



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

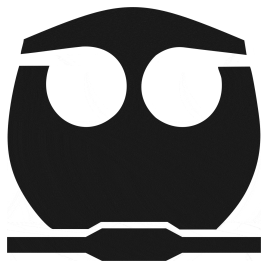
**ACTIVIDAD ANTIPLACA CONTRA *Streptococcus mutans* DEL
FLAVONOIDE AVICULARINA AISLADO DE LA INFUSIÓN DE
LAS HOJAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*)**

T E S I S

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

PRESENTA

PERLA SANDOVAL GUTIÉRREZ



México D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Jurado Asignado

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente: Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2do. suplente: Dr. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Perla Sandoval Gutiérrez





Agradecimientos

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de concluir esta etapa de estudios y por la formación académica recibida de cada uno de los profesores que forman parte de esta institución.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su enseñanza, apoyo y tiempo dedicado durante la realización del trabajo experimental, así como a la revisión del trabajo escrito.

A los miembros del jurado por darse el espacio para la revisión del presente trabajo y por sus observaciones realizadas en éste.

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

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





Dedicatoria

A mis padres, a quienes les agradezco infinitamente el esfuerzo que hicieron para que pudiera llegar hasta este momento, gracias por todo su apoyo, comprensión, compañía, cariño y paciencia.

A mi hermana Gise, que siempre ha estado conmigo apoyándome a pesar de todo, en las situaciones más difíciles, siempre teniendo las palabras adecuadas para llenarme de entusiasmo y valor. A mis hermanos Jaco y Ricky que me han ayudado siempre en todo aquello que necesitara, en fin por todos los momentos alegres que hemos tenido juntos.

A mis abuelos, tíos y primos que siempre tuvieron algún consejo para mí y por todas las veces en familia compartidas.

A mis amigos pasados y presentes: María José Gutiérrez, Donaji Heredia, Erika García, Edith García, Ángela Páez, Roque Ochoa, Ofelia Álvarez, Karla Montoya, Lucero de la Cruz, Víctor Gomero, Nadia Ramírez, Wendy, Miguel Munquía, Adriana Antonio, Claudia Nieto, Carlos Ibáñez, Susana Ibarra, Karina Cervantes, Yadira Soto. Con los cuales en su momento pase situaciones inolvidables, entre risas y llanto, alegrías y tristezas, angustia, desvelos en fin cuantas cosas que recordare para siempre, y otras tantas que aprendí de ellos; es esto que comparto con todos ustedes este logro. Al igual que con mi gran amigo Paul Chavira V. que siempre ha estado conmigo en todo momento.

Por último, no podría dejar de mencionar a mis nuevos amigos y compañeros del Lab 111: Gabriela Zarco E., Marisol Rosas G., Blanca Soto, Alicia Mejía, Alejandra Villegas, Carina Mendoza. quienes hicieron muy divertida y alegre la estancia en el Lab, que me contagiaron de sus risas y que también nos entristecimos juntas pero jamás permitieron que dejara de sonreír, gracias a ustedes. De igual forma gracias por su agradable compañía a Heysoldding, Elizabeth, Lupita, Ulises, Ingrid, Felix Cecilia.





Contenido

Jurado Asignado.....	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	iv
Lista de abreviaturas.....	viii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras y Diagramas.....	x

CAPÍTULO I

Introducción.....	11
-------------------	----

CAPÍTULO II

Antecedentes	13
2.1 CARIES DENTAL	13
2.1.1 Concepto	13
2.1.2 Etiología de la caries	14
2.1.3 Principales microorganismos implicados en la caries dental.....	16
2.2 PLACA DENTAL	17
2.2.1 Definición e importancia.....	17
2.2.2 Formación y desarrollo de la placa	18
2.2.3 Factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i>	19
2.2.4 Factores de riesgo	20
2.2.3 Relación de la ingesta con la formación de la caries	20
2.2.4 Agentes con actividad antimicrobiana contra la placa dental.....	21





2.3	<i>Psidium guayaba</i>	23
2.3.1	Descripción.....	23
2.3.2	Nombre comunes.....	23
2.3.3	Distribución geográfica	24
2.3.4	Composición química.....	24
2.3.4.1	Hojas.....	25
2.3.5	Usos y propiedades medicinales.....	25
2.3.5.1	Actividad antibacteriana	26
2.3.5.2	Antidiarreicos.....	27
2.3.5.3	Efectos sobre la placa dental	27
2.3.5.4	Antioxidantes	28

CAPÍTULO III

Justificación y Objetivos.....	34
--------------------------------	----

CAPÍTULO IV

Parte Experimental	36	
4.1	PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	36
4.1.1	Análisis cromatográficos.....	36
4.1.2	Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	37
4.1.3	Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia.....	37
4.2	MATERIAL VEGETAL.....	37
4.3	ENSAYO BIOLÓGICO.....	38
4.3.1	Microorganismo de prueba	38
4.3.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	38
4.4	ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i>	39





4.4.1	Preparación de la infusión de las hojas de <i>Psidium guajava</i>	39
4.4.2	Fraccionamiento primario del extracto derivado de las hojas de <i>P. guajava</i>	39
4.4.3	Fraccionamiento secundario de la partición del extracto con acetato de etilo-butanol...	40
4.4.4	Fraccionamiento terciario de la fracción activa A-FII.....	40
4.4.5	Fraccionamiento cuaternario de la fracción activa B-FIII.....	41
4.4.6	Fraccionamiento quíntuple de la fracción activa C-FV.....	41
4.4.7	Obtención y purificación del flavonoide avicularina a partir de la fracción activa D- FVI ..	44

CAPÍTULO V

Resultados y Discusión.....	45
5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la infusión de las hojas del guayabo sobre <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i>	46
5.2 Efecto de la avicularina sobre la agregación de bacterias	49

CAPÍTULO VI

Resumen y Conclusiones.....	51
-----------------------------	----

CAPÍTULO VII

Perspectivas	53
--------------------	----

CAPÍTULO VIII

Referencias.....	54
------------------	----





Lista de abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de Etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPP	Fosfopéptidos caseicos
Δ	Desplazamiento químico
D	Doblete
dd	Doble doblete
FAB	Bombardeo Atómico Acelerado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical libre)
FTF's	Fructosiltransferasas
GTF's	Glucosiltransferasas
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50%
J	Constante de Acoplamiento
mg	miligramo
L	Litro
μg	microgramo
MeOH	Metanol
MHz	megahertz
mL	Mililitro
Ppm	partes por millón
PAc	Proteína antigénica
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultravioleta





Índice de Tablas

Tabla 1. Factores etiológicos primarios de la caries	15
Tabla 2. Factores moduladores de la caries	16
Tabla 3. Principales bacterias que intervienen en la formación de la caries dental	17
Tabla 4. Principales factores de riesgo relativos a los microorganismos.....	20
Tabla 5. Agentes utilizados en la prevención de la caries que influyen en la biopelícula	21
Tabla 6. Usos etnomédicos de <i>Psidium guajava</i>	29
Tabla 7. Flavonoides reportados para la especie <i>Psidium guajava</i>	30
Tabla 8. Controles utilizados durante el ensayo biológico	39
Tabla 9. Cantidad obtenida del extracto realizado	40
Tabla 10. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la partición del extracto de las hojas de <i>Psidium guajava</i>	40
Tabla 11. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción A-FII....	41
Tabla 12. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción B-FIII....	41
Tabla 13. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción C-FV	42
Tabla 14. Actividad antibacteriana (CMI) del extracto acuoso, partición y avicularina sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	46
Tabla 15. Actividad antimicrobiana (CMI) de la avicularina y del gluconato de clorhexidina sobre las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	49





Índice de Figuras y Diagramas

Figura 1. Hojas de guayaba desecadas.....	23
Figura 2. Distribución geográfica en el mundo de <i>Psidium guajava</i>	24
Figura 3. Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba.....	44
Figura 4. Espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina	47
Figura 5. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (a) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (b) obtenidos para la avicularina.	48
Figura 6. Efecto de la fracción activa y la avicularina sobre la biocapa de <i>S. mutans</i>	50
Diagrama 1. Fraccionamiento de la infusión de las hojas de guayabo.....	43



CAPÍTULO

I

Introducción

El tema de las plantas medicinales es quizá tan antiguo como el hombre mismo, sin embargo, los conocimientos al respecto, siempre han sido diseminados. A pesar de la invasión farmacológica mundial, las personas siguen recurriendo a los remedios vegetales para aliviar sus enfermedades comunes, por ello un esfuerzo por regresar al empleo de los productos naturales representa un aporte muy significativo ya que son un recurso que debe conocerse, usarse y cuidarse como parte del rico patrimonio natural del país (Quesada, 2008).

Es indudable la importancia de las plantas y los árboles para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso de que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y, en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Núñez, 1982).

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos. Como toda institución social, la medicina tradicional mexicana ha cambiado en el curso de los siglos, interactuando con otros modelos terapéuticos para conformar



lo que llamamos el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el caso particular de México, se ha estimado que existen cerca de 30 000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó aproximadamente 3 000 con usos medicinales y según datos de la Organización Mundial de la Salud alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica existiendo una tendencia hacia lo natural como terapia alternativa de infinidad de dolencias. La salud bucal es parte integral de la salud general, y por lo tanto, es de gran importancia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En México, considerando que existe una población de aproximadamente 100 millones de personas, solamente existe un número limitado de estudios enfocados a la comprensión de los factores involucrados en el desarrollo de caries dental. Algunos estudios epidemiológicos estiman que alrededor del 95% de la población mundial se encuentra afectada (Aguilera *et al.*, 2004). A pesar de las mejoras en los servicios de salud, el acceso a la atención sanitaria bucodental es limitado.

Una mala salud bucodental puede tener profundas repercusiones en la salud general y en la calidad de vida. El dolor, los abscesos dentales, los problemas al comer o en la masticación, la pérdida de piezas y la existencia de dientes descoloridos o dañados tienen efectos importantes en la vida y el bienestar cotidianos de las personas (Miñana, 2004).

Tomando en cuenta que las enfermedades de la cavidad oral se encuentran entre las más comunes en México, el presente trabajo surgió como parte de un proyecto que plantea la investigación fitoquímica de las hojas de la especie *Psidium guajava* debido al uso que se le da para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).



CAPÍTULO

II

Antecedentes

La salud bucal se considera una parte integral del complejo cráneo-facial que participa en funciones vitales como la alimentación, la comunicación y el afecto, por lo tanto, la salud bucal está relacionada con el bienestar y la calidad de vida desde los puntos de vista funcional, psicosocial y económico. Entre las principales enfermedades que afectan la cavidad bucal figura la caries (De la Fuente *et al.*, 2008). Gran parte de la población la padece de forma innecesaria, debido sobre todo al estilo de vida (dieta e higiene bucal inadecuada), así como al acceso restringido a los servicios de salud odontológicos, la falta de cultura de la población en cuanto al cuidado de la boca y los altos costos que la atención odontológica representa, entre otros (De la Fuente *et al.*, 2008).

2.1 CARIES DENTAL

2.1.1 Concepto

Según la OMS, la caries dental se puede definir como 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.



La caries se caracteriza por una serie de complejas reacciones químicas y microbiológicas que acaban destruyendo el diente. Se acepta que esta destrucción es el resultado de la acción de ácidos producidos por bacterias en el medio ambiente de la pieza dental. Clínicamente, la caries se caracteriza por cambio de color, pérdida de translucidez y la descalcificación de los tejidos afectados. A medida que el proceso avanza, se destruyen tejidos y se forman cavidades (Miñana *et al.*, 2004).

2.1.2 Etiología de la caries

Es considerada como una enfermedad multifactorial, principalmente es producto de la interacción de los factores primarios: hospedero (diente y saliva¹), microorganismos y la dieta durante un determinado lapso (Cuenca *et al.*, 1994). La caries como enfermedad infecciosa se produce cuando se rompe dicho equilibrio (Henostroza *et al.*, 2005). [**Tabla 1**]

A través de los tiempos, se han preconizado diversas teorías acerca de la naturaleza etiológica de la caries, sin embargo las teorías microbianas empiezan a aparecer al final del siglo XIX (Henostroza *et al.*, 2005).

a) Proteolítica

Gottlieb, en 1944, sugirió que la matriz orgánica que forma una delicada red que recubre las superficies de los cristales de apatita del esmalte², era atacada antes que la porción mineral del esmalte. Los microorganismos, al hidrolizar las proteínas, dejan a la sustancia inorgánica desprovista de la estructura mecánica proteica que la soporta, lo cual ocasiona el desmoronamiento de los tejidos dentales.

Sin embargo, esta teoría no puede explicar que la incidencia de lesiones cariosas no se incrementa en determinados sectores de tejidos dentarios que tienen alto contenido orgánico.

¹ La saliva le aporta al esmalte de los dientes recién brotados iones de calcio y de fosfatos que permiten gradualmente incrementar su grado de mineralización y a la vez perfeccionar su estructura (Duque *et al.*, 2006).

² En la actualidad se conoce que la superficie externa del esmalte está en un constante intercambio iónico con el medio bucal (Duque *et al.*, 2006).





b) Proteólisis-quelación

Partiendo de la teoría proteolítica, se propuso que luego del proceso de proteólisis ocurriría una quelación. Esta teoría sostenía que los microorganismos causantes de la caries dental empiezan el proceso degradando enzimáticamente las proteínas, derivando en sustancias que disuelven la porción mineral del esmalte mediante un proceso denominado quelación, el cual se desarrolla por acción de moléculas orgánicas en forma de anillo, denominadas quelantes, las cuales al unirse a un ión forman una sal soluble por medio de enlaces covalentes.

c) Quimioparasitaria

Se afirma que las bacterias orales producen ácidos al fermentar carbohidratos de la dieta (específicamente el azúcar) y que tales ácidos (particularmente el láctico) disuelven el esmalte, ocasionando su deterioro.

El papel esencial de los microorganismos en la etiología de las caries fue instituido por Miller en 1980. Considerado el precursor de la microbiología dental, sostuvo que la evolución del proceso carioso tenía lugar en dos etapas: la primera ocasionaba la descalcificación o reblandecimiento de los tejidos dentales, por la participación de bacterias capaces de producir ácidos; y la segunda producía la disolución de las estructuras descalcificadas, por la intervención de microorganismos que degradan o digieren la sustancia orgánica (Henostroza *et al.*, 2005).

Tabla 1. Factores etiológicos primarios de la caries

	Diente	Saliva
HOSPEDERO	Genética Anatomía Posición	Flujo Tampón
AGENTE Microorganismo	<i>Streptococcus mutans.</i> <i>Lactobacilos sp.</i> <i>Actinomyces sp.</i>	
SUSTRATO Dieta-Medio-Azúcar	Carbohidratos → sacarosa Frecuencia de consumo	

❖ Adaptado de Henostroza *et al.*, 2005.





Para que se origine la enfermedad se requiere de la intervención adicional de factores moduladores [Tabla 2], los cuales contribuyen e influyen decisivamente en el surgimiento y evolución de las lesiones cariosas.

Tabla 2. Factores moduladores de la caries

Tiempo	Interacción de los factores primarios
Edad	Niños, adolescentes, adultos, ancianos
Salud general	Impedimentos físicos Consumo de medicamentos Enfermedades varias
Nivel socioeconómico	bajo, medio, alto
Experiencias pasadas de caries	Presencia de restauraciones y extracciones
Grupo epidemiológico	Grupos de alto y bajo riesgo
Variables de comportamiento	hábitos, usos y costumbres
Fluoruros	Remineralizadores y Antibacterianos

❖ Adaptado de Henostroza *et al.*, 2005.

2.1.3 Principales microorganismos implicados en la caries dental

En experiencias de laboratorio se consiguió producir *in vitro* caries dental en dientes humanos extraídos y asimismo, en animales de experimentación, alcanzándose importantes hallazgos. Se lograron identificar los microorganismos o bacterias relacionadas con el origen de la caries dental aislados a partir de lesiones cariosas activas (Henostroza *et al.*, 2005).

La cavidad bucal contiene una de las más variadas y concentradas poblaciones microbianas del organismo. Se estima que en ella habitan entre 200 y 300 especies y que en 1mm³ de placa dental, que pesa 1mg se encuentran 10⁴ microorganismos. Entre las bacterias presentes en la boca se encuentran tres especies principalmente relacionadas con la caries [Tabla 3]: *Streptococcus*





(subespecies *S. mutans*³ y *S. sobin*); *Lactobacillus* (subespecies *L. casei*, *L. fermentum*) y los *Actinomyces* (subespecies *A. israelis* y *A. nastundi*) (Henostroza *et al.*, 2005).

Tabla 3. Principales bacterias que intervienen en la formación de la caries dental

BACTERIAS	CARACTERÍSTICAS
<i>Streptococcus mutans</i>	Producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que permiten una gran formación de placa. Producen gran cantidad de ácidos a bajos niveles de pH. Rompen algunas glicoproteínas salivares importantes para impedir las etapas de desarrollo inicial de las lesiones cariosas.
<i>Lactobacillus</i> (bacilos gram negativos)	Aparecen cuando existe una frecuente ingesta de carbohidratos.
<i>Actinomyces</i>	Relacionados con lesiones cariosas radiculares. Raramente inducen caries en esmalte. Producen lesiones de progresión más lenta que otros microorganismos.

❖ Adaptado de Henostroza *et al.*, 2005.

2.2 PLACA DENTAL

2.2.1 Definición e importancia

La placa bacteriana⁴ se define como la agregación de múltiples bacterias activas de diferentes especies que se encuentran inmersas en una matriz extracelular compuesta principalmente de polisacáridos. La adhesión de los primeros pobladores de la placa a la superficie del diente tiene un papel importante en el inicio del desarrollo de la placa dental

³ *Streptococcus mutans*: Bacteria perteneciente a los estreptococos del grupo Viridans. Son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, asociados en parejas o cadenas (Coykendall, 1989).

⁴ Placa dental o bacteriana: Por sí sola no es dañina, hasta que no sea colonizada por microorganismos productores de toxinas causantes de la caries. Se caracteriza por ser una película pegajosa de color amarillento (Montes de Oca, 1989).





(Henostroza *et al.*, 2005), debido a que las bacterias de la placa en presencia de los azúcares, forman ácidos que son los que descalcifican y destruyen el esmalte de los dientes produciendo la caries (Módulo de Salud Oral, 2010) .

2.2.2 Formación y desarrollo de la placa

La formación de la placa dental pasa por diferentes etapas, como son:

- i. Formación de la película adquirida.- Se origina a partir de la precipitación de proteínas salivales, como la mucina y las proteínas ricas en prolina.
- ii. Colonización bacteriana, que incluye 2 tipos de interacciones:
 - ✦ Adhesión bacteriana reversibles.- Involucra interacciones físico-químicas débiles de largo alcance entre la superficie y la películas adquirida (Fuerza de Van der Waals o interacciones electrostáticas).
 - ✦ Adhesión bacteriana irreversible: Involucra interacciones fuertes de corto alcance, mediadas por la unión entre las adhesinas de la superficie bacteriana (proteínas fibrilares denominadas antígeno I/II o PAc⁵ en el *Streptococcus mutans*) y sus receptores glucídicos en las glicoproteínas de la película adquirida (interacciones proteína – proteína, proteína glúcidos).
- iii. Co-adhesión.- unión de colonizadores secundarios a las células bacterianas ya adheridas.
- iv. Multiplicación y formación de la biopelícula.- Incluye la síntesis de polisacáridos extracelulares.
- v. Maduración de la placa.- Incluye la muerte o el desprendimiento de microorganismos que van a colonizar otros sitios, y el predominio de microorganismos anaerobios (Triana *et al.*, 2008).

⁵ PAc: Proteína de la pared celular de *Streptococcus mutans* que tiene carácter antigénico cuyo peso molecular es de 190 kDa. Indispensable en los fenómenos iniciales de adherencia y agregación del microorganismo sobre la superficie dental, tomando como sustrato las proteínas de la película adquirida.





2.2.3 Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*

Los factores de virulencia⁶ involucrados en la producción de caries principalmente son:

- I. Acidogenicidad: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental (Azevedo, 1985).

El pH al cual los tejidos dentales se disuelven está entre 5.3 y 5.7 a nivel adamantino y de 6.5 a 6.7 en dentina. Algunos microorganismos, tales como *S. mutans* y *Lactobacillus* sp., alcanzan un excelente crecimiento a niveles de pH más bajos que otras bacterias de la placa, y un pH final menor al nivel crítico. Esta caída del pH se debe a mecanismos metabólicos bacterianos que se requieren para la obtención de energía (Henostroza *et al.*, 2005).
- II. Aciduricidad: es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- III. Acidofilicidad: el estreptococo puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
- IV. Síntesis de glucanos y fructanos: por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.
- V. Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno: sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos periodos aún en ausencia de consumo de azúcar.
- VI. Producción de dextranasa: además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano (Azevedo, 1985).

⁶ Factores de virulencia: Son aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que lo hacen patógeno.





2.2.4 Factores de riesgo

Por consiguiente el grado de cariogenicidad de la placa dental depende de una serie de factores que incluyen:

1. La localización de la masa de microorganismos en zonas específicas del diente, tales como: superficies lisas, fosas y fisuras y superficies radiculares.
2. El gran número de microorganismos concentrados en áreas no accesibles a la higiene bucal o a la autolimpieza.
3. La producción de una gran variedad de ácidos (ácido láctico, acético, propiónico, etc.) capaces de disolver las sales cálcicas del diente.
4. La naturaleza gelatinosa de la placa, que favorece la retención de compuestos formados en ella y disminuye la difusión de elementos neutralizantes hacia su interior (Henostroza *et al.*, 2005).

Tabla 4. Principales factores de riesgo relativos a los microorganismos

-
- ✓ **Concentración de bacterias acidogénicas en sitios específicos de los dientes.**
 - ✓ **Potencial acidogénico de las bacterias en superficies mucosas y en la saliva**
 - ✓ **Concentración de bacterias acidogénicas en la placa.**
-

❖ Adaptado de Henostroza *et al.*, 2005.

2.2.3 Relación de la ingesta con la formación de la caries

El aporte de la dieta al desarrollo de las caries constituye un aspecto de capital importante, puesto que los nutrientes indispensables para el metabolismo de los microorganismos provienen de los alimentos. Entre ellos, los carbohidratos fermentables se consideran los principales responsables de su aparición y desarrollo.

Más específicamente la sacarosa, que es el carbohidrato fermentable con mayor potencial criogénico y además actúa como el sustrato que permite producir polisacáridos extracelulares (fructano y glucano) y polisacáridos insolubles de la matriz. Además, la sacarosa favorece tanto





la colonización de los microorganismos orales como la adhesividad de la placa, lo cual permite fijarse mejor sobre el diente (Henostroza *et al.*, 2005).

El principal mecanismo que interviene en el inicio de la desmineralización de los tejidos dentales duros es la formación de ácidos por parte de los microorganismos durante su actividad glicolítica, a partir de diferentes sustancias o alimentos de la dieta. Esto se traduce en una caída del pH en el medio oral y favorece un medio de desarrollo para otras bacterias cariogénicas. Existen además otros factores individuales que afectan la variación del pH, tales como: cantidad y composición de la placa dental, flujo salival, capacidad buffer y tiempo de eliminación de la sustancia, entre otras. Aquellos productos que causan una caída brusca de pH por debajo del nivel crítico se consideran acidogénicas y potencialmente cariogénicas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Conjuntamente con la cantidad y frecuencia de consumo de los alimentos, asimismo deben tomarse en cuenta otros factores, como por ejemplo la adherencia propia del alimento, que prolonga el tiempo en que éste se mantenga en contacto con el diente (Henostroza *et al.*, 2005).

2.2.4 Agentes con actividad antimicrobiana contra la placa dental

Existen diversos agentes que han demostrado acción sobre la formación de la bioplaca causada por *S.mutans* como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Agentes utilizados en la prevención de la caries que influyen en la bioplaca

AGENTES TRADICIONALES	
Higiene oral mecánica	Radicales de oxígeno (ozono, peróxido de hidrógeno).
Surfactantes (en dentífricos y enjuagues bucales)	Clorhexidina.
Fluoruros tópicos de alta concentración y bajo pH	Fenólicos naturales (incluyendo aceites esenciales).
Iones metálicos (Cu, Fe, Zn, Sn, Ag)	Fenólicos sintéticos (Triclosan).





Tabla 5. Agentes utilizados en la prevención de la caries que influyen en la biopelícula (continuación)

AGENTES NUEVOS	
Agente	Función
Xilitol⁷	Numerosos estudios han demostrado su efecto antibacteriano. Debilita las propiedades de adhesión de <i>S. mutans</i> .
Fosfopéptidos caseicos⁸ (CPP)	Reducen la desmineralización y aumentan la remineralización.
Otros productos naturales derivados de plantas (antimicrobianos ingeribles)	Gran número de extractos derivados de las plantas poseen propiedades anticariogénicas, que bloquean la expresión y secreción de enzimas glucosiltransferasas de <i>S. mutans</i> previniendo su acción de síntesis de glucanos insolubles.
Especies bacterianas inhibidoras (probióticos)	Causar competencia entre especies bacterianas
Alcalinizantes (arginina, urea)	Elevar el pH en la placa dental.
Péptidos sintéticos	Propiedad antimicrobiana. Sin embargo la baja afinidad de unión a la placa no los hace una buena opción.

⁷ Xilitol: Es un poliol natural que es absorbido por *S. mutans* pero no es fermentable (Hildebrandt *et al.*, 2000).

⁸ CPP: Son moléculas que se producen naturalmente de la leche vacuna. Bajo condiciones ácidas son capaces de emitir iones de calcio e iones fosfato, y como resultado mantener un estado de sobresaturación con respecto al esmalte del diente (Rose, 2000).





2.3 *Psidium guayaba*

2.3.1 Descripción

Es un árbol de hoja perenne o arbusto pequeño de 4 a 10 m de altura, con extensas ramas, corteza lisa, delgada y de color café. Tiene las hojas duras, más anchas en su punta que en el centro y por la parte del envés la hoja es vellosa y con sus nervios realzados. Las flores son solitarias, blancas o cremosas y olorosas, con muchos estambres. Sus frutos son globosos, con olor fragante y la pulpa es de color amarillo o rosa, con numerosas semillas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



Figura 1. Hojas de guayaba desecadas

2.3.2 Nombre comunes

Xalxócotl, xaxokotl, xaxucotl (náhuatl): arena agria. Guava, guayabilla, guayabilla cimarrona, guayabo, guayabo morado, hojas de guayaba, palo de guayabo blanco. Chiapas: pata, pocs-cuy, potoj, potos, pox, sumbadam; Michoacán: enendi (purépecha); Morelos: coloc, jaljocote pichi, xalxócotl; Nayarit: ca-arú ó ca-rú (cora), ushca-arú (tepehuano); Oaxaca: lacow (huave), tzon t kichi kichi, tzon t kichi nchjon, tzon t kichi (amuzgo), jukoin papoxtik, pox; Puebla: asiuit, asiwit (totonaco), xaxokotl, xaxucotl (náhuatl), aci'huit, xalxocotl, xapeni, xocoyot; Quintana Roo: pichí (maya), kolok, julú, pachi', sakpichi; Veracruz: asiwit, cuymptan, patán,





pitchcuy; Yucatán: piichi'; San Luis Potosí: bek (tenek) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.3.3 Distribución geográfica

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

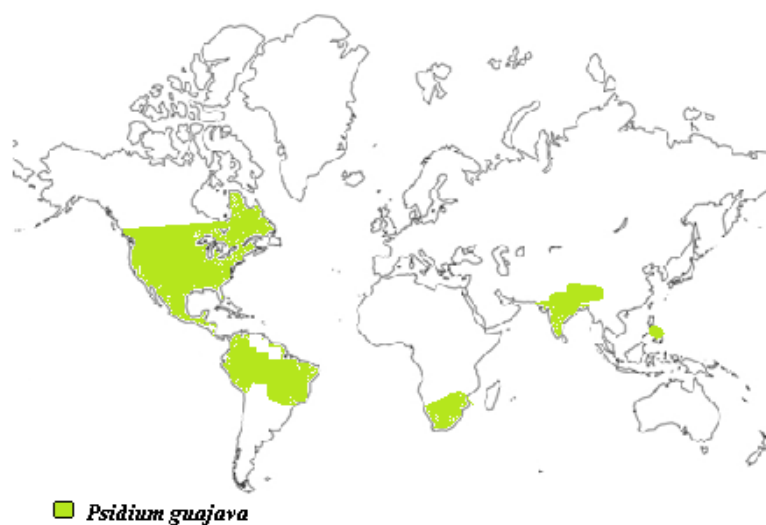


Figura 2. Distribución geográfica en el mundo de Psidium guajava

2.3.4 Composición química

Las hojas contienen un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, 3-bisaboleno, aromandreno y *para*-selineno. También se han detectado el β -sitosterol, los triterpenoides; ácidos oleanólico, ácido ursólico, ácido catagólico y ácido guayavólico; 10% de taninos derivados del ácido elágico y los flavonoides quercetina y quercetín-3-arabinósido. En la raíz se han detectado leucocianidinas, esteroides y ácido gálico. El fruto es rico en vitamina C (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).





2.3.4.1 Hojas

Las hojas contienen principalmente aceites esenciales como son: α - pineno, β -pineno, limoneno, mentol, acetato de terpenilo, alcohol isopropílico, β - cariofileno β -bisaboleno, cineol, óxido de cariofileno, β -copaneno, farneseno, humuleno, selineno, cardineno y curcumeno (Zakaria *et al.*, 1994). Se ha encontrado en el aceite esencial de las hojas contenido de nerolidiol, β -sitosterol, ácido ursólico, ácido cratególico y ácidos guayavólico (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Las hojas contienen un 6% de aceite fijo y 0.365% de aceite volátil, 3.015% de resina, y el 8.5% de tanino, y un número de otras sustancias fijas, resinas, grasas, celulosa, tanino, compuestos volátiles, clorofila y sales minerales (Burkill, 1997). También contienen un aceite esencial rico en cineol y cuatro ácidos triterpénicos, así como tres flavonoides [**Tabla 7**]: quercetina, avicularina y 3-L-4-piranósido con gran actividad antibacteriana (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los constituyentes de los aceites esenciales de las hojas de *Psidium guajava* han sido analizados por GC-MS cualitativa y cuantitativamente. Sesenta compuestos de los aceites esenciales han sido identificados en un 90.56%. El componente más importante fue cariofileno (18.81%), copaeno (11.80%), [1aR- (1a α -, 4 a α -, 7 α , 7a β -, 7b α -)]-decahidro- 1,1,7- trimetil-4-metileno 1H-ciclopropazuleno (10.27%), eucalipto (7.36%). Por otra parte, los ácidos guavenoico y oleanólico han sido aislados a partir de las hojas frescas de *Psidium guajava*. Por último, de las partes aéreas se han aislado el amritósido (glucósido de ácido elágico) y la guaijaverina (glicósido de quercetina) (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.3.5 Usos y propiedades medicinales

Psidium guajava además de ser un importante producto alimenticio, se utiliza en diferentes partes del mundo para el tratamiento de una serie de enfermedades [**Tabla 6**], tales como: anti-inflamatorias, diabetes, hipertensión, caries, heridas, alivio del dolor y reducción de fiebre etc., debido a que los extractos y metabolitos de esta planta, especialmente de las hojas y frutos poseen actividades farmacológicas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).





Los estudios muestran que *P.guajava* es principalmente conocida por sus propiedades antiespasmódicas y antimicrobianas en el tratamiento de la diarrea y la disentería. También, ha sido utilizado ampliamente como agente hipoglucemiante. Muchos estudios farmacológicos han demostrado la capacidad antioxidante, hepatoprotección, antialérgico, antimicrobiano, antígenotoxico, antiespasmódico, antiinflamatorio entre otras (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.3.5.1 Actividad antibacteriana

Se ha reportado efectos inhibitorios de los extractos acuoso y alcohólico de las hojas *P.guajava* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli*, causantes de infecciones intestinales. A lo largo de diferentes estudios sobre las hojas se ha encontrado la presencia de tres sustancias con propiedades antibacterianas que son derivados de la quercetina (Prabu *et al.*, 2006 ; Arima *et al.*, 2002).

La eficacia de la guayaba como antimicrobiano ha sido confirmada por cuatro compuestos antibacterianos aislados de las hojas como son: dos nuevos glicósidos flavonoides, morina-3-O- α -lixopiranosido y morina-3-O- α -L-arabopiranosido, y dos flavonoides que son la guaijaverina y quercetina (Arima *et al.*, 2002).

Las tinturas de las hojas y de la raíz de *Psidium guajava* han sido sujetas a pruebas de sensibilidad *in vitro* en diluciones en un rango del 5% a 15% contra seis especies de dermatofitos: *Tricophyton tonsurans*, *T. rubrum*, *Tricosporum beigeli*, *Microsporum fulvum*, *M. gypseum* y *Candida albicans*. Obteniéndose resultados en los cuales la tintura de la corteza presenta una mayor efectividad en el control del crecimiento micelial de los dermatofitos que la tintura preparada a partir de las hojas (Dutta *et al.*, 2000).





2.3.5.2 Antidiarreicos

La diarrea ha sido reconocida como uno de los problemas de salud más importantes que enfrenta el mundo en especial por la población de los países en desarrollo. Cada año se estima que la diarrea ocasiona la muerte alrededor de 2.2 millones de personas a nivel mundial, la mayoría son lactantes y niños menores de 5 años (Venkatesan *et al.*, 2005). Por lo que la decocción de las hojas de la guayaba es una opción para el tratamiento de gastroenteritis, diarrea crónica, etc., por otra parte las hojas jóvenes se utilizan para la disentería y la diarrea (Ticzon, 1997).

El extracto metanólico de las hojas (8 mg / ml) de *Psidium guajava* ha mostrado actividad frente a los (SA-11) rotavirus con un 93,8% de inhibición (Goncalves *et al.*, 2005). Por otra parte, la quercetina y quercetina-3-arabinósido provenientes de los capullos y hojas de *Psidium guajava* han presentado actividad contra la diarrea en una concentración de 1.6 mg/mL (Lutterodt, 1992). También se ha reportado que el ácido asiático, extraído de la hojas tiene actividad espasmolítica en una dosis de 10-500 µg/ mL (Conde *et al.*, 2003).

2.3.5.3 Efectos sobre la placa dental

La adhesión de los primeros pobladores de placa dental a la superficie del diente tiene un papel importante en el inicio del desarrollo de placa dental. Las propiedades hidrofóbicas de la pared celular de la bacteria son indirectamente responsables de la adhesión de la bacteria a la película adquirida en la superficie dental. El cepillado de los dientes se considera una técnica para reducir la acumulación de la placa. Los agentes químicos pueden ser utilizados para reducir la acumulación de placa en la superficie del diente. El tratamiento de los colonizadores tempranos con 1 mg/ml de un extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* reducen la hidrofobicidad de la superficie celular de *Staphylococcus sanguinis*, *Staphylococcus mitis* y *Actinomyces sp.* Por 54.1%, 49.9% y 40.6% respectivamente (Razak *et al.*, 2006). Estos resultados proveen de una justificación científica para su uso en el tratamiento de enfermedades dentales y sugirió que los extractos de hojas de guayaba pueden inhibir la caries provocada por estreptococo y, por lo tanto, puede ser beneficioso para el cuidado dental.





2.3.5.4 Antioxidantes

En estudios realizados sobre compuestos con actividad antioxidante aislados a partir de extractos de metanol de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) cultivados en Tailandia. Los compuestos aislados fueron seleccionados por su actividad antioxidante en un ensayo *in vitro* del radical libre DPPH. De acuerdo a los resultados obtenidos se indica que tres compuestos aislados contribuyen de manera importante a la actividad antioxidante de las hojas de guayaba, proporcionando una base científica para el uso de esta planta en la medicina tradicional. Sus estructuras se determinaron a partir de métodos espectroscópicos y químicos. El compuesto más activo encontrado fue la quercetina junto con dos compuestos flavonoides, quercetina-3-O-glucopiranosido y morina. El aislamiento de la quercetina, quercetina-3-O-glucopiranosido y morina mostró importante actividad de barrido con IC₅₀ de $1,20 \pm 0,02$, $3,58 \pm 0,05$ y $5,41 \pm 0,20$ mg / ml, respectivamente (Suganya *et al.*, 2007).

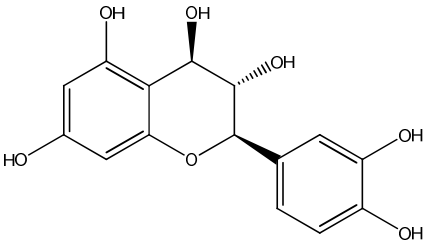
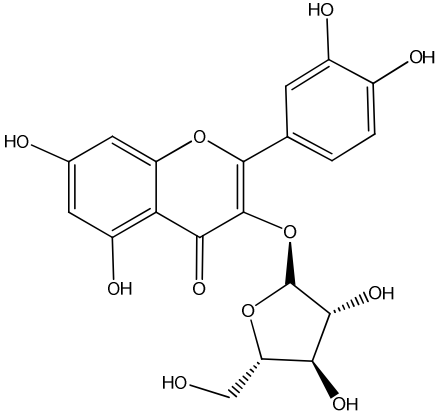
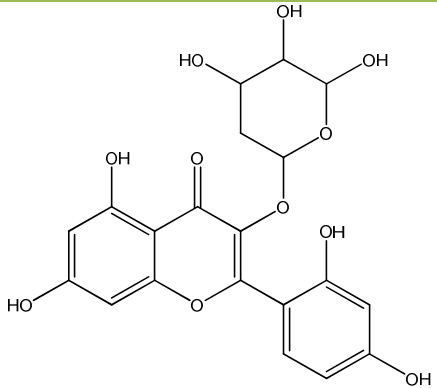
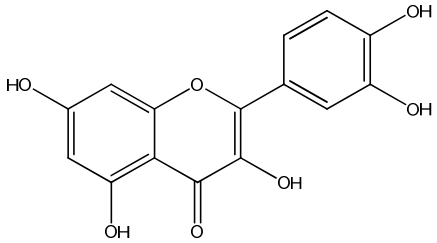


**Tabla 6.** Usos etnomédicos de *Psidium guajava*

Lugar	Parte utilizada	Usos	Preparación	Referencia
Colombia, México	Hojas	Gastroenteritis, diarrea, disentería, dolor reumático, heridas, úlceras y dolor de muelas	Decocción	(Heinrich <i>et al.</i> , 1998), (Aguilar <i>et al.</i> , 1994)
Indígenas mayas, nahuas, zapotecos y popolucas de la región de los tuxtlas, Veracruz, México	Hojas	Tos, Diarrea	Decocción o infusión	(Heinrich <i>et al.</i> , 1998)
América latina, Mozambique	Hojas	Diarrea, dolor de estómago	Infusión, decocción	(Pontikis, 1996)
México	Hojas, corteza	Febrífugo, tos, afecciones, caries, heridas y fiebre	Decocción	(Martínez <i>et al.</i> , 1991), (Argueta <i>et al.</i> , 1994)
Panamá, Cuba, Costa Rica, México, Nicaragua, Venezuela, Argentina	Hojas	Antiinflamatorio	Aplicadas externamente caliente en inflamaciones	(Pardo, 1999),
Sudáfrica	Hojas	Diabetes mellitus e hipertensión	Infusión o decocción	(Oh <i>et al.</i> , 2004), (Ojewole, 2005)
El Caribe	Hojas	Diabetes mellitus	Infusión o decocción	(Mejía <i>et al.</i> , 2000)
China	Hojas	Diarrea, antiséptico, diabetes mellitus	Infusión o decocción	(Teixeira <i>et al.</i> , 2003)
Filipinas	Hoja, corteza, frutos verdes, raíces	Astringente, úlceras, heridas, diarrea	Decocción	(Smith y Nigel, 1992),
India	Hojas	Febrífugo, antiespasmódico, convulsiones, astringente	Decocción o infusión	(Hernández, 1971)
EE.UU.	Hojas	Diarrea	Decocción	(Smith y Nigel, 1992)

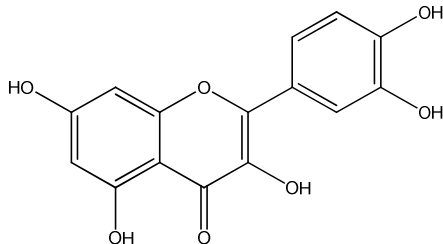
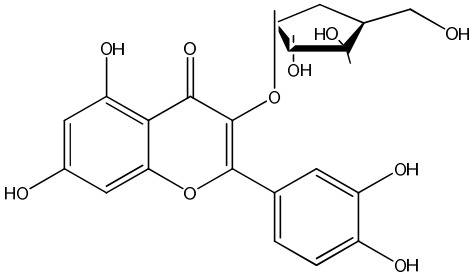
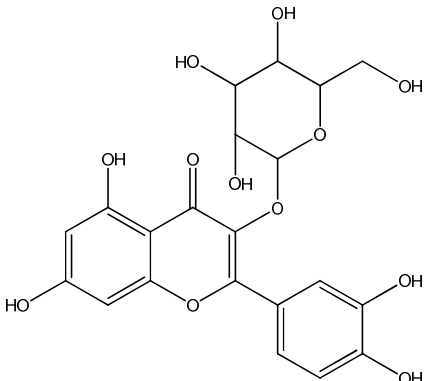


**Tabla 7.** Flavonoides reportados para la especie *Psidium guajava*

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	FUENTE	REFERENCIA
Leucocianidina		Hojas y Fruto	(Nadkarni, 1999)
Avicularina		Hojas y Fruto	(Arima <i>et al.</i> , 2002)
Morina-3-O-α-L-arabinopiranosido		Hojas y Fruto	(Arima <i>et al.</i> , 2002)
Quercetina		Hojas	(Liang <i>et al.</i> , 2005)



**Tabla 7. Flavonoides reportados para la especie *Psidium guajava* (continuación).**

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	FUENTE	REFERENCIA
Kaempferol		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)
Quercetina 3-α-L-arabinofuranósido		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)
Quercetina 3-β-galactósido		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)

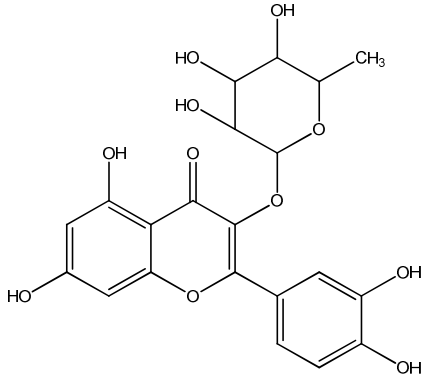
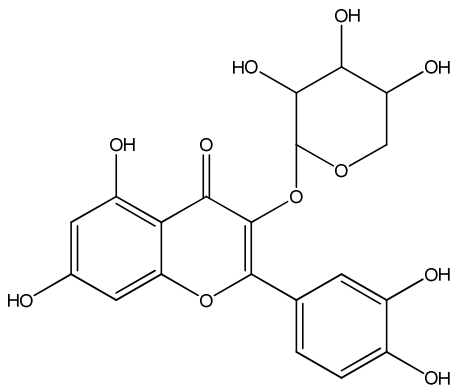


**Tabla 7. Flavonoides reportados para la especie *Psidium guajava* (continuación).**

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	FUENTE	REFERENCIA
Quercetina 3-β-D-glucósido		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)
Kaempferol -3-glucosido		Hojas	(Liang <i>et al.</i> , 2005)
Mecocianina		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)



**Tabla 7. Flavonoides reportados para la especie *Psidium guajava* (continuación).**

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	FUENTE	REFERENCIA
Quercitrina		Hojas y Fruto	(Liang <i>et al.</i> , 2005)
Guajaverina		Hojas y Fruto	(Prabu <i>et al.</i> , 2006)



CAPÍTULO

III

Justificación y Objetivos

La creciente aparición de bacterias resistentes a antibióticos, debido a su uso indiscriminado derivado del autodiagnóstico y la automedicación, limita el arsenal terapéutico contra patógenos de origen bacteriano, generando así un importante problema que en muchos casos resulta peligroso, costoso e ineficaz. Además de que la generación de bacterias multirresistentes pudiera agravar la situación del paciente.

Lo cual obliga a buscar otros remedios, al existir la necesidad de brindar alternativas de tipo preventivo y que ayuden a combatir eficazmente a microorganismos que causan alguna enfermedad, utilizando la riqueza natural, específicamente de plantas que pudieran disminuir la alta incidencia, que existe en nuestro país, de afecciones bucales más generalizadas como lo son la caries.

Por las razones antes mencionadas, el uso de plantas usadas en la medicina tradicional representa una alternativa valiosa al uso de antibióticos en el tratamiento de diversas enfermedades como son los padecimientos de la cavidad oral.



A pesar de la existencia de numerosos agentes antibacterianos en el mercado, la búsqueda de agentes con mayor eficacia continua y es por ello que se seleccionó a la guayaba como una fuente potencial de compuestos con actividad contra *Streptococcus mutans*.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i. Aislar y purificar los compuestos bioactivos a partir de la infusión de las hojas de guayaba de la especie *Psidium guajava* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
- ii. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la especie *Psidium guajava* contra la cepa cariogénica de *Streptococcus mutans*.
- iii. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas que permitirán la elucidación de la estructura molecular de los principios activos.



CAPÍTULO

IV

Parte Experimental

4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

Para realizar los análisis cromatográficos se llevó a cabo el uso de técnicas convencionales de Cromatografía en capa fina (CCF) tanto de tipo analítica como preparativa. Para el caso de la primera se utilizaron placas de aluminio de diversas dimensiones (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) y para la segunda se realizaron sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm (recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck) con un espesor de película de 2 mm, utilizando diversos sistemas de elución en ambos casos. Todas las placas se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm) las cuales posteriormente fueron reveladas con distintas soluciones cromogénicas⁹, seguido de un calentamiento a 110° C aproximadamente, hasta la visualización de los compuestos.

⁹ Fueron utilizados vainillina sulfúrica al 5% (1g de vainillina + 1mL HCl + 100 mL de Metanol), tricloruro de aluminio (AlCl₃) y tricloruro de hierro (FeCl₃).



Por otra parte, se realizó cromatografías en columna abierta (CCA) empleando Sephadex LH-20 y gel de sílice Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, empacado en una columna de vidrio (5 x 30 cm), utilizando como sistema de elución diferentes proporciones de disolventes tales como CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH, MeOH.

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 MHz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeos de átomos rápidos (EM-FAB) mediante la técnica de impacto electrónico (EM/IE). Los espectros se realizaron utilizando CDCl₃, CD₃OD y tetrametilsilano (TMS) como referencia reportando los desplazamientos químicos en ppm.

4.1.3 Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia

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

4.2 MATERIAL VEGETAL.

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





depositó en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3 ENSAYO BIOLÓGICO

4.3.1 Microorganismo de prueba

Para poder determinar la actividad antibacteriana del extracto, las fracciones y el compuesto aislado de las hojas de *Psidium guajava* se realizó el ensayo biológico utilizando como microorganismo de prueba a *Streptococcus mutans* (ATCC 700611) por ser la especie con mayor potencial cariogénico y *Phorphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) causante de enfermedades periodontales.

Los medios que se utilizaron para el crecimiento de *S. mutans* y *P. gingivalis* fueron el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI) y soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%), respectivamente.

4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la actividad antibacteriana se llevó a cabo un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Los cultivos de cada microorganismo fueron incubados toda la noche, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm x 10 min, se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. Cada pozo contenía 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans* y 5×10^6 UFC/mL de *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Las muestras se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba, utilizando diferentes controles como se muestra en la **Tabla 8**. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.





Tabla 8. Controles utilizados durante el ensayo biológico

	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	con inóculo	-	37°C
Blanco	sin inóculo	-	37°C
Control positivo	Clorhexidina(CHX)		37°C

- : Sin compuesto de prueba

El microorganismo *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente ($A_{660\text{nm}}$) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas, mientras que *P. gingivalis* se incubó en condiciones anaerobias mediante la utilización de un sobre activado para la generación de CO_2 (GasPack EZ CO_2) contenido dentro de un recipiente GasPack EZ (BD).

El valor de CMI para cada microorganismo analizado se definió como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de $0.05 A_{660\text{nm}}$. Utilizando como control positivo CHX (ver **Tabla 14**).

4.4 ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE *Psidium guajava*.

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

Se utilizaron 549 g de hojas secas del guayabo para realizar una infusión con 4 L de agua durante 2 horas.

4.4.2 Fraccionamiento primario del extracto derivado de las hojas de *P. guajava*.

El agua recuperada de la infusión se sometió a un proceso de partición con acetato de etilobutanol (1:1). Después de filtrar, se evaporó a presión reducida el disolvente del extracto (ver **Tabla 9**).





Tabla 9. Cantidad obtenida del extracto realizado

	Cantidad obtenida
Infusión hojas de guayaba	7.1 g

4.4.3 Fraccionamiento secundario de la partición del extracto con acetato de etilo-butanol

La fracción de acetato de etilo-butanol se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta en Sephadex LH-20 (5 × 28.5) utilizando metanol como eluyente. Obteniéndose 61 fracciones de 50 mL cada una, la cuales fueron reunidas en base a su similitud cromatográfica, formando de esta manera 4 conjuntos de fracciones (A-FI - A-FIV) que se resume en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la partición del extracto de las hojas de *Psidium guajava*.

Sistema de elución	Fracciones reunidas	CLAVE	Peso (g)
MeOH	F1-F5, F30,F31	A-FI	1.2698
	F6-F13, F32-F37	A-FII	1.2115
	F17-F19,F21-F23; F26-F29	A-FIII	1.6294
	F14-F16, F20,F38-F61	A-FIV	3.3689

4.4.4 Fraccionamiento terciario de la fracción activa A-FII

La fracción A-FII fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta de Sephadex LH-20 (5 × 28.5 cm) utilizando metanol como eluyente. Obteniéndose 17 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica, formando así 4 conjuntos de fracciones (B-F1 – B-F4) como se muestra en la **Tabla 11**.



**Tabla 11.** Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción A-FII.

Sistema de elución	Fracciones reunidas	CLAVE	Peso (mg)
MeOH	F1-F4	B-FI	124.5
	F5, F6	B-FII	454.9
	F7-F10	B-FIII	462.4
	F11-F17	B-FIV	169

4.4.5 Fraccionamiento cuaternario de la fracción activa B-FIII

La fracción B-FIII fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta con 270 mL de Gel de Sílice C₁₈ Bakerbond, utilizando como eluyente diferentes proporciones de agua-MeOH. Obteniéndose 37 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica, formando así 7 conjuntos de fracciones (C-F1 – C-FVII) como se muestra en la **Tabla 12.**

Tabla 12. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción B-FIII

Proporción del sistema de elución H ₂ O-MeOH	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	CLAVE	Peso (mg)
80:20	1-27	1	C- FI	6.3
70:30	28-34	2	C-FII	9.0
60:40	35-37	3	C-FIII	2.4
		4-6	C-FIV	16.8
		7-24	C-FV	244.1
		25-31	C-FVI	39.1
		32-37	C-FVII	136

4.4.6 Fraccionamiento quintuple de la fracción activa C-FV

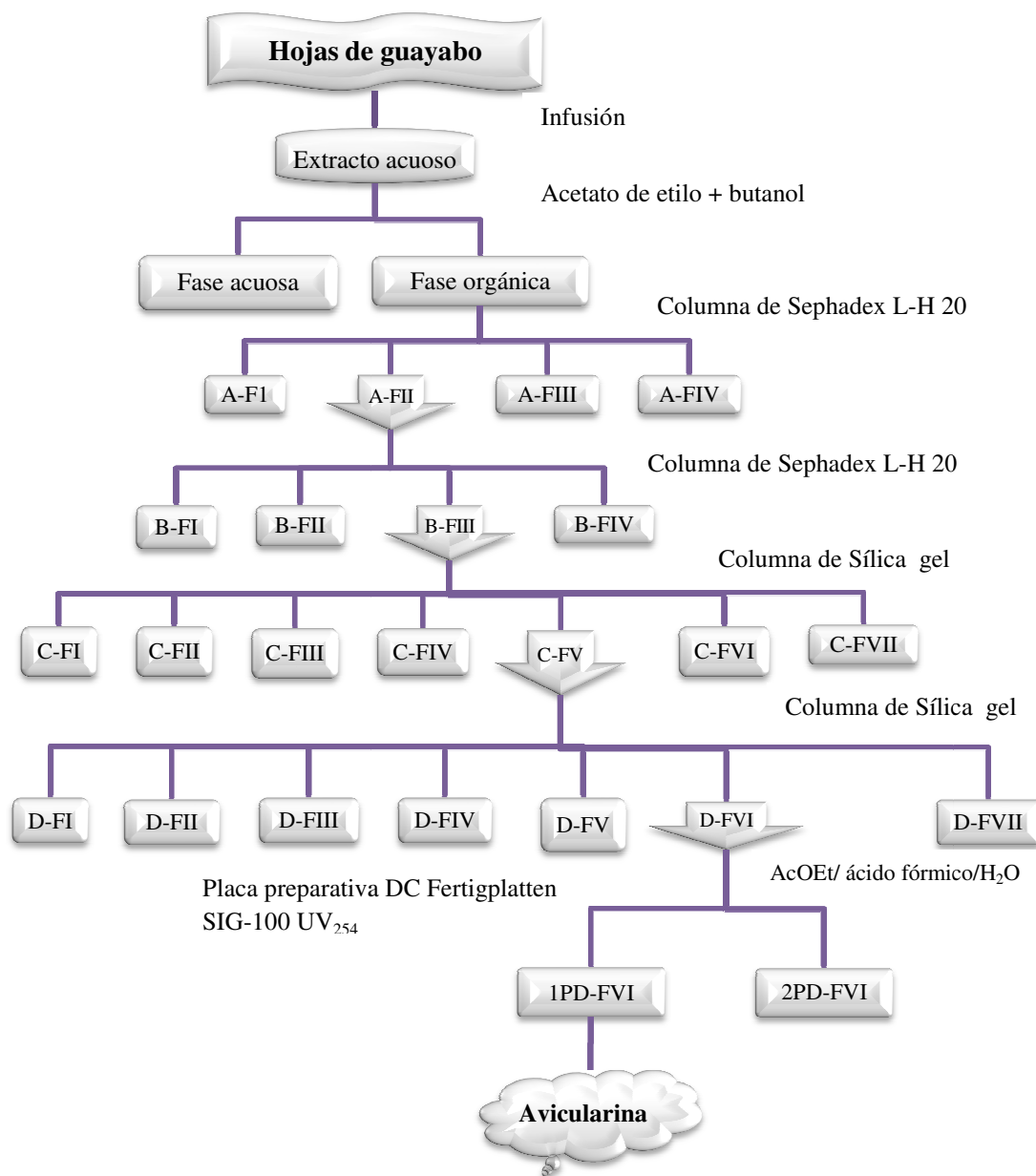
La fracción C-FV fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta con 270 mL de Gel de Sílice C₁₈ Bakerbond, utilizando como eluyente diferentes proporciones de H₂O-MeOH. Obteniéndose 61 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica, formando así 7 conjuntos de fracciones (D-FI – DF-VII) como se muestra en la **Tabla 13.**



*Tabla 13. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta de la fracción C-FV*

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	CLAVE	Peso (mg)
H ₂ O	100	Ninguna	1	D- FI	19.3
H ₂ O-MeOH	95:5	1	2	D-FII	4.0
	90:10	2	3	D-FIII	10.0
	85:15	3-8	4-6	D-FIV	8.8
	80:20	9-19	7-9	D-FV	5.9
	75:25	20-37	10-19, 35-61	D-FVI	50.4
	70:30	38-47	20-34	D-FVII	28.2
	65:35	48-51			
	60:40	52-61			



**Diagrama 1.** Fraccionamiento de la infusión de las hojas de guayabo

1PD-FVI: Primer compuesto obtenido en placa preparativa a partir de la fracción VI de la columna (8.0403 mg)

2PD-FVI: Segundo compuesto obtenido en placa preparativa a partir de la fracción VI de la columna D (8.0331 mg)





4.4.7 Obtención y purificación del flavonoide avicularina a partir de la fracción activa D- FVI

A partir de la fracción D-FVI (CMI 125 $\mu\text{g/ml}$ y 128 $\mu\text{g/ml}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis* respectivamente) se precipitó un sólido amorfo color amarillo, el cual fue purificado mediante Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) utilizando como sistema de elución una mezcla de AcOEt/ ácido fórmico/ H_2O (8:1:1). **Avicularina (1)**: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.53 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 6.95 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.20 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 5.50 (1H, sa, H-1''), 3.49-4.34 (5H, m, pentosa) (**Figura 5a**). RMN ^{13}C (100 MHz): δ 178.6 (C-4), 164.6 (C-7), 161.6 (C-5), 157.9 (C-9), 157.1 (C-2), 148.4 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.5 (C-3), 121.7 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-2'), 108.1 (C-1''), 104.2 (C-10), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8), 86.6(C-4''), 81.9 (C-2''), 77.3 (C-3''), 61.1 (C-5'') (**Figura 5b**). FAB (negativo) (**Figura 4**).

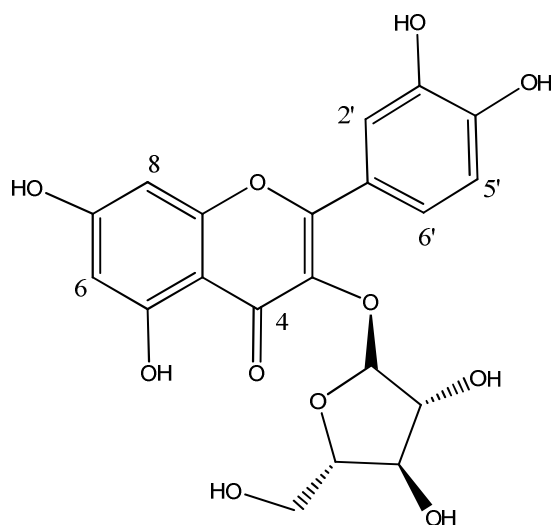


Figura 3. Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba



CAPÍTULO

V

Resultados y Discusión

La selección de la especie *Psidium guajava* se realizó con base en la frecuencia de su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos de origen infeccioso entre ellos los de la cavidad oral, siendo la caries la enfermedad más común que afecta a la población en México. El uso de pastas elaboradas a partir de las hojas tiernas de *P. guajava* en la medicina popular así como estudios previos de los extractos de hojas de guayaba han demostrado su potencial antimicrobiano. Estos antecedentes permitieron elegir a las hojas de la guayaba como candidato para evaluar su actividad sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans* y *P. gingivalis*, principales agentes relacionados con enfermedades de tipo odontógenas¹⁰ de la cavidad oral.

Los ensayos biológicos preliminares de selección permitieron establecer que la infusión de las hojas de *P. guajava* inhiben el crecimiento de las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*, agentes etiológicos de las caries y de las infecciones periodontales, respectivamente.

¹⁰ Infecciones Odontógenas: Son aquellas que afectan estructuras que forman el diente y el periodonto.- incluyen caries, pulpitis, absceso periapical, gingivitis, periodontitis (Rodríguez *et al.*, 2009)



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

La determinación del potencial antibacteriano de la infusión acuosa se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita en la literatura (Rivero-Cruz *et al.*, 2008). Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 15**. Se considera que un extracto vegetal es activo para *S. mutans* y *P. gingivalis* si la CMI es menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Wu *et al.*, 2002; Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

Tabla 14. Actividad antibacteriana (CMI) del extracto acuoso, partición y avicularina sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

MUESTRA	<i>Streptococcus mutans</i> *CMI ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> *CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Infusión acuosa	162.5	360.2
Partición acetato de etilo-butanol (1:1)	102	169
** CHX	1.2	0.31

* Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento

** Gluconato de clorhexidina

Con base en estos resultados, se decidió realizar el estudio fitoquímico biodirigido de la infusión de las hojas de *P. guajava* con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada.

La infusión de las hojas de guayaba fue sometida a un fraccionamiento primario por partición utilizando como disolvente una mezcla de acetato de etilo-butanol, como se describe en la parte experimental (**inciso 4.4.2**).

Posteriormente, la fracción activa resultante de la partición fue sometida a sucesivas cromatografías (A a la D) en columna utilizando como adsorbentes Sephadex-LH20 o sílica gel C18 como se muestra en el **Diagrama 1**(parte experimental **sección 4.4**).





Como resultado del fraccionamiento de C-FV (**sección experimental 4.4.6**) se obtuvieron las fracciones D-FI a la D-FVII, encontrando que la fracción D-FVI presentaba la mejor actividad antibacteriana.

De la fracción D-FVI (fracción activa) precipitó un sólido amorfo de color amarillo, del cual se purificó el compuesto mayoritario mediante CCFP utilizando un sistema de elución AcOEt/ ácido fórmico/H₂O (8:1:1), identificado como avicularina (1) [**Figura 3**] por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Pistelli *et al.*, 1992). En la **Figura 4** se muestra el espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina y en la **Figura 5** los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (a) y de carbono 13 (b).

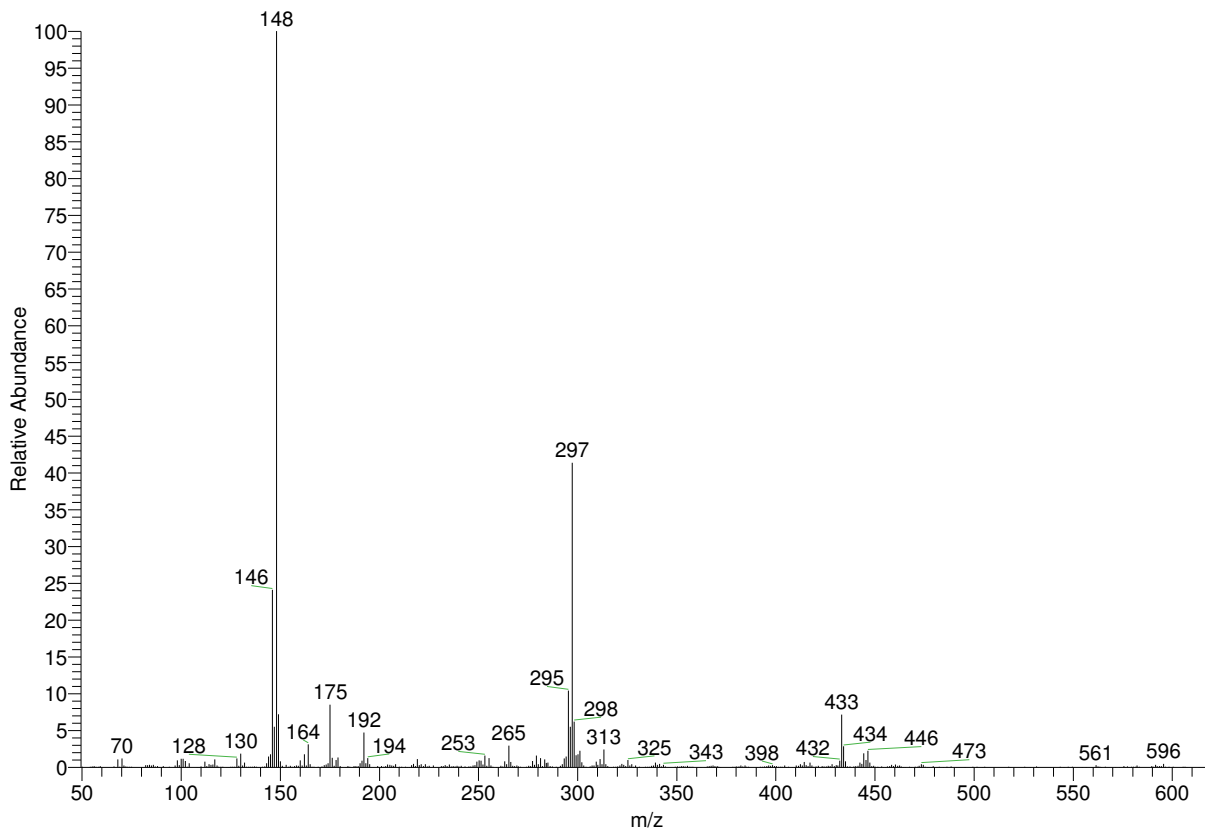


Figura 4. Espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina



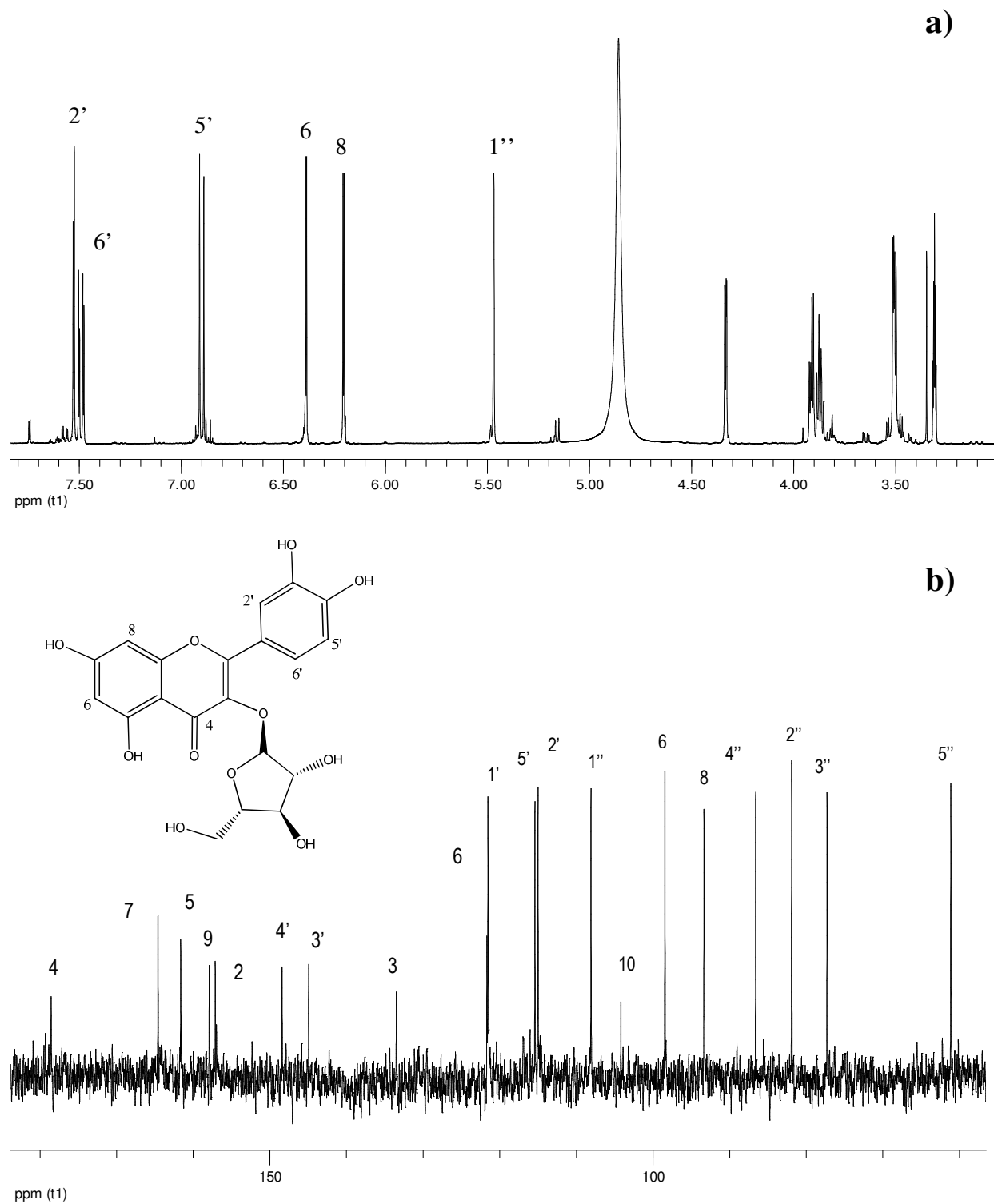


Figura 5. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (a) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (b) obtenidos para la avicularina.





Los resultados obtenidos de las evaluaciones de la avicularina aislada de la fracción activa D-VI (**Diagrama 1**) indican que sus concentraciones mínimas (CMI) son de 125 $\mu\text{g/mL}$ y 67.7 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente [**Tabla 15**].

Al comparar la actividad antibacteriana de la avicularina (**1**) con la obtenida para el control positivo clorhexidina, se puede apreciar que presenta una menor actividad contra *S. mutans* y *P. gingivalis* con CMI de 3.7 $\mu\text{g/mL}$ y 1.2 [**Tabla 15**]. Es importante destacar que la actividad encontrada para el flavonoide avicularina puede considerarse como activo de acuerdo a las concentraciones mínimas inhibitorias que se reportan en la literatura para compuestos aislados de fuentes vegetales (Rivero *et al.*, 2008).

Tabla 15. Actividad antimicrobiana (CMI) de la avicularina y del gluconato de clorhexidina sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

MUESTRA	<i>Streptococcus mutans</i> *CMI ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> *CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Avicularina (1)	125.1	67.7
CHX	3.7	1.2

* Los valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento

** Gluconato de clorhexidina

5.2 Efecto de la avicularina sobre la agregación de bacterias.

Para obtener mayor información acerca del efecto de la avicularina sobre la agregación de bacterias se decidió medir su efecto sobre la formación de agregados por parte de *S. mutans*. Los resultados de este experimento indican que el flavonoide avicularina presentó un efecto positivo sobre la agregación de *S. mutans*, es decir las bacterias al agregarse son incapaces de adherirse a las superficie del diente para formar la biocapa. En la **Figura 6** se observa que la avicularina induce un efecto máximo a los 120 min.



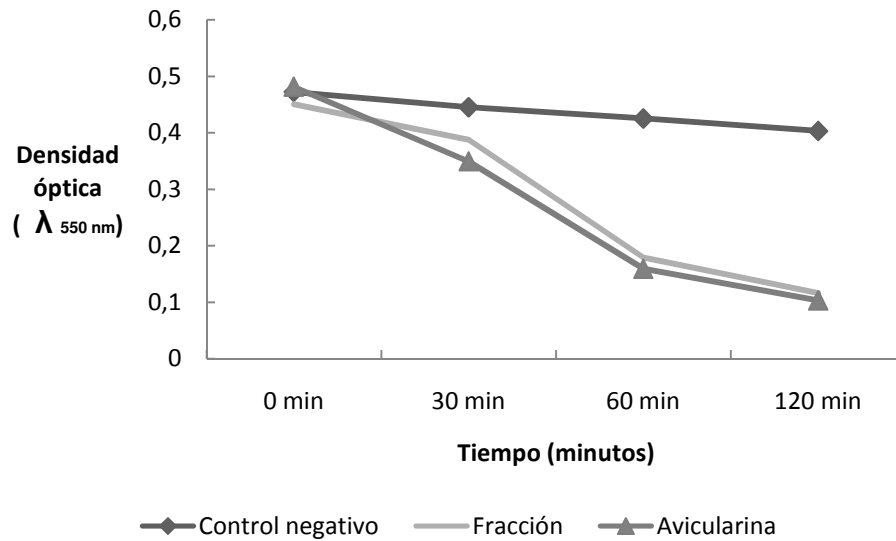


Figura 6. Efecto de la fracción activa y la avicularina sobre la biocapa de *S. mutans*

Este efecto observado para el flavonoide avicularina es muy relevante ya que el primer y más importante paso para que se produzcan la caries es la adhesión inicial de *S. mutans* a la superficie del diente. La adhesión de los colonizadores primarios como el *S. mutans* está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo (*PAC*) y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental, y la capacidad de formación de la placa. Este proceso ocurre cuando los estreptococos producen glucanos solubles e insolubles utilizando las enzimas glucosiltransferasas (GTF), a partir de los azúcares de la dieta (glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, maltosa, rafinosa, ribulosa, melibiosa e incluso el almidón). Por otra parte, estos carbohidratos son utilizados por el metabolismo de las bacterias para la producción de etanol o el ácido láctico. La producción de estos ácidos incrementa la acidez de la boca y los dientes permitiendo al estreptococo mantener una posición de dominio y permitiendo la descalcificación de los dientes.



CAPÍTULO

VI

Resumen y Conclusiones

La información científica generada a partir de este trabajo de investigación representa una contribución original al conocimiento biológico de la especie *Psidium guajava*.

El efecto antibacteriano que presenta el extracto íntegro preparado a partir de la infusión de las hojas de *P. guajava* y su uso como planta medicinal en el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral sustenta, de manera preliminar y parcial, la eficacia de esta especie en la medicina popular.

El estudio químico biodirigido de la infusión de las hojas de *P. guajava* permitió establecer las fracciones con propiedades antibacterianas de la especie, así como la obtención y purificación del compuesto mayoritario, identificado como el flavonoide avicularina el cual presentó CMI de 125 µg/mL para *S. mutans* y 67.7 µg/mL para *P. gingivalis*.



El estudio químico realizado, utilizando a las hojas de *P. guajava*, puso claramente de manifiesto que el compuesto mayoritario responsable de la actividad antibacteriana es la avicularina. Este flavonoide favorece la agregación de la bacteria *S. mutans* al disminuir su hidrofobicidad y como consecuencia disminuye la posibilidad de las bacterias para adherirse a la superficie de los dientes. Es importante destacar que uno de los factores iniciales más importantes para la formación de la placa dentobacteriana es la adhesión de bacterias patógenas a la superficie del diente (Prabu *et al.*, 2006).

Por otra parte, es importante señalar que la clorhexidina utilizada como control positivo presenta una mayor actividad biológica que el flavonoide avicularina. Sin embargo, este antibiótico presenta una serie de desventajas como el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto.



CAPÍTULO

VII

Perspectivas

- ✿ Continuar el estudio químico 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 *Psidium guajava* 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 las hojas de *Psidium guajava*, así como sus compuestos minoritarios.

CAPÍTULO

VIII

Referencias

- ☉ Aguilar, A., Argueta, A., Cano. (1994). Flora Medicinal Indígena de México. *Instituto Nacional Indigenista*, México.
- ☉ Aguilera, G.L., Padilla B.P., Aguilar R.R. (2004). Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de; *Asociación Dental Mexicana* , 61 (3), 85-91.
- ☉ Argueta V., Cano, A., Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.Tomo I (1-583).México. *Instituto Nacional Indigenista*, 457-458.
- ☉ Arima, H., Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guayaba (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66 (8), 1727 - 1730.
- ☉ Azevedo, RV. Palamin. (1985). Detection of *Streptococcus mutans* strains producers of bacteriocin like substances (mutacin).*Rev Fac Odontol Ribeirao Preto* 22 (2), 69 - 74.
- ☉ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Recuperado en Enero de 2010, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- ☉ Burkill, H.M. (1997). The useful plants of West Tropical Africa. *Royal Botanic Gardens Kew* , 4, 89-93.
- ☉ Conde, G.E., Nascimento, V.T., Santiago, S.A.B. (2003). Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. *Journal of medical and Biological Research* , 36, 1-27.



- Ⓢ Coykendall, A. (1989). Classification and identification of viridans streptococci. *Clinical Microbiology*, 2 (3) , 315-328.
- Ⓢ Cuenca, E., Manau, C., Serra M. (1994). Consejos para la prevención de las enfermedades bucodentales. *Medicina Clínica* , 102, 132 - 135.
- Ⓢ De la Fuente, H. J., González de Cossio M., Ortega, M, J. (2008). Caries y pérdida dental en estudiantes pre-universitarios mexicanos. *Medigraphic* , 50 (3), 235-340.
- Ⓢ Duque, J., Pérez Q. J., Hidalgo, G,I. (2006).. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas*, 1-12.
- Ⓢ Dutta, B.K., Rahman, I., Das, T.K., (2000). In vitro study on antifungal property of common fruit plants. *Biomedicine* , 68 (1), 187 - 189.
- Ⓢ García, T., Saldaña, A., Basterrechea, M. (2008). Glucanos extracelulares bacterianos: estructura, biosíntesis y función. *Revista Cubana de Estomatología* , 45 (3 - 4).
- Ⓢ Garza Velasco, R. (1991). Bacterias Patógenas. México: *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Ⓢ Gnan, S.O., Demello, M.T. (1999). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. *Journal of Ethnopharmacology* , 68 (1), 103 - 108.
- Ⓢ Goncalves, J.L., Lopes, R.C., Oliviera,D.B., Costa, S.S., Miranda, M.M., Romanos M.T., Santos, S.S. (2005). In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal Ethnopharmacology* , 99, 403 - 407.
- Ⓢ Heinrich, M. (1998). Plants as antidiarrhoeals in medicine and diet.In : Proceedings from a Joint Meeting of the Society for Economic Botany and International Society London, *Royal Botanic Gardens* 17 - 30.
- Ⓢ Henostroza, G. (2005). Diagnóstico de Caries Dental. Universidad Peruana Cayetano Heredia. *Facultad de Estomatología*. 11- 27
- Ⓢ Hernández, D.F., (1971). Plants of the Philippines. *University of the Philippines*, 678-680.
- Ⓢ Hildebrandt, G.H., Sparks, B.S. (2000). Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *131* 909-916.
- Ⓢ Iwu, M. (1993). Handbook of African Medicinal Plants. *ISBNN*





- Ⓢ Jaiarj, P., Wongkrajang, Y., Thongpraditchote, S., Peungvicha, P., Bunyapraphatsara, N. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* , 67, 203 - 212.
- Ⓢ Jimenez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido R, Saura-Calixto F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava*) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric Food Chem* 49 (11), 5489-5493.
- Ⓢ Jordan, M. J., Margaría, C. A., Shaw, P.E., y Goodner, K.L., (2003). Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1421-1426.
- Ⓢ Liang, Q., Quian, H., Yao, W.(2005). Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Journal European of Mass Spectrometry* , 11, 93-101.
- Ⓢ Lutterodt, G.D. (1992). Inhibición de la diarrea provocada por Microlax experimental con extractos de estupefacientes de hojas de *Psidium guajava* en ratas. *Diario de Etnofarmacología* , 51-157.
- Ⓢ Martínez, G.M., Barajas, B. (1991). Estudio etnobotánico de las plantas medicinales en el mercado libertad del área metropolitana de Guadalajara Jal. *Fac. Agronomía*.
- Ⓢ Martínez, M.J., López, M., Betancourt, B.J., Barcelo, P.H., Rego, R. (1991). Estudio toxicológico preclínico de *Psidium guajava* (guayaba). *Revista Cubana Plantas Medicinales* 6, 56-61.
- Ⓢ Medina-Solís C., Maupomé, G., Ávila-Burgos, L., Pérez N, R. (2006). Políticas de salud bucal en México2006. *Biomed* , 17 (4), 269 - 285.
- Ⓢ Mejía, K., Rengifo, E. (2000). Plantas Medicinales de uso Popular en la Amazonía Peruana. *Asociación gráfica educativa* .
- Ⓢ Miñana, V., De Barutell, A., (2004). Promoción de la salud bucodental. (Grupo de trabajo AEPap/PAPPS semFYC), 1-39
- Ⓢ Montes de Oca, M. (1989).Odontología. Bacterial plaque. 35-41.
- Ⓢ Morton, J.F. (1987). *Guava: fruits of warm climates*. 356-363.





- Ⓢ Nadkarni, K. (1999). Indian Materia Medica with Ayurvedic, Unani-Tibbi, Siddha, allopathic, homeopathic, naturopathic and home remedies. *1*, 142-149.
- Ⓢ Nuñez, M. (1982). Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. 318.
- Ⓢ Oh, W. (2004). Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology* , *96*, 411 - 415.
- Ⓢ Ojewole, J. (2005). Hipoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract. *27*, 689 - 695.
- Ⓢ Okonogi ,S., Duangrat,C., Anunchpreeda, S. (2007). Comparasion of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *103* (3), 839-846.
- Ⓢ Oliver-Bever. (1986). Medicinal Plants in tropical west Africa. Cambridge University Press.*ISBN*.
- Ⓢ Pardo, O. (1999). Estudio comparativo de ocho especies Americanas de uso medicinal en Mozambique. *Revista Chilena de Flora y Vegetación* , *323* - 328.
- Ⓢ Pérez – Gutiérrez, R. M. Mitchell, S. y Vargas-Solis, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Diario de Etnofarmacología* , *117* (1), 1-27.
- Ⓢ Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A. (1992). Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *Cernuum*. *Phytochemistry* , *33*, 1537 - 1539.
- Ⓢ Rattanachaikunsopon P., Phumkhhachhorn P. (2010). Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Medicinal Plants Research*, *4* (5), 393 – 396.
- Ⓢ Pontikis, C. (1996). *Psidium guajava* L. Guava. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* , *35*, 309 - 319.
- Ⓢ Prabu, G.R., Gnanamani, A., Sadulla, S. (2006). Guaijavern a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* , *101*, 487-495.
- Ⓢ Prieto-Prieto, J., Calvo, A. (2004). Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* , 11-18.
- Ⓢ Quesada, A. (2008). Las plantas Medicinales. *Biocenosis* , *21*, 1-2.





- © Razak, F., Othman, R., Rahim, Z. (2006). The effect of Piper betle and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science* , 48, 71 - 75.
- © Rivero-Cruz, 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.
- © Rodríguez, E., Rodríguez, T. (2009). Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. 33 (3), 67 - 79.
- © Rose, R. (2000). Binding characteristics of *Streptococcus mutans* for calcium and casein phosphopeptide. 427-431.
- © Salud del Niño y del Adolescente (2010).; *Salud Familiar y Comunitaria*. OMS.
- © Smith y Nigel, J. (1992). Tropical Forests and their Crops. *Cornell University Press, London* .
- © Suganya, T., Fumio, I., Okonogi, S.(2007). Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand. *Scientia Pharmaceutica* , 179-193.
- © Teixeira, R., Camparoto, M., Mantovani, M. (2003). Sessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology* , 26, 234 - 239.
- © Ticzon, R. (1997). Ticzon Herbal Medicine Encyclopaedia.
- © Tona, L., Kambu, K., Mesia, K. (1999). Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa. *Phytomedicine* , 6, 59-66.
- © Vargas Álvarez, D., Soto, H., González, H. (2006). Kinetics of accumulation and distributio of flavonoids in guava. 40 (1), 109 - 115.
- © Venkatesan, N., Thiyagarajan, T., Narayanan, S. (2005). Anti-diarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, (8) 39-45.
- © Wu, C. D; Wei, G. X. (2002). Tea as functional food for oral health. *Nutrition*. 18, 443-444.
- © Zakaria, W.J., Chen, B.T., Wang, C.Y., Zhu, Q.H. (1994). Traditional Malay Medicinal Plants. *ISBN* .

