



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto sobre el crecimiento de la bacteria
cariogénica *Streptococcus mutans* del
extracto metanólico de la corteza de *Bursera
simaruba*. Actividad anticariogénica del
lignano picropoligamaina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A :

ULISES MENDOZA MONROY



MEXICO, D.F.

2011



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: Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA
VOCAL: Dr. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ
SECRETARIO: Dr. GLORIA RUIZ DIAZ
1ER SUPLENTE: Dr. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
2DO SUPLENTE: M.C. ABRAHAM MADARIAGA MAZON

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111 Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Ulises Mendoza Monroy

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Química de la por darme la oportunidad de pertenecer a ella y brindándome la mejor educación para formarme como profesionista.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por brindarme su apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus valiosas observaciones para mejorarlo.

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

Este trabajo se realizó mediante el financiamiento económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205709.

Dedicatorias

A mis padres y mi hermano por su apoyo moral y económico y en general a toda mi familia.

A mis compañeros del laboratorio 111 por brindarme su amable compañía durante el desarrollo de mi trabajo de tesis en especial a Gabriela Zarco por su solidaridad hacia mi persona.

Contenido

Lista de figuras.....	6
Lista de diagramas y cuadros.....	8
Lista de abreviaturas.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.1.1. <i>Streptococcus mutans</i> como agente cariogénico.....	14
2.2. El género <i>Bursera</i>	16
2.2.1. Estudios fitoquímicos realizados sobre especies del genero <i>Bursera</i>	18
2.2.2. Actividad antibacterina de lignanos sobre <i>S. mutans</i>	19
2.2.4. Estudios sobre <i>B. suntui</i>	22
2.2.5. Estudios sobre <i>B. kerberi</i>	22
2.2.6. Estudios sobre <i>B. tokinensis</i>	23
2.2.7. Estudios sobre <i>B. graveolens</i>	24
2.3. Estudios fitoquímicos previos de la corteza de <i>B. simaruba</i>	25
2.4. Estudios farmacológicos previos realizados sobre especies del genero <i>Bursera</i> ...	29
3. JUSTIFICACION	34
4. OBJETIVOS PARTICULARES	35
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
5.1. Material vegetal.....	36
5.2. Procedimientos Generales	36
5.2.1. Análisis cromatograficos.....	36
5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados	36
5.3. Estudio químico de <i>B. simaruba</i>	37

5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de <i>B. simaruba</i>	37
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir de la corteza de <i>B. simaruba</i>	37
5.3.3 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de diclorometano de la corteza de <i>B. simarba</i>	37
5.3.4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F5.....	38
5.4. Ensayos Biológicos.....	41
5.4.1. Microorganismos de prueba	41
5.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	41
5.4.3. Procedimiento general del ensayo.....	42
5.4.4. Agregación de <i>S. mutans</i> en presencia de dextran T2000.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	44
7. CONCLUSIONES.....	49
8. PERSPECTIVAS.....	50
9. REFERENCIAS	51

LISTA DE FIGURAS		
FIGURA	Contenido	Pág
1.	El desarrollo de la caries dental	15
2.	Distribución geográfica de <i>B. simaruba</i> en México	18
3.	<i>Bursera simaruba</i>	18
4.	Estructura química del lignano aislado y caracterizado de <i>M. fragans</i>	20
5.	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>W. robusta</i>	21
6.	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>B. suntui</i>	22
7.	Compuesto aislado de de <i>B. kerberi</i>	23
8.	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>B. tonkinensis</i>	24
9.	Estructuras químicas provenientes de <i>B. graveolens</i>	25
10.	Monoterpenos aislados de <i>B. simaruba</i>	26
11.	Estructuras químicas aisladas en estudios previos de <i>B. simaruba</i>	26
12.	Estructuras aisladas de la corteza de <i>B. simaruba</i>	27
13.	Estructuras aisladas de la corteza de <i>B. simaruba</i>	28
14	Estructuras aisladas de la corteza de <i>B. simaruba</i>	29
15.	Compuestos aislados en este estudio a partir de la corteza de <i>B. simaruba</i> .	45
16.	Efecto de la picropoligamaina (I) sobre la agregación de <i>S. mutans</i>	48

LISTA DE DIAGRAMAS Y CUADROS		
Diagrama	Contenido	Pág
1.	Obtención de los compuestos I y II a partir de la corteza de <i>B. simaruba</i>	39
Cuadro	Contenido	Pág
1	Información etnobotánica y taxonómica de <i>B. simaruba</i> .	17
2	Actividad biológica de los compuestos aislados de diferentes especies del genero <i>Bursera</i> .	31
3	Fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta fracción primaria de diclorometano derivada del extracto de <i>B. simaruba</i> .	40
4	Fraccionamiento secundario utilizando cromatografía en columna abierta de la fracción F5 de <i>B. simaruba</i>	40
5	Fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta de la fracción F5 de <i>B. simaruba</i> (continuación).	41
6	Controles para el ensayo biológico	42
7	Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de la corteza de <i>B. simaruba</i> sobre <i>S. mutans</i> .	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CCA	cromatografía en columna abierta
CCD	cromatografía en capa delgada
CG-EM	cromatografía de gases-espectrometría de masas
DMSO	dimetilsulfóxido
CDCl ₃	cloroformo deuterado
TMS	tetrametilsilano
μL	microlitro
CMI	concentración mínima inhibitoria
H	hora
Kg	kilogramo
L	litro
μg	microgramo
MeOH	metanol
AcOEt	acetato de etilo
Mg	miligramo
mL	mililitro
MHz	megahertz
Nm	nanómetro
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
UFC	unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

La salud bucal es un factor importante a tomar en cuenta en el bienestar social y económico de la población mundial puesto que repercute en su calidad de vida. Dos de las enfermedades más comunes a tratar por los odontólogos son la periodontitis y las caries, mismas que son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas normalmente saludables. Particularmente *Streptococcus mutans*, agente etiológico de la caries forma biocapas también llamados biofilms, que se pueden definir como una comunidad microbiológica organizada adjunta a una matriz extracelular la cual a su vez está adherida a la superficie dental (Cahuana-Vásquez y Cury, 2010).

La caries dental continua siendo el principal problema de salud bucal en niños, adolescentes y adultos, sus consecuencias van desde la destrucción de tejidos dentarios, hasta la inflamación e infección del tejido pulpar, acarreado una pérdida de la vitalidad dentaria. Las complejidades de la enfermedad que conocemos como caries son debidas a múltiples factores asociados con la evolución de una población bacteriana de biofilm saludable a una con biofilm patológico y aún comprendidos todos estos factores, todavía es un reto significativo para muchas personas poder modificar sus factores de riesgo para crear un ambiente oral saludable dentro del biofilm. Una biocapa saludable puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas, por lo que actúa como defensa de primera línea para ayudar a proteger a la boca de infecciones bacterianas u otros patógenos.

Los biofilms por su naturaleza, son muy resistentes a cambios de presión por lo que su modificación puede causar un cambio en la sobrecarga de organismos patógenos y cambios dentro del biofilm que favorecerán la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas, como es el caso de *S. mutans* y lactobacilos, que como consecuencia pueden tomar posesión del biofilm (Milicich, 2008).

El primer signo visible de caries es una mancha blanca en el esmalte o un probable daño en la pieza dental lo cual es evidencia temprana de desmineralización. En este sentido se tiene que buscar una solución para evitar tener consecuencias más graves.

Por ejemplo el uso de flúor en la prevención de caries dental es una práctica muy extendida en la profesión odontológica ya que es una medida de prevención primaria eficiente, simple y de bajo costo (Falcon, 2002), sin embargo en algunos casos puede ocasionar fluorosis por lo cual es necesario la búsqueda de nuevas alternativas de origen natural que cumplan con las expectativas en la prevención y tratamiento de la caries que puedan convertirse en un recurso fundamental.

De acuerdo a la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2005), a nivel mundial solo 17 países son considerados megadiversos, ya que en conjunto albergan entre el 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta. México pertenece a esta selecta categoría, porque ocupa el cuarto lugar en el mundo en riqueza vegetal, dado que alberga el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Además, nuestro país se distingue por tener una elevada proporción de especies endémicas: 40% de las plantas y más del 17% de especies de vertebrados. Debido a esta riqueza florística, la diversidad de plantas medicinales en México es muy abundante y su uso está ampliamente difundido, tanto en las comunidades rurales como en las urbanas.

En la medicina tradicional la infusión de la corteza de *B. simaruba* se utiliza para adelgazar, para infecciones en la cavidad oral o para el tratamiento de úlceras estomacales. En Venezuela y países de América Central es usada como antídoto para la savia de la madera venenosa, para tratar picaduras de insectos, quemaduras solares, erupciones, llagas cutáneas, infecciones internas, fiebre, resfriados y gripe. En México las infusiones se usan como remedio para infecciones en el tracto urinario (Arvigo y Balik, 1993), en algunos lugares de nuestro país la resina se utiliza para cicatrizar heridas y para curar las lesiones ocasionadas por los corales de fuego (*Millepora* sp), que se encuentran regularmente en los arrecifes coralinos de los mares tropicales (Lewis, 1989).

Se ha descrito que el contacto con organismos de este género produce severas lesiones en la piel que incluyen quemaduras, eritema y una erupción que dura varios días (Hashimoto, 1979). La resina fresca es usada aplicándola en las llagas producidas por la sustancia toxica del chechen o “madera negra venenosa” (*Metopium brownei*) (Peraza y Peña, 1992).

Por otra parte, la infusión hecha con hojas de *B. simaruba* se reporto que posee una actividad antiinflamatoria (Abad *et al.*, 1996; Sosa *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2004; Carretero *et al.*, 2008). Es importante señalar que el proceso de ebullición provoca la liberación de taninos que pueden tener efectos tóxicos.

2. ANTECEDENTES

Durante las últimas décadas se han dado cambios no solo en la prevalencia de caries dental si no también en la distribución y el patrón de la enfermedad. Las desigualdades para el acceso a la salud bucal se han convertido en un problema de salud pública ya que las personas de más bajos ingresos son los más desfavorecidos. La detección oportuna de las etapas iniciales de la enfermedad antes de que pueda formarse una cavidad en la pieza dental puede ser trascendental para detener y controlar la progresión de la caries dental (Cadavid *et al.*, 2009).

2.1. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans forma parte de la microbiota normal de la boca, aparece junto con la erupción de las piezas dentarias y se hace patógeno al aumentar su proporción relativa en la boca este microorganismo es considerado el más cariogénico debido a su capacidad para utilizar los carbohidratos como la sacarosa para sintetizar polisacáridos extracelulares, estos compuestos son importantes factores de virulencia porque promueven la adherencia de las bacterias a la superficie dental (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010). Cabe señalar que los polisacáridos son utilizados posteriormente en la producción de ácido láctico, el cual favorece la destrucción del esmalte dental, ya que, forma una especie de película pegajosa que le permite adherirse a los dientes, dando lugar así a la caries dental (Kilian *et al.*, 1971; Finegold *et al.*, 1975); (Inoue *et al.*, 1979; Thomson *et al.*, 1979).

Estudios taxonómicos han revelado que *S. mutans* pertenece a un grupo bastante homogéneo de bacterias: se agrupa en cadenas, no móvil, no forma spora, microaerofílica, Gram positiva, catalasa negativa, fermentadores de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina, y salicina y que para su crecimiento y desarrollo “*in vitro*” necesita de medios enriquecidos.

Con respecto a su pared celular, ésta contiene cuatro polímeros antigénicos: peptidoglucanos, polisacáridos específicos, proteínas, ácido teicóico y ácido lipoteicóico. Es importante destacar que la pared presenta una estructura de mosaico en el que cada uno de estos polímeros es accesible para las reacciones en la superficie celular (Slade, 1978).

2.1.1. *Streptococcus mutans* como agente carigenico

La caries es un proceso infeccioso patológico multifactorial, localizado, post-eruptivo y transmisible que destruye los tejidos duros dentales (Mouton, 1995; Rodríguez y Gonzales, 2000). Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son en orden de frecuencia:

a) La bacteria *S. mutans* (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *S. sobrinus* y *S. gordonii*.

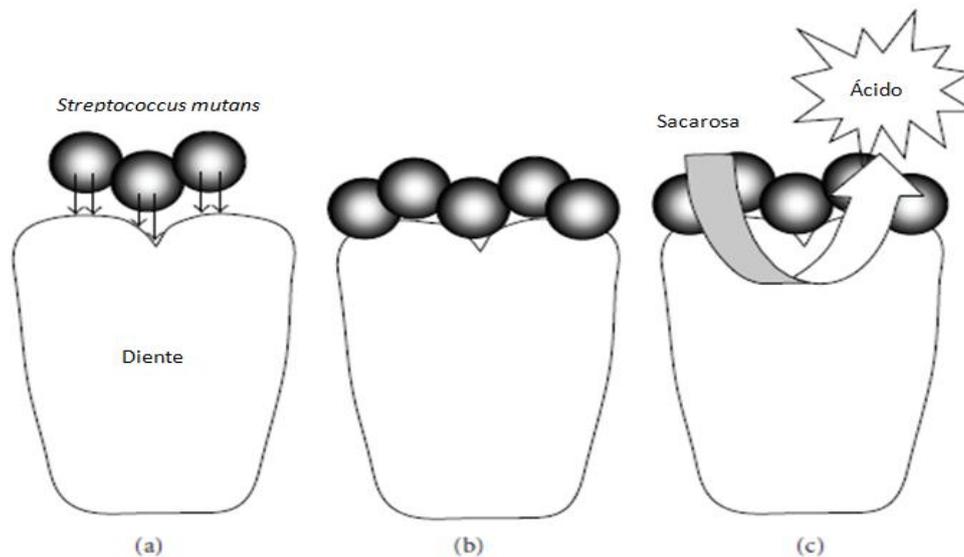
b) Especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Mouton 1995; Liébana, 2002).

La capacidad patogénica de *S. mutans* se fundamenta principalmente en sus propiedades adhesivas así como de su capacidad acidofílica, acidogénica y acidúrica además de otros mecanismos que incrementan su virulencia durante el proceso cariogénico (Gamboa *et al.*, 2004).

En el caso de *Streptococcus mutans* el proceso de adhesión se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de la sacarosa, que es mediado por la acción del sistema enzimático de las glucosiltransferasas (GTF's), responsables claves en la síntesis extracelular de dextranos (polisacárido constituyente de la matriz de la placa dental). La sacarosa es la fuente natural de energía para el sistema GTF's y es clave para catalizar la conversión de sacarosa a largas cadenas de polisacáridos (Hamada *et al.*, 1980; Loesche *et al.*, 1985).

Los dextranos son polímeros extracelulares solubles e insolubles, los cuales en su conjunto se conocen como exopolisacáridos. Estos productos bacterianos impiden la actividad de fagocitos, anticuerpos, enzimas, biodetergentes y antibióticos sobre el microorganismo productor (Padilla *et al.*, 2007).

Gamboa demostró en ensayos previos que la adición de 23% de sacarosa permite claramente la visualización de la biocapa alrededor de la colonia de *S. mutans*, y desde el punto de vista bioquímico es posible decir, que el exceso de sacarosa en el medio incrementará la actividad de las enzimas glucosil y fructosiltransferasas, enzimas responsables de la síntesis del glicocalix (Gamboa *et al.*, 2004). En la Figura 1 se ilustra el desarrollo de la caries dental.



(a) Fijación de *S. mutans*

(b) Adherencia mediada por síntesis de polisacáridos extracelulares

(c) El metabolismo de los carbohidratos resulta en la producción de ácido, lo cual lleva a la desmineralización y cavitación del diente.

Figura 1. El desarrollo de la caries dental

Por otra parte, es importante mencionar que extractos derivados de plantas han demostrado su capacidad para inhibir las diferentes etapas en la formación de las caries (fijación, adherencia, formación del biofilm y la producción de ácido) (Palombo, 2011).

2.2. El género *Bursera*

La familia Burseraceae comprende 16 géneros y 500 especies que incluyen arbustos y árboles tropicales con depósitos de secreción de gomas, resinas y aceites (esquizogenos). Las hojas de estas plantas, son alternas y provistas de glándulas. Poseen canales de oleorresina en el “liber” y a veces en la medula. *Commiphora*, *Boswellia*, *Bursera* y *Canarium* son los géneros más representativos de esta familia. Entre los productos más conocidos provenientes de especies de esta familia se encuentran la mirra, el incienso, el elemí americano y la almendra de Java (Evans, 1991).

El género *Bursera* comprende cerca de 80 especies distribuidas en zonas tropicales de Latinoamérica y Sudamérica. Algunas de sus especies son: *B. glabra* (Jacq.) Triana & Planch., *B. grandifolia* (Schltdl) Engl., *B. Graveolens* (Kunth) Triana & Planch., *B. howelli* Standl., *B. permollis* Standl. & Steyer., *B. schlechtendalii* Engl., *B. simaruba* (L.) Sarg., *B. standleyana* L. O. Williams & Cuatrec y *B. tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch. Algunas especies de este género son usadas como incienso y en la medicina tradicional (Nakanishi *et al.*, 2005). En el cuadro 1 se resume la información taxonómica y etnobotánica de *B. simaruba* y en la Figura 2 se ilustra la distribución de *B. simaruba* en la republica mexicana.

Cuadro 1. Información etnobotánica y taxonómica relacionada con *B. simaruba* modificado de Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana (Argueta *et al.*, 1994).

Familia	Burseraceae
Nombre científico	<i>B. simaruba</i>
Nombres vulgares	Indio desnudo, palo mulato, caraña, jiñote, jiñocuave y chaca.
Descripción	El árbol de <i>B. simaruba</i> (L.) Sarg mide entre 25 y 30 m de altura, sus hojas, que miden de 15 a 30 cm de largo, son alternas, imparipinnadas y poseen los pulvinudos engrosados. Las flores de este árbol son verde-amarillentas, con inflorescencias unisexuadas. Sus frutos son capsulas dupaceas, de 0.6 a 0.5 cm de largo, elipsoidales de color pardo-rojizas al madurar. El tronco posee una corteza que forma placas papiráceas, irregulares y que produce una savia resinosa, aromática (Zamora, 1999).
Distribución	Muchas de las especies de este género se localizan en el noreste de África, Arabia y América Tropical. Su distribución se extiende desde el extremo sur de los Estados Unidos de Norteamérica, hasta Venezuela, Perú y el sur de Brasil, incluyendo también áreas insulares de las Rivillagigedo, las Antillas y las Galápagos. El mayor número de especies de este género se concentra en México, distribuidas principalmente en la gran Depresión del río Balsas, que comprende una parte importante de los estados de Oaxaca, Puebla, Guerrero, Morelos y Michoacán.
Usos	La planta se ha empleado para aliviar dolores de espalda y estomago, para tratar mordeduras de serpiente, y en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen: debilidad, disentería, fiebre, gangrena, hernias, impotencia, obesidad, reumatismo, inflamaciones, enfermedades venéreas, llagas, nefritis, cistitis, tumores, cálculos renales, diarrea y cáncer gástrico. Esta especie también se ha utilizado como afrodisiaca, depilatoria, diaforética, diurética, expectorante, purgativa, antiséptica y repelente de insectos (Zamora, 1999).



Figura 2. Distribución geográfica en México de *B. simaruba* (modificado de Argueta *et al.*, 1994).

Cabe señalar que *Bursera simaruba* es un árbol que habita en climas cálido, semicálido y templado. Las ramas, flores, frutos y la resina (Figura 3) se utilizan con fines medicinales para el tratamiento de diversos padecimientos. Por otra parte, la resina se utiliza también como sustituto de goma arábica.



Figura 3. *Bursera simaruba* (modificado de CONABIO, 2011)

2.2.1. Estudios fitoquímicos realizados sobre especies del genero *Bursera*.

Las especies del género *Bursera* (Burseraceae) son de relevancia en la medicina tradicional mexicana y poseen múltiples usos domésticos en la región central de México, en donde se encuentran cerca de 70 especies endémicas, de las cuales 18 crecen abundantemente. Algunas especies son muy relevantes en el sistema local etnobotánico, debido a sus cualidades aromáticas y su aplicación etnomédica contra diarrea, fiebre, gingivitis, resfriado y sarampión (Hernández *et al.*, 2005).

Especies de este género, como *B. ariensis*, producen exudados que contienen derivados de lignanos, y otras como *B. delpechiana* contienen triterpenos, mientras otros miembros del genero *Bursera* producen flavonoides glicosilados (Hernández *et al.*, 2005).

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

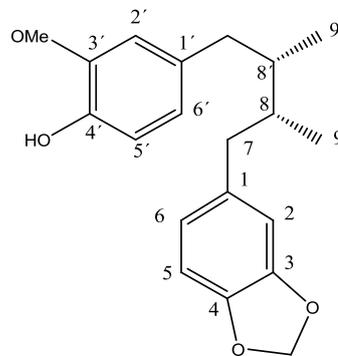
Investigaciones recientes sobre los constituyentes químicos de las diferentes especies del genero *Bursera* han dado como resultado el aislamiento de triterpenos, lignanos del tipo de las podofilotoxinas y flavonoides (Peraza y Peña, 1992).

2.2.2. Actividad antibacterina de lignanos sobre *S. mutans*.

En un estudio fitoquímico realizado sobre la especie *Myristica fragans* (nutmeg) se encontró que el extracto de esta nuez una fuerte actividad inhibitoria contra *S. mutans*. Como resultado de esta investigación se logró aislar e identificar el macelignano (**1**) como el compuesto responsable de la actividad inhibitoria del crecimiento de *S. mutans* con una CMI de 3.9 µg/mL. Es importante destacar que la CMI reportada es comparable al reportado en la literatura para agentes anticariogénicos naturales como lo son: sanguinarina (15.6 µg/mL), eucaliptol (250µg/mL), mentol y timol (500 µg/mL) y metil salicilato (1000 µg/mL) (Chung *et al.*, 2004).

En el estudio se determinó que el macelignano (**1**) posee actividad sobre otros microorganismos orales como son *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* con concentraciones mínimas inhibitorias en un rango de 2-31.3 µg/mL.

Por otra parte, el ensayo bactericida realizado mostró que el macelignano (**1**) a una concentración de 20 µg/mL inactiva completamente a *S. mutans* en 1 minuto. La actividad específica y rápida eficacia del macelignano (**1**) contra la bacteria sugiere que podría emplearse como un agente antibacteriano natural en alimentos o productos de higiene bucal (Chung *et al.*, 2004).



macelignano (**1**)

Figura 4. Estructura química del compuesto aislado y caracterizado de *M. fragans*

El estudio realizado sobre la especie *Walsura robusta*, permitió el aislamiento de dos lignanos glucosídicos con actividad antioxidante, antibacteriana y anti-giardia, el (+)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosido (**2**) y el (-)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosido (**3**). El ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos derivados de las ramas y las hojas permitieron determinar la actividad de los extractos sobre bacterias Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* (Supayang *et al.*, 2009).

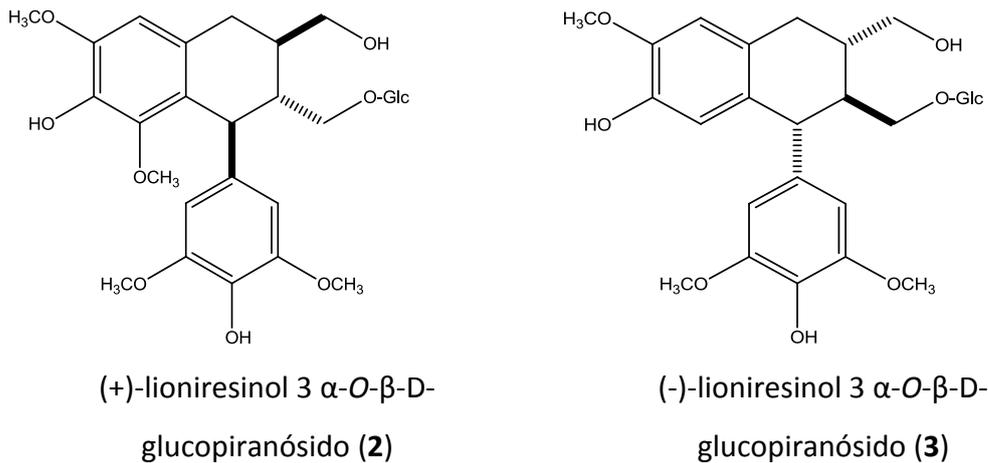


Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *W. robusta*

Por otro lado, es importante destacar que las especies *B. suntui* Toledo y *B. kerberi* Engler han sido objeto de estudios fitoquímicos, realizados en nuestro país. La primera es un árbol pequeño de 2-3 metros de altura, que tiene una corteza marrón rojiza oscura y crece en bosques tropicales secos localizados en el oeste de México. Por otra parte, *B. kerberi* es un árbol de crecimiento rápido y de tamaño mediano, que mide de 6 a 14 metros de altura y que crece abundantemente en los bosques tropicales del oeste y centro de México. Las ramas de esta especie son usadas para hacer cercas para casas, puesto que tienen la capacidad de rebrotar y tienden a echar raíz, para luego mudarse. Cuando ambas especies son dañadas, sus tejidos producen de inmediato una copiosa emisión de fluidos (Hernández *et al.*, 2005).

2.2.3. Estudios sobre *B. suntui*

El estudio fitoquímico realizado sobre *B. suntui* condujo al aislamiento de cuatro nuevos productos naturales, derivados del verticilano: el (+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol (**4**), el (+)-20-acetato de verticilan-3,7-dien-12-ol (**5**), el (+)-verticilan-3,7,12(18)-trieno (**6**), el (-)-verticilan-4(20),7,11-trieno (**7**) y el (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (**8**) (Hernández *et al.*, 2005).

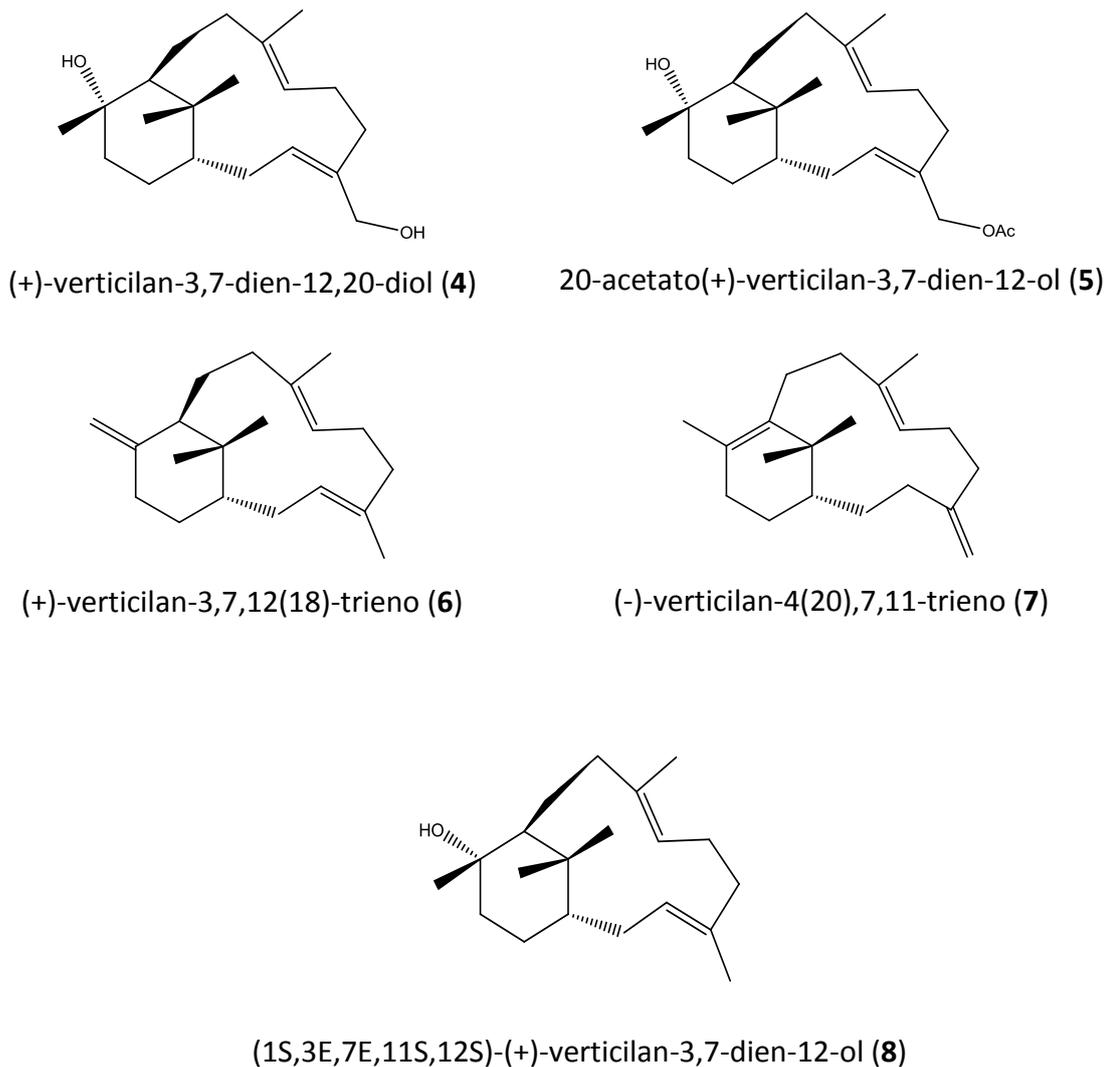
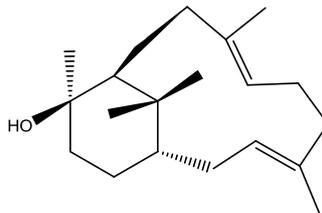


Figura 6. Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *B. suntui* (Hernández *et al.*, 2005).

2.2.4. Estudios sobre *B. kerberi*

El estudio fitoquímico de *B. kerberi* permitió la purificación de un nuevo derivado del verticilano, el (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*R*)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol (**9**), además de los compuestos **3** y **4** (Hernández *et al.*, 2005).



(1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*R*)-(+)-verticilan-
3,7-dien-12-ol (**9**)

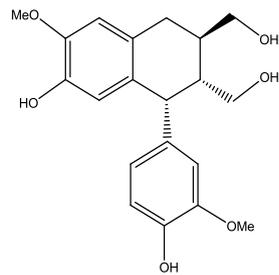
Figura 7. Compuesto aislado de *B. kerberi* (Hernández *et al.*, 2005).

Es importante destacar que los derivados de verticilano, como los compuestos purificados de *B. suntui* y *B. kerberi*, constituyen un grupo relevante de diterpenos, cuyo esqueleto hidrocarbonado parece ser el precursor biogénico de los taxanos. De hecho, en un trabajo reciente se propuso que el mecanismo de ciclización de un intermediario de verticilano, a través de un carbocación del tipo verticilen-12-il, es uno de los pasos claves en la biosíntesis de los taxanos (Jin *et al.*, 2005).

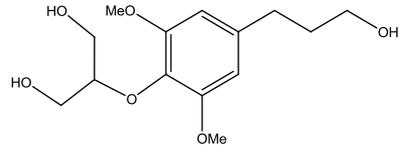
2.2.5. Estudios sobre *B. tonkinensis*

El estudio fitoquímico biodirigido de la raíz de *B. tonkinensis*, Guillaum condujo al aislamiento de 12 compuestos, de los cuales 3 resultaron ser nuevos metabolitos secundarios: el burselignano (**10**), el bursefenilpropano (**11**) y el burseneolignano (**12**).

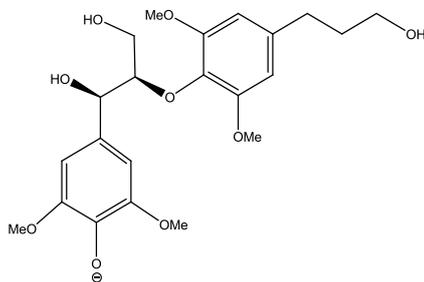
De manera adicional, se purificaron compuestos conocidos como el (+)-isolariciresinol (**13**), el 5-metoxi-(+)-isolariciresinol (**14**) y la 4'-dimetil-desoxipodofilotoxina (**15**), esta última con actividad citotóxica (Jutiviboonsuk, 2005).



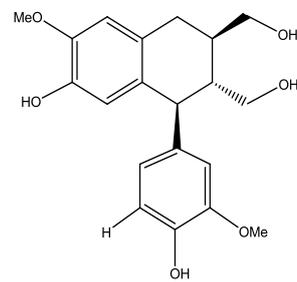
burselignano (10)



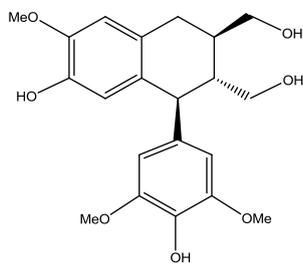
bursenilpropano (11)



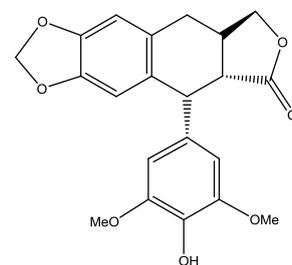
burseneolignano (12)



(+)-isolariciresinol (13)



5-metoxi-(+)-isolariciresinol (14)



4'-dimetildeso-podofilotoxina (15)

Figura 8. Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *B. tonkinensis* (Jutiviboonsuk, 2005).

2.2.6. Estudios sobre *B. graveolens*

Con respecto a *B. graveolens*, a partir de sus hojas se purificó el 3-O- α -L-ramnopiranosido de luteolina y tres de sus derivados acilados, además de cuatro flavonoides glicosilados (Nakanishi *et al.*, 2002). Posteriormente, se aislaron la picropoligamaina (**16**) y la burseranina (**17**), un lignano del tipo de la podofilotoxina (Nakanishi *et al.*, 2005).

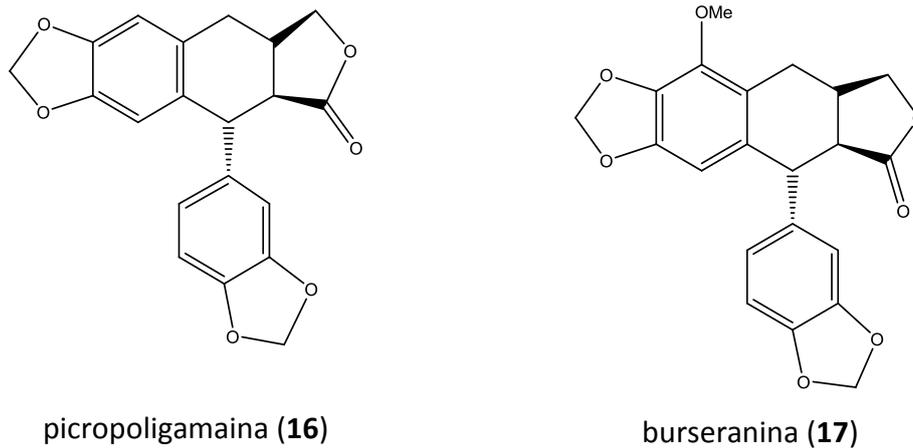
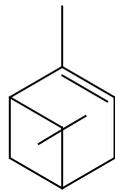


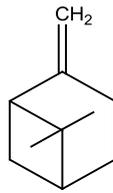
Figura 9. Estructuras químicas provenientes de *B. graveolens*

2.3. Estudios fitoquímicos previos de la corteza de *B. simaruba*

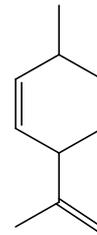
B. simaruba (L.) Sarg. es una de las especies del género *Bursera* que se ha investigado en México. En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), se realizó el estudio fitoquímico de la planta el cual permitió el aislamiento de la elemicina y el amireno. Durante este estudio se demostró que el extracto clorofórmico de la resina de *B. simaruba* tiene actividad citotóxica sobre el crustáceo *Artemia salina*. A partir de este extracto se purificó, mediante sucesivas cromatografías, la picropoligamaina (**16**) (Peraza y Peña, 1992), un lignano previamente aislado de la resina de *Commiphora incisa* (Burseraceae). Además de que los aceites presentes en la corteza de *B. simaruba* contienen una significativa cantidad de monoterpenos entre los cuales destacan el α -pineno (**18**), β -pineno (**19**) y el isolimoneno (**20**) (Grace-Ann *et al.*, 2008).



α -pineno (**18**)



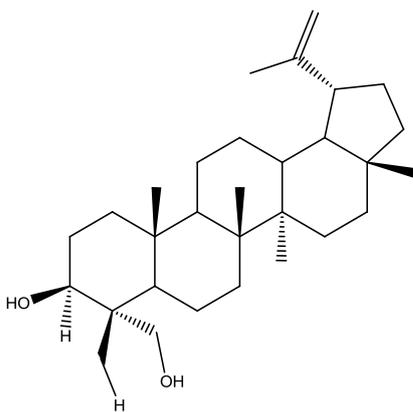
β -pineno (**19**)



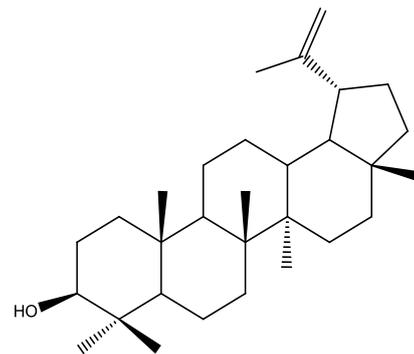
isolimoneno (**20**)

Figura 10. Monoterpenos aislados de *B. simaruba*

Adicionalmente, a partir de la resina, se purificó el 20 (29)-lupen-3 β , 23-diol (**21**), un nuevo triterpeno de tipo lupano, y los triterpenos ya conocidos: el lupeol (**22**), el epilupeol, el epiglutinol, la α -amirina y la β -amirina (Peraza *et al.*, 1995).



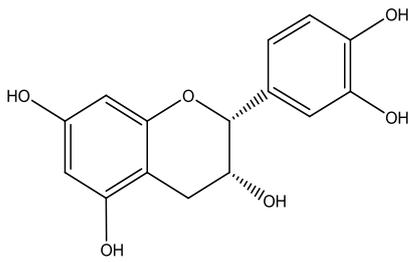
20(29)-lupen-3 β ,23-diol (**21**)



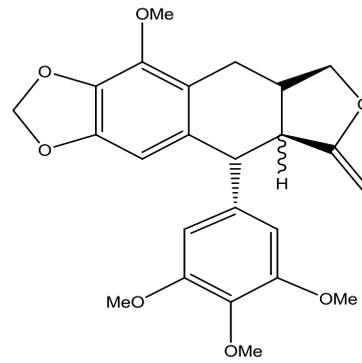
lupeol (**22**)

Figura 11. Estructuras químicas aisladas en estudios previos de *B. simaruba*

Otro estudio realizado previamente reporta la purificación del flavonoide 5,6,3',4'-tetrahidroxiflavanol (**23**) a partir del extracto con acetato de etilo de la corteza de *B. simaruba*. En tanto que, a partir de el extracto acuoso de la corteza se identificaron taninos condensados. En este mismo trabajo se purifico la metil- β -peltatina A (**24**) a partir del extracto hexánico de las hojas (Castro *et al.*, 1999).



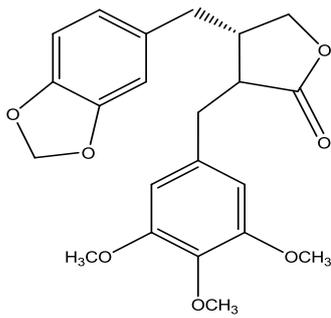
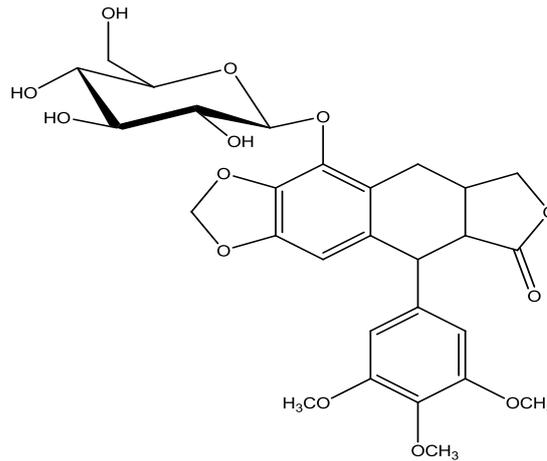
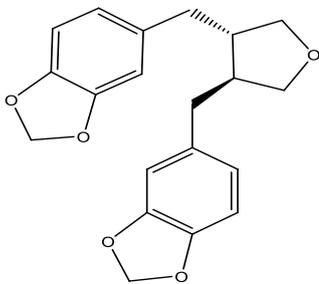
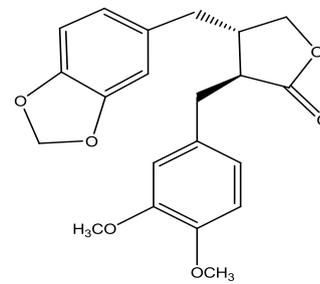
5,6,3',4'-tetrahydroxiflavanol (**23**)



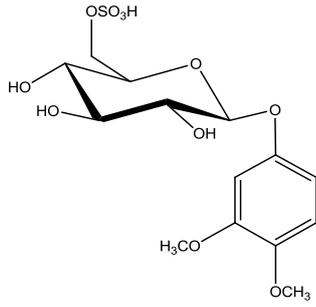
metil-β-peltatina A (**24**)

Figura 12. Estructuras provenientes de la corteza de *B. simaruba*

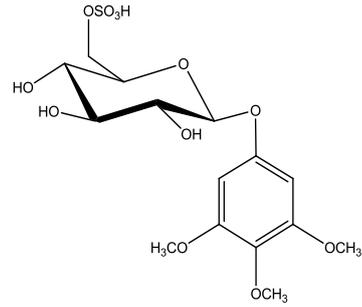
La investigación fitoquímica realizada sobre la corteza de *B. simaruba* permitió el aislamiento de 11 compuestos. Cuatro lignanos ya conocidos: yateina (**25**) (Ciccio y Rosales, 1995), β-peltatina-O-β-D-glucopiranosido (**26**) (Rashid *et al.*, 2000; Broomhead y Dewick, 1990 a, 1990 b; von Wartburg *et al.*, 1957), hinokinina (**27**) (Kiralj *et al.*, 2007) y bursehernina (**28**) (Estévez-Braun *et al.*, 1996).

Yateína (**25**) β -peltatina-O- β -D-glucopiranósido (**26**)hinokinina (**27**)bursehernina (**28**)**Figura 13.** Estructuras provenientes de la corteza de *B. simaruba*.

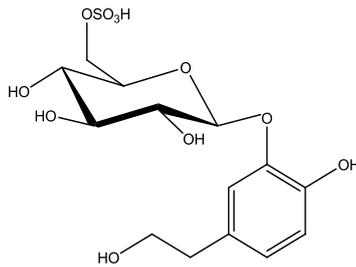
Por otra parte, se obtuvieron siete compuestos fenólicos de entre los cuales destacan tres compuestos nuevos: el 3,4-dimetoxifenil-1-O- β -(6-sulfo)-glucopiranósido (**29**), el 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- β -(6-sulfo)-glucopiranósido (**30**) y 3,4-dihidroxifeniletanol-1-O- β -D-(6-sulfo)-glucopiranósido (**31**). Los compuestos conocidos fueron la escopoletina (**32**) (Żoelek *et al.*, 2003), floroacetofenona-4-neohesperidosido (**33**) (Horowitz y Gentili, 1963), 4-acetil-3,5-dihidroxifenil- β -D-glucopiranósido (**34**) (Chosson *et al.*, 1997) y por último la picraquassiosida D (**35**) (Yoshikawa *et al.*, 1995).



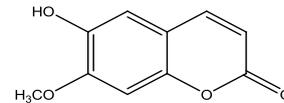
3,4-dimetoxifenil-1-O- β -(6-sulfo)-
glucopiranosido (29)



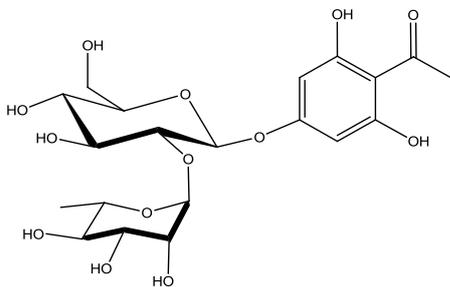
3,4,5-trimetoxifenil-1-O- β -(6-sulfo)-
glucopiranosido (30)



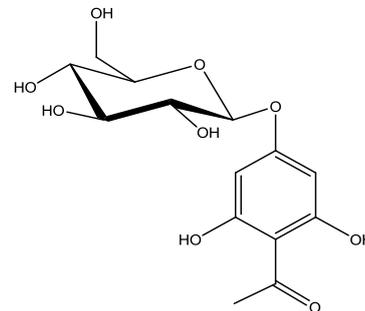
4-dihidroxifeniletanol-1-O- β -D-(6-sulfo)-
glucopiranosido (31)



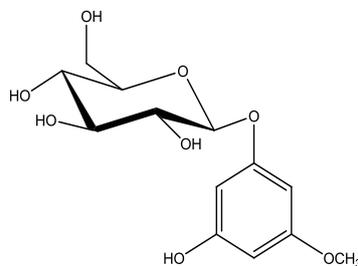
escopoletina (32)



floroacetofenona- 4-neohesperidósido (33)



4-acetil-3,5-dihidroxifenil- β -D-
glucopiranosido (34)



picraquassiosida D (35)

Figura 14. Estructuras provenientes de la corteza de *B. simaruba*

2.4. Estudios farmacológicos previos realizados sobre especies del genero *Bursera*

Se ha demostrado que las especies de la familia Burseraceae contienen compuestos con actividad antiinflamatoria (Duwiejua *et al.*, 1993). De manera particular, las especies del género *Bursera* han sido objeto de estudios farmacológicos, en los que se ha demostrado que los extractos crudos y algunos de los metabolitos secundarios purificados a partir de especies de este género presentan diversas actividades farmacológicas, tales como actividad antiinflamatoria, citotóxica, antibacteriana y antihemorrágica (Camporese *et al.*, 2003; Nakanishi *et al.*, 2005 y Jutiviboonsuk, 2005; *inter alia*).

El extracto de diclorometano preparado a partir de las raíces de *B. tonkinensis*, presenta actividad citotóxica contra células KB (carcinoma de epidermis de la boca) con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 4.1 µg/mL (Jutiviboonsuk, 2005). A partir de este extracto, se purificó el principio activo que resultó ser la 4'-dimetil-desoxi-podofilotoxina (**15**), la cual presentó un efecto citotóxico significativo contra las líneas celulares KB, Col2 (colon) y LNCaP (próstata) (Jutiviboonsuk, 2005).

A partir de *B. graveolens* se purificaron la burseranina (**17**) y la picropoligamaina (**16**), ambos compuestos con actividad citotóxica significativa. La picropoligamaina (**16**) mostró potencial citotóxico en cuatro líneas celulares, A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho), HT-29 (colon) y HT1080 (células de fibrosarcoma) en el Cuadro 2 se muestra la actividad citotóxica de algunas especies del genero *Bursera*.(Nakanishi *et al.*, 2005).

El estudio biodirigido utilizando las larvas del crustáceo *A. salina* realizado sobre la resina del palo mulato permitió la purificación de la picropoligamaina (**16**) (Peraza *et al.*, 1995).

Cuadro 2. Actividad de los compuestos aislados de diferentes especies del género *Bursera*.

Especie	Compuesto aislado	Uso o actividad	Ensayos	Referencia
<i>B. tonkinensis</i>	4'-dimetil-desoxipodofilotoxina (15)	citotóxica	contra células KB , Col2 (colon) y LNCaP (próstata)	(Jutiviboonsuk, 2005)
<i>B. graveolens</i>	burseranina (17) y la picropoligamaina (16)	citotóxica	contra células A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho), HT-29 (colon) y HT1080 (células de fibrosarcoma)	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2005).
<i>B. simaruba</i>	picropoligamaina (16)	citotóxica	contra <i>A. salina</i> , células tumorales humanas, A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho) y HT-29 (colon)	(Peraza y Peña, 1992).

Por último, con relación al efecto citotóxico producido por los lignanos purificados a partir de *B. tonkinensis*, *B. graveolens* y *B. simaruba*, es importante hacer notar que estos compuestos son análogos estructurales de la podofilotoxina, uno de los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de cáncer de ovario, de mama, de pulmón, de próstata y de estómago (Kikkawa *et al.*, 2006; Dang, 2006 y Massarelli, 2006;). Los lignanos poseen también actividad antiviral (Castro *et al.*, 2003; Uchide *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2005).

Debido a la diversa gama de acciones biológicas que presentan estos compuestos, especialmente debido a su gran eficacia como agentes citotóxicos, en la actualidad se están investigando nuevos métodos de síntesis (You, 2005) biotecnológicos (Ji *et al.*, 2006) para la producción más efectiva de lignanos biológicamente activos.

En un estudio realizado sobre la especie *B. simaruba*, se demostró que el extracto hexánico preparado a partir de las hojas inhibe el desarrollo de las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas ferruginosa*.

Este estudio permitió el aislamiento del triterpenoide lupeol (**22**), este compuesto demostró actividad *in vitro* contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas pyocyanea*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* y *Bacillus subtilis*) (Camporese *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha reportado que el extracto metanólico de las hojas y las ramas jóvenes poseen un efecto antibacteriano contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En el caso de los extractos de las hojas y las ramas, los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron mayores a 1024 µg/mL para *E. coli* y 8 µg/mL para *S. aureus*. El extracto metanólico de las ramas jóvenes presentó una CMI mayor a 1024 µg/mL para *E. coli* y una CMI = 64 µg/mL para *S. aureus* (Yasunaka *et al.*, 2005). Otra especie del género *Bursera* a la cual se le ha demostrado actividad antibacterial es la *B. orodata* que inhibe significativamente el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* (Hernández, 2005). Las actividades antimicrobianas presentadas por plantas del género *Bursera* sustentan su uso en la medicina tradicional de México y Centro América para curar heridas profundas y superficiales (Camporese *et al.*, 2003).

Evaluaciones previas realizadas con la finalidad de investigar el efecto antiinflamatorio sobre la *B. simaruba* permitieron determinar que los extractos derivados a partir de la corteza de palo mulato, utilizando disolventes de diferente polaridad, poseen efectos antiinflamatorios significativos (Sosa *et al.*, 2002). Las hojas del palo mulato, al parecer también contienen compuestos antiinflamatorios, ya que se ha demostrado que el extracto hexánico de las hojas alivia los edemas inducidos por carragenina en las orejas de ratones, cuando se aplica tópicamente. Asimismo, la administración oral de este extracto inhibe la inflamación inducida en ratas. En este mismo trabajo se encontró que la actividad antiinflamatoria presentada por el extracto hexánico de las hojas se concentraba en una fracción cromatográfica, cuyo componente mayoritario era la metil-β-peltatina A (**24**), lo cual sugiere que este compuesto podría ser uno de los principios activos responsables de la actividad antiinflamatoria de *B. simaruba* (Castro *et al.*, 1999).

Es importante destacar que en el Continente Africano, particularmente en Nigeria, la corteza de *B. simaruba* se utiliza sola o mezclada con aloe (*Aloe vera*), vitamina E y caléndula (*Calendula officinalis*) para elaborar una crema tópica, eficaz para tratar soriasis, mordeduras de insectos y hongos en la piel (Noguera *et al.*, 2004). El preparado fue sometido a un estudio (doble-ciego) realizado en el Jos University Teaching Hospital. Para realizar este estudio se eligieron a ocho pacientes con eccema (afección en la piel con manchas irregulares y rojizas) crónico y con dermatitis, caracterizada por inflamación, comezón e hiperpigmentación y se demostró que la aplicación de una preparación elaborada a partir de la corteza de *B. simaruba*, aplicada dos veces al día por un periodo de tres semanas revierte por completo los síntomas en todos los pacientes (Noguera *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACION

Las enfermedades de la cavidad oral no siempre son atendidos con la debida seriedad. Además de que los programas existentes se enfocan a la corrección y no a la prevención del problema. Otra de las causas que se enfrentan, es el uso excesivo y a la automedicación de los antibióticos, lo cual ha incrementado la aparición de bacterias resistentes, la disminución en la eficacia de los tratamientos, y ha limitado su rango terapéutico contra patógenos ocasionando que los tratamientos se vuelvan más costosos, invasivos, peligrosos e ineficientes. 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 alternativa 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.

Uno de los productos naturales más utilizados como un agentes antimicrobianos son las plantas medicinales y se ha encontrado que representan una fuente potencial de compuestos con actividad contra *Streptococcus mutans* (bacteria cariogénica).

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar el potencial antimicrobiano contra *S. mutans* del palo mulato y aislar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del extracto metanólico proveniente de la corteza de *Bursera simaruba* sobre el crecimiento de la especie cariogénica *S. mutans*.
- Aislar, purificar y caracterizar los compuestos bioactivos a partir del extracto derivado de la corteza de *B. simaruba* mediante la aplicación de métodos fitoquímicos y cromatográficos.
- Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados frente a *Streptococcus mutans*.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Material vegetal

La corteza de *B. simaruba* se compró en el Mercado de Sonora en la Ciudad de México. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2. Procedimientos Generales

5.2.1. Análisis Cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) tamaño de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con, vainillina sulfúrica al 1 % seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos. La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kiesegel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM empacado en columnas de vidrio (5 x 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución.

5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizaron en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H 400 MHz) y de carbono 13 (RMN-¹³C, 100 Hz) se realizaron en un equipo marca Varian modelo VNMRS. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV mediante técnica de impacto electrónico (EM/IE).

Los espectros se realizaron utilizando CD_3OD y CDCl_3 y tetrametilsilano (TMS) como referencia, reportando los desplazamientos químicos en ppm.

5.3. Estudio químico de *B. simaruba*

5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de *B. simaruba*

Se utilizaron 5 Kg de la corteza de *B. simaruba* para la extracción con metanol (5 L) mediante un proceso de maceración durante una semana a temperatura ambiente. El proceso se repitió tres veces en un período de tiempo de tres semanas. Al término de cada proceso de extracción el material vegetal se filtró y el extracto resultante se concentró al vacío para recuperar el disolvente.

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

El extracto metanólico se sometió a un proceso de partición con 500 mL de diclorometano y 500 mL de AcOEt ambos por triplicado, para después concentrar al vacío cada partición. Se realizó una CCF y observando las respectivas cromatoplasas se tomó la decisión de trabajar con el extracto proveniente de la partición con diclorometano.

5.3.3. Fraccionamiento cromatográfico de la partición de diclorometano de la corteza de *B. simaruba*.

La partición de diclorometano se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en columna abierta de gel sílice utilizando como eluyente diclorometano-metanol a diferentes proporciones. Se recolectaron 122 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica. Obteniéndose un total de 10 fracciones combinadas.

5.3.4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F5.

La fracción F5 se sometió a un fraccionamiento cromatográfico en columna abierta de gel sílice utilizando como fase móvil diclorometano-acetona a diferentes proporciones. Se recolectaron 220 fracciones de 25 mL cada una, las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica. Obteniéndose un total de 20 fracciones combinadas. A partir de la fracción F-4 se logró el aislamiento del compuesto BS1 y a partir de la fracción F-18 se aisló el compuesto BS2. En el diagrama 1 resume el proceso de extracción y fraccionamiento y aislamiento de los compuestos a partir del extracto metanólico de la corteza de *B. simaruba*.

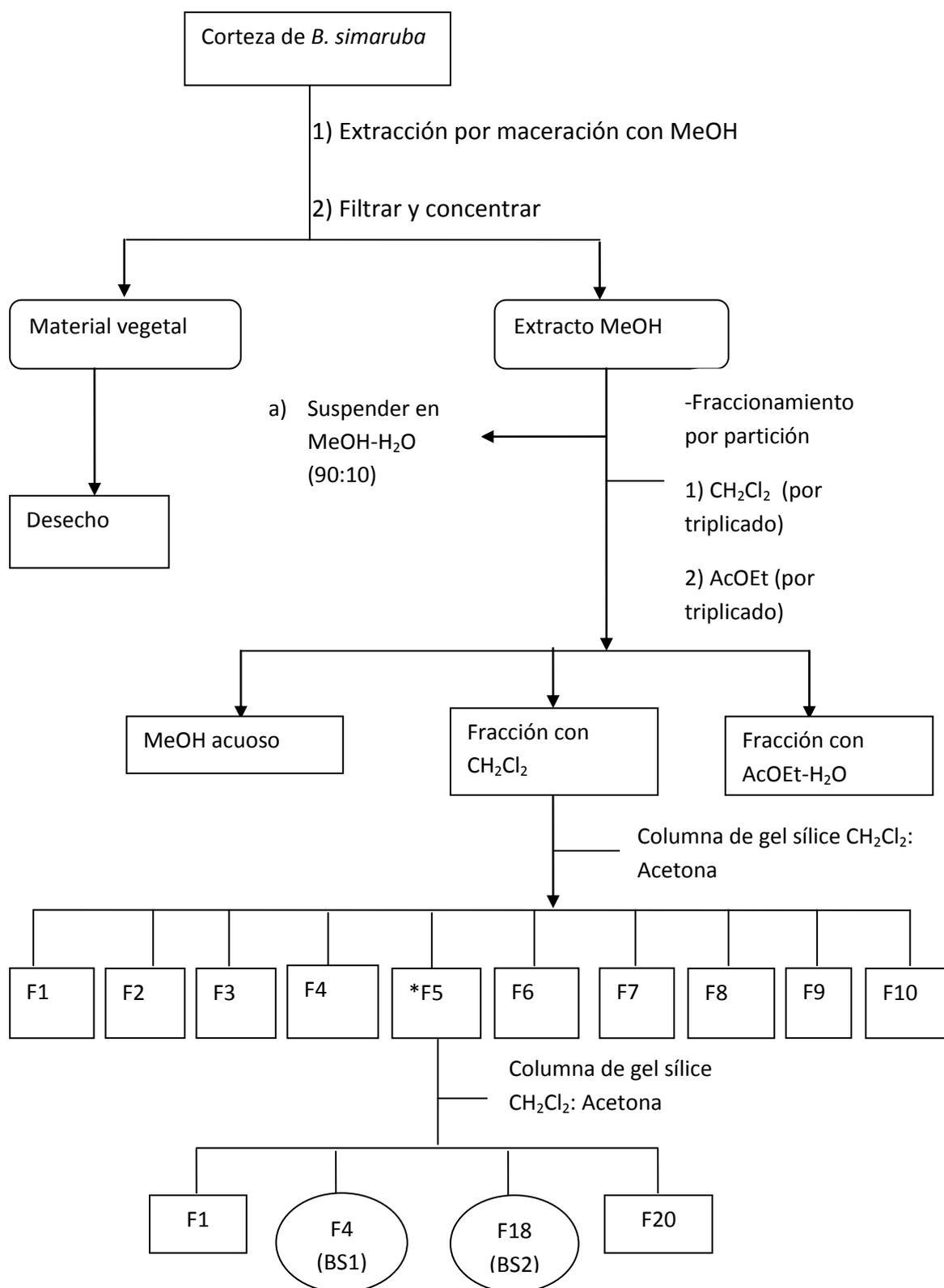


Diagrama 1. Extracción de la corteza de *B. simaruba*

Cuadro 3. Fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta fracción primaria de diclorometano derivada del extracto de *B. simaruba*.

Eluyente	Proporción (%)	Numero de Fracciones	de Fracciones combinadas
CH ₂ Cl ₂	100	1-12	F1
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:20	13-21	F2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:50	22-34	F3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	35-46	F4
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	85:15	47-55	F5
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	56-68	F6
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	69-84	F7
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	60:40	85-97	F8
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	98-110	F9
MeOH	100	110-122	F10

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario utilizando cromatografía en columna abierta de la fracción F5 de *B. simaruba*.

Eluyente	Proporción (%)	Numero de Fracciones	de Fracciones combinadas
CH ₂ Cl ₂	100	1-10	F1
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	98:2	11-22	F2
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	97:3	23-35	F3
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	96:4	36-48	F4 (BS1)
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	95:5	49-60	F5
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	94:6	61-68	F6
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	93:7	69-76	F7
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	92:8	77-88	F8
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	91:9	89-101	F9
Acetona	90:10	102-114	F10

Cuadro 5. Fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta de la fracción F5 de *B. simaruba* (continuación).

Eluyente	Proporción (%)	Numero de Fracciones	de Fracciones combinadas
CH ₂ Cl ₂	85:15	115-122	F11
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	80:20	123-132	F12
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	75:25	133-144	F13
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	70:30	145-157	F14
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	65:35	158-170	F15
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	60:40	171-179	F16
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	55:45	180-190	F17
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	50:50	191-200	F18 (BS2)
CH ₂ Cl ₂ -Acetona	30:70	201-212	F19
Acetona	100	213-220	F20

5.4. Ensayos biológicos

5.4.1. Microorganismos de prueba

Para realizar el ensayo biológico de los compuestos aislados de la corteza de *B. simaruba* se utilizó el microorganismo *Streptococcus mutans* (ATCC 10499) por tratarse de el principal el patógeno oral causante de la caries dental. Para desarrollar a *S. mutans* se utilizó caldo infusión de cerebro-corazón como medio de cultivo.

5.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la actividad antibacteriana de los compuestos ó Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos. El cultivo del microorganismo fue incubado por una noche, posteriormente se centrifugo a 10 000 rpm x 10 minutos se lavo 2 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) y se resuspendió en la misma solución. La suspensión celular se ajustó con un espectrofotómetro (marca Agilent, modelo 8453E) de forma tal que cada pozo contuviera 5×10^5 (UFC/mL) de *S. mutans*.

Se trabajaron las muestras por triplicado para cada concentración de prueba, utilizando diferentes controles.

Cuadro 6. Controles para el ensayo biológico

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control de disolvente	Con inculo	-	37 °C
Control negativo	Con inculo	-	37 °C
Blanco	Sin inculo	-	37 °C
Control positivo	Con inculo	Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12 %	37 °C

5.4.3. Procedimiento general del ensayo

Se adicionaron 100 µl de medio BHI en todos los canales mas 100 µl de los componentes a probar BS1 Y BS2 con una concentración de 2 µg/mL en el pozo del primer canal, de igual forma se adicionaron 100 µl del control positivo (gluconato de clorhexidina 0.12 %).

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas, este proceso se realizó, transfiriendo 100 µl, de pozo en pozo, desechando los últimos 100 µl, del último pozo. A continuación, se adicionaron 80 µl de medio con 1% de sacarosa, en todos los pozos, y finalmente 20 µl de la suspensión previamente ajustada de *S. mutans* en cada pozo.

Las placas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37°C, en una incubadora Labnet 211DS para finalmente determinar espectroscópicamente el crecimiento de la bacteria utilizando un lector de placas Bio-Rad (A_{660} nm).

5.4.4. Agregación de *S. mutans* en presencia de dextran T2000

La agregación de *S. mutans* en presencia de dextran se evaluó utilizando el método descrito por Murchison y colaboradores (1981). El método consiste en medir la agregación de concentrado de células de *S. mutans* (D.O. 0.8 a 550 nm). Para medir el efecto de los extractos o compuestos puros sobre la agregación estos se incubaron a diferentes concentraciones por un período de una hora a 37 °C y posteriormente se le adicionó dextran. Los controles de disolvente y negativo consistieron en incubar a la bacteria en presencia de 1% (v/v) de etanol al 95% y sin etanol. Como control positivo se utilizó el alcaloide sanguinarina el cual se ha determinado previamente inhibe la agregación de *S. mutans* (Wu *et al.*, 1995). Para registrar la agregación se utilizó la escala previamente descrita por Murchison y colaboradores (1981). La escala consiste en asignarle valores en un rango de 0 a 4 a la suspensión dependiendo de la agregación observada. Al medio de cultivo inoculado se le asigna 0; 1+, grupo de células ligeramente visible en el medio turbio; 2+ grupo de células fácilmente visible en el medio turbio; 3+, grupo de células bien definidas en el fluido claro; 4+, grupo de células floculadas notorio en el medio transparente. (Murchison *et al.* 1981).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

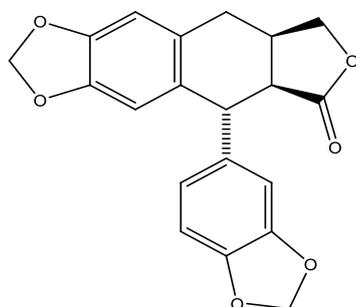
Estudios previos realizados utilizando extractos de la corteza de *B. simaruba* (palo mulato) han demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos. El extracto preparado de la especie además de poseer un efecto antimicrobiano presenta una buena opción en el tratamiento de dolores, erupciones, quemaduras, eccema, hiperpigmentación, dermatitis e infecciones de la cavidad oral de manera preliminar y parcial (Noguera *et al*, 2004).

La selección de la especie *B. simaruba* se realizó con base en el amplio uso de esta en la medicina tradicional; uno de los múltiples usos de la especie es el tratamiento de infecciones orales por lo que este estudio se enfocó biológicamente en esa dirección y durante la realización de los ensayos biológicos preliminares se estableció que el extracto preparado a partir de la corteza de *B. simaruba* inhibe el crecimiento de la bacteria *S. mutans* agente etiológico de la caries. La determinación del potencial antibacteriano del extracto de la corteza de *B. simaruba*, se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita (Rivero-Cruz *et al.*, 2008). Los resultados de la evaluación indicaron que el extracto preparado a partir de la corteza de *B. simaruba* presentaba una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/mL para *S. mutans*. Cabe mencionar que un extracto vegetal es considerado activo si presenta una CMI menor a 1000 µg/mL (Wu *et al.*, 2002; Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

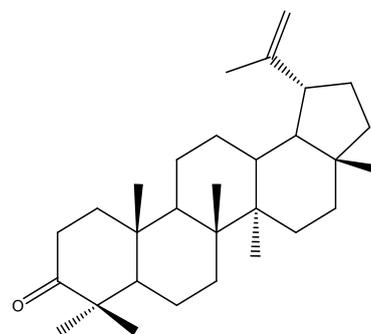
Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de la corteza de *B. Simaruba* con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada para el extracto total.

La preparación del extracto activo en gran escala se realizó mediante un proceso de maceración. Se utilizaron 5kg de la corteza de *B. simaruba* para la extracción con metanol (5L). Este proceso se repitió una vez cada semana durante tres semanas. Posteriormente se realizó una partición con 500 mL de diclorometano y 500 mL de AcOEt para después concentrar al vacío cada partición.

Observando las respectivas cromatoplasmas se tomó la decisión de trabajar con el extracto proveniente de la partición con diclorometano para la cual se montó una columna de gel sílice con un sistema de elución de CH_2Cl_2 -MeOH de aquí se obtuvo la fracción activa F5 que de igual manera se sometió a un fraccionamiento en columna de gel sílice obteniéndose un total de 20 fracciones combinadas y de estas la fracción F4 y F18 fueron purificadas obteniéndose los compuestos BS1 (lupenona) y BS2 (picropoligamaina). Los compuestos fueron caracterizados mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura (Peraza y Peña, 1992).



picropoligamaina (I)



lupenona (II)

Figura 15. Compuestos aislados a partir de la corteza de *B. simaruba* picropoligamaina (I) y lupenona (II).

Cuadro 7. Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de la corteza de *B. simaruba* sobre *S. mutans*.

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
	<i>S. mutans</i>
picropoligamaina	7.8
lupenona	>1000
clorhexidina	3.2

Al comparar la actividad antimicrobiana obtenida para la picropoligamaina (I) y la lupenona (II) con la correspondiente clorhexidina observamos que esta última presenta una concentración mínima inhibitoria menor con respecto a la picropoligamaina. Por otra parte, estudios previos reportan el potencial citotóxico de este lignano sobre cuatro líneas celulares cancerosas: A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho), HT-29 (colon) y HT1080 (células de fibrosarcoma) (Nakanishi *et al.*, 2005). Otros estudios reportan el aislamiento de este compuesto a partir de la especie *Euphorbia segetalis* L. (Euphorbiaceae) y su actividad antiviral sobre los serotipos HSV-1 y HSV-2 del virus del herpes simple con concentraciones de $5\mu\text{g/mL}$ (Madureira *et al.*, 2003).

Posteriormente, Wal y colaboradores reportan su actividad sobre las especies de hongos levaduriformes *C. glabrata* y *C. neoformans* con concentraciones en un rango de $32\text{-}64\ \mu\text{g/mL}$ y para *C. krusei* de $64\ \mu\text{g/mL}$ (Wal *et al.*, 2010, Madureira *et al.*, 2003).

Por otra parte, es importante destacar que al triterpenoide lupenona se le ha descrito actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (MIC = $2.8\ \mu\text{g/mL}$), *B. subtilis* (MIC = $1.4\ \mu\text{g/mL}$), *E. faecium* (MIC = $5.6\ \mu\text{g/mL}$), *L. plantarum* (MIC = $11.3\ \mu\text{g/mL}$), *E. coli* (MIC = $2.8\ \mu\text{g/mL}$), *S. typhimurium* (MIC = $22.5\ \mu\text{g/mL}$) y *K. pneumoniae* (MIC = $22.5\ \mu\text{g/mL}$) (Supaluk *et al.*, 2010).

Por último, es importante mencionar que el antibiótico clorhexidina posee efectos adversos como son el incremento en el sarro de los dientes, tinción del dorso de la lengua; manchado o decoloración de los dientes, boca, empastes y dentaduras u otros aparatos en la boca lo cual ha impulsado la búsqueda de nuevos agentes con actividad antibacteriana de origen natural. Por otra parte, ocasiona aunque con menor frecuencia la irritación de la cavidad oral, hinchazón en los costados de la cara o el cuello e irritación de la punta de la lengua (Palombo., 2011).

Con la finalidad de obtener mayor información sobre los posibles mecanismos de acción del extracto y los compuestos sobre el crecimiento y la agregación de *S. mutans* se decidió determinar su efecto sobre la agregación la bacteria en presencia dextran T2000. Los resultados de este experimento indican que al incubar la bacteria en presencia del extracto metanólico de *B. simaruba* a una concentración final de 50 µg/mL y la posterior adición de dextran T2000 se presenta un efecto inhibitorio sobre la agregación de *S. mutans*. Estos resultados son importantes debido a que algunas bacterias del género Mutans a pesar de la pérdida de su capacidad para sintetizar glucanos (y por tanto incapaces de adherirse), se agregan en presencia de glucosa o dextran (Murchinson *et al.*, 1981). Por esta razón, considerando que la agregación juega un papel importante en la acumulación de *S. mutans* en la superficie de los dientes, el potencial del extracto de *B. simaruba* para inhibir esta acumulación es alto.

Posteriormente, se midió la actividad de la picropoligamaina (I) sobre la agregación de *S. mutans* utilizando la misma metodología descrita anteriormente para extracto. Las concentraciones utilizadas para el lignano fueron de 1/8, 1/4, 1/2 de la CMI. Los resultados obtenidos indican que la picropoligamaina inhibe el proceso de agregación en presencia de dextran T2000. Este resultado es consistente con el observado para el extracto total de *B. simaruba*. En la Figura 15 se ilustran los resultados obtenidos sobre la agregación de *S. mutans* en los cultivos sin tratamiento y tratados con la picropoligamaina (1) en presencia de dextran T2000. Para determinar el efecto del compuesto sobre la agregación de *S. mutans* se utilizó la escala descrita por Murchinson y colaboradores (1981).

En la Figura 15a se observa claramente la formación de cúmulos y un medio transparente por lo que se le asignó un valor de 4+ de acuerdo a la escala descrita previamente. En la Figura 15 b se puede observar el efecto inhibitorio sobre la agregación de la bacteria en presencia de la picropoligamaina (I) a 1 /2 de la CMI (0 de acuerdo a la escala utilizada).

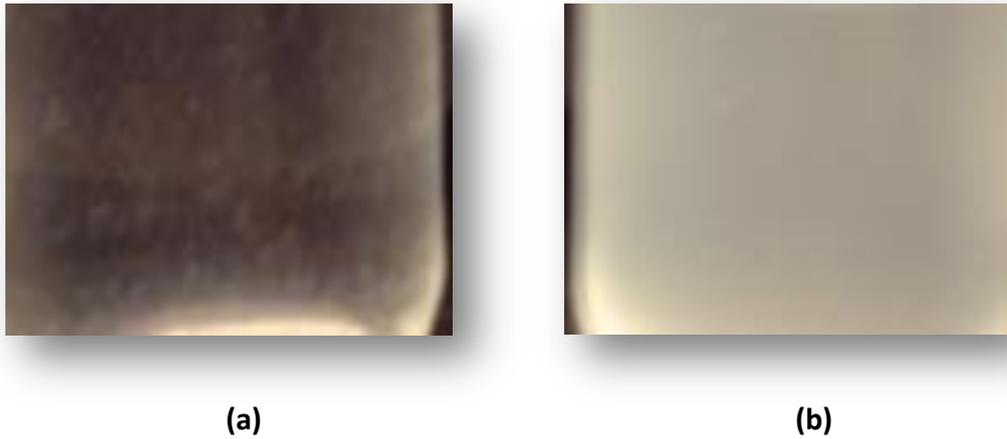


Figura 16. Efecto del tratamiento con picropoligamaina sobre la agregación de *S. mutans* 37°C (a) *S. mutans* en presencia de dextran (b) cultivo de de *S. mutans* tratado con picropoligamaina y la posterior adición de dextran.

7. CONCLUSIONES

La información científica que se generó en esta investigación representa una contribución al conocimiento biológico de la especie *Bursera simaruba*. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto derivado de la corteza permitió el aislamiento del lignano picropoligamaina (I) y del triterpeno lupenona (II). El lignano (I) presenta una potente actividad antimicrobiana con una CMI de 7.8 µg/mL. La actividad del lignano es comparable a la observada para el control positivo clorhexidina. Por otra parte, el efecto de la picropoligamaina (I) sobre de agregación es notable a 1/2 de la CMI. La evidencia experimental obtenida en el presente estudio sugiere que el lignano picropoligamaina además de su efecto antibacteriano inhibe la agregación de la bacteria *S. mutans*.

Por otro lado, el triterpenoide lupenona (II) presentó una actividad antibacteriana menor a la de la picropoligamaina (I) con una CMI de 7.8 µg/mL. Sin embargo en la literatura se describen sus actividades antiinflamatorias, antiulcerosas (Flekhter *et al.*, 2000), antivirales (Madureira *et al.*, 2003) y antifúngicas (Wal *et al.*, 2010). Estas actividades explican de manera parcial la utilización de la *B. simaruba* en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral.

8. PERSPECTIVAS

*Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en este proyecto, con la finalidad de aislar los compuestos que estén presentes, y posteriormente determinar su actividad biológica.

*Establecer el efecto de los extractos derivados de la corteza de y de los compuestos puros sobre las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*.

*Desarrollar un método analítico que permita cuantificar los principios activos del extracto total de la corteza de *B. simaruba*, así como sus compuestos minoritarios.

*Utilizar a la picropoligamaina como modelo, para la síntesis total o parcial de compuestos análogos, que presenten una mayor actividad biológica contra *Streptococcus mutans*.

9. REFERENCIAS

*Argueta, V., Cano, A., Rodarte, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I (1-583). México D.F.: Instituto Nacional Indigenista, pp. 772, 1099. 1100.

*Aguilera Galaviz L. A., M. en C. Padilla Bernal patricia, Aguilar Rodríguez R., 2004. "Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de la caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacateas", Revista de la Asociación Dental Mexicana, Volumen 61, No. 3, pp. 85-91.

*A.M. Madureira, J.R. Ascenso, L. Valdeira, A. Duarte, J.P.Frade, G. Freitas & M.J.U. Ferreira. 2003, Evaluation of The Antiviral And Antimicrobial Activities Of Triterpenes Isolated From *Euphorbia Segetalis*. *Natural Product Research*. Vol 17, No 5, pp 375-380.

*A. Nostro, M.A. Cannatelli, G. Crisafi, A.D. Musolino, F. Procopio and V. Alonzo. 2004, Modifications of hydrophobicity, *in vitro* adherence and celular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Letters in Aplied Microbiology*. Vol 38, pp 423-427.

*Ankita Wal, Pranay Wal, A.K. Rai, Kanwal raj. 2010, Isolation and modification of pseudohybrid plant (Lupeol). *Journal of pharmaceutical Sciences of Research*. Vol 2(1), pp 13-25.

*Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las Plantas de la medicina Tradicional Mexicana, Palo mulato, *Bursera simaruba*, disponible en la pagina <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7736> consultada el 20 de julio de 2010 a las 15: 44 pm.

*Enzo A. Palomo. 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Evidence-Base Complementary and Alternative Medicine, pp 15 , 2011.

*Finegold, S. M., et al., 1975 "Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients Cancer", Vol. 35, pag. 3407-3417.

*Gace-Ann O. Junor and Roy B.R. Porter, Trevor H. Yee (2008). The Chemical Composition of the Essential Oils from the leaves, Bark and Fruits of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. From Jamaica. Porter et al, 20, 426-429.

*H. Murchison, S. Larrimore, R. Curtiss. 1981. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* defective in adherence and aggregation. *Infection an immunity*. Vol 38, pp 1044-1055.

*Hamada, S., N. Masuda, and S. Kotani. 1980. Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. *J. Clin. Microbiol.* 11:314-318.

*J.Y. Chung, J.H. Choo, M.H. Lee, J.K. Hwang (2004). Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristicafragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 13, 261-266.

*J. Jesús Manríquez-Torres, Armida Zúñiga-Estrada, Manuel González-Ledesma, J. Martín Torres-Valencia. 2007, The Antibacterial Metabolites and Proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *Sociedad Química de México*. Vol 51(4), pp 228-231.

*Kilian, M., E. Theilade, and C. R. Schiott. 1971. "Isolation of *Streptococcus mutans* from human faeces". *Arch. Oral Biol.* Volumen 15, pag. 553-554.

*Maria teresa Maldini, Paola Montoro, Sonia Piacente, Cosimo Pizza (2009). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. Bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70, 641-649.

- *M.E. Carretero, J.L. LopezPerez, M.J. Abad, P. Bermejo, S. Tillet, A. Israel, B. Noguera-P (2007). 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.
- *O. B. Flekhter, L.R. Nigmatullina, L.T. Karachullina, L.A. Baltina, F.S. Zarudii, V.A. Davydova, F.Z. Galin y G.A. Tolstikov. 2000. The synthesis and the anti-inflammatory and antiulcer activities of a number of 2-substitutes derivatives of betulonic acid, methylbetulone and lupenone. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. Vol 34, No 11, pp 17-20.
- *Quiang Wu, Qi Wang, K.G Taylor and R. J. Doyle. 1995. Subinhibitory Concentrations of Antibiotics Affect Cell Surface Properties of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Bacteriology*. Vol 177, No 5, pp 1399-1401.
- *Sergio R. Peraza-Sánchez, Luis M. Peña-Rodríguez (1992). Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of natural products*, 12, 1768-1771.
- *Shigeyuki Hamadat and Hutton D. Slade, 1980. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, Vol. 44. No.2. pp 331-384.
- *Slade, H. D. 1978. "Specific binding of glucosyltransferase by *Streptococcus mutans* and its effect in the adherence of the organism", pag. 14-16. En E. L. Kaplan and A. V. taranta (ed), *Infective endocarditis*, American Heart Association Monograph No. 52. American Heart Association, Dallas.
- *Supaluk Prachayasittikul, Puttirat Saraban, Rungrot Cherdtrakulkiat, Somsak Ruchirawat, Virapong Prachayasittikul. 2010, New Bioactive Triterpenoids and Antimalarial Activity of *Diospyros Rubra* Lec. *Journal*. Vol 9, pp 1-10.

* Supayang P. Voravuthikunchai, Tripetch Kanchanapoom, Nongyao Sawangjaroen and Nongporn Hutadilok-Towatana (2009). Antioxidant, antibacterial and antiangiogenic activities of *Walsura robusta* Roxb. *Natural Product Research*, 9, 813-824.

*Thomson, L. A., W. H. Bowen, W. A. Little, H. M. Kuzmiak-Jones, and I. M. Gomez. 1979, "Simultaneous implantation of five serotypes of *Streptococcus mutans* in gerontic rats". *Caries*, Volumen 13, pag., 9-17

*Walter J. Loesche, 1986, "Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay", *Microbiological Reviews*, Vol. 50, No. 4, pp. 353-380.

*Yung-Huali, Peter C. Y. Lau, Janet H. Lee, Richard P. Ellen, Dennis G. Cvitkovitch., 2000, Natural Genetic Transformation of *Streptococcus mutans* Growing in Biofilms., *Journal of bacteriology*, Feb. 2001, Vol. 183, No. 3., pp. 897–908.

*Tsutomu Nakanishi, Yuka Inatomi, Hiroko Murata, Kaori Shigeta, Naoki Iida, Akira Inada, Jin Murata, Miguel Angel Perez Farrera, Munekazulinuma, Toshiyuki Tanaka, Shogo Tajima, and Naoto Oku. 2004, A New and Known Cytotoxic Aryltetralin-Type Lignans from Stems of *Bursera graveolens*., *Chem. Pharm. Bull*, 53, 229-231.