



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE LAS HOJAS DE GUAYABA Y DEL FLAVONOIDE
AVICULARINA SOBRE LAS GLUCOSILTRASFERASAS DE
*Streptococcus mutans***

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JANNET JAZMÍN QUINTANA MUNGUÍA



México D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Vocal:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
Secretario:	Dra. Gloria Díaz Ruíz
1er. suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazón
2do. suplente:	M. en C. José Alberto Rivera Chávez

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Supervisor técnico

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Sustentante

Jannet Jazmín Quintana Munguía



A la Facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de concluir esta etapa de estudios y por la formación académica recibida de cada uno de los académicos que forman parte de esta gran Institución.

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

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su apoyo y tiempo dedicado durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por darse el espacio y el tiempo para la revisión del presente trabajo y por sus observaciones realizadas a este.

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

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





Este trabajo se lo dedico con todo mi amor y cariño a mi familia, a mis padres que me han brindado todo su amor, comprensión y apoyo y que sin duda me han hecho la persona que soy hoy en día les dedico esta tesis.

A mi madre que ha estado conmigo siempre que la he necesitado y que sin dudarlo se que siempre estará ahí espero con esto retribuirte algo de lo mucho que has sacrificado por mi y que un día no muy lejano te sientas orgullosa de mi.

A mi padre que me ha brindado su apoyo y cariño y que sin decir nada se que apoyas mis decisiones y te preocupas por mí.

A mi hermana Jess que me ha ayudado con todos sus diagramas, carteles y dibujos que sin duda no hubieran quedado igual debido a mi falta de talento artístico, gracias hermanita espero verte en la misma situación en la que me encuentro hoy muy pronto.

A Juanjo gracias por tu apoyo, amor, comprensión y sobre todo toda tu paciencia, por aguantarme cuando nadie lo hacía, por consolarme cuando me desesperaba y por quererme tanto, te quiero mucho.

A mis amigos presentes y pasados por hacer toda mi carrera académica y vida más agradable y llenarme de recuerdos felices, a mi amiga Lawis ya que se que definitivamente la facultad no hubiera sido la misma sin ella sin ese dúodinámico jajaja¡¡ te quiero amiga y te deseo todo lo mejor.

Y a mis amigos del laboratorio 111 : Parizad, Ingrid, Gloria, Nizage, Gaby, Ahira, Yazmin gracias por compartir conmigo sus conocimientos, sus risas, por estresarse conmigo y por su cariño, espero que les valla muy bien en la vida y claro se acuerden de mi, pero me falto mencionar a alguien muy especial de ese laboratorio y que estimo muchísimo, Renecin definitivamente eres el alma de ese laboratorio gracias por hacerme reír, por escucharme y por ser mi amigo espero sigamos siendo amigos muchos años sabes que te deseo lo mejor.

J. Jazmín





*Muy cerca de mi ocaso, yo te bendigo, Vida,
porque nunca me diste ni esperanza fallida,
ni trabajos injustos, ni pena inmerecida;*

*Porque veo al final de mi rudo camino
que yo fui el arquitecto de mi propio destino;
que si extraje las mieles o la hiel de las cosas,
fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas:
cuando planté rosales coseché siempre rosas.*

*...Cierto, a mis lozanías va a seguir el invierno:
¡mas tú no me dijiste que mayo fuese eterno!
Hallé sin duda largas las noches de mis penas;
mas no me prometiste tan sólo noches buenas;*

*y en cambio tuve algunas santamente serenas..
.Amé, fui amado, el sol acarició mi faz.
¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en paz!*

Amado Nervo





Lista de abreviaturas	I
Lista de tablas y diagramas	II
Lista de figuras	III
1.0 Introducción.....	1
2.0 Antecedentes.....	3
2.1.0 Salud de la cavidad oral.....	3
2.1.1 Epidemiología de la caries	3
2.1.2 Definición de caries	4
2.2.0 Etiología de la caries	4
2.2.1 Factores implicados en el desarrollo de la caries	4
2.2.2 Patogénesis	5
2.3.0 Ecosistema oral	6
2.3.1 Placa dental	7
2.3.2 <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.3.3 Factores de Virulencia de <i>S.mutans</i>	9
2.3.4 Glucosiltransferasas de <i>S. mutans</i>	11
2.4.0 Prevención cariogénica	13
2.4.1 Principales estrategias para la prevención dental	13
2.4.2 Polifenoles y su actividad anti-cariogénica	14
2.5.0 <i>Psidium guajava</i> L (guayaba).....	17
2.5.1 Descripción	17
2.5.2 Origen y distribución	17
2.5.3 Fitoquímica.....	17
2.5.4 Usos y propiedades farmacológicas	21
2.5.5 Actividad antibacteriana	21
2.5.6 Efecto en la placa dental.....	22
3.0 Justificación	23
4.0 Objetivos	24
5.0 Parte experimental	25
5.1.0 Procedimientos generales	25
5.1.1 Análisis cromatográficos	25
5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	25





5.2 Ensayo biológico	25
5.2.1 Microorganismos de prueba	25
5.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	26
5.3. Estudio químico de las hojas de <i>Psidium guajava</i>	27
5.3.1 Material vegetal	27
5.3.2 Obtención del extracto	27
5.3.3 Fraccionamiento primario del extracto de las hojas de <i>P. guajava</i>	27
5.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción EII obtenida del fraccionamiento primario	27
5.4.4 Fraccionamiento terciario de la fracción activa J3	28
5.4.5 Fraccionamiento cuaternario de la fracción JJ4 obtenida del fraccionamiento terciario.	29
5.4.0 Medición de la actividad enzimática de GTFs	31
5.4.1 Cuantificación del contenido de glucosa en los glucanos.	31
5.4.2 Obtención del valor de I_{50} de los extractos de plantas sobre la actividad de las glucosiltransferasas.	32
6.0 Resultados y Discusión	34
6.1.0 Resultados de CMI del extracto crudo, así como de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario y secundario	34
6.2 Elucidación estructural de quercetina- α -arabinofuranosido (avicularina)	35
6.3 Efecto de los extractos y avicularina sobre las GTFs de <i>S. mutans</i>	36
7.0 Resumen	41
8.0 Perspectivas	42
9.0 Referencias bibliográficas	43





ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo
BHI	Infusión cerebro corazón (siglas en ingles)
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CHX	Clorhexidina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dd	Doble doblete
GTFs	Glucosiltransferasas
I ₅₀	Inhibición 50
mg	Miligramo
µg	Microgramo
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
MR	Medio de reacción
NAD ⁺	Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido.
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pac	Proteína de adhesión celular
Ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
Rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
V ₀	Velocidad inicial





Lista de Tablas

- Tabla 1: Clasificación de las glucosiltransferasas en base al tipo de glucano sintetizado.
- Tabla 2. Principales compuestos químicos utilizados en la prevención de la caries
- Tabla 3. Actividad de los polifenoles en plantas sobre *S.mutans*
- Tabla 4. Flavonoides reportados en la especie *Psidium guajava*
- Tabla 5. Controles para el ensayo biológico.
- Tabla 6 : Fracciones obtenidas por CCA de la fracción EII del extracto de *P. guajava*
- Tabla 7: Fracciones obtenidas por CCA de la fracción J3
- Tabla 8: Fracciones obtenidas por CCA de la fracción JJ4
- Tabla 9. Actividad antibacteriana (CMI) del extractos obtenido de *Psidium guajava*.
- Tabla 10: Resultados de inhibición enzimática.

Lista de Diagramas

- Diagrama 1: Proceso cariogénico
- Diagrama 2. Diagrama del fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava*
- Diagrama 3: Metodología del ensayo para la determinación de actividad de GTFs





Lista de Figuras

- Figura 1: Mapa de caries a nivel mundial en niños en edad escolar
- Figura 2. Factores etiológicos de la caries
- Figura 3 : Proceso de formación de biocapa
- Figura 4: Composición de la placa dental
- Figura 5. Utilización de la sacarosa por *S. mutans* y patogénesis de la caries
- Figura 6: Síntesis de glucanos
- Figura 7: Clasificación de los polifenoles
- Figura 8. Distribución geográfica de *Psidium guajava*
- Figura 9: Ecuación para obtener I_{50}
- Figura 10: Efecto de los extractos obtenidos de *P. guajava* y avicularina sobre la GTFs de *S. mutans*
- Figura 11: Estructura de la avicularina





1.0 INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización Mundial de Salud (OMS) las enfermedades bucodentales, como la caries dental, la periodontitis (enfermedad gingival) son un problema de salud de alcance mundial, presente tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo, afectando en estos últimos del 60% al 90% de la población. La caries dental es la enfermedad bucodental más frecuente dentro de los países asiáticos y latinoamericanos (OMS, 2010).

En México, las enfermedades ocasionadas por microorganismos representan un gran gasto al sector salud, en donde la caries representa una de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia y que puede ocasionar mayores estragos en la calidad de vida de quienes la padecen. Aunque en los últimos años la incidencia de esta enfermedad ha disminuido debido a la mejora en higiene bucal y al uso de diversos compuestos con fines profilácticos contenidos en los productos destinados a esta. Según datos de la OMS aún sigue siendo un problema grave de salud, sobre todo en poblaciones de bajos recursos (OMS, 2004).

La caries se caracteriza por la colonización y acumulación de microorganismos en la superficie dental formando la placa dentobacteriana produciendo la desmineralización de la estructura del diente y que puede desembocar en dolor o en el peor de los casos en la pérdida de piezas dentales (Fejerskov *et al.*, 2004). La especie *Streptococcus mutans* es conocida como el principal agente etiológico de la caries, esta especie, sintetiza polisacáridos extracelulares insolubles a partir de los azúcares de la dieta por acción de las enzimas glucosiltransferasas, estos polisacáridos aumentan la adhesión de bacterias a la superficie dental contribuyendo a la formación de la biocapa y con ello la acumulación de microorganismos cariogénicos (Hamada *et al.*, 1980).

En la actualidad existen una gran variedad de compuestos con actividad antimicrobiana tanto de origen sintético como provenientes de fuentes naturales las cuales gozan de ventajas sobre todo en la síntesis y seguridad sobre aquellos obtenidos de manera sintética. Adicionalmente el uso de plantas con fines medicinales en nuestro país goza de gran aceptación y es una práctica ampliamente utilizada sobre todo en la población que no cuenta con acceso a instituciones de salud (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Estudios etnofarmacológicos de la especie *Psidium guajava* comúnmente conocida como guayaba muestran el uso de esta planta en diferentes partes del mundo como tratamiento de





diversos padecimientos, atribuyéndole diferentes propiedades farmacológicas entre las cuales destacan sus propiedades: antiinflamatorias, antihipertensivas, analgésicas, antipiréticas, antidiarreico, antitusivo y antibacteriano, entre otras (Aguilar *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2004).

Aunque existen en la literatura diversos estudios de las propiedades farmacológicas atribuidas a esta especie y su relación con sus componentes químicos, en muchos casos aún no se ha podido dilucidar de una forma clara la relación existente entre estos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los flavonoides encontrados en la especie *Psidium guajava* poseen propiedades bacteriostáticas y antimicrobianas contra diversas especies bacterianas tanto Gram positivos como Gram negativos (Pongsak y Parichat, 2010).

Dado que la evidencia científica ha proporcionado bases para señalar que los componentes contenidos en los extractos de la especie *Psidium guajava* L. poseen un alto potencial antimicrobiano para una amplia variedad de especies microbianas, resulta de gran interés realizar una investigación sobre los efectos antimicrobianos y potencia de los diferentes componentes contenidos en la guayaba, particularmente los flavonoides con el fin de proporcionar información útil y trascendental para su posterior uso como profilaxis y tratamiento en enfermedades de la cavidad oral.





2.0 ANTECEDENTES

2.1.0 Salud de la cavidad oral

La OMS define la salud bucodental como la ausencia de dolor orofacial crónico, cáncer de boca o garganta, llagas bucales, defectos congénitos como labio leporino o paladar hendido, enfermedades periodontales (de las encías), caries dental y pérdida de dientes, y otras enfermedades y trastornos que afectan a la boca y la cavidad bucal (OMS,2004).

La salud bucal es un elemento determinante y fundamental de la salud integral, cualquier factor que afecte la salud bucal también tendrá implicaciones en el estado de salud general del paciente, perturbando por consiguiente en forma generalizada la calidad de vida de este.

2.1.1 Epidemiología de la caries

Cifras de la OMS estiman que alrededor de 5 mil millones de personas en el planeta sufren caries, de las cuales entre el 60 y 90 % de la población afectada se encuentra en edad escolar (Figura 1). Los efectos de estas enfermedades en términos de dolor, sufrimiento y/o deterioro en la calidad de vida son considerables y a la vez costosos, representando del 5 al 10 % de los gastos en salud pública (OMS, 2004).

En México la prevalencia de caries dental en niños supera cualquier otra condición de salud. De acuerdo con cálculos del 2002, seis de cada diez niños padecen caries dental a la edad de seis años. A los 25 años se encuentran afectados por caries dental 13 dientes en promedio y a los 64 años seis dientes presentan caries, 6 se han perdido y uno está obturado (SSA, 2002).

No obstante la reducción en la incidencia de caries es una tendencia a nivel mundial, como consecuencia de mejora en la higiene, uso de fluoruros y otros productos con fines profilácticos incorporados en productos destinados a la higiene dental, sin embargo los países menos desarrollados no han logrado reducir de forma significativa la incidencia de las caries, sobre todo en la





población que no cuenta con acceso a Instituciones de salud y de bajos recursos económicos (CENAVECE, 2008).

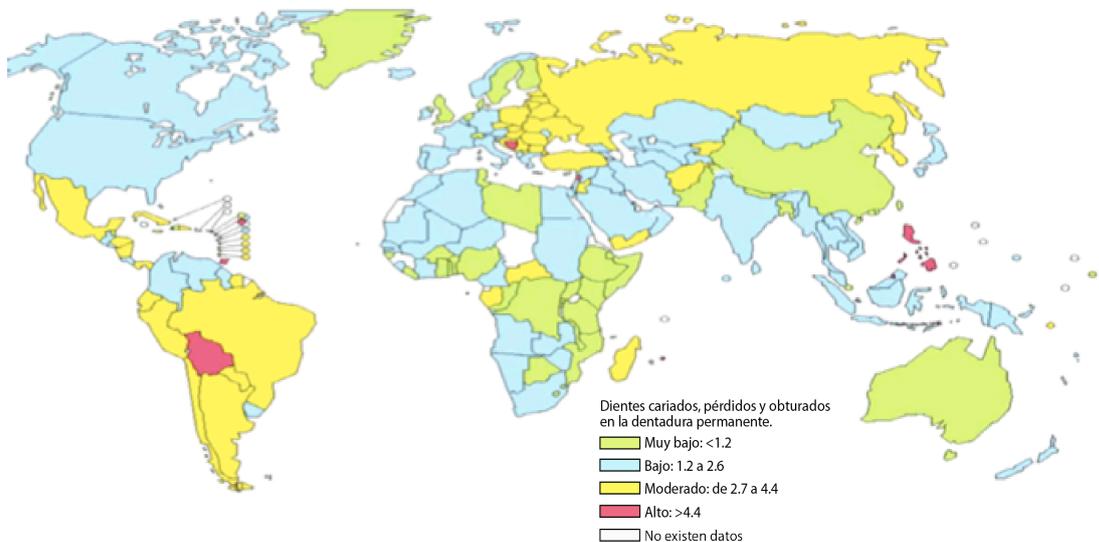


Figura 1: Mapa de caries a nivel mundial en niños en edad escolar (OMS, 2003).

2.1.2 Definición de caries

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a la caries como un proceso localizado de origen multifactorial caracterizado por el reblandecimiento del tejido duro del diente que evoluciona hasta formar una cavidad; de la cual, si no se atiende oportunamente afecta la salud general y la calidad de vida (OMS, 1987).

2.2.0 Etiología de la caries

2.2.1 Factores implicados en la caries

La caries dental es una enfermedad multifactorial que se inicia con cambios microbiológicos en la placa dental (biofilm) y que desencadena una serie de reacciones que propician la desmineralización del diente (Figura 2). El riesgo de una persona a sufrir caries puede variar y está relacionado con diferentes factores tanto fisiológicos como de estilo de vida.

Los factores socioeconómicos y culturales tienen un papel importante en el desarrollo de la caries ya que condicionan hábitos dietéticos, de higiene oral y





de frecuencia y tipo de atención odontológica, por otra parte factores propios del hospedero (como la estructura dental y el flujo y composición de la saliva), así como la microbiota oral también influyen en el desarrollo de la caries (Featherstone *et al.*, 2002).

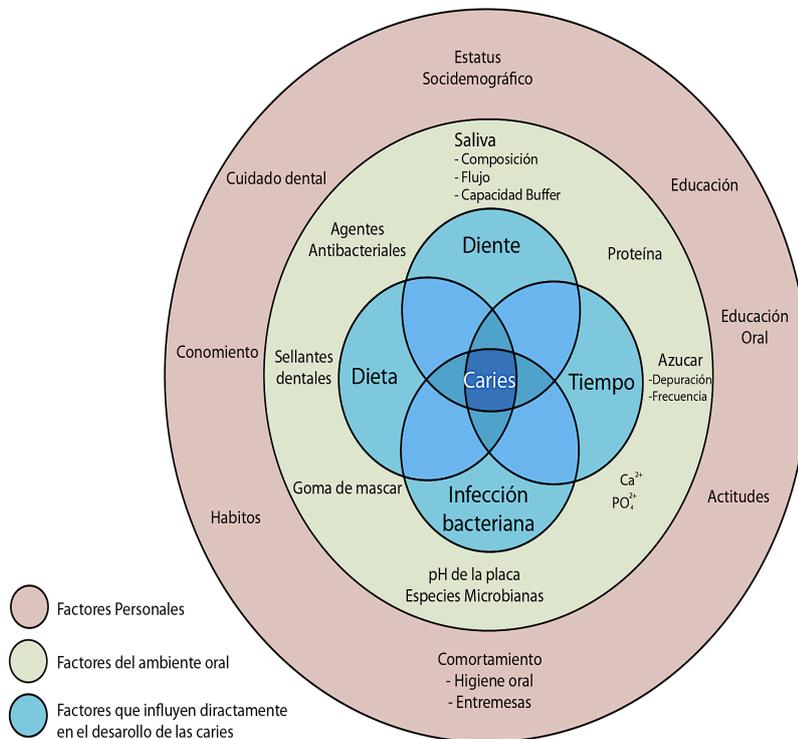


Figura 2. Factores etiológicos de la caries (Fejerskov y Manji, 1990)

Actualmente, se considera la formación de la placa dental como el principal detonante de la caries, todos los factores del hospedero y del medio que favorecen la formación de la biocapa dental pueden ser definidos como factores de riesgo para el desarrollo de la caries (Negroni, 2008).

2.2.2 Patogénesis

La caries dental es resultado de la interacción a través del tiempo entre las bacterias productoras de ácido, un sustrato que las bacterias pueden metabolizar y factores del hospedero que incluyen los dientes y la saliva (Selwitz, 2007). La caries dental resulta del desequilibrio entre los minerales del





diente y la ecología microbiana (biofilm). En donde las bacterias endógenas principalmente *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus* spp en el biofilm producen ácidos como un subproducto del metabolismo de hidratos de carbono fermentables (Diagrama 1). Este ácido es secretado por las bacterias y hace que el pH local disminuya hasta un valor crítico al cual se produce la desmineralización de los tejidos dentales. Si la difusión de calcio, fósforo y carbonato fuera del diente, continúa entonces se producirá una cavidad en las estructuras dentales implicadas (Fejerskov *et al.*, 2004; Scheje *et al.*, 2004).

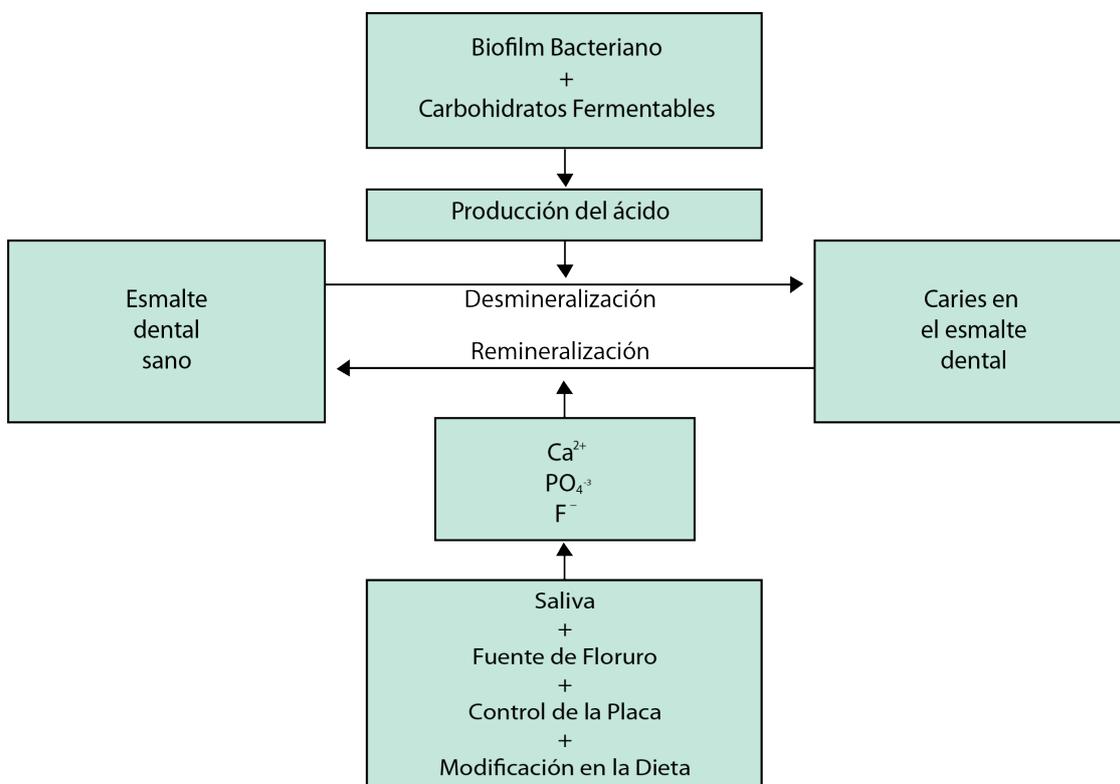


Diagrama 1: Proceso cariogénico (modificado de Selwitz, 2007).

2.3.0 Ecosistema oral

La cavidad oral posee una microbiota característica, debido a las condiciones peculiares de nutrientes, pH y humedad, además de la variedad de función y distintos factores que confluyen localmente. El ecosistema oral comprende la flora oral, los diferentes sitios de la cavidad oral donde crecen (es decir,





hábitats) y el entorno asociado. Siendo caracterizados 5 diferentes hábitats orales:

- Mucosa bucal
- El dorso de la lengua
- Epitelio crevicular
- Superficies dentales

2.3.1 Placa dental

La superficie dental es la única superficie dura del cuerpo no irrigada, la cual adsorbe selectivamente varias glicoproteínas acidas como la mucina de la saliva, las cuales forman una capa delgada en la superficie dental conocida como Película Adherida al Esmalte (PAE), esta capa contiene un alto número de grupos sulfato y carboxilo, que contribuyen a la adhesión de bacterias de las vecindades y que son transportadas a través del flujo salival, subsecuentemente ocurre la adhesión de otras bacterias la cual consiste en una variedad de reacciones de adhesión y coagregación en las que están involucradas interacciones fisicoquímicas (débiles) y estereoquímicas (permanentes) entre las superficies microbianas la PAE y entre sí (Figura 3). El proceso anterior continúa con un crecimiento confluyente y la formación de un biofilm maduro o en este caso la placa dental (Loesche *et al.*, 1986).

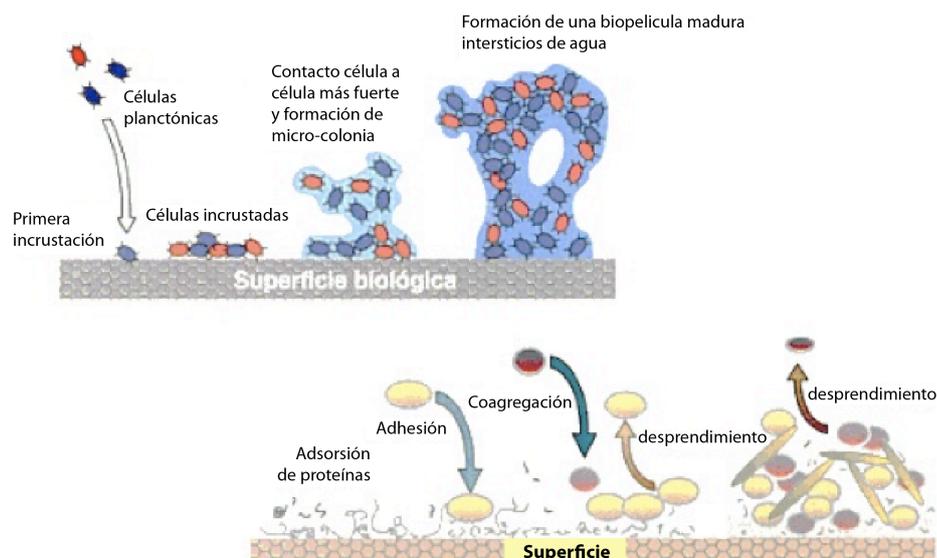


Figura 3: Proceso de formación de biofilm (Negroni, 2008).





Los biofilms son comunidades microbianas, de células unidas a un sustrato o interfase y entre sí, embebidas en una matriz extracelular de polímeros producidos por ellas mismas (Negroni, 2008). La formación de estas comunidades seniles y su inherente resistencia a los agentes antimicrobianos, son la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas. Por otro lado, los biofilms formados sobre la superficie dental, también suelen ser beneficiosos ya que impiden la colonización de otros patógenos exógenos (Lasa et al., 2005).

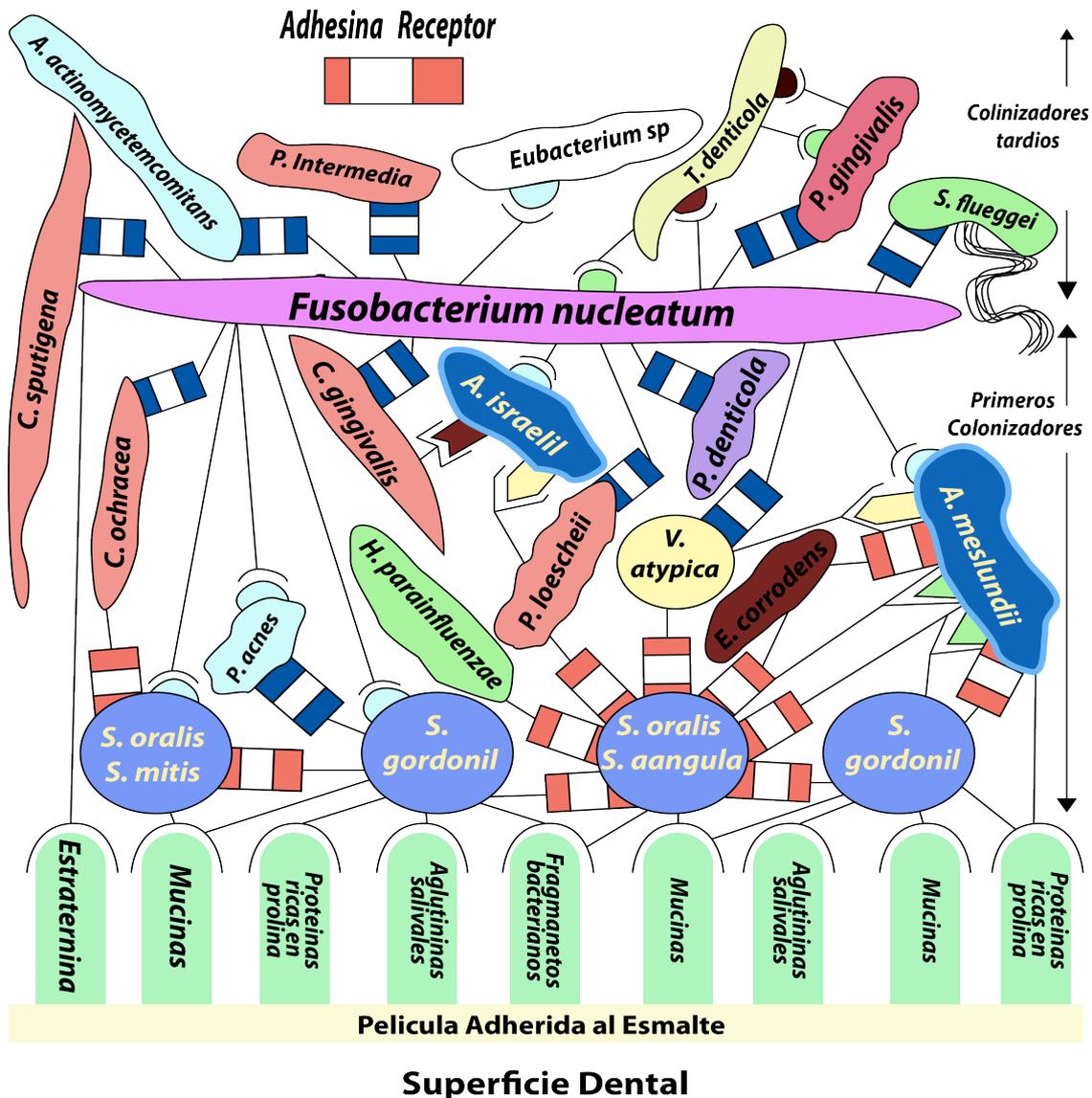


Figura 4: Composición de la placa dental (Kolenbrander et al., 2002).





La placa dental está compuesta de entre 20-30 especies bacterianas distintas, entre las que invariablemente destacan en número los *Streptococcus* y *Actinomyces* sp. (Lasa *et al.*, 2005). Las bacterias de la placa dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes, una persona con un alto consumo en azúcares, favorecerá el desarrollo de especies bacterianas capaces de fermentarlos, desequilibrando la población bacteriana y favoreciendo el desarrollo de especies como *Streptococcus mutans*, a su vez aumentando la producción de ácido láctico por estas bacterias, lo cual a largo plazo disuelve el esmalte de los dientes. *S. mutans* produce también glucanos insolubles que aumentan la adherencia de bacterias cariogénicas resultando como consecuencia final el desarrollo de la caries (Figura 4).

2.3.2 *Streptococcus mutans*

S. mutans fue aislado de lesiones cariosas en humanos por Clarke en 1924. Es una bacteria gram positiva, acidogénica, acidúrica de la cual se han identificado 3 serotipos en humanos el *c*, *e* y *f* (Akiko *et al.*, 1998) y es considerada como el principal microorganismo implicado en el desarrollo de la caries en el esmalte (Hamada *et al.*, 1980). Dicha condición solo ocurre en presencia de factores predisponentes, ya que en condiciones normales esta bacteria no causa caries. Un factor que propicia el desarrollo de la caries es un alto contenido de sacarosa en la cavidad oral. *S. mutans* posee distintos factores de virulencia que producen un ambiente adecuado para su supervivencia y proliferación contribuyendo a la desmineralización del diente.

2.3.3 Factores de virulencia de *S. mutans*

Streptococcus mutans tiene la capacidad de adherirse a la PAE y producir ácidos, dos características asociadas como factores cariogénicos de este microorganismo (Figura 5). La adherencia de esta bacteria se da por la interacción de una proteína extracelular que la constituye (PAC) y otras que están formando parte de la PAE tales como proteínas ricas en prolina (PRPs), estaterinas, histatinas y cistatinas (Hadada *et al.*, 1984). Adicionalmente la





síntesis de glucano insoluble de *S. mutans* a partir de sacarosa por acción de las glucosiltransferasas (GTFs) es esencial en el proceso de adhesión de otras bacterias. Por lo tanto los principales factores de virulencia de *S. mutans* son:

- Acidogenicidad: *S. mutans* tiene la capacidad de fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico que es secretado a través de su ATPasa, el cual ante un aumento de sustrato como la sacarosa puede ocasionar un descenso en el pH hasta valores de entre (5.2-5.7); mismos que propician la desmineralización del esmalte (Lakshman *et al.*, 2006).
- Acidofilicidad: se refiere a la capacidad que tiene *S. mutans* de sobrevivir en ambientes con bajos valores de pH (Acosta *et al.*, 2006).
- Acidúricos: con la finalidad de mantener las condiciones intracelulares a valores más altos que los del ambiente exterior, esta especie desarrolla mecanismos por los cuales puede transportar protones H^+ , al exterior por un aumento en la translocación de estos protones a través de la ATPasa localizada en su membrana plasmática, mecanismo que le sirve a la bacteria para introducir nutrientes a través de un transporte secundario favorecido por el gradiente de protones (Duarte *et al.*, 2006).
- Síntesis de glucanos: *S. mutans* tiene la capacidad de sintetizar diversos glicopolisacáridos, entre los cuales los de mayor relevancia en el desarrollo de la caries son los glucanos sintetizados por las GTFs, estos constituyen uno de los componentes estructurales del biofilm lo que contribuye a la adhesión de bacterias cariogénicas en la superficie dental además de servir como fuente energética (García *et al.*, 2008).
- PAc: es una proteína de la pared celular del *S. mutans* que tiene carácter antigénico también denominada antígeno I/II, B, IF, P₁, MSL-1. La cual es indispensable en los fenómenos iniciales de adherencia y agregación del microorganismo sobre la superficie dental, tomando como sustrato las proteínas de la PAE (Duque *et al.*, 2005).





- Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs): *S. mutans* sintetiza al menos dos GBPs. Estas proteínas fijan los glucanos libres en el medio, actuando como nexo de unión entre bacterias, formándose así las acumulaciones que quedan adheridas a las superficies dentales.

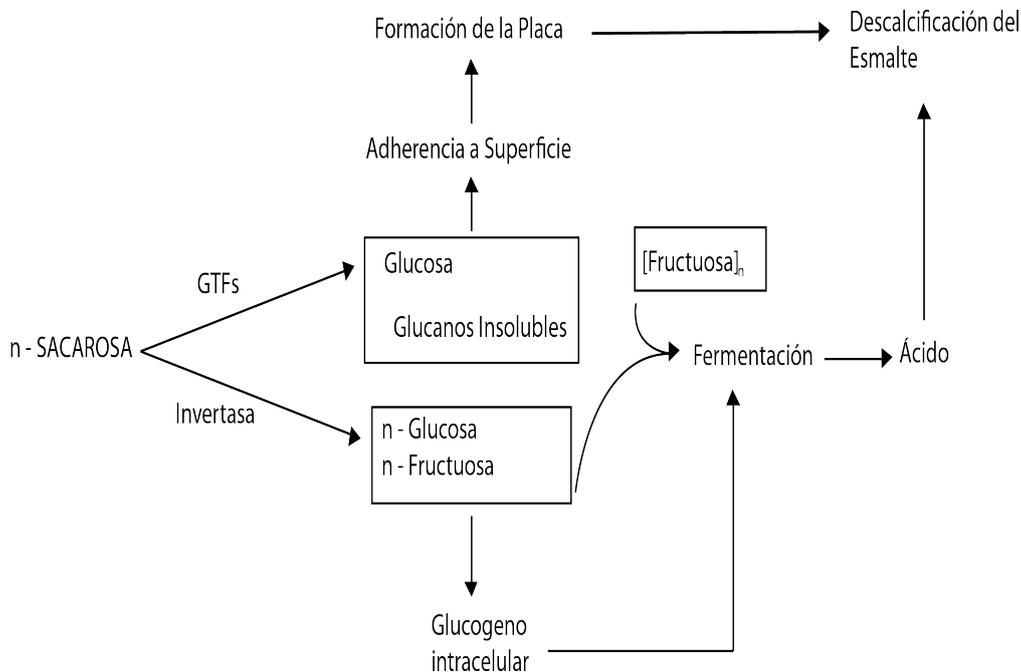


Figura 5. Utilización de la sacarosa por *S. mutans* y patogénesis de la caries (Hamada *et al.*, 1980)

2.3.4 Glucosiltransferasas de *S. mutans*:

Las glucosiltransferasas (GTFs; EC 2.4.1.5) o sacarosa-6-glucosiltransferasas son enzimas extracelulares producidas por *Streptococcus mutans* reconocidas como un factor de virulencia significativo en la patogénesis de la caries dental. Las GTFs catalizan la transferencia de unidades de D-glucopiranoído de la sacarosa a moléculas aceptoras que generalmente son carbohidratos, originando polímeros de glucosa (glucanos), dentro de los cuales existen tanto glucanos solubles como insolubles (Figura 6).

Los glucanos contribuyen en forma significativa con la composición polisacárida de la matriz de la placa dental. Los glucanos insolubles producidos por esta enzima promueven la adherencia y acumulación de bacterias cariogénicas en la superficie dental.



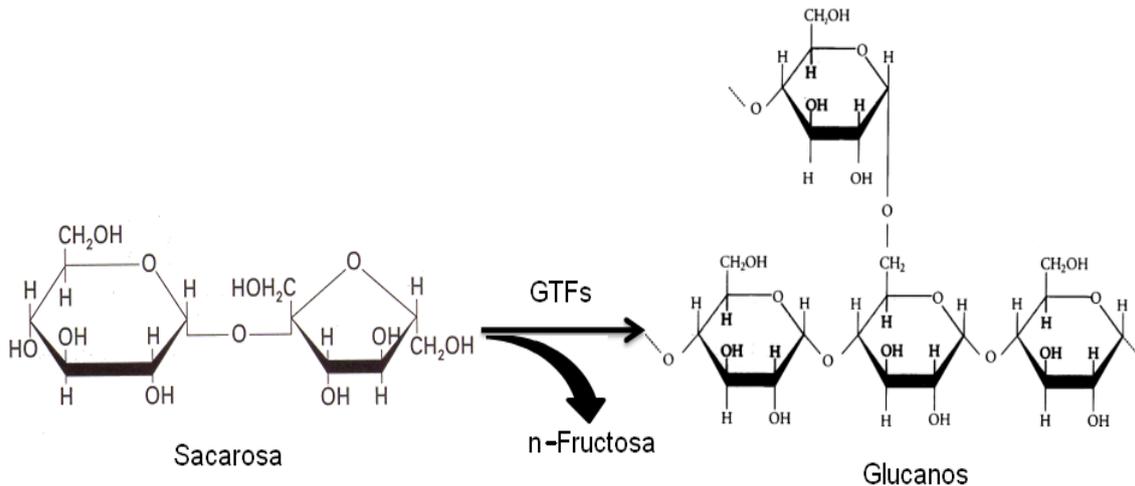


Figura 6: Síntesis de glucanos

El *S. mutans* produce 3 isoformas de esta enzima, cada una codificada por 3 genes diferentes y nombradas según el gen codificante, estas isoformas son capaces de producir diferentes tipos de glucanos con diferentes características de solubilidad, en base a esto existe otra clasificación de las glucosiltransferasas basada en el tipo de glucanos producidos (Tabla 1).

Las GTFs son proteínas de alto peso molecular (150 kDa) con aproximadamente 1300-17000 residuos de aminoácidos, su estructura puede dividirse en dos dominios: un dominio catalítico localizado en el primer tercio N-terminal en el cual une e hidroliza a la sacarosa y un dominio de unión al glucano, localizado en el último tercio C-terminal, el cual contiene múltiples secuencias repetitivas que le permiten localizarse en la pared celular (Kumari *et al.*, 1997).

La actividad de las glucosiltransferasas puede ser modulada por las condiciones ambientales tales como el pH, la concentración de iones, y el potencial de oxidación-reducción (García *et al.*, 2008).





Tabla 1: Clasificación de las glucosiltransferasas en base al tipo de glucano sintetizado (García *et al.*, 2008).

Clasificación	Nomenclatura Genética	Glucano producido	Tipo de uniones
GTF-I	GTF B	Insoluble	67% uniones α (1-6) 33% uniones α (1-4)
GTF-S	GTF D	Soluble	Mayoritariamente uniones α (1-4)
GTF-SI	GTF C	solubles e insolubles	En función del tipo de glucano

2.4. Prevención de las caries

2.4.1 Principales estrategias para la prevención dental

Una gran variedad de agentes antimicrobianos se utilizan para el control de los microorganismos bucales relacionados con la formación de la placa dental. Los más probados han sido los antibióticos, los detergentes catiónicos, las enzimas, el fluoruro, los extractos vegetales y sus compuestos fenólicos (Negroni, 2008; Petti y Scully, 2009).

El control químico de la placa resulta poco efectivo debido a la resistencia que opone la organización microbiana en el diente (biopelícula), por otro lado una eliminación exagerada de la microbiota bucal puede ocasionar la colonización y proliferación de microorganismos oportunistas.

La caries dental es una enfermedad multifactorial, por lo que aún no existe un método preventivo único, lo que conlleva a la utilización de más de un mecanismo para la prevención y control de la placa dental, el cepillado se considera la principal técnica para reducir la acumulación de la placa y los agentes químicos pueden ser utilizados para reducir la acumulación de la placa en la superficie de los dientes.





Tabla 2. Principales compuestos químicos utilizados en la prevención de la caries.

Compuesto	Productos que lo contienen	Mecanismo	Referencia
Gluconato de clorhexidina	Enjuagues, pastas y geles dentales a una concentración de (0.12-0.2%)	Reduce la formación de la placa dental y la adhesión microbiana a la superficie dental. Además altera la superficie bacteriana.	(O Pereina <i>et al.</i> , 1993)
Fluoruros	Sal de mesa, enjuagues, pastas y geles dentales (0.12%)	Aumenta la resistencia del esmalte, disminuye la producción de ácido y reduce la desmineralización. Actúan sobre la célula bacteriana disminuyendo el metabolismo energético.	(Adde <i>et al.</i> , 1993) (Oliviera <i>et al.</i> , 1998)
Xilitol	goma de mascar	Inhibe la desmineralización y media la remineralización, estimula el flujo gingival, disminuyendo los efectos del <i>S. mutans</i>	(Duque de Estrada <i>et al.</i> , 2006)
Bisfenolglícidil metacrilato (Bis-GMA)	aplicación por odontólogos	Sella las fosas y fisuras para evitar o prevenir la caries.	(Duque de Estrada <i>et al.</i> , 2006)
Compuestos polifenólicos	plantas y frutos	Reduce la tasa decrecimiento bacteriano y la adhesión a la superficie del diente, también inhiben la actividad enzimática de glucosiltransferasa y amilasa.	(Ferrazzano <i>et al.</i> , 2011)

2.4.2 Polifenoles y su actividad anti-cariogénica

Los polifenoles son los compuestos más comunes en las plantas (Ferrazzano *et al.*, 2011; Petti y Scully, 2009), incluyen una amplia variedad de moléculas (Figura 7), las cuales se caracterizan por contener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo en su estructura, además de otros sustitutos (Rao *et al.*, 2010). Los polifenoles se pueden dividir en varias clases de





acuerdo al número de anillos que contienen fenol y los elementos estructurales que unen a estos anillos entre sí. Los principales grupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, lignanos y estilbenos.

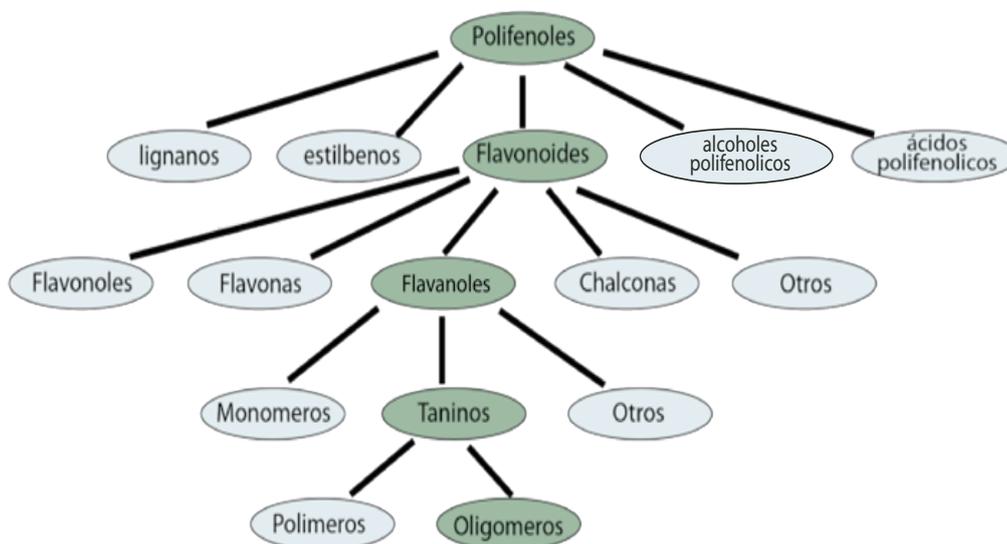


Figura 7: Clasificación de los polifenoles (Ferrazzano *et al.*, 2011).

Se ha informado que los compuestos polifenólicos cuentan con una amplia gama de actividades biológicas, muchas de las cuales están relacionadas con 2 de la actividades con las cuales se caracterizan a los flavonoides, la primera sus propiedades antioxidantes (Mora *et al.*, 1990; Cos *et al.*, 1998) y la segunda su capacidad de interferir con la actividad de distintos sistemas enzimáticos (Middleton *et al.*, 1998; Petti y Scully, 2009). Por otra parte, el aumento del conocimiento científico ha puesto de manifiesto su potencial actividad en la prevención de enfermedades bucales, incluida la prevención de la caries dental.

Estudios realizados recientemente han confirmado el papel de los polifenoles como compuestos anti-cariogénicos ya que se ha demostrando que puede reducir la tasa de crecimiento bacteriano (Sampaio *et al.*, 2009), la adhesión a la superficie del diente (Smullen *et al.*, 2007), y también puede realizar efectos inhibitorios sobre la actividad enzimática de glucosiltransferasa y amilasa (Tagashira *et al.*, 1997).



Tabla 3. Actividad de los polifenoles en plantas sobre *S. mutans*

Nombre	Planta	Parte	Actividad sobre <i>S. mutans</i>	Referencia
Xantorriazol	<i>Curcuma xanthorrhiza roxb</i>	rizoma	Inhibe la formación del biofilm a 20 µg/mL	Murphy <i>et al.</i> , 1999
Macelignano	<i>Myristica frarans</i>	semillas	Disminuye en un 50 % la formación de biofilm primario formado por <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>A. viscosus</i>	Nikitina <i>et al.</i> , 2007
Lavanduliflavona	<i>Sophora exigua</i>	duramen	Inhibe el crecimiento en un rango (1.56-6.25 µg/mL)	Sampaio <i>et al.</i> , 2009
Magnolol	<i>Magnolia officinalis</i>	corteza	Reduce en un 87.3 % la actividad de GTFs con una concentración 0.32 mg/mL	Osbourn <i>et al.</i> , 1996
Guajaverina	<i>Psidium guajava</i>	hojas	CMI 4 mg/mL, 0.32 mg/mL	Osawa <i>et al.</i> , 1992
Honokiol	<i>Magnolia officinalis</i>	corteza	Reduce en un 58.1 % la actividad de la GTFs	Osbourn <i>et al.</i> , 1996
Luteolina	Japónica Hara.	semillas	CMI 50-100 mg/mL en diferentes cepas de <i>S. mutans</i>	Sato <i>et al.</i> , 2003
Quercetina	<i>Psidium guajava</i>	hojas	Inhibe la adhesión del glucano formado en un rango entre (1.5-50) µg /mL	Smullen <i>et al.</i> , 2007
Avicularina	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	fruto	Inhibe la actividad de GTF en 500 mmol/L	Vercauteren <i>et al.</i> , 2009
Mircetina	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	fruto	Inhibe entre el 15-28 % de la actividad de GTF en 500 mmol/L.	Vercauteren <i>et al.</i> , 2009





2.5.0 *Psidium guajava* L. (guayaba)

2.5.1 Descripción

Psidium guajava L. es un árbol frutal conocido comúnmente como guayaba, que pertenece a la familia Myrtaceae. Es un árbol de hoja perenne o arbusto pequeño de 4 a 10 m de altura, con la corteza lisa, delgada y de color café. Tiene las hojas duras, más anchas en su punta que la parte central, y por la parte de envés la hoja es vellosa y con sus nervios realzados. Las flores son solitarias, blancas y olorosas, con gran cantidad de estambres. Sus frutos son globosos, con olor fragante y la pulpa de color amarillo o rosa, con numerosas semillas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2011).

2.5.2 Origen y Distribución

Psidium guajava, es considerado un árbol nativo de México (Ríos *et al.*, 1977) que se extiende por toda América del Sur, Europa, África y Asia (Figura 8). Crece en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo, ya que se adapta a diferentes condiciones climáticas, pero predomina en climas secos (Stone, 1970).

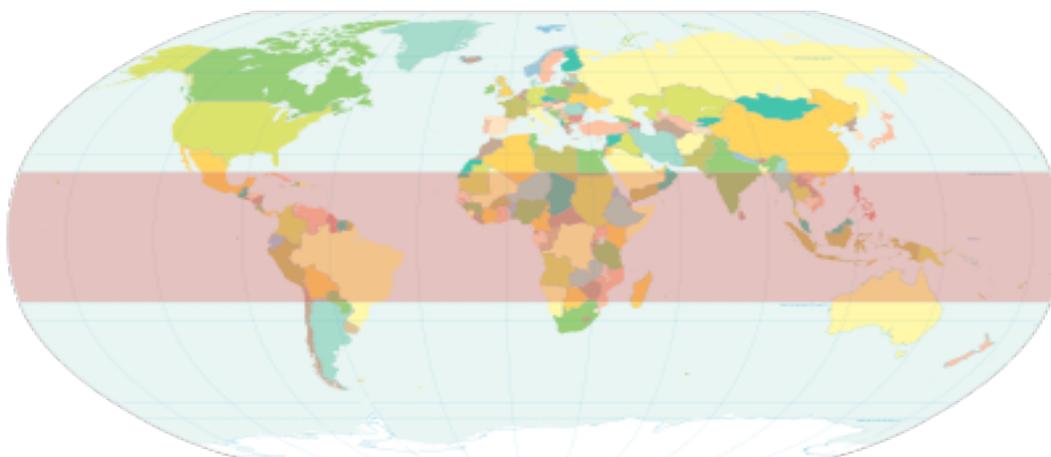


Figura 8. Distribución geográfica de *Psidium guajava* (Stone, 1970).

2.5.3 Fitoquímica

La guayaba es rica en taninos, fenoles, triterpenos, flavonoides, aceites esenciales, saponinas, carotenoides, lectinas, vitaminas, fibra y ácidos grasos.





Los cuales varían en cantidad y proporción dependiendo de la parte del árbol o de la época y región donde crecen (Kamath *et al.*, 2008).

- Frutos: Contienen una mayor cantidad de vitamina C que los cítricos y cantidades apreciables de vitamina A (Kamath *et al.*, 2008). Además se caracterizan por un bajo contenido de hidratos de carbono (13,2%), grasas (0,53%) y proteínas (0,88%) y un alto contenido en agua (84,9%) (Medina y Pagano, 2003). También se han encontrado aceites esenciales como 3-cariofileno (24,1%), nerolidol (17,3%), 3-fenilpropilacetato (5,3%) y óxido de cariofileno (5.1%) extraídos de los frutos rosas (Paniandy *et al.*, 2000).
- Raíz: Contiene principalmente taninos (10-20%,) leucocianidinas, esteroides, cumarinas (amritósidos, ácido gálico).
- Flor: Presenta cumarinas, flavonoides (guajaverina, avicularina, quercetina), ácido oleánico (Medina y Pagano, 2003).
- Hojas: En el aceite esencial de las hojas se han identificado la presencia de α -pineno, β -pineno, limoneno, mentol, acetato de terpenilo, alcohol isopropílinico, β -cariofileno, β -bisaboleno, cineol, óxido de cariofileno, β -copaneno, farneseno, humuleno, selineno, cardinene y curcumeno (Zakaria *et al.*, 1999) nerolidiol, ácido ursólico, ácido cratególico y ácido guayavólico (Pérez *et al.*, 2008). Adicionalmente las hojas contienen triterpenos y flavonoides (Tabla 4) como quercetina, morina-3-O-lixósido, morina-3-O-arabinósido, quercetina, quercetin-3-O-piranósido y quercetin-3-O-arabinofuranósido (avicularina) los cuales han demostrado poseer acción antibacteriana (Oliver *et al.*, 1986; Pongsak *et al.*, 2010).





Tabla 4. Flavonoides reportados en la especie *Psidium guajava*

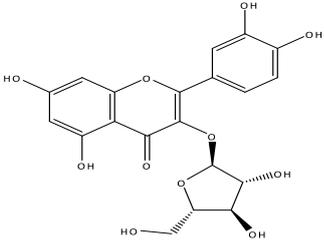
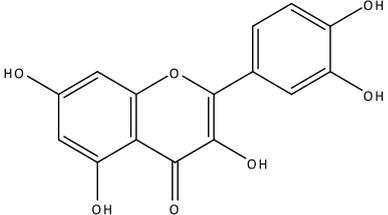
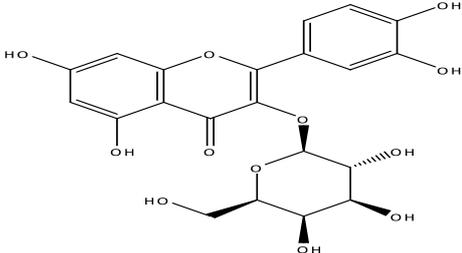
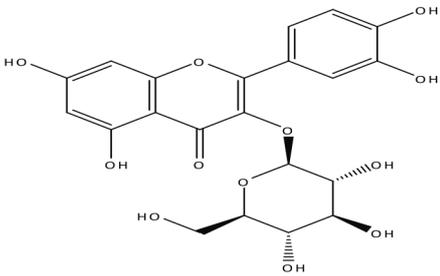
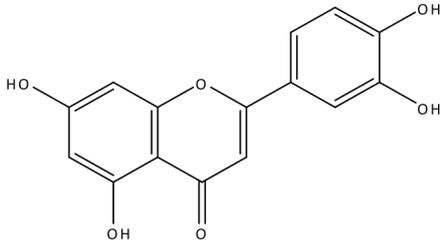
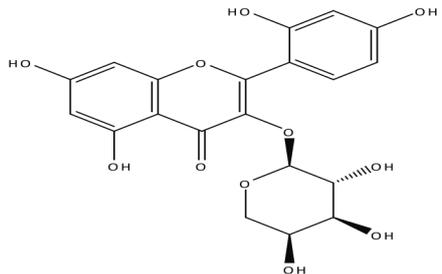
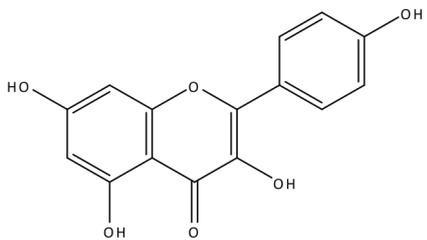
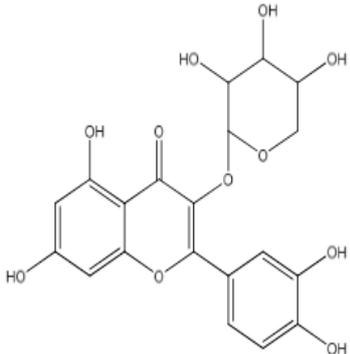
Nombre	Estructura	Fuente	Referencia
Avicularina		hojas y fruto	Arima y Dano, 2002
Quercetina		hojas y fruto	Liang <i>et al.</i> , 2005
Quercetin-3-β-galactósido		hojas y fruto	Liang <i>et al.</i> , 2005
Quercetina-3-β-glucósido		hojas y fruto	Liang <i>et al.</i> , 2005





Tabla 4: Flavonoides reportados en la especie *Psidium guajava* (continuación)

Nombre	Estructura	Fuente	Referencia
Luteolina		hojas y fruto	Vargas <i>et al.</i> , 2006
Morina-3-O-α-L-arabinopiranosido		hojas y fruto	Arima y Dano, 2002
Kaempferol		hojas y fruto	Liang <i>et al.</i> , 2005
Guajaverina		hojas y fruto	Pradu <i>et al.</i> , 2005





2.5.4 Usos y propiedades farmacológicas

Las diferentes partes de esta especie son ampliamente utilizadas y explotadas comercialmente, siendo utilizado para su consumo en forma mayoritaria como fruta fresca y en la elaboración de productos alimenticios. Sin embargo también es ampliamente usado alrededor del mundo para el tratamiento de diversos padecimientos. La larga historia del uso tradicional de guayaba contra la diarrea, gastroenteritis y otros problemas digestivos ha llevado a los investigadores de hoy en día a estudiar los extractos y su uso tradicional ha sido validado en numerosos estudios clínicos (Pérez *et al.*, 2008; Caceres, 2005).

Además, estudios etnofarmacológicos muestran que *Psidium guajava* se utiliza en muchas partes del mundo para el tratamiento de una serie de padecimientos, atribuyéndole diferentes propiedades farmacológicas entre las cuales destacan su actividad: anti-inflamatoria, hipoglucemiante, anti-hipertensivo, analgésico, antineoplásico, antipirético, antimicrobiano y en la prevención de la caries (Pérez *et al.*, 2008).

2.5.5 Actividad antibacteriana

Se han reportado efectos inhibitorios de los extractos acuosos y alcohólicos de *Psidium guajava* (raíz y hojas) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus*, *Proteus* sp, *Shigella* sp. y *Escherichia coli*, especies identificadas como agentes causales de enfermedades gastrointestinales (Chah *et al.*, 2006).

A partir del extracto metanólico de la raíz fraccionado por cromatografía en columna, se obtuvieron cuatro compuestos antibacterianos. Por otro lado 3 sustancias antibacterianas se han detectado en las hojas del guayabo compuestos que son derivados de la quercetina (Prabu *et al.*, 2006; Arima *et al.*, 2002).





Un estudio sobre el efecto antibacteriano de los extractos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* sobre bacterias en alimentos en proceso de descomposición reveló la presencia de cuatro flavonoides (*morina-3-O-lixósido*, *morina-3-O-arabinósido*, *quercetina*, y *quercetina-3-O-arabinofuranósido*), los cuales poseen propiedades bacteriostáticas y bactericidas (Pongsak y Parichat, 2010).

2.5.6 Efecto en la placa dental

La adhesión de los primeros pobladores de la placa dental en la superficie del diente tiene un papel primordial en el inicio del desarrollo de la placa siendo las propiedades hidrofóbicas de superficie de la pared celular de las bacterias indirectamente responsables de la adherencia de las bacterias a la película adherida al esmalte (PAE). En un estudio se observó que el tratamiento de las bacterias colonizadoras primarias de la placa dentobacteriana con 1 mg / mL de extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava* redujo la hidrofobicidad de la superficie celular de *Staphylococcus sanguinis*, *Staphylococcus smitis* y *Actinomyces* sp a un 54.1%, 49.9% y 40.6%, respectivamente (Razak *et al.*, 2006).

Otro estudio demostró que el flavonoide, quercetina-3-O- α -piranósido (guajaverina) aislado de *Psidium guajava* L. es un potencial agente antiplaca al inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Osawa *et al.*, 1992). Estos resultados proporcionan justificación científica para su uso en el tratamiento de las enfermedades dentales y sugirió que los extractos de las hojas de guayaba pueden inhibir las propiedades cariogénicas atribuidas a *Streptococcus mutans* y por lo tanto ser beneficioso para el cuidado dental.





3.0 JUSTIFICACIÓN

La caries es una enfermedad bacteriana, que afecta a miles de personas en el mundo, que tiene gran impacto en la calidad de vida de quien la padece y que implica grandes gastos al sector salud.

Los estudios realizados sobre la caries han determinado como principal agente etiológico a la especie bacteriana *Streptococcus mutans*, la cual tiene características asociadas como factores cariogénicos de esta enfermedad, una de ellas es la secreción de glucosiltransferasas (GTFs), enzima determinante en el proceso cariogénico ya que se encarga de la producción de polímeros insolubles de glucosa a partir de sacarosa, que propician la adhesión y acumulación de bacterias cariogénicas en la placa dental.

Aunque los científicos han avanzado tanto en la comprensión así como en el tratamiento y la prevención de este padecimiento, todavía no se ha podido disminuir de manera significativa los casos de incidencia de esta enfermedad, sobre todo en la población de escasos recursos que no tiene acceso a instituciones de salud pública y que no cuenta con los recursos económicos para adquirir productos destinados para la prevención de dicho padecimiento, unido a esto también es importante recalcar la creciente aparición de bacterias resistentes a antibióticos, derivado del uso indiscriminado del autodiagnóstico y automedicación generando así un importante problema para el control de enfermedades bacterianas (Stewart *et al.*, 2001).

Por otro lado, el uso de compuestos vegetales para inhibir la caries ha sido usado desde la antigüedad, demostrando un alto potencial anti-cariogénico en estos compuestos. Por lo cual el uso de compuestos obtenidos de fuentes naturales representa una valiosa alternativa en el tratamiento de la caries.





4.0 OBJETIVOS:

1. Aislar y purificar los compuestos bioactivos por medio de una maceración de las hojas de la especie *Psidium guajava* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
2. Determinar la estructura molecular de los componentes activos mediante la aplicación de técnicas espectrofotométricas que permitan la dilucidación de la estructura molecular de los principios activos.
3. Evaluar el efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas sobre la especie cariogénica *S. mutans* con la finalidad de determinar las fracciones con los compuestos bioactivos.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la especie *Psidium guajava* contra las glucosiltransferasas GTFs de *S. mutans*.





5.0 PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos generales

5.1.1 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de distintas 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% 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, amberlita XD-16 y utilizando diversos sistemas de elución.

5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 Hz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMR5. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeos de átomos rápidos (EM-FAB) mediante la técnica de impacto electrónico (EM/IE). Los espectros se realizaron utilizando CD₃OD y DMSO- δ_6 y tetrametilsilano (TMS) como referencia reportando los desplazamientos químicos en ppm.

5.2 Ensayo biológico

5.2.1 Microorganismos de prueba

Para poder determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo, las fracciones y el compuesto aislado de las hojas de *Psidium guajava*, se utilizó en el ensayo biológico como microorganismo de prueba a *Streptococcus*





mutans (ATCC 700611), siendo este el principal agente causal de caries. Para el crecimiento óptimo de dicha bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI), a una temperatura de 37°C, en condiciones aeróbicas por un periodo de 24 horas.

5.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad bacteriana se determinó con base en un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se incubaron los cultivos de la bacteria a una temperatura de 37° C en condiciones aeróbicas por 24h, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm × 10 min, se lavaron con buffer de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) dos veces y finalmente se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. En cada pozo se colocaron: el medio de cultivo, 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas, partiendo de una concentración stock de 2.5 mg/mL y el medio de cultivo. Las muestras se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba, utilizando diferentes controles como se muestra en la tabla 5. Finalmente las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.

Tabla 5. Controles para el ensayo biológico.

	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	Con inóculo	SC	37°C
Blanco	Sin inóculo	SC	37°C
Control positivo	Con inóculo	Clorhexidina (CHX)	37°C

SC: sin compuesto de prueba

La bacteria *S. mutans* fue incubada en condiciones aerobias, el crecimiento fue estimado espectroscópicamente (A_{660nm}) después de 24 horas utilizando un lector de microplacas tipo ELISA. El valor de CMI para el microorganismo analizado se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 A_{660nm} . Comparándolo con un control positivo que fue CHX (Tabla 5).





5.3 Estudio Químico de las Hojas de *Psidium guajava*

5.3.1 Material vegetal

Las hojas de *Psidium guajava* se recolectaron de una plantación de guayaba en el pueblo de Amatlán de Tepoztlán, en el Estado de Morelos. El material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología en base a las características de la especie. Una muestra de referencia de 1 Kg (aproximadamente) se depositó en el laboratorio 111 de la Facultad de Química, UNAM y es conservada ahí en condiciones de refrigeración, limpia y seca.

5.3.2 Obtención del extracto

Se utilizaron 1.9 kg de hojas de guayaba secas, previamente limpias y molidas, las cuales se sometieron a un proceso de maceración utilizando como disolventes etanol y agua en una proporción de 70:30 por un período de 168 horas. Posteriormente el material vegetal se separó por filtración y el extracto resultante se concentró a presión reducida. El proceso de extracción se repitió 3 veces en las condiciones descritas (Diagrama 2).

5.3.3 Fraccionamiento primario del extracto derivado de las hojas de *Psidium guajava*

El extracto etanólico derivado del procedimiento descrito anteriormente se sometió a un proceso de partición con hexano y una mezcla de etanol: agua (60:40) en partes equivalentes, resultando las fracciones denominadas E1 y EII que corresponden a la fase acuosa y orgánica respectivamente, las cuales se concentraron a presión reducida, a ambas fracciones se les determinó la CMI descrita en el punto 5.2.2. (Diagrama 2).

5.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción EII obtenida del fraccionamiento primario

La fracción EII se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta utilizando como adsorbente Amberlita XAD-16 (10x25) utilizando 3 sistemas de elución (AcOEt, MeOH y MeOH/H₂O en una proporción de 1:1). Obteniéndose 12 fracciones de 500 mL cada una, las





cuales fueron reunidas en base a su similitud cromatográfica, formando de esta manera 3 conjuntos de fracciones denominadas (J_1 , J_2 y J_3) que se resume en la tabla 6, a estas fracciones se les determino la CMI descrita en el punto 5.2.2.

Tabla 6: Fracciones obtenidas por CCA de la fracción EII del extracto de *P.guajava*

Sistema de Elución	Fracciones reunidas	Clave
AcOEt	F1-F4	J1
MeOH	F5-F8	J2
MeOH/H ₂ O 1:1	F9-F12	J3

5.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción activa J3

La fracción J3 fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta de sílica gel (10 x 20) utilizando mezclas AcOEt:MeOH como eluente. Obteniéndose 34 fracciones de 500 mL cada una las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica, formándose 9 grupos de fracciones (JJ1 –JJ8) como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Fracciones obtenidas por CCA de la fracción J3

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave
AcOEt:MeOH	F1-F8	JJ1
	F9-F10	JJ2
	F11-F15	JJ3
	F16-F20	JJ4
	F21-26	JJ5
	F27-F28	JJ6
	F29-F31	JJ7
	F32-F34	JJ8





5.3.5 Fraccionamiento cuaternario de la fracción JJ4 obtenida del fraccionamiento terciario.

La fracción JJ4 fue sometida a un fraccionamiento en cromatografía en columna abierta CCA de sílica gel (5 × 30) utilizando metanol como eluente, de esta se obtuvieron 22 fracciones de 75 mL cada una, las cuales se disolvieron en MeOH, se agregó unas gotas de AcOEt lo que produjo la precipitación de diferentes sólido amorfos, los cuales se separon y se juntaron según su similitud cromatográfica; Formándose 10 grupos de fracciones (JJQ1-JJQ6) y se describen en la Tabla 8

Tabla 8: Fracciones obtenidas por CCA de la fracción JJ4

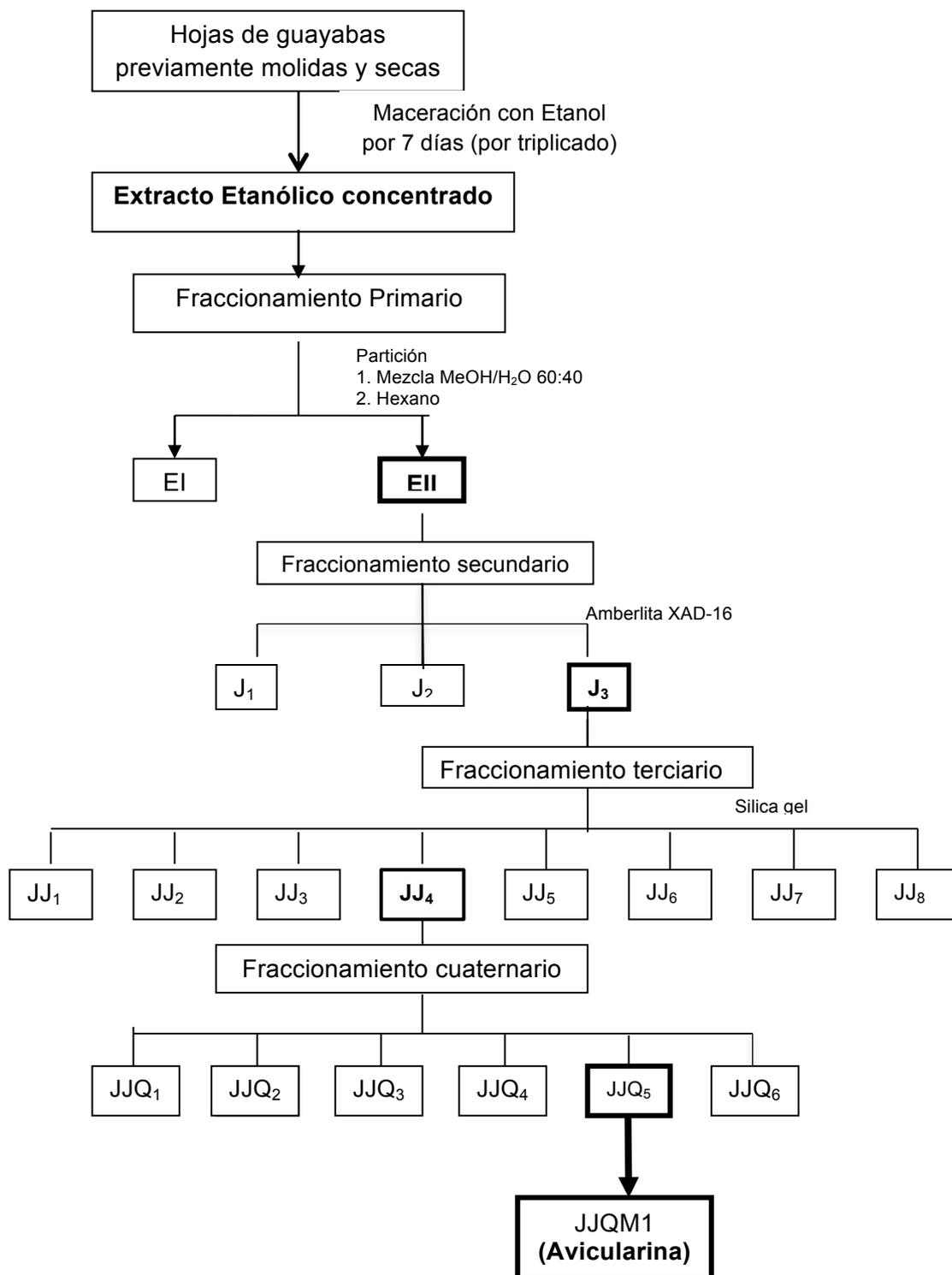
Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave
MeOH	F1	JJQ1
	F2-F4	JJQ2
	F5-F7	JJQ3
	F8-F12	JJQ4
	F13-15	JJQ5
	F16-F23	JJQ6

La fracción JJQ5 fue sometida a pruebas espectrométricas, las cuales revelaron su identidad como el flavonoide avicularina (quercetin-3- α -arabinofuranósido).





Diagrama 2. Diagrama del fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava*





5.4.0 Medición de la actividad enzimática de GTFs

Para la medición de la actividad enzimática de la GTFs se preparó una solución stock de la fracción EII, J3 y avicularina (JJQM₁) a partir de ella se tomaron 2, 4, 8 y 20 μL respectivamente para obtener diferentes concentraciones (0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 $\mu\text{g/mL}$), posteriormente a cada concentración se le adicionó 60 μL de medio de reacción MR (100mM acetatos pH 6,2, 5% sacarosa), seguido de 34 μL de buffer de acetatos pH 6.2 y se inicio la reacción enzimática con la adición de 6 μL de GTFs (obtenida según se describe en Da Silva-Leitao *et al.*, 2004), se incubo por 30 min a 37 °C, al término de este periodo se detuvo la reacción con la adición de 100 μL de NaOH 1M. Posteriormente se centrifugo a 12000 rpm por 5 min en microcentrifuga y se trasfirió el sobrenadante a otro tubo, al cual se le adicionaron 100 μL de etanol frío para precipitar los glucanos solubles.

Se sometió a otra centrifugación a 12000 rpm por 5 min en microcentrifuga, el botón obtenido se resuspendió con 200 μL de HCl 1M y se incubó a ebullición por 30 min para liberar a la glucosa de los glucanos, finalmente se neutralizó con una cantidad igual de NaOH 1M.

5.4.1 Cuantificación del contenido de glucosa en los glucanos.

La cuantificación de la cantidad de glucosa liberada de los glucanos se realizó por un método en microplaca de 96 pozos tipo ELISA, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Se tomaron 20 μL de las muestras de glucanos hidrolizados resultado del procedimiento descrito en el punto anterior y se colocaron en la microplaca, se agregaron 200 μL del reactivo enzimático de glucosa (REG de SIGMA G3293) el cual contiene ATP, MgCl_2 , NAD^+ , hexocinasa y glucosa-6P deshidrogenasa (Diagrama 3). Se consideró que por cada mol de glucosa liberada del glucano corresponde a 1 mol de NADH producido.

Debido a que la glucosa producida representa la glucosa que fue unida a los glucanos por la actividad de la GTFs entonces la actividad de la enzima se





expresa en unidades de concentración por el tiempo de incubación de la enzima (μmolmin^{-1}).

5.4.2 Obtención del valor de I_{50} de los extractos de plantas sobre la actividad de las glucosiltransferasas.

Para el análisis de los datos de actividad de la enzima se utilizó el programa estadístico MicroCalOrigin 6.0 realizando un tratamiento por regresión no lineal. Se utilizaron los datos del porcentaje de Actividad residual y como modelo matemático la ecuación mostrada (Figura 9) para obtener así el valor de I_{50} (concentración a la cual se inhibe al 50% la actividad enzimática) y V_0 (*velocidad inicial o actividad sin inhibidor*) de cada uno de los extractos evaluados (tabla 10).

Figura 9: Ecuación para obtener el valor de I_{50} :

$$V_{\text{residual}} = \frac{V_0 \times I_{50}}{I_{50} + C}$$

Donde:

V_0 = Velocidad inicial

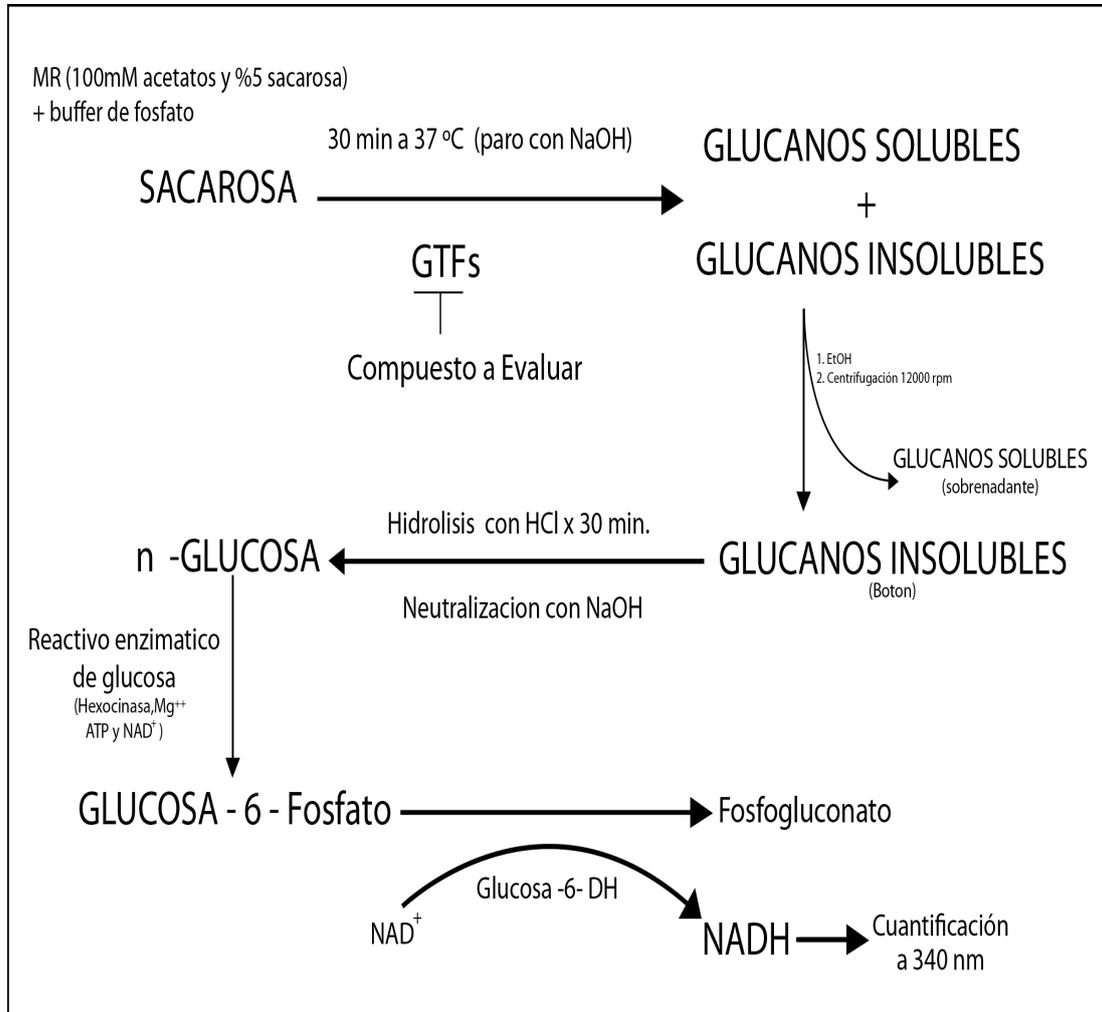
I_{50} = Inhibición 50

C=Concentración del compuesto a evaluar





Diagrama 3: Metodología del ensayo para la determinación de la actividad de GTFs (modificada de Noor *et al.*, 2005)



Descripción del método: La glucosiltransferasa utiliza la sacarosa del MR produciendo glucanos (solubles e insolubles), tras 30 min de incubación a 37° la reacción es detenida adicionando NaOH, posteriormente se separan los glucanos solubles e insolubles, desechando los primeros. Los glucanos insolubles se hidrolizan con HCl, para obtener unidades individuales de glucosa, la cual tras la adición del reactivo enzimático de glucosa produce Glucosa-6-Fosfato, que a su vez por una reacción de oxido-reducción en donde interviene el NAD⁺ se produce fosfogluconato y NADH que es cuantificable a una longitud de onda de 340 nm.





6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *Psidium guajava* se realizó con base en su uso en la medicina tradicional en padecimientos sobre la cavidad oral y estudios científicos sobre la especie que sustentan su propiedad anti-cariogénica.

A su vez ensayos biológicos preexistentes permitieron establecer la maceración como el método de extracción y las hojas como la parte de la planta de donde se obtendrían dichos extractos (Pongsak y Parichat, 2010; Pérez *et al.*, 2008).

El estudio fue biodirigido con la finalidad de detectar aquellas fracciones que en un principio tuvieran mayor potencial antimicrobiano sobre la especie *S. mutans* y de las cuales se obtendrían los compuestos bioactivos, con dichos fines se determinó la CMI de los diferentes extractos y a partir de las fracciones con un valor menor de CMI y de las cuales se continuó el fraccionamiento hasta la obtención de los compuestos bioactivos.

Finalmente los compuestos y los extractos fueron sometidos a un ensayo con las enzimas GTFs, consideradas como un factor de virulencia de *Streptococcus mutans* y que tiene un papel importante en el desarrollo de la caries.

6.1.0 Resultados de CMI del extracto crudo así como de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario y secundario.

La determinación del potencial antibacteriano del extracto etanólico y las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario y secundario se realizó utilizando el método de microdilución en placa descrito en el punto 5.2.2. En base a los resultados obtenidos podemos observar que la fracción denominada J3 tiene el mayor potencial anti-bacterial contra *S. mutans*.

Se considera que un extracto vegetal es activo cuando la CMI es menor de 1000 $\mu\text{g/mL}$, razón por la cual se consideró que la fracción J3 contenía a los compuestos bioactivos, continuando así con la purificación de esta fracción y incluyéndose en la evaluación de la actividad contra las GTFs. Bajo este mismo criterio y con la finalidad de proporcionar información más completa sobre el efecto sobre las GTFs se incluyó la fracción E11 en este ensayo (Tabla 9).





Tabla 9. Actividad antibacteriana (CMI) de los extractos obtenidos de *Psidium guajava*.

Fracción	*CMI <i>S. mutans</i>	Rendimiento
Extracto crudo (Extracto etanólico)	860 µg/mL	18.9 %
EII (Fraccionamiento primario)	730 µg/mL	9.4%
J1 (Fraccionamiento secundario)	570 µg/mL	1.2%
J2 (Fraccionamiento secundario)	313 µg/mL	1.9 %
J3 (Fraccionamiento secundario)	280 µg/mL	3.2 %
Estándar de CHX**	1.8 µg/mL	-----

*Los valores representan un promedio de un mínimo de 3 ensayos

**Gluconato de Clorhexidina, utilizado como control positivo.

En base en estos resultados, la fracción J3 fue sometida a sucesivos fraccionamientos en una CCA utilizando como adsorbentes Sílica gel y diferentes sistemas de elución como muestra el diagrama 2.

6.2. Elucidación estructural de la quercetina-3- α -L-arabinofuranosido (avicularina)

Como resultado del fraccionamiento cuaternario se obtuvieron las fracciones (JJQ1-JJQ6) de las cuales en la fracción JJQ5 se precipitó un sólido amorfo amarillo pálido, el cual fue sometido a pruebas espectrométricas, las cuales revelaron su identidad como el flavonoide avicularina (quercetina-3- α -arabinosido), por comparación directa de sus constantes espectrométricas y espectroscópicas reportadas en la literatura (Pistelli *et al.*, 1992) y de una muestra aislada previamente en el laboratorio (Sandoval, 2010).





6.3.0 Efecto de los extractos obtenidos y la avicularina sobre las glucosiltransferasas de *S.mutans*

Con la finalidad de obtener mayor información sobre el posible efecto inhibitorio de diferentes extractos etanólicos aislados de *Psidium guajava* sobre *Streptococcus mutans* se decidió realizar un ensayo sobre la enzima que tiene un papel importante en el desarrollo de la caries y la virulencia de *S. mutans*, la glucosiltransferasa (GTF). Esta enzima transfiere unidades de monosacárido desde la sacarosa hacia carbohidratos produciendo polisacáridos extracelulares (glucanos), los cuales forman la base del biofilm o biocapa dental, con lo que permiten la adhesión de la bacteria al diente.

El ensayo de actividad está basado en la detección del cambio de absorción del NAD^+ a NADH generado de la reacción acoplada para determinar la concentración de la glucosa libre, producto de hidrólisis del glucano (Diagrama 3). El NADH es una molécula que absorbe a 340 nm, por lo que la inhibición de la actividad enzimática en cada fracción evaluada se detecto como una disminución en la absorbancia.

Con los datos de absorbancia se obtuvieron los valores de la actividad de la enzima en presencia y/o ausencia de los extractos, para calcular el efecto de cada extracto sobre la actividad de la enzima, se consideró a la actividad en ausencia de extracto como el 100%, la cual denominamos actividad residual. Posteriormente se realizó un análisis por regresión no lineal utilizando el programa MicroCalOrigin versión 6.0 el cual proporcionó una representación gráfica del efecto de cada uno de los extractos sobre la actividad de las GTFs (Figura 10). A partir de esta gráfica se obtuvieron los valores de V_0 e I_{50} para cada compuesto

Tabla 10: Resultados de inhibición enzimática.

	EII	J3	Avicularina
V_0 (porcentaje de actividad)	95.51 ± 4.52	113.53 ± 7.72	102.8 ± 8.34
I_{50} (mg/mL)	1.038 ± 0.26	0.640 ± 0.18	0.499 ± 0.14





Los resultados de este ensayo indican que las fracciones EII, J3 y la avicularina presentaron un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de las GTFs. Sin embargo, el flavonoide avicularina presentó el mayor efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de GTFs, ya que como se observa en la tabla 10, tiene el valor más bajo de I_{50} entre las fracciones evaluadas.

Por otra parte, las curvas en la figura 10 muestran de manera interesante que las fracciones menos puras EII y J3 disminuyeron la actividad enzimática cerca de un 30% a concentraciones altas de cada uno de ellos, sin embargo, a concentraciones bajas las curvas de inhibición de la actividad son distintas, así mismo la fracción J3 presentó una disminución ligeramente mayor en la actividad de las GTFs respecto a la fracción EII.

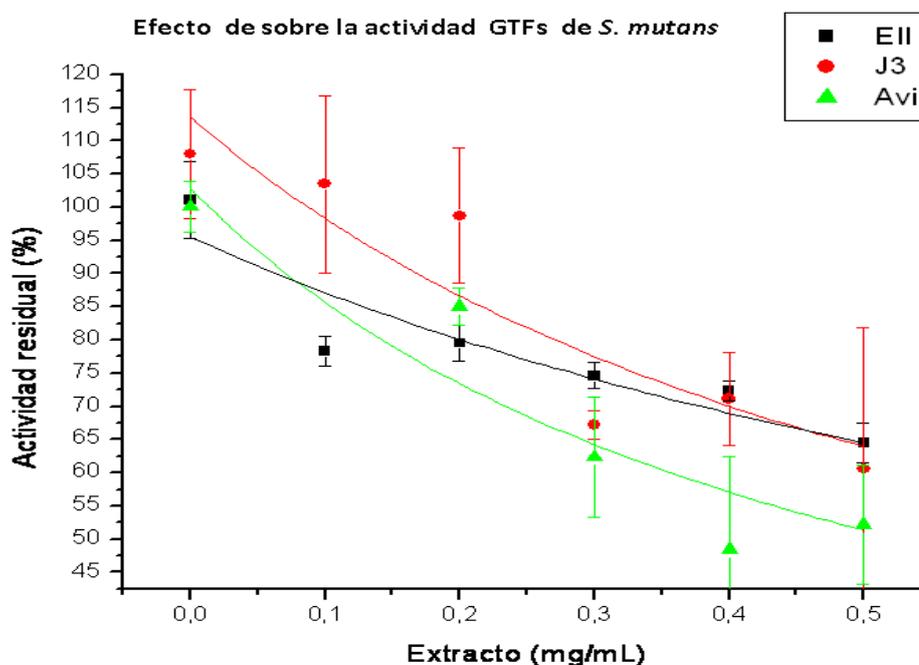


Figura 10: Efecto de los extractos obtenidos de *P. guajava* y avicularina sobre las GTFs de *S. mutans*

Por otra parte, al comparar el extracto J3 con la avicularina, se observó que muestran curvas de dosis-respuesta similares entre sí, aunque la avicularina presenta la mayor inhibición, debido a que la avicularina proviene de la fracción J3 es posible que este flavonoide sea el componente mayoritario y responsable





de que J3 sea capaz de inhibir la actividad de las glucosiltransferasas. Adicionalmente, las curvas en la figura 10 muestran que a pesar de que las fracciones menos puras EII y J3 disminuyeron la actividad enzimática a un valor similar y cercano al 30% las curvas de inhibición de la actividad son distintas, es posible que en EII existan otros componentes que también producen inhibición en la actividad y que se pierden cuando se realiza una posterior purificación.

Estos resultados son consistentes con el grado de purificación de cada fracción, aunque cabe mencionar que si bien la I_{50} nos proporciona un valor de la capacidad o potencia de la inhibición de cada fracción sobre las GTFs, las diferencias entre la fracción EII, J3 y la avicularina no son significativamente distintas (Tabla 10).

La inhibición y el valor de I_{50} sugieren la presencia de otros compuestos en la fracción J3, pero que no contribuyen de manera significativa a la inhibición en la actividad enzimática de las GTFs.

Se conoce que los extractos de hoja de *P. guajava* tienen un potencial de inhibición de la formación de la capa dentobacteriana. Encontrándose que uno de los compuestos que produce inhibición es la guaijaverina (quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido), flavonoide similar a la avicularina. La guaijaverina inhibe la adhesión de los glucanos producidos por la GTFs 26.9 ± 1.04 % a una concentración de 0.5 mg/mL y llega a ser del 52.8 ± 1.16 % a 2 mg/mL (Prabu *et al.*, 2006). Es posible que este y otros flavonoides sean los responsables de la capacidad bacteriostática sobre *S. mutans* lo cual indica su fuerte potencial de uso como agentes anti-placa.

El mecanismo exacto de la inhibición de la glucosiltransferasa por el flavonoide avicularina aún no ha sido dilucidado, sin embargo estudios recientes donde se plantea el efecto de diversos compuestos fenólicos obtenidos de fuentes naturales sobre la actividad de las GTFs, han relacionado el efecto inhibitor a la estructura molecular del compuesto y al estado físico de la enzima (Koo *et al.*, 2002).





En donde aquellos compuestos polifenólicos con un enlace insaturado en la posición C2-C3 presentaban una mayor inhibición sobre las GTFs en comparación con aquellos que no cuentan en su estructura con esta característica. La presencia de un doble enlace en esta posición provee un sitio de adición nucleofílica, en donde pueden unirse con aminoácidos de las cadenas de las GTFs (Koo *et al.*, 2002).

Por otro lado se han identificado varios aminoácidos esenciales en el sitio catalítico para la actividad de la enzima principalmente el ácido aspártico (CH_2COOH), el cual puede actuar como un nucleófilo con los flavonoides causando así la inhibición de la actividad de las GTFs.

La avicularina posee un enlace insaturado en la posición C-2 y C-3 (Figura 11) que podría contribuir a que este flavonoide inhiba la actividad de las GTFs. Además, como se observa en la figura, el flavonoide contiene un glucósido en su estructura, carbohidrato que podría unirse al sitio catalítico (el de transferencia de carbohidratos) o al de unión del glucano e inhibir de una manera competitiva a la enzima. Al respecto se ha observado que la inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa es mayor para quercitina-3-arabinofuranosido (avicularina; $\geq 42\%$) que la quercitina-3-galactosido (29-41%) y que la quercitina-3-glucosa (15-28%) o por la quercetina (1-14%) (Gregoire *et al.*, 2007).

Posiblemente la posición de los OH en el glucósido sean los que produzcan la diferencia en la capacidad inhibitoria de estos compuestos y que establezcan contactos con los aminoácidos de la proteína esenciales para su actividad. Sin embargo, se hace necesario un estudio más profundo para conocer el mecanismo exacto de la inhibición de la enzima por la avicularina.



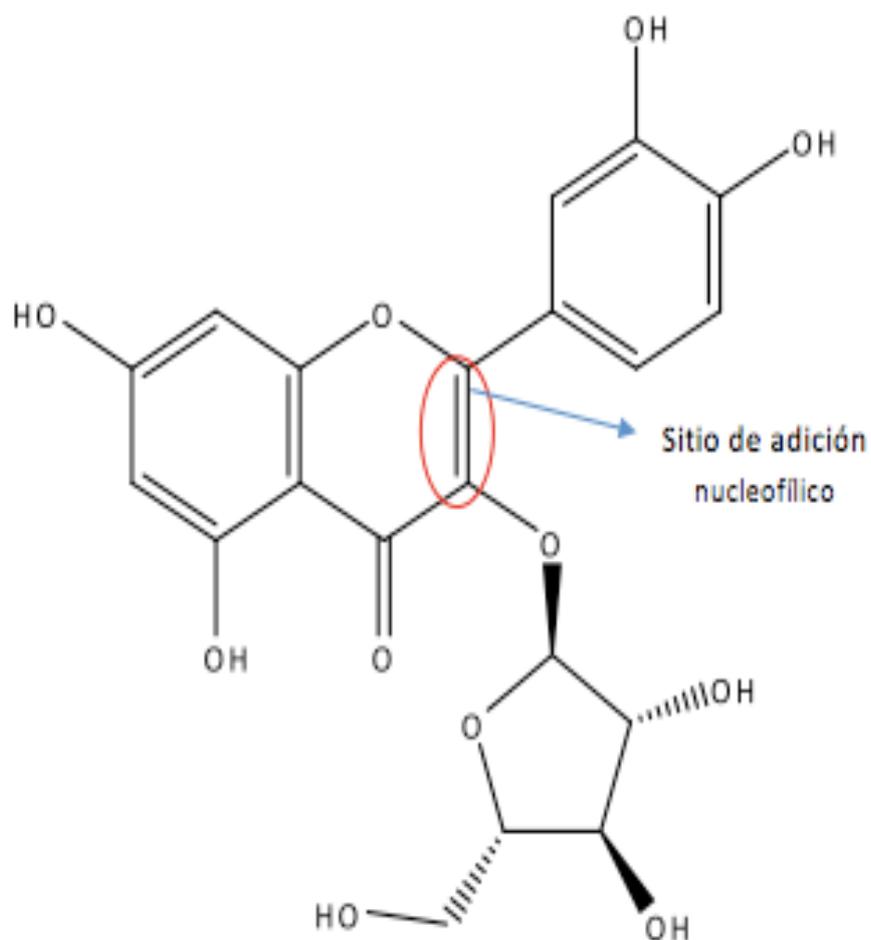


Figura11: Estructura de la avicularina, se muestra el sitio potencial de adición nucleofílica con el que la enzima glucosiltransferasa podría interactuar (Koo *et al.*, 2002).





7.0 RESUMEN

El estudio químico del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie *Psidium guajava* (guayaba) mediante métodos fitoquímicos convencionales permitió el aislamiento de diferentes fracciones bioactivas y la caracterización del flavonoide avicularina, dichas fracciones demostraron una importante actividad sobre las enzimas GTFs producidas por la especie cariogénica *S. mutans*.

Las fracciones evaluadas en el ensayo sobre el efecto inhibitorio de las GTFs fueron seleccionadas mediante los resultados obtenidos de un ensayo biodirigido resultado de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *S. mutans*, los resultados de dicho ensayo determinaron que la fracción J3 posee el mayor efecto inhibitorio contra la especie con un valor de CMI de 280 $\mu\text{g/mL}$, razón por la cual se consideró que la fracción J3 contenía a los compuestos bioactivos y se continuó con su purificación hasta obtener el flavonoide avicularina. Por otra parte se incluyó en la evaluación de la actividad contra las GTFs las fracciones J3 y EII ya que ambas fracciones son consideradas bioactivas al obtener un valor de CMI menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados de ensayo sobre las GTFs indican que las fracciones EII, J3 y la avicularina presentaron un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de las GTFs. Donde el flavonoide avicularina presentó el mayor efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de GTFs al tener el valor más bajo de I_{50} entre las fracciones evaluadas. Por otra parte, el extracto J3 comparado con la avicularina, muestran curvas similares entre sí, aunque la avicularina presenta la mayor inhibición, la similitud en las curvas sugiere que la inhibición de J3 es dada mayoritariamente por la presencia de la avicularina.





8.0 PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en el proyecto, con la finalidad de aislar algunos compuestos minoritarios presentes y determinar su actividad biológica.
- Realizar estudios más profundos sobre el mecanismo catalítico de inhibición de la avicularina sobre las glucosiltransferasas. Para ello es necesario tener mayor cantidad del compuesto y realizar ensayos de actividad a diferentes concentraciones de sustrato con concentraciones distintas de inhibidor. Con estas curvas se podría establecer el tipo de inhibición y la constante de inhibición de la enzima por avicularina (K_i) que podría ayudar a establecer las concentraciones necesarias del compuesto para ejercer su acción anticariogénica.
- Además, en vista de que los OH podrían ser importantes en establecer la actividad inhibitoria del compuesto, sería necesario realizar modificación química de estos grupos para establecer su importancia en el mecanismo de inhibición.





9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Acosta A, Agudelo C, Barrientos S (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la Odontología, 2ª edición, Perú;26-31.
- ✓ Adde C (1993). Fluoride use: The therapeutic of dental caries? Topics about its action in the oral cavity. *Revista ABO Nacional*;1(1):42-4.
- ✓ Aguilar A, Argueta A, Cano L (1994). Flora Medicinal Indígena de México, Instituto Nacional Indigenista, México. Communications in Molecular Pathology and Pharmacology: 105;129–138.
- ✓ Akiko E, Saido T, Fukushima K (1999). Inhibitory effect of a self-derived Peptide on Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological Chemistry*; 274(28):15797-15802.
- ✓ Alonso J (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Argentina. Editorial Corpus, 570-575.
- ✓ Arima H, Danno G (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*: 66:727–1730.
- ✓ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009), consultado el 20 febrero del 2011 disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- ✓ Caceres A; Samayoa B (2005). Tamizaje de la Actividad Antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones Gastrointestinales. USAC, No. 6-89 Cuaderno de Investigación Dirección General de Investigación. DIGI, 86-87.
- ✓ Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) (2008), Programa de acción específico 2007-2012, Salud bucal. Consultado 1 marzo del 2011 disponible en:
<http://www.cenave.gob.mx/progaccion/saludbucal.pdf>
- ✓ Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 164–167.





- ✓ Da Silva-Leitao DP, da Silva-Filho AA, Morseli-Polizello AC, Bastos JK, Cropanese-Spadaro AC. (2004). Comparative evaluation of *in vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1834-1839.
- ✓ Duarte S, Gregoire S., Singh A (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenity of *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology letter*; 257:50-56.
- ✓ Duque de Estrada J, Pérez JA, Hidalgo I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana Estomatología* :43(1)
- ✓ Duque R, Hidalgo G, Pérez A. (2005) Técnicas actuales utilizadas en el tratamiento de la caries dental. *Revista Cubana Estomatología*:43(2)
- ✓ Echemendia C (2004). Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple. *Rev Cubana Plant Med*. Vol 9(3).
- ✓ Featherstone JDB. The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *Journal Dent Res* 2004; 83
- ✓ Fejerskov O.(2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 38: 182–91.
- ✓ Ferrazano GF, Amato I, Ingenito A, Zarreli A (2011). Plant polyphenols and their Anti-Cariogenic Properties. *Molecules*; 16:1487-1501
- ✓ Ferrazzano G, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A(2009). Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea) *Fitoterapia* 80: 255–262
- ✓ Furiga A, Lonvaud-Funel A, Dorignac and G, Badet C (2008). In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. *Journal of Applied Microbiology* : 105, 1470–1476
- ✓ García B, Saldaña A, Basterrechea M (2008). Glucanos extracelulares bacterianos: Estructura Biosíntesis y Función. *Revista Cubana de Estomatología*; 45(3)





- ✓ Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H. 2007. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1960–1968
- ✓ Hamada S, Koga T, Oshima T (1984). Virulence Factors of *Streptococcus mutans* and Dental Caries Prevention. *Journal of Dental Review* ; 63(3):407-411
- ✓ Hamada S, Slade H (1980). Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus*, *Microbiological Reviews*; 44 (2): 331-384
- ✓ Kolenbrander P, Andersen R, Blehert S, Foster E (2002). Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*; 66(3), 486-488.
- ✓ Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YJ, Bowen WH (2002). Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 46:5:1302-1309.
- ✓ Kumari S, Devulapalle k, Goodman S, Gao Q, (1997). Knowledge- based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of the mutans *Streptococci*. *Protein Science*; 6:279-294.
- ✓ Lakshman P, Samaranayake L. (2006). Essential Microbiology for Dentistry, Elsevier, 3^a edición, Inglaterra; 253-306.
- ✓ Lasa J; Del Pozo J; Penadés J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Ann Sist sanit. Navar*; 28 (2): 163-175.
- ✓ Liang Q, Qian H, Yao W (2005). Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Journal European of Mass Spectrometry*: 11:93–101.
- ✓ Loesche W (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiology Review*; 50(4) : 353-380
- ✓ Marsh PD (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal Clinical Periodontology*; 32(6): 7–15.





- ✓ Marsh PD (2006), Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*: 6 (1):S14
- ✓ Murphy CM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*:12, 564-582.
- ✓ Negroni M (2008). Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica, 2º Edición, Editorial Panamericana.
- ✓ Noor Al-Hebshi N, Nielsen O, Skaug N. (2005). In vitro effects of crude khat extracts on the growth, colonization, and glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Acta Odontologica Scandinavica* 63: 136–142.
- ✓ Nikitina VS, Kuzmina YL, Melent'ev AI, Shendel G (2007). Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of *Geraniaceae* and *Rosaceae* families. *Appl. Biochem. Microbiol.*:43: 629-634
- ✓ Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Kiat-Lim E, Davis BG, Tarling CA, Ford CM, Bowles DJ, Davies GJ (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification *The EMBO Journal* : 25 (6) :1396-1405
- ✓ Oliveira C, Bastos M (1998). Water fluoridation as a method of caries control in the region Barreiro. *Revista ABO Nacional*; 6(3):153-8.
- ✓ Oliver BB (1986). Medicinal Plants in tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 457–461.
- ✓ OMS (2004), WHO releases new report on global problem of oral diseases 2004, consultado el 20 de febrero del 2011 , disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/en/>
- ✓ OMS 1987. Investigaciones en Salud Oral: Métodos y Bases. OMS, Ginebra.
- ✓ Organización Mundial de la Salud (OMS) ,consultado el 10 de diciembre del 2010, disponible en: <http://www.who.int/en/html>
- ✓ Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemistry Pharmacology Bull*: 40:2970-2974





- ✓ Osbourn AE (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*:10:1821-1831.
- ✓ Paniandy JC, Chane M, Pieribattesti JC (2000). Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava* L). *Journal of Essential Oil Research*: 12, 153–158.
- ✓ Pérez Gutiérrez RM, Mitchell S, Solis RV (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal Ethnopharmacol.* 117: 1-27.
- ✓ Petersen P. (2003). World map dental caries, *Organización Mundial de la Salud*, consultado el 18 feb 11 disponible en:
http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_figure6.pdf
- ✓ Petti S, Scully C (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry* 37, 413-423.
- ✓ Pistelli L, Cammilli A, Manunta A, Marsili A(1992). Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Blumeum falcatum* subsp. *Cernuum*. *Phytochemistry*; 33:1537-1539.
- ✓ Pongsak R, Parichat P (2010). Contents and antibacterial activity of flavonoidsextracted from leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Medicinal Plants Research*; 4(5): 393-396
- ✓ Pongsak R., Parichat P (2010). Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. *Fitoterapia*; 78:434–436
- ✓ Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S, (2006). Guajaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* : 101: 487–495.
- ✓ Rao, S, Gruber JV, Brooks GJ (2010). Personal care composition containing yeast/ polyphenol ferment extract. *US Pat. Appl. Pub. US 20100021532 A1*, January 28.





- ✓ Razak FA, Othman RY, Rahim ZH (2006). The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science* 48, 71–75.
- ✓ Rios CD, Salazar CR, Cardona C, Victoria K, Torres M (1977). Guayaba. Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá (Colombia), segunda edición Frutales. Manual de Asistencia Técnica No. 4. pp. 221–248.
- ✓ Sandoval P (2010), Actividad antiplaca contra *Streptococcus mutans* del flavonoide avicularina aislado de la infusión de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*). Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- ✓ Sampaio FC, Pereira M, Dias CS, Costa VC, Conde N, Buzalaf, MA (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*: 15:289-294
- ✓ Sato M, Tanaka H, Fujiwara S, Hirata M, Yamaguchi R, Etoh H, Tokuda C (2003). Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*: 10:427-433.
- ✓ Scheie A, Peterson F. (2004). The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 4–12.
- ✓ Secretaría de Salud. Salud: México 2002, información para la rendición de cuentas. Consultado el 24 de febrero del 2011 disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/evaluacion/saludmex2002/saludmex2002.htm>
- ✓ Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007), Dental caries review *The Lancet* ; 369: 51–59
- ✓ Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbé A, Storey DM (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Reviews*: 41, 342-349.
- ✓ Stewart PS, Costerton JW (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* ; 358: 135-138.
- ✓ Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N (1997). Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water





- insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. *Biosci. Biotech. Biochem*; 61, 332-335.
- ✓ Vargas AD, Soto HM, Gonzalez HVA, Engleman EM, Martinez GA (2006). Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava*). *Agrociencia* ;40: 109–115.
 - ✓ Vercauteren, J (2009). Compositions of stilbenic polyphenolic derivatives, their preparation, and their use in the treatment of disease and aging. *Fr. Demande 2923717 A1*, 2009.
 - ✓ Zakaria M, Mohd MA (1994). Traditional Malay medicinal plants. *Penerbit Fajar Bakti Sudan Berhard*, 129–132.

