



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

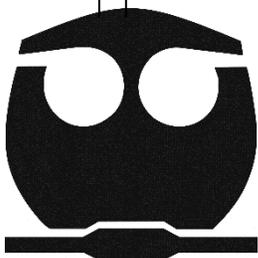
**“EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE
BACTERIAS DE LA CAVIDAD ORAL DEL
EXTRACTO DE LA GUAYABA AGRIA”**

T E S I S

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

PRESENTA

VELÁZQUEZ GALÁN STEFANY



México D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente:	Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano
2do. Suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Velázquez Galán Stefany



i.	LISTA DE CUADROS.	
ii.	LISTA DE ABREVIATURAS.	
iii.	LISTA DE FIGURAS.	
1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	ANTECEDENTES.	4
2.1	Enfermedades infecciosas.	4
2.2	Enfermedades microbianas de la cavidad oral.	4
2.3	Microorganismos de la cavidad oral.	5
2.3.1	<i>Streptococcus sanguinis</i> .	6
2.3.2	<i>Streptococcus oralis</i> .	9
2.3.3	<i>Streptococcus mutans</i> .	11
2.4	Biopelículas.	12
2.4.1	Generalidades.	12
2.4.2	Composición.	13
2.4.3	Formación.	14
2.5	Guayaba agria.	16
2.5.1	Nombres.	16
2.5.2	Clasificación.	17
2.5.3	Descripción.	18
2.5.4	Características agro-climáticas y distribución.	20
2.5.5	Composición.	22
3.	OBJETIVOS.	23
3.1	Objetivo general.	23
3.2	Objetivos particulares.	23
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.	24
4.1	Recolección del fruto.	24
4.2	Extracción del material vegetal.	25
4.2.1	Pequeña escala.	25
4.2.2	Obtención del extracto metanólico.	25
4.3	Obtención de las fracciones.	25
4.3.1	Fraccionamiento primario del extracto metanólico.	25



4.3.2 Fraccionamiento secundario de F-III.	26
4.4 Evaluación de la actividad biológica.	27
4.4.1 Evaluación de la infusión y del extracto metanólico de la guayaba agria mediante la prueba de difusión en agar.	27
4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico y de las fracciones primarias y secundarias.	29
4.4.3 Evaluación del efecto de las fracciones secundarias sobre la formación de la biopelícula producida por <i>S. mutans</i>	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	35
5.1 Obtención de la infusión y de los extractos.	36
5.2 Determinación del efecto del extracto metanólico sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.	38
5.3 Ensayo de inhibición de formación de biopelícula por <i>S. mutans</i>	41
6. CONCLUSIONES.	44
7. PERSPECTIVAS.	45
8. BIBLIOGRAFÍA.	46



-
- Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de la guayaba agria.
- Cuadro 2.** Composición de la guayaba agria en porcentajes.
- Cuadro 3.** Fracciones primarias.
- Cuadro 4.** Fracciones secundarias.
- Cuadro 5.** Efecto de las fracciones primarias sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.
- Cuadro 6.** Efecto de las fracciones secundarias sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.





Abreviatura	Significado
atm	Atmósferas
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CHX	Digluconato de Clorhexidina
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
D.O.	Densidad Óptica
EPS	Exopolisacárido
FTF	Fructosiltransferasa
g	Gramos
GTF	Glucosiltransferasa
m	Metros
MEM	Medio Esencial Mínimo
µg	Microgramos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mm	Milímetros
msnm	Metros Sobre el Nivel del Mar
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
UFC	Unidades Formadoras de Colonias





- Figura 1.** Porcentaje de la composición de la matriz polisacárida.
- Figura 2.** Fases de formación de la biopelícula.
- Figura 3.** Árbol de *P. friedrichsthalianum*.
- Figura 4.** Frutos inmaduros y hojas de *P. friedrichsthalianum*.
- Figura 5.** Flor de *P. friedrichsthalianum*.
- Figura 6.** Fruto de *P. friedrichsthalianum*.
- Figura 7.** Distribución geográfica de la guayaba agria.
- Figura 8.** Fruto de la guayaba agria desecado.
- Figura 9.** Esquema del inóculo en placa de 96 pozos utilizada en el bioensayo para las fracciones secundarias.
- Figura 10.** Diagrama del fraccionamiento y evaluación biológica de *P. friedrichsthalianum*.
- Figura 11.** Prueba de difusión en agar para el extracto metanólico.





1. INTRODUCCIÓN.

En México, la medicina tradicional ha tenido su origen en los espacios geográficos y sociales de los pueblos indígenas. Surgió antes de la colonia y también durante el proceso de la misma, cuyos conceptos y metodologías terapéuticas se basan en la historia, la cosmovisión y la identidad cultural indígena, lo cual no significa que no se hayan modificado en el tiempo, incorporando elementos conceptuales, médicos y terapéuticos de las diferentes sociedades que los han dominado (Organización Panamericana de la Salud, 2006).

La medicina tradicional lejos de desaparecer ha resurgido en la era actual. Las curas tradicionales de origen natural varían dependiendo de la región, pero también existen muchas similitudes entre ellas. La mayoría han sido desarrolladas a lo largo de los siglos y son prescritas y utilizadas por su población (Organización Panamericana de la Salud, 2006). Es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Argueta, 1994).

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la física y la medicina (Cortéz *et al.*, 2014).





Las poblaciones de África, Asia y Latinoamérica principalmente, utilizan la medicina tradicional para ayudar a satisfacer sus necesidades básicas de salud. Además de ser asequible económicamente, es también muy a menudo parte de un sistema más amplio de creencias y se considera una parte integral de la vida diaria y del bienestar. Sin embargo, el uso óptimo y la cada vez mayor credibilidad de la medicina tradicional dependerán por lo tanto del desarrollo de una base de evidencia sobre su seguridad y eficacia (OMS, 2002). Las principales ventajas de la utilización de alternativas naturales es que son de fácil disponibilidad, generalmente de bajo costo, eficaces, a veces tienen baja toxicidad y no promueven o generan resistencia microbiana informada hasta el momento (Prabhakar *et al.*, 2014).

La medicina complementaria y alternativa se utiliza cada vez más en paralelo con la medicina alopática debido a la creciente preocupación sobre los efectos adversos de esta última, de hecho la evidencia científica apunta hacia un potencial muy prometedor de la medicina tradicional en problemas tales como la resistencia a antibióticos (OMS, 2002).

La multirresistencia se ha desarrollado debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales comúnmente utilizados para tratar las enfermedades infecciosas. Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a la investigación de nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales (Zampini *et al.*, 2007).





Estudios realizados revelan que las plantas representan una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos. Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios. De éstos un porcentaje importante posee cierta actividad contra microorganismos. Tal es el caso de la guayaba, que se usa en la medicina herbolaria como antiséptico y astringente (Domingo *et al.*, 2003).

Las hojas de la guayaba poseen actividad antiespasmódica e inhiben el peristaltismo. El fruto se utiliza para eliminar parásitos, lombrices y amibas. Por otra parte, se utiliza para tratar enfermedades infecciosas de la cavidad oral y el tracto digestivo (Argueta, 1994). Actualmente existe poca evidencia documentada de que la guayaba agria tenga efecto sobre el crecimiento bacteriano (Miranda *et al.*, 2012) por ello, es importante realizar los estudios científicos correspondientes para de esta manera fomentar su uso, ya que representa una nueva alternativa frente al uso indiscriminado y creciente de resistencia a antibióticos.





2. ANTECEDENTES.

2.1 Enfermedades infecciosas.

El término infeccioso se refiere al hecho de que la enfermedad infecciosa es causada por microorganismos patógenos que penetran en un organismo y pueden multiplicarse hasta un número considerable (OMS, 2007).

La enfermedad infecciosa es un estado patológico que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano. La respuesta inmune del mismo está fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente. Es determinada por agresiones de microorganismos, que se multiplican en el sujeto y mecanismos inmunológicos que tratan de controlarlos (Antoni, 2005).

2.2 Enfermedades microbianas de la cavidad oral.

La salud oral es esencial para la salud en general y para la calidad de vida es un estado libre de dolor. Entre las principales patologías que afectan la cavidad oral encontramos: cáncer oral y de garganta, enfermedades periodontales (encías), pérdida de piezas dentales, entre otras enfermedades y desórdenes que limitan la capacidad del individuo al morder, masticar, sonreír, hablar, así como de su bienestar psicosocial. Las enfermedades microbianas de la cavidad oral son de las más comunes. Se incrementan por ciertos factores de riesgo tales como enfermedades crónicas (cardiovasculares, cáncer, VIH, diabetes), dieta (alta en





carbohidratos, consumo de tabaco y bebidas alcohólicas), así como la más importante: la falta de higiene bucodental (OMS, 2007).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud la falta de higiene bucodental, es un problema de salud de importancia a escala mundial, ya que causa (OMS, 2007):

- Enfermedades severas periodontales, las cuales pueden resultar en la pérdida de las piezas dentales; se encuentran en aproximadamente 15-20% de la población de mediana edad (35-44 años)
- Pérdida de las piezas dentales, cerca del 30% de las personas en edad de 65-74 años, no tienen dentadura natural.
- Caries, en todo el mundo, alrededor del 60-90% de niños en etapa escolar, y cerca del 100% de los adultos tienen caries dental

2.3 Microorganismos de la cavidad oral.

Streptococcus oralis, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* (pertenecientes al grupo bacteriano denominado *viridans*) han sido tradicionalmente considerados como patógenos oportunistas menores, siendo asociados principalmente con la caries dental. Sin embargo, estas bacterias se han convertido en patógenos significativos de pacientes inmunocomprometidos y aquellos con neoplasias hematológicas (Hasty, 1992).





El tratamiento de las infecciones causadas por estreptococos del grupo bacteriano *viridans* es cada vez más problemático: la terapia con penicilinas era un tratamiento estándar, pero se ha vuelto menos eficaz debido a la alta aparición de resistencia a antimicrobianos dentro de este grupo de microorganismos (Byers *et al.*, 2000).

La bacteriemia en grupos de pacientes susceptibles está asociada con complicaciones secundarias que incluyen endocarditis infecciosa, dificultad respiratoria y shock estreptocócico que alcanzan tasas de mortalidad de hasta 30% (Byers *et al.*, 2000).

La endocarditis infecciosa es una enfermedad endovascular que ocurre cuando las bacterias entran en el torrente sanguíneo y se adhieren a las válvulas cardíacas. Los microorganismos infecciosos más comunes son los estafilococos (44%), seguidos de los estreptococos (31%) y, particularmente, los estreptococos de la cavidad oral (21%) son los principales agentes causales de endocarditis infecciosa. Muchos estreptococos de la cavidad oral han sido aislados de casos de endocarditis, los más comunes han sido *S. sanguinis*, *S. oralis*, y *S. mutans* entre otros (Hasty, 1992).

2.3.1 *Streptococcus sanguinis*.

S. sanguinis es una bacteria Gram-positivo, aeróbica facultativa que es conocida no sólo por su asociación histórica con endocarditis bacteriana potencialmente mortal, sino también por su papel antagónico en la caries dental





(Loesche *et al.*, 1975) y en las enfermedades periodontales (Socransky *et al.*, 1988).

En cuanto a la caries dental, *S. sanguinis* puede competir con *S. mutans* por los sitios de colonización en las superficies dentales, y presentar antagonismo bioquímico (van der Hoeven, 1993).

Debido a que el potencial cariogénico de *S. sanguinis* se considera bajo en comparación con el de *S. mutans*, varios investigadores han sugerido que la relación entre ellos puede servir como un indicador de riesgo de caries, es decir, cuanto menor sea la relación, menor es el riesgo de caries (De Stoppelaar *et al.*, 1969; Loesche *et al.*, 1976). Sin embargo, en otro estudio, no se pudo demostrar la relación *S. mutans* / *S. sanguinis* (Burt *et al.*, 1983).

En cuanto a la endocarditis, *S. sanguinis*, entra en el torrente sanguíneo y coloniza las válvulas cardiacas vulnerables o el tejido del endocardio causando endocarditis infecciosa. La gravedad de esta enfermedad y la falta de una vacuna hacen imprescindible comprender el mecanismo de la virulencia de *S. sanguinis* para facilitar el desarrollo de agentes antimicrobianos potentes (Burt *et al.*, 1983).

Se conoce que la fibrina y las plaquetas se depositan en el sitio de trauma de las células endoteliales formando un área estéril, donde las bacterias pueden abordar y colonizar durante una bacteriemia; por lo tanto, los agentes patógenos exitosos pueden necesitar la activación de la agregación plaquetaria, pero también deben resistir la acción microbicida de las plaquetas (Paik *et al.*, 2005).





Varios estudios han examinado los factores de virulencia para causar endocarditis. Algunos tienen implicada la unión a la proteína laminina, la ya mencionada fibrina, y la matriz polisacárida. También se ha encontrado que la familia de lipoproteínas relacionadas *FimA* y *SLoC* implicadas en la adhesión de *S. sanguinis* son miembros de los sistemas de transporte ABC que ocupan al manganeso y al hierro, esta función ha demostrado que se requiere para la virulencia de endocarditis en estudios animales (Paik *et al.*, 2005).

Se han propuesto al menos siete mecanismos de adhesión de *S. sanguinis* (utilizando hidroxapatita recubierta de saliva como sustrato diana) y al menos dos clases de adhesinas (cuando se utilizaron otros sustratos diana) la lectina *GalNAc* específica que interactúa con las especies de *Actinomyces* para comenzar a formar la placa dental y de la clase I y II de antígenos que interaccionan específicamente con las integrinas (proteínas *Glib -IIIa*) de las plaquetas (Hasty *et al.*, 1992).

La técnica STM (por sus siglas en inglés *Signated Tagged Mutagenesis*) originalmente se desarrolló para determinar factores de virulencia de especies de *Salmonella*, pero se ha aplicado exitosamente a otros patógenos como *S. sanguinis* en el cual se identificaron seis mutantes de interés, incluyendo cepas con mutaciones en una región intergénica y en los genes que codifican undecaprenol quinasa, homoserina quinasa, ribonucleótido reductasa, adenilosuccinato liasa, y una proteína hipotética. Estos hallazgos indican que las funciones de síntesis, tales como pared celular, aminoácidos y de ácidos nucleicos, así como la capacidad de las bacterias para sobrevivir en condiciones anaeróbicas son factores de virulencia





causantes de endocarditis importantes para *S. sanguinis*. También se ha encontrado que los genes *bacA*, *thrB* y *purB* tienen un papel general en la virulencia en cocos Gram-positivo (Paik *et al.*, 2005).

2.3.2 *Streptococcus oralis*.

S. oralis es un colonizador primario de los dientes implicado en la formación de placa dental. Esta especie se adhiere al esmalte dental mediante la formación de polisacáridos extracelulares y crece en estrecha asociación con las fimbrias de *Actinomyces naeslundii* y otros miembros de la flora de la placa dental. La formación y el desarrollo de la placa dental, inicialmente supragingival y luego subgingival, juega un papel fundamental en la aparición de la enfermedad periodontal (Corcuera *et al.*, 2013).

En los seres humanos, *S. oralis* es una de las especies bacterianas que se encuentran más comúnmente en la boca sana. Sin embargo, puede ser potencialmente patógena y causar infecciones oportunistas como: endocarditis bacteriana en pacientes con enfermedad cardíaca previa, sepsis en pacientes neutropénicos, bacteriemia, neumonía, peritonitis en los pacientes sometidos a diálisis ambulatoria continua, abscesos cerebrales y meningitis (Corcuera *et al.*, 2013).

Los mecanismos por los cuales causa una amplia gama de infecciones no están bien definidos, sin embargo se sabe que la sialidasa y otras enzimas hidrolíticas producidas por esta bacteria contribuyen con la patogenicidad de otros





microorganismos incluyendo *S. pneumoniae*, *S. typhimurium* y *Vibrio cholerae* (Byers, *et al.*, 2000).

La producción de sialidasa por *S. oralis*, es el factor de virulencia más importante que posee, ya que provee a la bacteria de una fuente rica en carbohidratos fermentables que, además daña la función metabólica y celular del hospedero (Byers, *et al.*, 2000; Whatmore, *et al.*, 2000).

Además, el hecho de que ésta y otras especies de estreptococos en la flora de la placa dental se unen y activan el plasminógeno, constituye otro factor importante para el inicio de la infección y de su propagación en todo el cuerpo (Corcuera *et al.*, 2013).

Un estudio reciente encontró dos patrones de crecimiento de *S. oralis*, con diferencias específicas que confirman una variación fenotípica en la producción de biopelícula. Por un lado, las cepas productoras de biopelícula tuvieron la mayor tasa de crecimiento sin invasión o mínimamente invasiva. Por otro lado, las cepas que no producían biopelícula, crecieron más lentamente, pero mostraron una mayor capacidad invasora. Esta característica puede ser importante en los fenómenos relacionados con la aparición y el desarrollo de la placa dental subgingival, especialmente teniendo en cuenta la diversidad genotípica observada en el ecosistema bucal. Por lo tanto, la coexistencia de estos dos tipos de cepas puede tener una interacción mutualista: cepas productoras de biopelícula no invasivas crecerían rápidamente, se extienden sobre la superficie mientras que la





invasión de tejidos por las cepas invasivas podría servir para anclar la placa dental (Corcuera *et al.*, 2013).

2.3.3 *Streptococcus mutans*.

S. mutans es el microorganismo más frecuentemente asociado a la caries dental. Cuando *S. mutans* desarrolla biopelícula, los procesos genéticos y metabólicos junto con la matriz compleja que presenta, impiden la entrada y la acción de varios agentes antimicrobianos (Prabhakar *et al.*, 2014).

La producción de exopolisacáridos por *S. mutans* que contribuye a la caries dental por proporcionar adherencia, también juega un papel importante en la endocarditis. Se demostró en un estudio *in vitro* que los mutantes incapaces de producir exopolisacáridos se adhieren menos a la fibrina, y son menos resistentes a la fagocitosis por los granulocitos humanos y, en un modelo en rata muestran disminución de la virulencia. Por lo tanto, los exopolisacáridos probablemente contribuyen a la adherencia y la evasión de la respuesta inmune. Las propiedades adicionales que permiten a *S. mutans* colonizar la cavidad oral incluyen la capacidad de sobrevivir en un medio ambiente ácido y la interacción específica que tiene con otros microorganismos que también colonizan la cavidad oral, de modo que la bacteria *S. mutans* puede adherirse al tejido del corazón y penetrar en el endotelio de las arterias coronarias, en consecuencia, conduce a la endocarditis (Abranches *et al.*, 2009).





Hay estudios sugiriendo que aislamientos de *S. mutans* tienen una mayor capacidad para formar biopelículas que los aislamientos de otras especies de *Streptococcus* que colonizan la cavidad oral humana (Jaykus *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2009).

Sin embargo, el factor de virulencia más importante que posee *S. mutans* es la capacidad de sintetizar glucano a partir de sacarosa. La síntesis de glucano permite que las bacterias se adhieran firmemente a la superficie del diente y formen una biopelícula. La naturaleza gelatinosa de glucano retarda la difusión del ácido producido por las bacterias al fermentar azúcares en la placa dental. Esto lleva finalmente a la disolución de la superficie de esmalte del diente (Sri *et al.*, 2014).

2.4 Biopelículas.

2.4.1 Generalidades.

La caries dental es la enfermedad infecciosa oral dependiente de la formación de biopelícula más común en todo el mundo, que resulta de la interacción de los componentes bacterianos y salivales específicos con carbohidratos de la dieta fuertemente adheridos en la superficie del diente (Sri *et al.*, 2014).

Las biopelículas presentes en la cavidad oral son estructuras tridimensionales, que consisten de cepas bacterianas ancladas a superficies sólidas tales como esmalte, raíces de los dientes o implantes dentales. El rol que





desempeñan es muy importante para causar enfermedades infecciosas debido a su capacidad para adherirse a superficies como los dientes y encías (Krzyściak *et al.*, 2014).

2.4.2 Composición.

Las bacterias se encuentran en una matriz de exopolisacáridos (EPS) (Zijngel, 2010). Se han identificado más de 700 diferentes especies de bacterias que incorporan las biopelículas (Wang *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2011). La estructura y composición de la matriz de EPS se determina por las condiciones existentes en la cavidad oral y por el cambio a través del tiempo. Los exopolisacáridos también afectan a las propiedades físicas y bioquímicas de la biopelícula (Krzyściak *et al.*, 2014).

Las fuentes primarias del EPS son la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF) que son productos de la interacción con sacarosa y almidón hidrolizados. Los exopolímeros contenidos en la matriz polisacárida le proporcionan a la bacteria estabilidad y la posibilidad de unirse con otras células bacterianas (Xiao *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2007). Una investigación sobre la composición de la matriz polisacárida reveló la presencia de los componentes que se muestran en la **Figura 1**.



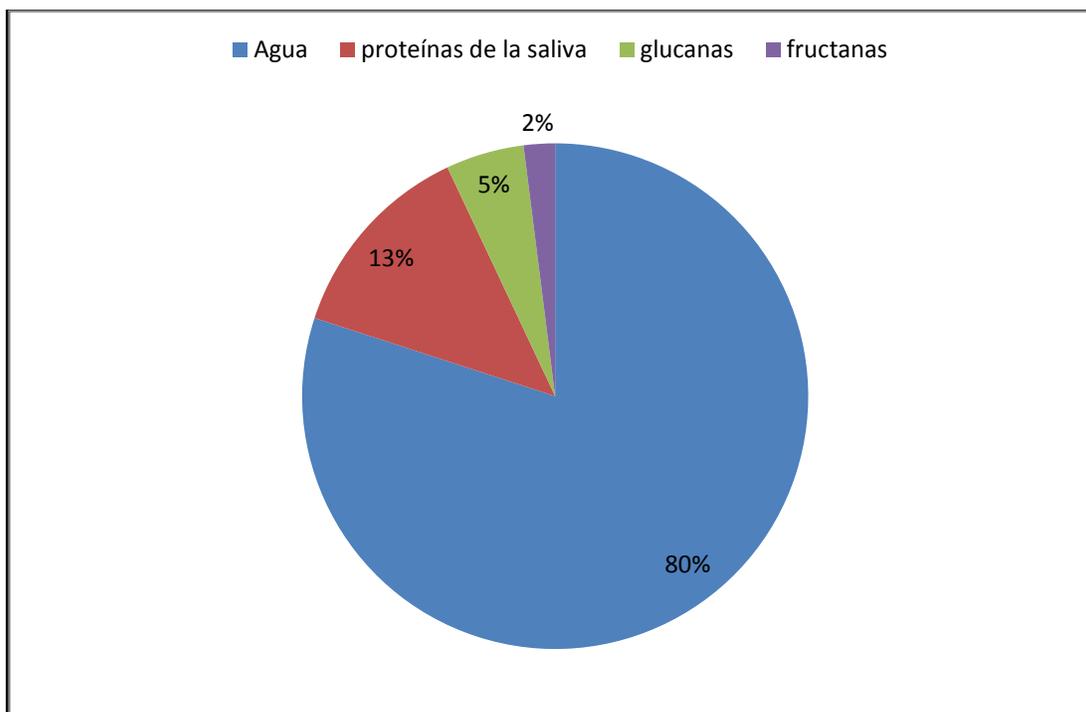


Fig 1. Porcentaje de la composición de la matriz polisacárida (Bowen *et al.*, 2011).

2.4.3 Formación.

La formación de la biopelícula dental se lleva a cabo en una serie de etapas secuenciales que depende de la interacción de los microorganismos involucrados sobre las superficies, logrando una adsorción al sustrato inerte. Posteriormente, se forma una microcolonia. Después, se induce la síntesis de metabolitos secundarios “quorum sensing” produciendo EPS, formando de esta manera la biopelícula (Castrillón *et al.*, 2010). Consta de seis principales fases (Samaranayake, 2006), las cuales se ilustran en la **Figura 2**:





1. Formación de la película salival: Las bacterias se adhieren inicialmente a la película salival y no directamente al diente (que se encuentra expuesto al medio) formando una capa de glicoproteínas.
2. Transporte de las bacterias: Las bacterias se dispersan a la proximidad de la superficie dental por medio del flujo de la saliva o quimiotaxia.
3. Interacciones de largo alcance entre la superficie de la célula microbiana y la película salival. Se produce una fase de adhesión reversible entre ambas superficies mediante fuerzas de Van der Waals y la repulsión electrostática.
4. Interacciones de corto alcance entre las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores de la película salival. Los microorganismos se fijan a la superficie dental. Esta fase es irreversible.
5. Coadhesión: Se unen nuevas bacterias (pueden ser del mismo género o no) a la primera generación que se unió previamente.
6. Formación de biopelícula: se adhieren nuevamente células bacterianas a las anteriores (como en la fase anterior) y sucesivamente continúa el proceso hasta la formación de una biopelícula más compleja y de mayor tamaño.



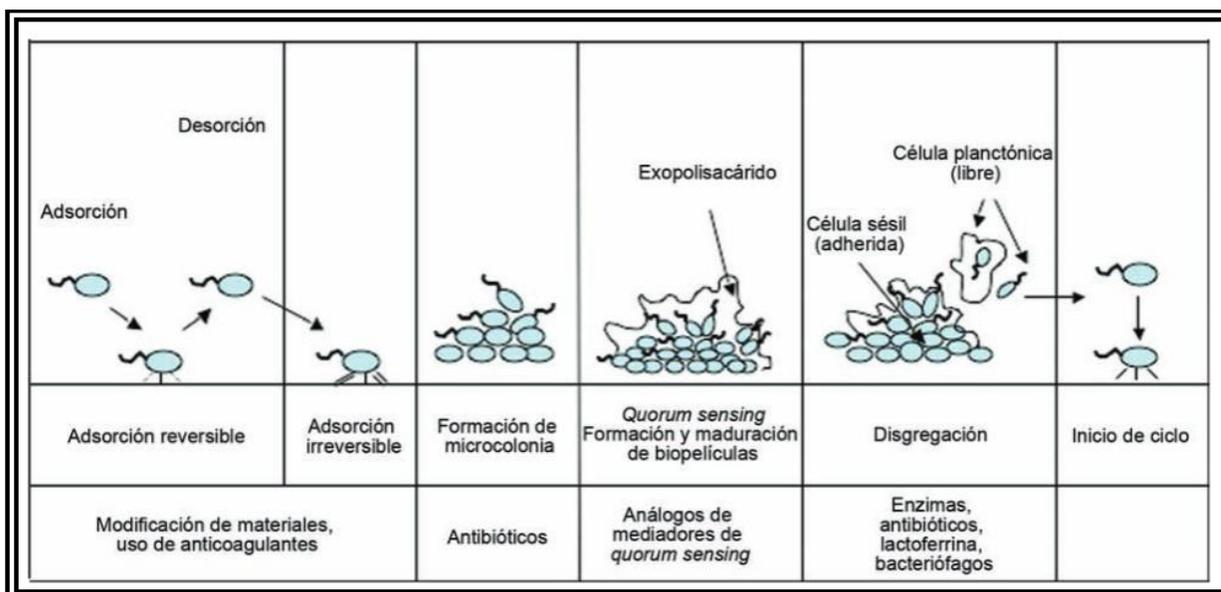


Fig 2. Fases de formación de la biopelícula (Castrillón *et al.*, 2010).

2.5 Guayaba agría.

2.5.1 Nombres.

A continuación se muestra el nombre científico de la guayaba agría, así como los nombres vernáculos, dependiendo de la región (Lim, 2012).

- **Nombre científico:** *Psidium friedrichsthalianum*.

Sinónimo: *Calyptropsidium friedrichsthalianum*

- **Nombre vernáculo:**

Colombia: Guayaba Agría;

Costa Rica: Cas, Cas Ácida, Cas Ácido;

Ecuador: Guayaba Del Choco;

El Salvador: Arrayán, Arrayan;





Francia: Goyavier De Costa Rica, Goyavier Du Costa Rica;

Alemania: Cas, Kostarika-Guave;

Guatemala: Guayaba Ácida;

Honduras: Guayaba Agría, Guayaba De Choco, Guayaba De Costa Rica, Guayaba De Danto;

Mexico: Guayaba Montes;

Nicaragua: Guayaba;

Panama: Guayaba Agría, Guayaba De Agua.

2.5.2 Clasificación.

En el **Cuadro 1** se enlista la clasificación taxonómica de la guayaba agría (*Psidium friedrichsthalianum*).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la guayaba agría (WCSP, 2000).

Reino:	<i>Plantae</i>
Phylum:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Myrtales
Familia:	Myrtaceae
Género:	<i>Psidium</i>
Especie:	<i>Psidium friedrichsthalianum</i>





2.5.3 Descripción.

El árbol tiene un tamaño de 6 a 12 m de altura, con ramas cuadrangulares y de corteza externa color marrón y rugosa. La corteza interna es grisácea y lisa como se muestra en la **Figura 3**.

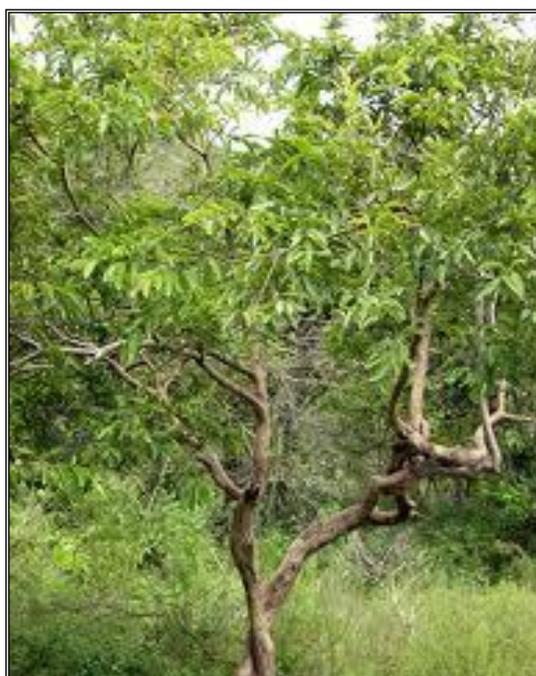


Fig 3. Árbol de *P. friedrichsthalianum* (Lim, 2012).

Las hojas presentan colores desde el bronce, pasando por el verde oscuro y hasta el verde pálido, son por ambos lados glabras, de forma elíptica u oblongo-elíptica, con un tamaño de 3.8 a 12 cm de largo, y 2.5 a 5 cm de ancho. Puntigradas en el ápice y redondeadas en la base, de bordes enteros. El peciolo tiene un tamaño de 3 a 6 mm de largo. Las hojas se ilustran en la **Figura 4**.





Fig 4. Frutos inmaduros y hojas de *P. friedrichsthalianum* (Lim, 2012).

Las flores generalmente crecen en solitario, pero también crecen en grupos de 2 ó 3. Tienen un tamaño promedio de 2.5 cm de ancho, con 5 pétalos color blanco, de textura cerosa, fragantes y numerosos estambres (hasta 300). Se ilustra en la **Figura 5**.



Fig 5. Flor de *P. friedrichsthalianum* (Lim, 2012).





El fruto es de forma globosa o elipsoide, inicialmente verde y cuando madura se torna amarillo, tiene un tamaño de 3 a 6 cm, con pulpa blanquecina y ácida. Las semillas son numerosas con un tamaño de 6-8 mm de largo incrustadas en la pulpa como se ilustra en la **Figura 6**.



Fig 6. Fruto de *P. friedrichsthalianum* (Lim, 2012).

2.5.4 Características agro-climáticas y distribución.

El árbol, se ha plantado en forma solitaria o en pequeños grupos en jardines, aunque recientemente en plantaciones más extensas, principalmente en Costa Rica. También se ha plantado en cafetales.





Se encuentra en las zonas de bosque húmedo tropical y subtropical. Se ha plantado a 1250 msnm.

- ✓ Clima: De 24.6 °C, con mínima de 15.2 °C. No tolera las heladas.
- ✓ Suelo: ácido con buen drenaje.
- ✓ Agua: Precipitaciones de 2200 mm, tres meses secos por año.

El árbol crece naturalmente desde el sur de México, América Central, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú, principalmente (Barahona y Rivera, 1995). La distribución geográfica de las principales regiones donde se encuentra la guayaba agria se ilustra en la **Figura 7** en color amarillo:



Fig 7. Distribución geográfica de la guayaba agria (GBIF, 2014).





2.5.5 Composición.

Análisis llevados a cabo en Guatemala informaron que el fruto tenía la composición que se enlista en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Composición de la guayaba agria en porcentajes (Morton, 1987).

Humedad	83.15%
Proteínas	0.78 a 0.88%
Hidratos de carbono	5.75 a 6.75%
Grasas	0.39 a 0.52%
Fibra	7.90%
Cenizas	0.80%
Humedad	83.15%
Proteínas	0.78 a 0.88%

La fruta se encontró que es rica en pectina, incluso cuando está completamente madura (Morton, 1987).

Posteriormente, en otro estudio fueron identificados ciento setenta y tres componentes volátiles. Los componentes que estaban en mayor proporción fueron: β -cariofileno, α -terpineol, α -pineno, α -selineno, β -selineno, δ -cadineno, y α -copaeno. Se atribuye la presencia de ésteres alifáticos y compuestos terpénicos al sabor y aroma de esta fruta (Pino *et al.*, 2002).





3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto del extracto metanólico y la infusión de los frutos de la guayaba agria (*P. friedrichsthalianum*) sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

3.2 Objetivos particulares.

- Preparar el extracto metanólico y la infusión de los frutos desecados de la guayaba agria (*P. friedrichsthalianum*).
- Evaluar la actividad del extracto metanólico y de la infusión de los frutos de la guayaba agria sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* utilizando la prueba de difusión en agar.
- Fraccionar el extracto activo, empleando para ello, procesos de partición y métodos cromatográficos convencionales.
- Evaluar cuantitativamente el efecto del extracto activo, obtenido mediante los fraccionamientos sobre el crecimiento de las bacterias: *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* usando el método de microdilución en placa de 96 pozos.
- Determinar el efecto de los extractos obtenidos mediante el fraccionamiento secundario sobre la formación de la biocapa producida por *S. mutans* utilizando el método de cristal violeta.





4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1 Recolección del fruto.

El fruto de la guayaba agria (*P. friedrichsthalianum*) objeto de este estudio, se recolectó e identificó en Villahermosa, Tabasco en mayo de 2013 por la M.C. Judith Espinosa, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. El material vegetal se sometió a un proceso de limpieza y desecado como se muestra en la **Figura 8.**



Fig 8. Fruto de la guayaba agria desecado.





4.2 Extracción del material vegetal.

4.2.1 Pequeña escala.

Para preparar la infusión, se calentaron 250 mL de agua y se agregaron a 50 g de material vegetal durante una hora. Posteriormente, se filtró la infusión y se concentró a sequedad usando un rotaevaporador y una bomba de alto vacío.

Para preparar el extracto metanólico se maceraron 50 g del fruto de la guayaba agria y se extrajeron con una mezcla de metanol/agua en proporción 7:3. Posteriormente, se filtró el extracto metanólico y se concentró del mismo modo que para la infusión.

4.2.2 Obtención el extracto metanólico.

Se extrajeron 900 g del fruto de la guayaba agria mediante un proceso de maceración con una mezcla de metanol/agua en una proporción 7:3 siguiendo la metodología descrita para el extracto en pequeña escala. Este proceso permitió la obtención de 187 g de sólido color ámbar.

4.3 Obtención de las fracciones.

4.3.1 Fraccionamiento primario del extracto metanólico.

El extracto seco (187 g) se suspendió en agua desionizada y se sometió a un fraccionamiento primario por partición utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo y 2-butanol (3 × 500 mL, cada una) en forma sucesiva. Este proceso permitió la obtención de cuatro fracciones (**F-I**: hexano, **F-II**: acetato de





etilo, **F-III**: 2-butanol, **F-IV**: acuosa). En el **Cuadro 3** se enlistan los rendimientos obtenidos para cada fracción.

Cuadro 3. Fracciones primarias.

Fracciones primarias	Cantidad obtenida (g)
hexano (F-I)	0.010
acetato de etilo (F-II)	19.3
2-butanol (F-III)	113.1
acuosa (F-IV)	50.7

4.3.2 Fraccionamiento secundario de F-III.

Una porción de 10 g de la fracción de 2-butanol (denominada **F-III**) se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna abierta empacada con DIAION HP-20 y se eluyó con un gradiente de concentración agua-metanol (100:0 a 0:100). Este proceso permitió la obtención de seis fracciones secundarias (**FA-FF**) que se enlistan en el **Cuadro 4** así como las cantidades obtenidas.

Cuadro 4. Fracciones secundarias.

Fracciones secundarias	Cantidad obtenida (g)
F-A	6.8650
F-B	1.3106
F-C	0.7929



**Cuadro 4.** Fracciones secundarias (cont).

Fracciones secundarias	Cantidad obtenida (g)
F-D	0.8370
F-E	0.1681
F-F	0.0785

4.4 Evaluación de la actividad biológica.

4.4.1 Evaluación de la infusión y del extracto metanólico de la guayaba agria mediante la prueba de difusión en agar.

La prueba de difusión en agar se realizó con el propósito de evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto metanólico y de la infusión de la guayaba agria sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*. En este método se observa la inhibición del crecimiento de los microorganismos por los extractos y las sustancias de prueba. La prueba se realizó siguiendo la metodología descrita por Rodríguez (2011):

- a) **Reactivación de la cepa:** Se tomaron 100 μ L del cultivo conservado en glicerol de cada cepa de *Streptococcus* a evaluar (*S. oralis*, *S. sanguinis* o *S. mutans*), se agregaron a viales con 5 mL de medio de cultivo BHI (Infusión cerebro-corazón), los cuales se incubaron a 37 °C durante 17 horas. Se tomaron 100 μ L de este nuevo cultivo y se inocularon en 5 mL de medio





BHI, se incubaron nuevamente a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una densidad óptica (D.O.) de 0.01 y, de esta manera alcanzar una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de la bacteria a utilizar durante el ensayo.

- b) **Preparación de las muestras a evaluar:** Las muestras evaluadas fueron el extracto metanólico y la infusión de la guayaba agria. Dada la naturaleza química de las muestras a valorar se solubilizaron de acuerdo a la metodología empleada por Hernández (2011), agregando 5 mL de agua destilada y 0.86 mL de Tween® 80, sonicando a temperatura ambiente.
- c) **Preparación de la placa con medio BHI:** Se preparó medio de cultivo BHI (según las instrucciones del fabricante) adicionándole 1.7 % de agar comercial Bacto® para solidificar el medio. La mezcla homogénea se esterilizó a 121 °C y 1 atm durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar a 40 °C para distribuir en cajas Petri de vidrio, colocando 10 mL en cada una y dejando enfriar a temperatura ambiente hasta solidificar. Para comprobar la esterilidad del medio, las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 horas.
- d) **Preparación de sobrecapa de medio BHI:** Se preparó medio BHI (según las instrucciones del fabricante) adicionándole 0.8 % de agar comercial Bacto® para solidificar el medio. La mezcla homogénea se distribuyó en





proporciones de 7 mL a tubos de ensaye con tapón. Finalmente, los tubos se esterilizaron a 121 °C y 1 atm durante 15 minutos.

- e) **Colocación de las muestras en los pozos.** En la placa de agar BHI se colocaron las torres de cristal y en los pozos formados se agregó el control negativo: medio de cultivo BHI, control positivo: digluconato de clorhexidina al 0.12%, control del disolvente: agua y Tween® 80 y los extractos a concentraciones de 1000, 1500 y 2000 µg/mL. De las cepas ajustadas a 1×10^6 UFC/mL, se tomaron 40 µL de la cepa de *S. mutans*, y 500 µL de las cepas *S. sanguinis* y *S. oralis* para inocularse en la sobrecapa fundida. El medio inoculado se vertió sobre la placa con las torres de cristal previamente colocadas. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, se retiraron las torres de cristal quedando pequeños pozos sobre el agar. En los pozos se agregaron 80 µL del compuesto a diferentes concentraciones y los controles mencionados.

4.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico y de las fracciones primarias y secundarias.

Para determinar el efecto del extracto metanólico y las fracciones obtenidas (fraccionamiento primario y secundario) sobre el crecimiento bacteriano, se utilizaron las bacterias cariogénicas previamente mencionadas: *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, las cuales se inocularon en medio de cultivo BHI para obtener una suspensión ajustada a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.





El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo las recomendaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Para las fracciones primarias, se colocó en todos los pozos 100 μ L de caldo BHI. Posteriormente, se agregaron en los pozos de la primera fila (A-H) 100 μ L de las fracciones primarias de la guayaba agria (**A,B,C**: F-III; **D,E,F**: F-II; **G,H**: F-IV). Se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100 μ L de la fila 1 a la 2, de la 2 a la 3 y, así, sucesivamente hasta la fila 10 desechando los últimos 100 μ L.

En el caso de las fracciones secundarias, se realizó el mismo proceso. Se colocó en todos los pozos 100 μ L de caldo BHI. Posteriormente, se agregaron en los pozos de la primera fila (A-G) 100 μ L del extracto metanólico y de las fracciones secundarias de la guayaba agria (**A**: Extracto metanólico, **B**:F-A, **C**:F-B, **D**:F-C, **E**:F-D, **F**:F-E, **G**:F-F) y se realizaron las diluciones seriadas (del mismo modo descrito anteriormente). En la **Figura 9** se ilustra el modo en que se realizó el inóculo en la placa para las fracciones secundarias.

Tanto para las fracciones primarias como para las secundarias, se adicionaron 20 μ L de caldo BHI con bacteria, *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* por separado (1×10^6 UFC/mL) en cada uno de los pozos. En las filas 11 y 12 se colocaron los controles, caldo BHI y digluconato de clorhexidina a una concentración de 0.12% (CHX), respectivamente.





Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se leyeron mediante densidad óptica para determinar las CMI.

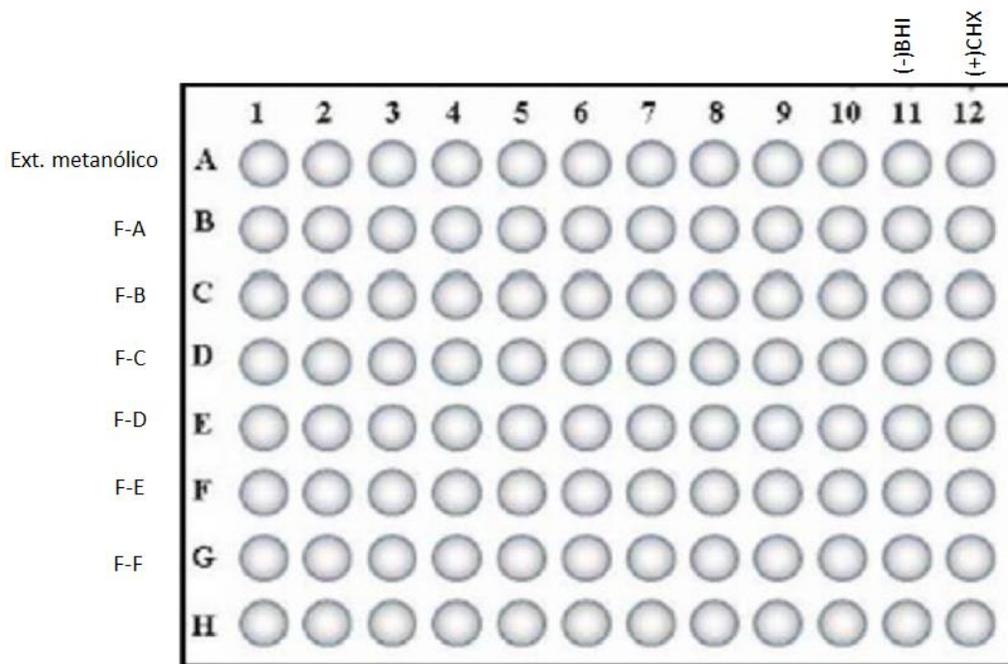


Fig 9. Esquema del inóculo en placa de 96 pozos utilizada en el bioensayo para las fracciones secundarias.

En la **Figura 10** se resume el procedimiento experimental del fraccionamiento así como la evaluación biológica del fruto de la guayaba agria.



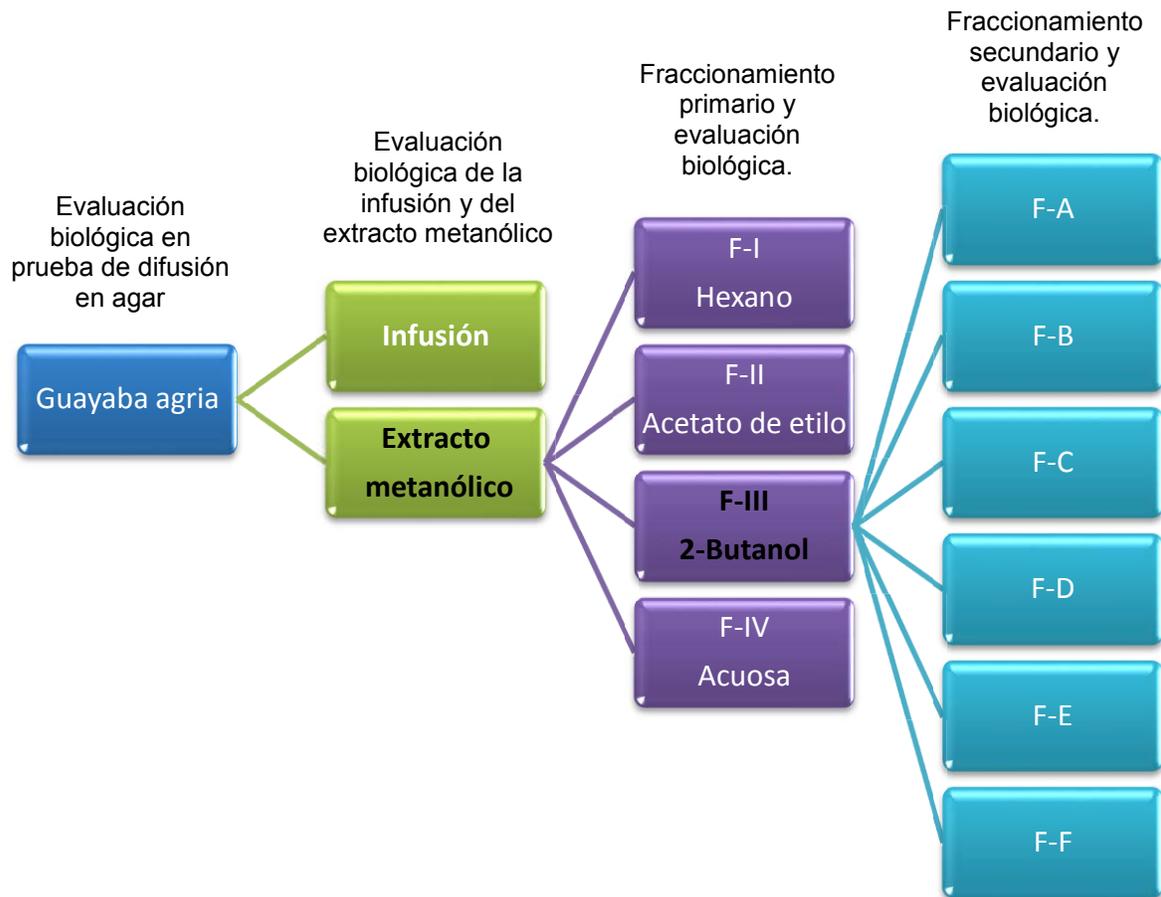


Fig. 10 Diagrama del fraccionamiento y evaluación biológica de *P. friedrichsthalianum*.





4.4.3 Evaluación del efecto de las fracciones secundarias sobre la formación de la biopelícula producida por *S. mutans*.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, a los que se adicionaron 100 μL de caldo BHI. Después, se adicionaron 100 μL de las fracciones secundarias así como los controles en las filas 1, 5 y 9 (**A**: Extracto metanólico, **B**:F-A, **C**:F-B, **D**:F-C, **E**:F-D, **F**:F-E, **G**:CHX, **H**: BHI) y se realizaron diluciones seriadas (pozos 1-4, 5-8, 9-12). Posteriormente, se agregaron 80 μL de medio BHI enriquecido con 1% de sacarosa y 20 μL de caldo BHI con la bacteria en estudio (*S. mutans*) a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

Las placas de 96 pozos se incubaron a 37 °C por 72 horas. Posteriormente, se siguió la metodología de Hwang y Rukayadi (2006) para cuantificar la biopelícula:

Se retiró el caldo BHI de la placa de 96 pozos lavando con agua desionizada con el fin de eliminar las bacterias no adheridas, después se agregaron 100 μL de etanol (95%) y se evaporó a sequedad a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 μL de cristal violeta (0.4%) para teñir a las bacterias, se incubó durante 45 minutos lavando después con agua desionizada. Se agregaron 200 μL de etanol (95%) y nuevamente se dejó en reposo 45 minutos. Finalmente, se transfirieron 100 μL a otra placa con el fin de quitar el excedente y se leyó la absorbancia a una longitud de 565 nm. Se utilizó como control positivo 80 μL de





CHX (0.12%) y como control negativo al inóculo de la cepa sin tratamiento para considerar a ésta como el 100% de adhesión y con base en los resultados de absorbancia, se calculó el porcentaje de inhibición en cada uno de los pozos.





5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Psidium friedrichsthalianum conocido comúnmente como guayaba agria, se utiliza en la medicina tradicional como antiséptico y astringente, así como para el tratamiento de diversos padecimientos (Domingo *et al.*, 2003).

Asimismo las hojas de esta guayaba se han utilizado para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales por su efecto antiespasmódico e inhibidor del peristaltismo intestinal. El fruto verde es ampliamente utilizado para eliminar parásitos, lombrices y amibas. También se ha utilizado para tratar enfermedades infecciosas de la cavidad oral y el tracto digestivo (Argueta, 1994).

Actualmente, existe poca evidencia documentada del efecto de la guayaba agria sobre el crecimiento de bacterias patógenas. En un estudio realizado por Miranda y colaboradores (2012) se analizó el extracto etanólico y hexánico de las hojas de la guayaba agria. Los resultados obtenidos describieron que el extracto etanólico tuvo la mejor actividad biológica en la prueba de difusión en agar, obteniéndose los mayores halos de inhibición de 9.53 y 13.38 mm para *S. typhimurium* y *S. aureus*, respectivamente.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se realizaron los estudios correspondientes para determinar si el fruto de la guayaba agria también podría proponerse como una alternativa terapéutica frente a los padecimientos infecciosos de la cavidad oral.





5.1 Obtención de la infusión y de los extractos.

Para realizar el estudio, se recolectó el fruto de la guayaba agria. Posteriormente, se realizaron extracciones en pequeña escala con metanol y agua caliente. Los extractos obtenidos se utilizaron para evaluar su efecto sobre el crecimiento de las bacterias *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. mutans*.

El método utilizado en primer lugar fue el de difusión en agar y, posteriormente, se cuantificó la concentración mínima inhibitoria utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.

Los resultados obtenidos del ensayo de difusión en placas de agar permitieron determinar que la infusión de los frutos de la guayaba inhibían el crecimiento de las bacterias *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. mutans* a una concentración de 2.0 mg/mL con halos de inhibición en un rango de 0.5 a 2.5 mm. Los halos de inhibición obtenidos para la infusión (2.0 mg/mL) fueron comparables a los determinados para el control positivo digluconato de clorhexidina (0.12%).

En la **Figura 11** se muestran los halos de inhibición de la prueba de difusión en agar.





Fig 11. Prueba de difusión en agar para el extracto metanólico: **A)** *S. mutans*, **B)** *S. oralis*, **C)** *S. sanguinis*. Los números indican **1)** extracto metanólico, **2)** control positivo: digluconato de clorhexidina (0.12%), **3)** control negativo: medio de cultivo BHI, **4)** control disolvente: agua y Tween® 80.

Posteriormente, se preparó el extracto metanólico de los frutos de la guayaba agria para obtener cantidades suficientes que permitieran realizar el estudio a gran escala. El fraccionamiento primario del extracto metanólico se realizó siguiendo la metodología reportada por Flores y colaboradores (2013), utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo, 2-butanol y agua. El proceso permitió la obtención de cuatro fracciones primarias: hexano (F-I) 0.010 g, acetato de etilo (F-II) 19.3 g, 2-butanol (F-III) 113.1 g, acuosa (F-IV) 50.7 g.





5.2 Determinación del efecto del extracto metanólico sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.

Las bacterias empleadas en el estudio pertenecen al género *Streptococcus* y se caracterizan por tener una agrupación en cadena, así como por presentar una tinción Gram (+). Este grupo bacteriano es probablemente el que causa más enfermedades que cualquier otro (Tortora *et al.*, 2007). Las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* se consideran como cariogénicas primarias, ya que forman la placa dental por adhesión a la superficie dental mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986)

Se realizó la evaluación biológica haciendo microdiluciones sucesivas y utilizando placa de 96 pozos, ya que según Reller y Weinstein (2009) la técnica de microdilución en placa se considera un buen método para probar de manera rápida y simultánea varias muestras obteniendo las CMI's para las especies bacterianas. En este ensayo se determinó que el extracto metanólico tuvo actividad biológica obteniéndose CMI's de 2.0, 1.0 y 0.5 mg/mL para *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, respectivamente.

A partir del extracto metanólico se realizó el fraccionamiento primario (anteriormente descrito) y se realizó la evaluación biológica obteniéndose los resultados que se enlistan en el **Cuadro 5**.





Cuadro 5. Efecto de las fracciones primarias sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.

Fracciones primarias	CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
hexano (F-I)	ND	ND	ND
acetato de etilo (F-II)	4.0	4.0	3.3
2-butanol (F-III)	2.6	3.3	2.5
acuosa (F-IV)	>8.0	>8.0	>8.0
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

ND: no determinada.

Debido a que F-III presentó la mejor actividad biológica se realizó a partir de ésta el fraccionamiento secundario utilizando una columna abierta empacada con DIAION HP-20, eluyendo en agua-metanol a diferentes concentraciones y obteniendo seis fracciones secundarias: **F-A** (6.8650 g), **F-B** (1.3106 g), **F-C** (0.7929 g), **F-D** (0.8370 g), **F-E** (0.1681 g), **F-F** (0.0785 g).

Posteriormente, se realizó la evaluación biológica de dichas fracciones secundarias utilizando placa de 96 pozos de la misma forma descrita anteriormente con las fracciones primarias y el extracto metanólico (**Cuadro 6**). La fracción que obtuvo la mejor actividad biológica fue la denominada **F-B**.





Cuadro 6. Efecto de las fracciones secundarias sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.

Fracciones secundarias	CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>
F-A	4.0	1.0	1.0
F-B	1.4	0.7	1.0
F-C	2.0	0.5	2.0
F-D	2.0	0.5	2.0
F-E	2.0	0.5	1.0
F-F	2.0	0.5	1.0
digluconato de clorhexidina	0.032	0.016	0.016

De acuerdo a Ríos y colaboradores (1988) se considera que un extracto vegetal es activo sobre el crecimiento de las células bacterianas cuando la CMI es menor a 1 mg/mL utilizando el método de microdilución en placa. En este estudio se encontró que el extracto metanólico de los frutos de guayaba inhibió el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* a concentraciones en un rango de 0.5 a 2.0 mg/mL, estas concentraciones permitieron seleccionar al extracto para su estudio químico. Las CMI obtenidas para las fracciones primarias y secundarias estuvieron en un rango de 1.0 a la concentración límite de 8.0 mg/mL para *S. sanguinis*, de 1.4 a 8.0 mg/mL para *S. mutans* y de 0.5 a 8.0 para *S. oralis*. Estas concentraciones fueron mayores a las determinadas para el control positivo





digluconato de clorhexidina (0.12%). Sin embargo, los resultados son consistentes con los reportados por el estudio previamente mencionado realizado por Miranda y colaboradores (2012) en el que se determinó que el extracto hexánico de corteza y el etanólico de las hojas de la guayaba inhibían el crecimiento de las bacterias *B. cereus* y *S. typhimurium* a concentraciones de 3.85 mg/mL. Por otra parte, ambos extractos inhibieron el crecimiento de *S. aureus* con CMI de 7.50 mg/mL.

Es importante destacar que las CMI determinadas para las bacterias seleccionadas en el caso del extracto metanólico fueron menores a las encontradas para las fracciones primarias y secundarias derivadas de los fraccionamientos realizados. La explicación para estos resultados es que los componentes presentes en el extracto pueden tener un efecto aditivo y al ser separados la actividad se ve disminuida.

5.3 Ensayo de inhibición de formación de biopelícula por *S. mutans*.

La formación de biopelículas bacterianas es importante para la aparición de enfermedades de la cavidad oral como lo son las caries (Nishimura *et al.*, 2012).

Para realizar el estudio se empleó a *S. mutans* debido a que es la bacteria con mayor capacidad para formar biopelículas del género *Streptococcus* (Jaykus *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2009). Además, es conocida por tener un papel importante en la endocarditis infecciosa. Esta bacteria tiene como característica principal la producción de exopolisacáridos que contribuyen a la adherencia y a la evasión de la respuesta inmune (Abranches *et al.*, 2009).





En este estudio se evaluó el efecto inhibitorio de la infusión y las fracciones secundarias sobre la formación de la biocapa. El primer paso consistió en realizar la estandarización del ensayo, seleccionando el medio de cultivo más conveniente para inducir la formación de la biopelícula por *S. mutans*. Al respecto existe cierta controversia, pues algunos autores proponen el empleo de MEM (Medio Esencial Mínimo) que es un medio utilizado para el cultivo de células y otros sugieren el empleo de BHI (Infusión Cerebro Corazón). Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio indican que hay una gran diferencia en la producción de biopelícula utilizando los medios de cultivo antes mencionados, ya que la cepa de *S. mutans* no creció en el medio de cultivo D-MEM por lo que no se favoreció la formación de biopelícula, ya que las lecturas de D.O. fueron de 0.010 a las 24 h. El mismo ensayo con el medio BHI aportó lecturas de D.O. de 0.530 a las 24 h.

Por otra parte, también se evaluó el tiempo óptimo en la expresión de biopelícula a tres tiempos de incubación (6, 12 y 24 h). El tiempo idóneo para la formación de la biopelícula fue de 24 h con el medio BHI.

Una vez estandarizado el método, se procedió a evaluar la infusión y las fracciones secundarias ya que tenían efecto sobre la formación de la biopelícula del microorganismo en estudio. El ensayo de inhibición de formación de la biopelícula se realizó por duplicado en dos ensayos independientes, para el tratamiento estadístico se decidió eliminar el valor más alto y el más bajo con el propósito de dar mayor consistencia en los resultados. Para definir el porcentaje de inhibición de la formación de la biopelícula, se consideró como 100% (formación de





biopelícula) la lectura en D.O. mostrada por el control sin tratamiento. Los resultados obtenidos indicaron que la infusión de los frutos de la guayaba agria tienen un efecto inhibitorio sobre la formación de la biopelícula. Dicha actividad fue dosis dependiente observando una inhibición de 75% a la concentración más alta (2 mg/mL). Los resultados obtenidos para las fracciones secundarias indican que la fracción butanólica (F-III) concentraba la actividad con un 80% de inhibición.





6. CONCLUSIONES.

- El extracto metanólico del fruto de la guayaba agria inhibe el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans* con CMI's en un rango de 0.5 mg/mL a 2 mg/mL.
- El fraccionamiento primario y la evaluación biológica del mismo permitió detectar como fracción activa a F-III con CMI's de 2.6, 3.3 y 2.5 mg/mL para *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*,
- El fraccionamiento secundario y la evaluación biológica de las fracciones permitió detectar la fracción activa F-B con CMI's de 1.4, 0.7 y 1.0 mg/mL para *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, respectivamente.
- La infusión acuosa de los frutos de la guayaba agria inhibe la formación de la biocapa en un 75% a una concentración de 2 mg/mL. Por otra parte, la fracción F-III produjo un 80% de inhibición a la misma concentración.
- Los resultados obtenidos permiten proponer al extracto metanólico de la guayaba agria como una fuente de compuestos con actividad sobre el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.





7. PERSPECTIVAS.

- Aislar los componentes responsables de la actividad biológica encontrada
- Determinar el mecanismo mediante el cual los compuestos presentes en el extracto metanólico de la guayaba agria afectan el crecimiento de las bacterias del grupo *viridans*.
- Determinar el mecanismo mediante el cual la fracción obtenida con mejor actividad biológica, inhibe la formación de la biocapa producida por *S. mutans*.





8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abranches, J., Zeng, L., Bélanger, M., Rodrigues, P.H., Simpson-Haidaris, P.J., Progulske-Fox, A., Burne, R.A. (2009). Invasion of human coronary artery endothelial cells by *Streptococcus mutans* OMZ175. *Oral Microbiol Immunol*, 24: 141–145.
- Antoni, S. (2005). *Clínica de enfermedades Infecciosas*. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Argueta, A. & Gallardo, M.C. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. 1ª edición. México, Instituto Nacional Indigenista. Vol. 1 y 2.
- Barahona, M. & Rivera, G. (1995). Desarrollo del jocote (*Spondias purpurea* L.) y del cas (*Psidium friedrichsthalianum*) en el bosque húmedo premontano de Costa Rica. *Agron Mesoam*, 6: 23-31.
- Bowen, W.H. & Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*, 45(1): 69-86.
- Burt, B.A., Loesche, W.J., Eklund, S.A., Earnest, R.W. (1983). Stability of *Streptococcus mutans* and its relationship to caries in a child population over 2 years. *Caries Res*, 17(6): 532-542.
- Byers, H., Tarelli, K., Homer, K. (2000). Isolation and characterisation of sialidase from a strain of *Streptococcus oralis*. *Journal Med Microbiol*, 49: 235–242.





- Castrillón Rivera, L.E., Palma Ramos, A., Padilla Desgarenes, M.C. (2010). Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex*, 54: 14-24.
- Corcuera, M.T., Gómez-Lus, M.L., Gómez-Aguado, F., Maestre, J.R., Ramosb, M.C., Alonso, M.J., Prieto, J. (2013). Morphological plasticity of *Streptococcus oralis* isolates for biofilm production, invasiveness, and architectural patterns. *Arch Oral Biol*, 58(11): 1584-1593.
- Cortéz-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., -rodríguez-Landa, J.F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev biomed*, 15: 123-136.
- De Stoppelaar, J.D., Van Houte, J., Backer, O. (1969). The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Res*, 3(2): 190-199.
- Domingo, D. & Brea, L. (2014). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quim*, 16(4): 385-393.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.B., Whaleen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., Foronjy, R.F., D'Armiento, J.M. (2013). Phenoli-rich extract frm the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem*, 141: 889-895.
- GBIF: Global Biodiversity Information Facility (2013). *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) [<http://www.gbif.org/species>]. Consultado el 20 de octubre de 2014.





- Hamada, S. & Slade, H. (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44: 331-384.
- Hasty, D.L., Ofek, I., Harrys, C, Doyles, R.J. (1992). Multiple Adhesins of Streptococci. *Infect Immun*, 60(6): 2147-2152.
- Hernández, D. (2011). *Efecto antimicrobiano de derivados de α - y β - amirina proveniente de fuentes naturales contra bacterias de la cavidad oral*. (Tesis de licenciatura), Facultad de Química, UNAM.
- Hwang, K. & Rukayadi, Y. (2006). In vitro activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms. *Lett Appl Microbiol*, 42: 400-404.
- Jaykus, L.A., Wang, H.H., Schlesinge, L.S. (2009) *Food-borne microbes: shaping the host ecosystem*. American Society of Microbiology-Press. Washington, USA, pág. 124.
- Kang, M.S., Oh, J.S., Lee, H.C., Lim, H.S., Lee, S.W., Yang, K.H., Choi, N.K., Kim, S.M. (2011). Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol*, 49(2): 193-199.
- Lim, T.K. (2012). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, Vol. 3. Springer Netherlands. Canberra, pág. 898.
- Loesche, W., Rowan, J., Straffon, L. (1975). Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect Immun*, 11: 1252–1260





- Loesche W. & Bhat, M. (1976). *Evaluation of diagnostic broths for Streptococcus mutans*. Microbial aspects of dental caries. Informational Retrieval Inc. Washington, D.C pp. 291–301.
- Loesche, W. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50: 353-380.
- Miranda-Cruz, E., Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Velázquez-Martínez, J.R., Alor-Chávez, M.J. (2012). Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. *BLACPMA*, 11(4): 354-361.
- Morton, J.F. (1987). *Fruits of warm climates*. 1st. Edition. Echo Point Books & Media. Miami, USA. pág. 365.
- Nishimura, J., Jaito, T., Yoneyama, H., Bai, L., Okumura, K., Isogai, E., (2012). Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* and Related Bacteria. *Adv in Microbiol.* 2: 208-215
- Organización Mundial de la Salud (2002). Medicina Tradicional: Necesidades crecientes y potencial. *World Health Organization*, 3: 1-6.
- Organización Mundial de la Salud (2007). Oral Health, fact sheet. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets>]. Consultado el 11 de septiembre de 2014.





- Organización Panamericana de la Salud (2006). Medicina indígena tradicional y medicina convencional. Instituto Interamericano de Derechos Humanos, San José, Costa Rica.
- Paik, S., Senty, L., Das, S., Noe, J.C., Munro, C.L., Kitten, T. (2005). Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infect Immun*, 73(9): 6064–6074.
- Pino, J.A., Marbot, R., Vázquez, C. (2002). Characterization of volatiles in Costa Rican guava [*Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu] fruit. *J Agric Food Chem*, 50(21): 6023–6026.
- Prabhakar, J., Balagopal, S., Priya, M. (2014). Evaluation of antimicrobial efficacy of Triphala (an Indian Ayurvedic herbal formulation) and 0.2% chlorhexidine against *Streptococcus mutans* biofilm formed on tooth substrate: An in vitro study. *Indian J Dent Res*, 25: 475-479.
- Reller, L. & Weinstein, M. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *CID*, 49: 1749-1755.
- Ríos, J., Recio, M., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J Ethnopharmacol*, 23: 127-149.
- Rodríguez, C. (2011). *Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol*. (Tesis de licenciatura), Facultad de Química, UNAM.
- Samaranayake, L. (2006). *Essential microbiology for dentistry*. 3rd. Edition. Churchill Livingstone. China, pp. 115-118, 255-282.





- Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F., Gänzle, M.G. (2007). Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst Appl Microbiol*, 30(6): 433-443.
- Socransky, S., Haffajee, A., Dzink, J. (1988). Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol*, 3: 1-7.
- Sri, A., Kennath, J., Peramachi, P. (2014). Biofilm forming ability of a new bacterial isolate from dental caries: An atomic force microscopic study. *J Nat Sci Biol Med*, 5(2): 278-283.
- Tamura, S., Yonezawa, H., Motegi, M., Nakao, R., Yoneda, S., Watanabe, H., Yamazaki, T., Senpuku, H. (2009). Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*, 24(2): 152–161.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 332-333.
- Van der Hoeven, J. & Camp, P. (1993). Mixed continuous cultures of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. *Caries Res*, 27: 26–30.
- Wang, W., Tao, R., Tong, Z., Ding, Y., Kuang, R., Zhai, S., Liu, J., Ni, L. (2012). Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides*, 33(2): 212–219.





- WCSP: World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens. (2011). *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) [<http://apps.kew.org/wcsp>]. Consultado el 20 de octubre de 2014.
- Whatmore, A., Efstratiou, A., Pickerill, A. (2000). Genetic Relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of “Atypical” Pneumococci and Organisms Allied to *S. mitis* Harboring *S. pneumoniae* Virulence Factor-Encoding Genes. *Infect Immun*, 68: 1374-1382.
- Xiao, J., Klein, M.I., Falsetta, M.L., Lu, B., Delahunty, C.M. (2012). The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed- species oral biofilm. *PLoS Pathog*, 8(4): e1002623.
- Zampini, I.C., Cudmani, N., Isla, M. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquim clin L*, 41(3): 385-393.
- Zijjge, V., Van Leeuwen, M.B., Degener, J.E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., Harmsen, H.J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 5(2): e9321.

