



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

REESTUDIO QUÍMICO DE *Bursera simaruba* (L) Sarg.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GERALDINE VERENICE NICASIO GARNICA



México D. F.

2015



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:	María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	José Fausto Rivero Cruz
Secretario:	Mabel Clara Fragoso Serrano
1er. suplente:	Mario Alberto Figueroa Saldívar
2do. suplente:	Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor del tema

Geraldine Verenice Nicasio Garnica

Sustentante

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCION.	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1 <i>Bursera simaruba</i>	3
2.1.1 Generalidades y distribución.	3
2.1.2 Sinonimia.....	4
2.1.3 Clasificación científica.....	5
2.1.4 Botánica.	5
2.1.5 Propiedades medicinales de <i>B. simaruba</i>	6
2.2 Copal.	9
2.2.1 Definición y generalidades.	9
2.2.2 Usos.	9
2.3 Resina.....	10
2.3.1 Definición y generalidades.	10
2.3.2 Composición química.	11
2.3.3 Importancia ecológica.....	11
2.3.4 Obtención.	12
2.3.5 Usos	12
2.3.6 Importancia comercial	12
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.4.1 Generalidades.	13
2.4.2 Género <i>Streptococcus</i>	14
2.4.3 Generalidades del grupo	15
2.5 Biofilm dental o placa dental.....	17
2.5.1 Definición y generalidades.	17
2.5.2 Estructura del biofilm.....	19
2.5.3 Características del biofilm.	20
2.6 Caries dental.	22
2.6.1 Definición y generalidades.	22
2.6.2 Factores de riesgo en la producción de la caries dental.....	22
2.7 Microorganismos de la cavidad oral.	23
2.8 Agentes antimicrobianos.	24
2.8.1 Definición y generalidades.	24
3. JUSTIFICACIÓN.	25
4. OBJETIVOS	26
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
5.1 Procedimientos generales.	27
5.1.2 Análisis cromatográficos.....	27

INDICE

5.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	27
5.2 Material Vegetal.....	28
5.3 Estudio químico de la resina de <i>B. simaruba</i>	28
5.3.1 Proceso de extracción de la resina de <i>B. simaruba</i>	28
5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto total obtenido a partir de la resina de <i>B. simaruba</i>	28
5.3.3 Fraccionamiento secundario de la resina.....	30
5.3.3.1 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción F3.....	30
5.3.3.2 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción F4.....	31
5.3.3.3 Obtención y purificación de la lupenona a partir de la fracción C6.....	32
5.3.3.4 Obtención y purificación del lupeol a partir de la fracción C8.....	32
5.3.3.5 Obtención de la mezcla de α - y β - amirina.....	33
5.4. Ensayo biológico.....	33
5.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	33
5.4.2 Procedimiento general del ensayo.....	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1 Aislamiento de la lupenona y el lupeol.....	38
6.2 Aislamiento de la mezcla de α - y β - amirinas.....	38
6.3. Determinación del efecto de los compuestos 1 , 2 y (3+4) sobre el crecimiento de <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>S. oralis</i>	39
7. CONCLUSIONES.....	41
8. PERSPECTIVAS.....	42
9. BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
°C	Grados centígrados
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroforno deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
MeOH	Metanol
g	Gramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
UV	Ultravioleta
mg	Microgramos
μL	Microlitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
eV	Electronvoltio
BHI	Caldo de la infusión cerebro-corazón
m	Metro
CHCl ₃	Cloroforno
AgNO ₃	Nitrato de plata
rpm	revoluciones por minuto

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
M	Molar
UFC	Unidades formadoras de colonias
SC	Sin compuesto
TMS	Tetrametilsilano
O ₂	Oxígeno
CO ₂	Dióxido de carbono
Ca ²⁺	Calcio
PO ₄ ³⁻	Fosfato
OH ⁻	Grupo hidroxilo
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute

LISTA DE CUADROS

Número de cuadro	Nombre	Pág.
1	Clasificación científica de <i>Bursera simaruba</i>	5
2	Usos terapéuticos y medicinales reportados para <i>B. simaruba</i>	6
3	Estreptococos <i>viridans</i>	16
4	Clasificación científica del grupo <i>viridans</i>	17
5	Fraccionamiento primario de la resina de <i>Bursera simaruba</i> .	30
6	Fraccionamiento secundario de la resina de <i>B. simaruba</i> a partir de la fracción F3	31
7	Fraccionamiento secundario de la resina de <i>B. simaruba</i> a partir de la fracción F4.	32

LISTA DE CUADROS (continuación)

Número de cuadro	Nombre	Pág.
8	Controles para el ensayo biológico.	36
9	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de los compuestos aislados de la resina sobre las bacterias de la cavidad oral.	41

LISTA DE FIGURAS

Número de figura	Nombre	Página
1	Distribución natural de <i>Bursera simaruba</i> , en América tropical.	4
2	<i>Bursera simaruba</i> .	6
3	Resina de <i>Bursera simaruba</i> .	18
4	Etapas de la formación del biofilm dental.	18
5	Lupenona, lupeol, α y β amirinas	40

1. INTRODUCCION.

El conocimiento de las plantas medicinales es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento de estas especies después de distinguir entre las que servían para comer y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, por lo que a partir de esto empezaron a diferenciarlas y seleccionarlás (Santillán, 2012).

Actualmente en México, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global (Santillán, 2012).

En México se estima que existen cerca de 3,103 especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional mexicana, de las cuales casi un tercio (1,024) son empleadas para tratar malestares del tracto digestivo, 473 especies para padecimientos estomacales, 247 para enfermedades respiratorias y 277 para enfermedades cutáneas (Argueta *et al.*, 1994; Aguilar *et al.*, 1994; Kakuko *et al.*, 2005). Datos de la Organización Mundial de la Salud señalan que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica (OMS, 2011)

Las especies de *Bursera* son de importancia en la medicina tradicional, y varios de ellos tienen usos domésticos en la región central de México. Algunas especies tienen aplicaciones etnomédicas contra la diarrea, la fiebre, la gingivitis, la tos y el sarampión (Yasunaka *et al.*, 2005; Hernández-Hernández *et al.*, 2005). Estudios químicos sobre este género han demostrado la presencia de derivados bioactivos, lignanos que fueron aislados de *Bursera ariensis* (Hernández *et al.*, 1983; Xia *et al.*, 2009), *Bursera graveolens* (Nakanishi *et al.*, 2005), *Bursera microphylla*

INTRODUCCIÓN

(Cole *et al.*, 1969), *Bursera permollis* (Wickramaratne *et al.*, 1995), y *Bursera simaruba* (Peraza y Peña, 1992).

Los resultados derivados del trabajo de investigación consistieron en aislar los compuestos mayoritarios de la resina de *Bursera simaruba* e identificarlos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los compuestos fueron evaluados biológicamente para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

2. ANTECEDENTES.

2.1 *Bursera simaruba*.

2.1.1 Generalidades y distribución.

Bursera agrupa más de un centenar de especies de plantas leñosas, cuya distribución se restringe al continente americano (figura 1), en particular a la mitad septentrional de su porción intertropical, pues se extiende desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos (Rzedowski, 2004).

Su centro de diversidad se localiza en México, de donde se conocen unas 80 especies claramente definidas, el total real del grupo en nuestro país posiblemente sobrepase las 100 entidades. Los representantes de *Bursera* son mayoritariamente árboles, de hoja decidua, que constituye un elemento característico y no pocas veces dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1800 m. Solamente la especie, *B. simaruba*, llega a ser componente de ambientes más húmedos y puede prosperar en bosques tropicales subcaducifolios y perennifolios. Dadas estas afinidades ecológicas, la mayor diversidad de las especies mexicanas de *Bursera* se establece en la vertiente del Pacífico de la República Mexicana (Rzedowski, 2004).

ANTECEDENTES



Figura 1. Distribución natural de *Bursera simaruba* en América Tropical (Francis, 1999).

2.1.2 Sinonimia.

Sinonimia botánica: *Bursera bonairensis* Bolding; *Bursera gummífera* (L.); *Bursera integerrima* (Tul.) Triana & Planch.; *Bursera ovalifolia* (Schltdl.) Engl; *Bursera subpubescens* (Rose) Engl; *Elaphrium simaruba* (L.) Rose; *Elaphrium subpubescens* Rose; *Pistacia simaruba* L.; *Tapiria macrophylla* Lundell (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2013).

Sinonimia popular mexicana: Chacá, copal, cuahuilote, cuajote, mulato, palo muerto, palo retinto, papelillo. Oaxaca: tsok; Puebla: chacai (náhuatl), tasuni, tusun (totonaco), taxun (tepehua); Quintana Roo: chacah (maya); Tabasco: chaca; Veracruz: teuc, tsic; Yucatán: chacaj, chachac, chakah, chakan, huk'uphuk'up , hupuk, sak chaka'; San Luis Potosí: tsaka (tenek); Sonora: palumulat (pima); Veracruz: tasan (tepehua). (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2013).

2.1.3 Clasificación científica.

Cuadro 1. Clasificación científica de *Bursera simaruba* (SEMARNAT, 2013).

Nombre científico	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.
Autor epíteto específico	(L.) Sarg.
Epíteto específico	<i>Simaruba</i> .
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Burseraceae</i>
Género	<i>Bursera</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>

2.1.4 Botánica.

Es un árbol de aproximadamente 25 m de altura, generalmente recto y a veces con una ligera y característica torcedura en su parte media o superior, tiene la corteza escamosa y delgada variando de rojo a verde pardo. Las hojas están reunidas en 5 a 7 hojuelas, son de color verde oscuro brillante arriba y verde pálido abajo. Las flores tienen un color crema verdoso o crema rosa y están agrupadas en densos racimos y los frutos son redondos, inmaduros de color verde y maduros café rojizo (Figura 2) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2013). Generalmente son dioicas, es decir, que las flores femeninas y masculinas son producidas por individuos distintos y se desarrollan previa o simultáneamente a las nuevas hojas (Rojas, 2006).

Otras características que presenta el árbol de *Bursera simaruba* son: una resina grisácea que emana al hacer incisiones en la corteza; el sabor y el olor es ligeramente picante o semejante a trementina que desprenden las hojas trituradas, el fruto y las ramitas al ser cortadas (Little, 1907).

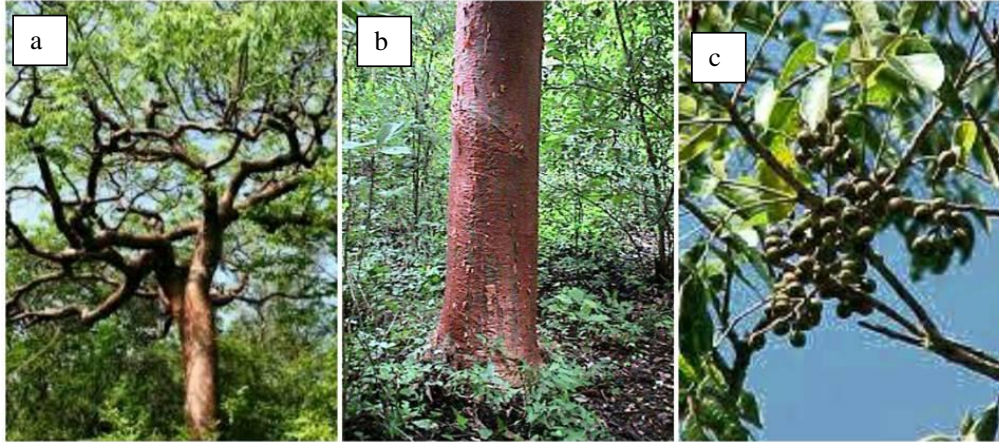


Figura 2. *Bursera simaruba*. a) árbol. b) tronco. c) Fruto

2.1.5. Propiedades medicinales de *B. simaruba*.

El palo mulato es un árbol medicinal muy arraigado en la cultura popular por su potencial curativo; en el Cuadro 2 se presentan los usos terapéuticos y medicinales reportados para *B. simaruba*.

Cuadro 2. Usos terapéuticos y medicinales reportados para *B. simaruba* (Rojas, 2006).

Usos reportados	Autor				
	Segleau, 2001	CONABIO, 2005	Rodríguez, 2006	Gupta, 1995	CATIE, 2005
Alergias		X			
Amigdalitis		X			
Bronquitis	X				
Cálculos biliares	X				
Cálculos renales	X				

ANTECEDENTES

Cuadro 2. Usos terapéuticos y medicinales reportados para *B. simaruba* (Rojas, 2006) (continuación).

Usos reportados	Autor				
	Segleau, 2001	CONABIO, 2005	Rodríguez, 2006	Gupta, 1995	CATIE, 2005
Hipertensión				X	
Infecciones bucodentales	X		X	X	
Infecciones internas	X				
Inflamaciones de piel	X				X
Insecticida	X			X	
Lombrices	X				
Perder peso	X	X		X	X
Piquetes de insectos	X		X	X	
Piquetes de serpientes	X	X			X
Purgante	X	X	X	X	X
Purificar sangre	X		X		
Quemaduras del sol	X	X	X	X	
Resfríos	X	X	X	X	
Salpullido	X	X	X		
Sarampión	X	X	X		
Tiroides	X				
Úlceras			X	X	

ANTECEDENTES

Cuadro 2. Usos terapéuticos y medicinales reportados para *B. simaruba* (Rojas, 2006) (continuación).

Usos reportados	Autor				
	Segleau, 2001	CONABIO, 2005	Rodríguez, 2006	Gupta, 1995	CATIE, 2005
Cicatrización de heridas				X	
Cicatrización de ombligo			X	X	
Cutis	X				
Diabetes					X
Diarrea	X	X	X	X	
Disentería		X			X
Diurético			X	X	X
Dolor de estómago			X	X	
Dolores de cintura	X				
Enfermedades de la piel			X		X
Expectorante	X				X
Febrífugo	X	X	X	X	

Además las decocciones de las hojas y corteza de *B. simaruba* (L.) Sarg., son utilizadas en la medicina tradicional yucateca para aliviar la dermatitis causada por la resina de *Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae) y las lesiones provocadas por sustancias tóxicas producidas por el árbol del chechem (*Chamaedorea tepejilote*) (Peraza *et al.*, 1992); también se utiliza para curar quemaduras de los corales de fuego, organismos del género *Millepora* (Phylum: Cnidaia), que se encuentra regularmente en los arrecifes coralinos de los mares tropicales (Lewis, 1989).

2.2. Copal.

2.2.1 Definición y generalidades.

El copal pertenece al género *Bursera*, el cual posee alrededor de 100 especies distribuidas exclusivamente en el continente americano. La palabra copal se deriva del vocablo náhuatl *copalli*, nombre que se le daba a diferentes resinas olorosas que se empleaban como incienso, independientemente de la planta de la que se extrajeran (Linares y Bye, 2008).

El copal que conocemos en la actualidad es una resina sólida obtenida de varias especies del género botánico *Bursera*, se sabe que el Alto Balsas es una de las principales áreas de extracción en nuestro país, se explotan cerca de 15 especies de *Bursera* (Linares y Bye, 2008).

2.2.2 Usos.

El copal es un elemento muy importante en la tradición médica y religiosa de Mesoamérica desde la época prehispánica, el humo que desprende al quemarse era usado por las civilizaciones de esta zona como ofrenda a las deidades y como terapia para diferentes males físicos y espirituales. Aún en la actualidad dichos usos son comunes dentro de la medicina tradicional indígena (Molina, 1980).

Se considera que al inhalar el humo del copal o tomarlo en forma de té, ayuda a aliviar enfermedades respiratorias. El aceite de copal es utilizado en la aromaterapia para tratar ciertas enfermedades, debido a que tienen efectos sobre el sistema cerebral relacionado con las emociones, entre otras respuestas (sistema límbico). Para el caso de la madera, es utilizada para elaborar artesanías (CONABIO, 2009).

2.3. Resina.

2.3.1 Definición y generalidades.

Las resinas naturales son exudados pegajosos de árboles o arbustos que se endurecen al entrar en contacto con el aire (CONABIO, 2009), se definen operacionalmente como una mezcla soluble principalmente de lípidos, terpenoides volátiles y no volátiles y/o compuestos fenólicos que están generalmente secretados en estructuras especializadas situadas ya sea internamente o en la superficie de la planta y tienen gran importancia en las interacciones ecológicas. En algunas ocasiones la literatura define a la fracción volátil de las plantas como aceite esencial y sólo la fracción no volátil se llama resina (Langenheim, 2003).

La mayor fuente de las resinas son las plantas de la familia *Burseraceae* (figura 3) cuyo uso se ha documentado desde la antigüedad. De los trópicos subhúmedos a secos de América, África y Asia crecen especies de 18 géneros de esta familia de plantas, entre los más importantes están el género *Boswellia* del que se obtiene incienso, el aceite de Líbano y varios bálsamos, de *Commiphora* se obtienen las mirras y de *Bursera* los copales (CONABIO, 2009).



Figura 3. Resina de *Bursera simaruba*.

2.3.2 Composición química.

Las resinas son secretadas en estructuras especializadas en el interior de la planta o de la corteza. Tienen compuestos volátiles y no volátiles cuya proporción determina su viscosidad y dureza. Las resinas de tipo terpenoide se encuentran en la mayoría de los seres vivos, pero en las plantas alcanzan su mayor diversidad con más de 30,000 moléculas diferentes. Se forman a partir de esqueletos simples de isopropeno (C_5H_8) que se ligan con diversas moléculas (CONABIO, 2009). Algunas especies del género *Bursera* producen un compuesto predominante (por ejemplo, β -felandreno o β -mirceno), mientras que la mayoría producen una mezcla de aproximadamente 25 compuestos, incluyendo mono-, sesqui-, y diterpenos. Algunas resinas también contienen pequeñas cantidades de fenilpropanoides (Langenheim, 2003).

Los triterpenos de la familia *Burseraceae* pueden ser clasificados en cuatro tipos que incluyen: lupanos, ursanos, oleanos y eufano-tirucalanos (Peraza *et al.*, 1995).

La resina de *B. simaruba* incluye una variedad de triterpenos tales como lupeol, epilupeol, epiglutinol, β - y α -amirina y se ha encontrado que picropoligamaina es uno de sus principales activos (Peraza *et al.*, 1992; Langenheim, 2003).

2.3.3 Importancia ecológica.

Las resinas confieren ventajas defensivas a las plantas que las producen, contribuyendo a la defensa contra herbívoros, parásitos y patógenos. Es posible que a lo largo de su evolución las plantas hayan desarrollado estructuras para el almacenamiento y la secreción de compuestos secundarios como respuesta para evadir la autotoxicidad, condición que les resultó ventajosa como mecanismo de defensa ante las interacciones perjudiciales con otros organismos (insectos, vertebrados y microbios). Una mayor cantidad de componentes no volátiles incrementa su viscosidad y cristalización (dureza), propiedades relacionadas con la capacidad de atrapar e inmovilizar organismos adversos o cubrir heridas en los

ANTECEDENTES

troncos. También confieren protección a las hojas jóvenes, ya que al cubrir su superficie evita la desecación y bloquea el paso de la radiación ultravioleta (CONABIO, 2009).

2.3.4 Obtención.

La resina se obtiene de algunos árboles de copal, puede ser producida por el ataque de un insecto o mediante el método de extracción realizado por el hombre que consiste en hacer una serie de cortes o incisiones en la corteza del tronco y en las ramas gruesas. Los cortes se hacen en forma de “V” y debajo se coloca un recipiente para colectarla.

La extracción de resina se lleva a cabo solamente durante la temporada de lluvias, los cortes se realizan cada tercer día y conforme éstos incrementan el flujo de resina es mayor. Cuando el árbol tiene unos 15 cortes se encuentra en su fase más productiva y generalmente la extracción se lleva a cabo durante 25 a 30 días, dependiendo del número y el tamaño de los árboles y de la cantidad de resina que posee (Purata y León, 2008).

2.3.5 Usos

Además de sus propiedades rituales se han reconocido varios usos medicinales ya que actúan como analgésicos y expectorantes, también es utilizada en aromaterapia debido a que el aroma que desprende provoca respuestas fisiológicas asociadas a estímulos emocionales y el estado de ánimo, se utiliza en algunas regiones como sustituto de pegamento, purgante, sudorífico y diurético (Reyes y Juárez, 2008). Por otra parte se ha demostrado que presenta actividad antiinflamatoria mediante la realización de un estudio fitoquímico del extracto hexánico, en la inflamación de fase aguda inducida por carragenina y utilizando como referencia, el antiinflamatorio no esteroideo fenilbutazona (Carretero *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

La resina que exuda del tronco y de las ramas de *Bursera simaruba* se utiliza en algunas regiones como sustituto de pegamento. También se usa para la fabricación de lacas y barnices (CONAFOR, 2013). Por otra parte, la resina es aromática, al secarse se puede utilizar como repelente contra los insectos, en el tratamiento antiinflamatorio y artritis (Estrada, 2013).

2.3.6 Importancia comercial.

En general muchas especies de la familia *Burseraceae* deben su valor económico al contenido de aceites esenciales, terpenos, esteroides y lignanos presentes en sus resinas (Peraza *et al.*, 1995). Debido a la variedad de estos compuestos, es evidente que tienen un importante valor fisiológico y comercial, muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimaláricas, antimicrobianas, etc. (Ávalos y Pérez, 2009).

2.4. *Streptococcus mutans*.

2.4.1 Generalidades.

Streptococcus mutans es un microorganismo Gram-positivo, fue aislado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos, lo denominó así por las formas mutantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino. Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si este no está presente puede sobrevivir; sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis (Prieto, 2006).

ANTECEDENTES

S. mutans se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de *S. mutans* se genera de madre a hijo. Durante sus primeros 30 meses de vida la bacteria se alimenta de sacarosa y produce ácido como subproducto, degradando con ello el esmalte dentario (Prieto, 2006).

2.4.2. Género *Streptococcus*.

El género *Streptococcus* lo forma un grupo amplio y heterogéneo de cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos, que se disponen agrupados en pares o en cadenas, y que pueden comportarse en el humano como saprofitos, oportunistas o patógenos. La clasificación de los estreptococos se realiza considerando 3 características: la estructura antigénica de su pared celular (serogrupos de Lancefield), el tipo de hemólisis que producen en placas de agar sangre (α , parcial; β , total; γ , ninguna), y sus propiedades fisiológicas en cuanto a crecimiento y sensibilidad antimicrobiana (Moreno *et al.*, 2002).

Los estreptococos de interés médico se engloban en 4 grandes grupos:

1. Los estreptococos β -hemolíticos, especialmente los grupos A, B, C y G. El grupo A (*S. pyogenes*) es responsable, entre otras, de la faringitis estreptocócica, la infección bacteriana más prevalente en los niños, y de los síndromes postinfecciosos: la fiebre reumática y la glomerulonefritis postinfecciosa. El grupo B (*S. agalactiae*) es la primera causa de sepsis y meningitis bacteriana en neonatos, y una de las más importantes de endometritis, corioamnionitis y sepsis puerperales. Los grupos C y G tienen una importancia limitada en patología humana, aunque pueden causar cuadros clínicos similares al resto de las infecciones estreptocócicas.

ANTECEDENTES

2. Los estreptococos del grupo D (*S. bovis*), frecuente son la causa de bacteriemias y endocarditis en pacientes con neoplasias de colon subyacentes.

3. Los enterococos, antiguamente incluidos en el serogrupo D, se consideran actualmente de forma independiente dentro del género *Enterococcus*. Son causa importante de infecciones urinarias, intraabdominales, cutáneas y endocarditis. En los últimos años han cobrado un protagonismo creciente como patógenos nosocomiales los enterococos resistentes a vancomicina.

4. Los estreptococos del grupo *viridans*, que constituyen un conjunto heterogéneo y no agrupable de muchas especies de estreptococos, perteneciendo varias de ellas a la flora bucal habitual. Suponen la causa más frecuente de endocarditis infecciosa (Moreno *et al.*, 2002).

2.4.3. Generalidades del grupo.

El grupo *Streptococcus viridans* incluye varias especies de estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos (cuadro 3), la mayoría de los cuales constituyen parte de la flora normal de las vías respiratorias altas y del aparato urogenital. Los *Streptococcus viridans* causan el 30-40 % de los casos de endocarditis bacteriana subaguda, lo que conduce a su aislamiento de múltiples conjuntos de hemocultivos. La endocarditis por *Streptococcus viridans* ocurre principalmente en individuos con enfermedad preexistente de las válvulas nativas; también puede asociarse con infección de las válvulas protésicas. Esta endocarditis se presenta de forma insidiosa, y la fiebre, la fatiga y la pérdida de peso son los hallazgos más frecuentes. A menudo también se presentan soplos cardíacos, estigmas periféricos de endocarditis y vegetaciones en los ecocardiogramas. Las complicaciones incluyen enfermedad multivalvular, aneurismas de la válvula mitral, abscesos paravalvulares y glomerulonefritis asociadas con inmunocomplejos circulantes (Koneman *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

Cuadro 3. Estreptococos *viridans* (Robledo, 2003).

Grupo	Especie
<i>Mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i>
<i>Anginosus</i>	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>Mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrunus</i>
<i>Salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , y <i>S. thermophilus</i>
<i>Bobis</i>	<i>S. bovis</i> , <i>S. alactolyticus</i> y <i>S. equinus</i> .

En general son microorganismos poco virulentos a diferencia de neumococos y estreptococos β -hemolíticos, pero se asocian con un espectro amplio de infecciones. Generalmente las infecciones causadas por estas bacterias se originan en un trastorno de su hábitat particular por manipulaciones, instrumentación, en hospederos inmunocomprometidos o factor predisponente.

Carecen de factores virulentos conocidos como pueden ser la producción de toxinas pero se ha relacionado la capacidad de producir dextrinas por algunas cepas con la capacidad de causar endocarditis. La propiedad de adherirse a la fibronectina por medio del ácido lipoteicoico es un factor importante en las lesiones valvulares cardiacas y la formación de los biofilms.

En la formación de las caries dentales existe una relación estrecha con la presencia de *S. mutans* y la ingesta de sacarosa. El microorganismo utiliza la sacarosa para sintetizar glucanos que le permiten la adherencia al esmalte dental y la producción de ácidos como consecuencia del metabolismo fermentativo, estos dos factores son determinantes en la formación de la caries (Robledo, 2003). En el Cuadro 4 se muestra la clasificación científica del grupo *viridans*.

Cuadro 4. Clasificación científica del grupo *viridans* (Rojas *et al.*, 2000).

Reino	Bacteria
Filo	<i>Firmiutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Streptococcaceae</i>
Genero	<i>Estreptococo</i>

2.5. Biofilm dental o placa dental.

2.5.1 Definición y generalidades.

Los biofilms se definen como un conjunto de microorganismos que crecen y se organizan en una matriz de exopolisacáridos, y están adheridos firmemente a superficies inertes o a tejidos vivos, como la superficie de los dientes, las encías, la lengua y las mucosas de la cavidad oral (Zerón, 2006).

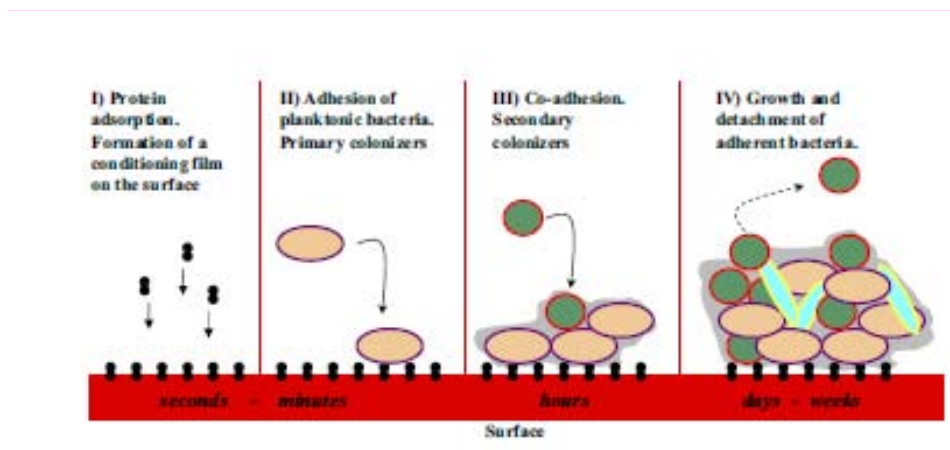
Las bacterias que se encuentran en la saliva se pueden considerar como bacterias planctónicas (bacterias que se encuentran suspendidas en una fase líquida). Sin embargo, las bacterias que se encuentran en una superficie dura (diente, reconstrucciones, prótesis e implantes) forman una película gelatinosa adherente: la placa dental. La placa dental es el principal agente etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales (Fine, 1988).

En 1965, Egelberg y colaboradores observaron las etapas en la formación de la placa dental (Figura 4) y definieron las siguientes:

- Fase I, en la que se forma un biofilm sobre la superficie limpia del diente. Este biofilm está compuesto principalmente por glicoproteínas y anticuerpos. El biofilm modifica la carga y la energía libre de la superficie dentaria.

ANTECEDENTES

- Fase II. En esta fase se observa una adhesión de determinados tipos de bacterias al biofilm previamente formado. Estos colonizadores primarios son estreptococos (cocos Gram-positivos anaerobios facultativos, siendo la especie más destacada *Streptococcus sanguinis*). Posteriormente, aumenta el número de bacilos Gram-positivos, que terminan por superar en número a las formas cocoides.
- Fase III. En esta fase se produce la multiplicación bacteriana. En esta etapa predominan las formas filamentosas Gram-positivas, sobre todo *Actinomyces* sp.
- Fase IV. Debido a la multiplicación bacteriana de la fase anterior y a la aparición de nuevas condiciones, se produce la coagregación de nuevas especies bacterianas. Se produce la adhesión de *Veillonella* sp., fusobacterias y otras bacterias Gram-negativas.



Comentario [JC1]: Mejora esta ilustración

Figura 4. Etapas de formación del biofilm dental (Svensäter y Bergenholtz, 2004).

ANTECEDENTES

Desde los años 90's, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio láser confocal, se ha llegado a un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura, desarrollándose el modelo de la placa dental como biofilm (Marsh y Bradshaw, 1995; Marsh, 1997; Bernimoulin, 2003). Un biofilm es una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan y Costerton, 2002).

2.5.2 Estructura del biofilm.

Cuando se observa un biofilm mediante el microscopio láser confocal, pueden observarse las distintas comunidades bacterianas organizadas en forma de seta o torre y separadas entre sí por microcanales de agua (Costerton *et al.*, 1994; Socransky y Haffajee, 2003).

El biofilm está compuesto por bacterias, que representan un 15-20 % del volumen, y una matriz o glicocálix, que representaría un 75-80 % del volumen del biofilm. Esta matriz está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular (Socransky y Haffajee, 2003). Los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz, y participan de forma fundamental en el desarrollo del biofilm, pues su intervención mantiene la integridad del todo. Esta estructura abierta permite una mejor circulación de distintas moléculas en el biofilm. Sin embargo, debido a la matriz de exopolisacáridos se crea un entorno complejo que no permite predecir con seguridad la capacidad de determinadas moléculas de penetrar y distribuirse en el biofilm (Rojas, 2009).

2.5.3 Características del biofilm.

Los biofilms presentan una serie de características que les confieren sus propiedades:

Heterogeneidad fisiológica. Dentro del biofilm se puede observar un rango muy amplio de micronichos, separados unos de otros por mínimas distancias; se pueden encontrar ambientes muy diferentes en cuanto al contenido de nutrientes del medio, tensión de O₂, tensión de CO₂, pH, etc. Por lo tanto, células de la misma especie bacteriana pueden presentar estados fisiológicos muy diferentes y también se pueden encontrar especies bacterianas con distintas necesidades fisiológicas (anaerobias, aerobias, microaerobias). Esta heterogeneidad fisiológica explica, en parte, la mayor resistencia de las bacterias cuando crecen en un biofilm, pues podemos encontrar bacterias en forma quiescente (bacterias en estado latente), que son muy poco susceptibles a la acción de los distintos antimicrobianos.

El pH es crucial en las placas dentales de cada individuo, está modulado por muchas variables, incluyendo concentraciones salivales de Ca²⁺, PO₄³⁻ y OH⁻, la ingesta de ácidos en la dieta, la respuesta inmune del huésped y la composición de la comunidad bacteriana de la placa. Cuando los carbohidratos de la dieta se agotan, el pH se eleva y la disolución del esmalte cesa. Comunidades que contienen acidúricos (bacterias ácido - tolerantes), tales como *Streptococcus mutans* y lactobacilos, son particularmente cariogénicas debido a que continuará su crecimiento a un pH inferior. Por otra parte, como el pH disminuye, las bacterias ácido-tolerantes constituyen una mayor proporción de la comunidad (Kolenbrander *et al.*, 2010).

ANTECEDENTES

Fenotipos en el biofilm. Las bacterias, cuando crecen en el biofilm, es decir en forma sésil, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica (Socransky y Haffajee, 2003; Marsh, 2005).

Capacidad adaptativa. Los biofilms deben mantener un equilibrio entre el crecimiento en condiciones favorables de aporte de nutrientes y de medio ambiente, y el mantenimiento de la estructura del mismo (Socransky y Haffajee, 2003; Marsh, 2005).

Resistencia frente a antimicrobianos. Dentro de estas ventajas que presentan las bacterias cuando crecen en forma de biofilm destaca la mayor resistencia frente a los distintos antimicrobianos, y esta mayor resistencia puede deberse a:

-Los antimicrobianos llegan en menores concentraciones (concentraciones no efectivas frente a las bacterias) a las zonas profundas del biofilm.

-Las bacterias, cuando son atacadas con dosis subletales, tienen capacidad para desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos (entrenamiento de resistencia con dosis subletales).

-En zonas profundas del biofilm, que tienen un menor aporte de nutrientes, las bacterias estarían en forma quiescente, que es un estado bacteriano no susceptible a los antimicrobianos.

-Las bacterias estarían protegidas por la matriz de exopolisacáridos frente a los antimicrobianos (Xu et al., 2000; Fine y col., 2001; Donlan y Costerton, 2002; Socransky y Haffajee, 2003; Marsh, 2005).

2.6. Caries dental.

2.6.1 Definición y generalidades.

La caries dental es una enfermedad multifactorial que se inicia con cambios microbianos localizados en el biofilm de la superficie de los dientes, también denominada placa dental o bacteriana, y que está determinada por la composición y flujo salival, por la exposición a los fluoruros, por la dieta y por los hábitos de higiene oral. Las bacterias de la dieta causan fluctuaciones de pH que, al interactuar con los tejidos mineralizados del diente, pueden provocar una pérdida de mineral y originar las lesiones de caries, que son los síntomas o el reflejo del proceso que ocurre en el interior de la placa. Su importancia radica, entre otros motivos, en que es una de las enfermedades más prevalentes que afectan al ser humano en todo el mundo. El término caries dental, se ha utilizado para identificar tanto el proceso de la enfermedad de caries, como las lesiones cariosas (en cualquier estadio de evolución) que se forma como resultado. Se considera como un proceso continuo de enfermedad con diferentes estadios que oscilan desde cambios subclínicos en la superficie del esmalte a nivel molecular hasta la completa destrucción del diente (Cuenca y Baca, 2013).

2.6.2 Factores de riesgo en la producción de la caries dental.

Los factores de riesgo no actúan aisladamente, sino en conjunto, interrelacionadamente, por lo que con frecuencia fortalecen en gran medida su nocivo efecto para la salud. Se tienen cálculos de la acción combinada de los factores de riesgo que muestran que su acción conjunta siempre es mayor, por lo tanto, la evaluación de un factor de riesgo será científicamente más aceptable si se consideran no solo sus efectos directos y aislados, sino también sus efectos conjuntos con otras variables de interés (Beaglehole *et al.*, 1994).

ANTECEDENTES

Existen factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la caries dental como son el nivel educativo, ingresos, estilo de vida, concepto de salud, autocuidado, hábitos de higiene bucal, entre otros. Aunque los factores que se consideran de mayor importancia relacionados con la caries dental son la frecuencia en la ingesta de carbohidratos fermentables y los factores socio-económicos, además, la baja salivación, algunas enfermedades crónicas, alteraciones en los factores del huésped y anatomía dental desfavorable que permite la retención de placa; así como, evidencia clínica que engloba nuevas lesiones, extracciones prematuras, caries anteriores y dentaduras parciales; el uso de agua y pasta dental sin fluoruros y altos conteos bacterianos también se relacionan con la formación de caries (Vélez, 2003).

2.7. Microorganismos de la cavidad oral.

La cavidad oral se considera un ecosistema abierto, siendo uno de los sitios del cuerpo humano más densamente poblados por flora microbiana, cuenta con alrededor de 500 especies de microorganismos que han sido aislados mediante métodos biológicos moleculares recientemente desarrollados, estos microorganismos colonizan superficies orales formando biopelículas (Takahashi, 2005).

En la cavidad oral predominan bacterias anaerobias, entre los que destacan las especies de los géneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Porphyromonas* y *Bacteroides*; así como bacterias aerobias tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium* (Prieto, 2004). Los microorganismos son retenidos en la cavidad oral en nichos de comunidades microbianas, mediante su capacidad para adherirse a superficies epiteliales o adamantinas, de manera mecánica en fosas, fisuras de los dientes, en el espacio entre la encía y el diente denominado surco gingival (Takahashi, 2005).

ANTECEDENTES

Existen otros microorganismos que logran ingresar a la boca sin instalarse en ella, denominados microorganismos transitorios. El desarrollo de especies de bacterias oportunistas o patógenas (*Actinomyces*, *Prevotella intermedia*, entre otras), hongos (*Candida sp.*, *Histoplasma capsulatum*), virus (*Herpes simplex*, *Papillomavirus*) y parásitos (*Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*), se ven favorecidas si el equilibrio del ambiente en la cavidad bucal es alterado (Prieto, 2004).

2.8. Agentes antimicrobianos.

2.8.1. Definición y generalidades.

Se denomina agentes antimicrobianos a aquellas sustancias químicas destinadas a impedir el desarrollo de los microorganismos o a destruirlos. Los antimicrobianos pueden diferenciarse según el efecto que producen en los microorganismos, hay algunos que sólo detienen su desarrollo y se llaman bacteriostáticos y otros que los matan o lisan y se denominan bactericidas; esto también depende de la concentración y del tiempo. Los bactericidas actúan en la fase de crecimiento, mientras que los bacteriostáticos lo hacen en la fase estacionaria (Negróni, 2009).

Para el control de la placa cariogénica se ha evaluado agentes antimicrobianos en animales con resultados positivos, algunos están incluidos en la dieta (penicilina y actinobolina) y otros aplicados tópicamente (clorhexidina, alexidina, octanidina, minociclina, aminoacridina y derivados de la piperazina). En estudios realizados en seres humanos se ha demostrado que tanto la clorhexidina como el triclosán reducen la producción ácida de la placa dentobacteriana. Se considera que el fluoruro de sodio es el agente preventivo de la caries dental de mayor importancia utilizado por el hombre y es capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Barrancos, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades de la cavidad oral constituyen una de las patologías más recurrentes en la población, debido principalmente a la asociación de complicaciones infecciosas con una inadecuada higiene bucodental y a que no son atendidas con la debida seriedad, además de que los programas de salud existentes se enfocan principalmente a la corrección y no a la prevención de las enfermedades. Este problema de salud pública que muchas veces es minimizado por la población, a su vez puede originar enfermedades gastrointestinales y esto se traduce en un incremento de las necesidades y las demandas de atención estomatológica. Otro de los problemas que enfrentan, es el uso excesivo y la automedicación de los antibióticos, lo cual ha propiciado la aparición de bacterias resistentes, la disminución en la eficacia de los tratamientos, y limitado el rango terapéutico contra patógenos ocasionando que los tratamientos se vuelvan más costosos, invasivos, peligrosos e ineficientes. Una adecuada y frecuente examinación de la cavidad oral permite la detección oportuna de lesiones y anomalías tales como caries, periodontopatías y maloclusiones con factores de riesgo estrechamente relacionados entre sí o enfermedades infecciosas que radican en inflamaciones gingivales o en una piorrea alveolar.

Las razones antes mencionadas hacen necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas. En este sentido, los productos naturales representan una opción que ayuda a combatir eficazmente a los microorganismos patógenos de una forma accesible a la población. Es importante destacar que estudios previos demuestran el valor de los productos naturales en la prevención y el tratamiento de las enfermedades de la cavidad oral sin ocasionar efectos adversos graves e indeseados. En este sentido es importante mencionar que uno de los usos tradicionales de la resina de *Bursera simaruba* o “palo mulato” es para el tratamiento de infecciones de la cavidad oral por lo que el presente estudio se enfoca biológicamente en ésta dirección.

4. OBJETIVOS.

Con base en los antecedentes descritos los objetivos primordiales del presente trabajo de investigación, consisten en evaluar el efecto del extracto etanólico de la resina de palo mulato sobre el crecimiento de bacterias del género *mutans* y aislar los compuestos mayoritarios presentes en el extracto. Para el cumplimiento de estos objetivos se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar la revisión bibliográfica exhaustiva de las diferentes publicaciones sobre la especie medicinal en cuestión.
2. Aislar y purificar los compuestos a partir del extracto etanólico de la resina de *Bursera simaruba* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
3. Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
4. Evaluar la actividad biológica de los compuestos mayoritarios obtenidos sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos generales.

5.1.2 Análisis cromatográficos.

Para la realización del análisis cromatográfico, se llevó a cabo el uso de la cromatografía en capa fina (CCF) de tipo analítica, para ello se utilizaron placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5 - 7.0 ASTM) de 0.1 mm de espesor.

Las placas se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con anisaldehído sulfúrico al 1%, seguido de un calentamiento a 100 °C aproximadamente, hasta la visualización de los compuestos.

5.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se llevaron a cabo 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 de protón (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS el cuál se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz, respectivamente. Los espectros RMN se registraron utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa, ionización directa a 70 eV.

PARTE EXPERIMENTAL

5.2 Material Vegetal.

La resina de *Bursera simaruba* fue recolectada por la Bióloga Judith Flores en Villahermosa, Tabasco en mayo del 2013. Una muestra de referencia se conserva en el laboratorio 111, del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

5.3 Estudio químico de la resina de *B. simaruba*.

5.3.1 Proceso de extracción de la resina de *B. simaruba*.

Se utilizaron 12.0 g de la resina de *Bursera simaruba* o palo mulato para la realización de la extracción con etanol (250 mL) mediante calentamiento a reflujo durante 8 horas y 30 minutos. Al término del proceso de extracción, el material vegetal se filtró y el extracto etanólico resultante de coloración amarilla se concentró a presión reducida.

5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto total obtenido a partir de la resina de la resina de *B. simaruba*.

El extracto etanólico (3.27 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta empleando gel de sílice Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, empacado en una columna de vidrio (6 X 60 cm), utilizando como sistema de elusión distintas proporciones de disolventes (Hexano, AcOEt y MeOH). El proceso descrito (cuadro 5) permitió la obtención de 79 fracciones de 150 mL cada una, las cuales se unieron con base a su similitud cromatográfica.

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 5. Fraccionamiento primario de la resina de *Bursera simaruba*.

Disolvente	Proporción	Fracciones obtenidas	Clave de fracciones reunidas
Hexano	100	1-9	F1
Hexano:AcOEt	98:2	10-15	
	95:5	16-20	
	90:10	21-27	F2
		28-34	
	85:15	35-36	F3
	37-38		
Hexano:AcOEt:MeOH	85:15:2	39-42	F4
	85:15:4	43-47	
	85:15:6	48	
		49-51	F6
		52-54	F7
	85:15:8	55-60	F8
	85:15:10	61-63	F9
		64-65	F10
		66	F11
	85:15:12	67	F11
		68-72	
	85:15:14	73-75	F12
	85:15:16	76-79	F13

PARTE EXPERIMENTAL

5.3.3 Fraccionamiento secundario de la resina.

5.3.3.1 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción F3.

La fracción F3 (0.2948 g) recromatografió en una columna abierta de gel de sílice. Para este proceso la fracción F3 fue disuelta en acetona y absorbida en gel de sílice, para posteriormente agregarse en una columna cromatográfica abierta (CCA, gel de sílice Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil se utilizó hexano, AcOEt y MeOH en gradiente de polaridad. Este procedimiento permitió obtener 17 fracciones de 50 mL cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica (cuadro 6).

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la resina de *B. simaruba* a partir de la fracción F3.

Disolvente	Proporción	Fracciones obtenidas	Clave de las fracciones reunidas
Hexano	100	1-2	B1
	100	3-4	B2
Hexano:AcOEt	98:2	5-7	B3
	96:4	8	B4
		9-10	B5
	94:6	11-14	B6
92:8	15-16	B7	
Hexano:AcOEt:MeOH	80:10:10	17	B8

PARTE EXPERIMENTAL

5.3.3.2 Fraccionamiento secundario a partir de la fracción F4.

La fracción F4 (0.8897 g) fue sometida a un fraccionamiento secundario, para ello se absorbió en gel de sílice y se realizó una CCA utilizando como eluyentes hexano, AcOEt y MeOH en diferentes proporciones. Este proceso permitió la obtención de 52 fracciones de 50 mL cada una, mismas que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica. En el Cuadro 7 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción F4.

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario de la resina de *B. simaruba* a partir de la fracción F4.

Disolvente	Proporción	Fracciones obtenidas	Clave de las fracciones reunidas
Hexano	100	1-4	C1
Hexano:AcOEt	98:2	5-8	C2
	96:4	9-11	C3
		12	C4
	94:6	13	C5
		14	
		15-16	C6
	92:8	17	C7
		18	
		19-20	
	90:10	21	C8
		22-24	
	88:12	25-26	C9
		27-28	
	86:14	29-30	C10

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario de la resina de *B. simaruba* a partir de la fracción F4 (continuación).

Hexano:AcOEt	86:14	31-32	C11
	84:16	33	C12
		34-36	
	82:18	37-39	C13
	82:18	40	C14
	80:20	41-44	C15
Hexano:AcOEt:MeOH	80:20:2	45-48	C16
	80:20:4	49-52	C17

5.3.3.3 Obtención y purificación de la lupenona a partir de la fracción C6.

El análisis por CCF de la fracción C15-17 permitió determinar que contenía dos componentes mayoritarios. Los compuestos fueron separados utilizando CCF preparativa impregnada con AgNO_3 , como fase móvil CHCl_3 /acetona (98:2). El proceso de desadsorción se realizó con CH_2Cl_2 .

5.3.3.4 Obtención y purificación del lupeol a partir de la fracción C8

La obtención del lupeol a partir de la fracción F-8 se realizó siguiendo una estrategia similar a la descrita para la lupenona. La fase móvil utilizada fue tolueno/acetona (95:5).

5.3.3.5 Obtención de la mezcla de α - y β - amirinas a partir de la fracción B1

La mezcla de amirinas se aisló a partir de la fracción B1 y no fue posible separarla utilizando cromatografía en capa fina.

PARTE EXPERIMENTAL

5.4 Ensayo biológico.

Los microorganismos de prueba utilizados en la determinación de la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos del fraccionamiento y purificación a partir del extracto etanólico de la resina de *B. simaruba* fueron *Streptococcus mutans* (ATCC 700611), *S. oralis* y *S. sanguinis*. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento óptimo de las bacterias fue el caldo de la infusión cerebro-corazón (BHI).

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

El efecto de los compuestos sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral fue determinado utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo las recomendaciones y protocolos del Clinical and Laboratory Standards Institute. A continuación, se describirá brevemente el protocolo seguido. Como primer paso se incubaron las bacterias por 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 10 000 rpm/10 minutos, se lavaron con buffer de fosfato 0.05 M (PBS, pH 6.8) dos veces para después ser resuspendidas en la misma solución. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro utilizando el estándar de Mac Farland de 0.5. Para la realización del bioensayo se colocó en cada pozo 180 μ L del medio de cultivo adicionado con glucosa, el compuesto de prueba de diluciones seriadas y 20 μ L de una suspensión ajustada a 5×10^6 UFC/mL de las bacterias (*S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*). Cada una de las determinaciones se realizó por duplicado. Durante la realización del bioensayo se utilizó como control positivo el digluconato de clorhexidiana al 0.12 % y como control negativo el medio de cultivo. Finalmente, las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C.

PARTE EXPERIMENTAL

5.4.2 Procedimiento general del ensayo.

Se adicionaron 100 μL de medio BHI en todos los canales más 100 μL de los componentes a probar C8, C6 y B1 (en una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en nuestro caso se utilizó Tween 40) con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el pozo del primer canal, de igual forma se adicionaron 100 μL del control positivo (digluconato de clorhexidina 0.12 %).

Posteriormente, se realizaron 12 diluciones seriadas; este proceso se realizó transfiriendo 100 μL de pozo en pozo, desechando los últimos 100 μL , del último pozo para adicionar después 80 μL de medio con 1% de sacarosa en todos los pozos, y finalmente 20 μL de suspensión previamente ajustada del patógeno oral correspondiente en cada pozo.

Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones aerobias a una temperatura de 37 °C en una incubadora Symphony VWR, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660} nm) utilizando un lector de placas Bio-Rad (A_{660} nm).

El valor de CMI para cada microorganismo utilizado se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 A_{660} nm., comparado con un control positivo que fue digluconato de clorhexidina al 0.12 %. En el cuadro 8 se muestran los controles utilizados para el bioensayo.

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 8. 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	Digluconato de clorhexidina al 0.12%	37 °C

* Sin compuesto

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. simaruba, comúnmente conocida como palo mulato, es un árbol nativo de México y distribuido en zonas tropicales de Centro y Sudamérica.

El material de estudio fue seleccionado con base a información reportada en la medicina tradicional y los resultados obtenidos de la evaluación biológica del extracto etanólico de la resina. Las bacterias patógenas elegidas para este estudio son causantes de enfermedades infecciosas de alta incidencia en México y el mundo. Los estreptococos ocasionan las caries y la endocarditis bacteriana, enfermedades muy comunes en nuestro país. Uno de los usos tradicionales de la resina de *B. simaruba* es para el tratamiento de las infecciones bucodentales por lo que este estudio se enfocó biológicamente en esta dirección.

Los triterpenos identificados ya han sido aislados a partir de la resina, sin embargo la metodología utilizada en éste trabajo representa una alternativa para la obtención de los mismos. Este estudio permitió el aislamiento de dos compuestos puros y una mezcla de triterpenoides como componentes mayoritarios del extracto etanólico de la resina del palo mulato.

Durante la realización del ensayo biológico se estableció que el extracto preparado a partir de la resina de *B. simaruba* inhibe el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*. La determinación del potencial antibacteriano del extracto etanólico se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología recomendada por el CLSI con modificaciones (Wu *et al.*, 2002). Los resultados de esta evaluación indicaron que tanto el extracto y los compuestos obtenidos (lupeol, lupenona, α - y β - amirinas) a partir de la resina de *B. Simaruba* inhiben el crecimiento de las bacterias en estudio, las concentraciones mínimas inhibitorias se presentan en el Cuadro 9. Es importante mencionar que un extracto vegetal es considerado activo si su CMI es menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Wu *et al.*, 2002; Rivero Cruz *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cabe destacar que los compuestos triterpenoides derivados de fuentes naturales, en general son conocidos por que poseen un amplio espectro de actividades farmacológicas. Saeed y Sabir (2001) aislaron compuestos triterpenoides de las semillas de *Caesalpinia bonducella*, estos compuestos (lupeol, acetato de lupeol, α y β -amirinas) demostraron actividad antimicrobiana contra distintas cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Holanda y colaboradores (2008) evaluaron el potencial antiinflamatorio de α y β -amirina (aisladas de *Protium heptaphyllum*) en ratas con periodontitis aguda, observando retardo en el proceso inflamatorio cuando se suministraban los triterpenos.

La lupenona obtenida a partir de un extracto de hexano y cloroformo de *Acacia cochliacantha*, demostró actividad antibacteriana relevante contra bacterias Gram positivas y negativas (Manr.quez *et al.*, 2007). Sosa y colaboradores (2007) evaluaron la actividad anti-inflamatoria de la lupenona y la β -amirina en comparación con fármacos no esteroideos y esteroideos como la indometacina e hidrocortisona, encontrando que dichos triterpenoides son menos potentes que los fármacos. Sin embargo, este estudio representa una contribución significativa en la búsqueda de anti-inflamatorios tópicos alternativos. Por otra parte, Feng y colaboradores (2014) evaluaron la actividad antidiabética de la lupenona obtenida a partir del extracto de acetato de etilo de *Rizoma musae* en ratas diabéticas Sprague-Dawley, encontrando una disminución en los niveles de glucosa en sangre en comparación con el grupo control, al igual que una reducción significativa en los niveles de HbA1c (hemoglobina glicosilada) en ratas diabéticas.

En el caso de α - y β - amirina se ha demostrado que presentan diversas actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* contra diversas condiciones relacionadas con la salud, incluyendo condiciones tales como la inflamación, bacterias, hongos, y las infecciones virales y células cancerosas (Hernández *et al.*,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2012), particularmente para β -amirina, se ha demostrado actividad antimicrobiana moderada en contra de *E. coli* (Jain *et al.*, 2003).

6.1 Aislamiento de lupenona y lupeol.

A partir de las fracciones C6 y C8 se aislaron los compuestos C6-1 y C8-1, los cuales fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y por comparación con muestras auténticas aisladas previamente de *Byrsonima crassifolia* (Rivero, 2009) como los triterpenoides lupenona (**1**) y lupeol (**2**), respectivamente. Las estructuras de los compuestos se ilustran en la Figura 5.

6.2 Aislamiento de la mezcla de α - y β - amirinas.

A partir de la fracción B1 precipitó de manera espontánea un sólido color blanco que se recristalizó de diclorometano. El sólido se caracterizó por comparación con una muestra auténtica aislada previamente de la corteza del palo mulato por Vences (2012) como una mezcla de α - (**3**) y β -amirina (**4**). En la Figura 5 se ilustran las estructuras para estos compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

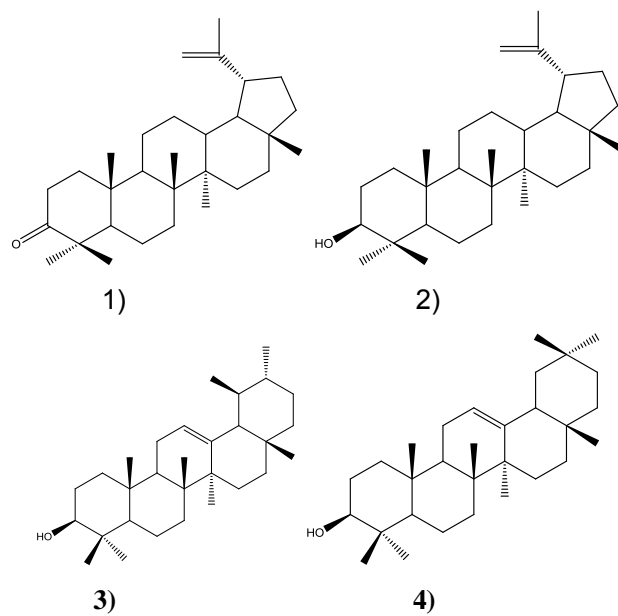


Figura 5. Estructuras químicas de la lupenona (1), lupeol (2), α - y β - amirinas (3+4).

6.3 Determinación del efecto de los compuestos 1, 2 y (3+4) sobre el crecimiento de *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*.

Los resultados obtenidos para el efecto de los compuestos sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* se resumen en el Cuadro 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 9. Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de los compuestos aislados de la resina sobre las bacterias de prueba.

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. oralis</i>
Extracto	1000	750	750
B1	>2000	2000	2000
C6-1	2000	1000	1000
C8-1	500	250	250
Digluconato de clorhexidina al 0.12 %	3.2	2.6	2.6

7. CONCLUSIONES.

- El presente trabajo de investigación representa una contribución al estudio sobre la química y actividad antimicrobiana de la especie *Bursera simaruba*.
- El estudio fitoquímico de la resina de *B. simaruba* demostró que el extracto etanólico posee actividad moderada sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.
- La lupenona presenta el mejor efecto sobre el crecimiento del panel de bacterias evaluadas (*S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*) con CMI's en un rango de 250 a 500 µg/mL.

8. PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo de investigación realizado sobre la especie *Bursera simaruba* representa sólo una contribución al estudio sobre la química y la actividad antimicrobiana de esta especie. Es por ello que a partir de este trabajo hemos formulado las siguientes perspectivas:

- Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar algunos de los compuestos minoritarios presentes, y posteriormente determinar su posible actividad biológica.
- Realizar la síntesis parcial de compuestos análogos más potentes a partir de los triterpenos aislados.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM [en línea] , [Consulta: 17 de junio del 2013], Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=7736>
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, ISSN: 1989-3620.
- Barrancos, M.J., Barrancos, P. (2006). Operatoria dental; integración clínica. Buenos Aires, Médica Panamericana 4ª ed, pp.381, 329–337.
- Beaglehole R, Bonita R, Kjellstrom. (1994). *Epidemiología Básica*. Publicación Científica No.551. Washington: OPS.
- Bernimoulin JP. Conceptos recientes sobre formación de placa. *J Clin Periodontol* 2003; 30:7-9.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2013). [en línea], [Consulta: noviembre del 2013], Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Bonafine, O., Cañizares, A., Laverde, D. (2006). Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Monagas. Laboratorio de Tecnología y Postcosecha. Maturin, Venezuela. [en línea] , [Consulta: 30 de octubre del 2013], Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%207/bonafine_o.pdf
- Carretero, M.E., López-Pérez, J.L, Abadb, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P, B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (*Burseraceae*) leaves; *Journal of Ethnopharmacology* 116, 11–15.

BIBLIOGRAFÍA

- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 2003. Árboles de Centroamérica; un manual para extensionistas. Turrialba, CR, CATIE. 1079 p.
- Cole, J.R., Bianchi, E., Trumbull, E.R. (1969). Antitumor agents from *Bursera microphylla*. II. Isolation of a new lignan: burseran. *J. Pharm. Sci.* 58, 175–176.
- CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, MX) (2009). Copal. [en línea], [Consulta: 7 de agosto del 2013], Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/copales/historia.html>
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, MX). (2005). *Bursera simaruba*. [en línea]. [Consultado 15 nov. 2013], Disponible en: www.conabio/gob.mx/conocimiento/infoespeciesarboles17/burse2m/pdf.
- CONAFOR. (2013). [en línea], [Consulta: 11 de noviembre del 2013], Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/894Bursera%20simaruba.pdf>
- Costerton JW. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriology* 1994; 176:2137-42.
- Cowan, M. (1999). Plants Products as Antimicrobia Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:375-441.
- Cuenca Sala Emili y Baca García Pilar. (2013). Odontología preventiva y comunitaria, principios, métodos y aplicaciones. 4ª edición, Barcelona, España, Elsevier Masson, pp. 93.
- Donlan, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 167-93.
- Egelberg J. Local effect of diet on plaque formation and development of gingivitis in dogs.3. Effect on frequency of meals and tube feeding. *Odontol Revy*, 1965; 16: 50-60.
- Estrada Faggioli, Carlos. (2013). *Bursera simaruba*. Bioma. El Salvador.

BIBLIOGRAFÍA

- Feng, X., Hongmei, W., Xiangpei, W., Ye Y., Yuanmin W., Haibing Q., Yanyan, Z.(2014). RP-HPLC Characterization of Lupenone and β -Sitosterol in Rhizoma Musae and Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Lupenone in Diabetic Sprague-Dawley Rats. ISSN 1420-3049.
- Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 2001; 28:697-700.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. Periodontol 2000.
- Fine DH. Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. Am J Dent 1988; 1:259-63.
- Francis, John K. (1990). *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Almácigo, gumbo limbo. SOITF-SM-35.
- Gupta, MP. 1995. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Bogotá, CO, CYTED. 616 p. Rodríguez, NH. 2006. La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. Heredia, CR, EUNA. 213 p. Segleau, JE. 2001. Plantas medicinales en el trópico húmedo. San José, CR, Editorial Guayacán.246 p.
- Hernández-Hernández, J.D., Román-Marín, L.U., Cerda-García-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P. (2005). Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*. J. Nat. Prod. 68, 1598–1602.
- Hernández, J.D., Román, L.U., Espiñeira, J., Joseph-Nathan, P., (1983). Ariensin, a new lignan from *Bursera ariensis*. Planta Med. 47, 215–217.
- Hernández, L., Palazon, J., Navarro, A., (2012). The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, CONAFOR. (2013). [en línea] , [Consulta: 26 de septiembre del 2014], Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of->

BIBLIOGRAFÍA

their-role-in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyrins-a-review-of-sources-and-biological-activities

- Holanda, P., Pinto, L., Cunha, G., Chávez, M., Santos, F., Rao, V., 2008. α β - amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Inflammopharmacology*, 16, 48-52.
- Jain, S., Jain, R., Singh, B., 2003. Antimicrobial principles of *Arnebia hispidissima*. *Pharmacology Biology*, 16, 48-52.
- Johann, S., Soldy, C., Lyon, J., Pizzolatti, M., Resende, M., 2007. Antifungal activity of the amyrin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Letters application microbiology*, 45, 148-153.
- Kakuko Y., Fumiko A., Ariaki N., Hikaru O., Lozada P., López V., Estrada M., Aguilar A., Reyes Chilpa, (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 2:293-9.
- Kolenbrander, PE. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews, Microbiology*. Vol. 8, Jul 2010. Pp. 474
- Koneman, Elmer W, et. al. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. 6ª edición, Buenos Aires, Médica Panamericana. pp. 660.
- Langenheim J. H. (2003). *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Timber Press. Portland, Cambridge. pp. 23, 24, 373,392, 586-588.
- Lewis, J. (1989). *Coral Reefs ecosystems*, 4th ed. Academic Press, Londres: 127.
- Liogier, Alain Henri. (1978). *Arboles dominicanos*. Santo Domingo, República Dominicana: Academia de Ciencias de la República Dominicana. 220 p.
- Little, E.L., Wadsworth F.H. Marrarero J. (1907). *Árboles comunes de Puerto Rico y las islas vírgenes*. Universidad de Puerto Rico, 278-280.

BIBLIOGRAFÍA

- Little, Elbert L., Jr. (1978). Atlas of United States trees. Florida. Mis. Pub. 1361. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. 22 p. Vol. 5.
- Manríquez-Torres, J., Zúñiga-Estrada, A., González-Ledesma, M., Torres-Valencia, J. (2007). The Antibacterial Metabolites and Proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. Sociedad Química de México, 51 (4), 228-231. ISSN 1870-249X.
- Marsh PD, Bradshaw DJ.(1995).Dental Plaques as a biofilm. J Industrial Microbiology; 15 (3). 169-175.
- Marsh PD. (1997). Physiological approaches to the control of oral biofilms. Adv Dent Res; 11:176-85.
- Mena Viveros Nicolás. (2012). Biofilms en otorrinolaringología. Acta Otorrinolaringol Esp.
- Molina, Alonso (1880). B. G. Teubner. ed. *Vocabulario de la lengua mexicana*. Liepzig. pp. 319.
- Moreno Izarra J., Montero C., Herrero Rodríguez C. y de la Torre Cisneros J. (2002). Infecciones por estreptococos. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. Medicine 2002; 8(62): 3297-3304.
- Nakanishi, T., Inatomi, Y., Murata, H., Shigeta, K., Iida, N., Inada, A., Murata, J., Perez Farrera, M.A., Iinuma, M., Tanaka, T., Tajima, S., Oku, N. (2005). A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. Chem. Pharm. Bull. 53, 229–231
- Negroni, M. (2009). Microbiología? Fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Medicina Panamericana, 2ª ed, pp. 124, 229–231, 664–665
- OMS (2011). [en línea], [Consulta: noviembre del 2013], Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/
- Peraza- Sánchez, S.R., Salazar-Aguilera, N.E. y Peña-Rodríguez, L.M. (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. Journal Natural Products: Vol.58:271-274.

BIBLIOGRAFÍA

- Peraza-Sánchez, S.R., Peña-Rodríguez, L.M. (1992). Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* 55, 1768–1771.
- Prieto G. (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Bogotá. Ed. Pontificia Universidad Javeriana, Capítulo 2:30–31.
- Prieto P.J., Calvo A. (2004). Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. *Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 9: 11 –18.
- Purata Velarde, S.E., León Martínez, M. (2008). La colecta de resina. En: *Uso y manejo de los copales aromáticos: resinas y aceites*. México, Formas Continuas España, pp. 17-19.
- Reyes, O., y Juárez, R. (2008). Palo Mulato. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. [en línea], [Consulta: 18 de agosto del 2013], Disponible en: <http://www.reforestamosmexico.org/blog/especie-semanal/palo-mulato>.
- Rivero-Cruz, J. Fausto, Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. (2008) Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 1:151-154.
- Rivero-Cruz, J. Fausto. (2008) Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *Jurnal of Ethnopharmacology*, 119:99-103.
- Rivero-Cruz, J., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rivero-Cruz, B. (2009). Antibacterial compounds isolated from *byrsonima crassifolia*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 37/2.
- Robledo R., Jaime. (2003). *Streptococcus viridans* y otros estreptococos no beta hemolíticos. En: Restrepo M., Angela. Et. al. *Fundamentos de medicina. Enfermedades infecciosas*. 6ª edición, Medellín, Colombia, CIB. pp 396.

BIBLIOGRAFÍA

- Rojas R., Freddy. (2006). Árboles que curan: indio desnudo. Kurú: Revista forestal, Costa Rica, 3,9.
- Rojas V, F., Oyonarte, M., Román, O., Corbalán, R. (2000). Enfermedades del corazón y de los vasos. 3ª Edición, Santiago de Chile, Editorial Mediterránea.
- Rojas, Vicente Fuenmayor Fernández. (2009). Manual de higiene bucal. España, Médica Panamericana, pp. 4.
- Rzedowski, J., Medina Lemus, R., Calderón de Rzedowski, G. (2004). Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la Cuenca superior del Río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*, 66:23-151.
- Saeed MA, Sabir AW. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia*. 2001 Nov; 72(7):807-9.
- Santillán, María Luisa. (2012). *El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia*. DGDC-UNAM.
- SEMARNAT. (20014). (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales). *Bursera simaruba*. [en línea]. [Consultado 13 may 2014], Disponible en: <file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/BurseraSimaruba.pdf>
- Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000* 2003; 3: 12-55.
- Sosa, S., Morelli, C., Tubaro, A., Cairolì, P., Speranza, G., Manitto, P. (2007). Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine* 14. 109–114.
- Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9: 27–36.
- Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *Internacional Congress Series*, 1284:103–112.
- Vélez A., Hernán, Rojas M., William, Borrero R., Jaime, Restrepo M., Jorge. (2003). *Fundamentos de Medicina. Enfermedades infecciosas*. 6ª edición, Colombia, Fondo editorial CIB. pp. 112.

BIBLIOGRAFÍA

- Wickramaratne, D.B.M., Mar, W., Chai, H., Castillo, J.J., Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D. (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Med.* 61, 80–81.
- Wu, C. D.; Wei, G.X., (2002). Tea as functional food for oral health. *Nutrition*, 18:443-444.
- Xu KD. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 2000 2004; 146:547-9.
Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65:261-291.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada-Muñiz, E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J. Ethnopharmacol.* 97, 293–299.
- Zamora, N., González J. & Poveda, L. J. (en prep.). (1999). *Árboles y Arbustos del Bosque Seco de Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.
- Zerón, Agustín (2006). Biofilm microbiano. *Odontología actual*. Año IV. Num, 43.