



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOCAPAS DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* Y SUS COMPUESTOS
MAYORITARIOS.**

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

PRESENTA

NAYELI AGUIRRE CRUZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013





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: Profesor: Arturo Navarro Ocaña
Vocal: Profesor: Sobeida Sánchez Nieto
Secretario: Profesor: José Fausto Rivero Cruz
1er. SUPLENTE: Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano
2º SUPLENTE: Profesor: Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111. Edificio E. Facultad de Química. UNAM.

Asesor

José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Nayeli Aguirre Cruz





Agradecimientos

A LA Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la formación académica para concluir mis estudios.

Mi más amplio reconocimiento y un agradecimiento muy especial al Dr. José Fausto Rívero Cruz por la asesoría, apoyo incondicional, tiempo dedicado para la elaboración y revisión de éste trabajo, por sus consejos y su orientación.

A los miembros del jurado por darse el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus observaciones respecto a éste.

Al personal técnico de la USAI por el registro de os distintos espectros usados en éste trabajo de investigación.

A la Doctora Gloria Díaz Ruíz por la valiosa ayuda técnica en el desarrollo y propagación de bacterias utilizadas en el presente trabajo.





Dedicatoria

He tenido dicha de estar con personas muy valiosas que han impactado totalmente, para bien, en el profundo escondite de mi alma y la han incitado a superarse así mismo, seguir avanzando y nunca, sin excepción, rendirse. Éste trabajo representa el esfuerzo propio y de mi familia; por tal motivo, es mi deseo dedicarlo a quienes han compartido conmigo su cariño, confianza, tiempo y experiencia, destacando que sin esas contribuciones, mi camino para llegar hasta aquí, habría sido más arduo.

Inicialmente, quiero agradecer a esos Ángeles que Dios me mandó, ellos que incondicionalmente me han apoyado, en todos los sentidos, y que sin su experiencia, consejos, regaños, abrazos y besos no habría llegado hasta aquí, mis padres Ofelia y Alfonso, los amo. A otro angelito que siempre ha estado a mi lado sin importar las divergencias de su mundo y mi mundo, quién siempre me ha ayudado y con su templanza me enseña que en la vida no hay que abatirse por nada, mi hermano Emmanuel, gracias por tu paciencia, te amo. A otros angelotes, ellos que me conocieron desde pequeña y quienes han aportado consejos que siempre tendré en mente, mis abuelos, gracias. A mis padrinos, Arturo e Irma, que siempre estuvieron pendiente de mí, con sus palabras y cariño me alentaban a seguir.

Posteriormente, a la familia que uno elige, que también son angelitos, aunque a veces son traviesos: los amigos. A esos chamacos que conocí desde pequeños: Ady, mi prima-T; Chio; Mar; Rafa; Ale; Oziel; Kary, y Tavo, que a pesar de conocernos desde hace años, siguen siendo los mismos de siempre, gracias por compartir conmigo todos esos momentos. A Marianita, gracias por escucharme y comprenderme, mi consentida.

A los más traviesos de todos: Karla, Ángel, Anita y Lau, mi hermanita del alma, ustedes me conocieron en otra etapa y de locuras como las que hemos vivido, pocas, muchas gracias. A aquellos que conocieron a una ardilla diferente: A Javier, partidario de mis sueños, Sergio, Emiliano, mi hermanito del alma, Jorge flakito, por su tiempo, las conversaciones entrañables, su apoyo, su cariño, que durante mi estancia en la Facultad de Química fueron indispensables, y los siguen siendo.

Por último, a Manuel Rosas, por tus enseñanzas, por regalarle a mi alma el esplendor de la música, Roberto Ramírez Moreno, que siempre confió en mí, por su apoyo maestro, gracias; Verito, tus palabras siempre me han llegado al alma, mujer artista gracias por tu amistad; a Osvaldo, mi parejito, compañero





de mis pasos, gracias por la paciencia, el apoyo y la amistad; a Mago, gracias porque me ha enseñado a siempre seguir adelante, a resistir y continuar, a volar.

A todos ustedes les dedico éstas páginas con cariño y el deseo de seguir creciendo, compartiendo y aprendiendo juntos.

“La vida es una audaz aventura o no es nada. Mantener la cara hacia el cambio y comportarse como un espíritu libre en presencia del destino significa tornarse invencible”
Helen Keller





Contenido

Jurado asignado.....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Diagramas.....	ix
Lista de Figuras.....	x

CAPÍTULO I

Introducción.....	Pág. 1
-------------------	--------

CAPÍTULO II

Antecedentes.....	Pág. 4
2.1. La caries.....	Pág. 4
2.1.1. Patogénesis.....	Pág. 5
2.1.2. <i>Streptococcus mutans</i> en la caries dental.....	Pág. 6
2.1.2.1 Factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i>	Pág. 8
2.1.2.2. Glucosiltransferasas	Pág. 8
2.1.3. Placa dental.....	Pág. 9
2.2. <i>Psidium guajava</i>	Pág. 10





2.2.1. Estudios fitoquímicos previos. Constituyentes aislados a partir de las hojas de <i>Psidium guajava</i>	Pág. 11
2.2.1.1. Flavonoides.....	Pág.11
2.2.1.1.1. La quercetina y sus glicósidos.....	Pág. 11
2.2.1.1.2. Otros flavonoides.....	Pág. 12
2.2.1.2. Taninos.....	Pág. 13
2.2.1.3. Terpenos/isoterpenoides.....	Pág. 14
2.2.2. Actividades biológicas de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	Pág. 15
2.2.2.1. Acción antitusiva	Pág. 16
2.2.2.2. Actividad espasmolítica.....	Pág. 16
2.2.2.3. Actividad antibacteriana.....	Pág. 16
2.2.2.4. Actividad antidiarréica.....	Pág. 17
2.2.2.5. Actividad antidiabética, hipoglicémica y antihiperlipidémica.....	Pág. 18
2.2.2.6. Actividad antioxidante.....	Pág. 18
2.2.2.7. Otras actividades.....	Pág. 20

CAPÍTULO III

Justificación y objetivos.....	Pág. 21
--------------------------------	---------

CAPÍTULO IV

Parte experimental.....	Pág. 22
4.1. Procedimientos generales.	Pág. 22
4.1.1. Análisis cromatográficos.	Pág. 22





4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	Pág. 22
4.1.3. Material vegetal.....	Pág. 23
4.1.4. Ensayos biológicos.....	Pág. 23
4.1.4.1. Microorganismo de prueba.....	Pág. 23
4.1.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	Pág. 23
4.1.4.3. Inhibición de la formación de biocapa de <i>Streptococcus mutans</i>	Pág. 24
4.1.5. Estudio químico de las hojas de <i>Psidium guajava</i>	Pág. 25
4.1.5.1. Preparación del extracto etanólico.....	Pág. 25
4.1.5.2. Fraccionamiento primario	Pág. 25
4.1.5.3. Fraccionamiento secundario	Pág. 26
4.1.5.4. Fraccionamiento terciario	Pág. 26
4.1.5.5. Fraccionamiento cuaternario	Pág. 27
4.1.6. Obtención de avicularina a partir de la fracción activa B4.....	Pág. 27
4.1.7. Obtención de quercetina a partir de la fracción activa B5.....	Pág. 28

CAPÍTULO V

Resultados y discusión.....	Pág. 30
-----------------------------	---------





5.1. Inhibición de formación de biocapas monoespecie por la bacteria <i>S. mutans</i>	Pág. 30
5.2 Aislamiento de la avicularina a partir de la fracción B4.....	Pág. 32
5.3 Efecto de la avicularina y la quercetina sobre la formación de la biocapa monoespecie por <i>S. mutans</i>	Pág. 35

CAPÍTULO VI

Resumen y conclusiones.....	Pág. 36
-----------------------------	---------

CAPÍTULO VII

Perspectivas.....	Pág. 37
-------------------	---------

CAPÍTULO VIII

Referencias.....	Pág. 38
------------------	---------





Lista de Tablas

Tabla	Nombre	Página
Tabla 1.	Microrganismos que colonizan los diferentes sitios de la cavidad oral.	Pág. 7
Tabla 2.	Quercetina sus glicósidos aislados a partir de las hojas de guayaba.	Pág. 12
Tabla 3.	Taninos aislados de hojas de <i>Psidium guajava</i> .	Pág. 14
Tabla 4.	Terpenoides aislados de hojas de guayaba.	Pág. 15
Tabla 5.	Actividad antibacteriana de hojas de <i>Psidium guajava</i> .	Pág. 18
Tabla 6.	Actividades de diferentes extractos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	
Tabla 7.	Controles utilizados durante el ensayo biológico.	Pág. 26
Tabla 8.	Fracciones primarias obtenidas.	Pág. 27
Tabla 9.	Resumen del fraccionamiento secundario.	Pág. 28
Tabla 10.	Resumen del fraccionamiento terciario.	Pág. 29
Tabla 11.	Actividad inhibitoria de formación de las biocapas de las fracciones B1-B8.	Pág. 33

Lista Diagramas

Diagrama	Nombre	Página
Diagrama 1.	Proceso de la caries como flujo regular de desmineralización (destrucción) y remineralización (reparación).	Pág. 6
Diagrama 2.	Fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> .	Pág. 30





Lista de Figuras

Figura	Nombre	Página
Figura 1.	Estructura general de un flavonoide.	Pág. 11
Figura 2.	Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba.	Pág.33
Figura 3	Espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina.	Pág.34
Figura 4.	Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (a) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (b) obtenidos para la avicularina.	Pág.35





CAPÍTULO I

1. Introducción

El uso de plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia. Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y constituyen una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas. Desde el año 3.000 a.C. hasta nuestros días, hay numerosas referencias y escritos como el famoso papiro egipcio de Ebers (cerca de 1.500 a.C.) que contiene muchas preparaciones medicamentosas a base de vegetales (Micheli *et al.*, 2009). México, por su ubicación geográfica privilegiada, abunda en ecosistemas, en los que encontramos 30 tipos de vegetación y aproximadamente 30 000 especies, de las cuales escasamente hay cerca de 20 000 estudiadas; de ellas, 3 000 son medicinales y solamente el 10% de éstas se ha estudiado desde el punto de vista farmacológico (Waizel, 2009).

Psidium guajava es una planta nativa del Continente Americano que pertenece a la familia *Myrtaceae*; sus hojas poseen alto porcentaje de taninos y glucósidos cardiacos (Kaneria *et al.*, 2011), así como un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, 3-bisaboleno, aromandreno y para-selineno. Por otra parte, se han detectado el beta-sitosterol y los ácidos oleanólico, ursólico, catagólico y guayavólico. Por otra parte, taninos derivados del ácido elágico y los flavonoides quercetina y quercetin-3-arabinósido. En la raíz se han detectado leucocianidinas, esteroides y ácido gálico. El fruto es rico en vitamina C (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Estudios etnofarmacológicos de la especie vegetal *Psidium guajava* L., describen su uso para diversos padecimientos y se le han atribuido propiedades tales como: antiinflamatorias, antihipertensivas, analgésicas, antígenotóxicas, hepatoprotectoras, antipiréticas, antidiarreicas, antitusivas y antibacterianas entre otras (Aguilar *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2004; Jayakumari *et al.*, 2012). Los flavonoides derivados





de la quercetina (avicularina, guaijaverina, isoquercetina, hiperina) contenidos en las hojas de *Psidium guajava* son hidrolizados en el cuerpo a la aglicona quercetina, responsable de la actividad espasmolítica de las hojas (Metwally *et al.*, 2010).

Así mismo, es importante señalar que enfermedades bucodentales, tales como caries dental y periodontitis, son un problema de alcance mundial y se presenta con mayor incidencia y prevalencia en los grupos de población menos favorecidos, lo cual constituye un problema de salud pública. Es por eso que, en países en vías de desarrollo afectan del 60% al 90% de la población y la atención odontológica curativa tradicional representa una importante carga económica para muchos países de ingresos altos, donde el 5%-10% del gasto sanitario público guarda relación con la salud bucodental (De la Fuente *et al.*, 2008; OMS, 2010). La caries dental se caracteriza por la colonización de microorganismos, siendo *Streptococcus mutans* el principal agente etiológico conocido, en la superficie dental y formación de placa dentobacteriana que ocasiona desmineralización del diente (Jass *et al.*, 2003).

Uno de los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* es la síntesis de glucanos y fructanos a partir de la sacarosa, por medio de enzimas como glucosiltransferasas (GTF) y fructosiltransferasas (FTF), los cuales ayudan a la adhesión y protección de éste agente patógeno (Prabu *et al.*, 2005).

La placa dental tiene como origen la formación de una biopelícula en la superficie dental y representa en una compleja comunidad bacteriana embebida en una matriz de polímeros. Esta película de exopolisacáridos (EPS) permite interacciones sinérgicas entre bacterias, incluso de diferentes especies, así como protección ante cambios en el entorno (De la Fuente *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2006).





Estudios fitoquímicos previos reportan que la avicularina posee actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*; es un flavonoide que favorece la agregación de la bacteria al disminuir su hidrofobicidad y disminuyendo su capacidad de adhesión, sin embargo pocos estudios se han realizado para determinar el efecto de los extractos y flavonoides de *Psidium guajava* sobre desarrollo de las biocapas por la bacteria (Razak *et al.*, 2006; Biblioteca Digital de la medicina Tradicional Mexicana, 2009).





CAPÍTULO II

2. Antecedentes.

La salud bucal es un elemento determinante y fundamental de la salud integral de un individuo y un indicador de su estado es el índice de caries dental (Ortega *et al.*, 2007), la cual es una enfermedad que figura entre las enfermedades principales que afectan la cavidad oral (De la Fuente *et al.*, 2008).

La caries se forma a través de una interacción compleja entre el tiempo de producción de ácido de la bacteria y los carbohidratos fermentables, y otros factores incluyendo los dientes y la saliva. El riesgo de caries incluye factores físicos, biológicos, ambientales, socio-económicos, así como un gran número de bacterias criogénicas, flujo de saliva inadecuado, exposición insuficiente de flúor, higiene dental deficiente, alimentación (Seltwiz *et al.*, 2007).

2.1 La caries.

La caries dental es una de las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes y ubicuas desde los principios del hombre y se considera como una enfermedad infecciosa resultado de la intervención de factores como la dieta, factores genéticos, edad, microbiota, hábitos de higiene dental, entre otros (Henostroza, 2005).

Por otra parte, los cambios tempranos en la dentina no son detectados por métodos clínicos tradicionales o radiografías. La enfermedad es inicialmente reversible y puede erradicarse en cualquier etapa, aún si la dentina o el esmalte son destruidos, mientras que la biocapa sea removida.

La caries consta de la desmineralización localizada y progresiva de los tejidos duros del diente, esmalte y dentina, estructuras que progresivamente se romperán formando cavidades (Deshpande *et al.*, 2012). Ésta erosión dental se debe al ataque químico de ácidos de la dieta como el ácido cítrico, fosfórico, málico, ascórbico, tartárico, carbónico y oxálico que se encuentran en frutas, verduras, bebidas y vinagre; así mismo por ácidos del medio producidos por las





bacterias que conforman la placa dental, por medio del metabolismo anaeróbico de los azúcares de la dieta (Moynihan, 2005). Las señales de la desmineralización se ven en los tejidos dentales duros, pero el proceso de ésta enfermedad se inicia desde la biocapa bacteriana (placa dental) que recubre la superficie dental (Seltwiz *et al.*, 2007).

En la cavidad oral reside la flora bacteriana normal, éste conjunto de microorganismos constituyen la placa dental o biocapa en la cual se encuentran aproximadamente 700 especies de bacterias (Dong *et al.*, 2012). Los microorganismos de la placa dental pueden llegar a colonizar y comportarse como bacterias oportunistas, si el medio oral y las condiciones son favorables. Las bacterias principales asociadas a la formación de placa dental y responsables de iniciar la caries dental son *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* y *Lactobacillus acidophilus* y *Actynomicetes* (Thomspon *et al.*, 2011; Deshpande *et al.*, 2012).

2.1.1 Patogénesis

La caries dental resulta de las interacciones entre el tiempo en el que la bacteria produce ácidos, el sustrato que la bacteria puede metabolizar y otros factores que incluyen al diente y la saliva. Resulta del desbalance ecológico en el equilibrio fisiológico entre los minerales del diente y la biocapa microbiana oral.

Los mecanismos del proceso de la caries son similares para todo tipo de caries. Bacterias endógenas (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* y *Lactobacillus sp*) en la biocapa producen ácidos orgánicos débiles como resultado del metabolismo de carbohidratos fermentables. Estos ácidos ocasionan que los valores de pH disminuyan a valores críticos resultando la desmineralización de tejido dental. Si la difusión de calcio, fosfato y carbonato fuera del diente continua, eventualmente habrá formación de cavidad. La desmineralización se puede revertir en sus etapas tempranas a través del consumo de estos componentes. El flúor actúa como catalizador de la difusión de calcio y fosfato al diente, con lo que se remineralizan las estructuras cristalinas de la lesión. Las superficies cristalinas reconstruidas, compuestas por hidroxapatita fluoridada y fluorapatita, son más





resistentes al ataque de ácido que la estructura original (Diagrama 1). El proceso de desmineralización y remineralización toma lugar frecuentemente durante el día en la mayoría de las personas. La remineralización es frecuente, especialmente cuando el pH de la biocapa es restaurado por la saliva, que actúa como amortiguador de pH.

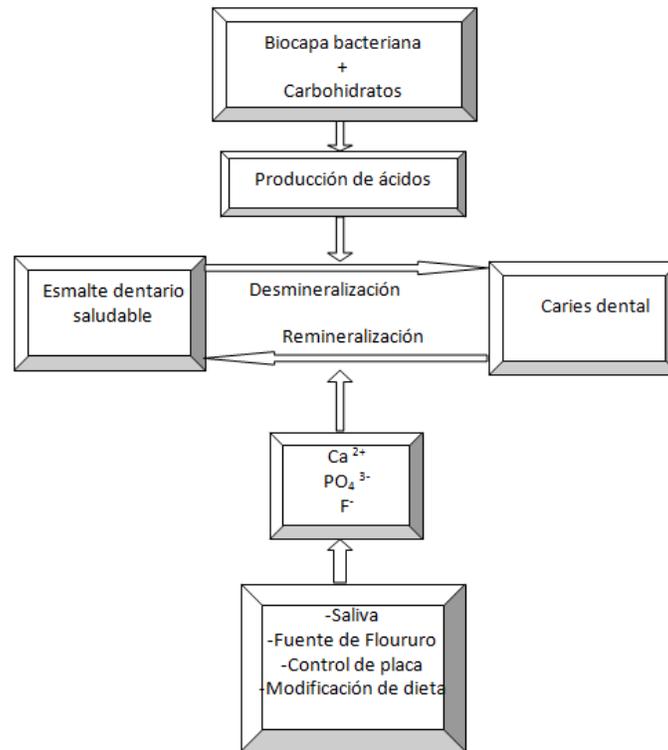


Diagrama 1. Proceso de la caries como flujo regular de desmineralización (destrucción) y remineralización (reparación). Adaptado de Seltwiz *et al.*, 2007.

2.1.2. *Streptococcus mutans* en la caries dental.

El género *Streptococcus*, pertenece a la familia *Streptococcoceae*. Son cocos Gram positivos que tienen la característica de asociarse en parejas o cadenas cortas o largas. *Streptococcus mutans* pertenece al grupo viridans y presenta alfa-hemólisis, no posee cápsula y sus fimbrias son poco prominentes. En 1924, Clarke identificó a *Streptococcus mutans* en la caries e introdujo el concepto de sucesión microbiana que no es más que la incorporación de grupos o complejos microbianos que modifican sus características cuando están en grupo





(Clarke, 1924). En la Tabla 1 se indica los sitios de colonización de la cavidad oral en función de la especie o grupo del género *Streptococcus*.

Tabla 1. Microorganismos que colonizan los diferentes sitios de la cavidad oral.

Sitio	Nasofaringe	Superficie dental	Mucosa vestibular	Saliva	Faringe	Lengua	Mucosa lingual	Amígdalas
Especie	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>S. vestibularis</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> .

(Guillaume, *et al.*, 2011).

El género *Streptococcus* agrupa seis especies (*S. anginosus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. mutans* y *S. salivarius*), de acuerdo a las secuencias de su ARN ribosomal 16S (Guillaume, *et al.*, 2011). *Streptococcus mutans* se caracteriza por ser un coco Gram positivo, α -hemolítico, anaerobio facultativo y perteneciente al grupo Viridans. *Streptococcus mutans* es altamente cariogénico por su acidogenicidad al producir ácidos carboxílicos de cadena corta los que son capaces de disolver los tejidos duros dentales (Deshpande *et al.*, 2012).

El nombre de éste grupo se debe a que las células bacterianas poseen capacidad de perder su forma de cocos y a menudo aparecen como bacilos cortos o coco-bacilos. Los serotipos (A-H) se deben a sus antígenos de pared celular. El serotipo C es el más encontrado en la cavidad oral humana (en un 70-80%), seguido por el serotipo E (aproximadamente un 20%), mientras que los serotipos F y K son menos frecuentes (menos del 5%). La composición de los polisacáridos de los antígenos para cada serotipo ha sido reportada, estos polisacáridos consisten en una combinación de glucosa, ramnosa y galactosa. Para los serotipos C y E los polisacáridos consisten en combinaciones de glucosa y ramnosa (Guillaume *et al.*, 2011).





2.1.2.1 Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*.

Para establecerse dentro de la cavidad bucal, los microorganismos deben adherirse a la superficie dental o a la mucosa, en éste proceso se encuentran involucradas las moléculas de adhesión (polisacáridos, ácidos lipotectóicos, lectinas, glucosiltransferasas), presentes en la superficie celular o asociados a sus estructuras celulares como las fimbrias y cápsulas(Guillaume, *et al.*, 2011).

Conjuntamente, éstas bacterias fermentan sacarosa por acción de enzimas glucosiltransferasas (GTF's) y como resultado de ese metabolismo producen polisacáridos extracelulares insolubles que potencian su adherencia al diente y promueven la formación de biocapa (Deshpande *et al.*, 2012).

Recientemente, se ha demostrado que *S. mutans* posee una feromona peptídica en el sistema de “quorum-sensing”; ésta hormona así como una histidina cinasa, son componentes de un mecanismo regulatorio que induce competencia genética y le permite actuar más eficientemente a la bacteria en la biocapa que de forma planctónica (Van Der Ploeg, 2005).

2.1.2.2. Glucosiltransferasas.

En general, los microorganismos de la cavidad oral requieren polisacáridos, que son constituyentes importantes de la biocapa para su colonización eficiente sobre superficies de la cavidad oral. *Streptococcus mutans* puede sintetizar éstos polisacáridos usando GTFs que pueden utilizar sacarosa como único sustrato y catalizan la transferencia de sacarosa a la cadena de glucano llevando a la síntesis de glucano insoluble con un 93% de enlaces α -(1 \rightarrow 3) y 7% de enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Taechowisan *et al.*, 2008).

Streptococcus mutans puede sintetizar tres tipos de GTFs (GtfB, GtfC y GtfD) que son codificadas por los genes *gtfB*, *gtfC* y *gtfD*, respectivamente. GtfB es el principal responsable de producir enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 3) cuyos polisacáridos resultantes son insolubles en agua, mientras que los GtfD produce los enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 6), cuyos polisacáridos son solubles en agua. GtfC produce ambos, por lo que es universalmente aceptado que GtfB y GtfC son





factores de virulencia críticos en el inicio de caries (Dong, *et al.*, 2012). La GTF posee un dominio C-terminal de unión a glucano que puede funcionar también como receptor de glucanos (Roushdy, 2009) y posee otro dominio que es el dominio catalítico en el N-terminal. Otros estudios han reportado que la interacción entre amilasa y las GTFs estreptocócicas en la superficie de hidroxiapatita cubierta de saliva resulta en la reducción en su actividad enzimática y formación de glucanos (Chauduri *et al.*, 2007).

Las GTFs secretadas por *S. mutans* se encuentran en la saliva humana y están incorporadas en la biopelícula formada en la superficie dental. La acción de las enzimas GTFs conlleva dos pasos: la hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa y la transferencia de residuos glucosil a la forma de glucanos (Guillaume *et al.*, 2011).

2.1.3. Placa dental.

La cavidad oral es colonizada por algunas bacterias Gram positivas. Se ha demostrado que algunas bacterias como *E. faecalis* y *S. mutans* incrementan sus capacidades adaptativas a condiciones adversas y exhiben aumento en la resistencia a tratamientos (Deng *et al.*, 2009).

Las colonias de bacterias que residen en los dientes son encapsuladas en una matriz orgánica de polisacáridos, proteínas y ADN secretado por las células y provee protección a la desecación y proporciona potenciación de resistencia a agentes antimicrobianos (Seltwiz *et al.*, 2007). En general, las bacterias de la cavidad oral requieren polisacáridos, que son componentes importantes de la biopelícula, para una eficiente colonización.

El biofilm o biopelícula, se define como comunidad de microorganismos adheridos a una superficie. Éste puede contener una sola especie de bacterias, o diversas y se pueden aglomerar tanto en superficies bióticas como abióticas. Las bacterias inician el desarrollo de la biopelícula en respuesta a un cambio específico en su entorno, por ejemplo la disponibilidad de nutrientes.





Dos propiedades son comúnmente asociadas a la biocapa bacteriana, incremento la síntesis de EPS y el desarrollo de resistencia a antibióticos, éstas características surgen para crear un ambiente protector para las bacterias. La biocapa puede generar otras propiedades, como incremento a la resistencia a la luz UV, incrementa el intercambio genético, altera las capacidades biodegradativas e incrementa la producción de metabolitos secundarios (O'Toole *et al.*, 2000).

La interacción entre estreptococos y las moléculas retenidas en el esmalte dentario juega un papel importante en la colonización temprana, agregación y formación de biopelícula. *S. mutans* posee proteínas de superficie que son los antígenos PAc, Ag I/II, B, P1, Spa-P y MSL-1 de peso molecular aproximado de 190kDa, dichas proteínas interactúan con los componentes salivares incluidos la lisozima, amilasa, proteínas ricas en prolina y la aglutinina (Kentaro *et al.*, 2010).

2.2. *Psidium guajava*

La guayaba, es una especie vegetal de gran importancia en la actualidad. Está distribuida en toda la franja subtropical y en algunas zonas subtropicales, tanto de forma silvestre como comercial; es una de las 50 especies más conocida y consumida a nivel mundial. De hecho, la guayaba, se usa en el tratamiento de más de 40 padecimientos que afectan la salud de los mexicanos en diferentes áreas del país (Marquina *et al.*, 2008).

Es un arbusto o árbol que pertenece a la familia Myrtaceae, de 4 a 10 metros de altura, que posee una corteza lisa y de color café (Abreu *et al.*, 2006). Las hojas de *Psidium guajava* son duras, ovadas, con el reverso veloso y las nervaduras realzadas. Las flores son solitarias, blancas o crema, olorosas y con muchos estambres. Sus frutos son globosos, con olor fragante y la pulpa es de color amarillo o rosa, con numerosas semillas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).





2.2.1. Constituyentes de las hojas de *Psidium guajava*.

2.2.1.1. Flavonoides

Son compuestos de bajo peso molecular formados por un esqueleto de difenil pirano, formado por dos anillos de fenilos A y B, ligados por un anillo de pirano C heterocíclico (Figura 1). Tienen en su estructura un grupo variable de hidroxifenólicos, que les confiere actividad antioxidante, capaces de quelar metales como el hierro y otros metales de transición. Las principales características para su función son la presencia de catecol en el anillo B, la presencia de un doble enlace en la posición 2 y 3 y la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3 y 5 (Martínez *et al.*, 2002).

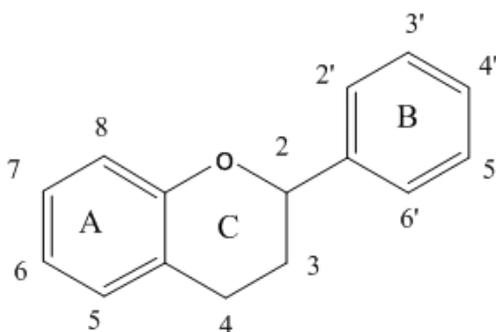


Figura 1. Estructura general de un flavonoide.

2.2.1.1.1. Quercetina y sus glicósidos

Las estructuras químicas de la quercetina y sus glicósidos aislados a partir de la guayaba se resumen en la Tabla 2.





Tabla 2. Quercetina y sus glicósidos aislados a partir de las hojas de guayaba.

Flavonoides aislados de hojas de <i>Psidium guajava</i>		R ₂	Referencias
Quercetina		H	(Nantitanon y OKonogi 2012)
Avicularina: Quercetin 3-O-L-arabinofuranósido	L-arabinofuranósido	H	(Begum, 2002)
Guajaverina: Quercetin 3-O-α-L-arabinopiranosido	L-arabinopiranosido	H	(Prabu <i>et al.</i> , 2005)
Isoquercetina: Quercetin 3-O-β-D-glucósido	β-D-glucosa	H	(Nantitanon y OKonogi 2012)
Hiperina: Quercetin 3-O-β-D-galactósido	β-D-galactosa	H	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Quercitrina: Quercetin 3-O-β-L-ramnósido	β-L-ramnosa	H	(Begum, 2002)
Quercetin-3-O-β-D arabinopiranosido	β-D-arabinopiranosido	H	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Quercetin 3-O-gentiobiosido	gentobiosa		(Nantitanon y OKonogi 2012)
Quercetin 4'-glucuronido	H	Ácido glucurónico	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)

2.2.1.1. 2. Otros flavonoides

Otros flavonoides incluyen la morina, morin-3-O-α-lixopiranosido, morin-3-O-α-L-arabinopiranosido, caempferol, naringenina, galoilglucósido, luteolin-7-O-glucósido y apigenin-7-O-glucósido (Park Byoung-Jae *et al.*, 2011). Los tres primeros presentan una notable actividad antibacteriana (Rattanachaikunsopon *et al.*, 2007).





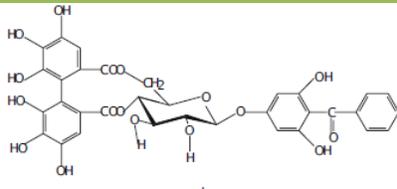
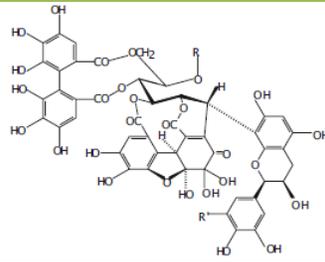
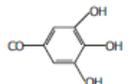
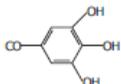
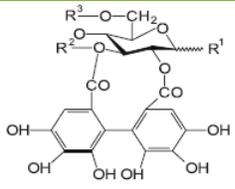
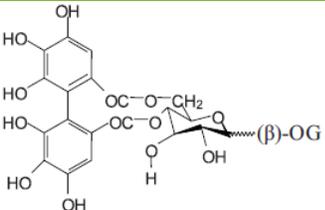
2.2.1.2. Taninos

Las hojas de *Psidium guajava* son ricas en:

- amritósido (ácido elágico 4-gentiobiósido)
- guavina B (estructura I) y guavinas A, C y D (estructuras II, III, IV, respectivamente).
- agentes antidiabéticos: isostrictinina (V), estrictinina (VI), pedunculagina (VII).
- agentes antimutagénicos: (+)-galocatequina (un compuesto bioantimutagénico en contra de la mutación inducida por UV de *E. coli*).
- casuarictina (Park Byoun-Jae *et al.*, 2011).

Las estructuras de los taninos aislados de hojas de *Psidium guajava* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Taninos aislados de hojas de *Psidium guajava*.

Taninos aislados de hojas de <i>Psidium guajava</i>	
	
	
IIIIIV	
R	  
R'	H OH
 	
(V): R ¹ = (β)-OG, R ² = R ³ = H (VII): R ¹ = OH, R ² = R ³ = (S)-HHDP (hexahydroxydiphenoyl)	

Adaptado de Metwally *et al.*, 2011





2.2.1.3. Terpenos/isoterpenoides

- Monoterpenos: óxido de cariofileno, β -selineno, 1.8-cineoleo, α -pineno, micreno, δ -elemeno, d-limoneno, cariofileno, linalol, eugenol, β -bisabolol, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno, Me 2-metiltiazolidina-4-(R)-carboxilato(cis y trans), etil-2-metil-tiazolidina-4-(R)-carboxilato, aromadendreno, α - y β -selineno, epóxido cariofeleno, cayofiladienol, (E)-nerolidol, Selin-11-en-4- α -ol.
- Terpenoides (Tabla 4).

Tabla 4. Terpenoides aislados de hojas de guayaba.

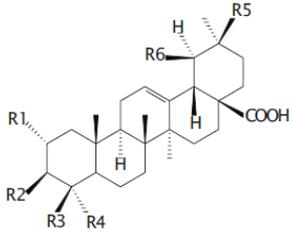
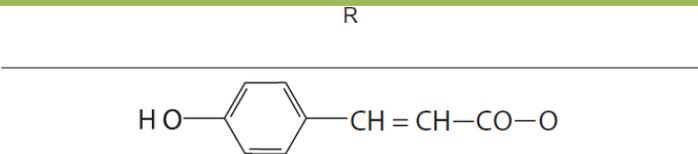
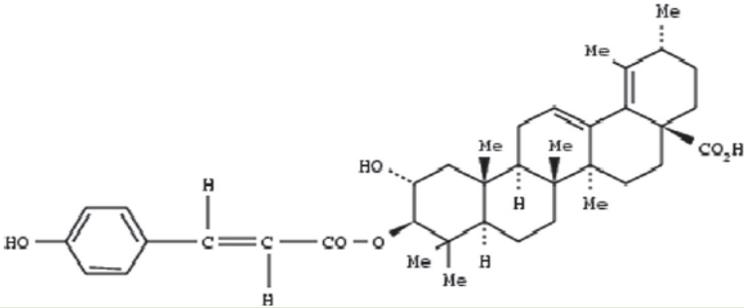
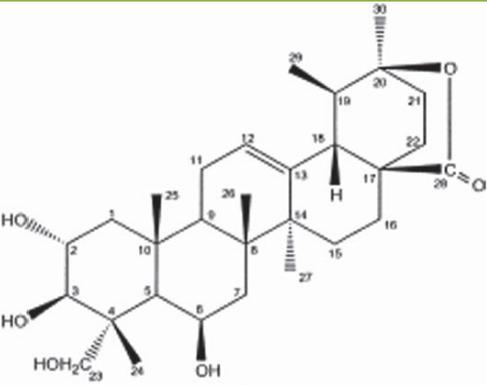
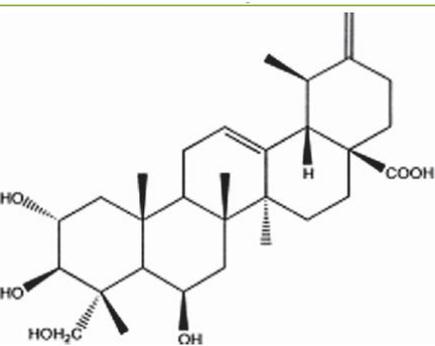
Terpenoides aislados de hojas de <i>Psidium guajava</i>							
							
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Referencias
Ácido guavanóico	OH	OH	-CH ₃	-CH ₃	-CO-CH ₃	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2002)
Ácido guavacoumarico	OH	OH	R	-CH ₃	H	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2002)
Ácido guajanóico	-OCH ₃	R	-CH ₃	-CH ₃	H	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2004)
Ácido ursólico	H	OH	-CH ₃	-CH ₃	H	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2002)
Ácido 2α-hidroxiursólico	OH	OH	-CH ₃	-CH ₃	H	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2004)
Ácido maslínico	OH	OH	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	H	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Ácido asiático	OH	OH	-CH ₃	-CH ₂ -OH	H	-CH ₃	(Begum <i>et al.</i> , 2002)
Ácido jacoumárico	OH	R	-CH ₃	-CH ₃	H	-CH ₃	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Ácido isonericoumárico	R	OH	-CH ₃	-CH ₃	H	-CH ₃	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)





Tabla 4. Terpenoides aislados de hojas de guayaba (continuación).

Terpenoides aislados de hojas de <i>Psidium guajava</i>	
Ácido guajavónico	
Guajavólida	
Ácido guavenónico	

Adaptado de Metwally, *et al.*, 2011

2.2.2. Actividades biológicas de las hojas de *Psidium guajava*.

La infusión de hojas de guayaba se utiliza tradicionalmente para el tratamiento gastrointestinal como diarreas (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2012). Su corteza y frutos también se usan para el tratamiento de diarrea y prevención de diabetes (Arima *et al.*, 2002). A continuación se listan las actividades que han sido reportadas para los extractos de las hojas de *Psidium guajava*:





2.2.2.1. Acción antitusiva

Las hojas de guayaba se han utilizado para tratar problemas de tos y enfermedades pulmonares. Estudios recientes indican que el extracto alcohólico (8 µg/ml), el extracto de acetato de etilo (6µg/ml), el aceite esencial (16µg/ml) así como la quercetina (30µg/ml) producen una disminución significativa en la respuesta contráctil de la tráquea aislada cobayo tratada con histamina (2µg/ml), acetilcolina (1µg/ml) ó serotonina (1µg/ml). Los extractos así como el aceite esencial poseen efectos relajantes en la tráquea aislada, y a altas dosis probablemente pueden inhibir la contracción ventricular del corazón (Metwally, *et al.*, 2011).

2.2.2.2. Actividad espasmolítica.

Estudios previos reportados en la literatura describen que el extracto de hojas de guayaba posee actividad espasmolítica que es atribuida a su alto contenido en flavonoides, en particular a la quercetina (las hojas de guayaba son una fuente rica en glucósidos de quercetina que una vez que se ingieren son hidrolizados por fluidos gastrointestinales a la aglicona quercetina). La quercetina es un flavonoide que produce relajación del íleon de cobayo previamente contraído con KCl y también inhibe la contracción intestinal inducida por Ca^{2+} . Otros estudios demostraron que el extracto alcohólico (4 µg/ml), la infusión acuosa (8 µg/ml), el extracto de acetato de etilo (6 µg/ml), el aceite esencial (16 µg/ml) y la quercetina (30 µg/ml) producen un efecto relajante significativo del íleon de cobayo e intestino de conejo pretratados con histamina (2 µg/ml). Por otra parte, otro estudio demostró que el ácido asiático aislado a partir de las hojas de guayaba demostró actividad espasmolítica dependiente de la dosis (10-500 µg/ml) en contracción espontanea del yeyuno de conejo (Begum S, 2002).

2.2.2.3. Actividad antibacteriana.

Un compendio de estudios previos sobre la actividad antibacterial del extracto de hojas de *Psidium guajava* y sus fracciones se muestra en la Tabla 5.





Los flavonoides morin-3-O-alfa-lixopiranósido y morin-3-O-alfa-L-arabopiranósido poseen CMI de 200 µg/ml para *Salmonella enteritidis* y 250 µg/ml contra *Bacillus cereus* (Metwally *et al.*, 2011).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de hojas de *Psidium guajava*.

Actividad antibacteriana de hojas de <i>Psidium guajava</i>		
Extracto	Actividad	
Acuoso	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> β- <i>Streptococcus</i> grupo A 5 enterobacterias patógenas para el hombre <i>Salmonella paratyphi</i>
	<i>In vivo</i>	Infección de <i>Salmonella typhi</i> en ratas Wistar <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella sonnei</i> y <i>Vibrio cholerae</i>
Alcohólico	<i>In vitro</i>	<i>Neurospora crassa</i> y otras 20 bacterias clínicamente importantes
Etanólico 50%	<i>In vitro</i>	<i>E. coli</i>
Metanólico	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> β- <i>Streptococcus</i> grupo A
Clorofórmico	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> β- <i>Streptococcus</i> grupo A
Acetónico	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i>
Aceite esencial.	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> sp

(Metwally *et al.*, 2011; Jaiari *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2008).

2.2.2.4. Actividad antidiarréica.

La actividad antidiarréica representa el mayor uso de las hojas de la planta. Esta propiedad puede ser explicada por sus notables actividades espasmolíticas, antibacteriales y antiamebicas (Lozoya *et al.*, 2002). A continuación se presentan algunas de las propiedades descritas para las hojas de guayaba relacionadas con este uso:

- Se ha descrito que la quercetina reduce la permeabilidad capilar en la cavidad abdominal.
- El extracto alcohólico de las hojas posee inhibición de péptidos opioides de la liberación de acetilcolina en el íleon.
- La administración oral de extracto metanólico de las hojas reduce el tiempo del tránsito intestinal y previene diarrea en ratón.
- En estudio reciente sugiere que la actividad antidiarréica se debe a la inhibición de la liberación de calcio intracelular





2.2.2.5. Actividad antidiabética, hipoglicémica y antihiperlipidémica.

Las hojas de guayaba han sido utilizadas con el propósito del tratamiento médico de diabetes mellitus durante años.

a) Reducción de glucosa postprandial en sangre: La administración oral de extracto etanólico (50%) inhibe la hiperglicemia en ratas diabéticas. Los principios activos fueron identificados como los taninos isostrictinina, estrictinina y pedunculagina. Por otra parte, una dosis oral de 250 mg/kg del extracto acuoso demostró actividad hipoglicémica en ratas diabéticas (Metwally *et al.*, 2011).

b) Inhibición de la enzima α -glucosidasa. El extracto acuoso de las hojas de guayaba demostró un efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa y disminuye niveles de glucosa postprandial en sangre de en seres humanos con o sin diabetes.

c) Mejora síntomas de diabetes, hiperlipidemia, hipercolesterolemia e hipoaldeponectinemia. Se ha mostrado que la ingestión consecutiva la infusión de las hojas de guayaba en cada alimento mejora no solo la hipercolesterolemia sino también hipoaldeponectinemia y la hiperlipidemia en pacientes diabéticos y prediabéticos, con o sin hiperlipidemia. Otro efecto observado es la disminución de los niveles de colesterol en sangre en sujetos con hipercolesterolemia o al borde de la hipercolesterolemia (Chin-Shiu *et al.*, 2011).

2.2.2.6. Actividad antioxidante.

El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de radicales libres excede la capacidad antioxidante de la célula. La mayoría de los radicales libres son especies reactivas de oxígeno como el hidroxilo, el anión superóxido, o el peróxido de hidrógeno, que puede causar un daño crucial en compuestos celulares como carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN (Marquina, *et al.*, 2010). Algunas enfermedades como Diabetes mellitus promueven el estrés oxidativo. El fruto y las hojas de *Psidium guajava* han sido descritos como una importante fuente de antioxidantes. Gutiérrez y colaboradores (2008) atribuyen la capacidad antioxidante de las hojas de *Psidium guajava* a los compuestos fenólicos que contienen ya que poseen alto grado de captación de radicales libres





2.2.2.7. Otras actividades

En la Tabla 6 se indican otras actividades atribuidas a los extractos de las hojas de *Psidium guajava*.

Tabla 6. Actividades de diferentes extractos de las hojas de *Psidium guajava*.

Actividad	Extracto		Referencias
Antifúngica	Acuoso	Contra <i>Arthrinium sacchari</i> M001 y <i>Chaetomium funicola</i> M002	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Cardioprotectora y sobre la presión arterial	Acuoso	La actividad cardioprotectora se atribuye al flavonoide quercetina y al ácido gálico. Estudios previos demostraron que la administración intraperitoneal del extracto de hojas de guayaba reduce de forma significativa la presión arterial en ratas sin afectar el ritmo cardiaco a través de la inhibición de la liberación de calcio intracelular.	(Metwally <i>et al.</i> , 2011; García-Conde <i>et al.</i> , 2003)
Antiinflamatoria	Aceite esencial y extractos acuoso, alcohólico, metanólico y de acetato de etilo	Se le atribuye a los sesquiterpenos presentes en hojas de guayaba.	(Ojewole, 2006)
Antimutagénica	Acuoso y metanólico	La (+)-galocatequina aislada de hojas de guayaba presenta actividad antimutagénica en contra mutaciones inducidas por UV en <i>E. coli</i> .	(Formica <i>et al.</i> , 1995; Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Inhibición de transcriptasa reversa retroviral	Metanólico	El extracto de las hojas de guayaba inhibe un 61% a la enzima transcriptasa reversa retroviral a una concentración de 125 µg/mL.	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)
Depresora del sistema nervioso central	Acuoso y aceite esencial	El óxido de cariofileno y β-selineno potencian el efecto de fenobarbital en el tiempo de sueño en ratones. Producen un efecto tranquilizante moderado.	(Metwally <i>et al.</i> , 2011)





Tabla 6. Actividades de diferentes extractos de las hojas de *Psidium guajava*. (Continuación).

Actividad	Extracto	Referencias
Antinocioceptiva/ analgésica	Acuoso y metanólico	Posee actividad antinocioceptiva dependiente de la dosis y se atribuye efecto antipirético al extracto metanólico así como actividad analgésica a la infusión acuosa. (Ojewole, 2006)
En lesiones gástricas	Acuoso	Ha demostrado efecto inhibitorio de la secreción de ácido en modelo de úlcera gástrica inducido por aspirina (Metwally <i>et al.</i> , 2011)





CAPÍTULO III

3. Justificación y objetivos.

En la actualidad, alrededor del 80% de la población mundial depende del uso plantas medicinales como alternativa terapéutica en múltiples padecimientos. *Psidium guajava* es una especie vegetal que ha sido estudiada durante años y se le han atribuido actividades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, entre otras. Los estudios realizados utilizando como materia prima las hojas de la guayaba han permitido el aislamiento de metabolitos activos y corroboran algunas de los usos tradicionales de las hojas de la guayaba. Uno los usos que se reportan con mayor frecuencia es para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral asociadas a bacterias patógenas. Sin embargo, los estudios conducentes a determinar la eficacia de las infusiones o extractos orgánicos sobre la formación de las biocapas por la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* son escasos. En este sentido es importante mencionar que la formación de las biocapas por bacterias orales es un importante factor en el desarrollo de la caries. El objetivo general es estudiar el efecto del extracto etanólico de *Psidium guajava* sobre la formación de la biocapa monoespecie por *S. mutans*.

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

- i. Aislar y purificar los compuestos mayoritarios a partir del extracto etanólico de la especie *Psidium guajava* utilizando métodos cromatográficos y de partición.
- ii. Evaluar la actividad de los compuestos mayoritarios, así como los compuestos aislados, de la especie vegetal *Psidium guajava* sobre la formación de biocapa la bacteria cariogénica *S. mutans*.
- iii. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.





CAPÍTULO IV

4. Parte experimental.

4.1. Procedimientos generales.

4.1.1. Análisis cromatográficos.

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas TLC recubiertas con sílica gel (60 F₂₅₄, Merck) de diversas dimensiones. Se visualizaron bajo luz UV (λ corta, 254nm y λ larga, 365nm) y posteriormente reveladas con vainillina sulfúrica 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta visualización completa de los compuestos.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice desactivada con sistema de elución de polaridad creciente. La cromatografía en columna en fase reversa (C18) se realizó utilizando una columna de mediana presión (3.5 x 35.0 cm) y una bomba de mediana presión a un flujo de 1 mL/min.

4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

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





4.1.3. Material vegetal

Las hojas de *Psidium guajava* se recolectaron en una huerta ubicada en Uruapan, Michoacán. Una muestra de referencia se guarda en el Laboratorio 111, del Conjunto E de la Facultad de Química.

4.1.4. Ensayos biológicos

4.1.4.1. Microorganismo de prueba

Para poder determinar la actividad del extracto, fracciones y compuestos aislados de las hojas de *Psidium guajava* sobre la formación de biocapa se realizó el ensayo biológico utilizando como microorganismo de prueba a la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*. El medio que se utilizó para el crecimiento fue caldo de infusión cerebro corazón (BHI). La metodología utilizada siguió las recomendaciones del NCLS.

4.1.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la actividad antibacteriana se llevó a cabo un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Los cultivos de cada microorganismo fueron incubados durante 24 horas a 37 °C, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, se llevaron dos veces con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. Cada pozo contenía 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado (BHI). Las muestras se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba utilizando los diferentes controles como se muestra en la Tabla 7. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.





Tabla 7. Controles utilizados durante el ensayo biológico.

	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	con inóculo	–	37°C
Blanco	Sin inóculo	–	37°C
Control positivo	Gluconato de clorhexidina(CHX)		37°C

– : sin compuesto de prueba

El microorganismo *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660nm}) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas de Elisa.

El valor de CMI para el microorganismo analizado se definió como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de $0.05 A_{660nm}$. Utilizando como control positivo gluconato de clorhexidina.

4.1.4.3. Inhibición de la formación de biocapa de *Streptococcus mutans*.

Para realizar la determinación del efecto de los extractos o sustancias de prueba se siguió la metodología descrita por Hwang y colaboradores (2006). A continuación se describe brevemente el procedimiento realizado, en primer lugar, se acondicionaron placas de 96 pozos con 200 μ L de saliva artificial (1% mucina en PBS). Posteriormente, se secaron al aire y se adicionaron 75 μ L de BHI (3% sacarosa) y 25 μ L de suspensión celular 1×10^8 UFC/mL (*S. mutans* con una edad de 24 horas), 50 μ L de cada fracción o compuesto (2mg/mL). Las placas se incubaron en condiciones aerobias a 37°C por 72 horas. Posteriormente, la formación de las biocapas se cuantificó mediante el método de cristal violeta siguiendo la metodología descrita por Hwang y Rukayadi (2006). Brevemente, las placas incubadas por 72 horas a 37°C, se lavaron dos veces con agua desionizada, con la finalidad de eliminar las bacterias que no se adhirieron; posteriormente, se eliminó el agua y se agregó etanol a cada pozo, con el propósito de fijar a las bacterias que si se adhirieron; se dejaron secar y posteriormente a cada pozo se le adicionaron 200 μ L de cristal violeta 0.4%, para teñir las bacterias adheridas y se dejó reposar durante 45 minutos; una vez transcurrido el tiempo, se lavó nuevamente con agua desionizada e





inmediatamente se añadieron 200 μ L de etanol al 95%, para decolorarlas; después de 45 minutos, 100 μ L de cada pozo se transfirieron a una placa para leer su absorbencia a 540nm en un lector de placas de 96 pozos. Se utilizó como control positivo gluconato de clorhexidina y como control negativo con inóculo y sin tratamiento.

Se considera que el 100% de adhesión corresponde a la absorbencia de los carriles que no fueron tratados con ningún compuesto y en base a ese resultado se calcularon los porcentajes de cada compuesto.

4.1.5. Estudio químico de las hojas de *Psidium guajava*

4.1.5.1. Preparación del extracto etanólico.

El extracto de las hojas se preparó a partir de 539g de hojas secas y molidas de *Psidium guajava* utilizando como disolvente 5 L de etanol al 96%. El disolvente se dejó en contacto con el material vegetal por un período de 72 horas y posteriormente, se filtró y concentró al vacío con ayuda de un rotaevaporador.

4.1.5.2. Fraccionamiento primario.

El extracto seco se sometió a un fraccionamiento primario utilizando el método de partición líquido-líquido y metanol al 90% y hexano en proporción 1:1 como disolventes. En la Tabla 8 se resume el proceso de fraccionamiento y los pesos obtenidos para cada una de las fracciones primarias.

Tabla 8. Fracciones primarias obtenidas.

Fracción	Peso (gramos)
Fracción metanol acuoso (FI)	52.3 g
Fracción de hexano (FII)	70.4 g





4.1.5.3. Fraccionamiento secundario.

La fracción FI (50g) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una columna abierta, gel de sílice como adsorbente y como fases móviles mezclas de acetato de etilo:metanol con un gradiente de polaridad. Este proceso permitió la obtención de 27 fracciones secundarias, las cuales se combinaron utilizando como criterio su similitud cromatográfica para obtener 8 fracciones secundarias (A-H).

Tabla 9. Resumen del fraccionamiento secundario.

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
AcOEt	1	A	3.1499
AcOEt:MeOH 95:5	2-6	B	11
AcOEt:MeOH 90:10	7	C	0.2818
AcOEt:MeOH 85:15	8	D	2.5703
AcOEt:MeOH 85:15	9-10	E	1.194
AcOEt:MeOH 80:20	11-14	F	7.4557
AcOEt:MeOH 70:30	15-21	G	8.0012
AcOEt:MeOH 50:50 y MeOH puro	22-27	H	4.4168

4.1.5.4. Fraccionamiento terciario.

La fracción B sometió nuevamente a cromatografía pero ahora en una columna de fase reversa utilizando como eluyente agua:metanol (1:0 → 0:1) y un flujo de 1.5 mL/min. El proceso permitió la obtención de 47 fracciones. Estas fracciones fueron reunidas según su similitud cromatográfica en 8 fracciones terciarias.





Tabla 10. Resumen del fraccionamiento terciario.

Sistema de elución	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
MeOH:H ₂ O 50:50	1-5	B1	0.1260
MeOH:H ₂ O 55:45	6-9	B2	0.0300
MeOH:H ₂ O 60:40	10	B3	0.0630
MeOH:H ₂ O 70:30	11-13	B4	0.2267
MeOH:H ₂ O 75:25	14-18	B5	0.0350
MeOH:H ₂ O 80:20	19-24	B6	0.0253
MeOH:H ₂ O 90:10	25-30	B7	0.4462
MeOH 100	31-47	B8	0.0719

4.1.5.5. Fraccionamiento cuaternario.

Una porción de 1.227g de la fracción B7 se resolvió sobre una columna de fase reversa utilizando como fase móvil metanol:agua (1:1). El proceso permitió la obtención de 32 fracciones. Estas fracciones fueron reunidas según su similitud cromatográfica en 3 fracciones cuaternarias.

4.1.6. Obtención de avicularina a partir de la fracción activa B4

A partir de la fracción B4 precipitó un sólido amarillo el cual fue separado mediante filtración al vacío, con un rendimiento del 28.5%. **Avicularina (1):** RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.53 (1H, d, *J*= 2.4 Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, *J*= 8.4, 2.4 Hz, H-6'), 6.95 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.20 (1H, d, *J*=2 Hz, H-8), 5.50 (1H, sa, H-1'), 3.49-4.34 (5H, m, pentosa). RMN ¹³C (100 MHz): δ 178.6 (C-4), 164.6 (C-7), 161.6 (C-5), 157.9 (C-9), 157.1 (C-2), 148.4 (C-4'), 144.9





(C-3'), 133.5 (C-3), 121.7 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-2'), 108.1 (C-1'), 104.2 (C-10), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8), 86.6(C-4'), 81.9 (C-2'), 77.3 (C-3'), 61.1 (C-5').

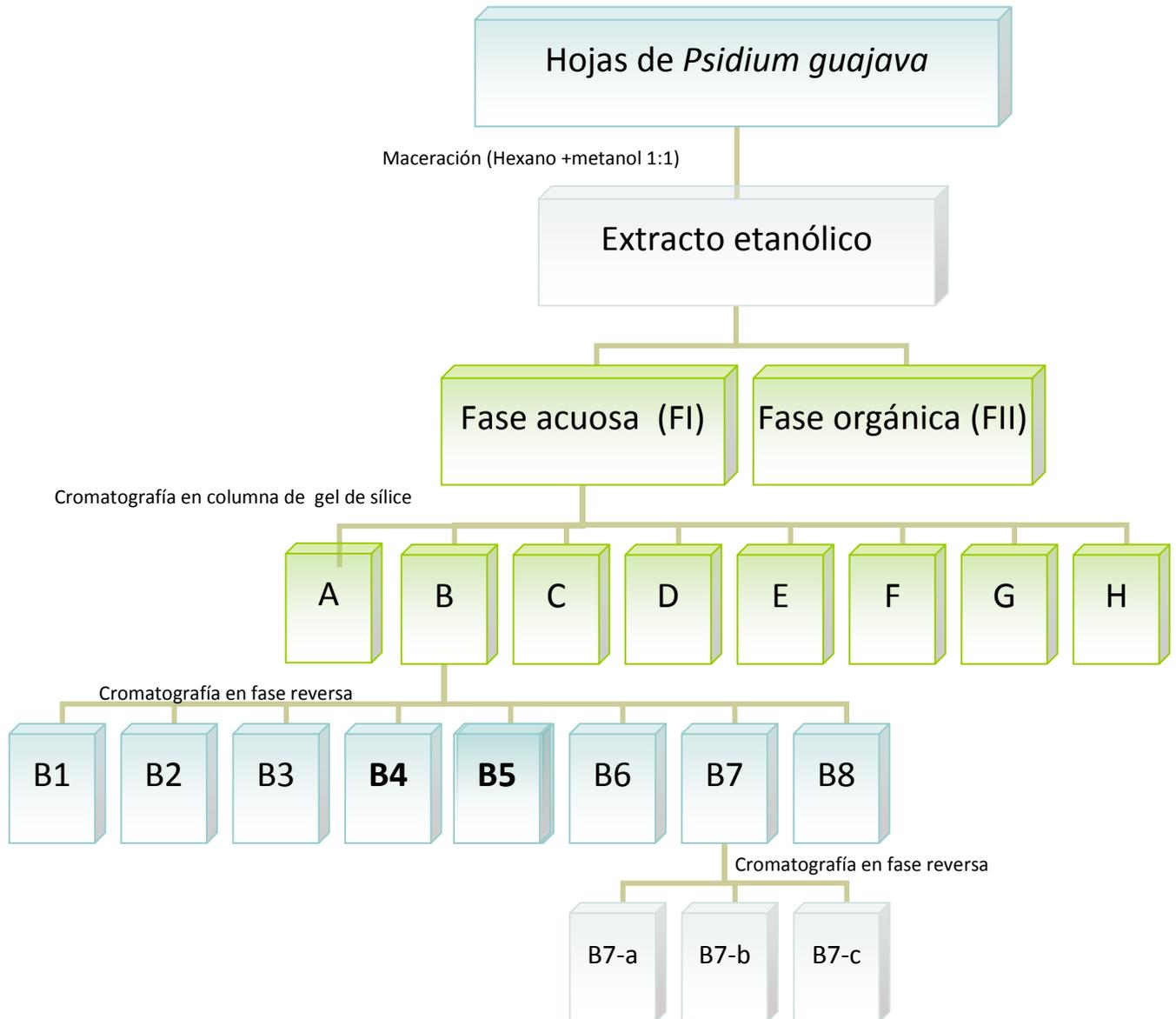
4.1.7. Obtención de quercetina a partir de la fracción B5

En la fracción B5 se observó un precipitado amarillo el cual se separó mediante filtración al vacío con un rendimiento del 2.5%. El sólido fue identificado como quercetina por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con los reportados previamente en la literatura (Waver y Zielinzka, 2001).





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





CAPÍTULO V

5. Resultados y discusión.

La preselección de la especie *Psidium guajava* se realizó con base a su uso en medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos de origen infeccioso, entre ellos los de la cavidad oral. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Sandoval, 2010) y reportes encontrados en la literatura (Prabu *et al.*, 2005) de ésta especie, indican que su extracto acuoso de las hojas de guayaba inhibe el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans* y *Phorphyromonas gingivalis* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en un rango de 125 a 1000 μ g/mL. Sin embargo, no se han realizado estudios conducentes a determinar el efecto de estos extractos sobre la formación de las biocapas monoespecie formadas por esta bacteria cariogénica. Los ensayos biológicos preliminares de selección permitieron establecer que el extracto etanólico de las hojas de *P.guajava* inhibía la formación de biocapa de *Streptococcus mutans* en un 61.3%. Con base en estas consideraciones se eligieron las hojas de la guayaba como candidato para evaluar su efecto en la biocapa formada por dicha bacteria.

5.1 Inhibición de formación de biocapas monoespecie por la bacteria *S. mutans*.

La determinación del efecto sobre la formación de las biocapas monoespecie por *S. mutans* se realizó siguiendo la metodología descrita por Hwang y Rukayadi (2006). En este método se considera como 100% de adhesión la medida de la absorbancia del carril sin tratamiento y con base a este resultado se calcula el porcentaje de adhesión para las sustancias de prueba. Por último, es importante mencionar que para calcular la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la formación de las biocapas se consideró que el 100% de adhesión corresponde a 0% de actividad inhibitoria.





Los ensayos iniciales incluyeron al extracto acuoso, las fracciones resultantes de la cromatografía en columna abierta con sílica y como control positivo el gluconato de clorhexidina. Los resultados obtenidos indicaron que la fracción II era la que presentaba la mejor actividad.

La fracción II se cromatógrafió en columna cerrada (3.5 × 35 cm) como adsorbente sílica gel C-18 y como eluyente metanol (Diagrama 1, parte experimental), obteniendo 8 fracciones. Las fracciones obtenidas del fraccionamiento secundario (B1-B8) se evaluaron utilizando la metodología descrita en el inciso 4.1.4.3. Como se puede observar en la Tabla 10, las fracciones B5 y B7 fueron las que presentaron la mejor actividad con una inhibición de 78.26 y 82.10%, respectivamente y la fracción B4 tuvo actividad similar a la avicularina control. En la Tabla 11 se resumen las fracciones obtenidas y los resultados de la inhibición de formación de la biocapa por *S. mutans*.

Tabla 11. Actividad inhibitoria de formación de las biocapas de las fracciones B1-B8.

Muestra	% actividad inhibitoria
Avicularina (2.0 mg/mL)	74.13
Gluconato de clorhexidina (0.012%)	95.24
Infusión de las hojas de guayaba	61.3
II	73.76
B1	61.74
B2	65.29
B3	77.99
B4	74.10
B5	78.26
B6	73.55
B7	82.10
B8	63.36





5.2 Aislamiento de la avicularina a partir de la fracción B4.

A partir de la fracción (fracción activa) precipitó un sólido amorfo color amarillo, purificando el compuesto mayoritario mediante CCFP utilizando un sistema de elución AcOEt/ ácido fórmico/H₂O (8:1:1). Este proceso permitió obtener el flavonoide avicularina como compuesto activo, e identificarlo por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Pistelli *et al.*, 1992). En la Figura 3 se muestra el espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina y en la Figura 4 los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (a) y de carbono trece (b).

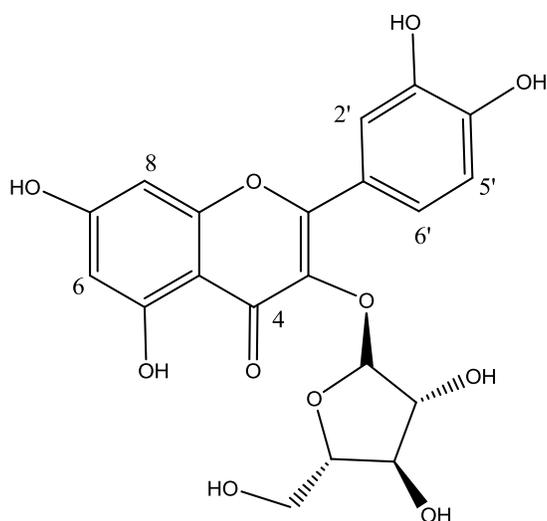


Figura 2. Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba



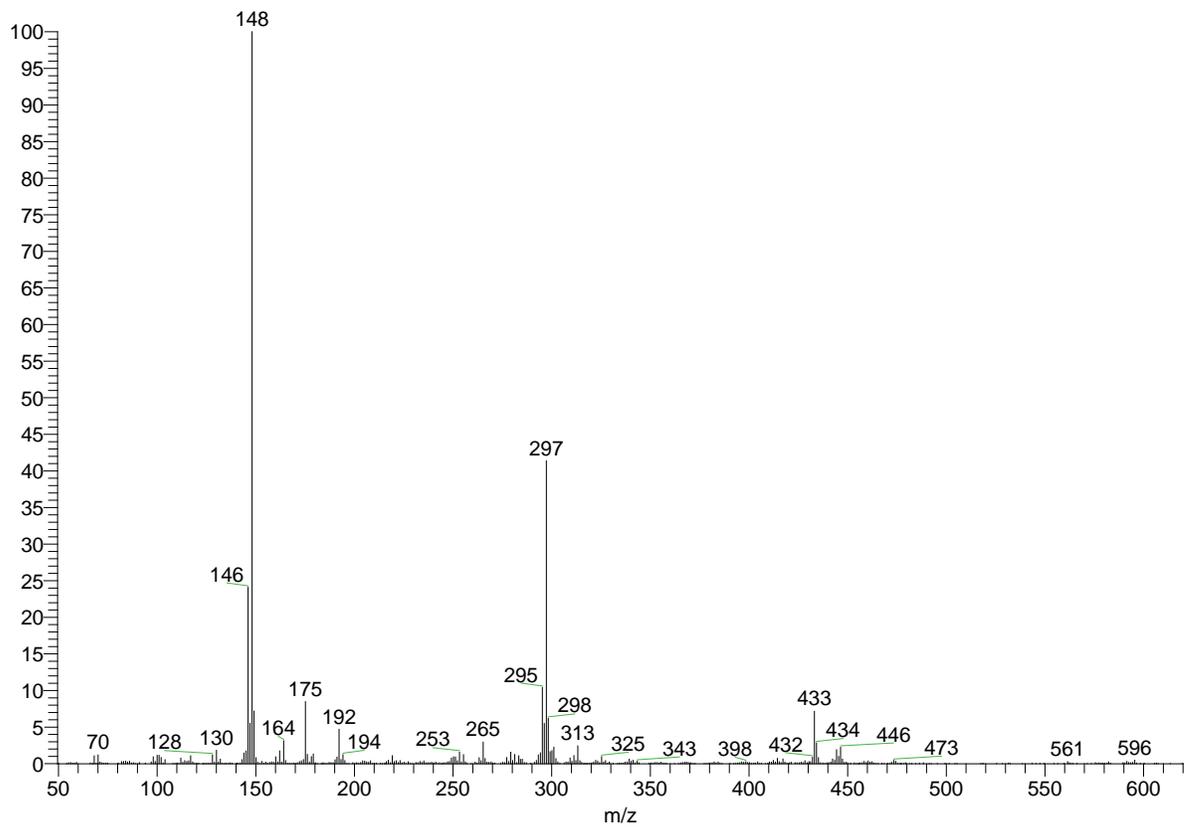


Figura 3. Espectro de masas FAB modo negativo de la avicularina



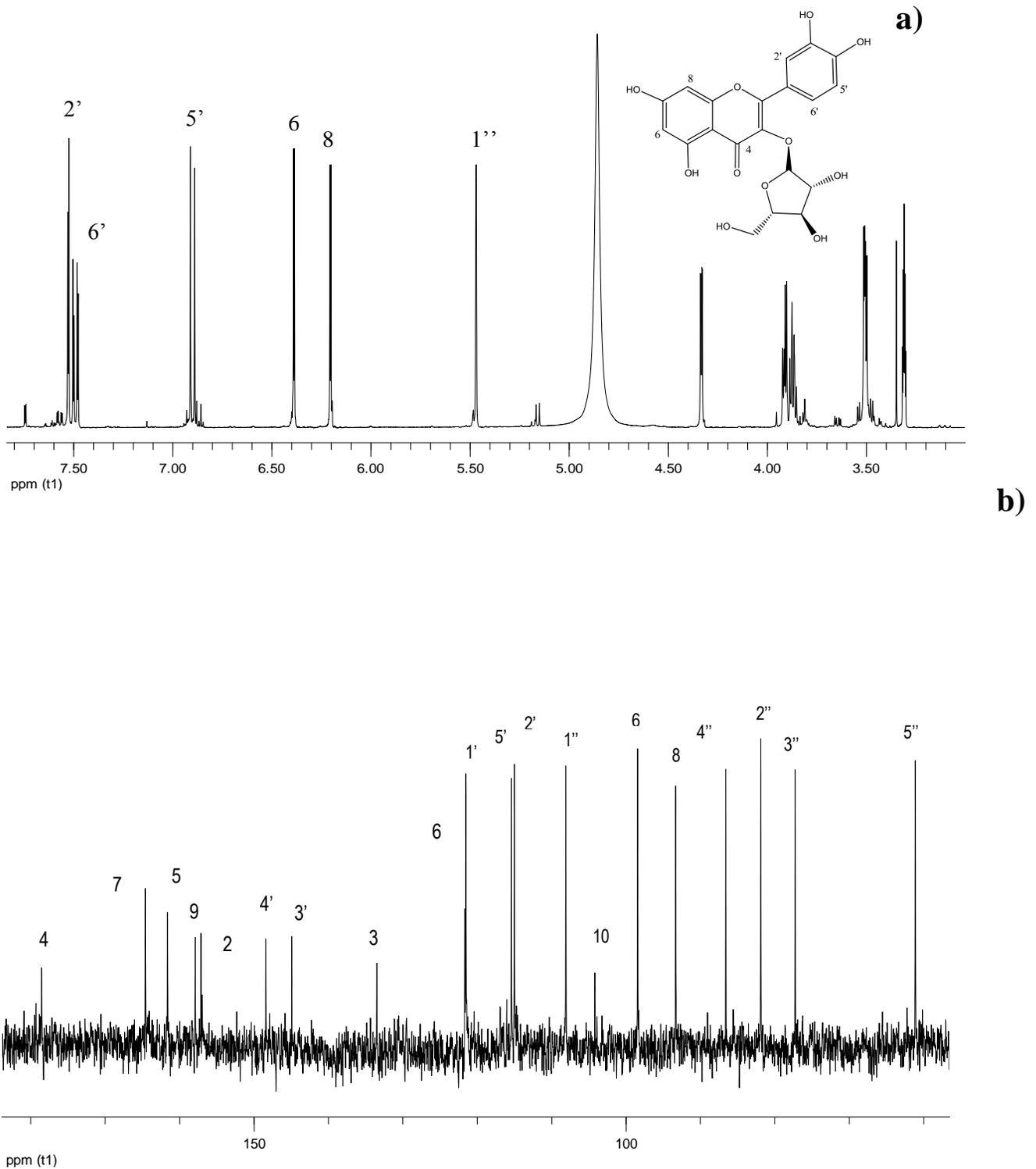


Figura 4. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (a) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (b) obtenidos para la avicularina.





5.3 Efecto de la avicularina y la quercetina sobre la formación de la biocapa mono especie por *S. mutans*.

El efecto de los flavonoides avicularina y quercetina sobre la formación de la biocapa mono especie se realizó siguiendo la misma metodología que se describe en la sección 4.1.4.3. Los resultados obtenidos indican que la avicularina inhibió un 74.13% la formación de la biocapa mono especie a una concentración de 2 mg/mL, mientras que el flavonoide quercetina la inhibió un 78.26% a una concentración de 4 mg/mL. Al comparar la actividad antibacteriana de la avicularina con la obtenida para el control positivo gluconato de clorhexidina, podemos apreciar que presentan una actividad similar (Tabla 11). Los resultados obtenidos sobre la inhibición de la biocapa por el flavonoide avicularina son similares a los descritos por Prabu y colaboradores (2005) para el flavonoide guaijaverina.





CAPÍTULO VI

6.1 Resumen y Conclusiones

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto obtenido de las hojas *Psidium guajava* permitió el aislamiento y caracterización de los flavonoides mayoritarios identificados como avicularina y quercetina como componentes activos.

En el presente trabajo, se determinó la actividad de los flavonoides aislados contra la formación de biocapa de la bacteria cariogénica *S. mutans*, ya que la formación de dicha biocapa es un paso previo importante para el desarrollo de la caries.

El extracto etanólico de las hojas de guayaba, sus fracciones y componentes mayoritarios poseen efecto inhibitorio sobre la formación de la biocapa mono especie de *S. mutans*; siendo las fracciones I y II, así como los compuestos avicularina y quercetina, los de mayor actividad. El porcentaje de inhibición de biocapa que presentaron los flavonoides avicularina y quercetina fueron de 74.10% y 78.26%, respectivamente.





CAPÍTULO VII

7. Perspectivas

- ✓ Continuar con el estudio químico de las fracciones cuaternarias con la finalidad de aislar los compuestos minoritarios presentes.
- ✓ Determinar la actividad de los compuestos aislados sobre la formación de biocapa monoespecie por *S. mutans*.
- ✓ Establecer el efecto de los extractos derivados de hojas de *Psidium guajava* y los compuestos aislados sobre enzimas glucosiltransferasas de *S.mutans*.





CAPÍTULO VIII

Referencias

- ✓ Abreu, P., Almeida M., Bernardo R., Bernardo L., Brito L., García E., Fonseca A., Bernardo F. (2007). Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with Technetium-99*. *Journal of Zhejiang University*, 7(6), 429-435.
- ✓ Aguilar, A., Argueta, A., Cano, (1994). Flora medicinal indígena de México. *Instituto Nacional Indigenista*, México.
- ✓ Arima, H., Danoo, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66, 1727-1730.
- ✓ Begum, S., Hassan, S., Siddiqui, B., Shaheen, Nabel, M., Gilani, A. (2002). Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*, 61(4), 399-403.
- ✓ Begum, S., Hassan, S., Ali, S., Siddiqui, B. (2004). Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Natural Product Research*, 18(2), 135-140.
- ✓ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). Recuperado en 8 enero 2012. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7651>
- ✓ Chin-Shiu Huang, Mei-Chin Yin, Lan, Chi Chiu. (2001). Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 2189-2195.
- ✓ Da Silva-Leitao, D., Da Silva-Filho, A., Morseli-Polizello, A., Bastos, J., Cropanese-Spadaro, A. (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.





-
- ✓ De la Fuente, H. G., Gonáles de Cossio, M., Ortega, M. (2008). Caries y pérdida dental en los estudiantes preuniversitarios mexicanos. *Medigraphic*, 50(3), 235-340.
 - ✓ Deng, D., Hoogenkamp, M., Exterkate, R., Jiang, L., van der Sluis, L., Cate, J., Crielaard, W. (2009). Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation *JOE*, 35(9), 1249-1252.
 - ✓ Desphande, S., Kadam, D., Ingle, S. (2012). Studies on determination of susceptibility to dental caries among school children. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(2), 809-817.
 - ✓ Dong, L., Tong, Z., Linhu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., (2012). Effects of sub minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39(5), 390-5.
 - ✓ Formica, J., Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
 - ✓ Guillaume, G., etMarc, N., Lavoie C. (2011). *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Rev. Can. Microbiol*, 57, 1-20.
 - ✓ Gutierrez, R.M., Mitchell, S., Solis, R.V. (2008). *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 117, 1-27.
 - ✓ Henostroza, G. (2005). Diagnóstico de Caries Dental. Universiad Peruana Cayetano Heredia, *Facultad de Estomatología*, 11-27.
 - ✓ Hwang, K., Rukayadi, Y. (2006). In vitro activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 400-404.
 - ✓ Jaiari, P., Khoohaswan, P., WongkraJang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, M. Anti-cough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract. (1999). *Journal of Ethnopharmacology*. 67, 203-212
 - ✓ Jan R. van der Ploeg (2005). Regulation of Bacteriocin Production in *Streptococcus mutans* by the Quorum-Sensing System Required for





Development of Genetic Competence. *Journal of Bacteriology*. 187(12), 3980–3989.

- ✓ Jass, J., Surman, S., Waker J. (2003). Biofilms Detection, Prevention and Control. Editorial Willey. Primer edición. pp 202-326.
- ✓ Jayakumari, S., Anbu, J., Ravichandiran, V., Nithya, S., Anjana, A., Sudharani, D. (2012). Evaluation of toothache activity of methanol extract and its various fractions from the leaves of *Psidium guajava* Linn. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3 (2), 238-249.
- ✓ Kaneria, M., Chanda, S. (2011). Phytochemical and pharmacognostic evaluation from leaves of *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*). *Pharmacognosy Journal*, 3(23), 41-45.
- ✓ Kentaro, O., Nobuhiro, H., Yoshie, U., Hiroaki, T., Hidehiko, K., Ryoma, N., Haruo W., Hidenobu, S. (2010). Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation using analogues of the SspB peptide. Elsevier. *Archives of oral biology*, 5(5), 754-762.
- ✓ Lozoya, X., Reyes-Morales, H., Chávez-Soto M., Martínez-García, M., Soto-González, Y., Doubova, S. (2002). Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. *Journal of ethnopharmacology*. 83 (1-2), 19-24.
- ✓ Marquina, V., Araujo, L., Ruiz, J., Rodríguez-Malacer, A. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.) *Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela*, 58,98-102.
- ✓ Martínez Flores, S., González Gallegos, J., Culebras, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 16 (6), 271-278.
- ✓ Micheli, A., Izzaguirre, A.R. (2009). De la herbolaria medicinal novohispana a los inicios de estudios botánico-farmacológicos sistematizados (bosquejo histórico). *Arch Cardiol. Mex*. 79 (2), 95-101.





-
- ✓ Metwally A., Omar A., Ghazy N., Harraz F., El Sohafy S. (2011). Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*, 3 (21), 89-104.
 - ✓ Moynihan, P. (2005). The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), 694-698.
 - ✓ Nantitanon Witayapan, Okonogi Siriporn. (2012). Comparison of antioxidant activity of compounds isolated from guava leaves and stability study of the most active compound. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(1):38-43.
 - ✓ Ojewole JAO. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. (2006). *Methods Find Exp Clin Pharmacology.*, 28(7), 441-6.
 - ✓ Park, B., Matsuta, T., Kanazawa, T., Chang, K., Park, C., Onjo, M. (2011). Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava*. 1. Hidrolisable tannins and benzophenone glycosides. *Chemistry of natural compounds*, 47(4), 632-635.
 - ✓ Pérez-Gutiérrez, R.M., Mitchel, S., Vargas-Solis, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its uses phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 1-27.
 - ✓ Prabu, G., Gnanamani, A., Sadula S. (2005). Gujaverin- a plant flavonoid as potential antiplaquet agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Microbiology*, 487-495.
 - ✓ Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2007). Short report: Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. *In Fitoterapia* 78(6):434-436.
 - ✓ Rasak, F., Othman, R., y Abd Rahim, Z. (2006). The effect of Piper betle and *Psidium guajava* on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science*, 48, 71-75.
 - ✓ Roushdy, M. (2009). Association of dental caries. *Streptococcus mutans* Counts and Secretory IgA with Tobacco Smooking. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (4), 3224-3229.





-
- ✓ Sandoval Gutiérrez, 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. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ✓ Selwitz, R., Ismail, A., Pitts, N. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369 (9555), 1–59
 - ✓ Taechowisan, T., Sitthipanya, A., Wanbanjob, A., Tantiwachwuttikul, P. (2008). Inhibitory effect of endophytic *Streptomyces sp.* ST8 on the growth, adherence and glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological Sciences*, 8(1), 43-51.
 - ✓ Thomson, S., Ashok, Arunima, S.K. (2012). Screening of *Psidium guajava* for effective phytomedicines and study on its antibacterial effect against dental caries bacteria. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 400-401.
 - ✓ Waixel, H., Waixel, B. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinolaringología Mexican*, 54(4), 145-71.
 - ✓ Waver, I., Zielinska, A. (2001). ¹³C cp/mas NMR Studies of flavonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 39, 374-380.

