</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-10-enil]-benzoico (l)</p> <p>Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-14-hidroxiheptadec-8-enil]-benzoico (m)</p> <p>(l) R= (CH₂)₉-CH=CH-(CH₂)₅-CH₃</p> <p>(m) R= (CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₄-CHOH-CH₃</p>
<i>Schoepfia californica</i>	<p>Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-10-enil]-benzoico (n)</p> <p>Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-10-enil]-benzoico (l)</p> <p>(n) R= (CH₂)₉-CH=CH-(CH₂)₃-CH₃</p> <p>(l) R= (CH₂)₉-CH=CH-(CH₂)₅-CH₃</p>

*Referencia: Tyman, 2001

2.5.1. Actividad biológica de los ácidos anacárdicos.

Los ácidos anacárdicos son sustancias ampliamente estudiadas en la actualidad y se conocen diversos usos de los mismos como:

- Actividad antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* metilina resistente, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, entre otros, (Lima *et al.*, 2000; Narasimhan *et al.*, 2008, Tyman, 2001); contra *Propionibacterium acnes*, la bacteria responsable de causar el acné (Himejima *et al.*, 1991; Hisae *et al.*, 1993, Tyman, 2001); uso potencial como conservadores para frutas y verduras (actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), (Narasimhan *et al.*, 2008);
- Los ácidos anacárdicos extraídos de *Pistacia vera* tienen actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Tyman, 2001); actividad contra las zoosporas del fitopatógeno *Aphanomyces cochlioides* por inhibición de motilidad y lisis de las mismas, (Begum *et al.*, 2002);

- Actividad inhibidora de las enzimas tirosina sintasa, lipooxigenasa y prostaglandin-endoperoxidasa (Kubo *et al.*, 2006; Grazzini *et al.*, 1991);
- Actividad antioxidante mediante la prevención de la generación de radicales superóxido por inhibición de xantina oxidasa (Kubo *et al.*, 2006).
- Además se sabe que algunos glucósidos derivados de los ácidos anacárdicos presentan acción blanqueadora de los dientes (Kasemura *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad la poca eficacia, resistencia, toxicidad y costo de los antibióticos comerciales ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales que permitan combatir procesos infecciosos que afectan a la mayor parte de la población. Esto justifica la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana partiendo de plantas usadas en la medicina tradicional. En México contamos con una inmensa variedad de especies vegetales que presentan actividad biológica, mismas que han sido empleadas tradicionalmente desde tiempos prehispánicos para curar diversas enfermedades.

La corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) es ampliamente utilizada en la medicina tradicional de nuestro país, uno de los muchos usos de esta especie es como agente antibacteriano y cicatrizante bucal al utilizar una infusión a manera de enjuague bucal. Por lo mencionado anteriormente el objetivo primordial de esta investigación es aislar y purificar compuestos con actividad antibacteriana a partir de la corteza de *A. adstringens* sobre patógenos de la cavidad oral.

Para poder cumplir con el objetivo general de este proyecto, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i. Realizar el estudio químico biodirigido del extracto de la corteza de la especie *Amphipterygium adstringens*, por medio de técnicas fitoquímicas convencionales.
- ii. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta y la cromatografía por adsorción en columna al vacío se realizaron sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula de 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM. Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con sulfato cérico/H₂SO₄ seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos.

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

Los estudios espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Apoyo a la Investigación (USAI) del edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H, 300 MHz) y de Carbono 13 (RMN-¹³C, 75 MHz) se generaron en un equipo Varian VXR-300S utilizando CDCl₃; los desplazamientos químicos se reportan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE) 70eV se obtuvieron en un equipo Thermo-Electron (Double Focus Sector) acoplado a un cromatógrafo de gases. Se utilizó la técnica de introducción directa.

5.1.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., EU) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Empower 2 (Waters). La separación y la purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de sílica gel C-18 (Waters, X-bridge, 5 μ m OBD, 19 x 50 mm). La detección se ajustó entre 215-254 nm.

4.2. Material vegetal

La corteza de *Amphipterygium adstringens* se obtuvo del centro mexicano de recolección de plantas medicinales localizado en Jolalpan (Puebla). Una muestra de referencia se encuentra en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Amphipterygium adstringens*.

4.3.1. Preparación del extracto íntegro de la corteza de *A. adstringens*.

La corteza seca se molió en un molino de cuchillas modelo Willey Modelo 4. Una muestra de 1.0 kg de la corteza se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 2.5 L de éter de petróleo por un período de 8 días. Después de filtrar, el disolvente se evaporó a presión reducida y se obtuvieron 27 g de un residuo oleoso de color verde oscuro.

4.3.2. Fraccionamiento primario de *A. adstringens*

El extracto se sometió a un proceso de cromatografía de columna al vacío con 0.5 kg de gel de sílice, se eluyó utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (diversas proporciones, Cuadro 5) y acetato de etilo. Este proceso generó 7 fracciones combinadas (FI–FVII). Un sólido cristalino que precipitó espontáneamente de la fracción FIV fue identificado como ácido 3 α -hidroxi-masticadienónico (**2**) por comparación directa con una muestra auténtica aislada previamente por el Doctor Andrés Navarrete de la Facultad de Química de la UNAM.

El Diagrama 1 resume el proceso de fraccionamiento del extracto de éter de petróleo obtenido a partir de la corteza de *A. adstringens*. El cuadro 5 muestra el fraccionamiento primario del extracto de éter de petróleo.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna al vacío del extracto etéreo obtenido de *Amphipterygium adstringens*.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Clave
Hexano	100	1–4	F–I
Hexano-AcOEt	95:5	5–8	
Hexano-AcOEt	90:10	9–12	F–II
Hexano-AcOEt	85:15	13–16	
Hexano-AcOEt	80:20	17–20	F–III
Hexano-AcOEt	75:25	21–24	F–IV
Hexano-AcOEt	70:30	25–28	
Hexano-AcOEt	60:40	29–32	F–V
Hexano-AcOEt	50:50	33–36	F–VI
Hexano-AcOEt	30-70	37–40	F–VII
AcOEt	100	41–44	

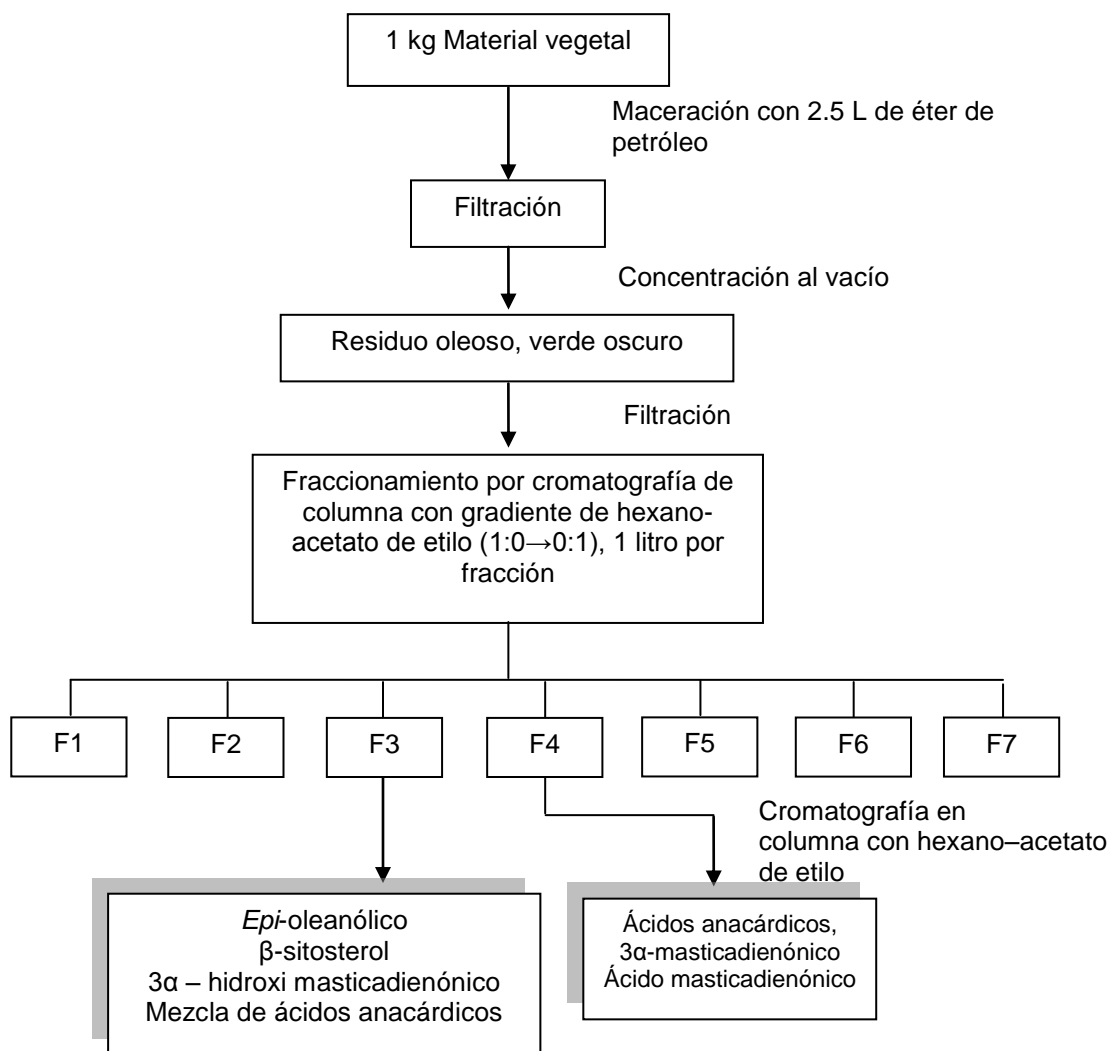


Diagrama 1. Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto de éter de petróleo de *Amphipterygium adstringens*.

4.3.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII.

La fracción FIII (3.5 g de peso), presentó una CMI de 769 y 325 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Esta fracción se considera activa ya que presenta una CMI menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Wu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1998). Una porción de 3.3 g de ésta fracción fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria 300 g de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula de 0.063 – 0.200 mm, 70 – 230 mesh ASTM) y como fase móvil se utilizó un gradiente de hexano: acetato de etilo (1:0 \rightarrow 0:1). Mediante este proceso se obtuvieron 18

fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 9 fracciones combinadas (FIII-1 – FIII-9).

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	-	-	-
Hexano-AcOEt	98:2	1	-	-
Hexano-AcOEt	95:15	2–3	3–4	FIII–2
Hexano-AcOEt	90:10	4–5	5–6	FIII–3
Hexano-AcOEt	85:15	6–7	7–9	FIII–4
Hexano-AcOEt	80:20	8–9		
Hexano-AcOEt	70:30	10–11	10	FIII–5
Hexano-AcOEt	50:50	12–13	11–12	FIII–6*
			13	FIII–7*
Hexano-AcOEt	30:70	14–16	14–16	FIII–8
Hexano-AcOEt	20:80	17–18	17–20	FIII–9
AcOEt	100	19–20		
Acetona	100	21–22		

*Las fracciones F6 y F7 se reunieron en una sola fracción por su semejanza en las cromatoplasmas, esta fracción se identificó como la fracción FIII-6–7 .

Una vez reunidas todas las fracciones, se realizó una cromatografía en capa fina, con base en los resultados se reunieron las fracciones FIII-4, FIII-5 y FIII-6–7, esta fracción se identificó como la fracción combinada FIII-4–7.

La fracción combinada FIII-4–7 se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (1:1) y hexano-acetato de etilo (4:6). Este proceso permitió la obtención de ocho fracciones las cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica en cuatro fracciones (FIII-a–d).

La fracción FIII-a se sometió nuevamente a una cromatografía de columna abierta utilizando gel de sílice y como eluyente mezclas de hexano-

acetato de etilo (8:2, 7:3 y 6:4). El Cuadro 7 resume este fraccionamiento cuaternario.

Cuadro 7. Fraccionamiento cuaternario de la fracción FIIIa.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Clave
Hexano-AcOEt	8:2	3	FIIIa-1 FIIIa-2 FIIIa-3
Hexano-AcOEt	7:3	3	FIIIa-4 FIIIa-5 FIIIa-6
Hexano-AcOEt	6:4	3	FIIIa-7 FIIIa-8 FIIIa-9
Hexano-AcOEt	3:7	1	FIIIa-10
Hexano-AcOEt	2:8	2	FIIIa-11 FIIIa-12

A partir de las fracciones FIIIa-7, FIIIa-8, FIIIa-9 se aislaron el ácido 3 α -hidroxi masticadienónico, β -sitosterol, ácido *epi*-oleanólico y una mezcla de ácidos anacárdicos. La identificación de los compuestos se realizó utilizando muestras auténticas aisladas previamente por el Dr. Andrés Navarrete.

4.3.4. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIV.

La fracción FIV (5.32 g de peso), que presentó una CMI para *S. mutans* 256 y 128 μ g/mL para *P. gingivalis* y fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria 300 g de gel de sílice, como fase móvil se utilizó hexano: acetato de etilo (1:0 \rightarrow 0:1).

Mediante este proceso se obtuvieron 29 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniendo 11 fracciones combinadas.

Cuadro 8. Fraccionamiento secundario de la fracción FIV.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	FIV-1	FIV-1- FIV-4	FIV-1-4
Hexano-AcOEt	98:2	FIV-2 FIV-3		
Hexano-AcOEt	95:15	FIV-4 FIV-5	FIV-5	FIV-5
Hexano-AcOEt	85:15	FIV-6 FIV-7	-	FIV-6 FIV-7
Hexano-AcOEt	75:25	FIV-8 FIV-9	FIV-8- FIV-10	FIV-8-10
Hexano-AcOEt	65:35	FIV-10 FIV-11 FIV-12	FIV-11-FIV-12	FIV-11-12
Hexano-AcOEt	60:40	FIV-13- FIV-14	FIV-13-FIV-16	FIV-13-16
Hexano-AcOEt	50:50	FIV-15 FIV-16		
Hexano-AcOEt	30:70	FIV-17 FIV-18	FIV-17-FIV-18	FIV-17-18
Hexano-AcOEt	20:80	FIV-19 FIV-20- FIV-21	FIV-19-FIV-21	FIV-19-21
Hexano-AcOEt	10:90	FIV-22 FIV-23 FIV-24 FIV-25	FIV-22- FIV-27	FIV-22- 27
AcOEt	100	FIV-26 FIV-27		
Acetona	100	FIV-28 FIV-29	FIV-28-FIV-29	FIV-28-29

En las fracciones FIV-13-16 se obtuvo un sólido cristalino que precipitó de forma espontánea (100 mg).

4.3.5. Separación mediante CLAE del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (28).

La resolución mediante CLAE de la fracción FIV-13-16 se realizó en una columna de sílica gel C-18 (fase reversa) utilizando un flujo de 6 mL/min y metanol como fase móvil. El ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (25 mg) se aisló como un sólido blanco con un tiempo de retención de 9.8 min.

4.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.4.1. Microorganismos de prueba

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de *Amphipterygium adstringens* se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10499) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por tratarse de los principales patógenos orales causantes de las caries dentales y de las enfermedades periodontales respectivamente. Para desarrollar a *S. mutans* se utilizó caldo infusión de cerebro-corazón (Difco) como medio de cultivo y para *P. gingivalis* el medio de cultivo fue medio soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%).

4.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la actividad antibacteriana de los compuestos ó Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos (Sarstedt). Los cultivos de cada microorganismo fueron incubados por una noche, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm/10 minutos y se lavaron 2 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron en la misma solución. La suspensión celular se ajustó con un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy). Cada pozo contenía 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para *S. mutans* ó 5×10^6 UFC/mL para *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se trabajaron muestras por triplicado para cada concentración de prueba.

Los controles utilizados fueron el medio de cultivo inoculado y sin compuestos de prueba, mientras que el blanco consistía únicamente en el medio de cultivo sin inocular. Las placas fueron incubadas a 37°C, *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias mientras que *P. gingivalis* se incubó en un sistema de recipientes de generación de GasPack EZ (BD) conteniendo un sobre activado para la generación de CO₂ (GasPack EZ CO₂) para crear la atmósfera anaeróbica. El crecimiento se determinó espectroscópicamente (A₆₆₀ nm) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas (Biorad).

El valor de CMI para cada microorganismo utilizado se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 A_{660} nm. El control positivo fue gluconato de clorhexidina (CHX; Sigma, St, Louis, MO, EU) que mostró valores de CMI de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* y 0.312 $\mu\text{g/mL}$ contra *P. gingivalis*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La corteza de *Amphipterygium adstringens* se comercializa a lo largo del país en forma de droga cruda y como componente de productos herbolarios. En varios estados de la república, se menciona el empleo del cocimiento, para las úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas. Debido al uso de la corteza del cuachalalate para el tratamiento de infecciones de la cavidad oral en la medicina tradicional de nuestro país, se decidió determinar la actividad antibacteriana de los compuestos mayoritarios de la corteza contra la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y la causante de la gingivitis, *Porphyromonas gingivalis*. El proceso de maceración con éter de petróleo permitió la obtención de un extracto de naturaleza aceitosa, verde oscuro, con CMI de 768 $\mu\text{g/ml}$ y 345 $\mu\text{g/ml}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente (Cuadro 9). Un extracto vegetal se considera activo contra las bacterias de prueba si presenta una CMI menor a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Wu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1998).

El extracto inicial fue sometido a un fraccionamiento por cromatografía de columna abierta con gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones como fase móvil. De este fraccionamiento se obtuvieron siete fracciones primarias (FI a FVII), que también se sometieron al ensayo biológico y se encontró que las fracciones FIII y FIV presentan actividad contra *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Cuadro 9. Actividad antibacteriana (CMI) del extracto de éter de petróleo contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Muestra	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Extracto de éter de petróleo	768	345
CHX*	1.25	0.32

CHX*: gluconato de clorhexidina

A partir de la fracción FIII (CMI 256 $\mu\text{g/ml}$ y 128 $\mu\text{g/ml}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente) se obtuvieron cuatro compuestos diferentes por medio de cromatografía de columna abierta, los compuestos aislados de esta fracción se identificaron por comparación directa con muestras auténticas como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**), el β -sitosterol (**7**) y el ácido *epi*-oleanólico (**5**) y una mezcla de ácidos anacárdicos (Figura 5). Las actividades biológicas de estos compuestos se resumen en el Cuadro 10. A partir de la fracción activa FIV (CMI= 128 $\mu\text{g/ml}$ y 64 $\mu\text{g/ml}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), se aisló un compuesto blanco, cristalino amorfo que cristalizó de manera espontánea el cual fue purificado mediante CLAE, la identificación de este compuesto (**28**) se explica de manera detallada en el apartado 5.1.2. de este trabajo. De esta fracción se obtuvo el ácido masticadienónico (**1**).

Cuadro 10. Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de la corteza de *A. adstringens* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Ácido 3 α -hidroxi-masticadienónico (2)	>1000	>1000
Ácido masticadienónico (1)	>1000	>1000
β -sitosterol (7)	>1000	>1000
Ácido <i>epi</i> -oleanólico (5)	560	267
Mezcla de ácidos anacárdicos	128	64
Ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico (28)	47	25
CHX*	1.25	0.32

CHX*: gluconato de clorhexidina

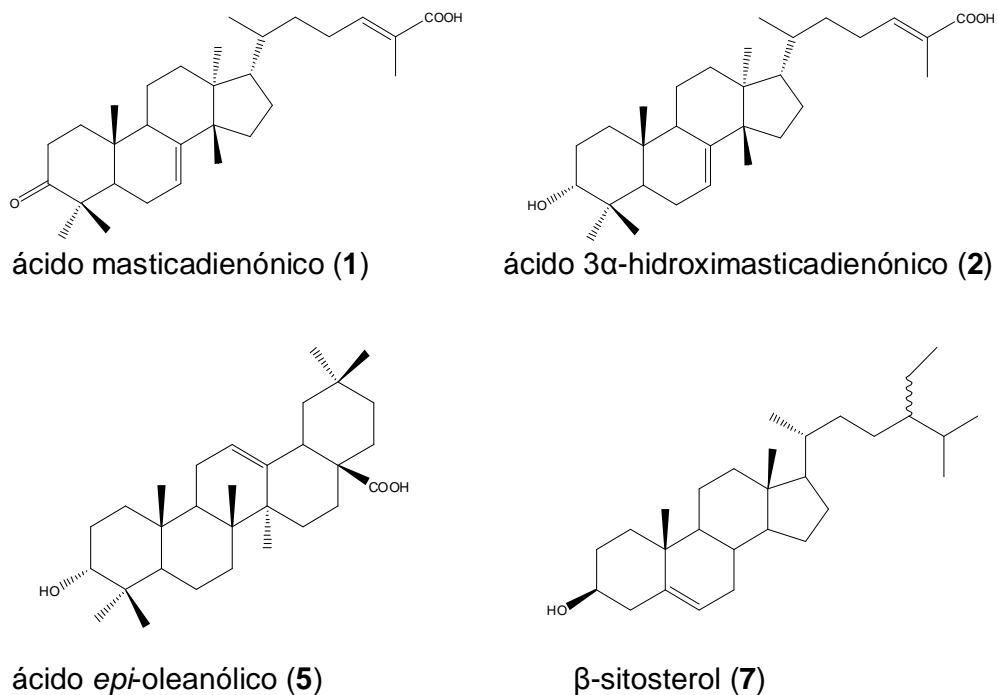


Figura 5. Estructuras de los triterpenoides y esterol aislados de la corteza de *A. adstringens*.

5.1. Caracterización estructural del ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-nonadec-16-enil)-benzoico (28).

El compuesto 28 se aisló como un sólido blanco con un punto de fusión de 123-124 °C. Las constantes espectroscópicas del compuesto 28 se resumen en el Cuadro 11. Su fórmula molecular se estableció como C₂₆H₄₂O₃ mediante espectrometría de masas la cual permitía seis insaturaciones. El espectro de UV presentó un máximo de absorción a 207 nm.

El espectro de RMN¹H del compuesto 28 (Figura 5) mostró el perfil típico para los compuestos del tipo de los ácidos anacárdicos (Mata *et al.*, 1991; Tyman, 2001) presentando las siguientes señales diagnósticas:

- a) Un sistema ABC para tres hidrógenos aromáticos de un benceno 1, 2, 3 trisustituído. El sistema se observó en δ 7.36 (*t*, $J= 7.2$ Hz, H-4), 6.87 (*dd*, $J= 7.2, 1.0$ Hz, H-3) y en 6.78 (*dd*, $J=7.2, 1.0$ Hz, H-5).
- b) Un multiplete centrado en δ 5.34 que integra para dos protones asignable a una doble ligadura una constante de acoplamiento de 4.2 Hz. El valor de la constante de acoplamiento sugiere una estereoquímica *Z* para la doble ligadura.
- c) Un triplete ($J= 7.8$ Hz) característico para un metileno bencílico centrado en δ 2.98.
- e) Una señal que integra para cuatro hidrógenos asignable a dos grupos metileno vecinos a una doble ligadura centrada en δ 2.02. Esta señal muestra en el espectro de correlación homonuclear (COSY) una correlación con la señal asignable a los protones vinílicos centrada en δ 5.34 (Figura 7).
- f) Un multiplete que integra para dos protones en δ 1.60. Esta señal mostró una correlación en el espectro de COSY (Figura 7) con la señal para el metileno bencílico en δ 2.98.
- g) Un multiplete ancho asignable a los protones de los metilenos alifáticos en δ 1.25–1.40. Esta señal muestra correlaciones en el espectro de COSY con las señales centradas en δ 2.02 y 1.60.
- h) Un triplete ($J= 7.6$ Hz) característico para un metilo alifático terminal en δ 0.95. Esta señal muestra una correlación en espectro de COSY con un multiplete en δ 2.02.

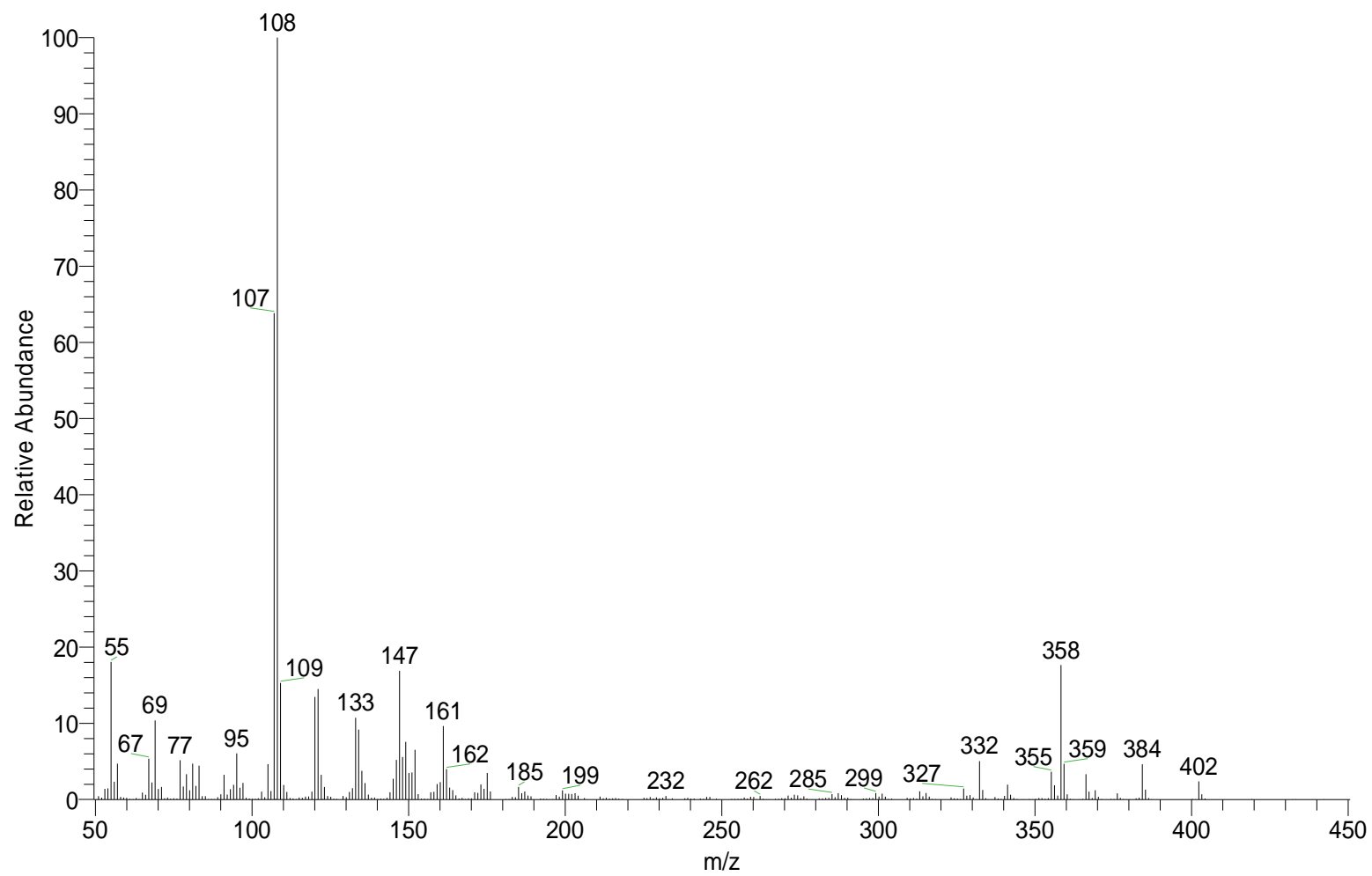


Figura 6. Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).

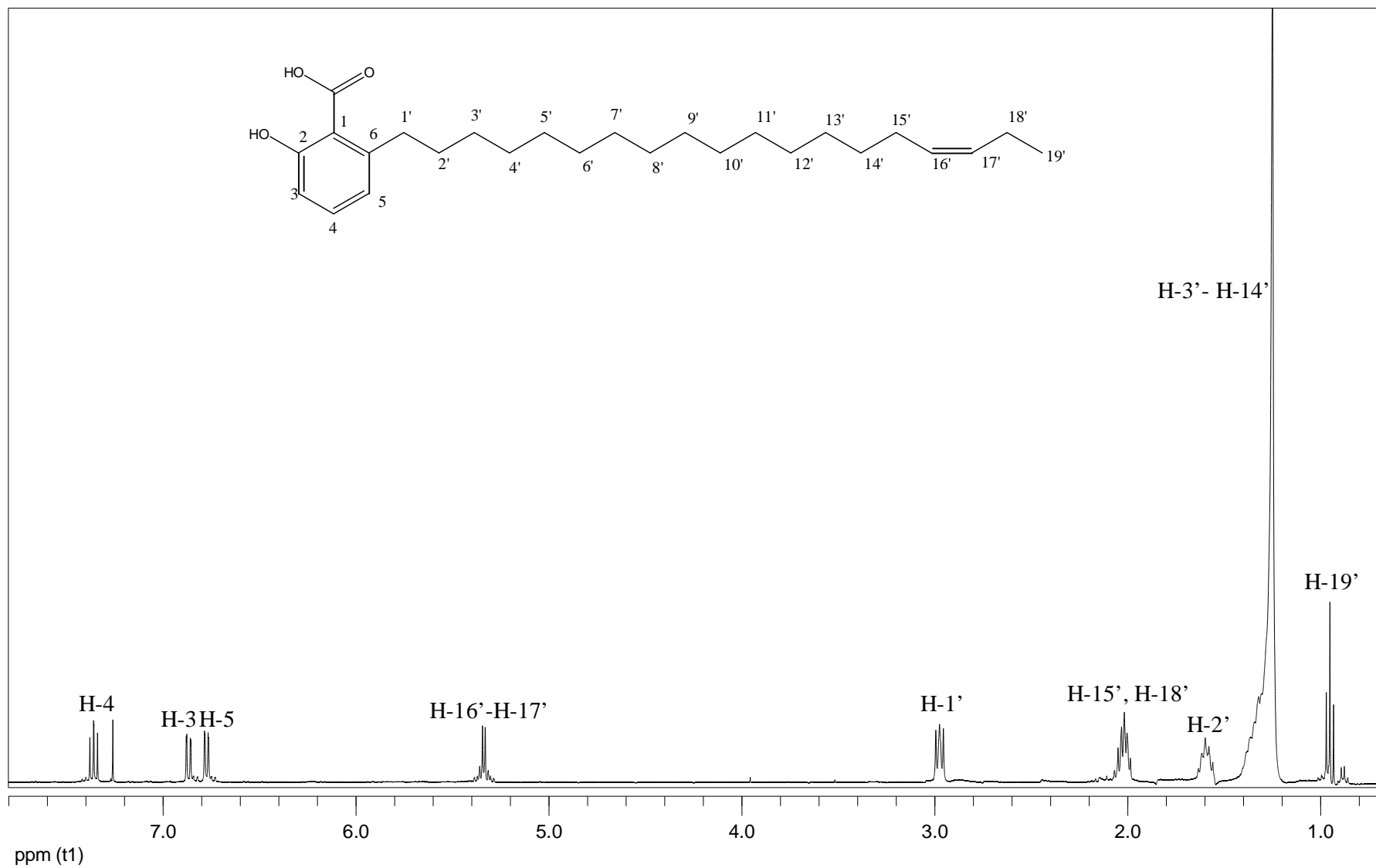


Figura 7. RMN¹H del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (28).

El espectro de RMN¹³C mostró el perfil típico para un ácido anacárdico (Mata *et al.*, 1991; Tyman, 2001). El espectro de masas (Figura 6) mostró un ión molecular de 402 uma que es congruente con la fórmula molecular del compuesto **28**. El análisis detallado del espectro de RMN¹³C modalidad DEPT indicó claramente que las señales correspondían a un metilo, dieciséis metilenos, cinco metinos y cuatro carbonos cuaternarios. De acuerdo con su desplazamiento químico, el metilo en δ 14.39 pertenece a una cadena alifática lineal. Las señales correspondientes a los grupos metileno en δ 36.48, 32.03, 29.81, 29.56, 29.3, 27.1, 20.50 se asignaron como sigue: la señal en δ 36.48 con base en su desplazamiento químico y las interacciones mostradas en el espectro de HMQC al metileno bencílico (C-1'), la señal en δ 32.03 se asignó a C-2', la señal en δ 29.8 a los carbonos C-12'-C-14', la señal en δ 29.56 a los carbonos C-4'-C-11', la señal en δ 29.3 a C-3', la señal en δ 27.1 a C-15' y por último la señal en δ 20.5 a C-18'. Las señales correspondientes a los grupos metino en δ 135.36, 122.72 y 115.83 se asignaron a los carbonos aromáticos C-4, C-5 y C-3, respectivamente. Por otro lado, los metinos en δ 131.5 y 129.35 asignables a los carbonos C-17' y C-16'. Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios en δ 175.53, 163.62, 147.74 y 110.8 son atribuibles al grupo carbonilo del ácido unido a C-1, y a los carbonos C-2, C-6 y C-1 del anillo aromático, respectivamente.

Los elementos estructurales presentados hasta el momento permitieron corroborar la presencia de un ácido anacárdico con una cadena lateral de 19 carbonos y una doble ligadura. La posición de la doble ligadura en la cadena se estableció con base en el análisis de los cuadros de conectividad en el espectro COSY (Figura 7). Los cuadros de conectividad observados para los protones H-16/H-15, H-17/H-18 y H-18/H-19 permitieron ubicar la doble ligadura en la posición 16 de la cadena lateral (Figura 9). El análisis de los cuadros de conectividad en el espectro de HMBC (Figura 10) permitió corroborar la posición de la doble ligadura en el carbono C-16. Las correlaciones H-19'/C-18', H-19'/C-17' son congruentes con la ubicación de la doble ligadura en C-16'. El valor de la constante de acoplamiento (J) entre los protones H-16' y H-17' (4.2 Hz) es congruente con una estereoquímica *Z* para

la doble ligadura. Es importante destacar que de acuerdo a la literatura todos los ácidos anacárdicos de origen natural poseen estereoquímica *Z* en sus dobles ligaduras (Tyman, 2001). Con base en las evidencias descritas anteriormente el compuesto 28 se caracterizó como el ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).

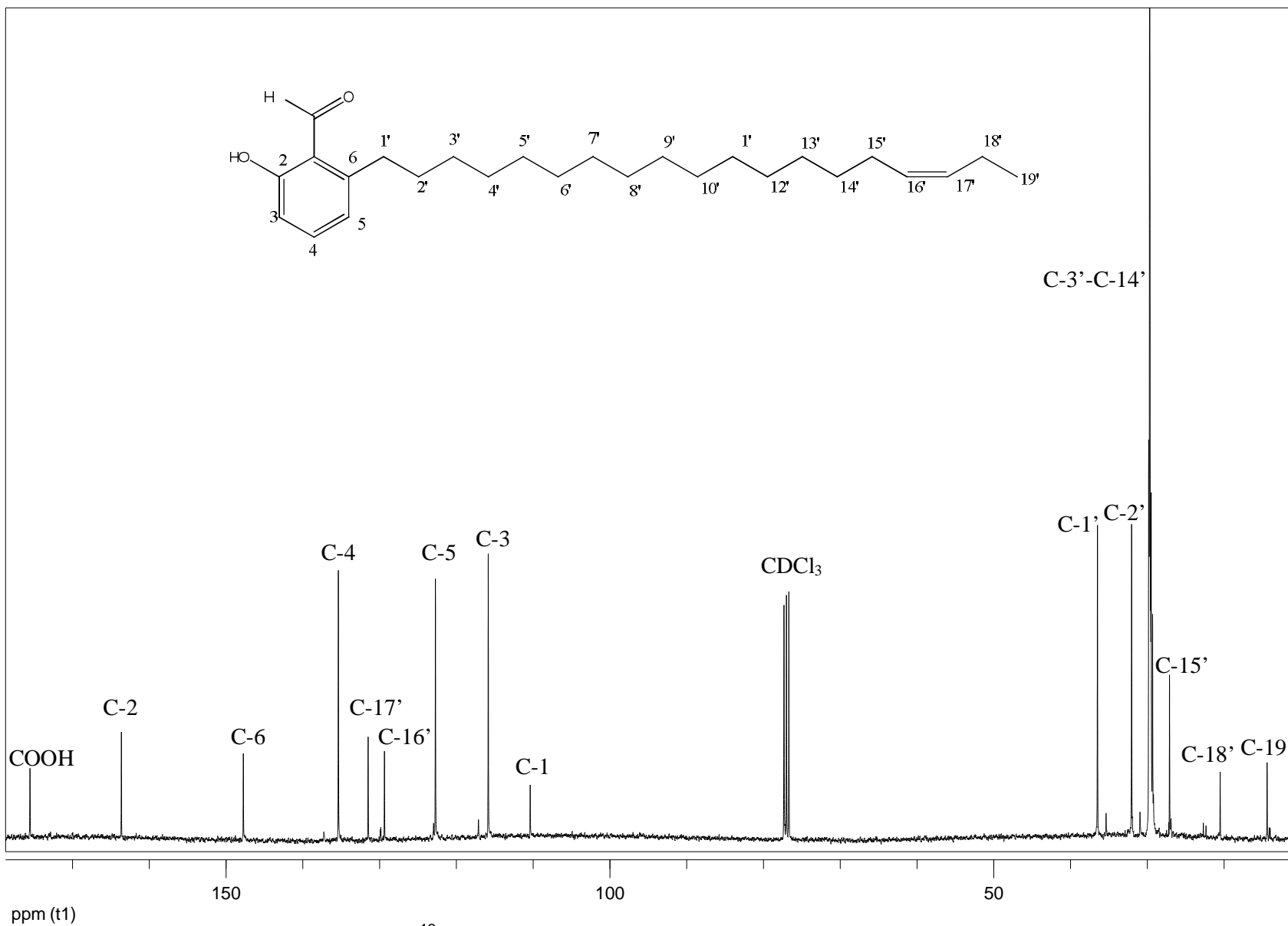


Figura 8. RMN ^{13}C del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).

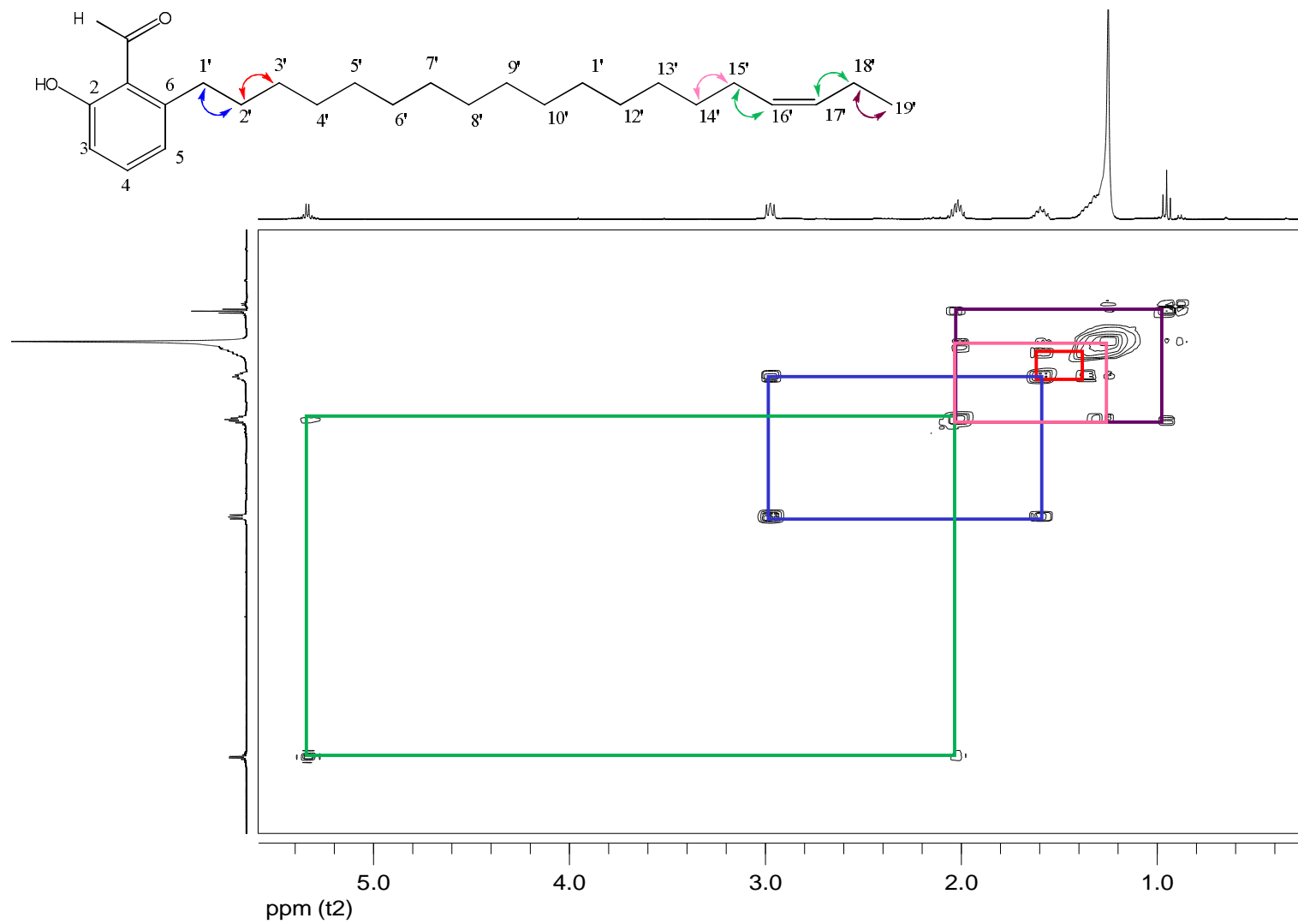


Figura 9. Espectro COSY del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).

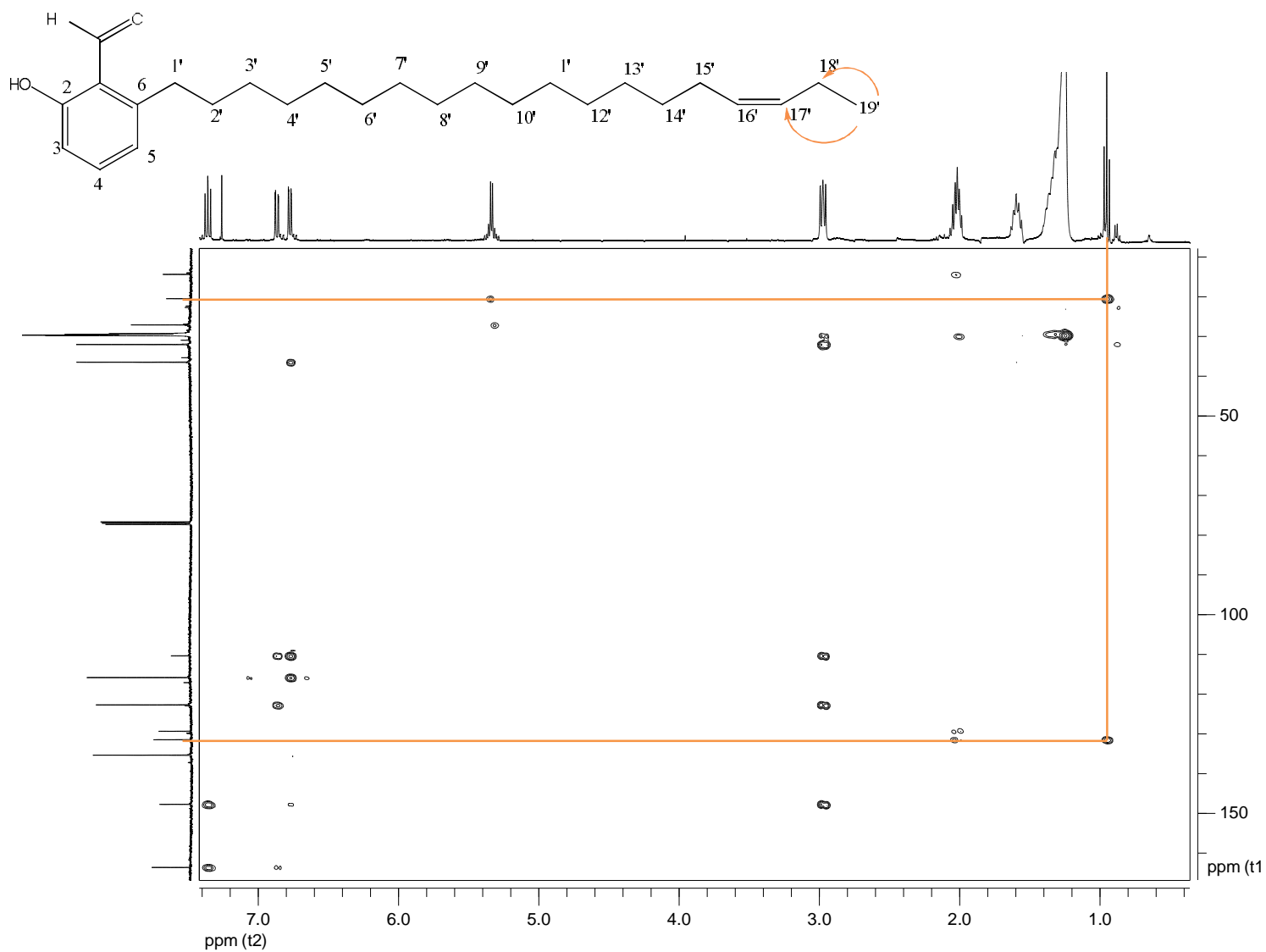
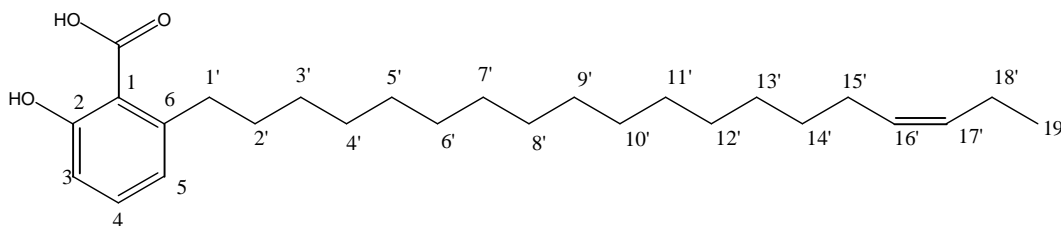


Figura 10. Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas en las RMN¹H y ¹³C para el ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**).



Posición	RMN ¹³ C	RMN ¹ H
	δ	δ
1	110.80	–
2	163.62	–
3	115.84	6.87 (<i>dd</i> , $J=7.2, 1.0$)
4	135.36	7.36 (<i>t</i> , $J=7.2$)
5	122.72	6.78 (<i>dd</i> , $J=7.2, 1.0$)
6	147.74	–
1-COOH	175.53	–
1'	36.49	2.98 (<i>t</i> , $J=7.8$)
2'	32.04	1.60
3'	29.30	1.25
4'	29.56	1.25
5'	29.56	1.25
6'	29.56	1.25
7'	29.56	1.25
8'	29.56	1.25
9'	29.56	1.25
10'	29.56	1.25
11'	29.56	1.25
12'	29.81	1.25
13'	29.81	1.25
14'	29.90	1.25
15'	27.10	2.02
16'	129.35	5.34
17'	131.50	5.34
18'	20.50	2.02
19'	14.39	0.95 (<i>t</i> , $J=7.6$)

CDCl₃, ¹H [400 MHz, J (Hz), δ en ppm], ¹³C [100 MHz, δ en ppm]

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La información científica generada en esta investigación representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie *Amphipterygium adstringens* que es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana.

El ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**) constituye una aportación original al conocimiento de la química de la especie *Amphipterygium adstringens*, ya que la presencia de este compuesto no tiene precedente en la naturaleza.

El ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**) presentó la mejor actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* con concentraciones mínimas inhibitorias de 47 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente. Por otro lado la mezcla de ácidos anacárdicos presentó una actividad biológica significativa contra los microorganismos de prueba, con CMI de 128 µg/ml y 64 µg/ml respectivamente.

Por otra parte, el ácido *epi*-oleanólico (**5**) presentó actividad biológica moderada con CMI de 560 µg/ml y 267 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Los demás compuestos aislados a partir de la corteza del cuachalalate no presentaron actividad biológica contra ninguna de las cepas bacterianas utilizadas.

Cabe señalar que aunque la clorhexidina es uno de los agentes más empleados para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por bacterias de la cavidad oral y presenta una actividad biológica mayor que el ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**), presenta desventajas tales como el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto (Quirynen *et al.*, 2000).

7. PERSPECTIVAS

Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias que no se utilizaron en el presente proyecto.

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto íntegro de cuachalalate.

Utilizar al ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico (**28**) como modelo para la síntesis total o parcial de compuestos análogos con mayor actividad biológica contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Realizar extracciones selectivas de la mezcla de ácidos anacárdicos obtenida a partir de la corteza de cuachalalate para determinar sus efectos sobre la agregación y la formación de la placa dentobacteriana.

Separar los constituyentes minoritarios de la mezcla de ácidos anacárdicos con la finalidad de determinar su estructura química y su actividad biológica de manera individual.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, H., Rojas, M., Arceo, S., Soto, M., Martínez, M., Terrazas, T., del Toro, G., (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **609**, 43-46.
2. Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, E., (1994). *Plantas Medicinales del Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 1ª edición.
3. Aguilera, L., Padilla, M., Frausto, E., Aceves, M., Muñoz, J., Duarte, S., Aguilar, R., Salaices, E., (2005). Estimación del riesgo de caries dental en escolares mediante el cariograma. *Revista Mexicana de Pediatría*, Volumen 72, número 5, septiembre-octubre, 230-236.
4. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Tomo I (1-583 páginas); Tomo II (584-1193 páginas); Tomo III (1194-1786 páginas). 1a. Ed. Méx. 1994. Referencia sobre el Cuachalalate, en las páginas 542-543, del Tomo No. I.
5. Begum, P., Hashidoko, Y., Islam, T., Ogawa, Y., Tahara, S., (2002). Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Journal of Biosciences*. **57(9/10)**, 874-882.
6. Castillo, I., Rivero, F., Celis, H., Romero, I., (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **144**, 72-77.
7. COFEPRIS, (2005). Hacia una política farmacéutica integral para México, Primera edición, Secretaría de Salud. México, D.F.

8. CONABIO, imágenes de *Amphipterygium adstringens*, disponibles en <http://www.conabio.gob.mx/>
9. Cuevas, X., (2005). A revisión of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Boletín del Instituto de Botánica*, Universidad de Guadalajara. **13**, 27-47.
10. Davies, D., (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drugs Discovery*. **2**, 564-582.
11. Déciga, M., Rivero, I., Arriaga, M., Castañeda, G., Angeles, G.E., Navarrete, A., Mata, R. (2006). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **110 (2)**, 334-342.
12. 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.
13. Dreeszen, P. H. (2003). Biofilm. The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking water system. *Edstrom Industries*, Inc. segunda edición.
14. Dzubak, P., Hajdich, M., Vydra D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J., (2005). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Reports*, **22**, 394-411.
15. FHEUM, (*Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*), (2001). Secretaría de Salud.
16. Gellerman, J., Anderson, W., Schlenk, H., (1976). Synthesis of Anacardic Acids in Seeds of *Ginkgo biloba*. *Biochimica ei Biophysica Acta*. **431**, 16-21.

17. Gestal, J., Smyth, E., Cuenca, E., (2001). Epidemiología y prevención de la caries y las enfermedades periodontales. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. 10ª edición. Barcelona. Masson. 789– 803.
18. Gilbert, P., Das, J., Foley, I., (1997). Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Adv Dent Res*. **1**, 160-167.
19. Grazzini, R., Hesk, D., Heininger, E., Hildenbrandt, G., Reddy, C., Cox-Foster, D., Medford, J., Craig, R., Mumma, R., (1991). Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxidase synthase by anacardic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **176(2)**, 775-780.
20. Green, I., Tocoli, F., Hwa Lee, S., Nihei, K., Kubo, I., (2007). Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **15**, 6236-6241.
21. Green, I., Tocoli, F., Hwa Lee, S., Nihei, K., Kubo, I., (2008). Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **43**, 1315-1320.
22. Gong, X., Ding, H., Qiu, Y., Jia, Z., Qu, W., He, Y., (2006). Toxicity of cyclophosphamide on primary cultured hepatocytes of rat and protective effects of oleanolic acid. *Yiyao Daobao Zazhishe*, **25(11)**, 1114-1116.
23. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Drugs Discovery*. **2**, 95-108.
24. Hernández, Francisco, 1959. Obras Completas. Vol. I (1571-1576). UNAM, México.

25. Himejima, M., Kubo, I., (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **39(2)**, 418-421.
26. Kasemura, K., Nomura, M., Sawabe, A., Fujuhara, Y., (2003). Synthesis and cosmetic whitening effect of glycosides from anacardic acids. *Journal of Oleo Science*. **52(3)**, 141-147.
27. Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M., Yamagiwa, Y., Mera, H., Tokushima, K., Ohta, S., Kamikawa, T., (1991). Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41(6)**, 1016-1019.
28. Kubo, I., Masuoka, N., Joung Ha, T., Tsujimoto, K., (2006). Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*. **99**, 555-562.
29. Li, X.-C., van der Bilj P., Wu, C., (1998). Binaphthalenone glycosides from african chewing sticks, *Diospyros lycioides*. *Journal of Natural Products*, **61**, 817-820
30. Liébana, U. J. (2002). *Microbiología oral*. McGraw Hill-Interamericana, España. 297-525.
31. Lima, C., Pastore, G., Lima, E., (2002). Study of the antibacterial activity of anacardic acids from the cashew *Anacardium occidentale* nut Shell oil of the clone of cashew-midget-precocious CCP-76 and CCP-09 in five stages of maturation on oral microorganisms. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*. **20(3)**, 358-362.
32. Linares, J., Martín, Herrero J.E. (2003). Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplatarias. *Avances en Periodoncia*. **15 (3)**, 139-147.

33. Lozoya, X., (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: La investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaria de Salud, México, 225-270.
34. Makino, M., Motegi, T., Fujimoto, Y., (2003). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry*. **65**, 891-896.
35. Martínez Maximino, *Las plantas medicinales de México*. 1959, 404-405.
36. Mata, R, Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G., (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. **34**, 147-154.
37. Mitscher, L. A., Pillai, S., Shankel, D., (2000). Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medicinal products. *Journal of Food and Drugs Analysis*, **8**, 229-234.
38. Murata, M., Irie, J., Homma, S., (1996). Inhibition of Lipid Synthesis of Bacteria, Yeast and Animal Cells by Anacardic Acids, Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase Inhibitors from Ginkgo. *Lebensm.-Wiss u-Technol*. **30**, 485-463.
39. Narasimhan, B., Panghal, A., Singh, N., Dhake, A. S., (2008). Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. *Journal of Food Processing and Preservation*. **32 (4)**, 600-609.
40. Navarrete, A., Hersh, P., Khan, I., (2006). Quantitative Determination of Triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography and Morphological Analysis of Cuachalalate Preparations. *Journal of AOAC International*. **89 (1)**, 1-7.
41. Olivera-Ortega, A., Soto, M., Martínez, M., Terrazas T., Solares F., (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium*

- adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*, **68**, 109-113.
42. Organización Mundial de la Salud (OMS), (2005). *Bulletin of the World Health Organization*. **83**, 641-720.
43. Oviedo, I., Ramirez, T, Soto, M., Martínez, M., (2001). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, **11**, 436–445.
44. Petersen, PE., (2005). Sociobehavioural risk factors in dental caries – international perspectives. *Community Dent Oral Epidemiol*. **33**, 274–9
45. Petersen, P., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., Ndiaye, C., (2005). The Global Burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*. **83**, 661-669.
46. Piera, S. G. (2003). Studio del biofilm, formación y consecuencias. Escola de Prevenció Seguretat Integral.
47. Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., Steenberghe, D., (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy or chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology*, **28**, 72-90.
48. Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J., Martínez, S., Bye, R., Pereda, R., Franzblau, S., Timmermann, B., Mata, R., (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**, 1117-1126.
49. Song, X., Ma, H., Hang, S., Song, W., Zhu, W., Lui, L., Che, X., (2008). Effect of oleanolic acid on cultured neuronal cells treated with glutamic acid. *Harbin Yike Daxue Xuebao*, **41(1)**, 13-15.

50. Takahashi, N., (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series* **1284**, 103-112.
51. Tyman, J., H., P., (2001). Chemistry and biochemistry of anacardic acids. *Recent Research Developments in lipids*, **5**, 125-145.
52. Watnick, P., Kolter, R., (2000). Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 2675–2679.
53. Wu, C., Wei, G., (2002). Tea as a functional food for oral health, *Nutrition*, **18**, 443-443.
54. Zhang, P., Li, H., Chen, D., Ni, J., Kang, Y., Wang, S., (2007). Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Acta Biochimica of Histology and Embriology*, **39(10)**, 803-809.