



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL Y COMPUESTOS AISLADOS DE LA
INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE GUAYABA (*Psidium
guajava* L.)**

T E S I S

Que para obtener el título de

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

OLGA MERCEDES BLACKALLER LEDESMA



MEXICO, 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 Aguilar Laurents
Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz
2do. suplente: M. en C. Mario Figueroa Saldívar.

Sitio donde se desarrollo el proyecto

Laboratorio 111. Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Olga Mercedes Blackaller Ledesma

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me proporcionó.

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

Al personal técnico de la USAI por el registro de los distintos espectros utilizados en esta investigación, y en especial a la M en C. Georgina Duarte Lisci por la enseñanza de la técnica de microextracción en fase sólida, por su disponibilidad y apoyo.

Al Q.F. B. Alejandro Camacho Cruz por su valiosa ayuda técnica en el desarrollo y propagación de las bacterias utilizadas en el presente proyecto.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dra. Rachel Mata Essayag por la revisión de la tesis.

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207 e IN205709.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su amor, consejos, por darme ánimos todos los días y por todos sus sacrificios para hacer de mi una mejor persona. Porque su determinación y entrega me han enseñado tanto.

A mi hermano Santiago, gracias por todos los momentos inolvidables que hemos compartido, por escucharme siempre, por hacerme reír, por aguantar mis enojos y por toda la paciencia que me has tenido, gracias por ayudarme a realizar esta meta.

A Sara, por la amistad que me has brindado durante tantos años, por todos los momentos de alegría que hemos compartido, por las crisis que hemos superado, por darme ánimo cuando lo he necesitado y porque tu sabes que hay hermanos que la vida regala.

A Roberto, por brindarme incondicionalmente su amor, comprensión y apoyo, gracias por todos los bellos momentos que hemos compartido.

A mis amigos: Alexis, Ania, Bea, David, Goretti, Mariana, Oscar, Ricardo y Zaine por proporcionarme momentos increíbles, por apoyarme en los malos, por comprender mis locuras y por todos los sueños que hemos compartido y se que lograremos. Gracias por hacer que cada uno de los días valiera la pena.

INDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE DIAGRAMAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biopelícula	3
2.1.1 Formación de las biopelículas	4
2.1.2 Estructura de la biopelícula	6
2.1.3 Mecanismos de resistencia de la biopelícula	6
2.1.4 Estrategias terapéuticas futuras.	8
	9
2.2 Antecedentes de <i>Psidium guajava</i> (guayaba):	
2.2.1 Uso en medicina tradicional	10
2.2.2 Estudios fitoquímicos previos.	11
2.2.2.1 Frutos	11
2.2.2.2 Piel del fruto:	12
2.2.2.3 Hojas	12
2.2.3 Actividad biológica	13
2.2.3.1. Antimicrobiana	13
2.2.4 Efectos en la placa dental:	14
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	21
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL.	22
4.1 Procedimientos generales.	22
4.1.1 Análisis cromatográficos.	22

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	22
4.2 Material vegetal	22
4.3 Estudio fitoquímico de <i>Psidium guajava</i> .	23
4.3.1 Microextracción en Fase sólida.	23
4.3.2 Obtención del aceite esencial.	26
4.3.3 Preparación de la infusión de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	27
4.3.3.1 Fraccionamiento primario del extracto.	27
4.3.3.2 Fraccionamiento secundario del extracto.	28
4.3.3.3 Fraccionamiento terciario del extracto.	28
4.3.3.4 Fraccionamiento cuaternario del extracto.	28
4.3.3.5 Obtención de avicularina a partir de la fracción activa F4.	29
4.3.3.6 Obtención del ácido asiático a partir de la fracción activa D6	29
4.3.3.7 Preparación del extracto de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	31
4.4 Ensayo biológico.	32
4.4.1 Microorganismo de Prueba	32
4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	32
5. RESULTADOS y DISCUSIÓN.	34
5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la infusión de hojas del guayabo sobre <i>S. mutans</i> .	34
5.2 Evaluación del potencial antibacteriano del aceite	39

esencial preparado a partir de las hojas de guayabo.	
5.3 Identificación de los componentes del aceite esencial de las hojas del guayabo.	39
5.4 Resultados obtenidos de la microextracción en fase sólida (SPME) realizada en las hojas del guayabo	43
5.5 Evaluación del potencial antibacteriano de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas del guayabo	46
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	48
7. PERSPECTIVAS.	50
8. BIBLIOGRAFÍA.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografía de gases.
CMI	Concentración mínima inhibitoria
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
g	Gramo
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
L	Litro
μg	Microgramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
PBS	Buffer de fosfatos.
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
rpm	Revoluciones por minuto
SPME	Microextracción en fase sólida
t	Triplete

LISTA DE ABREVIATURAS

TMS	Tetrametilsilano.
UFC	Unidad formadora de colonias
uma	Unidad de masa atómica.

LISTA DE CUADROS.

Cuadro	Contenido	Página
1	Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas	8
2	Actividades biológicas encontradas para <i>Psidium guajava</i>	13
3	Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo.	15
4	Características del cromatógrafo de gases utilizado	23
5	Características del espectrómetro de masas utilizado	24
6	Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco.	25
7	Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida.	25
8	Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución de las muestras.	26
9	Cantidades obtenidas de los extractos realizados.	27
10	Fraccionamiento cuaternario por cromatografía en columna abierta de las fracciones B2	28
11	Cantidades obtenidas del fraccionamiento primario del extracto.	31
12	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	34
13	Actividad antimicrobiana (CMI) de la avicularina (1) y del gluconato de clorhexidina (CHX) sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	38
14	Compuestos encontrados en el aceite esencial de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	41

15	Compuestos encontrados en las hojas del guayabo utilizando SPME	45
16	Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas del guayabo.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Fruto del guayabo (A) y flor del guayabo (B).	12
2	Compuestos aislados de la infusión de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	36
3	Espectros de resonancia magnética nuclear protónica (A) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (B) obtenidos para la avicularina.	37
4	Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de las hojas del guayabo	40
5	Cromatograma de gases de las hojas de <i>Psidium guajava</i> obtenido utilizando la técnica de SPME.	44

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama	Contenido	Página
1	Obtención del aceite esencial de las hojas del guayabo.	27
2	Fraccionamiento de la infusión de hojas de guayabo.	30
3	Fraccionamiento primario del extracto con diclorometano: metanol de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	31

1. INTRODUCCIÓN.

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia. En el caso particular de México, el uso de las plantas medicinales se describe desde la época prehispánica, se ha estimado que existen cerca de 30 000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó aproximadamente 3 000 con usos medicinales y según datos de la Organización Mundial de la Salud alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica existiendo una tendencia hacia lo natural que afecta al uso de los vegetales como terapia alternativa de infinidad de dolencias. El cuidado de la salud debe ser integral y por ende el componente de salud bucal queda incluido en esta concepción.

A pesar de las mejoras en los servicios de salud, existen grandes desigualdades de acceso a éstos lo cual mantiene a más de la mitad de la población mexicana con algún padecimiento de la cavidad oral que pudiera ser evitable. Las caries dentales y las enfermedades periodontales, son los padecimientos que se presentan con mayor incidencia y prevalencia concentrados principalmente en los grupos de la población menos favorecidos, lo cual constituye un grave problema de salud pública. El uso de antibióticos para tratar estos padecimientos representa una de las mejores opciones. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes y los efectos colaterales de los antibióticos hacen necesaria la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. En este sentido las plantas medicinales representan una alternativa al uso de antibióticos convencionales para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos de interés clínico para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El presente trabajo surgió como parte de un proyecto que plantea la investigación fitoquímica de las hojas de la especie *Psidium guajava* como una fuente potencial de compuestos con actividad antibacteriana sobre bacterias

patógenas de la cavidad oral. La selección de la especie *P. guajava* se realizó con base en un criterio etnobotánico.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Biopelícula

La placa dental es el término comúnmente utilizado para la presencia de la biopelícula en los dientes. Consiste en una compleja comunidad microbiana embebida en una matriz de polímeros (Jass *et al.*, 2003).

En una boca saludable, la superficie disponible para la colonización es el esmalte, un tejido duro y altamente calcificado. El esmalte de los dientes segundos después de limpiarlos se cubre con una película formada por las moléculas presentes en la saliva, las cuales se unen selectivamente a la superficie del diente; por ejemplo proteínas ricas en prolina, histatina y estaterina las cuales actúan para promover la adherencia de algunas bacterias importantes (*Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* y algunos microorganismos anaerobios pigmentados de negro). Una vez que las bacterias libres flotantes se adhieren a la superficie percibida, elaboran señales químicas para coordinar la diferenciación y formación de estructura de la biopelícula, incluyendo la síntesis de una cubierta protectora de naturaleza polisacárida (Jass *et al.*, 2003).

En casi todos los casos, la biopelícula desempeña un papel fundamental en la supervivencia y la propagación de los microorganismos en el interior del huésped. Ello se debe a la proximidad física de otras células ya que favorece las interacciones sinérgicas incluso entre miembros de especies distintas, la transferencia horizontal de material genético entre microorganismos y la utilización conjunta de subproductos metabólicos. La matriz de exopolisacáridos (EPS) que opera a modo de escudo ofrece protección a las bacterias patógenas ante los cambios del entorno (humedad, temperatura y pH) y protección frente al sistema inmunitario de un huésped infectado o frente a depredadores. Las biopelículas destacan también por su resistencia a concentraciones extraordinariamente elevadas de antibióticos, que, incluso a dosis menores, resultan letales para sus homólogos planctónicos (Harrison *et al.*, 2006).

La matriz incorpora grandes cantidades de agua en su estructura, llegando a representar el 97% de la biopelícula. Además de agua y microorganismos, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente fundamental y son producidos por los propios microorganismos que contiene la biopelícula. En menor cantidad se encuentran macromoléculas como proteínas, ácido nucleicos y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana (Nazar, 2007).

2.1.1 Formación de las biopelículas

El ciclo vital de los biopelículas puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento:

Primera fase (adhesión, 0-4 horas). Inicialmente se lleva a cabo vía fuerzas fisicoquímicas entre la bacteria y la superficie del diente recubierta incluyendo fuerzas atractivas de Van der Waals. De manera adicional, una alta hidrofobicidad de la superficie puede facilitar la adhesión. Una vez que las bacterias perciben una superficie, proceden a formar una unión activa vía apéndices, como fimbrias, flagelos o pili (Nazar, 2007 y Wilson *et al.*, 2003).

La motilidad otorgada por flagelos, ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no parece ser un requisito esencial, puesto que las bacterias Gram positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biopelículas. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie (Nazar, 2007).

El grupo de *S. sanguis* representa un buen ejemplo de colonizadores primarios que se adhieren a la película utilizando dos pasos cinéticamente distintos. El primer paso involucra una interacción reversible con la superficie del esmalte recubierto con la película, mediado por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, el segundo es un cambio dependiente del tiempo a un estado de unión de mayor afinidad; esto involucra múltiples adhesinas en la superficie del diente y no es dependiente de la hidrofobicidad (Jass *et al.*, 2003).

La adhesión firme resulta de interacciones estereoquímicas específicas entre las moléculas, (adhesinas) sobre la superficie celular de los microorganismos y receptores en la película. La única bacteria detectada a esta etapa temprana son cocos o cocobacilos, y siempre se encuentran localizados en las depresiones de la superficie del esmalte (Wilson *et al.*, 2003).

Se ha descrito que la colonización microbiana parece incrementar a medida que aumenta la aspereza de la superficie, esto sería debido a que el área de superficie se torna mayor (Nazar, 2007).

Durante la segunda fase de crecimiento (4 - 24 horas), la bacteria una vez adherida comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia. Incluso después de ocho horas únicamente pequeños grupos de microorganismos se encuentran en la superficie. El número de bacterias comienza a incrementar rápidamente después de 8 - 12 horas y gradualmente forma una monocapa sobre la superficie. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula, y éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional generando estructuras similares a setas (Nazar, 2007 y Wilson *et al.*, 2003).

Finalmente, la tercera etapa (desprendimiento), después que la biopelícula ha alcanzado la madurez, algunas células ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan de la matriz para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de formación y desarrollo de la biopelícula. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas a la biopelícula o de procesos activos inducidos por éste.

Los tres mecanismos principales para generar desprendimiento son:

- (a) Erosión o deslizamiento: remoción continua de pequeñas partes de la biopelícula
- (b) Separación: remoción rápida y masiva.
- (c) Abrasión: liberación por colisión de partículas del líquido circundante con la biopelícula. La separación es menos frecuente que la erosión y, se piensa que

resulta de depletar los nutrientes u oxígeno al interior de la biopelícula (Nazar, 2007).

2.1.2 Estructura de la biopelícula

La biopelícula estructuralmente está constituida por múltiples especies microbiológicas, los espacios intercelulares o canales, los cuales se han comparado con el sistema circulatorio de organismos superiores y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (Herrera, 2004). Muchas bacterias son capaces de producir exopolisacáridos (cápsulas) o excreciones celulares que rodean los ambientes. Entre los beneficios atribuidos a los exopolisacáridos como parte integral de la estructura organizacional se destaca el que actúan como un mecanismo de concentración de nutrientes, pero el mecanismo como tal por el cual desarrollan sus actividades es desconocido: previenen el acceso directo de ciertos agentes antimicrobianos o restringen la difusión de los componentes al interior de la biopelícula, contienen metales, aniones, cationes y toxinas que pueden ser la clave para la transferencia de estos al ecosistema y actúan como protectores de una gran variedad de condiciones de stress ambiental como rayos ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación (Herrera, 2004).

2.1.3 Mecanismos de resistencia de la biopelícula

La infección por las biopelículas es difícil de erradicar dada su resistencia, definida como la habilidad de un microorganismo para crecer en presencia de una elevada concentración de un agente antimicrobiano, o un pequeño grupo de cepas en las cuales la concentración mínima inhibitoria (MIC) se ha incrementado. En una biopelícula la susceptibilidad a los antibióticos puede disminuir de 10 a 1000 veces (Herrera, 2004).

Los mecanismos por los cuales se hacen resistentes aun no son completamente claros pero se han considerado: la inhabilidad de los antibióticos de penetrar todas las áreas de la biopelícula, la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas, la baja disponibilidad de nutrientes lo que contribuye a una baja tasa de crecimiento,

los cambios fenotípicos que adquiere la población bacteriana dentro de la biopelícula y la persistencia bacteriana (Herrera, 2004).

La penetración es restringida debido a que la matriz de exopolisacáridos limita la difusión de las sustancias. Por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva en la protección celular contra los antibióticos cargados positivamente como los aminoglucósidos, por restricción de la permeabilidad durante toda la unión (Herrera, 2004).

Otro factor considerado como responsable de la resistencia de las biopelículas es la disminución de la tasa de crecimiento, virtualmente todos los antibióticos son muy efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida por algunos antibióticos para poder atacar. La penicilina y la ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y la tasa de ataque es proporcional a la tasa de crecimiento.

En algunas biopelículas la población de bacterias es heterogénea con respecto a la fase de crecimiento y cubre desde el espectro rápido hasta la fase metabólica inactiva. Debido a que la biopelícula está influenciada por el transporte de nutrientes, las células en las orillas de una microcolonia son las más activas y las células en las profundidades de la microcolonia pueden permanecer inactivas estando bien posicionadas para contribuir a la supervivencia de ésta después de un tratamiento con antibióticos (Herrera, 2004).

2.1.4 Estrategias terapéuticas futuras

El reconocimiento de que los organismos que forman las biopelículas son las responsables de un grupo significativo de enfermedades humanas posibilita la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y prevención, como podría ser el inhibir la adhesión mediante la alteración de la superficie o inhibir la persistencia, teniendo como blanco a los genes responsables de la expresión de estas características, pero ésta no es fácil, ya que ellos varían en las diferentes especies haciendo que el pronóstico de un tratamiento universal de la infección por las biopelículas sea poco alentador en un futuro inmediato (Herrera, 2004; Nazar, 2007).

Cuadro 1. Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas.

Fuente	Compuesto	Microorganismo de prueba	Referencia
<i>Croton cajucara</i>	Linalool	<i>Candida albicans</i>	Alviano, 2005
<i>Croton cajucara</i>	Aceite esencial rico en linalol	<i>Candida albicans</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Alviano, 2005
<i>Mussaenda macrophylla</i>	Ácido 28-O-β-D-glucopiranosil-16α-hidroxi-23-deoxiprotobásico	<i>Porphyromonas gingivalis.</i>	Kim, 1999
<i>Mussaenda macrophylla</i>	Ácido-3-O-β-D-glucopiranosil-28-O-α-L-rhamnopiranosil-16α-hidroxiprotobásico	<i>Porphyromonas gingivalis.</i>	Kim, 1999
<i>Mussaenda macrophylla</i>	Ácido-3-O-acetil oleanólico	<i>Porphyromonas gingivalis.</i>	Kim, 1999
<i>Mussaenda macrophylla</i>	3-O-acetildaturadiol	<i>Porphyromonas gingivalis.</i>	Kim, 1999

Cuadro 1. Ejemplos de compuestos antibacterianos aislados de plantas (continuación).

Fuente	Compuesto	Microorganismo de prueba	Referencia
<i>Punica granatum</i>	Quercetina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Naz, 2007
<i>Punica granatum</i>	Miricetina	<i>Micrococcus lysodictius</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Shigella dysenteriae</i>	Naz, 2007
<i>Punica granatum</i>	Ácido gálico	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Naz, 2007
<i>Mussaenda macrophylla</i>	Ácido 16 α -hidroxiprotobásico.	<i>Porphyromonas gingivalis</i> .	Kim, 1999
<i>Arnebia hispidissima</i>	β - Amirina	<i>Escherichia coli</i> .	Jain <i>et al.</i> , 2003

2.2 Antecedentes de *Psidium guajava* (guayaba)

Psidium guajava L. (Myrtaceae) es una especie nativa de México. El guayabo es un árbol pequeño de 4 a 10 m de altura, cuya corteza es lisa, café y delgada, las hojas son opuestas, duras, cortas, ovales con venas prominentes 5 - 15cm de largo. Las flores son llamativas, solitarias, blancas o cremosas y olorosas con estambres numerosos y los pétalos son numerosos de 2 cm de largo. Sus frutos son globosos o piriformes de 3 a 6 cm de diámetro; contiene una pulpa blanco amarillenta o rosada, de consistencia gomosa; sabor dulce y olor penetrante, con numerosas semillas pequeñas y duras (INI, 1994; Martínez, 1996). La especie es conocida comúnmente como guayaba o guayabo; guayabilla, guayabilla cimarrona, guayabo, guayabo morado, palo de guayabo blanco. En el estado de Chiapas se le denomina como: pata, pocs-cuy, potoj, potos, pox, sumbadam, en Guerrero como: xaxokotl, xolxocatl; en Hidalgo: xalxócotl (náhuatl); Michoacán: enendi (purépecha); Morelos: coloc, jaljocote, pichi, xalxócotl; Nayarit: ca-arú (cora), ushca-arú (tepehuano);

Oaxaca: lacow (huave). goyavier en Francia; guave, guavenbaum, guayave en Alemania, banjiro en Japón; goiba, goiabeiro en Portugal; guaiaba en Brasil; guava en inglés (INI, 1994; Martínez, 1996; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

La guayaba se encuentra ampliamente distribuida en Centro y Sudamérica, Europa, África y Asia. Crece en áreas tropicales y subtropicales en el mundo, se adapta a diferentes condiciones climáticas, pero prefiere climas secos (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Su uso medicinal ha sido reportado en sistemas indígenas medicinales en América principalmente.

2.2.1 Uso en la medicina tradicional

La guayaba se utiliza en diversas partes del mundo con fines terapéuticos y es conocida principalmente por sus propiedades antiespasmódicas y antimicrobianas en el tratamiento de diarrea y disentería (INI, 1994; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008; Martínez, 1996). También es utilizada como agente hipoglucémico (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Diversos estudios farmacológicos han descrito actividades antioxidantes, hepatoprotectivas, antialérgicas, antimicrobianas, antígenotóxicas, antiplasmódicas, cardioactivas, antitusivas, antidiabéticas y antiinflamatorias (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Estas actividades sugieren un amplio rango de aplicaciones clínicas para el tratamiento infantil de diarrea, diabetes, enteritis rotaviral, hipertensión, caries, heridas, dolor, reducción de la fiebre (Pérez-Gutiérrez, 2008).

En México la guayaba se utiliza para tratar más de 40 padecimientos y es utilizada con frecuencia en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, principalmente diarrea. El tratamiento consiste en hacer una decocción o infusión con las hojas del guayabo y administrarla por vía oral tres veces al día o como agua de uso. Esta práctica fue heredada de la medicina practicada por los Aztecas (Lozoya *et al.*, 2001).

Las hojas se aplican en heridas, para atenuar el dolor reumático y también pueden ser masticadas para aliviar el dolor de dientes ya que poseen un débil efecto sedante (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008). La infusión de las hojas es utilizada para reducir los niveles de glucosa en diabéticos. El uso de la infusión caliente es muy común entre las personas de Veracruz (Pérez-Gutiérrez,

2008). En el caso de enfermedades con fiebres altas y continuas, fiebre con dolor de cabeza y cuerpo se recomienda beber el té de guayaba. (INI, 1994). El fruto consumido en ayunas o cocido actúa como desparasitante, contra lombrices y amibas (INI, 1994).

La decocción de la corteza y de las hojas se utiliza para tratar daños en la piel. Entre los padecimientos de la piel que son tratados con la decocción aplicada de forma local, lavados, enjuagues o cataplasmas, se encuentran la caída del cabello, granos, salpullido, jiotos, acné, prurito, sarampión, escarlatina y sarna (INI 1994; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.2.2 Estudios fitoquímicos previos

2.2.2.1 Frutos

Las guayabas se caracterizan por su bajo contenido en carbohidratos (13.2%), grasas (0.53%), y proteínas (0.88%) y por un alto contenido de agua (84.9%). El valor alimenticio por cada 100 g es: Calorías 36 - 50 kcal, humedad 77- 86 g, fibra 2.8 - 5.5 g, calcio 9.1 - 17 mg, fósforo 17.83 mg, hierro 0.30 - 0.70 mg, vitamina A 200-400 I.U., tiamina 0.046 mg, riboflavina 0.03-0.04 mg, niacina 0.6-1.068 mg, ácido ascórbico 100 mg, vitamina B3 40 I.U. El manganeso se encuentra presente también en la planta en combinación con los ácidos: fosfórico, oxálico y málico (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

En el aceite esencial del fruto del guayabo se han reportado: Hexanal (65.9%), γ -butirolactona (7.6%) 2-hexenal (7.4%) (*E, E*)-2,4-hexadienal (2.2%), (*Z*)-3-hexenal (2%), (*Z*)-2-hexenal (1%), (*Z*)-3-hexenil acetato (1.3%) y fenol (1.6%), 3-cariofileno (24.1%), nerolidol (17.3%), 3-fenil propil acetato (5.3%) y óxido de cariofileno (5.1%) (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Por otra parte, los cambios en la composición química y las actividades de enzimas hidrolíticas durante cuatro etapas diferentes de maduración han sido estudiados en frutos de guayaba. Los resultados obtenidos muestran un decremento en el contenido de clorofila y un incremento en el contenido de carotenoides durante la maduración. El contenido de almidón disminuye y se observa un incremento concomitante de azúcares solubles en alcohol. Es

importante mencionar que los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina también disminuyen durante la maduración (Jain *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Piel del fruto

La piel del fruto presenta como principal constituyente ácido ascórbico. Este ácido se encuentra también en la carne firme y en bajo contenido en la pulpa. El proceso de enlatado o alguno en el que se utilice calor, destruye aproximadamente 50% del ácido ascórbico (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.2.2.3 Hojas

Las hojas contienen principalmente componente volátiles como el α -pineno, β -pineno, limoneno, mentol, alcohol isopropílico, β -cariofileno, β -bisaboleno, cineol, óxido de cariofileno, β -copaeno, humuleno, selineno, farneseno, cardineno, curcumeno, nerolidiol y aromandreno (Zakaria y Mohd, 1994; Li *et al.*, 1999). Por otra parte, de extractos orgánicos de las hojas se han aislado y caracterizado metabolitos de tipo flavonoide (avicularina, guaijaverina, caempferol-3- glucósido, quercetin-3-O- α -L-arabinopiranósido, y quercetina), triterpenos (ácido oleanólico, uvaol, ácido goreisico, guajavólido), triterpenos glicosilados de tipo oleanano y esteroles (β - sitosterol). Además, de las hojas se han obtenido aceites fijos (6%), resinas (3.15%), taninos (8.5%), grasas, celulosa, taninos, clorofila y sales minerales (Arima y Danno, 2002; Iwu, 1993; Oliver-Bever, 1986).



(A)



Figura 1. Fruto del guayabo (A) y flor del guayabo (B).

2.2.3 Actividad biológica

2.2.3.1 Antimicrobiana

Estudios previos han demostrado los efectos inhibitorios de los extractos acuosos y alcohólicos de la raíz y las hojas de *Psidium guajava* sobre el crecimiento de las bacterias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.*, y *Escherichia coli*. Estas bacterias son los agentes causales de infecciones intestinales en humanos (Chah *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Actividades biológicas encontradas para *Psidium guajava*.

Actividad biológica	Referencia.
Acné	Qadan <i>et al.</i> , 2005
Antidiarréico	Heinrich, 1998, Coutiño <i>et al.</i> , 2001, Zhang <i>et al.</i> , 2003, Goncalves <i>et al.</i> , 2005
Antimalárico	Ponce <i>et al.</i> , 1994, Tona <i>et al.</i> , 1998 , Nundkumar <i>et al.</i> , 2002
Antinociceptivos	Lutterdot, 1988, Shaheen <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 2. Actividades biológicas encontradas para *Psidium guajava* (continuación).

Actividad biológica	Referencia.
Antigenotóxicos y antimutagénicos	Grover y Bala, 1993, Bartolomé <i>et al.</i> , 2006
Antioxidante	Quian <i>et al.</i> , 2004
Antitusivo	Jaiarj <i>et al.</i> , 1999
Cardiovasculares	Ojewole, 2005
Hepatoprotectivo	Roy <i>et al.</i> , 2006
Anti hiperglicémico	Cheng y Yang, 1983 Mukhtar <i>et al.</i> , 2004, Hsieh <i>et al.</i> , 2007

2.2.4 Efectos en la placa dental:

La adhesión de colonizadores tempranos de la placa dental a la superficie del diente tiene un papel importante en la iniciación del desarrollo de la placa dental. Las propiedades hidrofóbicas de la pared celular de la bacteria son indirectamente responsables de la adhesión de la bacteria a la película adquirida en la superficie dental. El tratamiento de los colonizadores tempranos con 1 mg/mL de un extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* reducen la hidrofobicidad de la superficie celular de *Staphylococcus sanguis*, y *Actinomyces sp.* por 54.1%, y 40.6% respectivamente (Razak *et al.*, 2006).

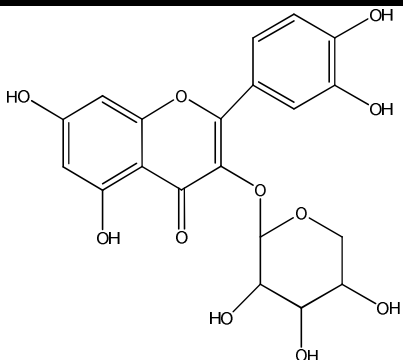
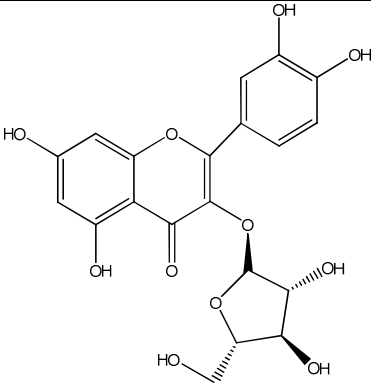
Estos resultados proveen alguna razón científica para utilizarlos en el tratamiento de enfermedades dentales y sugieren que el extracto de las hojas de guayaba puede inhibir la caries inducida por *Streptococcus*, por lo tanto pueden ser benéficos para el cuidado dental.

Uno de los factores fisiológicos de la generación de caries por *Streptococcus mutans* es la habilidad de generar ácidos y de funcionar a pH bajo. La guaijaverina ha demostrado reducir la producción de ácidos generados por *S. mutans* inhibiendo la enzima relacionada con los sistemas glicolizadores de *S. mutans* previniendo la degradación de la sacarosa e inhibiendo la glicólisis. La guaijaverina también ha disminuido la hidrofobicidad de *S. mutans* probablemente uniéndose a proteínas de la superficie celular.

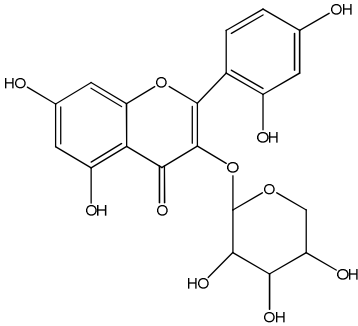
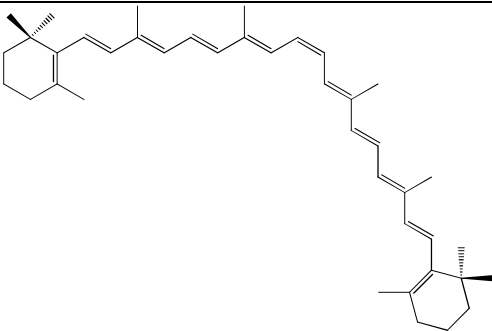
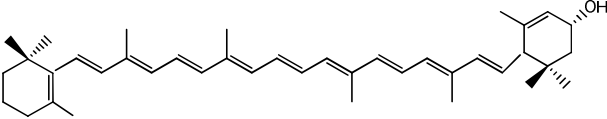
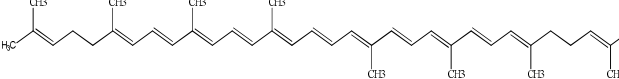
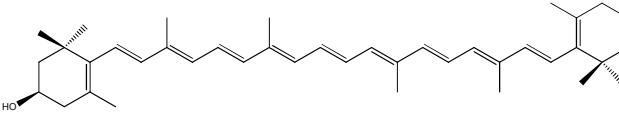
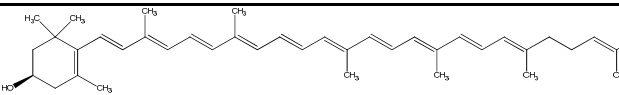
Se sabe que los flavonoides poseen actividad inhibidora de las glucosiltransferasas, estas enzimas son las responsables de la producción de glucanos que promueven la adherencia firme de *S. mutans* a la superficie dental. (Prabu *et al.*, 2006)

Se han identificado fitoconstituyentes importantes con aplicación medicinal. Los metabolitos que han mostrado poseer actividades útiles pertenecen principalmente a flavonoides, carotenoides, terpenos y triterpenos.

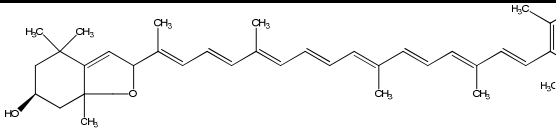
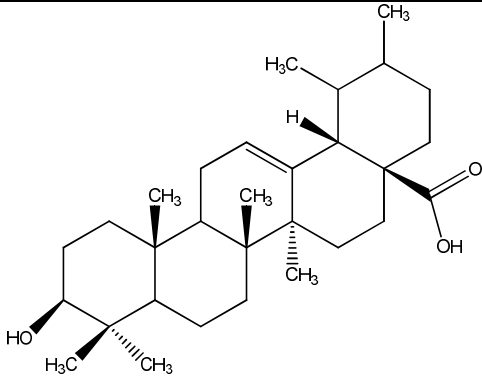
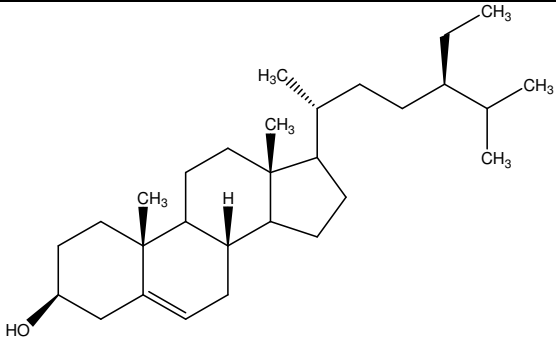
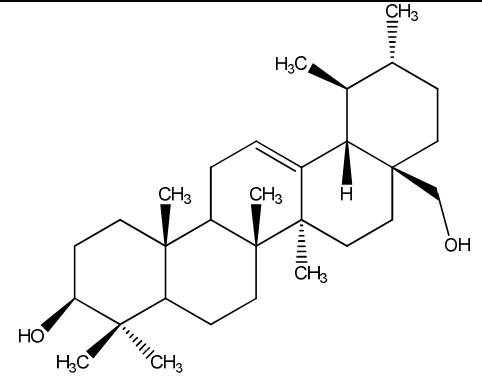
Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo.

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Guaijaverina		Hojas y Fruto	Prabu <i>et al.</i> , 2006
Avicularina		Hojas	Dweck, 2001

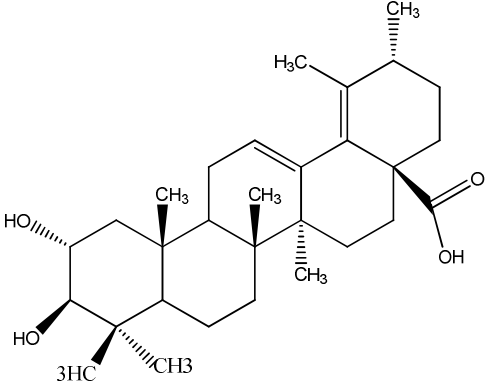
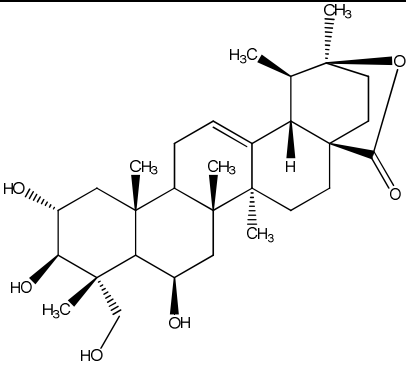
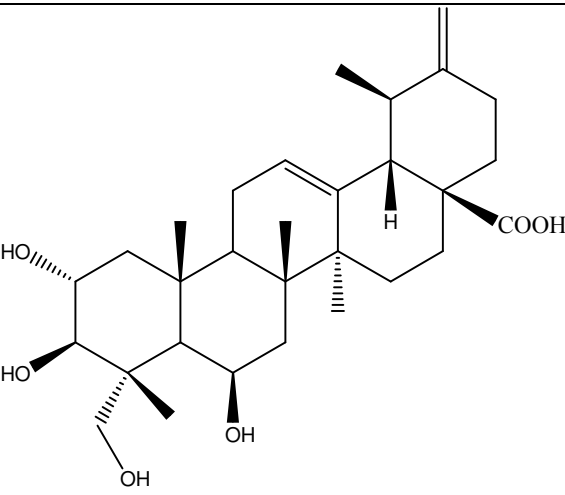
Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización	Referencia
Morin – 3 – O L-arabinopiranosida		Hojas y Fruto	Arima & Danno, 2002
β-caroteno		Hojas y fruto.	Mercadante <i>et al.</i> , 1999
Luteína		Hojas y fruto	Mercadante <i>et al.</i> , 1999
Licopeno		Hojas y fruto.	Mercadante <i>et al.</i> , 1999
β-criptoxantina		Hojas y fruto.	Mercadante <i>et al.</i> , 1999
Rubixantina		Hojas y fruto.	Mercadante <i>et al.</i> , 1999

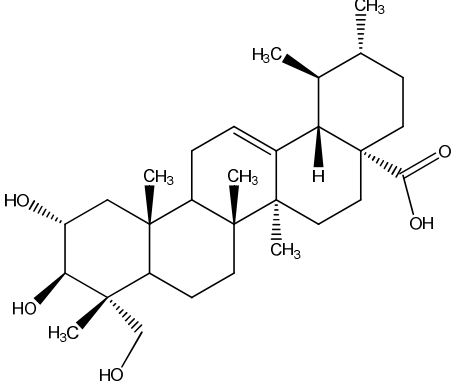
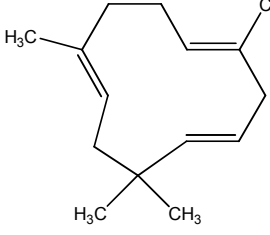
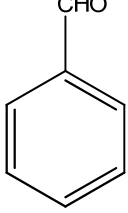
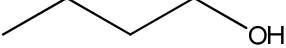
Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo
(continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Criptoflavina		Hojas y fruto.	Mercadante <i>et al.</i> , 1999
Ácido Ursólico		Hojas	Dweck, 2001
β-sitosterol:		Hojas	Dweck, 2001
Uvaol:		Hojas y fruto.	Pérez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2008

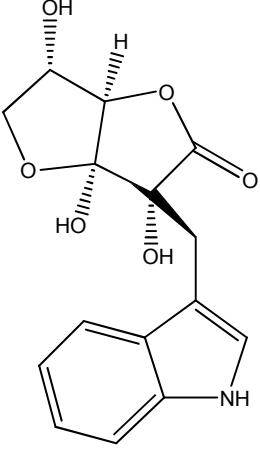
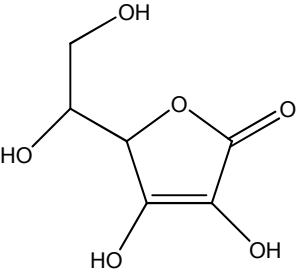
Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido Goreisico		Hojas y fruto.	Pérez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2008
Guajavólido		Hojas.	Begum <i>et al.</i> , 2004
Ácido guavenólico		Hojas.	Begum <i>et al.</i> , 2004

Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo
(continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido asiático		Hojas y fruto.	Begum <i>et al.</i> , 2004
Humuleno		Hojas	Dweck, 2001
Benzaldehído		Fruto	Jordan <i>et al.</i> , 2003
1-Butanol		Fruto	Jordan <i>et al.</i> , 2003

Cuadro 3. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo
(continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ascorbigeno		Fruto y hojas.	Radha, 1996
Ácido ascórbico		Fruto	Dweck, 2001

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades de la cavidad oral como la caries dental, la periodontitis (enfermedad gingival), los cánceres de la boca y faringe representan un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y cada vez con mayor frecuencia a los países en desarrollo en especial entre las comunidades más pobres, sin embargo estas enfermedades han sido poco atendidas.

En el mercado existen métodos químicos y mecánicos que se utilizan para controlar la placa dento-bacteriana (biopelícula), sin embargo, la búsqueda de agentes eficientes para eliminar la placa continúa. Los productos naturales se han utilizado en medicina tradicional y representan una alternativa a la búsqueda de sustancias químicas novedosas para la prevención de la placa dentobacteriana y de las caries.

Las hojas de *Psidium guajava* (guayaba) son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por las bacterias patógenas de la cavidad oral. Por lo mencionado anteriormente el objetivo primordial de esta investigación es evaluar el efecto del aceite esencial, los extractos y compuestos puros identificados y aislados de las hojas del guayabo sobre las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

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

1. Aislar los compuestos bioactivos de las hojas de la especie *Psidium guajava* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos. La actividad antimicrobiana de los compuestos puros se evaluará utilizando el método de microdilución en placa utilizando como especies de prueba *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.
3. Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM. Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítico o preparativo se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio y/o de vidrio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck ®, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas fueron reveladas con sulfato cérico/H₂SO₄ seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa.

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizó en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un aparato Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN - ¹³C) se generaron en un equipo marca Varian, modelo VNMRS el cual se operó en radiofrecuencias de 400 y 100 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron utilizando CDCl₃, CD₃OD y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

4.2 Material vegetal

Las hojas de *Psidium guajava* se obtuvieron de una plantación de guayaba en el pueblo de Amatlán, Municipio de Tepoztlán, en el Estado de Morelos. El material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología.

4.3 Estudio fitoquímico de *Psidium guajava*

4.3.1 Microextracción en Fase sólida

La microextracción en fase sólida se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación USAI bajo la supervisión de la M. en C. Georgina Duarte Lisci. El primer paso para realizar este procedimiento fue insertar la fibra (Supelco fase adsorbente 50/30 μm DVB/ Carboxen/ PDMS) en el inyector del cromatógrafo (CG-EM) para eliminar los contaminantes que pudieran interferir con el análisis.

Cuadro 4. Características del cromatógrafo de gases utilizado.

Cromatógrafo de gases	
Marca	Agilent
Modelo	6890N
Columna capilar	
Fase:	DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón)
Dimensiones	
Longitud	30 m
D.I.	0.25 mm
Espesor de película	0.18 μm
Inserto	Injection Sleeve, 0.77 mm
Septo	Supelco (Thermogreen TM LB-2) 11 mm.

Cuadro 5. Características del espectrómetro de masas utilizado.

Espectrómetro de masas	
Marca	LECO
Modelo	Pegasus 4D
Analizador másico	TOF (Tiempo de vuelo)

Las impurezas de la fibra se eliminan en el cromatógrafo durante 30 minutos y posteriormente se obtiene el espectro de masas (blanco) para asegurar que la fibra se encuentre libre de impurezas.

Una vez realizado el blanco se procedió a realizar la microextracción de las muestras, para lo cual se colocaron dos viales sobre una parilla de calentamiento con agitación constante, los viales contenían 10 mg de cloruro de sodio y 4 mL de agua. Uno de los viales contenía una muestra de hojas previamente fragmentadas y el segundo únicamente agua y un termómetro para monitorear la temperatura.

Cuando se alcanzó la temperatura de 50°C se insertó la aguja que contiene la fibra en el septo del tapón del vial y ya que se encontraba adentro, se deslizó para exponer la fibra recubierta de la fase estacionaria, la cual adsorbe los compuestos volátiles durante el tiempo estipulado. Posteriormente la fibra se insertó en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas y se calentó la fibra para volatilizar los componentes. Los componentes se separaron utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N y los picos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas LECO Pegasus 4D TOF. Las condiciones para cada uno de los análisis se muestran en los cuadros 6, 7 y 8.

Cuadro 6. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco.

Condiciones cromatográficas	
Temperatura del inyector.	300 °C
Temperatura inicial de la columna.	150 °C durante 0.2 min
Tasa de aumento de temperatura:	50 °C/min
Temperatura final	300 °C durante 5 min
Detector	Detector de ionizador de flama
Gas acarreador:	Helio
Modo	Splitless
Barrido de masas	50 – 500 uma

Cuadro 7. Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida.

Muestra	Cantidad (g)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo
Hojas de Guayabo	0.9228 g	50 -65 °C	360	1 hora

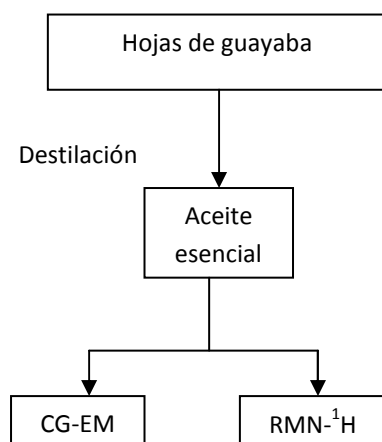
Cuadro 8. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución las muestras.

Condiciones cromatográficas:	
Temperatura del inyector:	300 °C
Temperatura inicial de la columna:	50 °C
Tasa de aumento de temperatura:	20 °C/ min
Temperatura final:	300 °C durante 5 min
Detector :	Detector de ionizador de flama
Gas acarreador:	Helio
Modo:	Splitless
Barrido de masas:	50 – 500 uma

4.3.2 Obtención del aceite esencial.

Se utilizó la técnica de hidrodestilación: a 291 g de hojas de guayaba se le agregaron 2 L de agua y se sometieron a una destilación durante 6 horas, se obtuvieron 230 mg de aceite esencial.

Los constituyentes presentes en el aceite esencial se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Cada espectro de masas resultante se comparó con la biblioteca del instrumento y con la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology a través de la página <http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Diagrama 1. Obtención del aceite esencial de las hojas del guayabo.

4.3.3 Preparación de la infusión de las hojas de *Psidium guajava*.

Se utilizaron 549 g de hojas secas del guayabo para realizar una infusión con 12 L de agua durante 2 horas. El agua recuperada de la infusión se sometió a un proceso de partición con acetato de etilo– butanol (1:1). Después de filtrar, se evaporó a presión reducida el disolvente de los extractos anteriormente mencionados obteniéndose las cantidades mostradas en el cuadro 9.

Cuadro 9. Cantidades obtenidas de los extractos realizados.

Nombre:	Cantidad obtenida
Destilación hojas de guayaba	5.1324 g
Infusión hojas de guayaba	7.1 g

4.3.3.1 Fraccionamiento primario del extracto.

El producto de la infusión de las hojas del guayabo se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en una columna de Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil etanol. Este proceso generó 27 fracciones de 50 mL, las cuales fueron reunidas en base a su similitud cromatográfica, obteniéndose así 10 conjuntos de fracciones (F1-F10, diagrama 3).

4.3.3.2 Fraccionamiento secundario del extracto.

La fracción F2 fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta de Sephadex LH-20, se utilizó MeOH como fase móvil y se obtuvieron 11 fracciones de 50 mL las cuales se reunieron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose así 3 conjuntos de fracciones (A, B y C).

4.3.3.3 Fraccionamiento terciario del extracto.

La fracción B se eluyó en una columna de gel de sílice C18 utilizando como fase móvil metanol, se obtuvieron 8 fracciones de 50 mL que siguiendo el mismo criterio de similitud cromatográfica, se juntaron en 3 fracciones (B1- B3).

4.3.3.4 Fraccionamiento cuaternario del extracto.

La segunda fracción (B2) se eluyó en una columna de gel de sílice C 18, se obtuvieron 15 fracciones y la polaridad de la fase móvil se modificó como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Fraccionamiento cuaternario por cromatografía en columna abierta de la fracción B2.

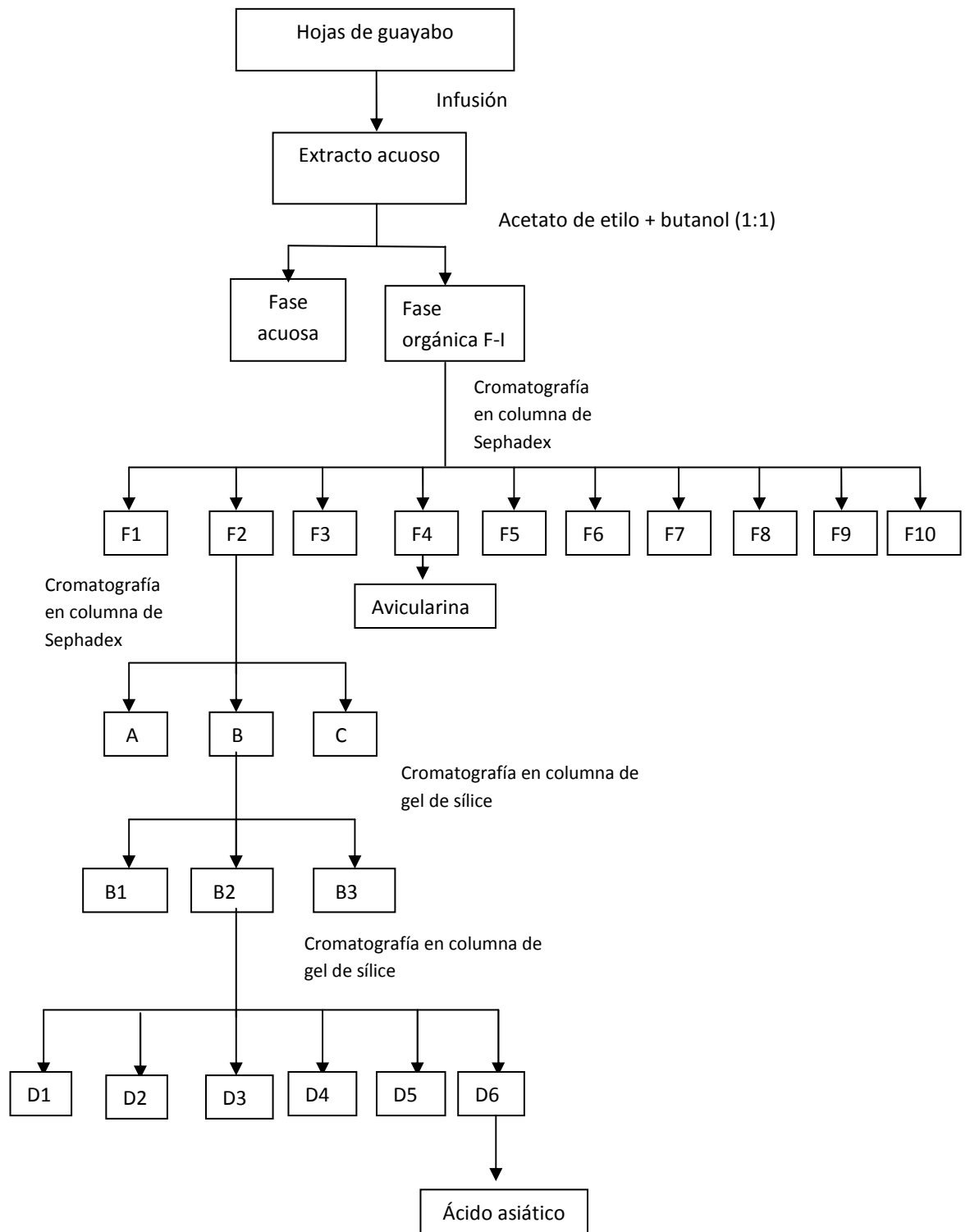
Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
CH ₂ -Cl ₂ - MeOH	95-5	4	1-4	D1
CH ₂ -Cl ₂ - MeOH	90-10	11	5-9,10,11,12- 13,14-15	D2-D6

4.3.3.5 Obtención de avicularina a partir de la fracción activa F4

En la fracción F4 se observó la formación de un precipitado amarillo que se separó mediante filtración al vacío. El sólido fue identificado como avicularina por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura (Pistelli *et al.*, 1999; Olszewska, 2005; Wei *et al.*, 2008). **Avicularina (1)**: ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.53 (1H, d, $J= 2.4\text{ Hz}$, H-2'), 7.50 (1H, dd, $J= 8.4, 2.4\text{ Hz}$, H-6'), 7.00 (1H, d, $J=8.4\text{ Hz}$, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-6), 6.20 (1H, d, $J=2\text{ Hz}$, H-8), 5.50 (1H, sa, H-1''), 3.49-4.34 (5H, m, pentosa) (Figura 3 A). RMN ^{13}C (100 MHz): δ 178.6 (C-4), 164.6 (C-7), 161.6 (C-5), 157.9 (C-9), 157.1 (C-2), 148.4 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.5 (C-3), 121.7 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-2'), 108.1 (C-1''), 104.2 (C-10), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8), 86.6(C-4''), 81.9 (C-2''), 77.3 (C-3''), 61.1 (C-5'') (Figura 3 B).

4.3.3.6 Obtención del ácido asiático a partir de la fracción activa D6

En la fracción D6 se observó la formación de un precipitado blanco que fue separado mediante filtración al vacío. El sólido fue identificado como ácido asiático por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura. (Rahandraha, 1963 y Mahato, 1994). **Ácido Asiático (2)**: ^1H RMN (400 MHz, Piridina- d_6) δ 5.47 (1H, d, $J= 6.0\text{ Hz}$, H-12), 3.72 (1H, d, $J= 10.0\text{ Hz}$, H_b-23), 3.62 (1H, t, $J= 10.2\text{ Hz}$, H_a-23), 1.72 (3H, s, CH₃-27), 1.27 (3H, s, CH₃-25), 1.09 (3H, d, $J= 5.4\text{ Hz}$, CH₃-30), 1.07 (3H, d, $J= 8.7\text{ Hz}$, CH₃-29), 1.05 (3H, s, CH₃-24), 0.96 (3H, s, CH₃-26), ^{13}C RMN (100 MHz, Piridina- d_6) δ 178.1 (C-28), 143.0 (C-13), 118.0 (C-12), 78.2 (C-3), 69.3 (C-2), 66.5 (C-23), 5.12 (C-18), 49.4 (C-9), 49.1 (C-1), 48.3 (C-5), 43.8 (C-4), 42.4 (C-14), 41.4 (C-8), 39.5 (C-17), 38.6 (C-10), 38.5 (C-20), 37.9 (C-19), 34.4 (C-22), 33.7 (C-7), 30.2 (C-21), 29.7 (C-16), 28.0 (C-15), 23.8 (C-30), 22.4 (C-27), 22.3 (C-11), 18.6 (C-6), 18.5 (C-29), 16.6 (C-26), 15.2 (C-25), 14.3 (C-24).

Diagrama 2. Fraccionamiento de la infusión de hojas de guayabo.

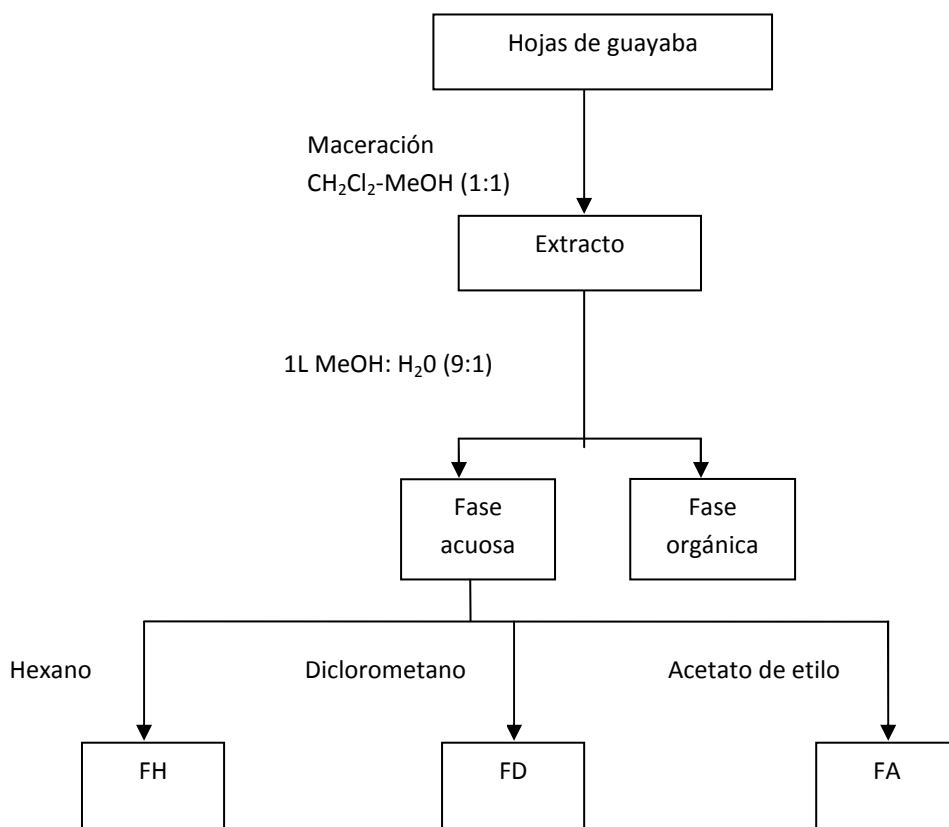
4.3.3.7 Preparación del extracto de *Psidium guajava*

Se realizó una extracción por maceración de las hojas del guayabo con diclorometano-metanol (1:1), al cual se le agregó 1L de MeOH: H₂O (90:10) y se realizó una partición con 4 porciones de hexano, cada una de 1.5 L otra con 3 porciones de 1.5 L de diclorometano y la última partición con 3 porciones de acetato de etilo cada una de 1 L. Las cantidades obtenidas se mencionan a continuación.

Cuadro 11. Cantidades obtenidas del fraccionamiento primario del extracto.

Nombre:	Cantidad obtenida
Extracción con CH₂-Cl₂-MeOH	225.8 g
Extracto con hexano	28.23g
Extracto con diclorometano	22.3 g
Extracto con acetato de etilo.	13.3 g

Diagrama 3. Fraccionamiento primario del extracto con diclorometano:metanol de las hojas de *Psidium guajava*.



4.4 ENSAYO BIOLÓGICO

4.4.1 Microorganismo de Prueba

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de las hojas de *Psidium guajava* se eligieron como microorganismos de prueba *Streptococcus mutans* (ATCC 700611) por ser patógeno oral causante de caries dental y *Phorphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por ser el agente etiológico de la gingivitis. Para su cultivo se utilizaron los medios de caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) y soya tripticaseína adicionado con cisteína, respectivamente.

4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad antimicrobiana de los compuestos (expresada como concentración mínima inhibitoria, CMI) se determinó utilizando un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos. 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 0.05M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. Cada pozo contenía 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans* y 5×10^6 UFC/mL de *P. gingivalis*, 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 a 37 °C bajo condiciones atmosféricas adecuadas. El microorganismo *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660} nm) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas y *P. gingivalis* se incubó en condiciones anaerobias utilizando un equipo de anaerobiosis BD y para generar el ambiente anaeróbico un sobre Gas Pack.

El valor de CMI para cada microorganismo analizado se definió como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 A_{660} nm, se utilizó gluconato de clorhexidina (CHX) como control

positivo mostrando valores de CMI de 3.7 y 1.2 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La selección de la especie *Psidium guajava* (guayaba) se realizó con base en el amplio uso de ésta en la medicina tradicional. Como se describe en la sección de antecedentes, uno de los usos tradicionales de la especie *P. guajava* 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 las hojas de *P. guajava* inhibe el crecimiento de las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*, agentes etiológicos de las caries y de las infecciones periodontales, respectivamente.

5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la infusión de hojas del guayabo sobre *S. mutans*

La determinación del potencial antibacteriano del extracto de las hojas de *P. guajava*, se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos, siguiendo la metodología descrita en la literatura (Rivero *et al.*, 2008). Los resultados de esta evaluación indicaron que la infusión preparada a partir de las hojas de *P. guajava* presentaban una concentración mínima inhibitoria de 720.4 y de 360.2 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente (Cuadro 12). Se considera que un extracto vegetal es activo para *S. mutans* y *P. gingivalis* si la CMI es menor a 1000 µg/mL (Rivero *et al.*, 1998).

Cuadro 12. Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

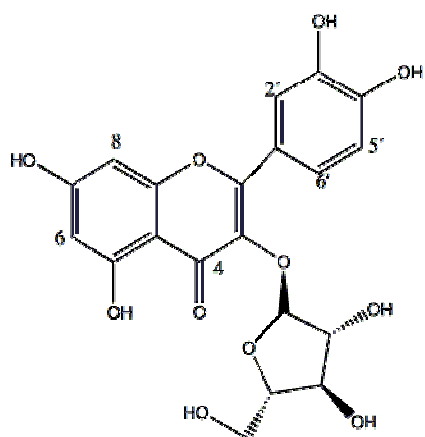
Muestra	CMI (µg/mL) ^a	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Infusión acuosa.	720.4	360.2
Acetato de etilo + butanol (1:1)	360.2	180.1
CHX ^b	3.7	1.2

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

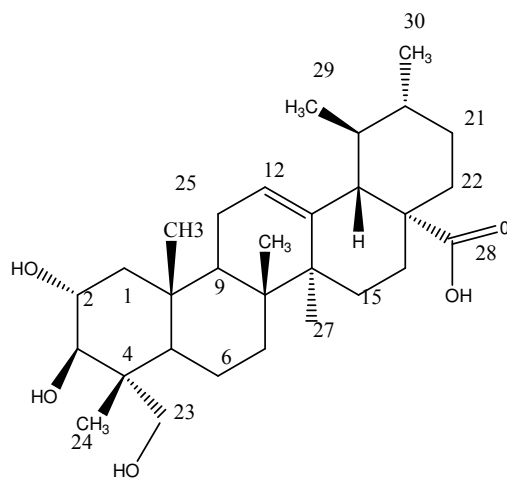
^b CHX: gluconato de clorhexidina.

Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido del extracto de las hojas de *P. guajava* con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada para la infusión acuosa de las hojas de guayaba (Cuadro 9). Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad biológica del extracto original.

La preparación del extracto activo en mediana escala se realizó utilizando agua caliente como disolvente, tal como se indicó en la Parte Experimental (4.3.3). Posteriormente, la infusión resultante se sometió a un fraccionamiento por partición utilizando una mezcla de acetato de etilo-butanol (1:1). Del residuo orgánico del fraccionamiento primario se obtuvo la fracción activa F-I (CMI= 360.2 y 180.1 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), la cual fue sometida a sucesivas recromatografías. Este proceso permitió aislar y determinar la estructura química del flavonoide avicularina (**1**) y del triterpenoide ácido asiático (**2**) como compuestos activos (Figura 2). El compuesto **1** fue caracterizado por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Pistelli *et al.*, 1999; Olszewska, 2005; Wei *et al.*, 2008). En la figura 3 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (A) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (B). Por otra parte, el ácido asiático fue caracterizado siguiendo una estrategia similar y se compararon las constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Rahandraha, 1963; Mahato, 1994). En la Figura 2 se muestran las estructuras de la avicularina (**1**) y del ácido asiático (**2**).



(1)



(2)

Figura 2. Compuestos aislados de la infusión de las hojas de *P. guajava*.

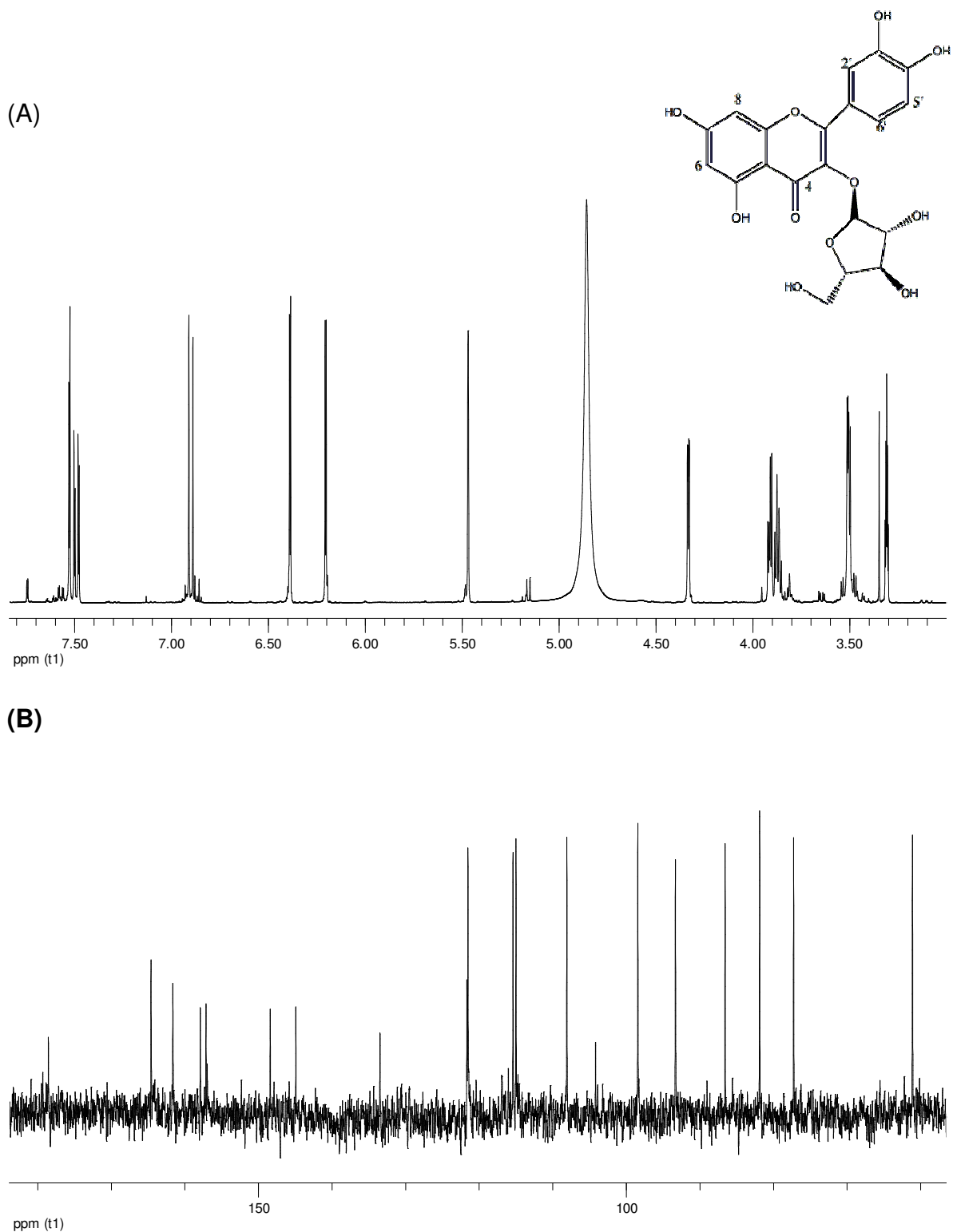


Figura 3. Espectros de resonancia magnética nuclear protónica (A) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (B) obtenidos para la avicularina (**1**).

Los resultados obtenidos de las evaluaciones de la avicularina aislada de la fracción activa F-4 (Cuadro 13) indican que sus concentraciones mínimas (CMI) son de 125.1 y 67.7 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Por otra parte las CMI's obtenidas para el ácido asiático fueron de 645 y 138 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Al comparar la actividad antibacteriana de la avicularina (1) y del ácido asiático (2) podemos apreciar que presentan una menor actividad contra *S. mutans* con CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ y 645 (Cuadro 13). Para el caso de *P. gingivalis* una CMI de 67.7 $\mu\text{g/ml}$ para avicularina y 138 para el ácido asiático (Cuadro 13). Sin embargo, es importante destacar que la actividad encontrada para el flavonoide avicularina puede considerarse como muy activo de acuerdo a las concentraciones mínimas inhibitorias que se reportan en la literatura para compuestos aislados de fuentes vegetales (Rivero *et al.*, 2008).

Cuadro 13. Actividad antimicrobiana (CMI) de la avicularina (1), ácido asiático (2) y del gluconato de clorhexidina (CHX) sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$) ^a	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
1	125.1	67.7
2	645	138
CHX ^b	3.7	1.2

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

^b CHX: gluconato de clorhexidina.

5.2 Evaluación del potencial antibacteriano del aceite esencial preparado a partir de las hojas de guayabo

El aceite esencial de las hojas del guayabo se ensayó para determinar su potencial antibacteriano contra bacterias patógenas de la cavidad oral (*S. mutans* y *P. gingivalis*). El efecto antibacteriano se estableció utilizando la metodología descrita previamente (Sección 4.4). Los resultados de esta determinación indicaron que el aceite esencial de las hojas del guayabo presenta CMI's de 650 µg/mL y 325 µg/mL para las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. El efecto obtenido por el aceite esencial es menor al obtenido para el control positivo clorhexidina.

5.3 Identificación de los componentes del aceite esencial de las hojas del guayabo

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó en primera instancia mediante un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y NIST (National Institute of Standards and Technology).

El cromatograma de gases indicó la presencia de 83 compuestos de los cuales se logró la identificación de los 24 componentes mayoritarios en la esencia (Cuadro 14), los cuales representan el 68% de los constituyentes presentes en el aceite esencial.

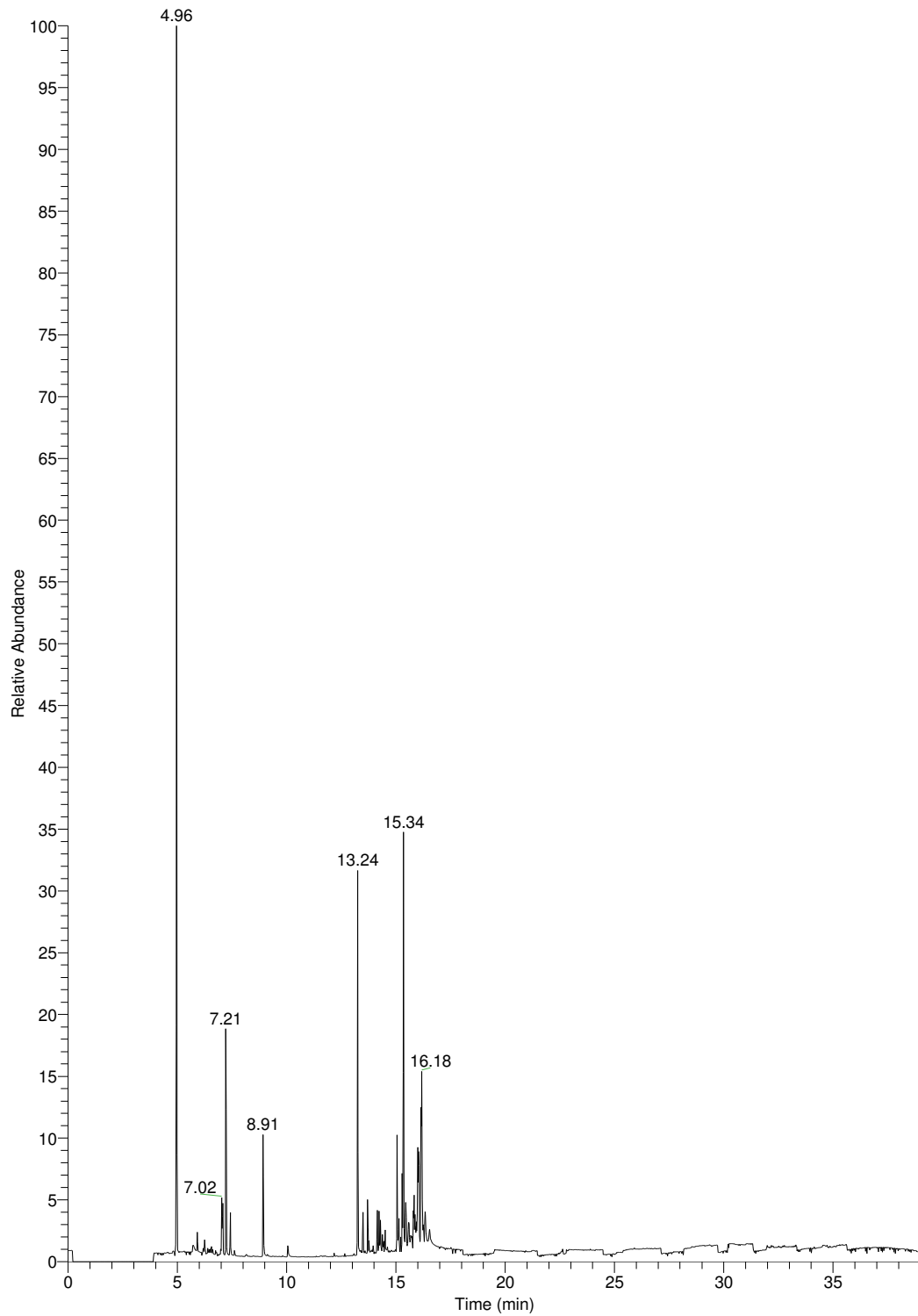


Figura 4. Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de las hojas del guayabo.

Cuadro 14. Compuestos encontrados en el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava*.

Nombre	Peso molecular	Área %	T.R. (s)	Fórmula
α -pineno	136	1.8659	101.916	C ₁₀ H ₁₆
α -mirceno	136	1.6604	103.416	C ₁₀ H ₁₆
Carveol	152	3.2029	113.716	C ₁₀ H ₁₆ O
D-limoneno	136	7.9738	114.916	C ₁₀ H ₁₆
Eucaliptol	154	2.1609	116.416	C ₁₀ H ₁₈ O
3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	136	0.763	117.316	C ₁₀ H ₁₆
3-metil-1-hexin-3-ol	112	0.763	117.616	C ₇ H ₁₂ O
5,7-dimetil-(<i>R</i>)-1,6-octadieno	138	1.869	124.116	C ₁₀ H ₁₈
Acetofenona	120	1.869	124.416	C ₈ H ₈ O
6-metil-3,5-heptadienal-2-etilideno	150	2.0523	128.616	C ₁₀ H ₁₄ O
5,7-dimetil-(<i>R</i>)-1,6-octadieno	138	0.9971	129.516	C ₁₀ H ₁₈
<i>cis</i> - Óxido de limoneno	152	3.8294	131.916	C ₁₀ H ₁₆ O
2,7,7-trimetil-3-oxatriciclo[4.1.1.0 (2,4)]octano	152	3.761	132.216	C ₁₀ H ₁₆ O
1-metil-1H-pirazol	82	2.5332	134.516	C ₄ H ₆ N ₂
[(1-etinilciclohexil)oxi]metoxi-metano	168	0.7559	135.216	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
1,3,5,5-tetrametil-1,3-ciclohexadieno	136	1.3208	137.016	C ₁₀ H ₁₆
7 α -metil-3-metilen hexahidrobenzofuran-2-ona	166	1.35	147.316	C ₁₀ H ₁₄ O ₂
4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol	154	0.8838	151.316	C ₁₀ H ₁₈ O
4,6,6-trimetil-, (1S)-biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona	150	0.9027	158.716	C ₁₀ H ₁₄ O

Cuadro 14. Compuestos encontrados en el aceite esencial de las hojas de *Psidium guajava* (continuación).

Nombre	Peso molecular	Área %	T.R. (s)	Fórmula
<i>E,E</i> -2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	152	2.006	172.016	C ₁₀ H ₁₆ O
3-decen-5-ona	154	2.1237	172.216	C ₁₀ H ₁₈ O
7,7-dicloro-biciclo[4.1.0]hept-3-eno,	162	1.3549	178.916	C ₇ H ₈ Cl ₂
Geranil vinil éter	180	1.3921	192.416	C ₁₂ H ₂₀ O
Copaeno	204	1.3921	192.716	C ₁₅ H ₂₄
Aristoleno	204	0.9349	202.816	C ₁₅ H ₂₄
Cariofileno	204	2.5415	204.616	C ₁₅ H ₂₄
2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-Indeno	122	1.5518	210.116	C ₉ H ₁₄
1,5,9,9-tetrametil-Z,Z,Z-1,4,7,-cicoundecatrieno	204	2.0426	210.716	C ₁₅ H ₂₄
Decahidro-1,1,7-trimetil-4-metilen-1H-cicloprop[e] azuleno	204	3.7395	217.116	C ₁₅ H ₂₄
3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	136	3.7395	217.416	C ₁₀ H ₁₆
1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-(1 <i>S-cis</i>)-naftaleno	204	0.9178	221.416	C ₁₅ H ₂₄
(-)-globulol	222	0.9448	241.616	C ₁₅ H ₂₆ O
α -cadinol	222	1.9585	252.816	C ₁₅ H ₂₆ O
Benzoato de bencilo	212	0.9003	268.716	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Total		68.0541		

5.4 Resultados obtenidos de la microextracción en fase sólida (SPME) realizada en las hojas del guayabo

Para realizar la identificación de los compuestos presentes en las hojas del guayabo utilizando la técnica de microextracción en fase sólida se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un espectrómetro de masas (EM). Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y NIST (National Institute of Standards and Technology).

El cromatograma de gases indicó la presencia de 175 componentes de los cuales se logró la identificación de 20 componentes mayoritarios (Cuadro 15), los cuales representan el 46% de los constituyentes presentes.

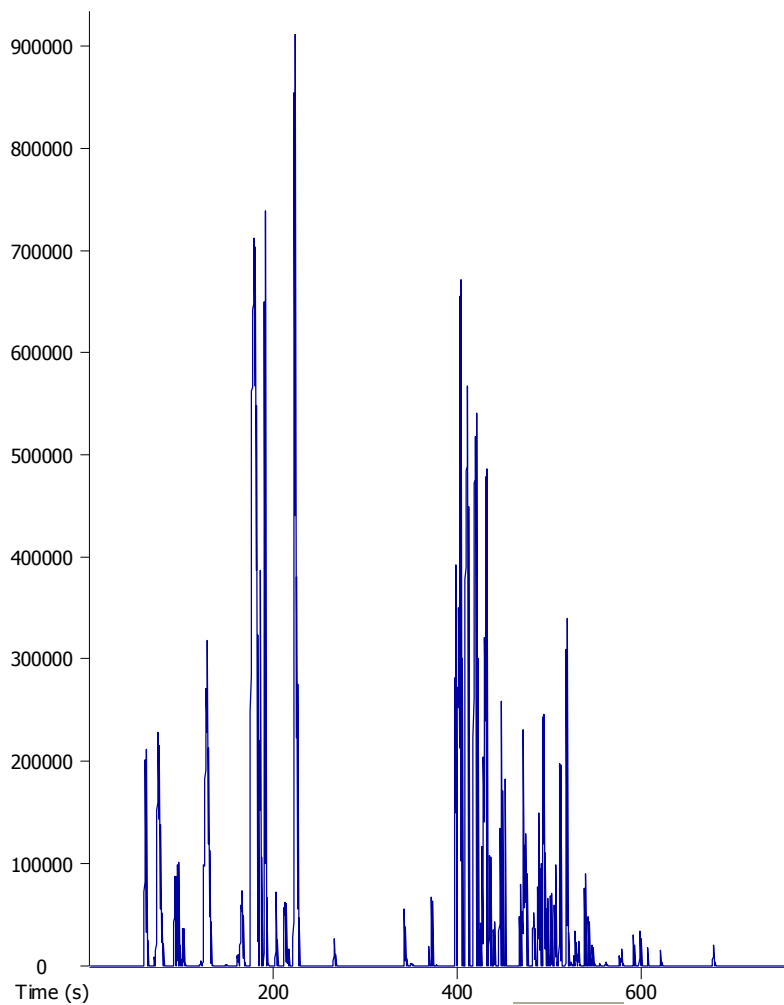


Figura 5. Cromatograma de gases de las hojas de *Psidium guajava* obtenido utilizando la técnica de SPME.

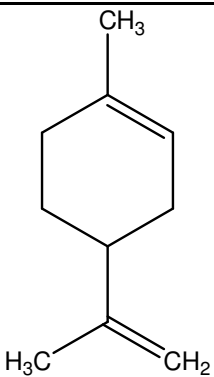
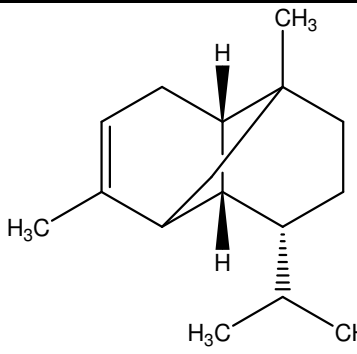
Cuadro 15. Compuestos encontrados en las hojas del guayabo utilizando SPME.

Nombre	T.R. (s)	Área %	Fórmula
Acetato de butilo	74.79	2.2611	C ₆ H ₁₂ O ₂
2-hexenal	93.69	2.6324	C ₆ H ₁₀ O
3-hexen-1-ol	95.89	2.4447	C ₆ H ₁₂ O
3-metil-2-pentanol	101.9	1.4259	C ₆ H ₁₄ O
Benzaldehído	149.2	3.8476	C ₇ H ₆ O
Catinona	161	2.2785	C ₉ H ₁₁ NO
(metoximetil)-benceno	164	2.0558	C ₈ H ₁₀ O
2,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	164.4	1.4037	C ₁₀ H ₁₆
D-limoneno	179.3	5.6633	C ₁₀ H ₁₆
Eucaliptol	180.5	1.9522	C ₁₀ H ₁₈ O
5-metil-3-(1-metiletilideno)- 1,4-hexadieno	224.2	2.9691	C ₁₀ H ₁₆
Cariofileno	351	1.2208	C ₁₅ H ₂₄
1-metil-4-(5-metil-1-metilen-4-hexenil)-, (S)- cilohexeno	398.9	1.9185	C ₁₅ H ₂₄
2,3,3 α ,4,5,6,7,7 α -octahidro-1H-ciclopenta[a]pentalen-7-ol	409.3	1.4078	C ₁₁ H ₁₆ O
α -calacoreno	410.6	2.8743	C ₁₅ H ₂₀
3,7,11-trimetil-, (E)-1,6,10-dodecatrien-3-ol	410.9	3.5552	C ₁₅ H ₂₆ O
Óxido de cariofileno	419.2	1.9276	C ₁₅ H ₂₄ O
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-3-ciclohexen-1-ol	448.6	1.8176	C ₁₅ H ₂₆ O
Epóxido isoaromadendreno	450.1	0.9494	C ₁₅ H ₂₄ O
Cis lanceol	452.7	1.3095	C ₁₅ H ₂₄ O
Total		45.885	

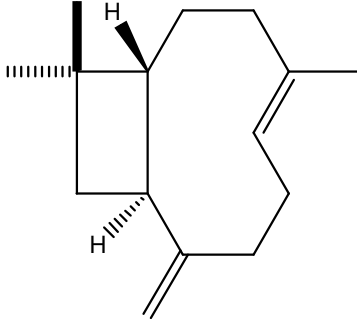
5.5 Evaluación del potencial antibacteriano de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas del guayabo

El potencial antibacteriano de los compuestos D-limoneno (**3**), copaeno (**4**), β -cariofileno (**5**) presentes en el aceite esencial del guayabo se determinaron utilizando la metodología descrita para el aceite esencial. En general, todos los productos presentan un efecto antibacteriano moderado. En el Cuadro 16 se resume la actividad antibacteriana encontrada para el aceite esencial de las hojas del guayabo y los compuestos **3**, **4**, y **5** obtenidos a partir de fuentes comerciales.

Cuadro 16. Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas del guayabo.

Nombre	Estructura	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
D-Limoneno		256	128
Copaeno		350	512

Cuadro 16. Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas del guayabo (Continuación).

Nombre	Estructura	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
β-cariofileno		620	128

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Esta investigación representa una contribución al conocimiento de la especie *P. guajava*, planta medicinal utilizada ampliamente en las prácticas médicas tradicionales del centro y sur de México.

Así, el estudio químico biodirigido del extracto preparado a partir de las hojas de *Psidium guajava* permitió el aislamiento y caracterización del flavonoide avicularina (**1**) y el triterpeno ácido asiático (**2**).

La avicularina presentó una buena actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* con concentraciones mínimas inhibitorias de 125.1 y 67.7 µg/mL respectivamente; este flavonoide ha demostrado actividad antioxidante *in vitro* (Xiangjiu *et al.*, 2008), antiinflamatoria (Demirezer *et al.*, 2006) y antimicrobiana (El Khaden *et al.*, 1958). La presencia de la avicularina puede justificar en parte el uso de las hojas para el tratamiento de diversas infecciones.

El ácido asiático presentó una actividad biológica moderada con CMI de 640 y 125 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Este triterpeno pentacíclico ha sido aislado previamente de especies del género *Terminalia* (Combretaceae) (Collins *et al.*, 1992), *Actinidia polygama* (Siebold & Zucc.) Maxim. (Actinidaceae) (Sashida *et al.*, 1992) y *Shefflera octophylla* (Lour.) Harms (Araliaceae) (Sung *et al.*, 1992). Este triterpeno ha demostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotectiva. (Kuifen *et al.*, 2008, Byeong-Seon *et al.*, 2006).

Si bien la clorhexidina presenta una CMI considerablemente menor a la de los productos naturales aislados en esta investigación, 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 (Quirynten *et al.*, 2000).

El análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) del aceite esencial obtenido a partir de las hojas del guayabo

permitió determinar como componentes mayoritarios al D-limoneno (**3**), copaeno (**4**), β -cariofileno (**5**). Estos últimos presentaron una actividad antibacteriana moderada contra *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Por último, la microextracción en fase sólida (SPME) representa una alternativa a la preparación de los aceites esenciales a partir de materiales vegetales. Este proceso tiene como principales ventajas que integra el muestreo, la extracción, la concentración y la introducción de la muestra sin utilizar disolventes que puedan contaminar las muestras. Es importante destacar que los analitos en la muestra son extraídos directamente y concentrados en la fibra de extracción lo cual permite incrementar los límites de detección de las sustancias volátiles.

7. PERSPECTIVAS.

Continuar con el aislamiento de los componentes minoritarios presentes en las fracciones activas obtenidas a partir de la infusión y extractos orgánicos de las hojas del guayabo.

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos presentes en la infusión y en el aceite esencial de las hojas del guayabo.

Determinar el efecto de los compuestos puros presentes en la infusión y en el aceite esencial de las hojas del guayabo sobre la agregación y la formación de la placa dentobacteriana.

8. BIBLIOGRAFÍA

Argueta, A.V., Cano, L. M. y Rodarte, M. E. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo II, México Instituto Nacional Indigenista, pp 709-711.

Arima, H., y Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Biosci, Biotechnol. Biochem*, **66**, 1727-1730.

Alviano, W. S., Mendoca-Filho, R. R., y Alviano, D. S., *et al.* (2005). Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **20**, 101-105.

Bartolome, A., Mandap, K., David, K. J., Sevilla, F., y Villanueva, . (2006). SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 2114-2120.

Begum, S., Hassan, S., y Siddiqui, B. (2002). Two new triterpenoids from the fresh leaves of *Psidium guajava*. *Letter Planta Med*, **68**, 1149-1152.

Bozcuk - Erdem, G., y Ölmez, S. (2004). Inhibitory effect of *Bursa propolis* on dental caries formation in rats inoculated with *Streptococcus sobrinus*, *Turk J Zool*. **28**, 29-36.

Byeong-Seon, J., Mi Kyeong, L., Young Choong, K., Eung-Seok, L., (2007). Modification of C2 functional group on asiatic acid and the evaluation of hepatoprotective effects. *Arch Pharm Res*, **30**, 282-289.

Castillo García, E., Martínez Solis, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. España. Elsevier Masson.

Chah, K., Eze, A., Emuelosi, C., y Esimone, C. (2005). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **104**, 164-167.

Cheng, J.T., y Yang, R. S. (1983). Hypoglycemic effect of guava juice in mice and human subjects. *American Journal of Chinese Medicine*, **11**, 74-76.

Collins, D. J., Pilotti, C. A., y Wallis, A. F. A.: (1992). Triterpene acids from some Papua New Guinea Terminalia species. *Phytochemistry*, **31**, 881-884.

Coutiño, R. R., Hernández, C.P., y Giles, R. H. (2001). Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* O157:H7. *Archives of Medical Research*, **32**, 251-257.

Demirezer, L. O., Kuruüzüm-Uz, A., Guvenlap, Z., y Süleyman, H. (2006). Bioguided Fractionation of polygonum alpinum and isolation and structure elucidation of active compounds, *Pharmaceutical Biology*, **44**, 462-466.

Dweck, A. C., 2001. A review of *Psidium guajava*. *Malayan Journal of Medical Science*, **8**, 27-30

El Khaden, H., Mohammed, Y. S., (1958). Constituents of the leaves of *Psidium guajava*. II. Quercetin, avicularin, and guaijaverin. *Journal of the chemical Society*.

Goncalves, J. L., Lopes, R. C., Oliviera, D. B., Costa, S. S., Miranda, M. M., Romanos, M. T., Santos, N. S., y Wigg, M. D. (2005). In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**, 403-407.

Grover, I. S., y Bala, S., (1993). Studies on antimutagenic effect of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, **300**, 1-3.

Harrison, J. J., Turner, R. J., Marques, L. R., y Ceri, H. (2006). Biopelículas. *Investigación y Ciencia* 76-83.

Heinrich, M. (1998). Plants as antidiarrhoeals in medicine and diet. En: Proceedings from a Joint Meeting of the Society for Economic Botany and the International Society London, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, July 1-6, 1996, pp. 17-30.

Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., y Sticher, O. (1998). Medicinal Plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance. *Soc. Sci. Med*, **47**, 1859-1871.

Herrera, M. (2004). El papel del Biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *NOVA*, **2**, 71-80.

Hsieh, C. L., Yang, M. H., Chyau, C. C., Chiu, C. H., Wang, H. E., Lin, Y. C., Chiu, W. T., y Peng, R. Y., (2007). Kinetic analysis on the sensitivity of glucose or glyoxal- induced LDL glycation to the inhibitory effect of *Psidium guajava* extract in a physiomimic system. *Biosystems* **88**, 92-100.

Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, M. L., y Ruangsomboon, O. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract. *Journal of Ethopharmacology*, **67**, 203-212.

Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., y Singh R. (2003). Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and Enzymatic Changes. *Plant foods for Human Nutrition*, **58**, 309- 315.

Jain, S. C., Jain, R., y Singh, B. (2003). Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*, *Pharmaceutial Biology*, **41**, 231-233.

Jass, J., Surman, S., y Walker J. (2003). *Biofilms Detection, Prevention and Control*. Inglaterra: Willey.

Jordan, M. J., Margaría, C. A., Shaw, P.E., y Goodner, K.L., (2003). Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 1421-1426.

Kim, N. Desjardins, A. Wu, C. y Kinghorn, D. (1999). Activity of Triterpenoid glycosides from the root Bark of *Mussaenda macrophylla* against two oral pathogens. *J. Nat. Prod*, **62**, 1379-1384.

Koo, H., Gomes, B.P.F.A., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M.B., Park, K.Y., y Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of oral biology*, **45**, 141-148.

Kuifen, M., Yuyu, Z., Danyan, Z., y Yijia, L. (2009). Protective effects of asiatic acid against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in hepatocytes and kupffer cells co-cultured system via redox-regulated leukotriene C₄ synthase expression pathway. *European Journal of Pharmacology*. **603** 98-107

Li, J., Chen, F., y Luo, J. (1999). GC-MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Zhong Yao Cai* **22**, 78-80.

Lozoya, X., Reyes-Morales, H., Chávez-Soto, M., Martínez-García, M., Soto-González, y Doubova, S. (2001). Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *Journal of Ethnopharmacology*.

Lutterodt, G. D., y Maleque, A., 1988. Effects on mice locomotor activity of a narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **24**, 219-231.

Ma, K., Zhang, Y., Zhu, D., y Luo, Y. (2008). Protective effects of Asiatic acid against D-galactosamine/lipopolysaccharide- induced hepatotoxicity in hepatocytes and kupffer cells co-cultured system via redox-regulated leukotriene C4 synthase expression pathway. *European Journal of pharmacology*, **603**, 98-107.

Mahato, S. B., y Kundu, A. P. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- A compilation and some salient features. *Phytochemistry* **37**, 1517–1575.

Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México*. Ediciones botas. pp 154-156.

Mercadante, A. Z., Steck, A., y Pfander, H., (1999). Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and structure elucidation. *Journal of agricultural and Food Chemistry*.

Mukhtar, H.M., Ansari, S. H., Ali, M., Naved, T., y Bhat, Z. A., (2004). Effect of water extract of *Psidium guajava* on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmazie*, **59**, 734-735.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A., y Sayeed, S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of food science*, **72**, 341- 345.

Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, **67**, 61-69.

Nundkumar, N., y Ojewole, J. A. (2002). Studies on the antiplasmodial properties of some South African medicinal plants used as antimalarial remedies in Zulu folk medicine. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **24**, 397- 401.

Ojewole. J. A. (2005). Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. *Methods and findings in experimental and Clinical Pharmacology*, **27**, 689-695.

Oliver, B. (1986). *Medicinal plants in tropical West Africa*. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 457-461

Olszewska, M. (2005). Flavonoids from *Prunus serotina* Ehrh. *Natural Drug*, **62**, 127-133.

Pérez –Gutiérrez, R. M. Mitchell, S. y Vargas-Solis, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**, 1-27.

Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A., y Morelli, I. (1992). Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *Cernuum*. *Phytochemistry*, **33**, 1537-1539.

Ponce, M. M., Navarro, A. I., Martínez, G. M. N., Alvarez, G. R. (1994). *In vitro* effect against Giardia of 14 plant extracts. *Revista de Investigación Clínica*, **46**, 343-347.

Prabu, G., Gnanamani, A., y Sadulla, S. (2005) Guaijaverin- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, 487-495.

Qadan, F., Thewaini, A. J., Ali, D. A., Afifi, R., Elkhawas, A., y Matalka, K. Z. (2005). The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *American Chinese Medical*, **33**, 197-204.

Quian, H., y Nihorimbere, V., (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Science*, **5**, 676-683.

Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., y Van Steenberghe, D., (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis microbiological aspects. *Periodontology*, **28**, 72-90.

Radha, A., y Chandrasekaran, R. (1996). X-Ray and conformational analysis of arabianan. *Carbohydrate Research*, **298**, 105-115.

Rahandraha, T., Chanez, M., Boiteau, P., y Jaquard, S. (1963) Anthrone determination of asiaticoside isolated from *Centella asiatica* by quantitative chromatography of thin layers of glass powder. *Ann. Pharm. Fr.* **21**, 561-567.

Razak, F., Othman, R., y Abd Rahim, Z. (2006). The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell- surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science*, **48**, 71-75.

Rivero-Cruz, F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 151 -154.

Roy, C. K., Kamath, J. V., y Asad, M. (2006). Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. *Indian Journal of experimental Biology* **44**, 305-311

Sashida, Y., Ogawa, K., Mori, N., y Yamanouchi, T. Triterpenoids from the fruit galls of *Actinidia polígama*. *Phytochemistry*, **31**, 2801-2804.

Shaheen, H. M., Ali, B. H., Algarawi, A. A., y Bashir, A. K. (2000). Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*, **14**, 107- 111.

Sung, T. V., Lavaud, C., Porzel, A., Steglich, W., y Adam, G. (1992). Triterpenoids and their glycosides from the bark of *Schefflera octophylla*. *Phytochemistry*, **31**, 227-231.

Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., y Vlietinck, A. J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, **61**, 57-65.

Wei, Y., Xie, Q., Dong, W., Ito, Y. (2009). Separation of epigallocatechin and flavonoids from *Hypericum perforatum* L. by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*.

Wilson, M., Devine, D. (2003). *Medical Implications of Biofilms*. Cambridge pp 171-177.

Xiangjiu He y Rui Hai Liu. (2008). Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem*, **56**, 9905-9910

Zakaria, M., Mohd, M: A. (1994). Traditional Malay medicinal plants. *Penerbit Fajar Bakti Sudan Bernhard*, 129-132.

Zhang, W. J., Chen, B. T., Wang, C. Y., Zhu, Q. H., y Mo, Z. (2003). Mechanism of quercetin as an antidiarrhoeal agent. *Di Yi Jun Yi xue xue Bao*, **23**, 1029-1031.