



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Aislamiento del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-
benzoico a partir de las hojas de *Spondias purpurea* L.
Evaluación de su actividad antibacteriana.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CARINA MENDOZA ESQUIVEL



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

PRESIDENTE:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL:	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. SUPLENTE:	Dra. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2° SUPLENTE:	Dra. Gloria Díaz Ruíz

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Carina Mendoza Esquivel



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer a ella y especialmente a la Facultad de Química por forjarme como profesionista y como ser humano.

A mi tutor el Dr. José Fausto Rivero Cruz por su tiempo dedicado a la realización de esta tesis, por su paciencia pero sobre todo por los consejos que me brindo a lo largo de todo este tiempo.

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205709.

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

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y al Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda por su tiempo invertido en la revisión y corrección del presente trabajo y por sus valiosos consejos.



LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Medicina tradicional en México	3
2.2. Familia Anacardiaceae.....	3
2.2.1. Generalidades de <i>Spondias purpurea</i> L. (Anacardiaceae)	4
2.2.2. Distribución geográfica	5
2.2.3. Historia del uso de <i>Spondias purpurea</i> L	6
2.2.4. Usos y propiedades medicinales	7
2.2.5. Estudios de actividad antibacteriana	10
2.3. Ácidos anacárdicos	10
2.3.1. Generalidades	10
2.3.2. Estructura química.....	10
2.3.3. Existencia de los ácidos anacárdicos en la naturaleza.....	11
2.3.4. Actividad antibacteriana	12
2.4. Enfermedades de la cavidad oral de origen microbiano.....	14
2.4.1. Etiología	14
2.5. <i>Streptococcus mutans</i>	15
2.5.1. Generalidades de la bacteria cariogénica	15
2.5.2. Asociación <i>Streptococcus mutans</i> -caries.....	16
2.5.3. Factores cariogénicos de <i>Streptococcus mutans</i>	19
2.5.4. Compuestos naturales con actividad antibacteriana contra <i>S. mutans</i>	20
2.6. Placa dental.....	24
2.7. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
2.7.1. Generalidades.....	27
2.7.2. Incidencia en la enfermedad periodontal	27
3. JUSTIFICACIÓN	30



4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivos generales.....	31
4.2. Objetivos particulares.....	31
5. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1. Procedimientos generales.....	32
5.1.1. Análisis cromatográficos.....	32
5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.....	32
5.2. Material vegetal.....	33
5.3. Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> L.....	33
5.3.1. Preparación del extracto total a partir de las hojas de <i>S. purpurea</i> L... ..	33
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.. ..	33
5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición hexánica (F001-SP) de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.....	33
5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex LH-20 de las fracciones activas F2a y F3a	34
5.3.5. Cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice a partir de la fracción activa F2d.....	34
5.3.6. Separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) del ácido (2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico) a partir de la fracción activa F1e.....	38
5.4. Obtención de derivados metilados.....	38
5.5. Microextracción en Fase sólida.....	38
5.5.1. Obtención del aceite esencial.....	40
5.6. Ensayo biológico.....	41
5.6.1. Microorganismos de Prueba	41
5.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	41
5.6.3. Procedimiento general del método.....	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	66
8. PERSPECTIVAS	68
9. REFERENCIAS	69



LISTA DE ABREVIATURAS

CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCF	Cromatografía en capa fina
VCL	Columna al vacío
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
MEFS	Microextracción en fase sólida
μL	Microlitro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
GTF's	Glucosiltransferasas
H	Hora
°C	Grados Celsius
Min	Minuto
Mm	Milímetro
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Metro
μg	Microgramo
M	Concentración molar
AcOEt	Acetato de etilo
HCOOH	Acido fórmico
DMDS	Disulfuro de dimetilo
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de sodio



CH₂Cl₂	Diclorometano
TFA	Acido trifluoroacético
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
MHz	Megahertz
Nm	Nanómetro
Ppm	Partes por millón
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
%	Por ciento
Rpm	Revoluciones por minuto
t	Triplete
NIST	National Institute of Standards and Technology



LISTA DE CUADROS.

Cuadro	Contenido	Pág.
1.	Usos y propiedades medicinales de la especie <i>S. purpurea</i> L.	8
2.	Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales	11
3.	Microorganismos implicados en el desarrollo de la caries dental	18
4.	Compuestos de origen natural con actividad sobre <i>S. mutans</i>	21
5.	Bacterias predominantes presentes en la placa de tres sitios distintos y factores ecológicos determinantes.	26
6.	Microorganismos de mayor prevalencia encontrados en las enfermedades periodontales.	29
7.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta empacada de la fracción activa F2d.	35
8.	Condiciones para la microextracción en fase sólida de <i>S. purpurea</i> L.	39
9.	Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución de las muestras.	40
10.	Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total, las fracciones y el control positivo clohexidina frente a las bacterias orales <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	44
11.	Actividad antibacteriana (CMI) de las fracciones de <i>S. purpurea</i> L. frente a las bacterias orales <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	45
12.	Actividad antibacteriana (CMI) de la mezcla de ácidos anacárdicos y del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico contra las bacterias orales <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	46
13.	Constantes espectroscópicas en las RMN ¹ H y ¹³ C para el ácido 2-hidroxi-6-(Z)-pentadec-8'-enil)-benzoico.	55
14.	Principales compuestos presentes en las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	58
15.	Principales compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	62
16.	Actividad antibacteriana (CMI) del aceite esencial de las hojas de <i>S. purpurea</i> L. frente a las bacterias orales <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	65



LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura	Contenido	Pág.
1.	Hojas y frutos de la especie <i>Spondias purpurea</i> L (Ciruelo rojo).	5
2.	Distribución de <i>Spondias purpurea</i> L. (Anacardiaceae) en México.	6
3.	Estructura del compuesto aislado de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	45
4.	Cromatograma obtenido por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	46
5.	Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	48
6.	a) Espectro de RMN ^1H del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	50
	b) Espectro de RMN ^{13}C del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	50
7.	Espectro de ^1H - ^1H -COSY del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	52
8.	Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	53
9.	Espectro de HSQC del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.	54
10.	Cromatograma de gases de los componentes volátiles de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	57
11.	Cromatograma de gases de los componentes presentes en el aceite esencial de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	61
Diagrama	Contenido	Pág.
1.	Proceso de extracción y fraccionamiento de las hojas de <i>Spondias purpurea</i> L.	37



1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de muerte en el mundo y de estas, las enfermedades de la cavidad oral como las caries dentales y la periodontitis representan un problema de salud de alcance mundial, que afecta a los países industrializados y a los países en vías de desarrollo, en especial a las comunidades más desprotegidas. En este contexto, tomando en cuenta que las enfermedades orales se encuentran entre las más comunes es necesario llevar a cabo mayor investigación sobre plantas con actividad antibacteriana y sobre las bacterias que se desarrollan en la cavidad oral (OMS, 2005).

La caries es una enfermedad multifactorial dependiente de las relaciones entre cuatro importantes grupos de factores: microbianos, inherentes al hospedero, ambientales y temporales (Gestal *et al.*, 2001). Dentro de los microorganismos que forman consorcios en la cavidad oral están *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* los cuales han sido reconocidos como los patógenos responsables de la caries dental y la periodontitis en adultos respectivamente (Takahashi, 2005).

Se han descubierto y desarrollado diversos agentes efectivos para eliminar a estos microorganismos de la microflora oral, como los antibióticos; los cuales comprende a la ampicilina, clorhexidina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y vancomicina los cuales han resultado ser muy eficaces, sin embargo su uso excesivo puede generar efectos indeseables y resistencia a los microorganismos (Chung *et al.*, 2006).

En este sentido, las plantas medicinales representan una de las mejores alternativas para la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos, de las cuales se han reportado diversos compuestos aislados de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales, que presentan una potente actividad antibacteriana contra este tipo de microorganismos bucales.



Debido a lo anterior y a la poca eficacia que presentan los tratamientos actuales que se emplean para aliviar estos padecimientos, es necesario buscar nuevos compuestos más eficaces, con menos efectos colaterales y con nuevos mecanismos de acción.

En México se cuenta con una riqueza y tradición acerca del uso de plantas medicinales; se estima que en la actualidad cerca de 3000 especies son usadas con esa finalidad. La especie *Spondias purpurea* L. es una planta popular utilizada en la medicina tradicional en México, conocida como “ciruelo rojo”. Es una planta de origen americano de uso muy antiguo útil para tratar afecciones de la piel, en particular para curar la sarna, el “algodoncillo”, ronchas, sarampión, granos y “clavillos”. Hoy en día se sigue recomendando en la medicina tradicional contra ciertos padecimientos de la piel y puesto que se ha detectado actividad antibiótica en sus extractos, esto valida tal uso (CONABIO, 2008; Martínez M., 1996; INI, 1994).

Tomando en cuenta que las enfermedades orales se encuentran entre las más comunes en México, el presente trabajo de tesis surgió como parte de un proyecto que plantea la investigación fitoquímica de las hojas de la especie *Spondias purpurea* L., como una posible fuente de compuestos antibacterianos contra las bacterias patógenas responsables de las enfermedades de la cavidad oral



2. Antecedentes

2.1. Medicina tradicional en México

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemorables, no sólo para satisfacer su hambre, sino también con la finalidad de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas etc., por lo que la medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en las personas.

La ciencia moderna ha permitido el estudio exhaustivo de algunas de las especies empleadas en la medicina tradicional. En lo que respecta al uso de las plantas con propiedades antimicrobianas, se han descrito ya un gran número de especies que actúan contra diversos microorganismos, principalmente bacterias.

En lo que respecta al uso de plantas con fines curativos, México posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales entre sus variadas prácticas curativas tradicionales o populares (Lozoya, 1993; Aguilar, 2001).

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

2.2. Familia Anacardiaceae

La familia Anacardiaceae consta de 78 géneros a nivel mundial. En América tropical existen 33 géneros y aproximadamente 170 especies. La familia es originaria de las regiones tropicales del mundo, pero en el hemisferio oriental hay más diversidad que en el occidental. Los ejemplares de esta familia se distinguen porque usualmente sus árboles o arbustos tienen una savia clara o blanquecina



que se torna negra al secarse y puede ser sumamente irritante y tóxica en algunas especies (Avitia *et al.*, 2000).

Anacardiaceae es una familia importante desde el punto de vista económico en cuanto que comprende muchas especies cultivadas por sus frutos comestibles. En particular, en las regiones cálidas, se extienden los cultivos del mango, *Mangifera indica*, que produce sabrosas drupas. El pimentero falso, *Schinus molle*, originario de América tropical, y entre las especies de origen mediterráneo, el pistache *Pistacia vera*, utilizada para confeccionar dulces y embutidos. Así como *Spondias mombin* y *Spondias purpurea* L. valoradas por sus frutos con los que se elaboran bebidas y diversos postres en miel (Pimienta *et al.*, 2003).

2.2.1. Generalidades de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae).

Árbol que llega a medir de 12 a 15m de altura, de ramas gruesas, retorcidas y frágiles o quebradizas (vidriosas o volubles). Su corteza externa es rugosa, muy ornamentada y con aspecto muy variable, de color gris plomo a moreno verdoso, a veces con fisuras irregulares y protuberancias con textura de corcho pequeñas o en ocasiones muy grandes, que incluso pueden confundirse con espinas o costillas. Tiene las hojas divididas en hojuelas, alternas, pinnadas, de color verde amarillento. Es un árbol melífero que posee pocas flores pequeñas, finamente vellosas de color rojo brillante o purpúreo con 5 lóbulos y 5 pétalos. Los frutos generalmente ovoides son rojos o púrpura y algunas veces amarillos (CONABIO, 2008; INI, 1994) (Figura 1).

Esta especie originaria de América tropical, se cultiva en toda la tierra caliente. Habita en clima cálido, semicálido y templado. Se localiza entre los 5 y los 1200m. Es una planta silvestre, encontrada en potreros, acahuales, pastizales, aunque también cultivada en huertos familiares. Está asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino (INI, 1994).



El árbol florece de febrero a mayo y fructifica de mayo a julio, es de origen nativo y se propaga por medio de semilla y por estaca o esquejes. Exhibe una pobre tolerancia a suelos salinos, suelos ácidos, por lo que no se recomienda su plantación en zonas costeras tropicales (CONABIO, 2008; INI, 1994).

Es conocido popularmente con los nombres de ciruelo rojo, ciruela, ciruela colorada, ciruela campechana, jocote, ciruelo de San Juan y ciruelo cimarrón entre otros (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 1. Hojas y frutos de la especie *Spondias purpurea* L (Ciruelo rojo).

2.2.2. Distribución geográfica.

El ciruelo rojo es una planta originaria de Mesoamérica, probablemente nativa de México, cultivada e introducida en toda América tropical, partes de África y sureste de Asia, se extiende desde el suroeste de Ecuador hasta Brasil y Perú. Es una especie de amplia distribución, principalmente en la vertiente del Pacífico y la mitad sur de la república mexicana, desde Sonora hasta Hidalgo, Jalisco, Puebla, Morelos, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Nayarit, Chiapas, Tabasco, Yucatán (CONABIO, 2008; INI, 1994).

Se ha naturalizado a lo largo de las Antillas, excepto en las Bahamas. Se cultiva en el sur de la Florida y se ha introducido en los trópicos del viejo mundo (CONABIO, 2008).



Figura 2. Distribución de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) en México.

2.2.3. Historia del uso de *Spondias purpurea* L.

El ciruelo rojo es una planta de uso muy antiguo. En el siglo XVI, Martín de la Cruz, lo prescribe como antiescabiático y analgésico, además de que se indicaba entonces contra afecciones de la piel, en particular para curar la sarna. En ese mismo siglo, Francisco Hernández utiliza la corteza de estos árboles como condimento para la hinchazón de las piernas y el polvo de naturaleza fría y seca como astringente y para curar las úlceras (INI, 1994).

Asimismo a mediados del siglo XVIII, Ricardo Ossado recomienda la administración de esta planta a los niños cuando tienen diarreas, tomando un pequeño trozo de la corteza y haciendo una infusión. Finalmente para el siglo XX Maximino Martínez, lo indica como: antidiarreico, antiespasmódico, antiséptico. Narciso Souza concluye en el conocimiento de las hojas y corteza de todas las especies de *Spondias* que son usadas contra fiebres y diarreas (CONABIO, 2008; Martínez, M., 1996).



Hoy en día se sigue recomendando contra ciertas afecciones de la piel, y puesto que se ha detectado actividad antibiótica en sus extractos, esto valida hasta cierto punto su uso.

2.2.4. Usos y propiedades medicinales.

Desde épocas prehispánicas, esta especie ha sido utilizada por sus diversas propiedades medicinales, tales como: analgésicas, antipiréticas, antidiarréicas, astringentes, así como por sus propiedades antimicrobianas, por tan sólo 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 enumeran el cuadro 1 (INI, 1994).



Cuadro 1. Usos y propiedades medicinales de la especie *S. purpurea* L.

Parte del Árbol utilizado	Uso y/o propiedad medicinal
Fruto (cáscara)	<p>Medicinal: El extracto se utiliza para sanar inflamaciones, el jarabe se usa para curar diarrea crónica, además el fruto es útil para tratar pus en la orina, cálculos renales, como diurético y como antiespasmódico (machacado con alcohol). El fruto crudo es laxante.</p> <p>Estimulante: Con los frutos se confeccionan vinos y otras bebidas alcohólicas (chicha).</p> <p>Comestible: Los frutos frescos se comen maduros o crudos, deshidratados, curtidos en alcohol o salmuera. Con los frutos se elaboran bebidas refrescantes y vinagre. Se usan también para hacer gelatina y jalea.</p>
Semilla	<p>Forrajero: Se usa para alimentar ganado y cebar cerdos.</p>
Hoja	<p>Medicinal: El extracto de las hojas es utilizado como febrífugo. Al sureste de Nigeria se emplea una infusión de hojas para lavar heridas, inflamaciones y quemaduras. Asimismo las hojas se usan en infecciones de encía, úlceras, salpullido, sarampión, como antipirético, antidiarréico y astringente.</p> <p>La decocción de las hojas si se aplica localmente sirve para combatir las afecciones de la piel. Es útil para curar los bronquios, garganta, la hidropesía y para purificar la sangre, además de fortalecer la dentadura.</p>

*Referencia: CONABIO, 2005; Martínez, M., 1996; INI, 1994.



Cuadro 1. Usos y propiedades medicinales de la especie *S. purpurea* L. (continuación).

Parte del Árbol utilizado	Uso y/o propiedad medicinal
Corteza (madera)	<p>Medicinal: El extracto de la corteza cocida es un remedio para la roña, disentería y para la flatulencia infantil. En Filipinas la savia de la corteza se usa para tratar estomatitis en infantes. Se maceran en agua la corteza o se machaca el palo y se remoja en agua y con el líquido se aplican en enjuagues bucales.</p> <p>Industrializable: La madera es ligera y blanda y en Brasil se ha encontrado que es adecuada para la fabricación de papel.</p> <p>Saponífera: Las cenizas de la madera se utilizan en la fabricación de jabón.</p>
Resina	<p>Exudado: La resina se mezcla con jugo de piña o guanábana para tratar la ictericia.</p> <p>Adhesivo: La resina se utiliza en América Central para elaborar pegamentos y gomas.</p>
Raíz	<p>Medicinal: Útil en erupciones acompañadas de dolor de cabeza y cuello. Se ha reportado que además se utiliza para enfermedades del intestino y la vejiga, y como remedio contra la sarna.</p>
Flor	<p>Melífera: Apicultura.</p>

*Referencia: CONABIO, 2005; Martínez, M., 1996; INI, 1994.



2.2.5. Estudios de actividad antibacteriana de *S. purpurea* L.

El estudio de la especie *Spondias purpurea* L. es relativamente nuevo, por lo que se cuenta con muy poca información respecto a la química de esta especie, ya que ha sido muy poco estudiada para conocer la totalidad de sus acciones biológicas. *Spondias purpurea* L., de la familia Anacardiaceae, en la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto hidroalcohólico de las hojas, mostró actividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, habiendo dado resultado negativo frente a las bacterias Gram negativas y la levadura *Candida albicans*. El extracto etanólico de las hojas de *Spondias purpurea* L. presentó actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. typhi* y *S. typhimurium* en un estudio de diversas plantas de uso medicinal realizado en Guatemala (CONABIO, 2005; INI, 1994).

2.3. Ácidos Anacárdicos

2.3.1. Generalidades

Los ácidos anacárdicos son compuestos que se encuentran como ácidos libres en la naturaleza, en los últimos años se ha encontrado que algunas de las fuentes naturales de estos compuestos se localizan sólo en algunas especies de plantas pertenecientes a la familia Anacardiaceae como *Anacardium occidentale*, *Pistachio vera* y *Spondias mombin* siendo el primero la principal fuente de ácidos anacárdicos (Tyman, 2001).

Su biosíntesis se lleva a cabo mediante la condensación de un ácido graso con tres moléculas de malonil-coenzima A, seguida de deshidratación e hidrólisis para formar el anillo aromático (Corthout *et al.*, 1994).

2.3.2. Estructura química

Los ácidos anacárdicos son metabolitos del tipo ácido 6-alkilsalicílico, estos ácidos deben considerarse como ácidos grasos en los que el grupo carboxílico ha sido reemplazado por un ácido salicílico. Los ácidos anacárdicos presentan una configuración Z (cis) sin excepción. La cadena lateral puede contener una, dos o



tres insaturaciones. En algunos de estos compuestos la cadena lateral varía de 2 (C_2) a 21 (C_{21}) átomos de carbono, los ácidos anacárdicos más comunes poseen cadenas laterales de 13, 15 ó 17 carbonos, con una insaturación en la posición del C-8' o C-10', aunque también pueden existir con dos o tres insaturaciones en C-8', C-11' y C-8', C-11' y C-14', respectivamente. (Tyman, 2001).

2.3.3. Existencia de los Ácidos Anacárdicos en la Naturaleza

Los ácidos anacárdicos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en muchas familias biológicas y botánicas, de las cuales en los últimos años se han aislado de nuevas fuentes naturales estos compuestos. Entre todas las actividades biológicas encontradas para estos compuestos su actividad antibacteriana es la que ha cobrado mayor importancia tanto en el ámbito químico como biológico. Algunos de los ácidos anacárdicos que se encuentran en la naturaleza se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales.

Familia Botánica	Especie	Componentes
ANACARDIACEAE	<i>Anacardium occidentale</i>	Ácido 2-hidroxi-6-(pentadecil)-benzoico
		Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-8-enil]-benzoico
		Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11-dienil]-benzoico
	<i>Pistacia vera</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11,14-trienil]-benzoico
		Ácido 2-hidroxi-6-(tridecil)-benzoico
	<i>Spondias mombin</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-tridec-8-enil]-benzoico
		Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z,Z)-heptadeca-8,11,14-trienil]-benzoico

*Referencia: Tyman, 2001



Cuadro 2. Algunos ácidos anacárdicos y sus fuentes naturales (continuación).

Familia Botánica	Especie	Componentes
MYRISTICACEAE	<i>Kneama elegans</i>	Ácido 2-hidroxi-6-(undecil)-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-(tridecil) Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-8-enil]-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-(ω -fenildecil)-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-(ω -fenildodecil)-benzoico
BASIDIOMYCETES	<i>Merulius spp.</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-10-enil]-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-14-hidroxiheptadec-8-enil]-benzoico
ARACEAE	<i>Philodendron scandens</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z,Z)-heptadeca-8-,11,14-trienil]-benzoico
OLACACEAE	<i>Schoepfia californica</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-10-enil]-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-10-enil]-benzoico
GERANIACEAE	<i>Pelargonium x hortorum</i>	Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadec-10-enil]-benzoico Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-heptadec-10-enil]-benzoico

*Referencia: Tyman, 2001

2.3.4. Actividad antibacteriana

Las ácidos anacárdicos son compuestos ampliamente estudiados actualmente y se debe a que el conocimiento de sus propiedades antibacterianas y antimicrobianas es de origen legendario.

De estos compuestos se conocen diversos usos entre los cuales destacan:



- ❖ Actividad antibacteriana contra *Propionibacterium acnes* agente responsable del acné (Himejima *et al.*, 1991; Tyman, 2001).
- ❖ Actividad antitumoral de *Ginkgo biloba* dada por una mezcla de ácidos anacárdicos (Tyman, 2001).
- ❖ Poseen actividad antioxidante previniendo la generación de radicales superóxido inhibiendo la actividad de la xantina oxidasa, su actividad antioxidante se destaca de manera muy amplia incluyendo la inhibición de enzimas prooxidantes implicadas en la producción de especies reactivas de oxígeno y al quelar iones metálicos divalentes como el Fe^{2+} o el Cu^{2+} (Kubo *et al.*, 2006).
- ❖ Poseen actividad inhibidora de las enzimas tirosina sintasa y prostaglandin-endoperoxidasa (Kubo *et al.*, 2006; Grazzini *et al.*, 1991).
- ❖ Poseen acción en el mecanismo moluscicida, participando en la inhibición en la acción de la prostaciclina en plaquetas de la sangre humana, a través de la competencia por los receptores (Tyman, 2001).
- ❖ Inhiben la peroxidación del ácido linoleico catalizada por la lipoxigenasa, esta actividad depende en gran medida de la naturaleza de sus cadenas alquílicas laterales (Kubo *et al.*, 2006).
- ❖ Inhibición de la enzima β -lactamasa que rompe el anillo de cuatro miembros en las penicilinas (Tyman, 2001).
- ❖ El ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z,-heptadeca-8-,11,14-trienil]-benzoico es el inhibidor más activo de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), el cual resulta comparable con la acción de las adipostatinas (Tyman, 2001).
- ❖ Los ácidos anacárdicos extraídos de *Pelargonium x hortorum* inhiben la proliferación de células cancerosas y la acción de la ADN polimerasa que puede reparar el daño de las células (Tyman, 2001; Schultz *et al.*, 2000).



- ❖ Uso potencial como conservadores para frutas y verduras (actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) (Narasimhan *et al.*, 2008).
- ❖ Actividad antifúngica derivada de los ácidos anacárdicos de *Pistacia vera* los cuales actúan contra *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* productores de aflatoxinas dañinas para el ser humano (Tyman, 2001).
- ❖ Actividad contra las zoosporas del fitopatógeno *Aphanomyces cochlioides* por inhibición de motilidad y lisis de las mismas (Begum *et al.*, 2002).
- ❖ Algunos glucósidos derivados de los ácidos anacárdicos presentan acción blanqueadora de los dientes (Kasemura *et al.*, 2003).
- ❖ Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, entre otros, (Lima *et al.*, 2000; Narasimhan *et al.*, 2008; Tyman, 2001).
- ❖ Su uso en formulaciones para el cuidado personal, en adición con aminos y aminoácidos como la L-lisina, L-arginina y L-ornitina, por sus propiedades tensoactivas, surfactantes, antibacterianas, incolora, absorbentes de la luz UV, por no presentar efectos irritantes (Tyman, 2001).

2.4. Enfermedades de la cavidad oral de origen microbiano

2.4.1. Etiología

Las enfermedades de la cavidad oral como son la caries dental y la periodontitis (enfermedad gingival) son un problema de salud de alcance mundial que afecta tanto a los países industrializados como a los países en desarrollo, en especial a las comunidades más pobres, ya que se estima que aproximadamente cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental, aunado a esto las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de



dientes, afectan a un 5%-20% de los adultos de edad madura y la incidencia varía según la región geográfica (OMS, 2005).

Las dolencias bucodentales comparten factores de riesgo con las cuatro enfermedades crónicas más importantes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes, pues se ven favorecidas por las dietas malsanas, el tabaquismo y el consumo nocivo de alcohol, además de que otro factor de riesgo muy importante es una higiene dental deficiente (OMS, 2005).

Numerosos estudios han demostrado que tanto las enfermedades periodontales como la caries dental, son de naturaleza infecciosa y que los microorganismos presentes en la placa bacteriana, como *S mutans*. y *P. gingivalis* localizados en la región del surco gingivo-dentario o placa subgingival, constituyen los agentes etiológicos principales de estas enfermedades orales.

2.5. *Streptococcus mutans*

2.5.1. Generalidades de la bacteria cariogénica

Las diversas especies de *Streptococcus* se encuentran íntimamente relacionadas entre sí y fueron descritas inicialmente como serotipos diferentes de *Streptococcus mutans*. Estos microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*, básicamente las especies *S. mutans* (con sus serotipos c, e y f), *S. sanguis*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*, se encuentran formando parte de la placa bacteriana o biocapa dental y han sido asociados con el establecimiento inicial de la caries en humanos (Fives-Taylor *et al.*, 1999).

Streptococcus mutans ha sido descrito como el principal agente causal y patógeno primario de la caries dental, una de las enfermedades infecciosas humanas más comunes. Entre las enfermedades causadas por este microorganismo las más habituales se dan en la cavidad oral donde dan origen a la caries dental. Sin embargo, actualmente se le asocia a la endocarditis si estos patógenos alcanzan el torrente circulatorio de individuos con valvulopatías, durante una extracción dental donde se muestran las petequias conjuntivales, un



signo de endocarditis bacteriana causada por este microorganismo (Hanham *et al.*, 2001).

Es acidófilo porque vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones, como lo es la cavidad oral, además de que es capaz de metabolizar la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (para su metabolismo energético) (Silvana *et al.*, 2009).

2.5.2. Asociación *Streptococcus mutans*-caries

La caries dental es considerada como una enfermedad prevenible. Prevención requiere reducir al mínimo la frecuencia de la ingestión de hidratos de carbono simples en alimentos y bebidas, y sobre todo implica la regulación de las medidas de higiene oral para eliminar la placa. La caries dental todavía se considera una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo. Aunque la naturaleza de la enfermedad y los métodos de tratamiento han avanzado enormemente durante el siglo pasado, la enfermedad todavía no se controla del todo en el mundo (NamHui-Yim *et al.*, 2009).

Streptococcus mutans y *Streptococcus sanguis* son muy importantes para la microflora oral. Sin embargo, *S. mutans* es considerado el principal microorganismo que causa la caries dental, la placa dental y la cariogenicidad. *S. sanguis* es un microorganismo que afecta indirectamente el proceso de la caries a través de su competencia con *S. mutans* por el poblamiento de los nichos orales existentes durante la formación de la placa dental. A diferencia de *S. mutans*, que se asocia frecuentemente con la caries dental, *S. sanguis* se cree que posee un potencial cariogénico bajo (NamHui-Yim *et al.*, 2009).

La caries dental es causada por la interacción de múltiples factores, dentro de los más importantes destacan las características propias del huésped afectado (los dientes y la saliva), de igual manera la interacción microorganismo, sustrato, y



tiempo, son de gran relevancia para el establecimiento de la enfermedad. La caries dental se caracteriza por la pérdida de los minerales del diente, la hidroxiapatita; debido a la acción de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación bacteriana, además de que una dieta rica en hidratos de carbono fermentables, principalmente sacarosa, conduce a la formación de una biocapa cariogénica dental (Wu *et al.*, 2002).

El paso más importante para que se ocasione la caries es la adhesión inicial del *S. mutans* a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental, y la capacidad de acumulación en la placa, proceso que ocurre cuando el *S. mutans* produce glucanos solubles e insolubles utilizando las enzimas glucosiltransferasas (GTF) a partir de los azúcares de la dieta. Una vez que la unión se hace más fuerte, las bacterias degradan la sacarosa a ácidos, como el láctico, que desmineralizan el diente formando la cavidad que se encuentra en la caries dental (Socransky, 1994).

Por lo tanto, los microorganismos orales presentes en la biocapa dental se consideran cruciales para la iniciación y progresión de la caries. Además, la presencia de sustratos adecuados y las condiciones fisiológicas en el huésped son necesarios para permitir la implantación y la supervivencia de estos microorganismos y facilitar el desarrollo de la caries (Marsh, 2003).

Además de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus spp.*, otros microorganismos con potencial cariogénico también se encuentran formando parte de la biocapa. Estos microorganismos incluyen otros *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Dentocariosa*, entre otros.



Cuadro3. Microorganismos implicados en el desarrollo de la caries dental.

		Microorganismos	
ESMALTE	Fosas y Fisuras	<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus sobrinus</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus sanguis</i>	
		<i>Streptococcus milleri</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	
		<i>Lactobacillus sp.</i>	
		Superficies proximales	<i>Streptococcus mutans</i>
			<i>Streptococcus sanguis</i>
			<i>Actinomyces viscosus</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>			
<i>Capnocytophaga</i>			
		<i>Lactobacillus casei</i>	
DENTINA	-	<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Lactobacillus sp.</i>	
		<i>Propionebacterium propionicus</i>	
		<i>Bifidobacterium</i>	
		<i>Eubacterium</i>	



2.5.3. Factores cariogénicos de *Streptococcus mutans*

Las bacterias forman capas de naturaleza polisacárida (glicocalix) que les permiten adherirse a los dientes. Producen ácido a partir de los azúcares de la saliva y dan lugar a la erosión del esmalte y la dentina. El glicocalix también facilita la adherencia a las válvulas cardíacas lesionadas si las bacterias penetran en el torrente circulatorio (Rudney, 2000).

Los polisacáridos como glucanos insolubles en agua son sintetizados por la acción de enzimas bacterianas especializadas llamadas glucosiltransferasas (GTFs). Estos polisacáridos contribuyen a la acumulación de microorganismos cariogénicos y confieren una mayor capacidad para la difusión de la biopelícula dental, así como para la colonización y acumulación de otros microorganismos. *S. mutans* puede sintetizar estos glucanos a partir de la sacarosa con ayuda de estas enzimas y con esto lograr una adherencia firme a la superficie del diente. *S. mutans* produce tres tipos de GTFs (GTF_B, GTF_C Y GTF_D) cuya acción cooperativa es esencial para dicha adhesión celular (Devulapalle *et al.*, 2004).

La síntesis de exopolisacárido, la adherencia a la superficie del diente y la formación de la biopelícula son factores de importancia para *S. mutans*.

En el caso del *S. mutans*, los factores más involucrados en la producción de la caries dental son:

- Acidogenicidad: el *S. mutans* 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.
- Aciduricidad: es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- Acidofilicidad: el *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
- 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.

- 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.
- Producción de dextranasa: además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.

Estudios recientes muestran que además de la sacarosa, la lactosa también desempeña un papel muy importante para la microflora oral y puede contribuir a la aparición de caries. La lactosa es fermentada rápidamente por los estreptococos, incluyendo a los *Streptococcus* cariogénicos orales como lo es *S. mutans* (Zeng *et al.*, 2010).

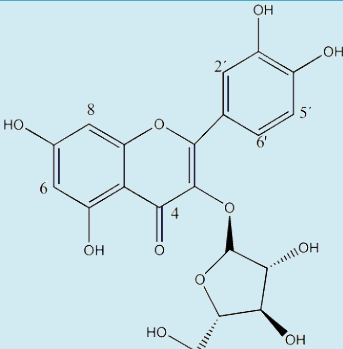
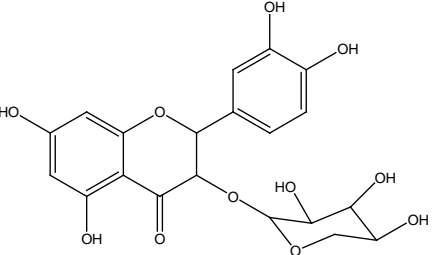
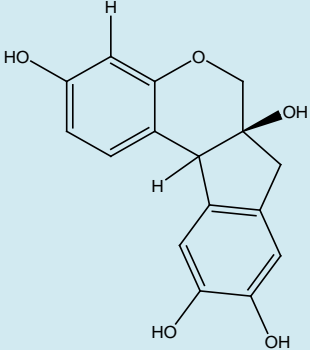
2.5.4. Compuestos naturales con actividad antibacteriana contra *S. mutans*

Se han reportado diversos compuestos aislados de fuentes naturales que presentan una potente actividad antibacteriana contra la bacteria cariogénica *S. mutans* de la flora oral.

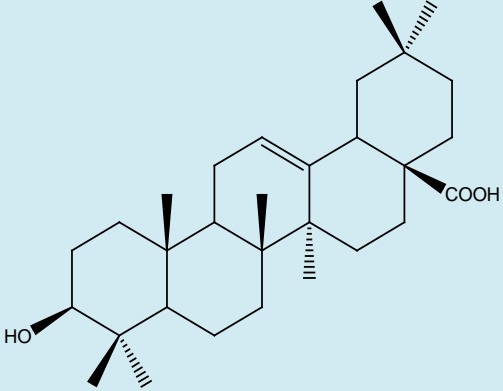
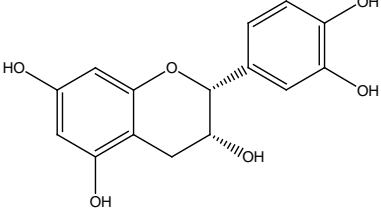
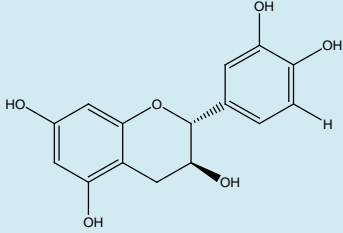
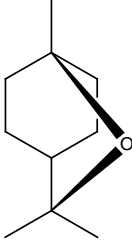
Ejemplos de estos compuestos de origen natural con actividad sobre el crecimiento de *S. mutans* se enumeran en el cuadro 4.



Cuadro 4. Compuestos de origen natural con actividad sobre *S. mutans*.

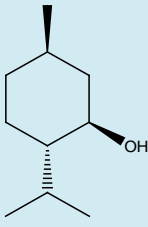
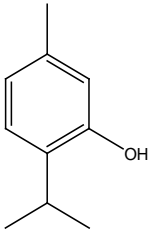
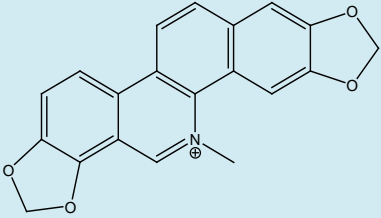
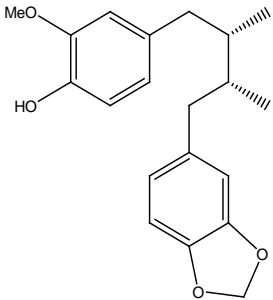
Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Avicularina		<i>Psidium guajava</i>	Dweck <i>et al.</i> , 2001
Guaijaverina		<i>Psidium guajava</i>	Prabu <i>et al.</i> , 2006
Brazilina		<i>Caesalpinia sappan</i>	Xong <i>et al.</i> , 2004
Ácido oléico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	<i>Theobroma cacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001

Cuadro 4. Compuestos de origen natural con actividad sobre *S. mutans*.
(continuación).

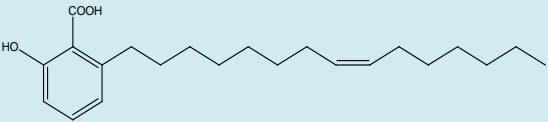
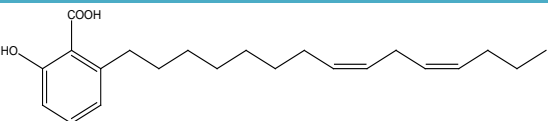
Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Ácido oleanólico		<i>Vitis vinifera</i>	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2008
(-)-Epicatequina		<i>Theobroma cacao</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2001
(+) -catequina		<i>Camellia sinensis</i>	Murphy, 1999
Eucaliptol		<i>Eucalyptus globulus</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006



Cuadro 4. Compuestos de origen natural con actividad sobre *S. mutans*.
(continuación).

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

Cuadro 4. Compuestos de origen natural con actividad sobre *S. mutans*. (continuación).

Compuesto	Estructura	Especie de la que se aisló	Referencia
Ácido anacárdico C_{15:1}		<i>Anacardium occidentale</i>	Kasemura <i>et al.</i> , 2002
Ácido anacárdico C_{15:2}		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003
Ácido anacárdico C_{15:3}		<i>Anacardium occidentale</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2003

2.6. Placa dental

La placa dental se define como una comunidad microbiana que se encuentra sobre la superficie dental, formando una biopelícula embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival.

La formación de la placa involucra la interacción entre las bacterias colonizadoras primarias y la película adquirida del esmalte. Los colonizadores secundarios se unen a las bacterias inicialmente adheridas a través de interacciones moleculares específicas (Marsh *et al.*, 2000). A medida que la biopelícula se forma, se van desarrollando gradualmente factores biológicos importantes, que permiten la coexistencia de especies que serían incompatibles si fuera un medio homogéneo. La placa dental se desarrolla naturalmente, pero también está asociada con dos de



las enfermedades más prevalentes de la cavidad oral: la caries dental y la enfermedad periodontal (Davey, 2000; Baehni, 2003).

Se estima que es posible encontrar más de 300 especies bacterianas en la placa dental, pero sólo un número reducido se relacionan íntimamente con el desarrollo de las patologías orales. Sin embargo, la presencia de la placa dental con especies anaeróbicas específicas induce el desarrollo de la enfermedad periodontal (Timmerman, 2001).

La placa dental se clasifica según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente, y por su potencial patógeno en cariogénica y periodontopatogénica (Genco, 2000). La placa dental supragingival se encuentra en las superficies dentales y está constituida predominantemente por flora bacteriana sacarolítica Gram positiva, en las cuales se encuentran microorganismos cariogénicos; sin embargo, es posible que esta placa se extienda hasta el fondo del surco gingival y entre en contacto con la encía, recibiendo la denominación de placa marginal. La placa dental subgingival se encuentra por completo dentro del surco gingival o de los sacos periodontales, y está constituida principalmente por flora bacteriana proteolítica Gram negativa en la cual se encuentran microorganismos periodontopatogénicos (Liebana, 2002; Beyenal, 2004).

Las biopelículas bacterianas suelen evadir las defensas del huésped y son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos. Son estas características las que imponen amenazas graves para la salud. Dado que las enfermedades infecciosas crónicas, como la endocarditis y la periodontitis, resultan ser infecciones persistentes su erradicación se ha convertido en una preocupación importante en el tratamiento clínico, debido a la resistencia a los antibióticos por parte de estas bacterias (Donlan, 2002).



Cuadro 5. Bacterias predominantes presentes en la placa de tres sitios distintos y factores ecológicos determinantes.

Bacterias	Fisuras (%)	Superficie proximal (%)	Surco gingival (%)
Streptococcus	8-86	<1-70	2-73
Actinomyces	0-46	4-81	10-63
Bacterias anaerobias obligadas Gram positivas	0-21	0-6	0-37
Neisseria	-	0-44	0-2
Veinoella	0-44	0-59	0-5
Bacterias anaerobias Gram negativas	-	0-66	8-20
Medio ambiente			
Fuente de nutrientes	Saliva y dieta	Saliva y fluido gingival	Fluido gingival
pH	Neutro-bajo	Neutro-bajo	Neutro-alto
Potencial redox	Positivo	Ligeramente negativo	Negativo

*Referencia: Adaptado de Newman, 1999.



2.7. *Porphyromonas gingivalis*

2.7.1. Generalidades

Porphyromonas gingivalis es una de las especies de bacterias patógenas más fuertemente asociadas tanto al inicio como a la progresión de la periodontitis. Se piensa que *P. gingivalis* coloniza en forma tardía o secundaria la cavidad bucal, proceso que es facilitado por la presencia de otras especies bacterianas, los colonizadores primarios, que proporcionan sitios de unión y nutrientes que contribuyen a reducir la tensión de oxígeno a niveles óptimos para su crecimiento. Se ha demostrado que esta bacteria se adhiere a estos colonizadores tempranos, tales como a especies de *Streptococcus* bucales y a *Actinomyces naeslundii*, y también a otros colonizadores más tardíos tales como *Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola* (Lamont, 1999; Santos *et al.*, 2002).

2.7.2. Incidencia en la enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son lesiones con características inflamatorias causadas por una infección por placa bacteriana y/o patógenos específicos. Es así como la periodontitis representa un grupo de patologías infecciosas que afectan a las estructuras que rodean el diente de tipo específica y es causada por un sobrecrecimiento de bacterias periodontopatógenas en la placa subgingival, seguida de una respuesta inmunoinflamatoria por parte del hospedero susceptible (Moore, 1994). A diferencia de la gingivitis, en la periodontitis existe pérdida de inserción conectiva en presencia de sacos periodontales, reabsorción ósea, e inflamación en grados variables. Cuando progresa, la periodontitis puede causar la destrucción de los tejidos de soporte dentario, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, y luego la pérdida de la pieza dentaria (Yasuyuki *et al.*, 2005).

El inicio y la progresión de la periodontitis es el resultado de una compleja interacción entre las bacterias que colonizan el surco gingivo-dentario y la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero. Así, estas enfermedades han sido



asociadas con la presencia subgingival de una microbiota variada y numerosa. Sin embargo, sólo unas 20 de las más de 500 especies bacterianas descritas en esta microbiota, se consideran como potenciales patógenos periodontales entre las cuales, las de mayor prevalencia en la periodontitis son *Porphyromonas gingivalis*, y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, principalmente (Stefano *et al.*, 2009).

El rol de estas especies bacterianas en la patogénesis de la periodontitis está basado en su alta frecuencia de aislamiento y su potencial patogénico que incluye factores de virulencia, que les permiten evadir los sistemas de defensa del hospedero. Estos incluyen la habilidad para unirse a células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, producir una gran cantidad de proteasas, colagenasas, endotoxinas (LPS), mecanismos de resistencia antibiótica, bacteriocinas, etc. (Thongchai *et al.*, 2009).



Cuadro 6. Microorganismos de mayor prevalencia encontrados en las enfermedades periodontales.

Aerobios (25%)	Anaerobios facultativos	Anaerobios estrictos (75%)
Cocos Gram (+)	Cocos Gram (-)	Bacilos Gram (-)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
		<i>Prevotella pigmentada</i>
		<i>Prevotella no pigmentada</i>
		<i>Porphyromonas gingivalis, Endodontalis</i>
		<i>Mitsuokella</i>
		<i>Selenomona sputigena</i>
		Bacilos Gram (+)
		<i>Eubacterium</i>
		Cocos Gram (-)
		<i>Veillonella parvula</i>
		Cocos Gram (+)
		<i>Peptoestreptococo</i>
		<i>Peptococo Niger</i>



3. Justificación

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

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

Las hojas de *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo) son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por las bacterias patógenas de la cavidad oral. Por lo mencionado anteriormente, el objetivo primordial de esta investigación es aislar e identificar los compuestos con actividad antibacteriana presentes en las hojas de *S. purpurea* L.



4. Objetivos

4.1. Objetivos Generales:

- ✓ Aislar y evaluar los compuestos con actividad antibacteriana a partir del extracto de las hojas de *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo) que actúen contra bacterias patógenas de la cavidad oral.
- ✓ -Determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4.2. Objetivos Particulares:

- ✓ -Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto hexánico de las hojas de *Spondias purpurea* L.
- ✓ Realizar el fraccionamiento primario del extracto activo empleando para ello métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición. Esta actividad conducirá a la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- ✓ Purificar y caracterizar los compuestos activos aislados del extracto de las hojas de *Spondias purpurea* L.
- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y el agente etiológico de la gingivitis *Porphyromonas gingivalis*.



5. Parte Experimental

5.1. Procedimientos generales.

5.1.1. Análisis cromatográficos.

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) de tipo analítica y preparativa se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1% o anisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento (aproximadamente 110° C) hasta la visualización completa de los compuestos.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, o bien con Sephadex LH-20, empacado en columna de vidrio (5 x 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución.

5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.

Los estudios espectroscópicos y espectrométricos, resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H) y de carbono 13 (RMN¹³H) así como el análisis de espectroscopía de masas por impacto electrónico, se realizaron en la Unidad de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas para el compuesto aislado se determinaron mediante los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) y se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) por introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB). Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un equipo marca Varian, modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz,



respectivamente. Los espectros se realizaron utilizando CDCl_3 , CD_3OD y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

5.2. Material vegetal.

Las hojas de *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo) se recolectaron en el Estado de Morelos, en el pueblo de Amatlán, Municipio de Tepoztlán.

5.3. Estudio Fitoquímico de las hojas de *Spondias purpurea* L.

5.3.1. Preparación del extracto total a partir de las hojas de *S. purpurea* L.

Para la preparación del extracto, las hojas secas de *S. purpurea* L. (416 g) se sometieron a un proceso de extracción vía maceración a temperatura ambiente utilizando etanol como disolvente (3.0 L), por un periodo de 6 días. Al término de dicho proceso el extracto resultante se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un extracto total de consistencia cerosa de color verde oscuro (12 g).

5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto de las hojas de *S. purpurea* L.

Una muestra del extracto total (10 g) fue sometida a un proceso de partición entre metanol-agua (9:1) y hexano obteniendo la fracción F001-SP (3.4467 g), posteriormente se realizó una partición con CH_2Cl_2 , de este proceso se obtuvo la fracción F002-SP (1.3827 g) y finalmente el extracto se sometió a una partición con acetato de etilo F003-SP (1.2622 g).

5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición hexánica (F001-SP) de las hojas de *S. purpurea* L.

Se realizó una evaluación preliminar del potencial antimicrobiano de las fracciones obtenidas, observándose que la fracción hexánica (F001-SP) fue la que presentó un CMI menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a los microorganismos de prueba *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Esta fracción se sometió al



fraccionamiento secundario, el cual se realizó por cromatografía de columna abierta que contenía Sephadex LH-20 (4.5 × 41 cm). El proceso de elución se realizó utilizando como eluyente metanol. Este proceso permitió la obtención de 17 fracciones (150 mL) que se reunieron con base en su similitud cromatográfica reveladas con vainillina sulfúrica al 1%. Como resultado de este proceso se obtuvieron cuatro fracciones secundarias (F1a- F4a).

5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex LH-20 de las fracciones activas F2a y F3a.

De nueva cuenta, las fracciones secundarias obtenidas F1a –F4a se evaluaron biológicamente con la finalidad de determinar su potencial antibacteriano. Las fracciones activas F2a y F3a se sometieron a una cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex LH-20 (4.5 × 41 cm) usando como eluyente metanol. De este proceso resultaron 18 fracciones combinadas, las cuales se reunieron aquellas que mostraron similitud cromatográfica, obteniéndose cinco fracciones terciarias (F1b- F5b).

El fraccionamiento terciario permitió la obtención de dos fracciones activas (F3b y F4b), las cuales fueron recromatografiadas por separado en una columna al vacío (VCL) empacada con 20 g de sílica C₁₈ utilizando como eluyente etanol. El resultado de ambos procesos permitió obtener 13 fracciones y 16 fracciones cuaternarias que se reunieron en base a su similitud cromatográfica resultando tres (F1c-F3c) y cuatro fracciones (F1d- F4d) en total para dichos fraccionamientos.

5.3.5. Cromatografía en columna abierta utilizando gel de Sílice a partir de la fracción activa F2d.

La fracción activa resultante de los fraccionamientos anteriores, la fracción F2d se sometió a una cromatografía en columna abierta empacada (CCA) utilizando gel de sílice (100 g) como adsorbente y como fase móvil mezclas de éter de petróleo y AcOEt en diferentes proporciones. Mediante este proceso se generaron 94



fracciones (100 mL) que por su similitud cromatográfica, se reunieron en tres fracciones combinadas (F1e- F3e).

Cuadro 7. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta empacada de la fracción activa F2d.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Éter de petróleo	100	1-4
Éter de petróleo- AcOEt	98:2	5-16
Éter de petróleo- AcOEt	95:5	17-24
Éter de petróleo- AcOEt	90:10	25-35
Éter de petróleo- AcOEt	85:15	36-44
Éter de petróleo- AcOEt	80:20	45-53
Éter de petróleo- AcOEt	75:25	54-69
Éter de petróleo- AcOEt	70:30	70-83
Éter de petróleo- AcOEt	50:50	84-90
AcOEt	100	90-94



Posteriormente, se realizó una cromatografía en capa fina de tipo preparativa (CCF) de la fracción activa F2e utilizando una fase móvil de éter de petróleo-AcOEt-HCOOH en una proporción de (8.5:1.5:0.2), que permitió la obtención de un residuo sólido de color blanco de apariencia cerosa (78.4 mg), el cual fue identificado como un ácido anacárdico (**1**).



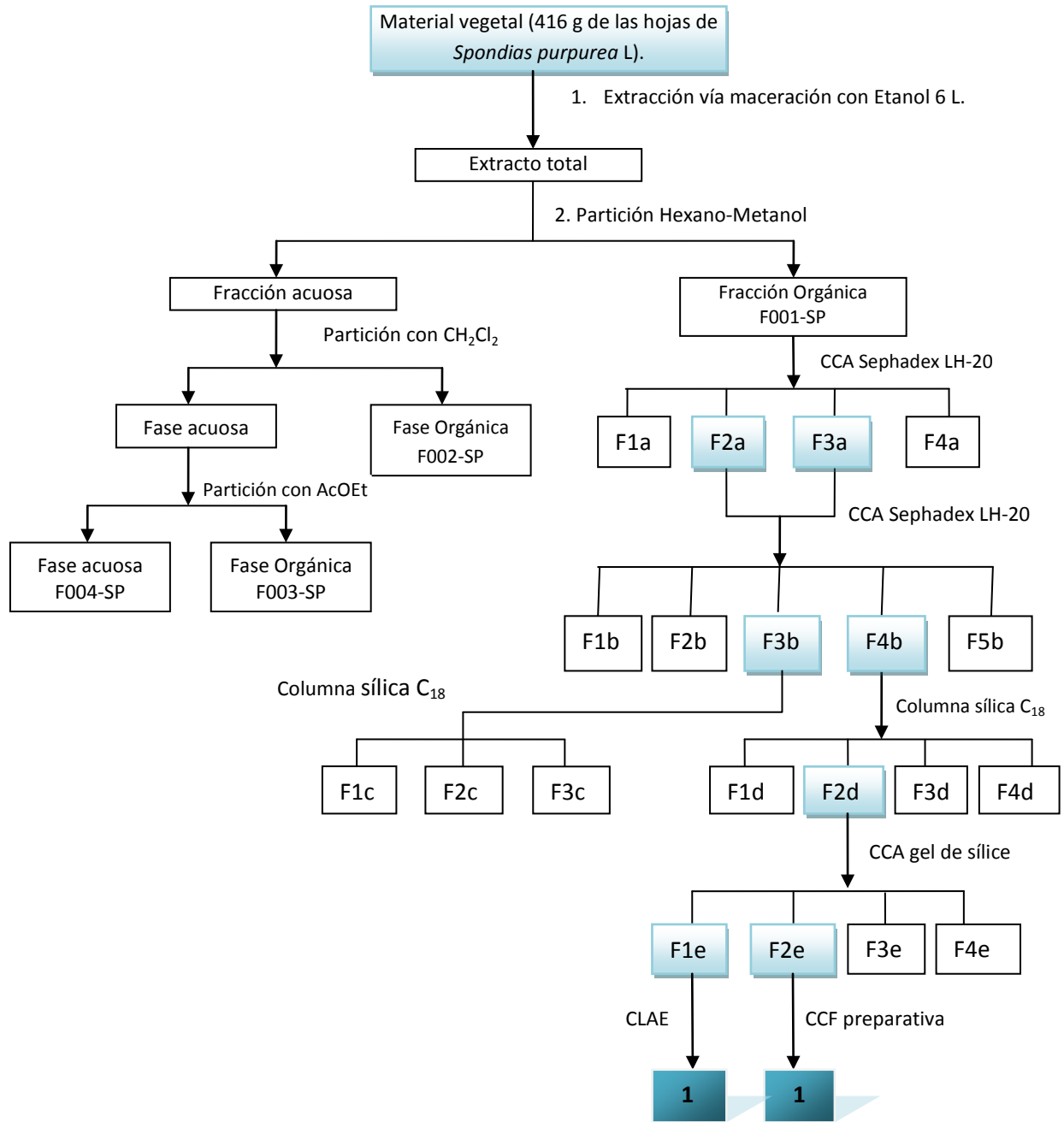


Diagrama 1. Proceso de extracción y fraccionamiento de las hojas de *Spondias purpurea* L.



5.3.6. Separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) del ácido (2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico) a partir de la fracción activa F1e.

Para realizar la separación y la purificación del ácido anacárdico se utilizó 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 la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software LCsolution versión 1.22 SP1. La resolución mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) presente en la fracción activa F1e con la clave 1, se efectuó utilizando una columna Fortis C18, con un tamaño de partícula de 5 μm (150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno), empleando un flujo de 5 mL/min y como fase móvil una combinación de metanol: H₂O-TFA, en una proporción de 7:3; la detección del equipo se ajustó a 254 nm.

5.4. Obtención de los derivados metilados.

Para la obtención del derivado metilado del producto aislado, se utilizó una solución etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio al 50% en agua (2.0 g en 2 mL de agua destilada), 25 mL de etanol y 2.0 g de N-Nitroso-N-metilurea en 2 mL de éter etílico (por cada 100 mg de producto a metilar se utilizaron 20 mL de una solución etérea de diazometano). El producto a metilar se disolvió en 10 mL de etanol y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas.

5.5. Microextracción en Fase sólida.

La microextracción en fase sólida se realizó en la en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química, UNAM. Para iniciar este procedimiento uno de los primeros pasos fue limpiar la fibra (Supelco Fase adsorbente 50/30 μm DVB/ Carboxen/ PDMS), en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, durante 30 minutos para obtener el espectro de masas del blanco con el fin de asegurar que la fibra se encuentre libre de impurezas que puedan en algún momento interferir con el análisis.



Las muestras se colocaron en dos viales con septo, sobre una parilla de calentamiento con agitación constante. Ambos viales contenían 10 mg de cloruro de sodio para favorecer la extracción y 2 mL de agua destilada. Uno de los viales contenía una muestra del material vegetal (las hojas), previamente fragmentadas y el segundo únicamente contenía agua y un termómetro para monitorear la temperatura, y mantenerla en un rango de 50-70°C durante un periodo de tiempo determinado.

Posteriormente, una vez alcanzada esta temperatura, se insertó la aguja que contiene la fibra en el septo del tapón del vial y una vez adentro, se deslizó para exponer la fibra recubierta de la fase estacionaria, para comenzar la microextracción y con esto poder adsorber los compuestos volátiles durante el tiempo establecido.

Cuadro 8. Condiciones para la microextracción en fase sólida de *S. purpurea* L.

Material vegetal	Peso (g)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo de extracción (h)
Hojas	0.8537	50-60	220	1

Finalmente, una vez terminado el tiempo de extracción, la fibra se retiró y se insertó en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas y se calentó para desadsorber los componentes volátiles. Los componentes se separaron utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N y los picos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas LECO Pegasus 4D TOF. El análisis de microextracción en fase sólida nos permitió conocer la composición cualitativa de los componentes volátiles mayoritarios presentes en las hojas de *Spondias purpurea* L.



Cuadro 9. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución de las muestras.

CONDICIONES

CROMATOGRÁFICAS:

Temperatura del inyector	300°C
Temperatura inicial de la columna	50° C
Tasa de aumento de temperatura	20 ° C/min
Temperatura final de la columna	300 °C
Modo	Splitless
Barrido de masas	50-500 uma
Detector	Flama

5.5.1. Obtención del aceite esencial.

Utilizando la técnica de hidrodestilación, a 100 g de las hojas de *Spondias purpurea* L. se le agregó 1 L de agua, para ser sometido a un proceso de destilación por un periodo de 6 horas. Al término de este proceso se obtuvieron 32 mg de aceite esencial. Los compuestos presentes en el aceite esencial, se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El espectro de masas resultante se comparó con la biblioteca del instrumento, la biblioteca Pherobase y la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology) para corroborar la similitud entre los compuestos obtenidos.



5.6. Ensayo Biológico.

5.6.1. Microorganismos de Prueba.

Para realizar el ensayo biológico y determinar la actividad antibacteriana tanto del extracto total, las fracciones y del compuesto aislado de las hojas de *Spondias purpurea* L., se utilizó a *Streptococcus mutans* (ATCC 700611) y a *Phorphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) como microorganismos de prueba por tratarse de los principales agentes etiológicos orales causantes de las enfermedades infecciosas de la cavidad oral como son la caries dental y la periodontitis, respectivamente. *S. mutans* se cultivó en un caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) a 37°C bajo condiciones aerobias, mientras que para desarrollar a *P. gingivalis* el medio de cultivo utilizado fue soya tripticaseína adicionado con clorhidrato de cisteína incubado a 37°C bajo condiciones anaerobias.

5.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La actividad antimicrobiana evaluada para el extracto total, las fracciones, y el compuesto aislado se determinó utilizando el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos y se expresó en términos de concentración mínima inhibitoria (CMI). Los cultivos de cada microorganismo fueron incubados a lo largo de una noche para luego centrifugarlos a 10 000 rpm por un periodo de 10 min, se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8) y se re suspendieron con la misma solución. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. Cada pozo contenía 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans* y 5×10^6 UFC/mL de *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se utilizaron muestras por triplicado para cada concentración de prueba.

5.6.3. Procedimiento general del método.

Para realizar el ensayo se adicionan 100 µL de medio BHI en todos los canales, posteriormente se adicionan 100 µL del compuesto a probar en el primer canal de



la placa (por triplicado). Posteriormente, se realizaron 12 diluciones, procedimiento que se lleva a cabo, transfiriendo 100 μL , de canal a canal, desechando los últimos 100 μL , del último canal. Después se agregan 80 μL de medio con 1% de sacarosa, en todos los canales, y finalmente se adicionaron 20 μL de *S. mutans* en cada canal.

Los controles utilizados consistieron en medio de cultivo inoculado y sin compuestos de prueba, mientras que el blanco contenía únicamente medio de cultivo sin inocular. Todas las placas se incubaron a 37°C bajo condiciones atmosféricas durante un periodo de 24 horas. 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 y *P. gingivalis* se incubó en condiciones anaerobias utilizando un equipo de anaerobiosis BD y para generar el ambiente anaeróbico un sobre Gas Pack (EZ).

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 660nm, como control negativo se utilizó el medio de cultivo inoculado, mientras el blanco fue el medio de cultivo sin inocular, se utilizó gluconato de clorhexidina (CHX) como control positivo.



6. Resultados y discusión

La selección de la especie *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo) se realizó con base en un criterio etnomédico por el amplio uso de esta especie en la medicina tradicional. Las enfermedades infecciosas constituyen una de las primeras causas de muerte en el mundo y de estas las infecciones de la cavidad oral representan un serio problema de salud de alcance mundial. Uno de los usos tradicionales descritos para esta especie resulta ser contra infecciones orales, por lo que en este contexto y respaldado por los ensayos biológicos preliminares realizados en los cuales se ha detectado actividad antibacteriana de los extractos preparados a partir de las hojas del ciruelo rojo, frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* se decidió realizar el estudio de la especie.

Una vez preseleccionada la especie se preparó el extracto metanólico a partir de las hojas secas de *S. purpurea* L. y se determinó su concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Como resultados de este ensayo se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 521 µg/mL y de 256 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente (Cuadro 11). Es importante destacar que un extracto preparado a partir de una fuente vegetal se considera activo contra *S. mutans* y *P. gingivalis* si sus CMIs son menores a 1000 µg/mL (Rivero-Cruz, 2008).

Posteriormente, se procedió a realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto total preparado a partir de las hojas de *S. purpurea* L. con la finalidad de aislar los compuestos activos mayoritarios responsables de la actividad antibacteriana encontrada para esta especie.

El extracto inicial de naturaleza viscosa, verde oscuro; fue sometido a un fraccionamiento por partición utilizando como disolventes hexano, CH₂Cl₂ y acetato de etilo. Como resultado de este proceso se obtuvieron cuatro fracciones (F001-SP - F004-SP). Posteriormente, a cada una de las fracciones se determinó su CMI y como resultado se obtuvo que la fracción hexánica (F001-SP) era la que



presentaba la mejor actividad con CMI de 289 $\mu\text{g/mL}$ y 64 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y *P. gingivalis* (Cuadro 11), respectivamente.

Cuadro 10. Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total, las fracciones y el control positivo clorhexidina frente a las bacterias orales *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Muestra	<i>Streptococcus mutans</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto total	521	256
F001-SP	289	64
F002-SP	>1000	>1000
F003-SP	>1000	>1000
F004-SP	>1000	>1000
CHX*	1.2	0.7

CHX*: gluconato de clorhexidina

La fracción primaria F001-SP fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía de columna abierta utilizando Sephadex-LH20. De este fraccionamiento se obtuvieron cuatro fracciones secundarias (F1a, F2a, F3a y F4a). Las fracciones fueron evaluadas con la finalidad de determinar su efecto sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis* y se obtuvo que las fracciones con mejor actividad eran la F2a y F3a (Cuadro 12).

Las fracciones activas F2a y F3a se reunieron debido a que presentaban una gran similitud cromatográfica y en sus actividades biológicas. La fracción combinada (F2a-3a) se recromatografió sobre una columna abierta de Sephadex-LH20. Como resultado de este nuevo fraccionamiento se obtuvieron cinco fracciones terciarias (F1b, F2b, F3b, F4b y F5b). Las fracciones se evaluaron biológicamente utilizando el mismo bioensayo y se encontró actividad en las fracciones F3b y F4b (Cuadro 12).

Las fracciones activas F3b y F4b se sometieron por separado a una columna al vacío (VLC) de sílica C₁₈. Este proceso permitió la obtención de una fracción activa



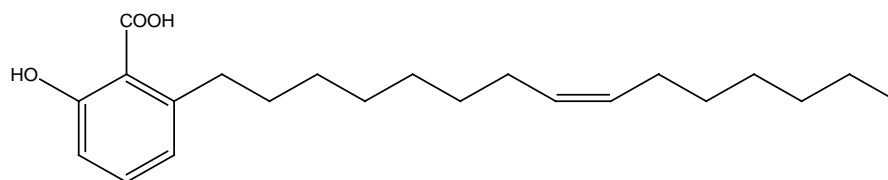
F2d con una CMI de 149 $\mu\text{g/mL}$ y CMI de 170 $\mu\text{g/mL}$, que finalmente se recromatografió utilizando gel de sílice y mezclas de éter de petróleo y AcOEt en diferentes proporciones, dando como resultado la obtención de dos fracciones activas de cuatro fracciones totales, destacando a las fracciones F1e y F2e que resultaron ser una mezcla de ácidos anacárdicos con una CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ y 94 $\mu\text{g/mL}$ en el ensayo biológico para los microorganismos de prueba (Cuadro 13).

Cuadro 11. Actividad antibacteriana (CMI) de las fracciones de *S. purpurea* L. frente a las bacterias orales *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Muestra	<i>Streptococcus mutans</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)
F2a/F3a	250	267
F3b/F4b	225	214
F3c	>1000	>1000
F2d	149	>250
CHX*	1.2	0.7

CHX*: gluconato de clorhexidina

A partir de la fracción activa F2d (CMI: 149 $\mu\text{g/mL}$) se aisló el compuesto **1** como un sólido blanco de apariencia cerosa. El compuesto **1** se purificó mediante sucesivas cromatografías a partir de las fracciones F1e y F2e. El compuesto se caracterizó como el ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico.



ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico

Figura 3. Estructura del compuesto aislado de las hojas de *S. purpurea* L.

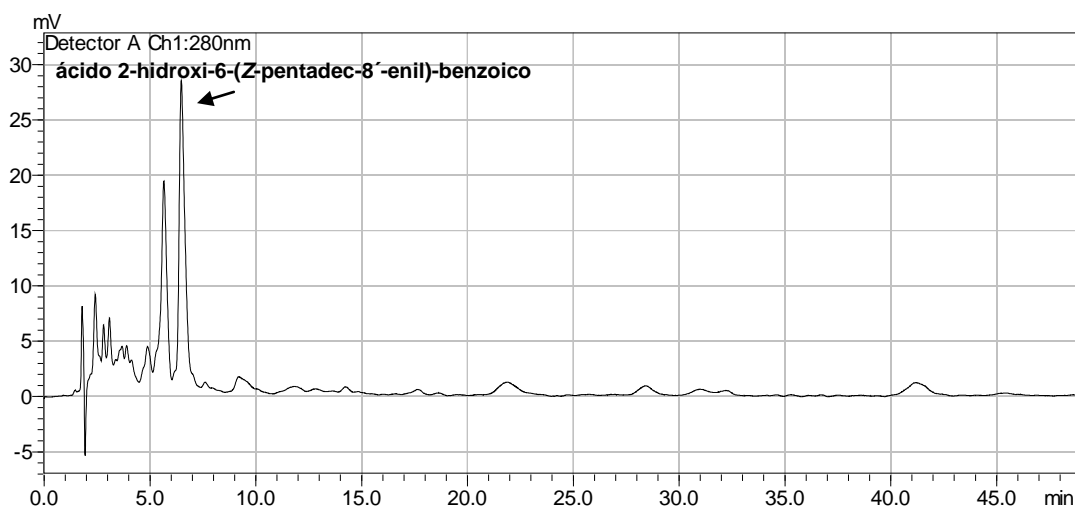


Cuadro 12. Actividad antibacteriana (CMI) de la mezcla de ácidos anacárdicos y del ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-pentadec-8'-enil)-benzoico contra las bacterias orales *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Compuesto	<i>Streptococcus mutans</i> CMI (µg/mL)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI (µg/mL)
Mezcla de ácidos anacárdicos (F1e y F2e)	125	112
Ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -pentadec-8'-enil)-benzoico (1)	56	40
CHX*	1.2	0.7

CHX*: gluconato de clorhexidina

Figura 4. Cromatograma obtenido por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) del ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-pentadec-8'-enil)-benzoico.



6.1. Caracterización estructural del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

El ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1) se aisló como un sólido blanco con un punto de fusión de 84-86°C. Su fórmula molecular se estableció como $C_{22}H_{34}O_3$ mediante espectrometría de masas y permite seis insaturaciones. El espectro de masas (Figura 5) mostró un ión molecular de 328 uma $[M^+ - H_2O]$. El espectro al UV presentó un máximo de absorción a 207 nm.

El espectro de RMN¹H del compuesto 1 (Figura 6) mostró el perfil típico para los compuestos del tipo de los ácidos anacárdicos (Mata *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2004; Liu y Abreu, 2006) presentando las siguientes señales diagnósticas:

a) Un sistema ABC para tres hidrógenos aromáticos de un benceno 1, 2, 3 trisustituído. El sistema ABC se observó en δ 7.36 (*dd*, $J= 8.0$ Hz, H-4), 6.87 (*dd*, $J= 8.0, 0.9$ Hz, H-3) y en 6.77 (*dd*, $J=8.0, 0.9$ Hz, H-5).

b) Un multiplete centrado en δ 5.35 que integra para dos protones asignable a una doble ligadura. La forma del multiplete sugiere que la misma tiene una estereoquímica Z (van Beek y Wintermans, 2001).

c) Un triplete ($J= 8.0$ Hz) característico para un metileno bencílico centrado en δ 2.98. Esta señal tiene correlación con el multiplete asignable a H-2' centrado en δ 1.60 en el espectro de correlación homonuclear COSY (Figura 7).

d) Una señal que integra para dos hidrógenos centrada en δ 2.70 asignable a H - 7'. Esta señal muestra en el espectro COSY una correlación con la señal asignable a los protones vinílicos centrada en δ 5.35.

e) Una señal que integra para dos hidrógenos centrada en δ 2.03 asignable a H - 10'. Esta señal muestra en el espectro COSY una correlación con la señal asignable a los protones vinílicos centrada en δ 5.35.



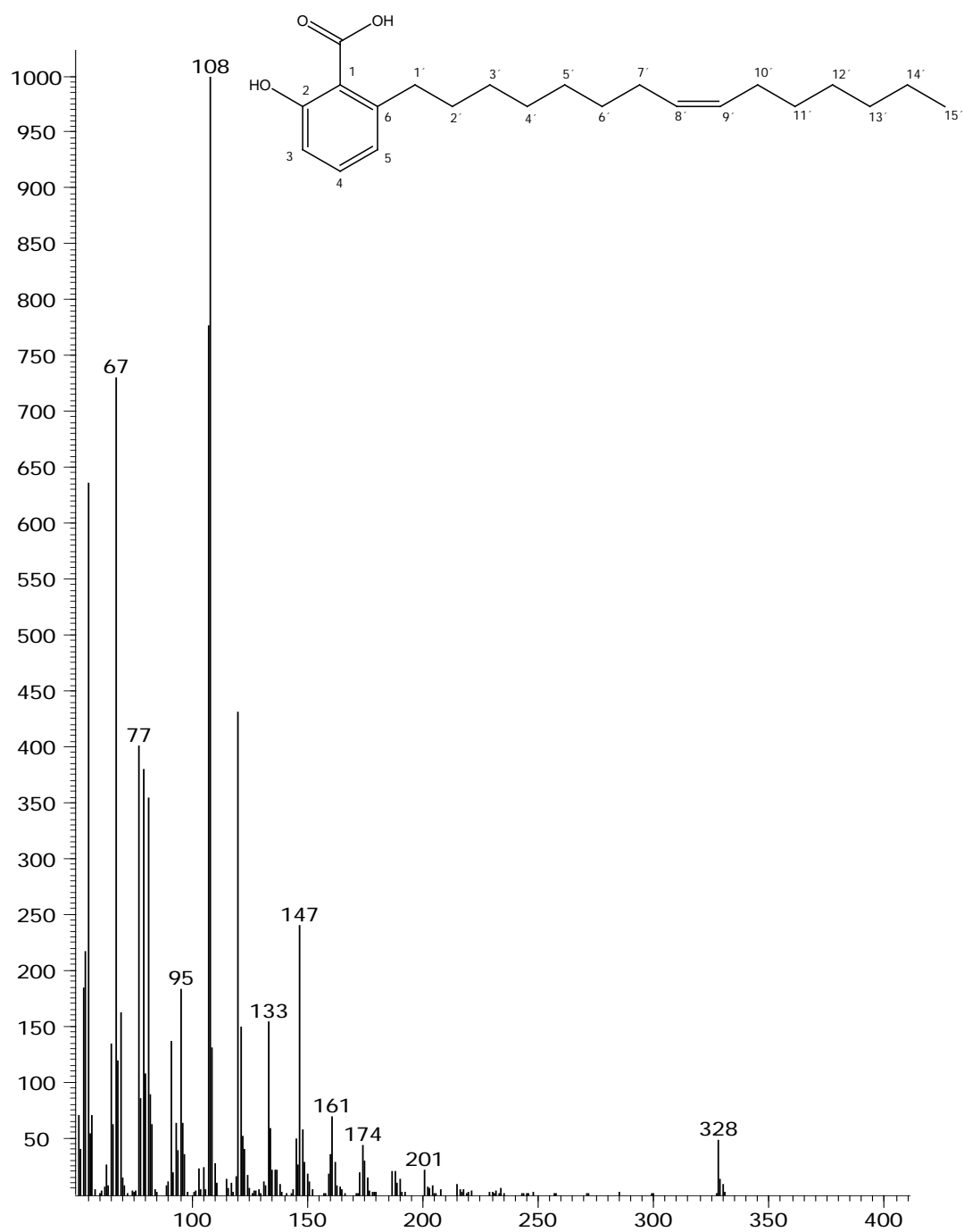


Figura 5. Espectro de masas del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

- f) Un multiplete que integra para dos protones en δ 1.60. Esta señal mostró una correlación en el espectro de COSY con la señal para el metileno bencílico en δ 2.98.
- g) Un multiplete ancho asignable a los protones de los metilenos alifáticos en 1.25–1.36. Esta señal muestra correlaciones en el espectro de COSY con las señales centradas en δ 2.03, 1.60 y 0.89.
- h) Un triplete ($J= 7.6$ Hz) característico para un metilo alifático terminal en δ 0.89. Esta señal muestra una correlación en el espectro de COSY en el multiplete centrado en δ 1.25.

El espectro de RMN¹³C (Figura 6) mostró el perfil típico para un ácido anacárdico (van Beek y Wintermans, 2001). El análisis detallado del espectro de RMN¹³C modalidad DEPT indicó claramente que las señales correspondían a un metilo, 12 metilenos, cinco metinos y cuatro carbonos cuaternarios. De acuerdo con su desplazamiento químico, el metilo en δ 14.05 pertenece a una cadena alifática lineal. Las señales correspondientes a los grupos metileno en δ 36.45, 31.97, 29.56 y 27.2 se asignaron como sigue: la señal en δ 36.45 con base en su desplazamiento químico y las interacciones mostradas en el espectro de HSQC (Figura 9) al metileno bencílico (C-1'), la señal en δ 31.97 se asignó a C-2', la señal en δ 29.56 a los carbonos C-3'-C-6' y C-11'-C-14', y por último, la señal en δ 27.2 a C-7' y C-10'. Las señales correspondientes a los grupos metino en δ 135.44, 122.76 y 115.89 se asignaron a los carbonos aromáticos C-4, C-5 y C-3, respectivamente. Por otro lado, los metinos en δ 130.17 y 127.98 fueron asignables a los carbonos C-8' y C-9'. Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios en δ 176.14, 163.63, 147.78 y 110.37 son atribuibles al grupo carbonilo del ácido unido a C-1, y a los carbonos C-2, C-6 y C-1 del anillo aromático, respectivamente.



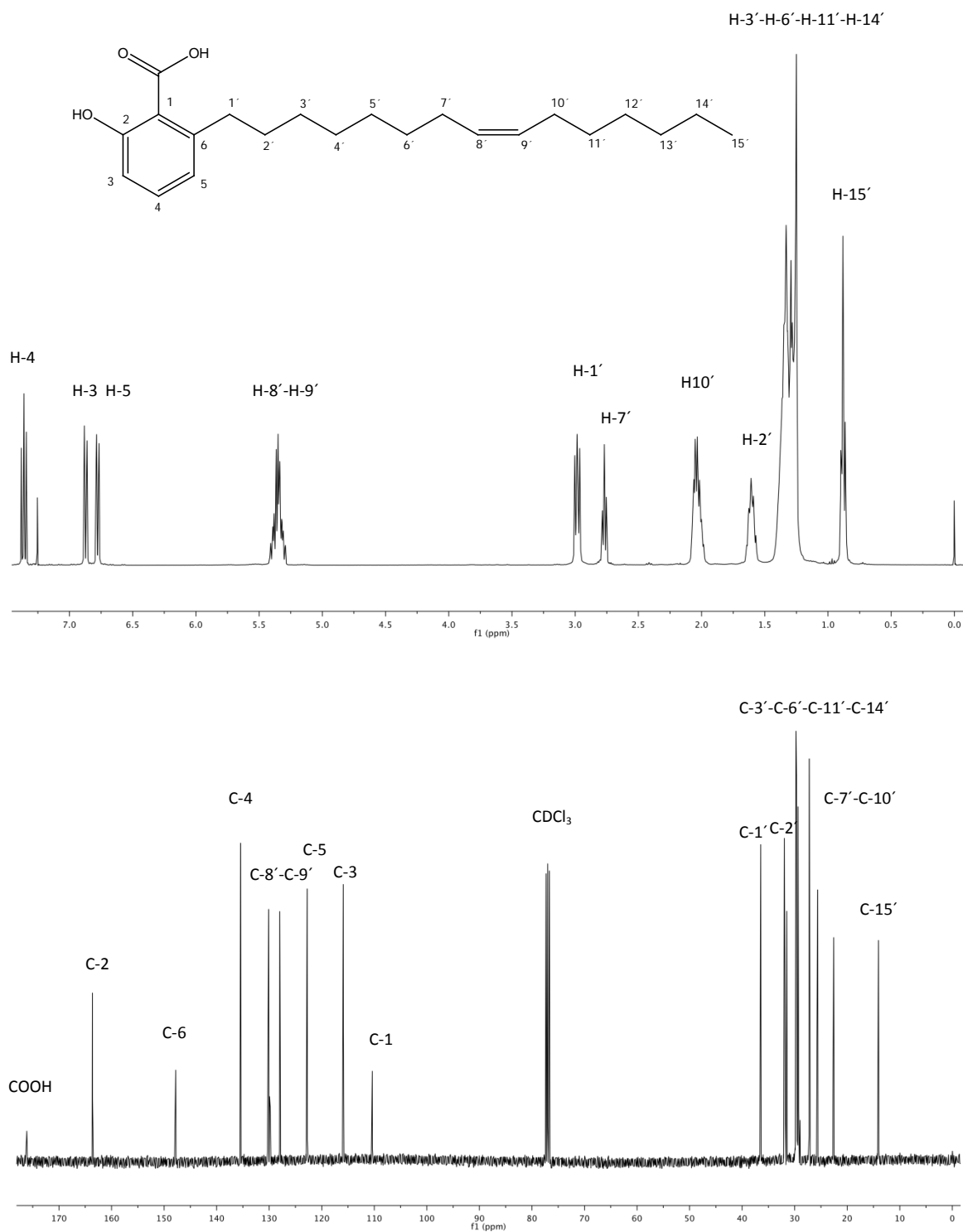


Figura 6. Espectro de RNM¹H (A) del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1) y espectro de RNM¹³C (B) del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

Los elementos estructurales presentados hasta el momento permitieron corroborar la presencia de un ácido anacárdico con una cadena lateral de 15 carbonos y una doble ligadura. La posición de la doble ligadura en la cadena se estableció por comparación de los espectros de RMN¹³C con datos reportados en la literatura (Van Beek, 2001). Con base en estas evidencias descritas anteriormente el compuesto **1** se caracterizó como el ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-pentadec-8'-enil)-benzoico (**1**).

Es importante destacar que estudios previos, destacan que los ácidos anacárdicos obtenidos de fuentes naturales poseen una estereoquímica *Z* (cis) en sus dobles ligaduras (Tyman, 2001).



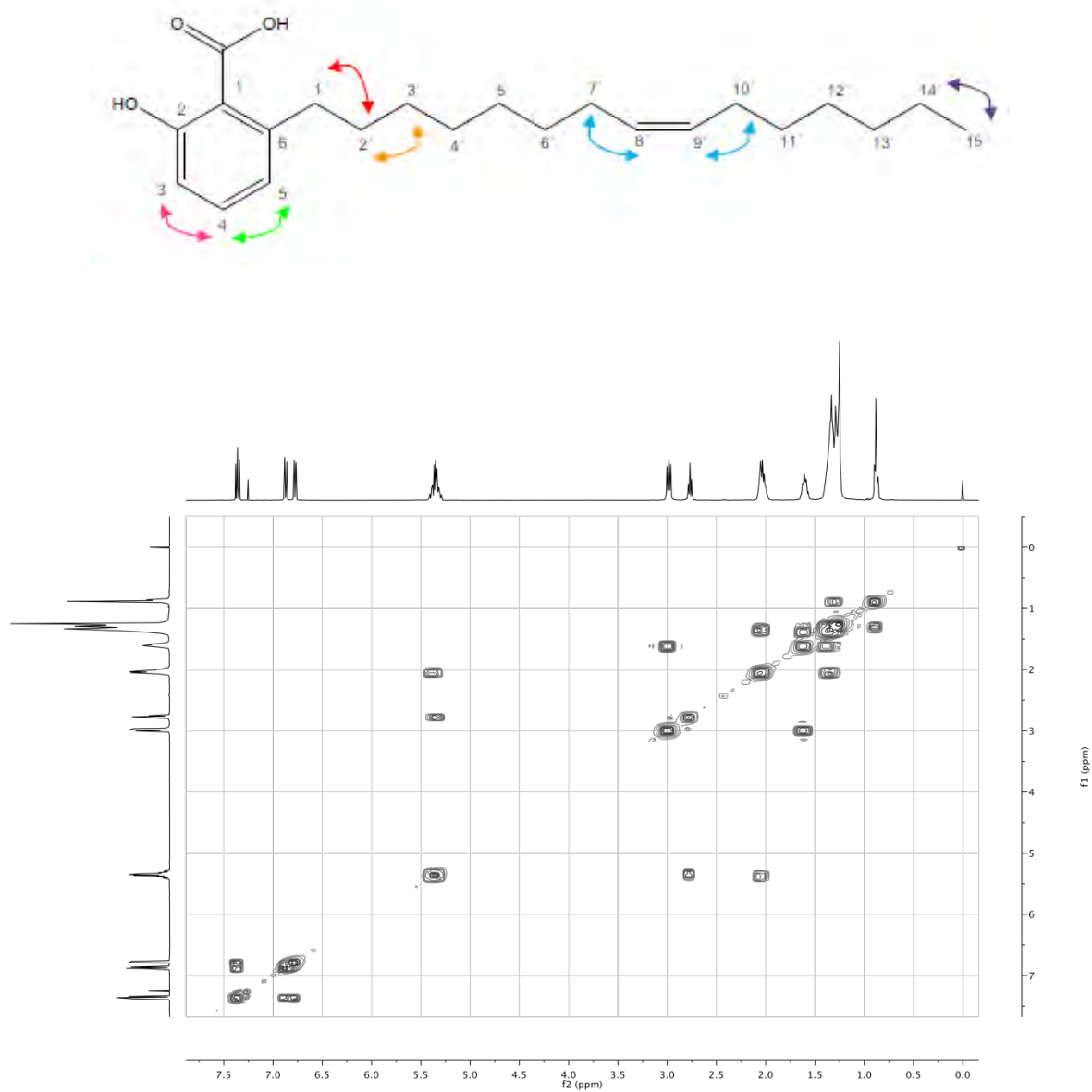


Figura 7. Espectro de ^1H - ^1H -COSY del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

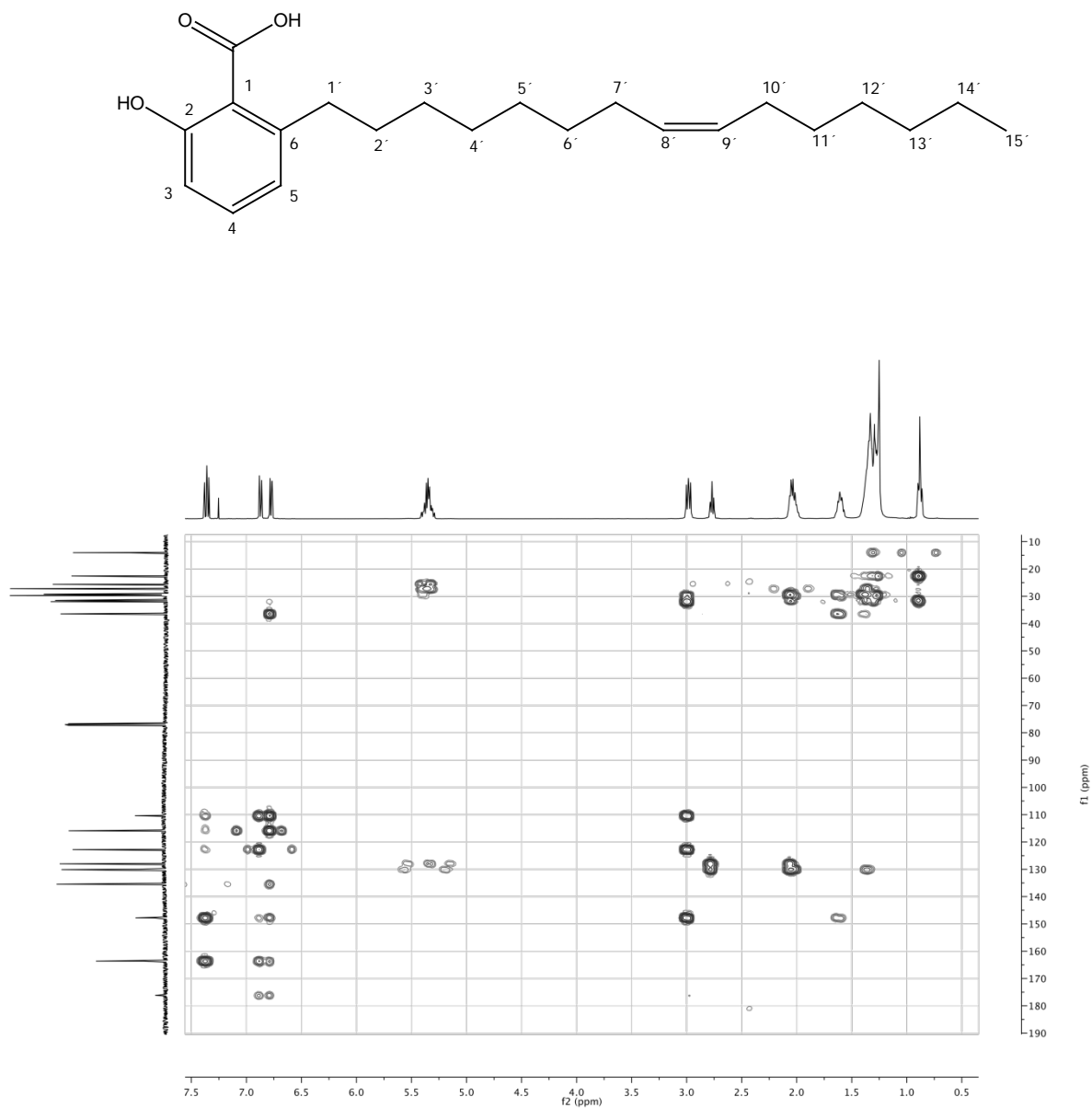


Figura 8. Espectro de HMBC del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

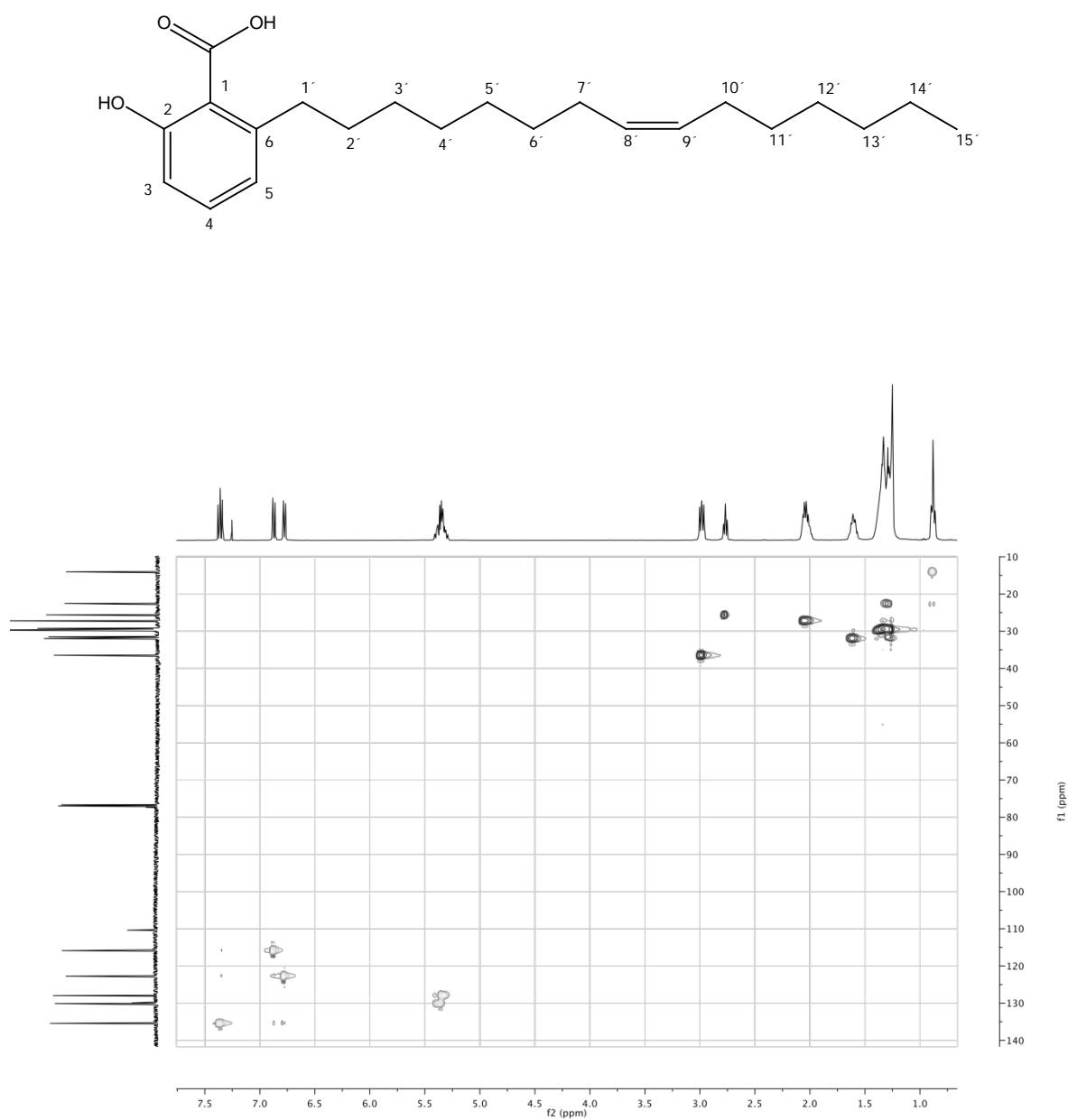


Figura 9. Espectro de HSQC del ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico (1).

Cuadro 13. Constantes espectroscópicas en las RMN¹H y ¹³C para el ácido 2-hidroxi-6-(Z)-pentadec-8'-enil)-benzoico (**1**).

Posición	RMN ¹³ C δ	RMN ¹ H δ
1	110.37	–
2	163.63	–
3	115.89	6.87 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8, 0.9)
4	135.44	7.36 (<i>t</i> , <i>J</i> =8)
5	122.76	6.77 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8, 0.9)
6	147.78	–
1- <u>C</u> OOH	176.14	–
1'	36.45	2.98 (<i>t</i> , <i>J</i> =8)
2'	31.97	1.60
3'	29.56	1.25
4'	29.56	1.25
5'	29.56	1.25
6'	29.56	1.25
7'	27.21	2.70
8'	130.17	5.35
9'	127.98	5.35
10'	27.21	2.03
11'	29.56	1.25
12'	29.56	1.25
13'	29.56	1.25
14'	29.56	1.25
15'	14.39	0.89 (<i>t</i> , <i>J</i> =6.8)

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



6.2. Determinación de los compuestos volátiles de las hojas de *S. purpurea* L. por la técnica de espacio de cabeza microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (EC-MEFS-CG-EM).

Para la identificación de los compuestos volátiles presentes en las hojas del ciruelo rojo se utilizó la técnica de espacio de cabeza microextracción en fase sólida (EC-MEFS) seguida de un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectroscopía de masas (EM). Los compuestos separados se caracterizaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los contenidos en la biblioteca del equipo, la biblioteca de Pherobase y la Biblioteca del NIST (National Institute of Standards and Technology).

El cromatograma de gases obtenido durante el análisis indicó la presencia de 88 componentes, de los cuales se logró la identificación de 43 componentes mayoritarios (Cuadro 14), los cuales representan el 49 % de los componentes totales. Los componentes mayoritarios de las hojas son: el 2-hexenal (11.06%), el benzaldehído (2.50%), el ácido hexanoico (3.27%), el salicilato de metilo (14.85%) *p*-ment-1-en-8-ol (14.31%) y el 1-nonen-3-ol (3.52%).



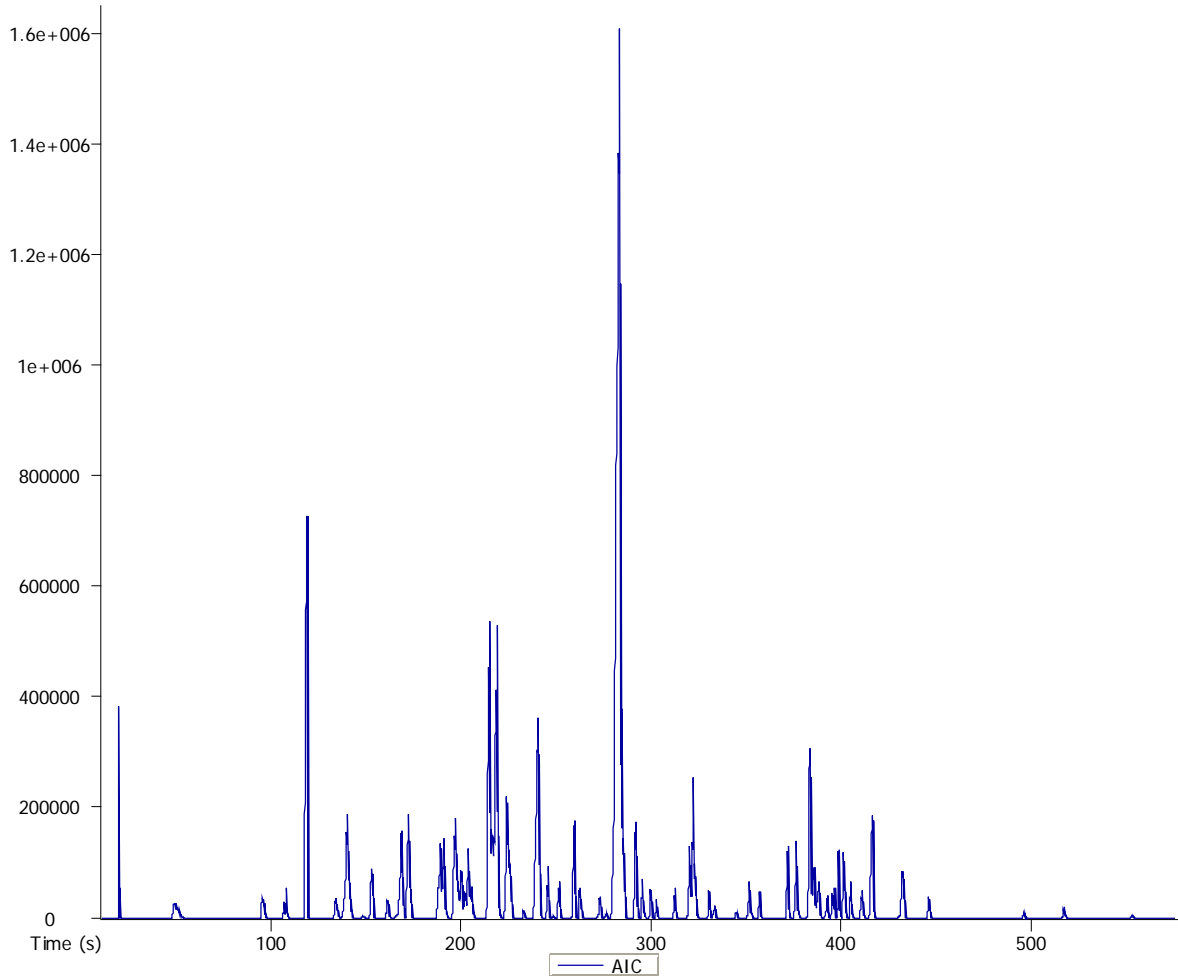


Figura 10. Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las hojas de *S. purpurea* L.



Cuadro 14. Principales compuestos presentes en las hojas de *S. purpurea* L.

Compuesto	IK	R.T. (s)	Área %	Fórmula
6-metil-2-Piperidinona	722	49.1	0.879	C ₆ H ₁₁ NO
3-amino-1-Propanol	726	50.95	0.503	C ₃ H ₉ NO
2-Hexenal	857	119.15	11.06	C ₆ H ₁₀ O
2-Pentin-4-ona	861	121.15	1.201	C ₅ H ₆ O
2,5-dihidro-1-nitroso-1 <i>H</i> -Pirrol	897	139.8	0.686	C ₄ H ₆ N ₂ O
Heptanal	898	140.4	1.956	C ₇ H ₁₄ O
Metoxi-fenil-oxima	952	168.85	0.697	C ₈ H ₉ NO ₂
(2 <i>Z</i>)-Heptenal	953	169.15	0.468	C ₇ H ₁₂ O
Benzaldehído	959	172.5	2.509	C ₇ H ₆ O
1-Nonen-3-ol	979	182.7	3.52	C ₉ H ₁₈ O
(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)-Heptadienal	992	189.5	0.891	C ₇ H ₁₀ O
Octanal	995	191.25	0.762	C ₈ H ₁₆ O
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-Heptadienal	1007	197.1	1.341	C ₇ H ₁₀ O
Eucaliptol	1026	204	0.468	C ₁₀ H ₁₈ O
2-metil-6-metilen-2-Octeno	1046	215	3.253	C ₁₀ H ₁₈
Ácido hexanoico	1047	215.4	3.276	C ₆ H ₁₂ O ₂
Alcohol becílico	1050	216.65	0.928	C ₇ H ₈ O
4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-isopropilideno-1 <i>H</i> -Pirazol	1053	218.15	0.675	C ₈ H ₁₄ N ₂
(2 <i>E</i>)-Octenal	1055	219.2	3.143	C ₈ H ₁₄ O
<i>trans</i> -3(10)-Caren-2-ol	1066	223.95	0.459	C ₁₀ H ₁₆ O
1-metanol, 2-hidroxi- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-Ciclohexeno	1066	224.2	1.54	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
2-metil-6-hepten-3-ol	1067	224.55	1.591	C ₈ H ₁₆ O
1-Octanol	1071	226.2	0.789	C ₈ H ₁₈ O
Nonanal	1101	240.2	1.466	C ₉ H ₁₈ O



Cuadro 14. Principales compuestos presentes en las hojas de *S. purpurea* L (continuación).

Compuesto	KI	R.T. (s)	Área %	Fórmula
6-metil-3,5-heptadieno-2-ona	1103	241.1	2.743	C ₈ H ₁₂ O
1,7,7-trimetil-(1S)Biciclo[2.2.1]heptan-2-ona	1149	259.65	0.799	C ₁₀ H ₁₆ O
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	1195	283.65	14.31	C ₁₀ H ₁₈ O
Salicilato de metilo	1195	283.8	14.85	C ₈ H ₈ O ₃
Acido truxílico	1196	284.1	0.651	C ₁₈ H ₁₆ O ₄
2,6,6-trimetil-1-Ciclohexeno-1-carboxaldehído	1215	292.1	0.818	C ₁₀ H ₁₆ O
Ácido 6-Noninoico	1216	292.5	0.818	C ₉ H ₁₄ O ₂
4-tert-Butilciclohexil acetato	1284	320.3	0.589	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
(-)-Mirtenil acetato	1285	320.55	0.576	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
(5Z)-(1-propenil)-1,3-Benzodioxol	1290	322.45	0.983	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
Tetrahidro-2-(2-propiniloxi)-2H-pirano	1362	351.7	0.513	C ₈ H ₁₂ O ₂
Cariofileno	1413	372.1	0.617	C ₁₅ H ₂₄
2-(3,3-Dimetil-but-1-inil)-1,1-dimetil-3-metilen-ciclopropano	1425	376.55	0.687	C ₁₂ H ₁₈
(6E)-10-dimetil-5,9-Undecadien-2-ona	1444	383.8	1.538	C ₁₃ H ₂₂ O
3,7-dimetil-1,3,7-Octatrieno-5,9-Undecadien-2-ona	1450	385.95	0.636	C ₁₀ H ₁₆
1,2,3,4,4α,5,6,8α-octahidro-4α,8-dimetil-2-(1-metiletenil)-, [2R-(2α,4α,8α)]- Naftaleno	1491	401.35	0.669	C ₁₅ H ₂₄
Éster metílico del ácido 11-Octadecinoico	1517	411.05	0.416	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
5,6,7,7α-tetrahidro-4,4,7α-trimetil-2(4H)-Benzofuranona	1532	416.7	1.224	C ₁₁ H ₁₆ O ₂
4-Propioniloxipentadecano	1573	432.2	0.799	C ₁₈ H ₃₆ O ₂



6.3. Determinación de los componentes del aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L.

Para la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L. se realizó un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). Los compuestos obtenidos, posteriormente fueron caracterizados mediante la comparación de sus índices de Kovats con los de la biblioteca del equipo, la biblioteca Pherobase y NIST (National Institute of Standards and Technology).

El cromatograma de gases indicó la presencia de 89 compuestos, de los cuales se logró la identificación de 42 componentes mayoritarios en la esencia (Cuadro 15), los cuales representan el 47% de los constituyentes totales presentes en el aceite esencial de las hojas. Destacando que los componentes mayoritarios de la esencia son: el butil ester ácido acético (1.89%), (2Z)-Hexenal (3.27%), Ciclohexanona (2.18%), etilenglicol butil éter (4.42%), 1-Nonen-3-ol (2.51%), 2, 6, 6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxaldehído(1.02%), Ionona(1.47%), óxido de Cariofileno (4.14%) y (5E)-Octadeceno (3.91%).



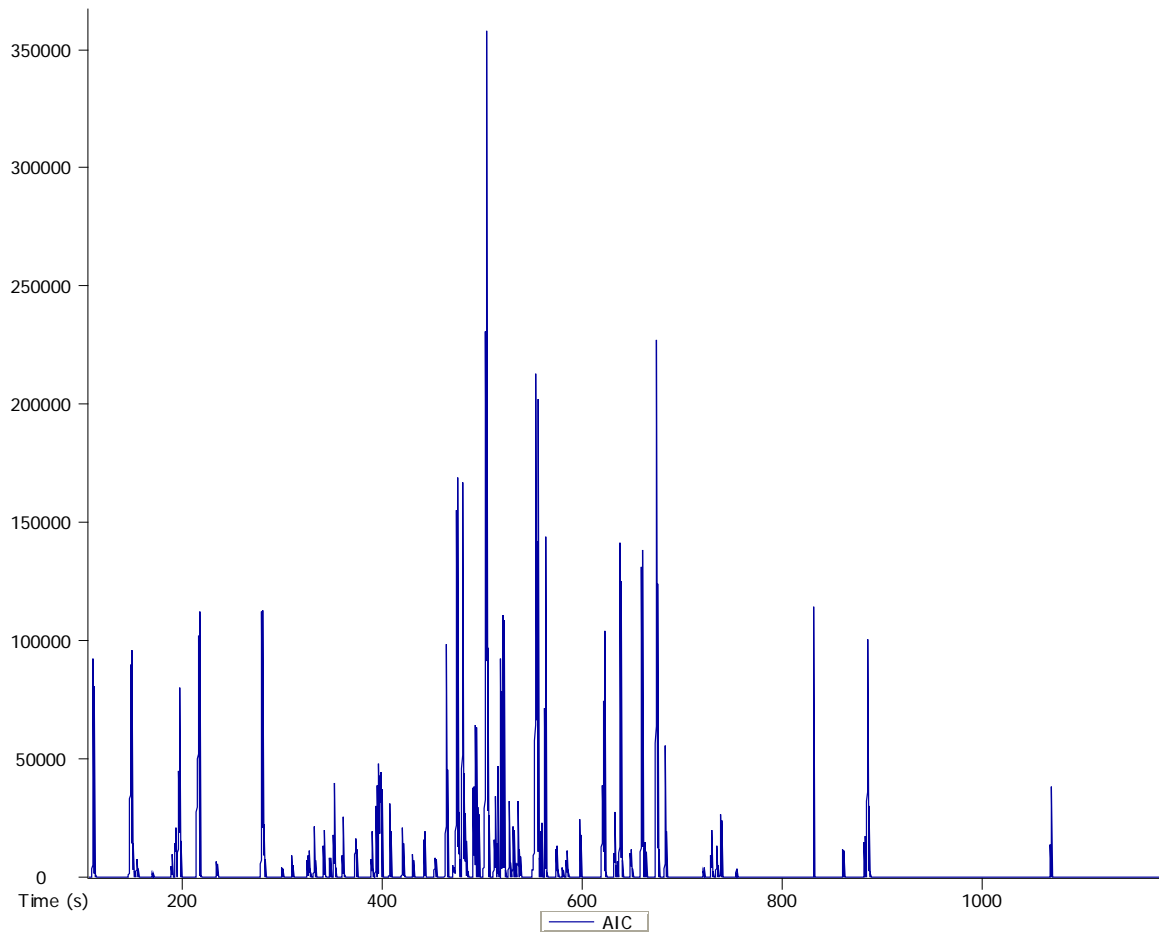


Figura 11. Cromatograma de gases de los componentes presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L.

Cuadro 15. Principales compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L.

Compuesto	IKE	IKT	TR (s)	Área %	Fórmula
Acetato de butilo	810	812	112	1.894	C ₆ H ₁₂ O ₂
(2Z)-Hexenal	846	854	150	3.275	C ₆ H ₁₀ O
Etilbenceno	848	855	151	0.134	C ₈ H ₁₀
(3E)-Hexeno-1-ol	852	853	155	0.198	C ₆ H ₁₂ O
(2E)-Propanoato-hexeno-1-ol	867	864	171	0.048	C ₉ H ₁₆ O ₂
1,2-dimetil,benceno	885	891	190	0.041	C ₈ H ₁₀
2-Heptanona	889	890	194	0.969	C ₇ H ₁₄ O
Ciclohexanona	892	894	197	2.181	C ₆ H ₁₀ O
Etilenglicol butil éter	913	909	217	4.429	C ₆ H ₁₄ O ₂
2-Ciclohexen-1-ona	933	914	235	0.187	C ₆ H ₈ O
1-Nonen-3-ol	984	1041	280	2.519	C ₉ H ₁₈ O
1,2,3-trimetil-benceno	986	996	282	0.448	C ₉ H ₁₂
Ácido hexanoico	1029	1020	310	0.304	C ₆ H ₁₂ O ₂
3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona	1057	1117	325	0.021	C ₉ H ₁₄ O
(2E)-Octenal	1060	1059	327	0.297	C ₈ H ₁₄ O
Undecano	1099	1099	348	0.115	C ₁₁ H ₂₄
3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol	1108	1104	353	0.696	C ₁₀ H ₁₆ O
Salicilato de metilo	1189	1190	397	0.615	C ₈ H ₈ O ₃
α,α4-trimetil-3-ciclohexen-1-metanol	1192	1190	399	0.475	C ₁₀ H ₁₈ O
2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxaldehído	1194	1201	399	1.027	C ₁₀ H ₁₄ O



Cuadro 15. Principales compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L. (continuación).

Compuesto	IKE	IKT	TR (s)	Área %	Fórmula
2,6,6-trimetil-1-Ciclohexen-1-carboxaldehído	1213	1208	408	0.577	C ₁₀ H ₁₆ O
(3Z)-7-dimetil-2,6-Octadienal	1266	1240	431	0.172	C ₁₀ H ₁₆ O
(1E)-(2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-il)-,2-Buten-1-ona	1372	1374	477	0.501	C ₁₃ H ₁₈ O
beta-cariofileno	1407	1414	492	0.626	C ₁₅ H ₂₄
Ionona	1412	1422	494	1.473	C ₁₃ H ₂₀ O
(6E)-10-dimetil-,5,9-undecadien-2-ona	1442	1445	505	6.527	C ₁₃ H ₂₂ O
3,7-dimetil-1,3,7-Octatrieno	1445	1052	506	2.22	C ₁₀ H ₁₆
Germacrano D	1465	1480	513	0.54	C ₁₅ H ₂₄
Óxido de Cariofileno	1573	1575	554	4.148	C ₁₅ H ₂₄ O
(5E)-Octadeceno	1579	1894	556	3.918	C ₁₈ H ₃₆
1,5,5,8-tetrametil-, [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]-12-Oxabiciclo[9.1.0]dodeca-3,7-dieno	1600	1601	564	2.057	C ₁₅ H ₂₄ O
Cadaleno	1667	1663	585	0.774	C ₁₅ H ₁₈
Hexadecanal	1708	1811	598	0.645	C ₁₆ H ₃₂ O
(5E)-Octadeceno	1779	1894	620	1.098	C ₁₈ H ₃₆
Ácido tetradecanoico	1782	1771	622	0.478	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Miristato de isopropilo	1819	1816	633	0.493	C ₁₇ H ₃₄ O ₂



Cuadro 15. Principales compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L. (continuación).

Compuesto	IKE	IKT	TR (s)	Área %	Fórmula
(3E,7E)-11-trimetil-,2,6,10-dodecatrien-1-ol	1829	1730	636	0.013	C ₁₅ H ₂₆ O
6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	1838	1842	639	2.397	C ₁₈ H ₃₆ O
Ácido pentadecanoico	1873	1870	649	0.197	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Metil ester ácido tridecanoico	1921	1625	664	0.253	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
9,12,15-Octadecatrienal	2153	2175	730	0.864	C ₁₈ H ₃₀ O
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	2172	2021	735	0.415	C ₁₆ H ₃₂ O ₂

IKE: Índice de Kovats Experimental

IKT: Índice de Kovats Teórico

6.4. Evaluación del potencial antibacteriano del aceite esencial preparado a partir de las hojas de *S. purpurea* L. (ciruelo rojo).

Realizando el método descrito en la sección 5.7, a partir del aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L. se determinó su potencial antibacteriano utilizando a *S. mutans* y *P. gingivalis* como microorganismos de prueba. Los resultados arrojados de dicho procedimiento indican que la esencia presenta una CMI de 67 µg/mL y 96 µg/mL para las bacterias patógenas *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. (Cuadro 16).



Cuadro 16. Actividad antibacteriana (CMI) del aceite esencial de las hojas de *S. purpurea* L. frente a las bacterias orales *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Compuesto	<i>Streptococcus mutans</i> CMI (µg/mL)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI (µg/mL)
Aceite esencial de las hojas de <i>S. purpurea</i> L.	67	96
CHX*	1.2	0.7

CHX*: gluconato de clorhexidina



7. Conclusiones

- La presente investigación representa una contribución original al conocimiento de la química de la especie *Spondias purpurea* L. (ciruelo rojo).
- El estudio fitoquímico biodirigido del extracto total de las hojas, permitió la obtención de un ácido anacárdico con actividad antibacteriana contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. A partir de las evidencias experimentales se concluyó que el ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico aislado de la fracción activa F2d, constituye el compuesto activo mayoritario de las hojas del ciruelo rojo.
- El ácido 2-hidroxi-6-(Z-pentadec-8'-enil)-benzoico mostró actividad antibacteriana con concentraciones mínimas inhibitorias de 56 µg/mL y 40 µg/mL para *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente.
- El potencial antibacteriano presentado por el extracto corrobora el uso dado para esta especie en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades infecciosas.
- El análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) del aceite esencial obtenido a partir de las hojas, permitió determinar como compuestos mayoritarios: acetato de butilo, (2Z)-Hexenal, ciclohexanona, etilenglicol butil éter, 2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxaldehído, óxido de cariofileno y el (5E)-octadeceno.
- La microextracción en fase sólida (SPME) representa una alternativa a la preparación de los aceites esenciales a partir de fuentes vegetales, ya que los analitos en la muestra son extraídos directamente y concentrados en la fibra de extracción lo que permite incrementar los límites de detección de los componentes volátiles del material vegetal.



8. Perspectivas

- ✧ Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto total, así como de sus compuestos minoritarios; a partir de las hojas de *S. purpurea* L. (ciruelo rojo).

- ✧ Continuar el estudio fitoquímico biodirigido de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar compuestos minoritarios presentes en las hojas para poder determinar su posible actividad biológica, así como para poder realizar la caracterización estructural de cada uno de ellos de manera individual.

- ✧ Utilizar al ácido 2-hidroxi-6-(*Z*-pentadec-8'-enil)-benzoico (**1**), como modelo para la síntesis total o parcial de compuestos análogos, que presenten una mayor actividad biológica frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

- ✧ Determinar el efecto del aceite esencial de las hojas del ciruelo rojo sobre la agregación y la formación de la placa dentobacteriana.

- ✧ Analizar de manera más directa el mecanismo de acción de los ácidos anacárdicos en la inhibición de las enzimas glucosiltransferasas de *Streptococcus mutans* y en la inhibición en el crecimiento de la bacteria periodontopática *Porphyromonas gingivalis*.



9. Referencias

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, E., (1994). *Plantas Medicinales del Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 1ª edición.

Argueta A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I (1-583). México: Instituto Nacional Indigenista, pp 457 y 458.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, (1994). Tomo I (1-583 páginas); Tomo II (584-1193 páginas); Tomo III (1194-1786 páginas). 1a. Ed. Méx.

Avitia, G., Ediberto, A. (2000). Información forestal de *Spondias purpurea* L. Sistema de información forestal. 134-137

Baehni, P., Takeuchi, Y., (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Diseases* 9(Suppl. I):23-9.

Begum, P., Hashidoko, Y., Islam, T., Ogawa, Y., Tahara, S., (2002). Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Journal of Biosciences*. 57(9/10), 874-882.

Beyenal, H., Lewandoski, Z., (2004). Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Research* 38: 2726-2736.

CONABIO, imágenes de *Spondias purpurea* L., disponibles en <http://www.conabio.gob.mx/>

Corthout, J., Pieters, L., Claeys, M., Geerts, St., Vanden-Berghe, D., Vlietinck, A. (1994). Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Medica*, 60, 460-463.

Choi, Y. H., Choi, H. K., Peltenburg-Looman, A. M. G., Lefeber, A. W. M., Verpoorte, R. (2004). Quantitative analysis of ginkgolic acids from *Ginkgo* leaves and products using 1H-NRM. *Phytochemical Analysis*, 15,325-330.



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.

Davey, M.E., O'Toole, G.A., (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-867.

Devulapalle, K.S., Gómez de Segura, A., Ferrer, M., Alcalde, M., Mooser, G., Plou, F.J. (2004). Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research*, 339, 1029-1034.

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 trece de julio de 2010a las 6:25 pm.

Donlan, R., Costerton, W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol.* 15: 167-193.

Fives-Taylor, P.M., Meyer, D.H., Mintz, K.P., Brissette, C. (1999) Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 20:136-67

Genco, R., (2000). Is periodontitis a risk for general health. *J.Clin.Periodontol. Suppl.*1.27: 9.

Gestal, J., Smyth, E., Cuenca, E., (2001). Epidemiología y prevención de la caries y las enfermedades periodontales. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. 10ª edición. Barcelona. Masson. 789– 803.

Grazzini, R., Hesk, D., Heininger, E., Hildenbrandt, G., Reddy, C., Cox-Foster, D., Medford, J., Craig, R., Mumma, R., (1991). Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxidase synthase by anacardic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 176(2), 775-780.



Hanham, A., Addy, M. (2001). The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. *J Clin Periodontol* 28:255-7.

Himejima, M., Kubo, I., (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(2), 418-421.

Kasemura, K., Nomura, M., Tada, T., Fujihara, Y., Shimomura, K. (2002). Antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of 6-[(8Z)-8-pentadecenyl]salicylic acid derivatives. *Journal of Oleo Science*, 51 (10), 637-642.

Kubo, I., Masuoka, N., Joung Ha, T., Tsujimoto, K., (2006). Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*. 99, 555-562.

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.

Lamont, R., Jenkinson, H., (1999). Life below the gum line: Pathogenic Mechanism of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(4):1244-1263

Liébana, U. J., (2002). *Microbiología oral*. McGraw Hill-Interamericana, España. 297-525.

Lima, C., Pastore, G., Lima, E., (2002). Study of the antibacterial activity of anacardic acids from the cashew *Anacardium occidentale* nut Shell oil of the clone of cashew- midget-precocious CCP-76 and CCP-09 in five stages of maturation on oral microorganisms. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 20(3), 358-362.

Liu, Y., Abreu, P.J.M (2006). Long chain alkyl and alkenyl phenols from roots of *Orozoa insignis*. *J. Braz. Chem. Soc.*,17(3), 527-532.



Lozoya, X., (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: La investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaria de Salud, México, 225-270.

Martínez, M., (1959). *Las plantas medicinales de México*. 404-405.

Marsh, P., Martin, M., (2000). *Oral Microbiology*. Fourth edition. Wright. England.

Marsh, P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? SGM Special Lectura. *Microbiology* 149:279-94.

Mata, R, Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G., (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 34, 147-154.

Moore, W., Moore, L., (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 66-77

Murphy-Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

NamHui, Y., DoThi, Ha., Thrinh, N., Jin, P., Sangmyung, L., Minkyun, N., Hyunju, J., Hyun, S., Young, H., Kihuan, B. (2010). The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*. 20, 1165-1168.

Narasimhan, B., Panghal, A., Singh, N., Dhake, A. S., (2008). Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. *Journal of Food Processing and Preservation*. 32 (4), 600-609.

Organización Mundial de la Salud (OMS), (2005). *Bulletin of the World Health Organization*. 83, 641-720.



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.

Pimienta, B. E., Ramírez, H. B., Castellanos, R. J., (2008). Sistemas de producción de *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) en el centro-occidente de México. *Rev. biol. trop*, vol.56, no.2, p.675-687.

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.

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

Rivero-Cruz J. Fausto., (2008), "Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*", *Journal of Ethnopharmacology*, 119, pp 99-103.

Rudney, J.D. (2000). Saliva and dental plaque. *Adv Den* 14:29-39.

Santos, F.A., Bastos, E.M., Uzeda, M., Carvalho, M.A., Farias, L.M., Moreira, E.S., Braga, F.C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 1-7

Schultz, D. J., Wickramasinghe, N.S., Ivanova, M.M., Isaacs, S.M., Dougherty, S.M., Imbert-Fernandez, Y., Cunningham, A.R., Chen, C., Klinge, C.M., (2000). Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation *Periodontol* 5: 7-25.

Silvana, A. L., Antonio Luís, A. P., Maria José, A.M., Richard, P.D., Flavia, N., Valério, M. N., Maria, N. S., Azizedite, G. G., Rosane, N. G. (2009). The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 1-9.



- Socransky, S., Haffajee, A. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective 6:3-14.
- Stefano, P., Crispian, S. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*. 37, 413-423.
- Takahashi, N., (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series* 1284, 103-112.
- Thongchai, T., Athisri, S., Asawin, W., Pittaya, T. (2009). *Streptomyces* sp. ST8 extracts attenuate growth, acid production, adhesion, biofilm formation, and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 21: 78-86
- Timmerman, M., Van der Weijden, G., Arief, E., Armand, S., Abbas, F., Winkel, E., Van Winkelhoff, A., Van der Velden, U., (2001). Untreated periodontal disease in Indonesian Adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J. Clin Periodontol*. 28: 617-627.
- Tyman, J. H. P., (2001). Chemistry and biochemistry of anacardic acids. *Recent Research Developments in lipids*, 5, 125-145.
- Van Beek, T.A. y Wintermans, M.S. (2001). Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. *Journal of Chromatography A*, 930, 109-117.
- Wu, C., Wei, G., (2002). Tea as a functional food for oral health, *Nutrition*, 18, 443-443.



Yasuyuki, A., Kenji, Y., Yoshinori, O., Tomohiko, O. (2005). Microbiological Research, 160, 257-263.

Zeng, L., Das, S., Burne, R. (2010). Utilization of lactose and galactose by *Streptococcus mutans*: Transport, Toxicity and Carbon Catabolite Repression. Journal of Bacteriology. 191:2434-2444.

