



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Compuestos con actividad sobre  
*Streptococcus mutans*, aislados de la infusión  
de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GABRIELA LIZETH ZARCO ESPINOSA



MEXICO, D.F.

2010



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**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Dra. María Isabel Aguilar Laurents</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Dra. Rachel Mata Essayag</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Dr. José Fausto Rivero Cruz</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>M. en C. José Alberto Rivera Chávez</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano</b>

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111 Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

---

Gabriela Lizeth Zarco Espinosa

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a ella y brindarme la mejor educación para forjarme como profesionista.

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

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus valiosas observaciones para mejorarlo.

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

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por el apoyo técnico para el crecimiento de las bacterias empleadas en esta investigación y la esterilización de los medios de cultivo utilizados.

A la Dra. Christine D. Wu, del Departamento de Pediatría de la Universidad de Illinois en Chicago, por su colaboración en la realización de la técnica de agregación sobre *S. mutans*.

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 mi **mami Elvia** que siempre ha estado ahí para mí, en cada uno de los momentos de mi vida, a ti que te has encargado de la gran mayoría de mi felicidad, si no es que de toda. Mami te lo agradezco demasiado, creo que jamás podre pagarte todo lo que has hecho por mí, solo me queda decirte que te amo con lo más profundo de mi alma y de mi corazón y que te agradezco todo lo que ahora soy, ya que ello lo he logrado gracias a ti y a tu esfuerzo. Mami este logro también es todo tuyo.

A **mis hermanos Javier, Carlos, Joy y Chava, y a mi prima Andrea y Jessica Michael**, gracias por las risas, por las confianzas, por las salidas, por las bromas, por los juegos, por las lagrimas, por las riñas, en fin por todo lo que hemos vivido juntos y aun más por todo lo que nos falta, gracias por estar siempre ahí para mí y brindarme su apoyo incondicional. Definitivamente sin ustedes mi vida no sería lo maravillosa que es ahora que los tengo a mi lado.

A **mi tía Bety** que has sido también uno de los grandes pilares de mi vida, puesto que sin tu apoyo y tus consejos no hubiese llegado a este punto de mi vida, gracias Bety por haber estado en los momentos más difíciles para mí y para mi familia, y por continuar estando a nuestro lado.

A **mi tía Yael**, que la considero como una hermana mayor. Gracias por estar conmigo durante mi infancia, por los juegos y las risas, por compartir tus y mis confianzas, por tus guisos, por tu apoyo y tus consejos tan acertados, por tu agradable compañía, en fin por todo eso y más ¡Gracias!, te quiero mucho. Eres una de las personas más importantes en mi vida.

A **mi papá Paco**, que pese a todo lo que ha pasado entre nuestras vidas, sigues apoyándome de forma incondicional, a ti también te doy las gracias por estar ahí y por todos los momentos agradables y felices que hemos pasado juntos.

A **mi abue Lilia** que durante los años de tu vida te dedicaste a mimarme con tus inmensos cariños y regalos como resultado de mis “grandes” logros, gracias por el

extraordinario y único amor que me brindaste, y pese que ya no estás mas a mi lado, tu recuerdo sigue con migo con la misma intensidad que cuando estabas con vida.

A **mi abue Emilia**, quien me ha brindado su compañía y su gran amor de abuela, compartiendo conmigo su sentir, así como sus ricos y deliciosos guisos que tanto me gustan, gracias por ser parte de mi vida, ¡te quiero mucho abue!, eres la mejor.

A mis grandes amigos de la secundaria **Edna Maricela Castillo Silva, Sofía Cervantes Maya, Rodrigo, Manuel, Luis Ángel, Jorge, Juan Carlos, Alma Laura, Andrea y Leticia**; con los cuales pase magníficos momentos y que jamás olvidaré, gracias por todas esas risas que aún parecen no terminar, por los trabajos en equipo realizados, por su tiempo dedicado, y en particular a Edna y Sofía por permanecer aún a mi lado, gracias por ser unas de mis mejores amigas en la vida.

A mis amigos de la prepa: **Jenny, Sheila, Ahíram, Iliana, Maricela, Alejandra, Diana, José Luis, Gabriel, Adán y Lázaro**, gracias por su amistad que me llena de recuerdos hermosos e inolvidables, y aunque ya no nos frecuentamos mucho, las veces que lo hacemos la seguimos pasando estupendamente bien, recordando momentos chuscos, contándonos otros tantos y viviendo muchos más.

A **mis amigos de la Facultad** con los cuales he vivido y aprendido tanto. Hemos pasado a través de interminables exámenes, proyectos, desvelos, llantos, risas, siestas en el pasto, confidencias, emociones, noticias particulares, reuniones, intercambios, una que otra fiestecilla y salidas (por eso de los permisos), pero cuando se dio la oportunidad que divertidas nos dábamos y aún nos damos. Caray tantos momentos para ser recordados y que volvería a vivir una y otra vez con tal de estar ahí con ustedes, ¡los quiero mucho a todos!, son ustedes muy importantes para mí, por ello espero seguir compartiendo más y más momentos de toda índole con ustedes. Amigos muchas gracias! este trabajo también es para ustedes: Nancy Jazmín Chávez de la Cruz, Perla García Guzmán, Martha Vázquez Romero, Marco Antonio Balandrán Ruiz, Matilde Ángeles García, Claudia

Patricia Romero Sánchez, Maricela García Jiménez, Heysoldding Vanégas Ávila, Elizabeth Hernández Fuentes, Marisol Rosas Guerrero, Martha Ivón García Martínez, Héctor Manuel Tafoya Olivos, Emanuel Aztatzí, Aurea Carolina Prado Ramírez, Lila Lubianka Domínguez Ramírez, Guadalupe Nery Paredes, Perla Sandoval Gutiérrez, Erandi Loredo Vázquez, Jesús Trinidad Orduño, Claudia García Pérez, Félix Morales Flores, Javier Gutiérrez Tapia, Gabriela Rubí Tapia Álvarez, Ariel Hernández Pérez, Arturo Colín, Blanca Elba Cruz Mondragón, Mónica González, y particularmente a Fabián Fernández Reyes quien es una persona muy especial para mí ya que siempre ocupará un lugar muy importante en vida y en mi corazón.

A **mis compañeros del laboratorio 111** por brindarme su amable compañía durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, gracias: Perla, Marisol, Cecilia, Luz, Karina, Alejandra, Ingrid, Alfonso, Ulises, Alicia, Blanca y por supuesto a los vecinos del laboratorio: Moni, Chio, Toño, Rodrigo y Miguel, quienes hicieron de mi estancia en el laboratorio la más agradable y divertida que pudiese tener, por ello gracias.

## Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE CUADROS .....	ii
LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	6
2.1.1. Generalidades.....	6
2.1.2. <i>Streptococcus mutans</i> en la caries dental.....	6
2.1.3. Actividad antibacteriana contra <i>S. mutans</i> de compuestos sintéticos y naturales.....	9
2.2. Caries dental.....	12
2.2.1. Definición y generalidades .....	12
2.2.2. Biocapas .....	14
2.2.3. Factores de riesgo debidos a la caries dental .....	16
2.2.4. Medidad de riesgo debidos a la caries dental .....	16
2.3. <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst .....	19
2.3.1. Generalidades .....	19
2.3.2. Distribución geográfica .....	20
2.3.3. Usos y propiedades medicinales .....	21
2.3.4. Estudios químicos realizados .....	22
2.3.5. Hematoxilina: Historia y compuestos relacionados .....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS .....	32
4.1. Objetivos generales .....	32
4.2. Objetivos particulares.....	32
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
5.1. Material vegetal .....	33
5.2. Procedimientos generales .....	33
5.2.1. Análisis cromatográficos .....	33
5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.....	33
5.2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia .....	34
5.3. Estudio químico de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst .....	34
5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de <i>H. brasiletto</i> .....	34
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto derivado de la corteza de <i>H. brasiletto</i> .....	34
5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición de acetato de etilo de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	35



5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex_LH20 de la fracción activa CA-FII .....	36
5.3.5. Cromatografía en columna utilizando Sephadex_LH20 de la fracción activa CA-FV .....	37
5.3.6. Cromatografía en columna utilizando Sílica gel C18 de la fracción activa CC-FII .....	37
5.3.7. Purificación de la hematoxilina presente en la fracción activa CD-FII por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).....	38
5.4. Ensayos biológicos .....	40
5.4.1. Microorganismos de prueba.....	40
5.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	40
5.4.3. Procedimiento general del ensayo.....	40
5.4.4. Determinación de la agregación de <i>S. mutans</i> , por el extracto de <i>H. brasiletto</i> .....	42
5.4.5. Determinación del efecto del extracto acuoso, de la fracción de acetato de etilo y de hematoxilina sobre la formación de la biocapa monoespecie.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
7. CONCLUSIONES.....	50
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. REFERENCIAS.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>CCA</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
<b>CLAE</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>μL</b>	Micro litro
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble de dobles
<b>GTF's</b>	Glucosiltransferasas
<b>h</b>	Hora
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>μg</b>	Microgramo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de protón
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ton</b>	Toneladas

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro	Contenido	Pág.
1.	Distribución de bacterias en varios sitios de cavidad oral.	4
2.	Compuestos de origen natural con actividad contra <i>Streptococcus mutans</i> .	7
3.	Factores de riesgo y posibles consecuencias debidas a la caries dental.	14
4.	Evaluación del riesgo de caries de acuerdo a tres niveles: alto, moderado y bajo.	15
5.	Propiedades medicinales atribuidas a <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	19
6.	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	20
7.	Algunas propiedades farmacológicas de la haematoxilina y de la brazilina.	22
8.	Hematoxilina y compuestos derivados.	25
9	Usos de la Hematoxilina y compuestos relacionados, a lo largo de la historia	27
10.	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatográfica de la partición en AcOEt de <i>H. brasiletto</i> Karst.	33
11.	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CA-FII.	33
12.	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CB-FV.	34
13	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CC-FII.	35
14	Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza de <i>H. brasiletto</i> Karst, así como de la partición de AcOEt y de la hematoxilina, frente a <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	42
15	Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza de <i>H. brasiletto</i> Karst, así como de la partición de AcOEt y de la hematoxilina, frente a <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	42
16	Constantes espectrométricas de la Hematoxilina	44
17	Concentración inhibitoria del extracto acuoso, fracción de AcOEt y de hematoxilina sobre la biocapa de <i>Streptococcus mutans</i> .	46

## LISTA FIGURAS Y DIAGRAMAS.

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1	Factores involucrados en el proceso de la caries dental según Newbrun.	10
2	Mecanismos de resistencia propuestos asociados a la resistencia de las biocapas	12
3	Diversidad de infecciones asociadas a biocapas.	13
4	<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	17
5	Distribución geográfica de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst en la República Mexicana	18
6	Distribución de los canales en la placa Sarstedt	38
7	a) Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la hematoxilina	43
	b) Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la hematoxilina	43
8	Cromatograma obtenido por medio de CLAE de la hematoxilina.	44
9	Efecto del extracto acuoso de <i>H. brasiletto</i> Karst, de la fracción de AcOEt, así como de la hematoxilina, sobre la biocapa de <i>S. mutans</i> .	45
<b>Diagrama</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1	Procedimiento del fraccionamiento primario y secundario del extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de <i>H. brasiletto</i> .	32
2	Fraccionamiento de la partición de <i>H. brasiletto</i> Karst en AcOEt	36

## 1. INTRODUCCIÓN

Es evidente que gran parte del esplendor de las culturas antiguas está relacionada con el conocimiento que éstas poseían acerca del uso, propiedades y cualidades de una gran variedad de especies vegetales; estableciéndose con ello, una estrecha relación entre la diversidad cultural y la diversidad biológica, relación que aún persiste y puede constatarse con la megadiversidad existente. Pues tan solo México ocupa a nivel mundial el cuarto lugar en biodiversidad en especies vegetales, de las cuales 270 mil corresponden a plantas, sin embargo, por el momento sólo se tiene un registro de que aproximadamente 4500 de éstas son de carácter medicinal.

Dicha biodiversidad refleja un enorme potencial puesto que muy pocas especies y productos vegetales han sido estudiados, de ahí surge el interés de conocer más a fondo las propiedades químicas y biológicas, además del uso de las especies vegetales, en el tratamiento de diversos padecimientos; sin embargo, para ello es necesario el rescate del conocimiento del uso tradicional de dichos recursos, lo cual, dependerá no sólo de la conservación de la biodiversidad como tal, sino también de la conservación y el estudio más profundo de las diversas culturas étnicas, ya que, los procesos de pérdida, desaparición o transculturización de un grupo étnico, de su lengua y/o de su cultura conllevan a la pérdida de un enorme conocimiento.

Es importante resaltar que México cuenta con una cantidad importante de información que va desde investigaciones de índole práctica-descriptiva, como catálogos e inventarios de plantas útiles, sin embargo aún queda mucho por hacer, con lo cual, uno de los principales objetivos del presente trabajo de tesis es abundar particularmente en el conocimiento fitoquímico de la especie: *Haematoxylon brasiletto* Karst, popularmente conocida como “palo de Brasil”.

*Haematoxylon brasiletto* Karst, es un árbol ampliamente utilizado en la medicina tradicional, desde la época de los antiguos mayas y actualmente en la época rural, es utilizado para curar la erisipela, varios tipos de inflamaciones estomacales, diarreas, combatir la anemia, en el tratamiento de problemas cardiovasculares, disminuir el nerviosismo, como **antimicrobiano**, por tan solo mencionar algunos.

De dicha especie se tiene un particular interés por su actividad antimicrobiana, ya que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de carácter infeccioso constituyen las primeras causas de muerte a nivel mundial, de las cuales, las enfermedades orales como la **caries dental** es un gran problema de salud, puesto que al menos el 95 % de la población global se encuentra afectada por tal enfermedad y, pese que se han establecido tratamientos y nuevas alternativas para combatirla, es sin duda una de las enfermedades con mayor prevalencia y más costosa, esto es en cuanto a los tratamientos y las horas de trabajo perdidas, tanto en los países en desarrollo como en los industrializados.

Particularmente, en México solamente existe un número limitado de estudios enfocados a la comprensión de los factores involucrados en el desarrollo de caries dental, por lo cual el estudio fitoquímico de *Haematoxylon brasiletto* Karst, puede ser una alternativa, para la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Streptococcus mutans*

#### 2.1.1. Generalidades

Aunque *Streptococcus mutans* es una bacteria que habita generalmente en la cavidad oral, también, puede ser aislada de las heces de los seres humanos (Finegold *et al.*, 1975; Kilian *et al.*, 1971) y de las ratas (Inoue, *et al.* 1979; Thomson *et al.*, 1979).

Estudios taxonómicos han revelado que estos organismos son un grupo bastante homogéneo de Gram positivos, catalasa negativos, fermentadores de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina, y salicina. *S. mutans* metaboliza dextranos de alto peso molecular y otros glucanos para producir sacarosa. Cabe señalar que los polisacáridos son utilizados posteriormente en la producción de ácido láctico, el cual favorece la destrucción del esmalte dental, ya que, forma una especie de película pegajosa que le permite adherirse a los dientes, dando lugar así a la caries dental.

Con respecto a su pared celular, ésta contiene cuatro principales polímeros antigénicos: peptidoglucanos, polisacáridos específicos, proteínas, ácido teicoico y ácido lipoteicoico. Es importante destacar que la pared presenta una estructura de mosaico en el que cada uno de estos polímeros es accesible para las reacciones en la superficie celular (Slade, 1978).

#### 2.1.2. *Streptococcus mutans* en la caries dental

La boca está poblada por un gran número de especies microbianas, algunas de ellas se mencionan en el **Cuadro 1**; de estas especies, las placas debidas a estreptococos en las superficies de los dientes, son aproximadamente  $10^{11}$  UFC por gramo de peso húmedo, de las cuales, *S. mutans* compone del 30 al 60% del total de las bacterias que habitan en las superficies de los dientes, la

lengua, las mejillas y la saliva (Aguilera, 2004); cabe mencionar que en estado de salud, un recuento de estas bacterias en la boca será de menos de 100 000 UFC.

**Cuadro 1.** Distribución de bacterias en varios sitios de cavidad oral (Walter *et al.*, 1986)

Grupo bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco gingival
Cocos facultativos Gram-positivos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos anaerobios Gram-positivos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos anaerobios Gram-negativos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos facultativos Gram-negativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Cocos facultativos Gram-positivos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos facultativos Gram-positivos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos facultativos Gram-negativos	ND	3.2	2.3	1.2
Bacilos anaerobios Gram-negativos	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

ND: no determinado

**Nota:** Los datos se expresan como un porcentaje del recuento total de cultivo en agar sangre incubados anaeróbicamente. Los datos entre paréntesis se expresan como un porcentaje del total de los recuentos de facultativos por estreptococo.

La caries es un proceso infeccioso patológico multifactorial, localizado, post-eruptivo y transmisible que destruye los tejidos duros dentales (Mouton, 1995; Rodríguez y Gonzales, 2000). Los principales microorganismos asociados a la



producción de caries son en orden de frecuencia: 1) *S. mutans* (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *S. sobrinus* y *S. gordonii* y 2) especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Mouton 1995; Liébana, 2002).

La capacidad patogénica de *S. mutans* se fundamenta principalmente en sus propiedades adhesivas así como de su capacidad acidofílica, acidogénica y acidúrica además de otros mecanismos que incrementan su virulencia durante el proceso cariogénico (Gamboa *et al.*, 2004).

En el caso de *Streptococcus mutans* el proceso de adhesión se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de la sacarosa, el cual es mediado por la acción del sistema enzimático de las glucosiltransferasas (GTF's), responsables claves en la síntesis extracelular de dextranos (polisacárido constituyente de la matriz de la placa dental). La sacarosa es la fuente natural de energía para el sistema GTF's, el cual es clave para catalizar la conversión de sacarosa a largas cadenas de polisacáridos (Hamada *et al.*, 1980; Loesche *et al.*, 1985).

Los dextranos son polímeros extracelulares solubles e insolubles, los cuales en su conjunto se conocen como exopolisacáridos. Estos productos bacterianos impiden la actividad de fagocitos, anticuerpos, enzimas, biodetergentes y antibióticos sobre el microorganismo productor (Padilla *et al.*, 2007). Gamboa demostró en ensayos previos que la adición de 23% de sacarosa permiten claramente la visualización de la biocapa alrededor de la colonia de *S. mutans*, y desde el punto de vista bioquímico es posible decir, que el exceso de sacarosa en el medio incrementará la actividad de las enzimas glucosil y fructosil transferasas, enzimas responsables de la síntesis del glicocalix (Gamboa *et al.*, 2004).

### 2.1.3. Actividad antibacteriana contra *S. mutans* de compuestos sintéticos y naturales.

Existen diversos compuestos químicos capaces de ejercer una acción directa sobre *S. mutans*, un ejemplo de ellos son la clorhexidina y el triclosán, los cuales impiden su desarrollo (Dasanayake *et al.*, 2001; Donlan *et al.*, 2002). La **clorhexidina** es un agente antimicrobiano de amplio espectro, se ha utilizado para reducir el nivel de *S. mutans* oral, y se incorpora en soluciones de enjuague bucal. Este compuesto ha demostrado que inhibe la formación de la biocapa, además reduce la inflamación gingival y evita las caries dentales (Hatta *et al.*, 1997).

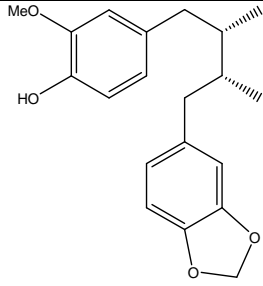
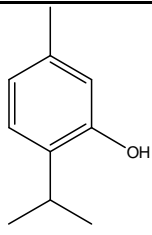
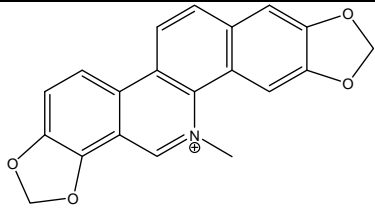
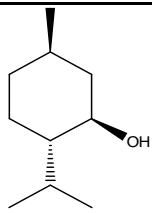
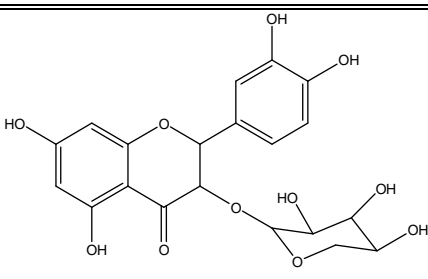
El **dihidrocloreuro de octenidina** fue desarrollado en el Instituto de Investigación Sterling Winthrop como un agente antimicrobiano tópico. El compuesto fue descubierto en un estudio conducente a determinar la inhibición del crecimiento y la reducción de la formación de biocapas por la bacteria *S. mutans* en animales de experimentación. (Mustafa *et al.*, 2009).

Por otro lado, el fluoruro de sodio es el agente preventivo de la caries más importante utilizado en humanos. Esta sal es un agente capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Hamilton, 1990; Bradshaw *et al.*, 2002).

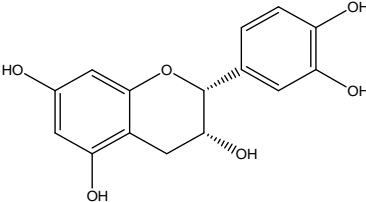
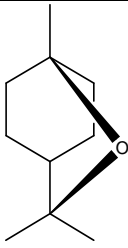
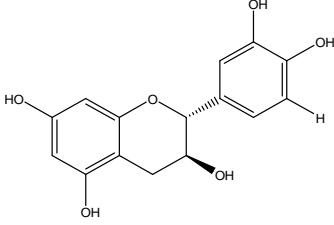
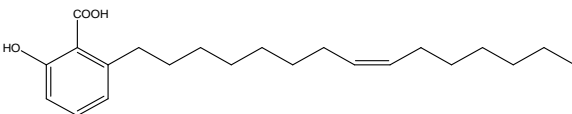
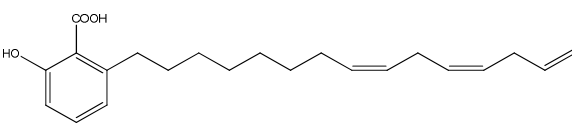
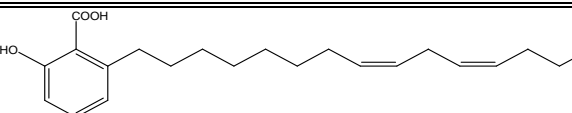
Así mismo, algunos enjuagues como el “Biotene®”, contienen enzimas antibacterianas que se encuentran de forma natural en la saliva humana. El Biotene® contiene tres enzimas primarias: glucosaoxidasa, lactoperoxidasa, y lisozima como “ingredientes” antibacterianos.

Por último, existen compuestos de origen natural con actividad sobre el crecimiento de la bacteria *S. mutans*. Algunos ejemplos de estos compuestos se muestran en el **Cuadro 2**.

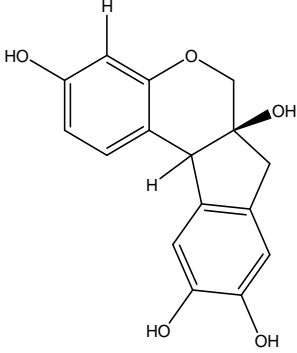
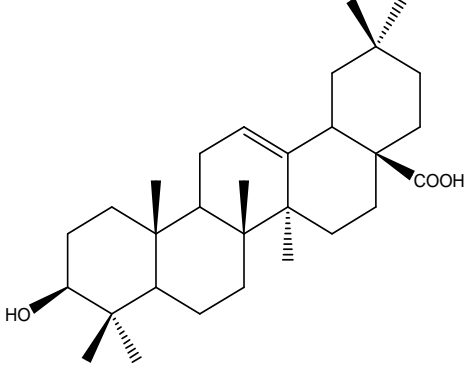
**Cuadro 2.** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans*.

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Macelignan		<i>Myristica fragans</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Timol		<i>Thymus vulgaris</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Sanguinarina		<i>Sanguinaria canadensis</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Mentol		<i>Menta piperita</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
Guaijaverina		<i>Psidium guajava</i>	Prabu <i>et al.</i> , 2006

**Cuadro 2. (Continuación)** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans*

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
(-)- Epicatequina		<i>Theobroma cacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001
Eucaliptol		<i>Eucalyptus globulus</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006
(+)-catequina		<i>Camellia sinensis</i>	Murphy, 1999
Ácido oléico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	<i>Theo bromacacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001
Ácido anacárdico $\text{C}_{15:1}$		<i>Anacardium occidentale</i>	Kasemura <i>et al.</i> , 2002
Ácido anacárdico $\text{C}_{15:3}$		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003
Ácido anacárdico $\text{C}_{15:2}$		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003

**Cuadro 2. (Continuación)** Compuestos de origen natural con actividad contra *Streptococcus mutans*

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Brazilina		<i>Caesalpinia sappan</i>	Xong <i>et al.</i> , 2004
Ácido oleanólico		<i>Vitis vinifera</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2008

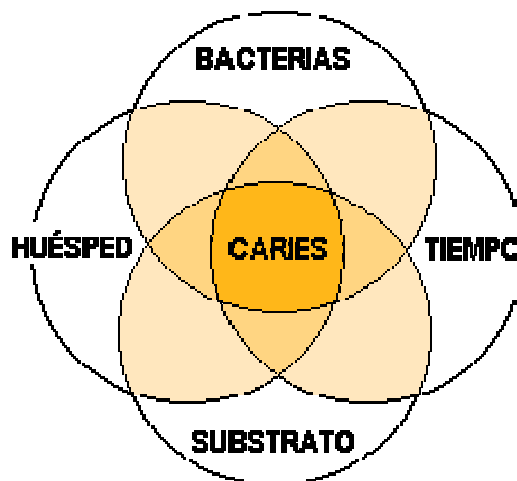
## 2.2. Caries dental

### 2.2.1. Definición y Generalidades.

La caries es una enfermedad infecciosa caracterizada por la destrucción del tejido dentario por efecto de los ácidos que producen las bacterias a partir de alimentos ricos en azúcar y almidón. Esta enfermedad puede ir desde una pequeña mancha blanca, que es el estadio inicial de la caries, hasta la destrucción total del diente y la diseminación de la infección hacia otras partes del cuerpo (Ruiz *et al.*, 1999). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la caries dental se puede definir como un proceso patológico localizado de origen externo

que se inicia tras la erupción y que determina un reblandecimiento del tejido duro del diente evolucionando hacia la formación de una cavidad (OMS, 2010).

Las caries representan una patología etiológica multicausal y se reconocen factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre los primeros se menciona el estado anatómico y funcional de los tejidos de la cavidad bucal, calidad y cantidad de saliva, y el sistema inmunológico; mientras que entre los segundos se encuentran, la condición socioeconómica y cultural, hábitos y conductas de higiene bucal, elevado consumo de azúcares fermentables en alimentos y bebidas, así como la disponibilidad de sustratos requeridos por microorganismos específicos (Bojanich *et al.*, 2003). Keyes se dio a la tarea de representar de modo gráfico los tres factores principales necesarios para el desarrollo de la caries, como tres círculos parcialmente superpuestos (microorganismos, sustrato y huésped), a los que Newbrun (**Figura 1**) añadió un cuarto círculo (el tiempo), para así expresar la necesidad de la persistencia de la agresión de los factores en la producción de la caries (Casillo *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Factores involucrados en el proceso de la caries dental según Newbrun.

Es importante destacar, que para la formación de las caries existen tres principales eventos dependientes del microorganismo y que en un determinado momento son susceptibles de ser intervenidos: 1) adhesión inicial de los microorganismos cariogénicos a la película adquirida; 2) coagregación de los

microorganismos para iniciar la producción de ácidos (degradación de los sustratos), que lleva a la desmineralización del diente; y el 3) progreso de la lesión cariosa (Gamboa *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Biocapas.

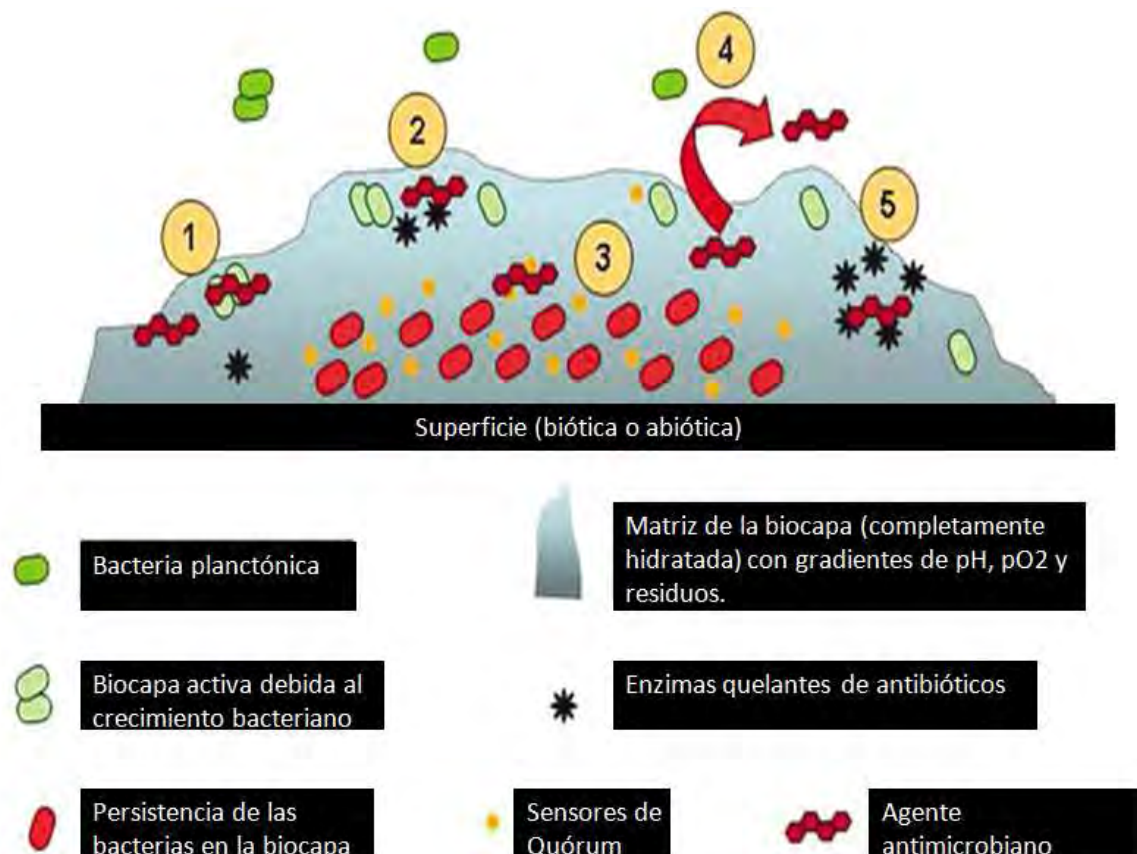
Una biocapa se define como una unidad estructurada de células bacterianas, recubiertas de una matriz polimérica y adheridas a una superficie viva e inerte; de manera adicional durante este proceso, se lleva a cabo un sistema de comunicación química a través de un complejo de célula-célula. Cabe mencionar que típicamente las bacterias constituyen del 5 al 35 % (v/v) de la biocapa y el volumen restante corresponde a la matriz extracelular.

En la mayoría de las especies la matriz es un complejo polianiónico hidratado (dexopolisacaridos de origen bacteriano), aunque también se han descrito matrices parcialmente o predominantemente consistentes. La matriz extracelular crea un sistema de captura para atrapar y concentrar minerales y nutrientes esenciales a partir del ambiente que les rodea; a su vez provee un cierto grado de protección contra los retos ambientales.

La eliminación de dichas bacterias es complicada, debido a que se adhieren a una superficie y crecen como una biocapa la cual las protege de la destrucción debida a las defensas innatas del huésped y de los agentes antimicrobianos, representando así un tipo de resistencia única y distinta a los antibióticos convencionales. La resistencia que esta bacteria exhibe cuando ellas crecen en biocapas, no es debida a los mecanismos genéticos clásicos, sino que está determinada por el crecimiento peculiar de la biocapa. Al parecer la matriz extracelular asociada a las biocapas podría restringir los agentes antimicrobianos, sin embargo, la limitada difusión de antimicrobianos dentro de las biocapas no parece desempeñar un papel significativo en la resistencia de la biocapa.

Con base en lo anterior se han propuesto los siguientes mecanismos implicados en la resistencia de la biocapa (**Figura 2**):

- 1) Los agentes antimicrobianos no pueden penetrar más allá de las capas superficiales de la biocapa, de tal forma que la acción de estos puede verse afectada por la alteración del medio (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, etc.) o bien por zonas de residuos.
- 2) Los agentes antimicrobianos pueden ser atrapados y destruidos por las enzimas en la matriz de la biocapa.
- 3) Debido a una alteración de la tasa de crecimiento dentro de la biocapa. Los agentes antimicrobianos pudiesen estar inactivados debido al crecimiento de los microorganismos.
- 4) Por la expresión de genes específicos de resistencia contra biocapas.
- 5) Debido a la respuesta del estrés provocado por condiciones ambientales hostiles.

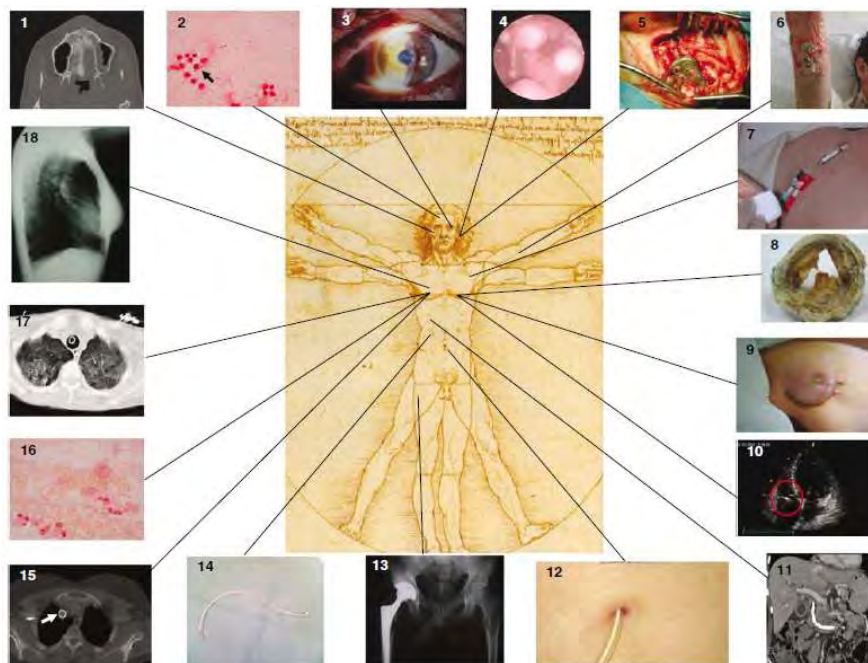


**Figura 2.** Mecanismos de resistencia propuestos asociados a la resistencia de las biocapas. Adaptado de Del Pozo y Patel, 2007.



### 2.2.3. Factores de riesgo debidos a la caries dental.

La caries dental puede avanzar hasta destruir el hueso adyacente de los dientes e incluso producir infecciones que comprometan la vida del paciente, como por ejemplo: osteomielitis y endocarditis, esto es, en el caso de que las bacterias penetren al torrente sanguíneo. Así mismo, la diversidad debida a infecciones asociadas a biocapas se ha incrementado cada vez más, puesto que éstas se encuentran presentes en más del 65 % de todas las infecciones bacterianas, incluyendo infecciones relacionadas con implantes e infecciones crónicas (**Figura 3**).



**Figura 3.** Diversidad de infecciones asociadas a biocapas. 1) Tomografía computarizada de una sinusitis crónica, 2) Infección cerrada en el Sistema Nervioso Central. Tinción de Gram de una muestra intracelular de líquido cefalorraquídeo, donde se observan cocos Gram-positivos (flecha negra). 3) Queratitis asociada a lentes de contacto. 4) Ortitis media crónica 5) Infección de cocleares por el implante. 6) Infecciones relacionadas con quemaduras. 7) Infección del catéter intravascular (se muestra un catéter tipo Hickman). 8) Endocarditis valvular protésica. 9) Infección de marcapasos. 10) Endocarditis electrofisiológica. 11) Infección biliar extendida. 12) Infección peritoneal debida al catéter de diálisis. 13) Infección por articulación protésica. 14) Infección urinaria extendida. 15) Infección intravascular extendida (endoprótesis en la vena cava superior, marcada con la flecha blanca). 16) Infección pulmonar en paciente con fibrosis quística. Tinción de Gram que muestra bacilos Gram-negativos encerrados en una matriz de alginato. 17) Neumonía asociada a ventilación. 18) Infección de implantes mamarios. Adaptado de Del Pozo y Patel, 2007.

Aun cuando no existe información relacionada para todos los tipos de dispositivos se ha estimado que las tasas de infección son aproximadamente: 2% para prótesis, 2% en implantes de mama, 4% para válvulas cardíacas, 4% para marcapasos y desfibriladores, 10 % derivaciones ventriculares, y 40% en otros dispositivos ventriculares (Del Pozo y Patel, 2007). Sin embargo, el avance de la caries dental depende de diversos factores, los cuales se resumen en el **Cuadro 3**. Por otra parte, en el **Cuadro 4** se muestra la evaluación del riesgo de caries de acuerdo a tres niveles: alto, moderado y bajo.

**Cuadro 3.** Factores de riesgo y posibles consecuencias debidas a la caries dental. (Castillo *et al.*, 2004).

<b>Factores nutricionales</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Afectación nutricional prenatal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infecciones graves o déficit nutricional importante en el tercer trimestre gestacional</li> <li>Ingesta de tetraciclinas por la madre</li> <li>Prematuridad</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Afectación nutricional postnatal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Insuficiente ingestión de calcio, fosfatos y flúor</li> <li>Hábitos alimentarios inadecuados                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Chupetes o tetinas endulzados</li> <li>Biberón endulzado para dormir</li> <li>Consumo de bebidas con azúcares ocultos</li> <li>Consumo de jarabes endulzados</li> </ul> </li> </ul>
<b>Factores relacionados con la higiene dental</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alteraciones morfológicas de la cavidad oral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Malformaciones orofaciales</li> <li>Uso de ortodoncias</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Deficiente higiene oral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mala higiene oral de los padres y hermanos</li> <li>No correcta eliminación de la placa dental</li> <li>Minusvalías psíquicas importantes (dificultad de colaboración)</li> </ul>
<b>Factores asociados con xerostomía</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hipertrofia adenoidea</li> <li>Anticolinérgicos</li> <li>Síndrome de Sjögren</li> <li>Displasia ectodérmica</li> </ul>	
<b>Factores asociados a enfermedades a la manipulación dental</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cardiopatías</li> <li>Inmunosupresión</li> <li>Hemofilia y otros trastornos de coagulación</li> </ul>	

**Cuadro 4.** Evaluación del riesgo de caries de acuerdo a tres niveles: alto, moderado y bajo. (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2000)

	Evidencia clínica.	Hábitos alimenticios	Historia social	Uso de flúor	Control de placa	Saliva	Historia médica.
<b>Riesgo Alto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesiones nuevas.</li> <li>• Extracciones prematuras</li> <li>• Caries o restauraciones anteriores</li> <li>• Restauraciones múltiples.</li> <li>• No hay fisuras selladas</li> <li>• Existen aparatos fijos debido a ortodoncia.</li> <li>• Prótesis dentales</li> </ul>	Consumo frecuente de azúcares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Privación social.</li> <li>• Bajo conocimiento de la enfermedad dental.</li> <li>• Asistencia irregular</li> <li>• Disponibilidad de refrigerios</li> <li>• Pocas aspiraciones dentales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua potable no fluorada</li> <li>• No toma suplementos de fluoruro</li> <li>• Pasta dental sin fluoruro</li> </ul>	Limpieza ineficaz poco frecuente Control manual pobre.	Bajo caudal.  Baja capacidad buffer.  Alto contenido de <i>S. mutans</i> y <i>lactobacillus</i>	Medicamento comprometidos  Medicamentos cariogénicos a largo plazo  Xerostomía  Discapacidad física.
<b>Moderado</b>	Individuos que no encajan claramente en categorías de alto o bajo riesgo, con considerados estar en riesgo moderado.						
<b>Bajo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninguna lesión</li> <li>• Ninguna extracción por caries</li> <li>• Dientes sanos</li> <li>• Pocas o ningunas restauraciones</li> <li>• Restauraciones años atrás</li> <li>• Fisura sellada</li> </ul>	Consumo poco frecuente de azúcares.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ventaja social</li> <li>• Hermanos con caries baja</li> <li>• Conciencia dental</li> <li>• Asistencia regular</li> <li>• Alta aspiración dental.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toma agua fluorada</li> <li>• Utiliza suplementos fluorados</li> <li>• Utiliza pastas con fluoruro</li> </ul>	Limpieza eficaz frecuente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tasa de flujo normal</li> <li>• Alta capacidad buffer</li> <li>• Bajo contenido de <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No tiene problemas médicos</li> <li>• No tiene problemas físicos</li> <li>• Tienen un nivel de saliva normal</li> <li>• No están medicados a largo plazo.</li> </ul>

#### **2.2.4. Medidas de prevención y tratamientos contra la caries dental.**

El hecho de reconocer a *S. mutans* como el microorganismo más importante en la iniciación de la caries ha permitido diseñar medidas de prevención dirigidas hacia la eliminación o disminución de éste en la cavidad oral (Gamboa *et al.*, 2004).

Estudios previos realizados por Bojanich y colaboradores demostraron la efectividad de los polímeros: quitosano de alto peso molecular (QAPM) y del alginato de sodio (Al-Na) para aglutinar, agregar e impedir la adherencia de *Streptococcus mutans* a perlas de hidroxiapatita tratadas con saliva, y a células epiteliales bucales (Bojanich *et al.*, 2001) y, posteriormente demostraron que ambos polímeros reducen la formación de dextranos por parte de estos patógenos (Bojanich *et al.*, 2003).

Por otra parte, es importante destacar que en la prevención de la caries dental se han planteado diferentes estrategias, tales como control inmunológico, control microbiológico o reemplazo de *S. mutans* (Gamboa *et al.*, 2003), así como educación específica, control de dieta, detección previa de factores de riesgo, higiene bucodental, ingestión y aplicación tópica de fluoruros, ingestión y aplicación de fármacos, además de la aplicación de agentes sellantes en fisuras y fosetas (Herazo, 1993).

### **2.3. *Haematoxylon brasiletto* Karst**

#### **2.3.1. Generalidades**

*Haematoxylon brasiletto* Karst (Leguminosae) es un árbol de 7 a 15 metros de altura, cuyas ramas tienen espinas duras de 1 a 3 cm de largo; su corteza va del café claro a rojizo, mientras que el centro del tallo va del café muy oscuro al rojo intenso. Las hojas, con forma de moños, se encuentran divididas en seis hojuelas. Tiene racimos de flores amarillas, ligeramente desiguales en tamaño; y

los frutos son legumbres aplanadas más largas que anchas y no abren al madurar; sus semillas son alargadas (**Figura 4**) (Argueta *et al.*, 1994).

El árbol florece de febrero a marzo, es de origen nativo y se propaga por medio de semilla; cabe mencionar que éste, representa una abundante fuente productora de néctar y polen. Con su madera se produce carbón; así mismo proporciona un tinte semejante pero no igual al de palo de tinta (*Haematoxylon campechianum*). Antiguamente se utilizaba como colorante natural, para fabricar postes y en la construcción de casas, así como horcones y morillos.

Es conocido popularmente con los nombres de “azulillo”, “corteza de Brasil”, “palo Brasil”, “palo de tinta” y “palo tinto”, “guichachaco”, “yowi”, “kakoameé”, entre otros (Argueta *et al.*, 1994).



**Figura 4.** *Haematoxylon brasiletto* Karst. A la izquierda se observan las hojas en forma de moños, divididas en hojuelas de seis y las flores amarillas de tamaño ligeramente desigual. A la derecha se muestra el árbol completo, en donde se observa la corteza que va de café a rojo claro.

### 2.3.2. Distribución geográfica.

El palo Brasil es un árbol originario del norte de Granada, que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Está asociado a bosques tropicales, caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, así como a bosques

espinosos, mesófilo de montaña, de encino y de pino (Argueta *et al.*, 1994), principalmente en depresión central en donde forma comunidades densas de Brasil.

En México, esta especie se distribuye principalmente en los Estados de Baja California Sur, Sonora, Morelos, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y en el Estado de México (Argueta *et al.*, 1994).



**Figura 5.** Distribución geográfica de *Haematoxylon brasiletto* Karst en la República Mexicana.

### 2.3.3. Usos y propiedades medicinales.

Desde épocas prehispánicas, esta especie ha sido utilizada por sus diversas propiedades y/o usos medicinales, tales como: padecimientos renales, problemas cardiovasculares, antidiabéticos, antisépticos, antipirético, control de la ictericia, así como por propiedades antimicrobianas, por tan solo citar algunos. Cabe mencionar que para el tratamiento de tales padecimientos, se utilizan diversas partes de dicha especie, ya sea en forma de infusiones o en forma de tinturas; las cuales se muestran el **Cuadro 5**.

Asimismo *H. brasiletto* Karst se emplea en la fabricación de cremas y geles, para teñir el cabello, además de ser utilizado como colorante en la industria textil (Paris y Rousselet, 1958; Lolor y Martín, 1959).

**Cuadro 5.** Propiedades medicinales atribuidas a *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Argueta *et al.*, 1994)

Uso popular	Parte de la planta utilizada	Vía de administración
Padecimientos reales	Corteza y tronco	Oral
Problemas cardiovasculares	Tallo y corteza	Oral
Antidiabético	Toda la planta	Oral
Antidiarreico	Corteza y tronco	Oral
Antiséptico	Corteza y tronco	Oral
Dolor de espalda	Flores	Tópica y oral
Dolor de pulmón	Raíz y hojas	Oral y tópico
Enfermedades gastrointestinales	Corteza y tallo	Oral
Dolor corporal	Toda la planta	Oral o tópico
Antiinflamatorio	Flores, corteza y hojas	Oral
Padecimientos biliares	Corteza y tronco	Oral
Dolor de bazo	Corteza y tallo	Oral y tópico
Dolor de dientes	Corteza y tallo	Oral
Control de la ictericia	Toda la planta	Oral
Antianémico	Flores	Oral
Antipirético	Toda la planta	Oral
Colorante	Tallo y corteza	-----

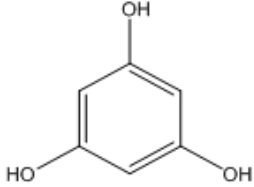
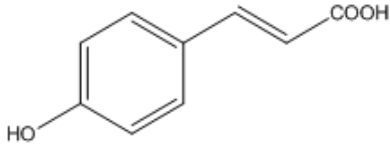
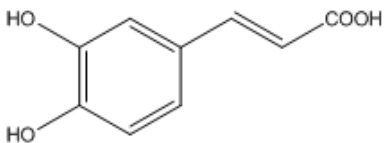
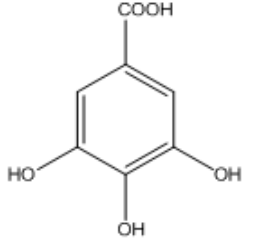
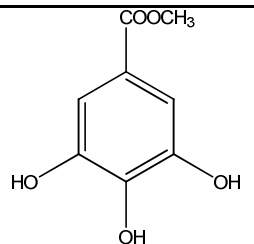
#### 2.3.4. Estudios químicos realizados.

Estudios químicos previos de *H. brasiletto* Karst han permitido la purificación y caracterización de ocho compuestos aromáticos (Pratt y Yuziriha, 1959; Rivero-Cruz, 2008) cuyas estructuras se muestran en el **Cuadro 6**. Los homoisoflavonoides hematoxilina y brazilina presentan importantes propiedades farmacológicas (**Cuadro 7**) entre las cuales podemos destacar las propiedades

antiinflamatorias, antimicrobianas, vaso relajantes, anticonvulsivas y antioxidantes.

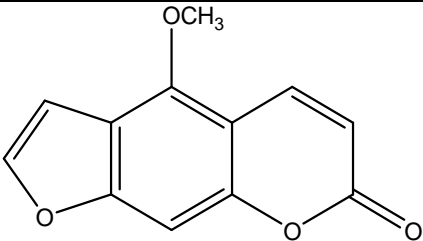
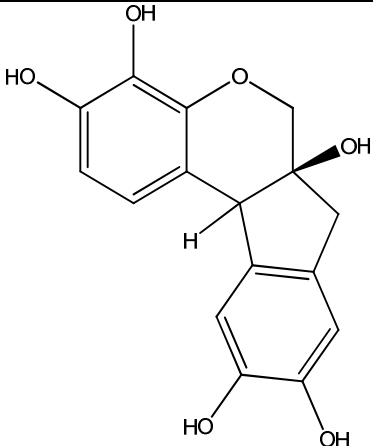
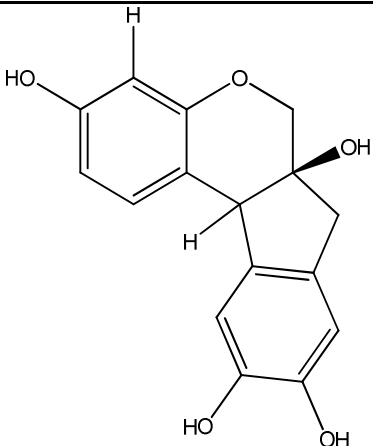
De los compuestos descritos anteriormente, la hematoxilina, la brazilina, el ácido cafeico y el floroglucinol, presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* 375, *Enterococci faecium* y *Escherichia coli* imp. 389. (Rivero-Cruz, 2008)

**Cuadro 6.** Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Compuesto	Estructura	Referencia
<b>Floroglucinol</b>		Rivero Cruz, 2008
<b>Ácido 4-hidroxi-cinámico</b>		Rivero Cruz, 2008
<b>Ácido cafeico</b>		Rivero Cruz, 2008
<b>Ácido gálico</b>		Rivero Cruz, 2008
<b>Galato de metilo</b>		Rivero Cruz, 2008



**Cuadro 6 (Continuación).** Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

<i>Compuesto</i>	<i>Estructura</i>	<i>Referencia</i>
<b>5-metoxisoraleno</b>	 <p>The structure shows a soralenone skeleton with a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 5-position of the central benzene ring.</p>	Rivero Cruz, 2008
<b>Hematoxilina</b>	 <p>The structure shows a complex polycyclic molecule with multiple hydroxyl groups (-OH) and a central oxygen atom in a ring system.</p>	Pratt y Yuziriha, 1959
<b>Brazilina</b>	 <p>The structure is very similar to Hematoxilina, showing a complex polycyclic molecule with multiple hydroxyl groups and a central oxygen atom.</p>	Pratt y Yuziriha, 1959

**Cuadro 7.** Algunas propiedades farmacológicas de la hematoxilina y de la brazilina.

<b>Propiedad farmacológica</b>	<b>Hematoxilina</b>	<b>Brazilina</b>	<b>Referencia</b>
Antiinflamatoria	+	+	Hikino <i>et al.</i> , 1997
Inhiben de manera dependiente las concentraciones inducidas por KCl y CaCl <sub>2</sub> en aorta de rata	+	+	Xie <i>et al.</i> , 2000
Antiséptica	+	+	Takechi y Tanaka, 1982
Disminuye niveles de glucosa en ratones diabéticos		+	Moon <i>et al.</i> , 1985 y 1993; Kim <i>et al.</i> , 1998
Inhibidor competitivo con ATP en c-Src	+		Li-Gen <i>et al.</i> , 2008
Antimicrobiana	+	+	Beak <i>et al.</i> , 2000; Martinez, 2001 Punsrirat <i>et al.</i> , 2007
Antihipertensiva	+	+	Punsrirat <i>et al.</i> , 2007
Antioxidante	+	+	Punsrirat <i>et al.</i> , 2007
Anticonvulsiva	+	+	
Incrementa los niveles de IgM (posible utilidad para enfermedades autoinmunes)		+	Choi <i>et al.</i> , 1997
Inhibidor de la actividad de Proteínas tirosina cinasa (PTKs), particularmente de la c-Src tirosina cinasa	+		Li-Gen <i>et al.</i> , 2008
Bloquea la fosforilación de tirosina cinasa.	+		Li-Gen <i>et al.</i> , 2008
Agente vasorelajante	+	+	Yi-Wu <i>et al.</i> , 2000
Biosensor	+		Nasirizadeh <i>et al.</i> , 2009
Utilizado en técnicas de tinción de mielina	+		Kutscher <i>et al.</i> , 1987
Utilizado como colorante en tinciones histológicas.	+		Waldeyer, 1985; Titford, 2005
Colorante de telas (seda, algodón, lino)	+		Slightly y Frey, 1868; Cardón, 2007

### 2.3.5. Hematoxilina: historia y compuestos relacionados.

La hematoxilina era obtenida inicialmente a partir del palo de Campeche (*Haematoxylon campechianum*), árbol que crece en América Central y el Caribe. Al arribo de los europeos en busca de oro y plata a la Península de Yucatán a fines del siglo XV, se encontraron con el uso del palo tinto, llamado por los habitantes Mayas “**ek**”, que era utilizado para teñir algodón, así como para fines medicinales. Aún cuando inicialmente no fue reconocido su inmenso valor, esta densa madera, llamada en esa época “*Bois de Campeche*” y “logwood” por los ingleses, era utilizado como lastre para los barcos que regresaban a Europa. Una vez que la utilidad de logwood se hizo evidente, cantidades cada vez mayores fueron enviadas a Europa (Cooksey, 2009).

Sin embargo, en Inglaterra, una ley del Parlamento en 1581 prohibió el uso de palo tinto como colorante, alegando que era "falso y fraudulento" y que "sólo se vendió y lanzó para engañar a la realeza y a las Reinas dentro de su reino en Inglaterra y en las colonias para el gran descredito y difamación tanto de los comerciantes como de los tintoreros del reino". La verdadera razón era proteger la producción del glasto (*Isatis tinctoria*). El decreto fue derogado en Inglaterra en 1662, sin embargo, en otros países europeos la prohibición permaneció por al menos otros cien años.

Una vez que la alquimia evolucionó hacia la química moderna a finales del siglo 18, muchas investigaciones se realizaron a las plantas, particularmente en Francia. Un logro notable fue el desarrollo de técnicas para el aislamiento y la cristalización de sustancias. Los precursores tintóreos de la madera brazilina y hematoxilina fueron descubiertos durante este período (1810-1812). Aún cuando la fórmula molecular de ambos compuestos fue determinada, las estructuras moleculares no fueron elucidadas hasta el siglo XX (Cooksey, 2009). Tan pronto como la popularidad del árbol denominado “logwood” se incrementó para utilizarlo como colorante, las cantidades colectadas se incrementaron dramáticamente de 1000 ton/año en 1690 a miles de ton/año en el siglo XIX, teniendo el pico de

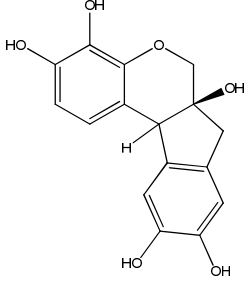
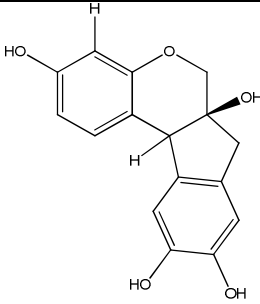
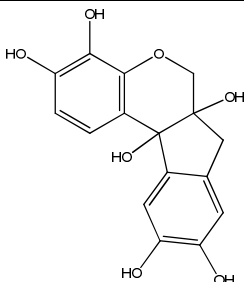
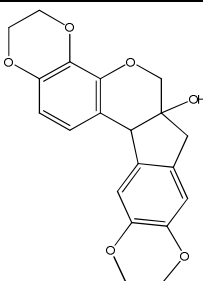
producción en 100,000 ton/año en 1896. Durante el siglo XX su popularidad decreció y solo hubo un repunte durante las Guerras Mundiales (Cooksey, 2009; Smith, 2006). De tal forma que la utilización de la hematoxilina en los laboratorios de histología y de citología, es el resultado de siglos de guerra, conflictos, y descubrimiento (Cooksey, 2009; Smith, 2006).

Las razones mencionadas dieron pie a continuar con las investigaciones acerca de la hematoxilina, descubriendo así algunos productos derivados de la oxidación de ésta, uno de ellos es la hemateína. Ambos compuestos, son los principales antibacterianos y colorantes de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karts, además de la brazilina (Lalor *et al.*, 1959; 1962; Craig *et al.*, 1965).

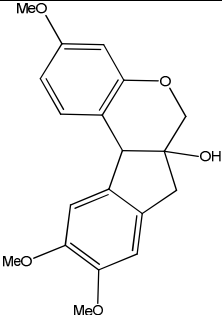
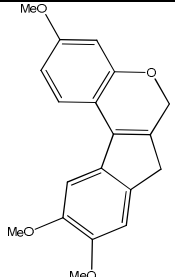
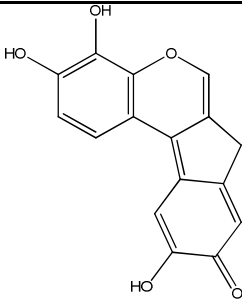
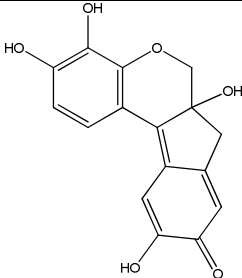
Algunos de estos compuestos, derivados de la oxidación de la hematoxilina, así como otros obtenidos a través de síntesis parciales de ésta o derivados se muestran en el **Cuadro 8**.

Por otra parte, la hematoxilina y sus derivados han sido de gran utilidad a lo largo de la historia (**Cuadro 9**), en las tinciones biológicas y por sus actividades antimicrobianas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticonvulsivantes (Cooksey, 2009; Smith, 2006).

**Cuadro 8.** Hematoxilina y compuestos derivados.

Compuesto	Estructura	Referencia
Hematoxilina		Pratt y Yuziriha, 1959
Brazilina		Mićović y Robinson 1937.
Hidroxihematoxilina		Lalor y Martin, 1959; Lalor, 1962.
o-dietilhematoxilina		Morshing y Robinson, 1970

**Cuadro 8. (Continuación)** Hematoxilina y compuestos derivados.

Compuesto	Estructura	Referencia
O-trimetilbrazilina		Perkin <i>et al.</i> 1928
Deoxitrimetilbrazilona		Perkin <i>et al.</i> 1928
Isohemateína		Mićović y Robinson, 1937
Hemateína		Havas, (1986)

**Cuadro 9.** Usos de la Hematoxilina y compuestos relacionados, a lo largo de la historia.

Compuesto	Época	Uso	Referencia
Palo tinto	Finales del siglo XV	Mayas: para teñir algodón y para usos medicinales. Europeos: lastre para los barcos y posteriormente como colorante	Davies, 2008
Hematoxilina y palo tinto	Siglo XVI y XVII	Utilizados por los Mayas y los Aztecas, para una variedad de colores pastel. En Francia, E.U.A. y América del sur, se utilizaba para teñir: cuero, seda y papel.	Schweppe, 1993
Hematoxilina y hemateína	1864	Utilizado en tinciones en histología y citología.	Conn, 1925
Hematoxilina	1943	Utilizado para teñir cuero, lino y algodón	Cardon, 2007
Brazilina y hematoxilina	2007	Antimicrobiano, antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, anticonvulsivante.	Punsrirat, 2007

### 3. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad la poca eficacia, resistencia, toxicidad y alto costo de los antibióticos han 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. Por otra parte, es importante destacar que las infecciones ocasionadas por patógenos resistentes tienen altas tasas de morbilidad y mortalidad, y suponen un mayor costo que las causadas por bacterias sensibles; por ello es necesario recurrir a antibióticos más caros y/o tóxicos, esto es debido a los mecanismos de resistencia a antibióticos, siendo estos fundamentalmente de tres tipos: a) Inactivación de las sustancias antibacterianas por destrucción o modificación, b) Difícil acceso al sitio de acción, por disminución de la permeabilidad o por extrusión activa y, c) Alteración del blanco de acción.

Por último, cabe destacar que, en México contamos con una gran variedad de especies vegetales que presentan actividad antibacteriana, mismas que han sido empleadas tradicionalmente desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de diversas enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos. En el caso particular de la especie *H. brasiletto* utilizada para el tratamiento de padecimientos renales, problemas cardiovasculares, antidiabéticos, antisépticos, antipirético, control de la ictericia, así como por propiedades antimicrobianas, por tan solo citar algunos.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivos Generales:

- Aislar compuestos con actividad antibacteriana a partir del extracto de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst.
- Realizar el estudio químico biodirigido del extracto de acetato de etilo de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

### 4.2. Objetivos Particulares:

- Determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst frente a las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.
- Purificar y caracterizar los compuestos activos aislados del extracto de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karts.
- Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados frente a *Streptococcus mutans*.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL.

### 5.1. Material vegetal.

La corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst se compró en pasillo 6 del Mercado de Sonora en la Ciudad de México. Una muestra de referencia se encuentra en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 5.2. Procedimientos generales.

#### 5.2.1. Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kiesegel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM, Sephadex LH-20 (Fluka) y C<sub>18</sub> Bakerbond (40 µm, Baker). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica o preparativa 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 (60F<sub>254</sub> Merck®, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM] de 0.25 mm de espesor. Las placas fueron reveladas con tricloruro de fierro al 5%, vainillina sulfúrica y vainillina en HCl seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa. Cabe destacar que antes de ser reveladas, dichas placas fueron visualizadas a dos longitudes de onda (254 y 365 nm).

#### 5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizó en la Unidad de Servicios 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 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-<sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un equipo marca Varian, modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron utilizando CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

### **5.2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Shimadzu modelo 10 A VP equipado con un detector de UV dual. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software LCsolution versión 1.22 SP1. La separación y la purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de sílica gel C-18 (Waters, X-bridge, 5µm OBD, 19 x 50 mm). La detección se ajustó a 254 nm.

## **5.3. Estudio químico de *Haematoxylon brasiletto* Karst.**

### **5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de *H. brasiletto*.**

La corteza seca y molida (2 Kg) se sometió a un proceso de extracción utilizando agua caliente (2.0 L) por un período de 1 hora. Después de filtrar, el extracto se evaporó a presión reducida y se obtuvieron 112 g de un sólido rojo oscuro.

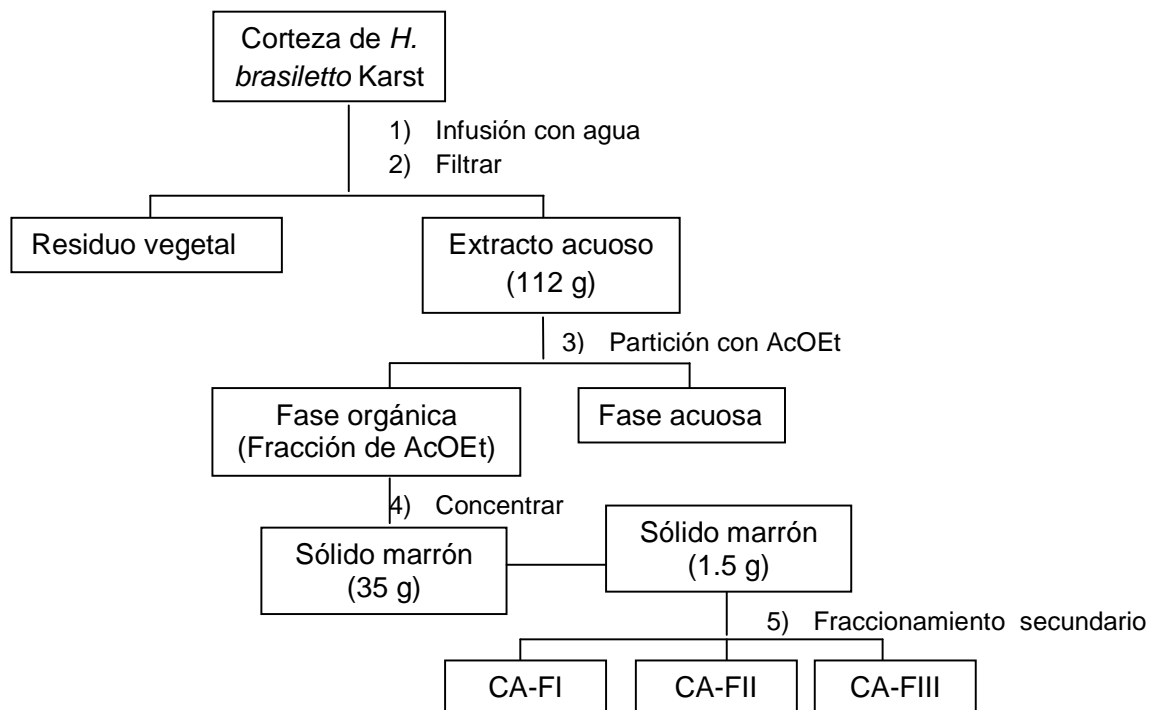
### **5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto derivado de la corteza de *H. brasiletto*.**

El extracto se sometió a un proceso de fraccionamiento primario utilizando un método de partición y como disolventes agua y acetato de etilo. La fase orgánica (AcOEt) se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniendo 35 g de un sólido amorfo de color naranja-marrón

### 5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición de acetato de etilo de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Una porción de 1.24 g de la fracción de AcOEt derivada de la partición del extracto de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst se sometió a un proceso de cromatografía en columna abierta (24 x 5 cm) utilizando Sephadex LH-20 como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se colectaron 24 eluatos de 50 mL cada uno, los cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica en tres fracciones combinadas (CA-FI – CA-FIII). El **Diagrama 1** resume el proceso de fraccionamiento del extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de *H. brasiletto* Karst, mientras que el **Cuadro 10** muestra el fraccionamiento primario del extracto acuoso.

**Diagrama 1.** Procedimiento del fraccionamiento primario y secundario del extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de *H. brasiletto* Karst



**Cuadro 10.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatográfica de la fracción de AcOEt de *H. brasiletto* Karst.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1 - 24	1 – 3	CA-FI	47.1
		4 – 14	CA-FII	1277
		15 – 24	CA-FIII	155.6

#### 5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CA-FII.

Posteriormente se realizó la cromatografía en columna de la fracción CA-FII, utilizando Sephadex LH-20 (24 x 5 cm) como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se recolectaron 20 fracciones de 50 mL. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que resultaron ser similares, generándose así 6 fracciones terciarias (CB-FI a CB-FVI). En el **Cuadro 11** se resume el proceso cromatográfico.

**Cuadro 11.** Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CA-FII.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1 – 20	1 – 3	CB-FI	23.9
		4 – 7	CB-FII	44.8
		8	CB-FIII	11.6
		9	CB-FIV	54.5
		10 – 17	CB-FV	499.5
		18 – 20	CB-FVI	432.0

### 5.3.5. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CB-FV.

La fracción CB-FV se sometió a una cromatografía en columna, utilizando Sephadex LH-20 (24 x 5 cm) como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se recolectaron 25 fracciones de 50 mL, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina, reuniendo aquellas de naturaleza semejante, resultando 3 fracciones (CC-FI a CC-FIII), tales se muestran en el **Cuadro 12**.

**Cuadro 12.** Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CB-FV.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1 - 25	1 - 4	CC-FI	14.6
		5 - 7	CC-FII	262.8
		8 - 25	CC-FIII	202.1

### 5.3.6. Cromatografía en columna utilizando Sílica gel C18 de la fracción activa CC-FII.

La fracción CC-FII, fue sometida a una columna de vidrio, utilizando C18 como adsorbente, y como fase móvil, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1). Se recolectaron 27 fracciones de 50mL, las cuales, fueron analizadas por cromatografía en capa fina, reuniendo aquellas que resultaron ser semejantes, obteniéndose nueve fracciones totales (CH-FI a CH-FIX), las cuales se resumen en el **Cuadro 13**.

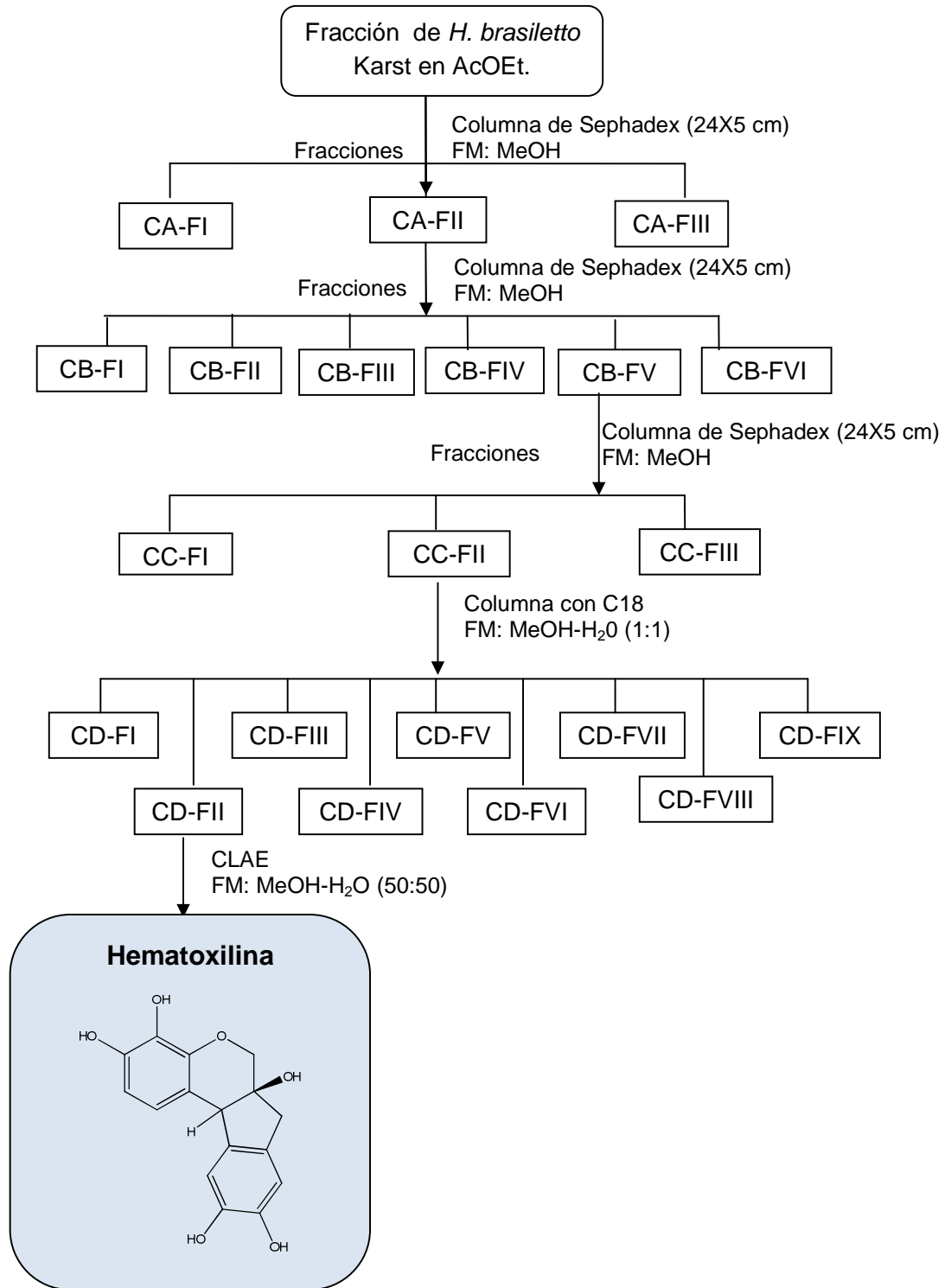
**Cuadro 13.** Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CC-FII.

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Claves	Peso (mg)
MeOH- H <sub>2</sub> O	1:1	1 - 27	1 – 3	CD-FI	5.7
			4 – 6	CD-FII	9.7
			7	CD-FIII	28.4
			8 – 11	CD-FIV	64.6
			12 – 16	CD-FV	60.8
			17 – 19	CD-FVI	7.9
			20	CD-FVII	34
			21 – 27	CD-FVIII	36.5
MeOH	100	28→	28→	CD-FIX	11.2

**5.3.7. Purificación de la hematoxilina presente en la fracción activa CD-FII por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).**

La resolución mediante CLAE de la fracción CD-FII se realizó en una columna de fase reversa de C18 utilizando un flujo 3 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria constituida por metanol-agua, en proporción 50:50.

Diagrama 2. Fraccionamiento de la partición de *H. brasiletto* Karst en AcOEt





## 5.4. Ensayos biológicos

### 5.4.1. Microorganismos de prueba

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de *H. brasiletto* 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 como medio de cultivo y para *P. gingivalis* 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%).

### 5.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

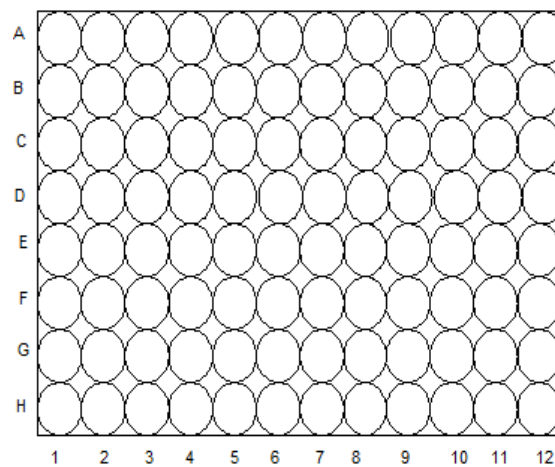
La determinación de la actividad antibacteriana de los compuestos ó Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Los cultivos de cada microorganismo fueron incubados por una noche, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm/10 minutos 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 a una turbidez correspondiente al Standard de Mac Farland de 2. Cada pozo contenía  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para *S. mutans* ó  $5 \times 10^6$  UFC/mL para *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se trabajaron las muestras por triplicado para cada concentración de prueba.

### 5.4.3. Procedimiento general del ensayo.

Se adicionaron 100 µL de medio BHI en todos los canales, posteriormente se adicionaron 100 µL, del componente a probar en un pozo del primer canal, de igual forma se adicionaron 100 µL del control positivo.

En seguida se realizaron 12 diluciones, lo cual se llevó a cabo, transfiriendo 100  $\mu\text{L}$ , de canal a canal, desechando los últimos 100  $\mu\text{L}$ , del último canal. Después se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de medio con 1% de sacarosa, en todos los canales, y finalmente se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de *S. mutans* en cada canal.

Las placas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37°C, en una incubadora Labnet 211DS: para después leerlas y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).



**Figura 6.** Distribución de los canales en la placa Sarstedt.

Los controles utilizados fueron el medio de cultivo inoculado con las bacterias de prueba, medio sin inocular como control de esterilidad y control de disolvente. 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 CO<sub>2</sub> (GasPack EZ CO<sub>2</sub>) para crear la atmósfera anaeróbica. El crecimiento se determinó espectroscópicamente (A<sub>660</sub> nm) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas.

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<sub>660</sub> nm. El control positivo fue gluconato de clorhexidina (CHX; Sigma, St, Louis,

MO, EU) que mostró valores de CMI de 1.2  $\mu\text{g/mL}$  contra *S. mutans* y 0.31  $\mu\text{g/mL}$  contra *P. gingivalis*.

#### **5.4.4. Determinación de la agregación de *S. mutans*, por el extracto de *H. brasiletto*.**

La bacteria *S. mutans* se inoculó ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.05 M, pH= 6.8) conteniendo varias concentraciones del extracto de palo de Brasil (1% - 10%) y se incubó a 37°. Los valores de densidad óptica ( $\lambda=550$  nm) fueron medidos a 0, 10, 30, 60 y 120 minutos.

#### **5.4.5. Determinación del efecto del extracto acuoso, de la fracción de acetato de etilo y de hematoxilina sobre la formación de la biocapa mono-especie.**

La bacteria *Streptococcus mutans*, que contenían el extracto acuoso a diferentes concentraciones, así como la fracción de AcOEt y la hematoxilina, crecieron en una placa de 96 pozos, y se les adicionó 1% de sacarosa. Posteriormente se dejó formar la biocapa por un periodo de 48 horas a 37°C .

Para la determinación de la cantidad de bacterias adheridas a cada uno de los pozos, se removieron las bacterias planctónicas no adheridas por aspiración posteriormente los pozos con las células adheridas, fueron secados al aire y en seguida se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de NaOH con la finalidad de disolver la biocapa. La estimación de la formación de la biocapa se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 660 nm utilizando una lectora de placas.

La concentración mínima inhibitoria de los compuestos, fracciones y extracto, se definieron como la concentración mínima que limita la turbidez a  $\leq 0.05$  a 660 nm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La preselección de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst fue realizada con base en un criterio etnomédico, ya que, la especie es ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional de México para el tratamiento de diversos padecimientos de la cavidad oral. La alta incidencia de padecimientos infecciosos en México y los estudios previos realizados utilizando extractos orgánicos de la corteza del árbol han demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella sp*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, con lo cual hacen de *H. brasiletto* un buen candidato para su estudio. Una vez preseleccionada la especie se procedió a realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto acuoso de la corteza del Palo Brasil.

La determinación del potencial antibacteriano del extracto acuoso se realizó mediante el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita (Rivero-Cruz *et al.*, 2008). Los resultados de la evaluación indicaron que el extracto posee una CMI de 256 µg/mL y 412 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Cabe mencionar que un extracto vegetal es considerado activo si presenta una CMI menor a 1000 µg/mL (Wu *et al.*, 2002; Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

El extracto activo inicial fue sometido a un fraccionamiento por partición utilizando como disolventes agua y acetato de etilo. Como resultado del proceso se obtuvo una fracción activa (AcOEt) con CMI de 150 y 103 µg/mL (**Cuadro 14**) para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente.

La fracción resultante de la partición (Partición de *H. brasiletto* en AcOEt) fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía de columna abierta utilizando Sephadex-LH20 como adsorbente y metanol como fase móvil. De este

fraccionamiento se obtuvieron tres fracciones (CA-FI, CA-FII y CAF-III), de las cuales la más activa resultó ser CA-FII, con una CMI de 225 µg/mL (**Cuadro 15**).

La fracción activa CA-FII se recromatografió utilizando Sephadex-LH20 como adsorbente y metanol como fase móvil. De este fraccionamiento se obtuvieron seis fracciones secundarias (CB-FI a CB-FVI), resultando la fracción CB-FV la de mejor actividad (**Cuadro 15**).

La fracción CB-FV se cromatografió utilizando como adsorbente Sephadex-LH20 y como fase móvil metanol. De este proceso se obtuvieron tres fracciones terciarias (CC-FI, CC-FII y CC-FIII), que también se sometieron al ensayo biológico, encontrando que la fracción CC-FII (CMI= menor a 125 µg/mL) presentaba la mejor actividad antibacteriana.

Finalmente, la fracción CC-FII se recromatografió utilizando sílica gel C18 y metanol-agua (50:50) como fase móvil, como resultado del proceso se obtuvieron solo 8 fracciones activas de nueve fracciones totales, destacándose las fracciones CD-FV (CMI=244 µg/mL) y CD-FVI (CMI=113 µg/mL).

A partir de la fracción CD-FV precipitó un sólido amorfo de color marrón, del cual se purificó el compuesto mayoritario, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Este compuesto fue identificado como la hematoxilina (**1**), por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas en la literatura. En el **Cuadro 16** se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno y las constantes de acoplamiento de la hematoxilina (**1**) para RMN-<sup>1</sup>H, en la **Figura 7a y 7b** se muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y de RMN-<sup>13</sup>C respectivamente y, en la **Figura 8** el cromatograma obtenido para la hematoxilina pura mediante CLAE. Dicho compuesto mostró una CMI de 150 µg/mL y 66 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente.

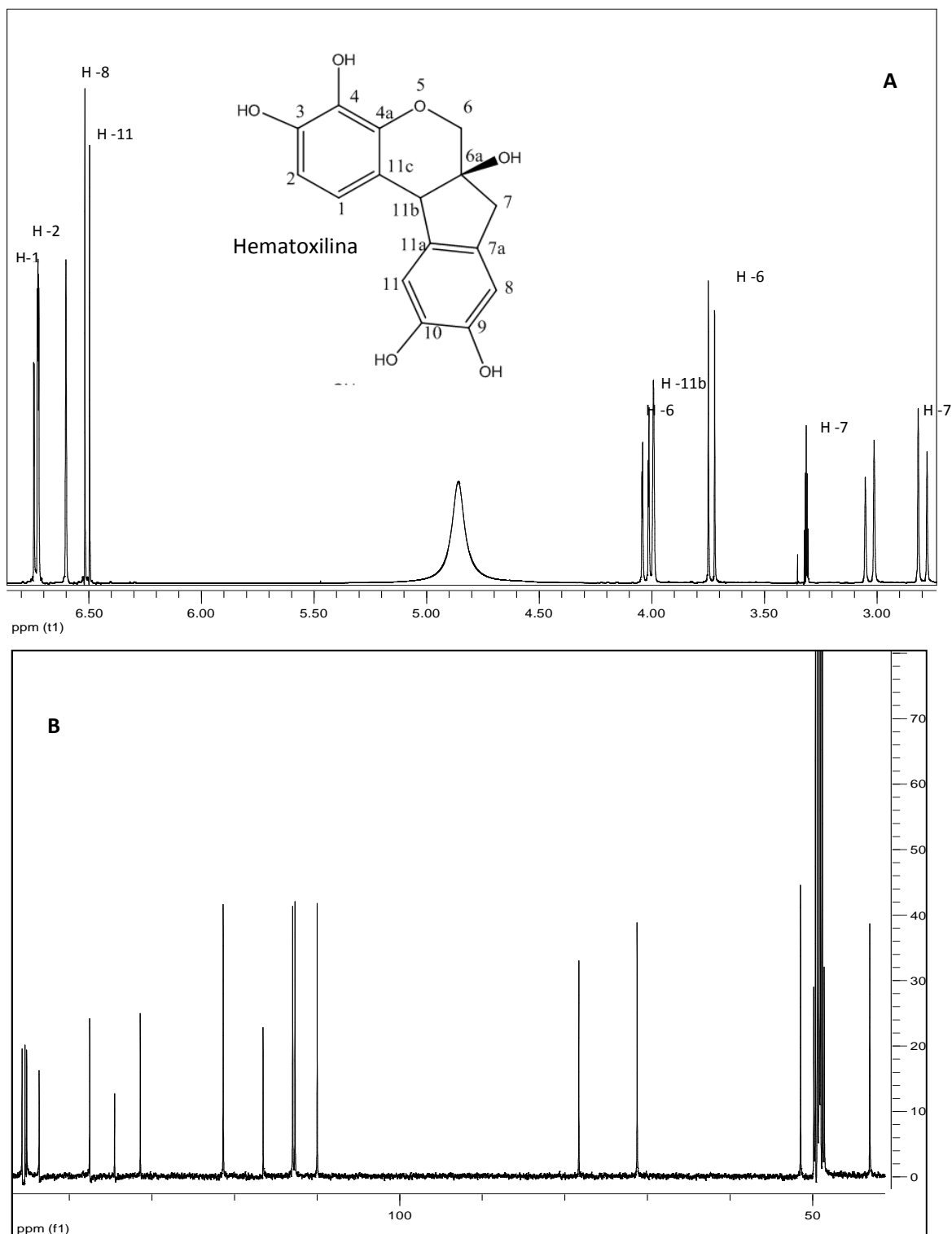
**Cuadro 14.** Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza de *H. brasiletto* Karts, así como de la partición de AcOEt y de la hematoxilina, frente a *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Fracción	CMI (µg/mL) frente a <i>S. mutans</i>	CMI (µg/mL) frente a <i>P. gingivalis</i>
Extracto acuoso	256	412
Partición de AcOEt	150	103
Hematoxilina	150	66

**Cuadro 15.** Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de la partición de AcOEt de *H. brasiletto*, frente a *S. mutans*.

Fracción.	CMI (µg/mL) frente a <i>S. mutans</i>	Fracción.	CMI (µg/mL) frente a <i>S. mutans</i>
CA-FI	490	CC-FIII	156
CA-FII	225	CD-FI	375
CA-FIII	>1000	CD-FII	460
CB-FI	>1000	CD-FIII	500
CB-FII	287	CD-FIV	263
CB-FIII	144	CD-FV	244
CB-FIV	312	CD-FVI	113
CB-FV	<100	CD-FVII	875
CB-FVI	>1000	CD-FVIII	625
CC-FI	206	CD-FIX	>1000
CC-FII	<125	CHX*:	1.2

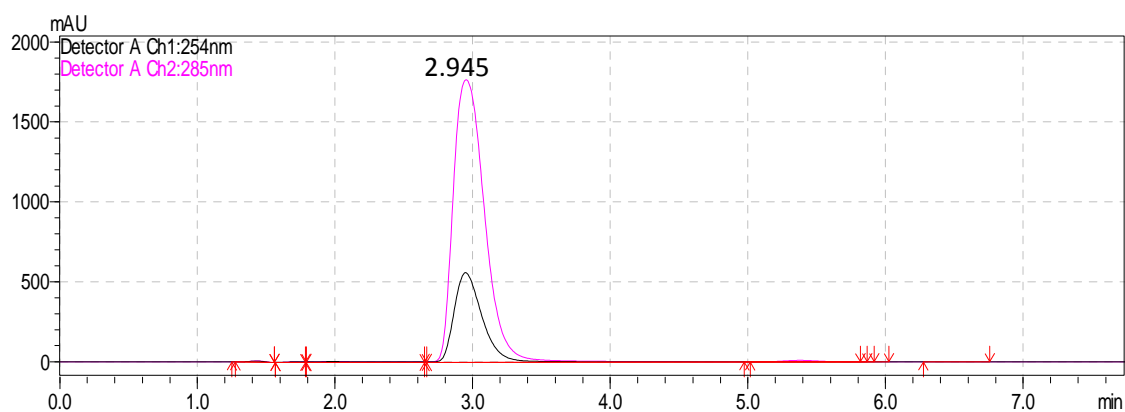
CHX\*: gluconato de clorhexidina.



**Figura 7.** En la parte superior (A) se muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , mientras que en la parte inferior (B) se muestra el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la hematoxilina.

**Cuadro 16.** Constantes espectrométricas de la Hematoxilina.

Posición	RMN ( $\delta$ H)	Posición	RMN ( $\delta$ H)
1	6.74 (d, $J= 8.0$ )	7a	-----
2	6.72 (d, $J=8.0$ )	8	6.51 (s)
3	-----	9	-----
4	-----	10	-----
4a	-----	11	6.49 (s)
5	-----	11a	-----
6	4.04 (d, $J=11.2$ ) 3.75 (d, $J=11.2$ )	11b	4.0 (s)
6a	-----	11c	-----
7	3.25 (d, $J=15.9$ ) 2.80 (d, $J=15.9$ )		

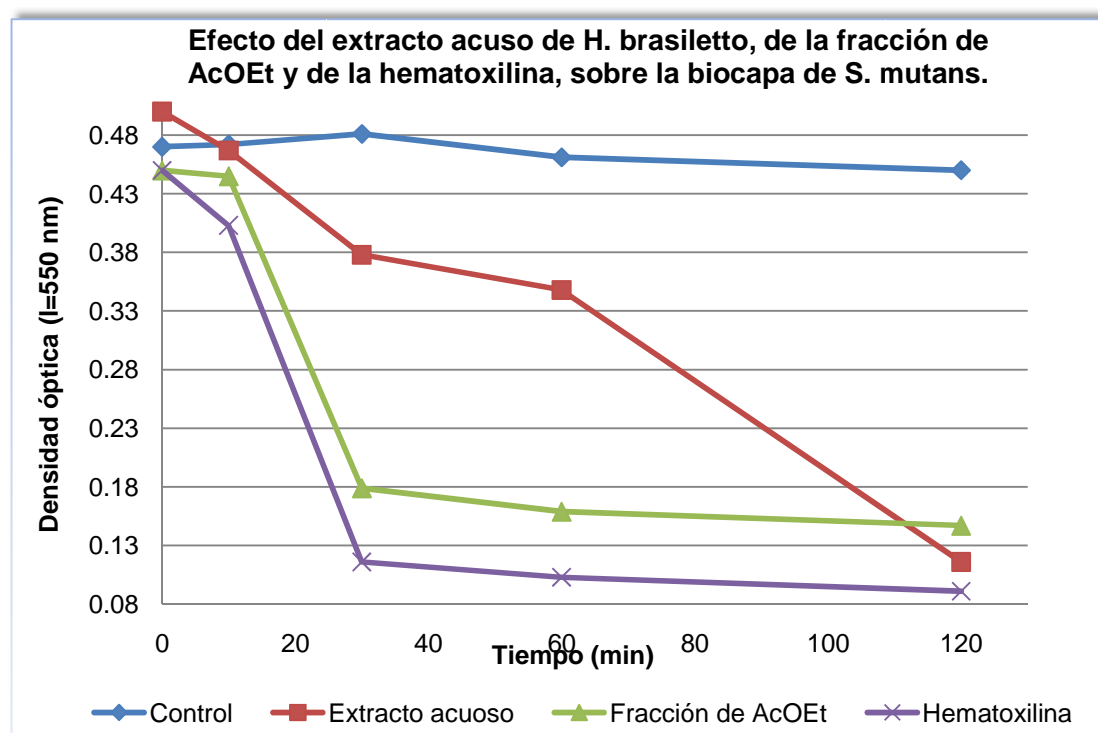


**Figura 8.** Cromatograma obtenido por medio de CLAE de la hematoxilina a dos longitudes de onda ( $\lambda= 254$  nm y  $\lambda= 285$  nm), mostrando un tiempo de retención de 2.945 min.



Con la finalidad de obtener mayor información acerca de los efectos del extracto acuoso, de la fracción de AcOEt y de la hematoxilina pura se decidió medir el efecto de cada uno sobre la formación de agregados por parte de la bacteria cariogénica *S. mutans*. Los resultados de este experimento indican que la hematoxilina presenta el mejor efecto sobre la agregación de la bacteria. En la **Figura 9** se observa que la hematoxilina induce un efecto máximo en el intervalo a partir de 60 minutos. Por otra parte, es importante mencionar que el extracto y la fracción de acetato de etilo presentaron una tendencia similar a la obtenida para la hematoxilina, sin embargo, el efecto observado fue menor.

La actividad presentada por la hematoxilina sobre la agregación de *S. mutans* es importante debido a que una vez que las bacterias se agregan ya no les es posible adherirse a las superficies para desarrollar biocapas, puesto que para poder hacerlo es necesario que éstas se encuentren de forma libre.



**Figura 9.** Efecto del extracto acuoso de *H. brasiletto*, de la fracción de AcOEt, así como de la hematoxilina, sobre la biocapa de *S. mutans*

Por otra parte, se determinó la concentración inhibitoria de la formación de la biocapa de *S. mutans* del extracto acuoso, la fracción de AcOEt y de la hematoxilina. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso de *H. brasiletto* inhibe la formación de la biocapa a una concentración de 512 µg/mL, mientras que la hematoxilina (1) tiene el mejor efecto sobre la supresión de la biocapa con una concentración de 98 µg/mL. En el **Cuadro 17** se resumen las concentraciones inhibitorias de la formación de la biocapa por el extracto acuso, fracción de acetato de etilo y hematoxilina.

**Cuadro 17.** Concentración inhibitoria del extracto acuoso, la fracción de AcOEt y de hematoxilina sobre la biocapa de *Streptococcus mutans*.

	CI (µg/mL) sobre la biocapa de <i>S. mutans</i>
Extracto acuoso	512
Fracción de AcOEt	156
Hematoxilina	98

## 7. CONCLUSIONES.

La información científica generada en esta investigación representa una contribución al conocimiento biológico de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst.

El efecto antibacteriano que presenta el extracto integro preparado a partir de la corteza del palo de Brasil y el uso en la medicina tradicional de la especie para el tratamiento de enfermedades infecciosas sustenta, de manera preliminar y parcial, la eficacia de esta especie medicinal.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto acuoso preparado a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst, permitió establecer las fracciones con propiedades antibacterianas de la especie. De acuerdo con la potencia mostrada por la hematoxilina aislada de la fracción activa CD-FV se concluyó que constituye el compuesto activo mayoritario del la corteza de palo Brasil. El extracto, la fracción de acetato de etilo y la hematoxilina pura presentan una menor actividad a la obtenida para el control positivo gluconato de clorhexidina (1.2 µg/mL).

La evidencia experimental obtenida en la presente investigación permite sugerir que tanto el extracto acuso de *H. brasiletto*, la fracción de AcOEt y la hematoxilina promueven la agregación de la bacteria criogénica *S. mutans*. Este efecto se encuentra estrechamente relacionado con la formación de las biocapas ya que para que las bacterias puedan adherirse a superficies como paso inicial para la formación de las biocapas es necesario que se encuentren en su forma libre o planctónica.

La presencia de la hematoxilina en el palo Brasil apoya el uso de la especie en la medicina tradicional para “fijar o amarrar” los dientes.

Por último, es importante destacar que el gluconato de clorhexidina puede ocasionar un cambio en el sabor, producir un incremento en el sarro de los dientes, tinción del dorso de la lengua; manchado o decoloración de los dientes,

boca, empastes y dentaduras u otros aparatos en la boca. La coloración de los empastes puede ser permanente y en algunos casos deberán ser sustituidos. Por otra parte, puede causar aunque con menor frecuencia irritación de la cavidad oral, hinchazón en los costados de la cara o el cuello e irritación de la punta de la lengua.

## 8. PERSPECTIVAS.

- Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar algunos de los compuestos minoritarios presentes, y posteriormente determinar su posible actividad biológica.
- Establecer el efecto de los extractos derivados de la corteza de *H. brasiletto* Karst y de los compuestos puros sobre las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto total de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst, así como sus compuestos minoritarios.
- Utilizar a la hematoxilina como modelo, para la síntesis total o parcial de compuestos análogos, que presenten una mayor actividad biológica contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

## 9. REFERENCIAS.

- Aguilera Galaviz L. A., M. en C. Padilla Bernal patricia, Aguilar Rodríguez R., 2004. "Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de la caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacateas", Revista de la Asociación Dental Mexicana, Volumen 61, No. 3, pp. 85-91.
- Allmann Amber, Noviembre 2009. "Streptococcus mutans: Tooth decaying Bacteria", obtenida de: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/allmann\\_amber.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/allmann_amber.htm)
- Argueta, V., Cano, A., Rodarte, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I (1-583). México D.F.: Instituto Nacional Indigenista, pp. 772, 1099. 1100.
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las Plantas de la medicina Tradicional Mexicana, Palo de Brasil, Haematoxylon brasiletto Karts, disponible en la pagina <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Palo%20de%20brasil&id=7910>, consultada el ocho de octubre de 2009 a las 5:04 pm.
- Bojanich A, Calamari SE, Cornejo LS, Barembaum S, Virga C, Dorronsoro S., 2003. Efecto de polímeros sobre los niveles de IgAs anti *Streptococcus mutans* y la producción de dextranos de *Streptococcus mutans autóctonos* (estudio *in vitro* e *in vivo*). Avances en Odontología, Vol. 19., No. 5., pp. 226-232.
- Bradshaw D, Marsh P, Hodgson R, Visser J. 2002. Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. Caries Res; Vol. 36: pp. 81-86.
- Cardon D., 2007. Natural Dyes: Sources, Tradition, Technology and Science. Archetype Publications, London. ISBN 978-1-904982-00-5. 778 págs.
- Caufield P, Dasanayake A and Li Y., 2001. The antimicrobials approach to caries management. J Dent Educ; Vol. 65, pp. 1091-95.

- Choi S. Y., Moon C. K. 1997. Effects of brazilin on the altered immune functions in the early phase of halosthano of C57BL/6 mice. *Planta Médica*. Vol. 63., pp. 400.
- Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H., Hwang, J.K. 2006. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 13, 261-266.
- Conn HJ, 1925. *Biological Stains. A Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory*. The Commission on Standardization of Biological Stains, Geneva, NY.
- Cooksey, C., 2009. Hematoxylin and related compounds -an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications', *Biotechnic and Histochemistry*, Vol. 84 No. 4, pp. 123 -134.
- Davies BH, 2008. Logwood under the microscope. *Dyes Hist. Archaeol.* 21: 181-189.
- Del Pozo J.L. y Patel R., 2007. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections., *Translational Medicine, Clinical Pharmacology and Therapeutics.*, Vol. 82 No. 2., pp 204-209.
- Diversidad de especies, *Revista digital de la Universidad Autónoma de México*, disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.1/num2/sabias/despecies.html>, consultada el ocho de octubre de 2009 a las 4:15 pm.
- Donlan R and Costerton W.. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev* 2002; 15: 167-193.
- Finegold, S. M., et al., 1975 "Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients Cancer", , Vol. 35, pag. 3407-3417.
- Gamboa Fredy, Herazo Acuña Benjamin, Martinez Maria C., 2004, "Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica", *Revista de la Facultad de Ciencias, Universitas Scientiaru*, Vol. 9, pp. 45-55.
- Hatta H, Tsuda K, Ozeki M., 1997, Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*; 31: 268-274.

- Hamada, S., N. Masuda, and S. Kotani. 1980. Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. *J. Clin. Microbiol.* 11:314-318.
- Hamilton I. 1990. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*; 69: 660-67.
- Herazo, B. 1993. *Clínica del sano en odontología*, segunda edición, Ediciones Ecoe, Bogotá, D.C., Colombia, 125 págs.
- Hikino H., Taguchi., Fujimura H., Hiramatsu Y. 1977. Antiinflammatory principles of *Casalpina sappan ood* and *Haematoxylon campechianum* Wood. *Planta Médica*, pp. 31, 241-220.
- Inoue, M., S. Hamada, S. Kotani, and K. Kato. 1979. "Enzymatic lysis and structure of the cell walls of *Streptococcus mutans* BHT". *Arch. Oral Biol*, Volumen 24, pág. 529-537.
- Instituto de Biología. a. "*Haematoxylon brasiletto* Karst - IBUNAM: MEXU:OAX204783". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2008-10-22. Universidad Nacional Autónoma de México. . Disponible en:<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX204783>
- Isidro Vitoria Miñana. Sección Nutrición Infantil. Hospital Xàtiva. Valencia, 2004., Promoción de la Salud Bucodental, obtenido el 18 de abril de 2009, de la pagina web: [http://repositorio.ine.gob.mx/ae3/ae\\_004336\\_-83p.pdf](http://repositorio.ine.gob.mx/ae3/ae_004336_-83p.pdf) , 1:19 , 13/01/10.
- Kasemura, K., Nomura, M., Tada, T., Fujihara, Y., Shimomura, K. (2002). Antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of 6-[(8Z)-8-pentadecenyl]salicylic acid derivates. *Journal of Oleo Science*, 51 (10), 637-642.
- Kilian, M., E. Theilade, and C. R. Schiott. 1971. "Isolation of *Streptococcus mutans* from human faeces". *Arch. Oral Biol*. Volumen 15, pag. 553-554.
- Kubo, I., Nihei, K., Tsujimoto, K. (2003). Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7624-7628.



- Kutscher Charles L., Cheek Monica, Borski Kurt and Maucher Jill, 1987. Hematoxylin and Thionin Techniques for Staining Myelin and Cells: Variations and Critical Steps'. *Brain Research Bulletin*, Vol. 19, pp. 161-166.
- Leguminosae Caesalpinioideae Haematoxylon brasiletto Karst, disponible en la página web: [http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos\\_especies\\_y\\_anexos/haematoxylon\\_brasiletto.pdf](http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/haematoxylon_brasiletto.pdf).
- Liebana J, 2002, Microbiología oral., Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, 677 págs.
- Li-Gen Lin, Xua Xie, Hong-Lin Li, *et al.* 2008. Naturally Occurring Homoisflavonoids Function as Potent Protein Tyrosine Kinase Inhibitors by c-Src-Based High-Throughput Screening, *Med. Chem.* Vol. 51., pp. 4419-4429.
- Loesche, W. J., S. A. Syed, E. Schmidt, and E. C. Morrison, 1985, Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis, *J. Periodontol.* 56: 447-456.
- Martínez Luna Emma (Tesis de Maestría), 2001, "Compuestos antimicrobianos aislados de las especies *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth (Asteraceae) y *Haematoxylon brasiletto* karst (Leguminosae)".
- Medina Asensio Jesús, 2ª edición, 2000, "Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones", Ed. Días de santos, pág. 59-60.
- M.D. Arthur H. Cohen., 1975. Hematoxylin bodies: Their appearance in renal tubular epithelium. *Human Pathology*. Vol. 6. No. 6., pp. 741-744.
- Moon C., Yun Y. P., Lee J. H., Wagner H., Shin Y. S. 1985. Inhibition of lens-aldose reductase activity by brazilin and hematoxylin. *Planta Médica*. Vol. 1., pp. 66-67.
- Mouton C., 1995., Bacteriología bucodental. Versión española de la obra original en la lengua francesa. Masson S. A. Barcelona, España, 183 págs.
- Muñeton Perez Patricia, 2009, Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria*, Vol. 10., No.

- 9., obtenido a partir de la pagina web:  
<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Murphy-Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
  - Mustafa Murat Kocaka, Suat Ozcanb, Sibel Kocakb, Ozgur Topuzc, Hulya Ertend., 2009. Comparison of the Efficacy of Three Different Mouthrinse Solutions in Decreasing the Level of *Streptococcus Mutans* in Saliva. *European Journal of Dentistry*. Vol. 3, pp. 57-61.
  - Navid Nasirizadeh, Hamid R. Zare, 2009. Differential pulse voltammetric simultaneous determination of noradrenalin and acetaminophen using a hematoxylin biosensor., *Talanta*. Vol. 80., pp. 656-663.
  - Osawa, K., Miyazaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., Ooshima, T. (2001). Identification of caristatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J. Dent. Res.* 80 (11), 2000-2004.
  - Padilla, Carlos; Lobos, Olga; Villagra, Cristian; Padilla, Andrés., 2007, Susceptibilidad de cepas de *Streptococcus mutans* productores y no productores de biofilm frente a clorhexidina, triclosán y fluoruro de sodio utilizadas en colutorios orales. *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas.*, ISSN 0718-4743. Vol. 1, No. 2., pp. 23-28.
  - Pawlak K, Puchalska M, Miszczak A, Rosloniec E, Jarosz M (2006) Blue natural organic dyestuffs from textile dyeing to mural painting. Separation and characterization of coloring matters present in elderberry, logwood and indigo. *J. Mass Spectrom.* Vol. 41, pp. 613-622.
  - Prabu, G. R., Gnanamani, A., Sadulla, S. (2006). Guaijaverin-a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 101, 487-495.
  - Pratt R., Yuzuriha Y., 1959. Antibacterial activity the heartwood of *Haematoxylon brasiletto*. *Journal American Pharm. Assoc.* Vol. 48. pp. 69-72.

- Rendón Aguilar Beatriz et. Al, 2001, "Plantas, culturas sociedad: estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas del siglo XXI", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 317 págs
- Revista de Medicina, Buenos Aires, Vol. 54, No. 5/ 1- 1994, pág. 446.
- Rivero-Cruz J. Fausto., 2008, "Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*", Journal of Ethnopharmacology, Volume 119, pp 99-103.
- Rivero-Cruz, J. F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. 2008. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. Phytochemistry Letters, 1, 151-154.
- Rodriguez, A.; Gonzáles, O.A. 2000. Fisiopatología de la caries dental. *Universitas Odontológica* 20 (suppl 1): 21-27.
- Schweppe H., 1993. Handbuch der Naturfarbstoffe: Vorkommen, Verwendung, Nachweis. Ecomed, Landsberg/Lech ISBN 360965130X (3 933203 46 5).
- Shigeyuki Hamadat and Hutton D. Slade, 1980. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological Reviews, Vol. 44. No. 2. pp. 331-384.
- Slade, H. D. 1978. "Specific binding of glucosyltransferase by *Streptococcus mutans* and its effect in the adherence of the organism", pag. 14-16. En E. L. Kaplan and A. V. taranta (ed), Infective endocarditis, American Heart Association Monograph No. 52. American Heart Association, Dallas.
- Smith C., 2006. Our debt to the logwood tree: the history of hematoxylin. Med. Lab. Obs. Vol. 38., No 18., pp. 20-22.
- Tamsiririrkkul R, Punsrirat J, Ruangwises N, Wongkrajang Y, Nakornchai S., 2007 Determination of haematoxylin and brazilin in *Caesalpinia sappan* extract from various locations in Thailand by high performance liquid chromatography. *Planta Med.* 73: 901.
- Thomson, L. A., W. H. Bowen, W. A. Little, H. M. Kuzmiak-Jones, and I. M. Gomez. 1979,"Simultaneous implantation of five serotypes of *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats". *Caries*, Volumen 13, pag., 9-17

- 
- Tovar, S.; Zúñiga, E.; Franco, A.; Jácome, S.; Ruiz, J. 1999. III estudio nacional de salud bucal: Ministerio de Salud y Centro Nacional de Consultoría. Bogotá, D.C., Colombia, pag.350.
  - Walter J. Loesche, 1986, "Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay", Microbiological Reviews, Vol. 50, No. 4, pp. 353-380.
  - Wu, C. D; Wei, G. X., 2002. Tea as functional food for oral health. Nutrition. Vol. 18. pp. 443-444
  - Xic Y., Ming D., Xu H., Dong H., But P. P., 2000. Vasorelaxin effects of *Caesalpinia sappan* Involvement of endogenous nitric oxide. Life Sciences. Vol. 67. pp. 1913-1918.
  - Yung-Huali, Peter C. Y. Lau, Janet H. Lee, Richard P. Ellen, y Dennis G. Cvitkovitch., 2000, Natural Genetic Transformation of *Streptococcus mutans* Growing in Biofilms., Journal of bacteriology, Feb. 2001, Vol. 183, No. 3., pp. 897–908.