

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS METABOLITOS
DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Mammea americana* SOBRE
Enterococcus faecalis.**

ESTUDIO *IN VITRO*.

EDUARDO COVO MORALES

ANTONIO DÍAZ CABALLERO

NATALIA FORTICH MESA

DONOVAN RODRÍGUEZ SIERRA

LIZETH JOHANNA YANES MIRANDA



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN PERMANENTE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

CARTAGENA-BOLÍVAR

2017

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS METABOLITOS
DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Mammea americana* SOBRE
Enterococcus faecalis.**

ESTUDIO *IN VITRO*

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REALIZADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

Investigador principal

EDUARDO COVO MORALES

**Odontólogo y Especialista en Endodoncia. Pontificia Universidad Javeriana.
Magíster en Microbiología. Universidad de Cartagena.**

Co- investigadores Estudiantes

LIZETH YANES MIRANDA

DONOVAN RODRÍGUEZ SIERRA

Estudiantes IV año. Especialización en Endodoncia.

Co-investigador

ANTONIO DÍAZ CABALLERO

**Odontólogo. Universidad de Cartagena. Especialista en Periodoncia.
Pontificia Universidad Javeriana. Magíster en Educación. Universidad del
Norte. Doctor en Ciencias Biomédicas. Universidad de Cartagena.**

Asesor metodológico

NATALIA FORTICH MESA

**Odontóloga. Pontificia Universidad Javeriana. Especialista en Endodoncia.
Universidad de Cartagena. Magíster en Epidemiología Clínica. Universidad
Nacional de Colombia.**

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN PERMANENTE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES

ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

CARTAGENA-BOLÍVAR

2017

NOTA DE ACEPTACIÓN

FIRMA DEL PRESIDENTE DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

Cartagena, 14 de Junio de 2017.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, a nuestra familia y a todas las personas que nos han ayudado de manera desinteresada en la elaboración de este proyecto.

Se agradece la colaboración de los integrantes del Grupo de Investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena; entre ellos al Docente Harold Gómez Estrada, quien colocó a nuestra disposición su Laboratorio de Fitoquímica donde Cristian Paternina Castro, Químico Farmacéutico, concentró los extractos de las semillas de Mammea Americana. A Leonor Cervantes Hoyos, Magíster en Microbiología y estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas, quien realizó las pruebas de cada uno sobre Enterococcus Faecalis en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena. A su vez, al grupo de Investigación en Genética y Biología molecular de la Universidad de Cartagena donde Jeison Reyes, Químico Farmacéutico y estudiante de Maestría en Microbiología de la Universidad de Cartagena ayudó a ejecutar la primera fase de las extracciones: maceración del material vegetal.

Al Investigador principal y Docente Eduardo Covo Morales, al Director y Docente Antonio Díaz Caballero y a la Asesora metodológica y Docente de Investigación Natalia Fortich de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena por su apoyo y colaboración durante el desarrollo del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	I
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	IV
3. JUSTIFICACIÓN	VIII
4. OBJETIVOS	IX
4.1 Objetivo general	IX
4.2 Objetivos específicos	IX
5. MARCO TEÓRICO	X
5.1 PARTE FITOQUÍMICA	X
5.1.1 Estudios etnobotánicos	X
5.1.2 Productos naturales	XI
5.1.3 Extracto	XII
5.1.4 Métodos de extracción	XIII
5.1.5 Identificación preliminar de metabolitos secundarios	XIV
5.1.5.1 Principales metabolitos en las plantas	XV
5.1.5.2 Principales pruebas fitoquímicas para la identificación de metabolitos	XVIII
5.1.6 Género <i>Mammea</i>	XIX
5.1.6.1 Metabolitos secundarios aislados del género <i>Mammea</i>	XX
5.1.7 <i>Mammea americana</i> L.	XX
5.1.7.1 Descripción botánica	XXI
5.1.7.2 Distribución geográfica de <i>M. Americana</i> en Colombia	XXII
5.1.7.3 Usos del fruto de <i>M. americana</i>	XXIII
5.1.7.4 Semillas de <i>M. americana</i>	XXIII
5.2 PARTE MICROBIOLÓGICA	XXIV
5.2.1 Género <i>Enterococcus</i>	XXIV
5.2.1.1 Resistencia antimicrobiana del género <i>Enterococcus</i>	XXV
5.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	XXVI
5.2.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> y la infección en endodoncia	XXVII
5.2.3 Método de dilución en caldo	XXIX
6. METODOLOGÍA	XXX
6.1 Recolección del material vegetal	XXXI

6.2.	Preparación de los extractos y fraccionamiento	XXXI
6.3.	Caracterización fitoquímica	XXXII
6.4.	Actividad antimicrobiana.....	XXXIII
6.4.1	Preparación de las soluciones.....	XXXIII
6.4.2	Microorganismo de estudio	XXXIII
6.4.3	Condiciones de los cultivos	XXXIII
6.4.4	Actividad antibacteriana	XXXIV
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	XXXIV
6.6	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	XXXIV
7.	RESULTADOS	XXXV
7.1	Obtención de los extractos de semillas de <i>M. americana</i>	XXXV
7.2	Tamizaje fitoquímico preliminar de semillas de <i>M. Americana</i>	XXXVI
7.3	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de semillas de <i>M.americana</i>	XXXVI
8.	DISCUSIÓN	XL
8.1	Tamizaje fitoquímico preliminar de semillas de <i>M. americana</i>	XL
8.2	Actividad antibacteriana de semillas de <i>M. americana</i>	XLI
9.	CONCLUSIONES	XLIV
10.	RECOMENDACIONES O PROSPECTIVA	XLV
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS DE TABLAS	
	ANEXO DE FIGURAS	

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Tamizaje fitoquímico preliminar de las semillas de <i>Ambrosia cumanensis</i> Kuhn.....	XXXVI
Tabla 2 Porcentajes de inhibición del control positivo (Kanamicina).....	XXXVII
Tabla 3 Porcentajes de inhibición de las concentraciones del control negativo (DMSO).....	XXXVIII
Tabla 4 Porcentajes de inhibición de las concentraciones de los diferentes tipos de extractos.....	XXXVIII
Tabla 5 Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de las semillas de <i>M. americana</i>	XXXIX
Tabla 6 Datos crudos de las absorbancias del control positivo (Kanamicina).....	LIII
Tabla 7 Datos crudos de las absorbancias del control negativo (DMSO).....	LIII
Tabla 8 Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de <i>M. americana</i> del primer ensayo.....	LII
Tabla 9 Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de <i>M. americana</i> del segundo ensayo.....	LIV
Tabla 10 Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de <i>M. americana</i> del tiempo cero.....	LIV

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras y nomenclatura de cumarinas extraídas de <i>M. americana</i> (<i>Mammea cumarinas</i>).....	XX
Figura 2. Dibujo lineal de <i>Mammea americana</i> L.....	XXI
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Mammea americana</i> L.....	XXII
Figura 4. Actividad inhibitoria del control positivo (Kanamicina).....	XLII
Figura 5. Efecto del DMSO sobre el crecimiento de <i>E. faecalis</i>	XLIII
Figura 6. Inhibición de los extractos de semillas de <i>M. americana</i> frente a <i>E. faecalis</i>	XLIII

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt (Acetato de etilo)

CHCl₃ (cloroformo)

cm (centímetros)

DMSO (Dimetilsulfóxido)

DNA (Ácido desoxirribonucleico)

EtOH (Etanol)

FDA (Food and Drug Administration) (Administración de Drogas y Alimentos)

g (gramos)

MBC (concentración mínima bactericida)

mg (miligramos)

MIC (concentración mínima inhibitoria)

Min (minutos)

mL (mililitros)

mm (milímetros)

m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar)

OMS (Organización mundial de la salud)

pH (potencial de hidrógeno)

PN (Productos naturales)

TLC (Inglés: Thin Layer Chromatography) (cromatografía en capa fina)

UFC (Unidades formadoras de colonias)

UV (Ultravioleta)

µg (microgramos)

°C (grados centígrados)

GLOSARIO

CONDUCTO RADICULAR: parte de la cavidad pulpar correspondiente a la porción radicular de los dientes; en los que presentan más de una raíz se inicia en el piso y termina en el foramen apical. Tiene forma cónica con la base mayor dirigida hacia el piso y el vértice hacia la porción apical, forma similar a la de la raíz.

DROGA VEGETAL: es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica.

FRACCIONAMIENTO: acción y efecto de fraccionar. En este contexto se utiliza la separación de subextractos de un extracto total (generalmente etanólico).

IRRIGANTES ANTIMICROBIANOS: son sustancias con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, entre estos se encuentra la clorhexidina, el hipoclorito de sodio, el ácido cítrico, entre otros.

MACERAR: mantener sumergida alguna sustancia sólida en un líquido a temperatura ambiente, con el fin de ablandar o extraer de ella las partes solubles.

METABOLITOS: son todas aquellas sustancias que resultan del metabolismo de un ser vivo.

MICRODILUCIÓN: la disminución de una concentración de una disolución añadiendo disolvente. El término microdilución se utiliza para denominar disoluciones que son pequeñas generalmente en el orden de micromililitros.

NECROSIS: Degeneración de un tejido por muerte de sus células.

PLANTA MEDICINAL: es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.

POLARIDAD: la propiedad que tienen los agentes físicos de acumularse en los polos de un cuerpo o de polarizarse. En el texto se entiende este término como la

polarización que tienen los diferentes metabolitos presentes en el extracto etanólico en los diferentes solventes utilizados en la extracción, lo cual está estrechamente relacionado con la solubilidad de estos.

PRINCIPIOS ACTIVOS: son las sustancias responsables de la acción farmacológica.

RECIDIVA: Reaparición de una enfermedad algún tiempo después de padecida.

RESUMEN

Introducción: *Enterococcus faecalis* es un microorganismo patógeno involucrado en numerosas infecciones de la cavidad oral y por consiguiente en el fracaso de procedimientos odontológicos, posiblemente por su alto grado de resistencia químico-mecánica y a múltiples fármacos. Actualmente existe un notable interés en la etnobotánica que investiga productos naturales como alternativa para nuevos antimicrobianos. **Objetivo:** el presente estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana de diversos extractos de semillas de *Mammea americana* frente a *Enterococcus faecalis*. **Materiales y métodos:** para la obtención de los extractos se utilizó el material vegetal seco previamente triturado, el cual fue macerado en frío utilizando como solvente etanol durante 48 horas, el cual se concentró a presión reducida y a partir de este se obtuvieron cuatro (4) extractos orgánicos adicionales con solventes de diferentes polaridades. Luego de obtener los extractos se solubilizaron en DMSO y se midió la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de microdilución en caldo en placas de 96 pozos en un intervalo de concentración de 50 a 500mg/L, utilizando kanamicina como control positivo y DMSO como control negativo. **Resultados:** al analizar los resultados del ensayo se observó que los extractos hexanoico y clorofórmico mostraron los más altos porcentajes de inhibición con una concentración mínima inhibitoria de 100 y 200mg/L respectivamente. **Conclusión:** en este trabajo se concluyó que los 4 tipos de extractos son candidatos para próximos estudios de fraccionamiento y aislamiento de metabolitos secundarios con posible actividad antibacteriana frente a *E. faecalis*.

Palabras clave: *Mammea americana*, *Enterococcus faecalis*, actividad antibacteriana.

1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral humana es una zona altamente colonizada por microorganismos tales como virus, protozoos, hongos, arqueas y bacterias, siendo estos últimos los principalmente señalados como causantes de enfermedades infecciosas. Muchas especies de bacterias se han aislado de la boca, la mayoría inocuas. Sin embargo, los microorganismos orales son los responsables de dos enfermedades comunes en los seres humanos: la caries dental y la enfermedad periodontal¹.

La caries dental es una enfermedad muy prevalente en el mundo. Una opción para tratar dientes ampliamente destruidos por caries dental es la realización de tratamientos de endodoncia. Aun cuando estas terapias tienen un pronóstico favorable en la mayoría de los casos, la literatura señala que existe la posibilidad de fracaso.² Una vez que el conducto radicular se infecta coronariamente, la infección progresa apicalmente hasta que los productos bacterianos o las bacterias Están en posición de estimular los tejidos periapicales, lo que conduce a periodontitis apical. Los microorganismos y sus productos (endotoxinas) están estrechamente relacionados con la etiología de las lesiones pulpares y periapicales. Los conductos radiculares con infecciones primarias contienen una alta carga bacteriana, pero La preparación del conducto radicular ha demostrado ser capaz de reducir los porcentajes bacterianos en al menos el 95%. Las infecciones endodónticas tienen una naturaleza polimicrobiana, con las bacterias anaerobias obligadas dominando la microbiota en infecciones primarias. La microbiota del conducto radicular incluye más de 700 especies bacterianas diferentes que todavía no se han identificado a nivel de especie. Además de las

¹ CHINSEMBU, K. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. En: Acta Trópica. February, 2016. Vol 154, p. 6-18.

² SOUZA, M; DALLA, D; GABRIELLI, E. *et al.* Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. En: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. March 2017. Vol. 17, p. 92-97.

bacterias, otros microorganismos como las levaduras pueden ser Encontrado en los canales radiculares con necrosis pulpar. Los principales microorganismos que se aíslan antes de un tratamiento de conducto radicular incluyen varillas anaeróbicas Gram-negativas, Cocos anaeróbicos Gram-positivos, varillas anaerobias y facultativas Gram-positivas, (especies sacarolíticas como muchos tipos De Prevotella y especies asacarolíticas como Porphyromonas, además Tannerella forsythia, Dialister, Fusobacterium, Spirochetes), especies de Lactobacillus, y Gram-positivos Streptococcus facultativo. Los anaerobios obligatorios generalmente son erradicados por el tratamiento endodóntico; Por el contrario, las bacterias facultativas Como Streptococcus, Enterococcus, y Lactobacilos son capaces de sobrevivir a la instrumentación quimio-mecánica del conducto radicular;³ sin embargo dentro de las numerosas especies bacterianas existentes, una de las más frecuentemente encontradas en dientes con necrosis pulpar (sin historia previa de endodoncia) y más aislada en aquellos con recidiva de infección (dientes con indicación de retratamiento) es *Enterococcus faecalis*⁴.

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) es un microorganismo anaerobio facultativo altamente resistente a los procedimientos químico-mecánicos convencionales². Así mismo, ha adquirido un perfil multifármaco-resistente a fármacos betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), tetraciclinas, macrólidos⁵, aminoglicósidos (gentamicina y estreptomina), lincosamidas (clindamicina) y glucopéptidos (vancomicina).⁶ Esto lo ha convertido en una emergencia sanitaria

³ BORZINI L, CONDÓ R, DE DOMINICIS P, CASAGLIA A, CERRONI L, Root canal irrigations: Chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. En: The Open Dentistry Journal. 2016, Vol. 10, p. 692-703.

⁴ SOUZA, M; DALLA, D; GABRIELLI, E. *et al.* Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. En: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. March 2017. Vol. 17, p. 92-97.

⁵ JAIN, H; MULAY, S; MULLANY, P. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. En: Gene Reports. 2016. Vol.5, p.112-116.

⁶ VELÁZQUEZ, N; VIGUERAS, J; ESCALONA, G. *et al.* Resistance to linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* with high-level resistance to aminoglycosides in a third-level pediatric hospital. En: Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 2010. Vol.67, N^o.1, p.19-26.

que ha encendido alarmas en la comunidad científica impulsándola a buscar nuevas alternativas quimio-mecánicas o antibacterianas, que permitan la descontaminación y eliminación de *E. faecalis* de la cavidad oral.

El uso de plantas con fines curativos se remonta a muchos años atrás y guarda relación con la flora existente en cada territorio. A pesar de ser utilizadas desde la antigüedad y de generación en generación, hoy día son objeto de múltiples investigaciones científicas en las que se han demostrado experimentalmente algunas de las acciones atribuidas. Esto brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos, a partir de una fuente de materia prima renovable⁷.

Desde este punto de vista, la investigación de plantas medicinales es un potencial enfoque viable para el descubrimiento de nuevos agentes bioactivos para resolver problemas generalizados de salud pública⁸ específicamente relacionados con sustancias antiinfecciosas. Este hecho puede evidenciarse en que alrededor del 5% de los medicamentos antiinfecciosos aprobados entre 1981 y 2002, provinieron de fuentes naturales, muchos aislados a partir de plantas.⁹

Extractos de diversas plantas han demostrado efecto antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* y la planta objeto de investigación; *Mammea americana*, es una de ellas. Con este estudio se pretende evaluar la actividad antibacteriana de los diferentes metabolitos que se obtengan de extractos de las semillas del fruto de esta planta sobre *E. Faecalis* con el fin de identificarlos como potenciales

⁷ REMÓN, H; ALARCÓN, A; ALMEIDA, M. *et al.* Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos secos de tinturas al 20 % de *Mammea americana* L. En: *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2012. Vol.17, N°.4, p.300-307.

⁸ SHARMA, A; FLORES, R; CARDOSO, A. *et al.* Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine, En: *Journal of Ethnopharmacology*. 2016. p.0378-8741.

⁹ SÜLSEN, V; CAZORLA, S; FRANK, F. *et al.* Natural Terpenoids from *Ambrosia* Species Are Active In Vitro and In Vivo against Human Pathogenic Trypanosomatids. En: *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013. Vol.7, N°.10, p.2494.

agentes antimicrobianos. La obtención de resultados positivos en los ensayos será el primer paso para la síntesis de una sustancia capaz de eliminar esta bacteria de los conductos radiculares a la vez que permita abrir campo a nuevas investigaciones con otras plantas y bacterias que participen activamente en el desarrollo de patologías endodónticas.

En este estudio *in vitro* se realizaron pruebas de CMI (concentración mínima inhibitoria) de extractos de semillas de *Mammea americana* sobre *E. Faecalis*, midiendo y comparando lo observado en cada extracto y en los controles utilizados.

Los resultados de este estudio propenderán para una futura eliminación y/o control de *Enterococcus Faecalis* mediante el uso de estos metabolitos como irrigante durante la preparación biomecánica previniendo la formación de lesiones periapicales y recidivas en los tratamientos.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Enterococcus faecalis durante los últimos años se ha identificado como uno de los microorganismos causantes de infecciones bucales (incluyendo las recidivantes)¹⁰. Adicionalmente, este microorganismo ha generado un amplio espectro multifármaco-resistente^{11,12}, situación que se extiende a irrigantes utilizados en endodoncia como hipoclorito de sodio (NaOCl), clorhexidina¹³ e hidróxido de calcio¹⁴.

Por consiguiente, la investigación sobre alternativas para eliminar o controlar el crecimiento de *E. faecalis* tiene importancia sanitaria y científica. El crecido interés por los productos naturales de origen vegetal como solución a problemas médicos y odontológicos existentes. Históricamente los productos naturales demostraron ser una fuente amplia para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos.

Los estudios etnobotánicos establecieron criterios de inclusión y exclusión para la selección del material vegetal de partida. Teniendo en cuenta que *Mammea americana* es utilizada en etnobotánica con diferentes fines entre los que se destaca su uso antiinfeccioso, existen algunos estudios que han demostrado la actividad antibacteriana de esta planta. La mayoría se han centrado en extractos

¹⁰ SOUZA. Op. Cit., p.4

¹¹ JAIN. Op. Cit., p.113-114

¹² VELÁZQUEZ. Op. Cit., p.19

¹³ ASNAASHARI, M; ASHRAF, H; RAHMATI, A. *et al.* comparison between effect of photodynamic therapy by LED and calcium hydroxide therapy for root canal disinfection against *Enterococcus faecalis*: A randomized controlled trial. En: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2016. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.00.

¹⁴ JINGLEI, M; ZHONGCHUN, T; JUNQI, L. *et al.* The effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine irrigants on the antibacterial activities of alkaline media against *Enterococcus faecalis*. En: Archives of Oral Biology. 2015. Vol.60, N°7, p.1075-1081.

obtenidos a partir de las hojas y la corteza pero pocos son los que indican una actividad antibacteriana de las semillas.

Mammea americana es un árbol nativo de las Antillas y del norte de Sudamérica¹⁵ que pertenece a la familia Guttiferae¹⁶. Se utiliza ampliamente en la curación de diversas enfermedades debido a su efecto antiparasitario e insecticida. Para estos fines, se utiliza el látex de la semilla contra *Aedes aegypti*, que elimina las larvas de este vector¹⁷. Se ha confirmado el efecto de la fruta para tratar la anemia, mientras que la resina y la decocción de la corteza se emplean contra parásitos, infecciones micóticas y eczemas¹⁸.

Diversos estudios *in vitro* han reportado la efectividad antibacteriana de extractos de muchas partes de *M. americana* frente a microorganismos. Según Finnegan et al (1973), algunas xantonas y benzofenonas aisladas de los aceites de la semilla de esta planta mostraron actividad antibacteriana¹⁹; así mismo, Frame et al (1998), informaron que un extracto etanólico de la hoja proporciona actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculae*²⁰.

¹⁵ RAPONDA, A; FORESTIÈRES, G; SILLANS, R. *et al.* Les plantes utiles du Gabon [Essai d'inventaire et de concordance des noms vernaculaires et scientifiques des plantes spontanées et introduites, description des espèces, propriétés, utilisations économiques, ethnographiques et artistiques]. En: Fondation Raponda Walker-Centre culturel français de Libreville; Sépia. 1961.

¹⁶ CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. 1994.

¹⁷ BANTAR, C; SARTORI, B; VESCO, E. *et al.* A hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance. En: Clinical infectious diseases. 2003. Vol.37, N°2, p.180-186.

¹⁸ PADILLA, L; CAPÓ, T; HERNÁNDEZ, A *et al.* Efecto diurético y toxicidad aguda del *Orthosiphon aristatus* Blume (te de riñón). En: Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1996. Vol.1, N°3, p.26-30.

¹⁹ FINNEGAN, R; MERKEL, K; PATEL, J. Constituents of *Mammea americana* L. XII: Biological data for xanthenes and benzophenones. En: Journal of pharmaceutical sciences. 1973. Vol.62, N°3, p.483-5.

²⁰ FRAME, A; RÍOS, E; DE JESÚS, L. *et al.* Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. En: Puerto Rico health sciences journal. 1998. Vol.17, N°3 p.243-52.

Un componente activo principal, Mammea A/AA, ha sido aislado de la corteza del tallo y del núcleo de la semilla de *Mammea africana* por Verotta et al (2004), quienes encontraron que este compuesto inhibe el crecimiento de *Enterococcus faecalis*²¹.

Yasunaka et al (2005) evaluaron 32 extractos de 22 plantas medicinales mexicanas de 15 familias diferentes para determinar su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El extracto de la cáscara del fruto de *Mammea americana* L. (Clusiaceae) resultó altamente activo contra *Staphylococcus aureus*²². A su vez, Remón et al. (2012) reportaron que los extractos secos de las hojas y corteza del fuste de *Mammea americana* mostraron actividad antibacteriana *in vitro* también frente a *Staphylococcus aureus*²³.

De la misma forma, Canning et al en 2013, identificaron y aislaron el compuesto Mammea A/AA de la corteza de esta planta, el cual presentó actividad inhibitoria específica sobre cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, y *Campylobacter jejuni*²⁴.

En un estudio experimental realizado en la Universidad de Cartagena, se evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la semilla de *Mammea americana* contra *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. Se detectó actividad bactericida y bacteriostática frente a *S. mutans*, según la concentración del extracto, y sólo actividad bacteriostática contra *P. gingivalis*²⁵.

²¹ VEROTTA, Op Cit. p. 2867.

²² YASUNAKA, K; ABE, F; NAGAYAMA, A. *et al.* Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. En: Journal of ethnopharmacology. 2005. Vol.97, N°2, p.293-299.

²³ REMÓN, Op Cit., p. 302.

²⁴ CANNING *et al.* Antibacterial and cytotoxic activity of isoprenylated coumarin mammea A/AA isolated from *Mammea africana*. En: Journal of ethnopharmacology. 2013. Vol.147, N°1, p.259-62.

²⁵ HERRERA, A; OSPINA F, FANG, L. *et al.* Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* to Antibacterial Effect from *Mammea americana*. En: Advances in pharmacological sciences. 2014.

En un trabajo de tesis en la Universidad de Cartagena, se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Mammea americana* contra *Enterococcus faecalis*²⁶ y *Fusobacterium nucleatum*. El extracto presentó una actividad antibacteriana considerable frente a *E. faecalis* y *F. nucleatum*. Las fases oleosa y etanólica del extracto de *Mammea americana* demostraron actividad bacteriostática sobre *Enterococcus faecalis* a 500 ppm.

En el presente estudio, se evaluó la actividad antibacteriana de los diferentes metabolitos obtenidos de extractos de las semillas de *Mammea americana* frente a *Enterococcus faecalis*, con el fin de establecer si estos son fuente alternativa que pueda ser utilizada en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas generadas por esta bacteria; de lo anterior surge la siguiente pregunta:

¿Existe un efecto antibacteriano de los metabolitos obtenidos de extractos de las semillas de *Mammea americana* sobre la cepa de *Enterococcus Faecalis* ATCC (51299)?

²⁶ COVO, Eduardo; DÍAZ, Antonio; FRANCO, Angélica et al. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de *mammea americana* sobre cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Trabajo de grado Posgrado de Endodoncia. Cartagena: Universidad de Cartagena. Facultad de Odontología, 2016. 78 p.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el gran reto para los países ricos en biodiversidad de especies vegetales como Colombia, es poder vincular y convertir el conocimiento de los recursos biológicos de las comunidades rurales en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles como parte de su aprovechamiento en beneficio de la comunidad. Es por esto que en este estudio se seleccionó una especie vegetal de especial importancia: *Mammea americana*, presente en gran parte del territorio colombiano, teniendo como antecedente diferentes estudios reportados sobre sus propiedades.

El presente estudio es de gran importancia en endodoncia, ya que evalúa si los metabolitos obtenidos de extractos de las semillas de *M. americana* poseen, *in vitro*, efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*, bacteria encontrada en un porcentaje significativo en casos de fracaso endodóntico. Adicionalmente, esta investigación tiene importancia clínica por proponer una nueva sustancia que coadyuve a la desinfección de los conductos radiculares siendo esta, objetivo o fuente para el aislamiento e identificación de metabolitos con actividad antibacteriana contra *E. faecalis*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos obtenidos de extractos de las semillas de *Mammea americana* frente a la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC (51299).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana de los diferentes metabolitos obtenidos de extractos de la semilla de *Mammea americana* frente a *E. faecalis* ATCC (51299).
- 4.2.2 Obtención y caracterización fitoquímica de los metabolitos obtenidos de extractos de la semilla de *Mammea americana*.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 MARCO CONCEPTUAL

5.1.1 PARTE FITOQUÍMICA

5.1.1.1 Estudios etnobotánicos

Muchas especies de plantas medicinales en un gran número de países en desarrollo constituyen alternativas a la medicina convencional, especialmente en comunidades de bajos recursos donde no tienen acceso a los servicios de salud. Es debido a esta situación, entre otras razones culturales, que un número de plantas medicinales nativas de zonas tropicales han tenido un valor significativo para las comunidades indígenas, debido a sus propiedades curativas²⁷.

El uso cultural de las plantas con fines medicinales es el objetivo de la etnofarmacología vegetal, en donde una comunidad ha establecido el uso de una planta y lo reconocen ampliamente como inocuo y eficaz²⁸. Vale aclarar que a pesar de su uso cultural, esto no garantiza en lo absoluto las propiedades medicinales que se le asignan. Desde este punto de vista, es importante estudiar las plantas usadas por las comunidades, no solo porque contribuyen a validar los usos atribuidos, sino también para buscar alternativas en el manejo de patologías, específicamente de enfermedades infecciosas.

La importancia de los estudios etnobotánicos de plantas medicinales radica en que son el punto de partida en la búsqueda de fuentes de nuevas moléculas y principios activos a partir de recursos naturales, circunstancia extrapolable al

²⁷ GONZÁLEZ, A; SØRENSEN, M; y THEILADE, I. Uso y valoración de las especies de plantas medicinales nativas e introducidas en Campo Hermoso y Zetaquira, Boyacá, Colombia. En: Diario de Etnobiología y etnomedicina. 2013. Vol.9, p 23.

²⁸ RODRÍGUEZ, C y OPORTO, G. Estudio etnobotánico de especies medicinales utilizadas por la comunidad de la vereda campo alegre del corregimiento de siberia – cauca Colombia. En: Revista de ciencias. 2013. Vol.17, N°.2, p.35-49.

desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos para la manufactura de medicamentos²⁹.

5.1.2 Productos naturales (PN)

Los productos naturales han demostrado históricamente su valor como fuente potencial de moléculas con actividad terapéutica, representando hoy día, una reserva importante para la identificación de nuevas drogas. En las últimas décadas, la industria farmacéutica se ha centrado principalmente en las bibliotecas de compuestos sintéticos como fuente de descubrimiento de fármacos³⁰. Sin embargo, a pesar de esta situación, ha disminuido el número de nuevos medicamentos que llegan al mercado, renovando el interés científico en los fármacos de origen natural.

Aunque la complejidad intrínseca en el descubrimiento de fármacos a base de productos naturales requiere enfoques interdisciplinarios altamente integrados, los avances científicos, tecnológicos y las tendencias de investigación, indican claramente que los productos naturales serán fuente importante de nuevos medicamentos en el futuro³¹.

Lo anterior puede verse reflejado en que cerca del 50 por ciento de los medicamentos aprobados por la FDA fueron PN o derivados de estos³². Según el Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 65% de la población mundial, se basa en las plantas medicinales como su fuente de atención primaria. Se ha estimado que alrededor del 39% de los medicamentos desarrollados desde 1980, provienen de productos naturales, de sus derivados o

²⁹ RODRÍGUEZ. Op. Cit., p36

³⁰ ATANASOV, A; WALTENBERGER, B; FERSCHY, E. *et al.* Descubrimiento y el reabastecimiento de productos naturales farmacológicamente activos de origen vegetal: Una revisión. En: Los avances de la biotecnología, Vol.33, N°.8, p.1582-1614.

³¹ *Ibid.* p.1583

³² Gu, J; Gui, Y; Chen, L; Yuan, G. *et al.* The use of natural products such as the chemical library of drug discovery and the Pharmacology Network. En: *PLoS ONE*, 2013, Vol.8, N°.4, p.e62839.

sus análogos; además de afirmarse, que aproximadamente el 25% de los medicamentos usados actualmente se derivan de plantas³³.

En la investigación de plantas existen diferentes enfoques para seleccionar el material de partida, entre otros, el género o familia donde se ha reportado aislamiento de compuestos con la actividad biológica de estudio y estudios etnobotánicos. Cabe señalar que las familias de las plantas con efecto antimicrobiano, poseen una distribución ubicua. Esto significa que las plantas de todas las regiones del mundo pueden ser fuente natural para el descubrimiento de antimicrobianos, por lo que pueden generar un amplio campo de investigación³⁴.

La odontología actual no es ajena al uso potencial de productos de origen natural aún más cuando de irrigantes o antibacterianos orales se trata. A continuación se presentan algunas de las sustancias más relevantes que pueden ofrecer una alternativa a los principales irrigantes en el campo (hipoclorito de sodio, clorhexidina).

Uncaria tomentosa

Conocido comúnmente como "garra del gato" debido a las pequeñas espinas curvadas en el vástago en la juntura de la hoja, ofrece propiedades anti-inflamatoria, antiviral, antibacteriana, antioxidante, y la acción inmunomoduladora. Su toxicidad es baja cuando es utilizado correctamente, siendo esta una ventaja importante de los tratamientos de plantas medicinales sobre métodos más convencionales. Herrera et al. han evaluado la actividad antimicrobiana de *Uncaria tomentosa* contra *E. Faecalis*, *S. Aureus* y *C. Albicans*. 2% de gel de *Uncaria tomentosa* y gel de clorhexidina al 2% tenían una actividad antimicrobiana similar

³³ POOJARY, M; VISHNUMURTHY, K; VASUDEVA, A. Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*. En: Journal of Pharmaceutical Analysis. June 2015. Vol. 5, n^o.3, p.182-189.

³⁴ RAMIREZ, L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. En: Scientia et Technica. 2009. Vol.15, N^o.42, p. 263-268.

a *S. Aureus*, mientras que la clorhexidina es más efectiva contra *E. faecalis* y *C. albicans*. U. Tomentosa contiene triterpenos, esteroides vegetales y glicoides, estos compuestos pueden estar relacionados con su actividad antimicrobiana.

Vinagre de manzana

El vinagre de manzana ha sido indicado como un agente antiséptico debido a sus propiedades medicinales, con su uso como una solución auxiliar en el sistema quimiomecánico en la preparación de los canales radiculares que ha mostrado buenos resultados en comparación con NaOCl y EDTA. Se ha evaluado la eficacia del vinagre de manzana en la microbiota endodóntica, mostrando una buena acción bactericida contra microorganismos asociados con irrigaciones endodónticas, como *S. Aureus* y *E. Faecalis*.

Propóleos

Presenta acciones anti-inflamatorias y antimicrobianas. Duarte et al. demostraron su influencia en la reducción de la producción de ácido por *S. mutans* en el biofilm dental, además de su acción inhibitoria sobre la actividad F-ATPasa De *S. mutans*. Ferreira et al. evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro del propóleos contra las bacterias anaeróbicas, como *Prevotella Nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*. El análisis microbiológico no reveló diferencias entre grupos irrigados con propóleo y grupos tratados con otros medicamentos intracanales tales como el Hidróxido cálcico.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas conocidas y usadas desde hace siglos (especias, medicinales y plantas aromáticas) se prueban cada vez más por su actividad antibacteriana y antifúngica. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales están estrictamente conectados a su composición química, que está influenciada por numerosos factores incluyendo la procedencia de la planta, la parte de la planta utilizada, la etapa de desarrollo de la planta, las

condiciones climáticas y de crecimiento (Temperatura, suelo, fertilizantes, etc.), así como las condiciones de destilación y almacenamiento.³⁵

5.1.3 Extractos

Los extractos vegetales se definen como un concentrado obtenido por tratamiento a material vegetal con solventes orgánicos, tales como etanol, éter, entre otros. Están constituidos por una mezcla de metabolitos secundarios de la planta y por sustancias inertes producidas de la totalidad o de partes de ella, fresca o seca.

Tipos de extractos

Existen diferentes tipos de extractos entre los que encontramos:

Extractos fluidos: son aquellos en los que el volumen de líquido del extracto es igual al volumen de la planta seca que se haya usado.

Extractos blandos: son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta tener una consistencia de unguento.

Extractos secos: son aquellos a los que se les ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino³⁶.

5.1.4 Métodos de extracción

Para lograr una extracción eficiente de los metabolitos presentes en una planta se requiere un sistema de solventes adecuado, que se selecciona dependiendo del propósito del investigador. En primer lugar, se pueden seleccionar dependiendo de la polaridad del tipo de metabolito que se desea aislar, pero cuando no se tiene certeza de un tipo de metabolito en particular, se procede a obtener diferentes tipos de extractos de diferentes polaridades con el fin de estudiarlos.

Generalmente, se utiliza la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición y de baja reactividad; inicialmente se puede partir de etanol debido a su

³⁵ BORZINI, Op. Cit., p. 693.

³⁶ OLAYA, J y MENDEZ, J. Guía de plantas y productos medicinales. En: Serie ciencia y tecnología. 2003. N° 116, p.11.

capacidad para arrastrar o recuperar la mayoría de metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados en caso de extracciones con agua³⁷. Estas extracciones se diferencian de las soluciones verdaderas en que están presentes sustancias en suspensión.

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diferentes compuestos encontrados en el material vegetal. Para sustancias de baja polaridad (lípidos, terpenos y terpenoides), se utilizan como solventes: éter de petróleo o hexano; para sustancias medianamente polares: cloroformo; para sustancias polares: acetato de etilo; y para sustancias de alta polaridad: etanol o metanol.

Los principales métodos de extracción son:

Continua en soxhlet: el material seco se sitúa en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal.

Por reflujo: el material vegetal y el solvente se colocan en un balón, el cual tiene acoplado un refrigerante; se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal.

Maceración en frío: el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío³⁸.

5.1.5 Identificación preliminar de metabolitos secundarios

El tamizaje fitoquímico o “Screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir

³⁷ ÁVALOS, A y PÉREZ, E. Metabolismo secundario de plantas. 2009, Serie fisiología vegeta. En: Reduca (biología). Vol.2 N^o.3, p.119-145.

³⁸ Ibid. p.122-140

de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés³⁹.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del "Screening" farmacológico. Así, cuando una planta revela acción sobre un sistema durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. Esta puede ser aislada y sometida a pruebas más específicas⁴⁰.

5.1.5.1 Principales metabolitos identificados en las plantas

Alcaloides: Comprenden una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que contienen nitrógeno y se encuentran en aproximadamente el 20% de las especies de plantas vasculares. En estas sustancias, el átomo de nitrógeno está formado en parte por un anillo heterocíclico que contiene átomos de nitrógeno y de carbono. Como grupo, los alcaloides son los más conocidos por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre los animales vertebrados⁴¹.

Taninos: Son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables. Estas

³⁹ SHARAPIN, N; MACHADO, L; SOUZA, E. *et al.* Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos, En: Área de ciencia y tecnología del Convenio Andrés bello & Red Iberoamericana de Productos Fitoterapéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X del CYTED. 2000. p.198.

⁴⁰ Ibid. p.198

⁴¹ TAIZ, L. Fisiología vegetal. En: Publicaciones de la universitat de jaune. 2006. Vol.2, N°.10, p.554.

sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse a sus proteínas⁴².

Glicósidos: Más correctamente heterósidos; son compuestos que presentan en su estructura, una parte formada por una o más moléculas de azúcar y otra denominada aglicón o aglicona. Los glicósidos se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su aglicona en: esferoidales, triterpénicos, flavonoides, antraquinónicos, cumínicos, cianógenos, etc. Desde el punto de vista terapéutico, las sustancias de más interés son los glucósidos cardiotónicos⁴³.

Glicósidos cardiotónicos

Los glucósidos cardíacos (CRGs) son metabolitos naturales de los cuales pequeñas dosis pueden afectar los músculos del corazón de una manera específica.

Su efecto (cardiotónico) ya era conocido en el antiguo Egipto hace más de 3000 años y se han utilizado en el tratamiento de enfermedades cardíacas durante más de 200 años. CRGs forman un grupo bien definido con estructuras homogéneas. Comprenden el núcleo de aglicona y un resto de azúcar (a menudo un oligosacárido). Los glucósidos cardiotónicos pueden ser de dos tipos: cardenólidos y bufadienólidos⁴⁴.

Saponinas: Son generalmente conocidas como compuestos no volátiles que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. El nombre "Saponina" se deriva de la palabra latina "sapo", que refleja sus propiedades surfactantes: capacidad de formar espumas estables en forma de jabón en soluciones acuosas. La naturaleza anfifílica de las saponinas y la combinación de un hidrofóbico aglicona

⁴² DOMINGO, D y LÓPEZ, M. plantas con actividad antimicrobiana. En: Rev.Esp Quimioterap. España. 2003. Vol.16, N^o.4, p.385-393.

⁴³ SHARAPIN. Op. Cit., p.83

⁴⁴ BARTNIK, M y FACEY, P. Chapter 8 - Glycosides, In Pharmacognosy, edited by Simone Badal and Rupika Delgoda, En: Academic Press, Boston, 2017, p.144.

(sapogenina), unida a la cadena o cadenas hidrofílicas de azúcar, distinguen estos compuestos de otros glucósidos. La estructura química de la sapogenina define la clasificación de las saponinas como esteroides o triterpenoides⁴⁵.

Flavonoides: Son compuestos polifenólicos sintetizados en las plantas a través del metabolismo fenilpropanoide o vía acetato-malonato. Se han reportado más de diez mil variantes estructurales de flavonoides. El término "flavonoide" describe generalmente una amplia colección de productos naturales formados por estructuras C6-C3-C6 que forman un 2-fenil-benzo-alfa-pireno (cromano) que consiste en dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano (C). Estos son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, divididos por el grado de hidroxilación, metoxilación, prenilación, glicosilación y fijación del anillo B en C-2 (más frecuentemente) o posición C-3⁴⁶.

Cumarinas. Las cumarinas deben su nombre de clase a "Coumarou", el nombre de la haba tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae), del que fue aislado el coumarin en 1820. El núcleo cumarínico consiste en un anillo de pirona unido a un anillo de benceno. Las cumarinas son 1,2-benzopironas (benzo-2-pironas, cromeno-2-onas) y se clasifican en: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas y las cumarinas sustituidas con pirona (benzocumarinas y furanobenzocumarinas) con benceno o benzofurano respectivamente⁴⁷. Las cumarinas son unos de los metabolitos que han destacado en la planta *M. americana*.

Triterpenos y esteroides. Los triterpenos son el grupo biológicamente versátil de terpenos; se componen de subunidades de isopreno y consisten en aproximadamente 30.000 compuestos identificados. En relación con el número de unidades isoprenoides, los terpenos se subdividen en: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) y

⁴⁵ Ibid. p.136

⁴⁶ Ibid. p.117

⁴⁷ Ibid. p.111

tetraterpenos (C40), donde el esqueleto de carbono es acíclico, contiene estructuras mono-, bi-, tri-, tetra- y pentacíclicas, respectivamente. Los términos triterpenos y triterpenoides se usan frecuentemente para describir el mismo compuesto C30-terpeno. Mientras que el triterpeno se usa como un término colectivo para describir los terpenos naturales. La expresión más amplia triterpenoide cubre también productos naturales de degradación, por ejemplo iononas, así como derivados naturales y sintéticos tales como: alcoholes terpénicos, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, epóxidos y productos de hidrogenación⁴⁸.

Los esteroides poseen una estructura de ciclopentaperhidrofenantreno total o parcialmente reducido, a veces con grupos metilo en C-10 y C-13. Sin embargo, la columna vertebral de la cadena lateral en C-17, su longitud y la estereoquímica de algunos de sus centros quirales, conducen a diferentes esqueletos de esteroides. Desde el descubrimiento de la limonina en 1960, muchos esqueletos de limonoides naturales han sido caracterizados. La ocurrencia de las últimas modificaciones estructurales proporciona diversas columnas vertebrales de limonoides con 26 carbonos, justificando por qué esta clase de compuestos se llama tetranortriterpenoides⁴⁹.

5.1.5.2 Principales pruebas fitoquímicas para la identificación de metabolitos secundarios⁵⁰

Ensayos de Mayer y de Wagner: permiten identificar alcaloides; se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si

⁴⁸ MUFFLER, K; LEIPOLD, D; SCHELLER, M. *et al.* Biotransformation of triterpenes, En: Process Biochemistry. 2011. Vol.46, N°1, p.2.

⁴⁹ PERGAUD, L y KUETE, V. 4-Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa, In Medicinal Plant Research in Africa. En: Elsevier, Oxford. 2013. p.135.

⁵⁰ JÁTIVA, Cumanda. Texto básico de Farmacognosia y Productos Naturales. En: Riobamba CDR-XEROX 2000. p.56- 59.

al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito. En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso. Para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

El ensayo de Baljet: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas; aunque hay otros compuestos lactónicos que pueden dar también positivo en este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado.

Ensayo de Bornträger: Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo. Se utiliza para la identificación de quinonas.

Ensayo de Liebermann – Burchard: Se utiliza para identificar triterpenos y/o esteroides debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de Antocianidinas: permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo. La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forman un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua de donde se extrae, denota la presencia de mucílagos.

Ensayo de espuma: permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas.

5.1.6 Género *Mammea*

El género *Mammea* pertenece a la familia *Clusiaceae* y se compone de 70 especies que crecen en las regiones tropicales de todo el mundo. Muchas de las especies del género *Mammea* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades tales como fiebre, dolores estomacales e infecciones microbianas⁵¹.

Los estudios fitoquímicos de miembros del género *Mammea* reportan una serie de compuestos cumarínicos del tipo *Mammea*. Se ha informado en la literatura que 39 cumarinas del tipo *Mammea* han sido previamente aisladas e identificadas de diversas partes de *Mammea americana*⁵².

⁵¹ MAGADULA, J; MASIMBA, P; TARIMO, R. *et al.* Mammea-type coumarins from *Mammea usambarensis* Verdc. En: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2014. Vol.56, p.65.

⁵² *Ibid.* p.56

5.1.6.1 Metabolitos secundarios aislados del género *Mammea*.

En este género, los metabolitos que han mostrado y a los cuales se les ha atribuido la mayoría de las actividades biológicas son las cumarinas. Según la revista SciFinder database, del género *Mammea* se han aislado aproximadamente 120 tipos de cumarinas. Entre estos metabolitos se han reportado distintos tipos de actividades biológicas entre las que se encuentran insecticidas, antivirales y antioxidantes. Para estos, se ha propuesto una nomenclatura que se basa brevemente en el nombre 'mammea' seguido por una primera letra que indica la sustitución en C-4 (carbono cuatro). Una segunda letra indica si el grupo acilo está en C-6 (carbono seis) o C-8 (carbono ocho). Una tercera letra está relacionada con el tipo de sustituyentes acilo. Cuando el sustituyente prenilo ha sido posteriormente ciclado, la tercera letra va seguida del prefijo ciclo y una cuarta letra que indica el tipo de heterociclo implicado⁵³, como se indica en la figura 1.

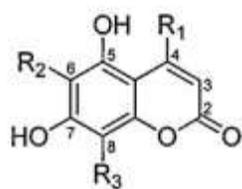
	Sustitución en C-4	1^{era} letra	Sustitución en C-6 o C-8	3era letra
	R1 = fenilo	Mammea A	R2/R3 = 3-metilbutílico	A
	R1 = propil	Mammea B	2-metilbutílico	B
	R1 = 1-acetoxipropil	Mammea e	butinilo	C
			2-metilpropinilo	D
	Posición del grupo acilo	2da letra	Si la ciclación del grupo prenilo	Ciclo+4^a letra
R2 = Acilo	A	2,2-dimetilcromene	ciclo D	
R3 = Acilo	B	3-hidroxy-2,2-dimetildropirane	ciclo E	
		2-(1-hidroxy-1metiletil)	ciclo F	
		dihidrofurano		

Figura 1.

Estructuras y nomenclatura de cumarinas extraídas de *M. americana* (Mammea cumarinas)⁵⁴.

5.1.7 *Mammea americana* L.

⁵³ DANG, B; GUITTON, Y; FREUZE, I; GROVEL, O. *et al.* Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. En: *Phytochemistry Letters*. 2015. Vol 11, p.61-68.

⁵⁴ *Ibid.* p.64

Árbol de hoja perenne que alcanza una altura de 18 a 21 mts. Tiene un tronco corto con una corona oval. La fruta es de unos 300 a 500 g en peso. Es una fruta redonda ovoide, similar en forma y tamaño a una naranja (aproximadamente 7,7-9,8 cm de longitud y 10,9-8,6 cm de diámetro)⁵⁵.

A pesar de que la manzana mamey comúnmente se considera una drupa, en realidad es una baya. La corteza es de color rojizo, cubierta de manchas marrones, dura, gruesa, coriácea, arrugada y tiene aproximadamente 4 mms de espesor. La fruta contiene una gran semilla única rodeada por una capa fina de carne amarilla. El endocarpio, que es también amarillo, es de aproximadamente 2-5 mm, grueso y fusionado con la testa⁵⁶.

Cuando la fruta está completamente madura, la carne es apetitosamente fragante. Su sabor es similar al del albaricoque, melocotón o frambuesa roja, pero algunas variedades se caracterizan por un aroma ácido. Frutas demasiado ácidas o demasiado dulces son consideradas de baja calidad⁵⁷.

Descripción botánica

Taxonomía

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Theales
Familia	Clusiaceae
Género	Mammea
Epíteto específico	americana
Autor	L. ⁵⁸

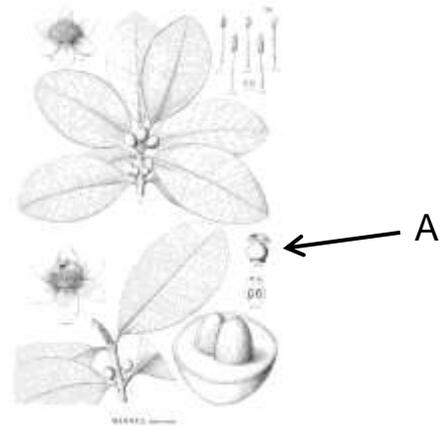


Figura 2. Dibujo lineal de *Mammea americana* L. (A) semilla. Tomado de Trópicos (<http://www.tropicos.org/>)

⁵⁵ YAHIA, E y GUTTIERREZ, F. 20 - Mamee apple (*Mammea americana* L.). En: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing. 2011. p.475.

⁵⁶ Ibid. p.475

⁵⁷ Ibid. p.475

⁵⁸ (JBMB) Jardín Botánico de Missouri Biblioteca. En: Flora brasiliensis illustration. 1840-1906. Vol. XII, Part I, Plate 79.

5.1.7.1 Distribución geográfica de *M. americana* en Colombia

La planta se encuentra distribuida en gran parte del territorio colombiano, logrando crecer en ambientes desde el nivel del mar hasta zonas superiores a los 1500 msnm; se ha reportado su presencia en los departamentos de Bolívar, Antioquia, Caldas, Cundinamarca y Guajira. Figura 2.



Región Biogeográfica

Andes, Llanura del Caribe, Pacífico, Valle del Magdalena.

Elevación

100 - 1670 m.

Departamentos

Antioquia, Bolívar, Caldas, Cundinamarca, La Guajira.

Distribución Global

Nativa de las Antillas, cultivada en zonas tropicales.

Figura 3. Distribución geográfica de *Mammea americana* L. tomado de: Celis, M. 2017-1-09. *Mammea americana* L. En Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2015. En: Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>.

5.1.7.2 Usos del fruto de *Mammea americana* L.

Atendiendo a los reportes populares realizados, se ha demostrado que la planta *M. americana* se utiliza ampliamente en la curación de diversas enfermedades debido a su efecto antiparasitario e insecticida. Para estos fines, se utiliza el látex de la semilla contra el *Aedes aegypti*, que elimina las larvas de ese vector. Por otra parte, se ha confirmado el efecto de la fruta para tratar la anemia, mientras que la resina y la decocción de la corteza se emplean contra los parásitos, infecciones micóticas y eczemas. La infusión de sus hojas es un antifebrífugo⁵⁹.

5.1.7.4 Semillas de *M. americana* L.

Las infusiones de las semillas pulverizadas se usaron con frecuencia como insecticidas para eliminar las garrapatas y los ácaros en los animales domésticos y en los seres humanos. Los usos del mamey en la medicina popular han incluido las semillas de esta planta en el tratamiento de las infecciones del cuero cabelludo, diarrea, problemas oculares y digestivos. La mameína y las cumarinas relacionadas han sido objeto de investigación para determinar su actividad farmacológica⁶⁰. Existen pocos estudios de la semilla de esta planta; según la literatura, del aceite de la semilla se ha aislado el floriglucinol⁶¹.

5.2 PARTE MICROBIOLÓGICA

5.2.1 Género *Enterococcus*

Son microbios bien adaptados como comensales de los tractos gastrointestinales de los organismos de hombre a insectos. Han surgido a lo largo de las últimas décadas como causantes de infecciones nosocomiales. Esta evolución se debe,

⁵⁹ REMÓN. Op Cit., p. 302

⁶⁰ FRANCIS, J. Mamey, mammea-apple. Department of Agriculture, Forest Service. En: Southern Forest Experiment Station. 1989. p. 334-337.

⁶¹ TOMA, W; HIRUMA, C; GUERRERO, R. et al. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. En: Phytomedicine. 2005. Vol. 12, N^o. 5, p.345-350.

en parte, a su resistencia intrínseca a las duras condiciones de entornos hospitalarios, resultando a menudo en su concurrencia con otros microbios resistentes a los antibióticos. En hospitales y entornos agrícolas, los enterococos han servido como punto de recogida para los factores de resistencia a antibióticos, y con la aparición en los 80 de cepas resistentes a la vancomicina, pocos tratamientos bactericidas permanecen. Se piensa que han comenzado a transferir genes con *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y a adquirir su resistencia. Como resultado, los enterococos resistentes a múltiples fármacos se han convertido en una preocupación principal de salud pública⁶².

Los *Enterococcus* son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6-2,0x0,6-2,5 µm. Son cocos grampositivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles, con excepción de las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, con metabolismo fermentativo. Fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de L (+)- ácido láctico, pero no de gas, y producen un pH final de 4,2-4,6. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o, más comúnmente, débilmente positivos. Crecen usualmente en un caldo de cultivo entre 10°C y 45°C, aunque el crecimiento óptimo es a 37°C. Pueden crecer a pH 9,6, con 6,5% de NaCl y con 40% de bilis. Usualmente fermentan la lactosa. Portan el antígeno D del grupo Lancefield y poseen el carbohidrato C. Sobreviven después del calentamiento a 60°C durante 30 min⁶³.

Microbiológicamente, los enterococos son clasificados como: cocos grampositivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y la mayoría aglutinan con anticuerpos específicos para el grupo D de Lancefield. Debido a estas características, durante

⁶² HEIMER, S; MORRISON, R; GILMORE, M. Chapter 39 - The Enterococci, In Molecular Medical Microbiology (Second Edition), edited by Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton and Joseph Schwartzman, En: Academic Press, Boston. 2015. p.717-730.

⁶³ DIAZ, M; RODRIGUEZ, C; ZHURBENKO, R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. En: *Revista Cubana Higiene y Epidemiología* [online]. 2010. Vol.48, N°.2, p.149.

un largo período de tiempo, fueron considerados *Streptococcus*; estudios genéticos posteriores evidenciaron diferencias con este género, por lo cual, en 1984, los enterococos constituyeron un nuevo género llamado *Enterococcus*, integrado por múltiples especies. Las especies de enterococos con importancia clínica para el hombre son:⁶⁴

- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *E. durans*
- *E. avium*
- *E. casseliflavus*
- *E. gallinarum*
- *E. raffinosus, E. malodoratus, E. hirae*
- *E. mundtii, E. solitarius, E. pseudoavium.*

5.2.1.1 Resistencia antimicrobiana del género *Enterococcus*.

El género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca, de carácter cromosómico y no transferible, a varios antibióticos, incluyendo cefalosporinas, meropenem, ertapenem, penicilinas resistentes a penicilinasas, cotrimoxazol, aminoglucósidos y clindamicina.

La mayoría de los genes que codifican resistencia intrínseca residen en los cromosomas. Además de la resistencia intrínseca, poseen gran capacidad para la adquisición de mecanismos de resistencia y de genes de virulencia, ya sea a través de plásmidos, transposones conjugativos, intercambio cromosómico o mutaciones⁶⁵.

⁶⁴ ORTEGA, L. Enterococos: actualización. En: *Revista habana ciencias médicas* [online]. 2010. Vol.9, N°.4, p.507-515.

⁶⁵ Ibid. p.512

Debido a que los enterococos son más resistentes a los agentes antimicrobianos, las opciones terapéuticas son más limitadas. Las cepas multirresistentes de *Enterococcus* se están convirtiendo en una amenaza, ya que algunas son resistentes a todos los antimicrobianos disponibles. Es por esto, que el control de la diseminación de estos microorganismos es indispensable.

5.2.2 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis es un coco Grampositivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes⁶⁶.

La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa; no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas. *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, la cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureína y ácido teicoico⁶⁷.

Una característica notable de *E. faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias; particularmente en zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C); también puede resistir la acción de

⁶⁶ PARDI, G; GUILARTE, C; CARDOZO, E. *et al.* "Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico". En: *Acta odontol. venez* [online]. 2009. Vol.47, N^o.1, p.112.

⁶⁷ *Ibid.* p.112

colorantes como Azul de Metileno al 0,1%. Esta capacidad de resistencia por parte de *E. faecalis* en microambientes tóxicos está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes tratados endodónticamente, con nutrientes limitados⁶⁸.

5.2.2.1 *Enterococcus faecalis* y la infección en endodoncia

El objetivo final del tratamiento de endodoncia es eliminar el tejido pulpar enfermo del sistema de conductos radiculares, proporcionar un ambiente adecuado para la cicatrización y prevenir la periodontitis apical. Los microorganismos son la causa principal de las enfermedades pulpares y periapicales. Una buena compactación del material de relleno dentro del conducto radicular y un sellado apical hermético que impida cualquier fuga microbiológica, son cruciales para el éxito de un tratamiento de endodoncia. La periodontitis apical es causada por bacterias; es tratada mediante limpieza y desinfección químico-mecánica del canal, para posteriormente ser rellenado, sellándolo apical y coronalmente para prevenir la reinfección⁶⁹. Sin embargo, en la literatura se describen dos hechos que están estrechamente relacionados con la infección de esta zona. Algunos autores citan la penetración de bacterias en el canal radicular y otros autores indican la supervivencia de estas a los procedimientos químico-mecánicos de descontaminación de los canales radiculares.

Las infecciones endodónticas pueden subcategorizarse como primarias y persistentes. Las infecciones primarias mayormente se producen por microorganismos anaerobios gramnegativos, mientras que las infecciones persistentes son causadas por bacterias grampositivas facultativas⁷⁰.

Los *Enterococcus* son bacterias grampositivas que hacen parte de la flora habitual que se encuentra en la boca, el tracto gastrointestinal humano y el tracto genital

⁶⁸ Ibid. p.112

⁶⁹ SAVADKOUHI, S; BAKHTIAR, H; ARDESTANI, S. *In vitro* and *ex vivo* microbial leakage assessment in endodontics: A literature review. En: Int Soc Prevent Communit Dent. 2016. Vol. 6, N^o.6, p.510.

⁷⁰ Ibid. p.510

de la mujer. Son una causa bien conocida de fracaso endodóntico, así como causantes de algunas enfermedades sistémicas como infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia y endocarditis bacteriana. Han desarrollado una alta resistencia a agentes antimicrobianos y poseen numerosos factores de virulencia tales como sustancias de agregación, proteína de superficie, gelatinasa, producción de superóxido extracelular, polisacáridos capsulares y la determinante resistencia a los antibióticos. Los enterococos son reconocidos como potenciales patógenos humanos, causando el 12% de todas las infecciones hospitalarias. En las infecciones recurrentes de endodoncia, la especie que se ha aislado con mayor frecuencia es *Enterococcus faecalis*⁷¹. Su supervivencia a largo plazo en el sistema del conducto radicular podría ser el resultado de su capacidad de adherirse a la dentina e invadir los túbulos dentinales, formar comunidades organizadas en biofilms, que pueden contribuir a la resistencia bacteriana y persistencia después de los diferentes procedimientos antimicrobianos intracanales. Este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir en un ambiente en el que no hay nutrientes disponibles y en los que la comensalidad con otras bacterias es mínima. Por lo tanto, es probable que las bacterias dentro de los túbulos dentinarios sobrevivan a la instrumentación quimio-mecánica y a la medicación intracanal con lo que pueden colonizar los túbulos y reinfectar el canal de la raíz ya obturada.⁷²

La frecuente presencia de *Enterococcus faecalis* en los canales radiculares donde el tratamiento de endodoncia ha fallado sugiere que este es un patógeno oportunista, cuya persistencia en los canales representa un problema terapéutico significativo⁷³.

⁷¹ JAIN, H; MULAY, S; MULLANY, P. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. En: Gene Reports. 2016. Vol. 5, p.114.

⁷² BORZINI, Op. Cit. p. 700.

⁷³ Ibid. p.114

5.2.3 Método de dilución en caldo.

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC). La MIC es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. La MBC es la concentración más baja que puede prevenir su crecimiento después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado. Estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos⁷⁴. En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación⁷⁵.

⁷⁴ RAMIREZ, L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. En: Scientia et Technica. 2009. Vol.15, N° 42, p.264.

⁷⁵ Ibid. p.265

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de intervención experimental *in vitro* para evaluar la efectividad antibacteriana de los metabolitos de extractos de la semilla de *Mammea americana* sobre *E. faecalis* mediante un ensayo de microdilución en caldo.

-Modelo biológico

Colonias de *E. faecalis* ATCC 51299 disponibles en el Laboratorio de Investigaciones del grupo Genética y Biología molecular, Facultad de Medicina - Universidad de Cartagena.

-Criterios de inclusión y exclusión

-Criterios de inclusión

- Presencia y disminución de turbidez en las muestras con cada extracto cuando se compara con la del control de crecimiento.

-Criterios de exclusión

- Ausencia de turbidez en el control de crecimiento.

-Operacionalización de variables

Variables	Indicadores	Unidad de medida	Nivel de medición	Tipo de variable
Extracto	Concentración	µg/mL	De razón	Cuantitativa -Continua Independiente

Concentración mínima inhibitoria (CMI)	Peso/volumen	µg/mL o mg/mL Ausencia o presencia de actividad antibacteriana.	De razón Nominal	Cuantitativa -Continua Cualitativa -Nominal Dependiente
---	--------------	--	---------------------	---

-Objeto de estudio: Actividad antibacteriana de los metabolitos de extractos de la semilla de *Mammea americana* contra *E. faecalis*.

-Unidad de análisis:

- Concentración mínima inhibitoria (CMI).

6.1 Recolección del material vegetal

Las semillas de *Mammea americana* fueron extraídas de la fruta (Mamey) obtenida del mercado local de Barranquilla-Atlántico, en la costa caribe colombiana. (Fig. 7).

6.2 Preparación de los extractos y fraccionamiento

La obtención de los extractos y el análisis fitoquímico se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena. Los extractos orgánicos de diferentes polaridades objeto de estudio se obtuvieron empleando la metodología propuesta por Beltrán *et al.*, 2013⁷⁶. La cáscara de las semillas fue removida y su núcleo triturado al máximo posible con ayuda de instrumentos de cocina. (Fig. 7). Se tomaron 500 gramos de material vegetal triturado, seco (Fig. 8) y se sometieron a maceración usando como solvente etanol (Fig. 9). Después de su filtrado (Fig. 9) se procedió a concentrar el

⁷⁶ BELTRÁN, C; DÍAZ, F; GOMEZ-ESTRADA H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. En: Rev Cubana Plant Med, Ciudad de la Habana. Vol. 18, N° 4, p. 624.

extracto etanólico en un rotaevaporador automático (HEIDOLPH Fig. 10), hasta un volumen aproximado de 10 y 20 mL de los que se separó 1mL para la posterior actividad biológica. El extracto restante fue mezclado con alúmina (MERK) y absorbido por ésta en una proporción 1/8 extracto: alúmina, utilizando un mortero hasta obtener un polvo seco (Fig. 11). Posteriormente se dejó secar en una incubadora (BINDER Fig.12) a 45° C durante 24 horas para evaporar el solvente restante presente en el extracto. A partir del anterior extracto en alúmina, se obtuvieron los extractos orgánicos de diferentes polaridades (Fig.13) efluyendo cada uno de los solventes por la columna de cromatografía abierta en orden creciente de polaridad. Los solventes fueron hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol de grado analítico. (Fig. 14).

6.3 Caracterización fitoquímica de los extractos de *M. americana*

Los procesos de caracterización de los extractos se realizaron por medio de pruebas microquímicas, según lo descrito por Beltrán⁷⁷. El tamizaje fitoquímico de los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos de las plantas estudiadas se realizó de la siguiente forma: determinación de alcaloides (ensayo de *Dragendorff*, taninos (ensayo de cloruro férrico), cumarinas (ensayo de NaOH (*Bornträger*), KOH), flavonoides (ensayo de *Shinoda* y citrobórico), triterpenos (*Salkowski*), saponinas (vainillina-ácido sulfúrico), y glicósidos cardiotónicos (ensayo de *Kedde*, *Raymond-Marthoud* y *Keller-Kiliani*). Todas estas pruebas se realizaron utilizando la técnica de cromatografía en capa fina sobre cromatoplasmas de Sílica gel 60 F₂₅₄ (MERK) con soporte de aluminio (20x20 cm, 0.2 mm de espesor). Todos los solventes utilizados fueron en grado analítico y los reactivos de identificación se prepararon al momento de realizar los ensayos para minimizar errores por degradación de las soluciones reactivas. Finalmente se utilizó una lámpara UV ($\lambda=254$ nm y 365 nm) (Fig.15), ácido sulfúrico al 10% en metanol, vainillina y reactivos de revelación universales o específicos dependiendo del grupo de compuesto a evaluar.

⁷⁷ Ibid. p.626

6.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

6.4.1 Preparación de las soluciones

Diez miligramos de los extractos se pesaron y disolvieron en 1 mL de Dimetilsulfóxido al 99% (DMSO Fig.16), hasta obtener una solución madre de 10.000 mg/L. A partir de la solución madre se realizaron diluciones intermedias hasta llegar al intervalo de concentraciones a evaluar de 500-400-300-200-100-50 mg/L (Fig. 17). Como control se utilizó Kanamicina, a la cual se le determinó la concentración efectiva e inhibitoria media y como control negativo se utilizó DMSO, al cual se le determinó la concentración inhibitoria media.

6.4.2 Microorganismo de estudio

La actividad antimicrobiana fue evaluada usando la bacteria Grampositiva *Enterococcus faecalis* ATCC (51299), la cual se adquirió en el Laboratorio de Investigación de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena.

6.4.3 Condiciones de los cultivos

Las cepas bacterianas se mantuvieron en tubos de agar Mueller Hinton (MERK) inclinados a 4°C previa su reactivación. Para la prueba de actividad antibacteriana, los cultivos bacterianos fueron preparados en un tubo con caldo Mueller Hinton (MERK Fig.18), e incubados a 37°C en una incubadora Gemmyco, LAB incubator modelo IN-010 (Fig.19). El inóculo se preparó a las 24 horas de incubación y la densidad óptica fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland equivalente a 1×10^8 UFC/mL.

6.4.4 Actividad antibacterial

La actividad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, se evaluó la actividad utilizando el método de dilución en caldo en placas de 96 pozos, lo que

permitió determinar también la concentración mínima inhibitoria. Las muestras de bacterias se inocularon en caldo Mueller Hinton ajustadas a escala 0.5 McFarland. Luego, 100µL de las suspensiones microbianas y 100µL de las diluciones de los extractos en caldo Mueller-Hinton, se transfirieron a las microplacas. Alícuotas de 200µL se incubaron durante 24 horas a 37°C (bacterias) (Fig. 20). La concentración mínima inhibitoria fue evaluada con la ayuda del espectrofotómetro Multiskans ascent (Thermo Scientific, Germany) (Fig. 21) a una longitud de onda de 620 nm a las 0 y 24 horas. El ensayo se realizó dos veces en dos días distintos por triplicado para cada concentración.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm SEM. El nivel de significación estadística se determinó usando análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con GraphPad Prism software 6.0. Las diferencias entre las medias de los ensayos obtenidos para concentración se evaluaron por análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey's como Post-Test. Esta última fue utilizada para realizar las comparaciones con el grupo control. Para todos los casos, los valores de $p < 0.05$ se consideran significativos.

6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Tomando en cuenta lo establecido en el artículo 67 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, donde se disponen los reglamentos y estatutos a seguir en investigaciones con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, se tuvo en cuenta y se incluyó el proyecto como grupo de riesgo uno: en el cual los microorganismos representan un escaso riesgo para el individuo y para la comunidad, por tal motivo pueden ser manipulados en laboratorios tipo básico de microbiología.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de los extractos de *M. americana*

Empleando la metodología propuesta por Beltrán⁷⁸, se obtuvieron los extractos orgánicos de diferentes polaridades, partiendo de un extracto etanólico adsorbido en Sílica gel empaquetado en una columna de cromatografía abierta. Se efluyeron cuatro solventes en orden creciente de polaridad por la columna y se obtuvieron los siguientes extractos: Extracto hexanoico, clorofórmico, acetato de etilo y metanol; incluyendo el extracto etanólico, se obtuvieron 5 extractos. El extracto etanólico de consistencia semilíquida, poseía un color anaranjado-café, color que permaneció en el extracto hexanoico y clorofórmico; los extractos acetato de etilo y metanólico presentaron un color café. Se calcularon los porcentajes de rendimiento de los extractos mediante las siguientes fórmulas:

Para el extracto etanólico (total):

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso del material vegetal seco}} \times 100$$

Para los extractos orgánicos:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso del extracto etanólico seco}} \times 100$$

De las semillas de *M. americana*, se pesaron 1088.13g de material seco y se obtuvieron 86.14g de extracto etanólico con un porcentaje de rendimiento de 7.91%. A partir de este se obtuvieron los extractos orgánicos con los siguientes pesos: hexanoico 34.82g; clorofórmico 32.21g; acetato etilo 13.22g; metanólico 14.76g, con porcentajes de rendimiento de 40.42%, 37.39%, 15.34%, 17.34% respectivamente.

⁷⁸ Ibid. p.626

7.2 Tamizaje fitoquímico preliminar de las semillas de *M. americana*

Mediante el tamizaje fitoquímico preliminar se logró identificar la presencia de los metabolitos presentes en el extracto total y en los extractos de diferentes polaridades. Los resultados del Screening fitoquímico se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico preliminar de la especie *Mammea americana*.

Nombre planta	<i>M. americana</i>	EtOH	Hex	CHCl ₃	AcOEt	MeOH
Metabolito	Prueba	TLC	TLC	TLC	TLC	TLC
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	-	-
Glucósidos cardiotónicos	Ballet	-	-	-	-	-
	Raymond-Marthoud	-	-	-	-	-
	Tricloruro de antimonio	-	-	-	-	-
Cumarinas volátiles	NaOH	+	+	+	-	-
	KOH	+	+	+	-	-
Flavonoides	Reactivo citrobórico	+	+	+		
Taninos	Cloruro férrico	+	-	-	+	+
Saponinas	Vainillina-ácido sulfúrico	-	-	-	+	+
	Tricloruro de antimonio	-	-	-	+	+
Triterpenos y/o esteroides	Salkowski	+	+	+	-	-
EtOH (extracto etanólico), He (extracto hexanoico), CHCl ₃ (extracto clorofórmico), AcOEt (extracto acetato de etilo), Me (extracto metanólico). Presencia (+); Ausencia (-) Dudoso (+/-)						

7.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de semillas de *M. americana*

En este experimento, la capacidad antimicrobiana es medida a través de un equipo de Multiskans ascent para las lecturas de las placas de 96 pozos. Inicialmente se determinaron los porcentajes de inhibición de los controles. Para el

control positivo, (Kanamicina) en un intervalo de concentración de 50-100-200-300-400-500mg/L, los valores de los porcentajes de inhibición se muestran en la Tabla 2. Para el control negativo, se evaluó el efecto que tiene el DMSO en el crecimiento de la cepa bacteriana para lo cual se evaluó un intervalo amplio de concentraciones (25-50-100-200-300-400-500mg/L); los resultados de los porcentajes de inhibición se muestran en la Tabla 3. Para la actividad antibacteriana de los extractos, se determinaron los porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones de los extractos; para esto, a las absorbancias de los ensayos a las 24 horas, se les restó la absorbancia del blanco (medio de cultivo). Este valor se dividió entre la absorbancia del control de crecimiento (medio de cultivo +cepa) y por último este valor resultante se multiplicó por 100.

En la Tabla 5 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de las semillas de *M. americana*, obtenidas a partir de las concentraciones mínimas de los dos ensayos de actividad antibacteriana, en la cual también se muestra el porcentaje de inhibición promedio para cada extracto con su desviación estándar.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición del control positivo.

Concentración (mg/L)	Porcentaje de inhibición (%)
50	84,83
100	92,18
200	98,07
300	98,54
400	99,41
500	99,93

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de las concentraciones de DMSO.

Concentración (mg/L)	Porcentaje de inhibición (%)
50	0,04
100	0,39
200	0,66
300	0,74
400	0,78
500	0,97

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de las concentraciones de cada uno de los diferentes tipos de extractos.

Extracto etanólico				
Concentración (mg/L)	Porcentajes de inhibición (%)			Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	
50	28,64	28,14	28,39	0,36
100	54,86	53,85	54,36	0,71
200	51,93	50,34	51,13	1,12
300	48,49	48,07	48,28	0,30
400	52,01	50,67	51,34	0,95
500	59,97	61,98	60,97	1,42
Extracto hexanoico				
Concentración	Porcentajes de inhibición (%)			Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	
50	30,07	29,31	29,69	0,53
100	56,95	54,94	55,95	1,42
200	55,70	56,03	55,86	0,24
300	54,52	52,76	53,64	1,24
400	54,10	55,19	54,65	0,77
500	73,87	73,20	73,53	0,47
Extracto clorofórmico				
Concentración	Porcentajes de inhibición (%)			Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	
50	25,63	25,71	25,67	0,06
100	61,64	62,14	61,89	0,36
200	71,78	75,80	73,79	2,84
300	65,16	68,51	66,83	2,37
400	61,89	62,73	62,31	0,59
500	68,09	65,08	66,58	2,13

Extracto de acetato de etilo				
Concentración	Porcentajes de inhibición (%)			Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	
50	39,03	36,60	37,81	1,72
100	37,69	39,87	38,78	1,54
200	45,98	47,32	46,65	0,95
300	48,74	49,16	48,95	0,30
400	39,78	42,80	41,29	2,13
500	55,03	52,76	53,89	1,60
Extracto metanólico				
Concentración	Porcentajes de inhibición (%)			Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	
50	30,40	26,30	28,35	2,90
100	43,30	44,56	43,93	0,89
200	40,12	39,61	39,87	0,36
300	39,11	37,69	38,40	1,01
400	36,26	35,51	35,89	0,53
500	41,21	40,03	40,62	0,83

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de las semillas de *M. americana*.

Tipo de extracto	Concentración mínima inhibitoria (mg/L)	Porcentaje de inhibición promedio
Etanólico	100	54,36±0,71
Hexanoico	100	55,95±1,42
Clorofórmico	200	73,79±2,84
Acetato de etilo	300	48,95±0,30
Metanólico	100	43,93±0,89

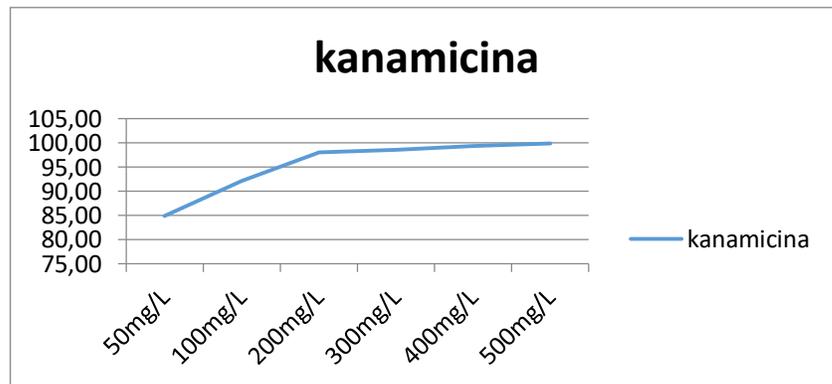


Figura 4. Actividad inhibitoria del control positivo (Kanamicina)

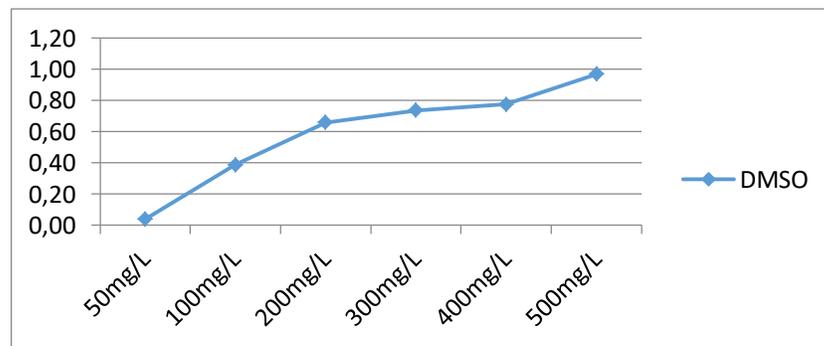


Figura 5. Efecto del DMSO sobre el crecimiento de E. faecalis.

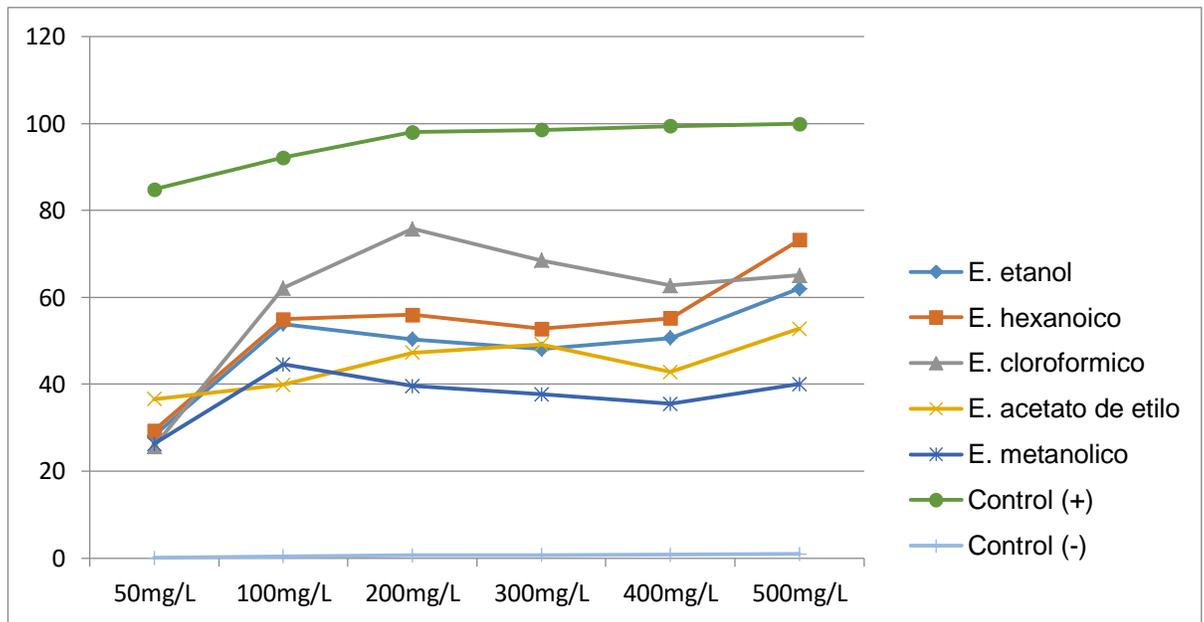


Figura 6. Inhibición de los extractos de semillas de *M. americana* frente a *E. faecalis*.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de las semillas de *M. americana* frente a *E. faecalis* no han sido descritos para la especie colombiana.

8. DISCUSIÓN

8.1 Tamizaje fitoquímico preliminar de semillas de *M. americana*

Mediante la tamización fitoquímica de las semillas de *M. americana* se determinó la presencia de alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos y esteroides para los extractos: etanólico, hexanoico, y clorofórmico; presencia de saponinas en los extractos: etanólico, acetato de etilo y metanólico; y presencia de taninos para los extractos: etanólico, acetato de etilo y metanólico. No se logró determinar la presencia de glucósidos cardiotónicos en ninguno de los extractos (Tabla 1), datos que concuerdan con los descritos por Remón et al⁷⁹, quienes reporta la presencia de alcaloides, cumarinas, taninos y flavonoides en tinturas de extractos de *M. americana*. No obstante en el tallo de la planta, los resultados también se relacionan con los reportados por Manzano et al⁸⁰ en los que reportan alcaloides, flavonoides en extractos etanólicos y acuosos, taninos en extractos acuosos (extracto polar) en las semillas de esta planta. Por último, los datos del tamizaje también coinciden con los reportados por Beltrán et al⁸¹ quienes reporta la presencia de cumarinas, taninos, flavonoides, triterpenos y esteroides en el extracto etanólico de semillas de *M. americana*.

Esta variedad de metabolitos identificados y reportados por la literatura justifica la utilidad de esta planta en la cura de diversas afecciones. Se ha demostrado científicamente la presencia de taninos y fenoles como responsables de la posible actividad antibacteriana de esta especie de planta, ampliamente distribuida en la región⁸². Se comprueba, además, la ausencia de glucósidos cardiotónicos en los extractos de las semillas de esta especie.

⁷⁹ REMÓN. Op. Cit., p.304

⁸⁰ MANZANO, P; ORELLANA, T; CATAGUA, D. Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólico y etéreo de la semilla de *Mammea americana* de Ecuador. En: Yachana. 2012. Vol. 4, No. 1, p.1

⁸¹ BELTRAN. Op. Cit., p.626

⁸² REMÓN. Op. Cit., p.306

Es muy importante resaltar la presencia de cumarinas debido a que a estos metabolitos han sido muy estudiados en esta planta, se han aislado y se les ha atribuido sus propiedades biológicas. Una de las cumarinas que más ha sido estudiada y aislada de las semillas de *M. americana* es la Mameína (4n - propil - 5,7 - dihidroxi - 6 isopentil - 8 - isovaleril - cumarina)⁸³.

Además cabe destacar que la Mameína y las cumarinas relacionadas han sido objetivo de investigaciones para determinar su actividad farmacológica, ya que el mamey en la medicina popular se ha incluido en el tratamiento de infecciones del cuero cabelludo, boca, diarrea, problemas oculares y digestivos⁸⁴.

8.2 Actividad antibacteriana de extractos de semillas de *M. americana*

Todos los metabolitos obtenidos del extracto de la semilla presentaron actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*, sin embargo se evidencia mayor inhibición con los extractos hexanoico y clorofórmico, observada a las 24 horas. En el extracto etanólico también se evidenció un porcentaje superior al 50%, observado a las 24 horas, pero haciendo la salvedad que este es el extracto total. Es un extracto crudo, más complejo en composición ya que se parte de este para la obtención de los demás extractos orgánicos (Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH).

Para los controles se puede evidenciar que el control positivo (Kanamicina) tiene porcentajes altos de inhibición, incluso en la concentración más baja del intervalo de concentración de trabajo, como se puede observar en la Fig 4. En cuanto a los efectos que el DMSO puede llegar a producir sobre el crecimiento, se evidenció que dentro de las concentraciones de trabajo no afecta el crecimiento de la cepa bacteriana (Fig 5). Las concentraciones mínimas inhibitorias variaron de acuerdo al tipo de extracto y en su porcentaje de inhibición (Tabla 5).

Los extractos que evidenciaron mayor inhibición bacteriana fueron el hexanoico (IMC de 200mg/L, con porcentaje de inhibición de 55,95%) y el clorofórmico (IMC

⁸³ REMON. Tamizaje fitoquímico de *Mammea americana* L. En: Revista ciencia. 2011. p.3.

⁸⁴ Ibid. p.3

de 200mg/L, con un porcentaje de inhibición de 73,79%), en los cuales están presentes los siguientes metabolitos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos y esteroides. El extracto etanólico evidenció una actividad inhibitoria, datos que se pueden relacionar con los reportados por Remón et al⁸⁵, donde se evidenció actividad inhibitoria del extracto etanólico de las semillas de *M. americana* frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737); además comprueba la existencia de la variedad de metabolitos (alcaloides, cumarinas, taninos y flavonoides) presentes en la semilla de esta planta que se relacionan con los encontrados en este estudio.

De la misma forma Manzano⁸⁶ et al, evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de semillas de *M. americana*, describiendo que este extracto etanólico posee un efecto inhibitorio para las bacterias gramnegativas (*E. Coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp*).

En los análisis estadísticos de la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de *M. americana* frente a *E. faecalis*, se encontraron diferencias significativas inferiores al 5% (Tabla 4), observada a las 24 horas de incubación.

⁸⁵ REMON. Op. Cit., p.305-306

⁸⁶ MANZANO. Op. Cit, p.3

9. CONCLUSIONES

Los concentrados obtenidos del extracto de las semillas de *M. americana* revelaron una variedad de metabolitos secundarios, entre los que se resaltan las cumarinas, en su mayoría reportadas como responsables de su actividad biológica.

Todos los extractos de la semilla de *Mammea americana* evaluados en este trabajo mostraron actividad inhibitoria frente a *Enterococcus faecalis*. Se destacan los extractos hexanoico (IMC 100mg/L) y clorofórmico (IMC 200mg/L) como los metabolitos con mayor actividad inhibitoria.

RECOMENDACIONES O PROSPECTIVA

Por los efectos biológicos que han sido reportados para esta planta, se sugiere realizar estudios más profundos de fraccionamiento, aislamiento e identificación de metabolitos, que permitan seleccionar esta planta como una biblioteca para la identificación de compuestos con actividad antibacteriana, así como emitir un criterio más profundo sobre su eficacia, como forma de constatar sus usos en la medicina natural y tradicional.

En lo posible realizar estudios con muestras *in vivo*, utilizar otros medios de cultivo, diferentes tipos de bacterias, evaluar la actividad antibacteriana de los diferentes extractos sobre un biofilm.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASNAASHARI, Mohammad; ASHRAF, Hengame; RAHMATI, Afsaneh; AMINI, Neda. A comparison between effect of photodynamic therapy by LED and calcium hydroxide therapy for root canal disinfection against *Enterococcus faecalis*: A randomized controlled trial, En: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2016, p. 8-16.

ATANASOV, A; WALTENBERGER, B; FERSCHY, E; LINDER, T; WAWROSCH, C; UHRIN, P; STUPPNER, H. Descubrimiento y el reabastecimiento de productos naturales farmacológicamente activos de origen vegetal: Una revisión. En: Los avances de la biotecnología, 2015. vol.33, n°8, p.1582-1614.

ÁVALOS, A; PÉREZ, E. metabolismo secundario de plantas. En: Reduca (biología). Serie fisiología vegeta. 2009, vol.2, N°.3, p.119-145.

BANTAR, C; SARTORI, B; VESCO, E; HEFT, C; SAÚL, M; SALAMONE, F et al. A hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance. En: Clinical infectious diseases. 2003, vol.37, n°.2, p.180-186.

BARTNIK, M; FACEY, P. Chapter 8 - Glycosides, In Pharmacognosy, edited by Simone Badal and Rupika Delgoda, En: Academic Press, Boston, 2017, Pp.101-161.

BELTRÁN, C; DÍAZ, F; GOMEZ-ESTRADA H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. En: Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013, vol.18, N°.4, p.619-631.

BORZINI L, CONDÓ R, DE DOMINICIS P, CASAGLIA A, CERRONI L, Root canal irrigations: Chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. En: The Open Dentistry Journal. 2016, Vol. 10, p. 692-703.

CANNING, C; SUN, S; JI, X; GUPTA, S; ZHOU, K. Antibacterial and cytotoxic activity of isoprenylated coumarin mammea A/AA isolated from *Mammea africana*. En: Journal of ethnopharmacology. 2013, vol.147,n^o1, p.259-62.

CHINSEMBU, K. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. En: Acta Trópica. 2016, Vol. 154, p. 6-18.

CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro 1994.

DANG, B; GUITTON, Y; FREUZE, I; GROVEL, O; LITAUDON, M; RICHOMME, P; SÉRAPHIN, D; DERBRÉ, S. Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. Phytochemistry Letters. 2015, vol. 11, p.61-68.

DIAZ, M; RODRIGUEZ, C; ZHURBENKO, R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. En: *Revista Cubana Higiene y Epidemiología*. 2010, vol.48, N^o.2, p.147-161.

DOMINGO, D; LÓPEZ, M. plantas con actividad antimicrobiana. En: Rev. Esp Quimioterap. España. 2003, vol.16, N^o.4, p.385-393.

FRAME, A; RÍOS, E; DE JESÚS, L; ORTIZ, D; PAGÁN, J; MÉNDEZ, S. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. Puerto Rico. En: health sciences journal. 1998, vol.17, n^o.3 p.243-52.

FINNEGAN, R; MERKEL, K; PATEL, J. Constituents of *Mammea americana* L. XII: Biological data for xanthenes and benzophenones. En: Journal of pharmaceutical sciences. 1973, vol.62, n^o.3, p.483-5.

FRANCIS, J. Mamey, mammee-apple. New Orleans, LA: U.S. En: Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 1989, p.334-337.

GONZÁLEZ, A; SØRENSEN, M; y THEILADE, I. Uso y valoración de las especies de plantas medicinales nativas e introducidas en Campo Hermoso y Zetaquirá, Boyacá, Colombia. En: Diario de Etnobiología y etnomedicina, 2013, vol.9 , p.23.

Gu, J., Gui, Y., Chen, L., Yuan, G., Lu, H.-Z., & Xu, X. (2013). El uso de productos naturales como biblioteca química de descubrimiento de fármacos y la Red de Farmacología. En: PLoS ONE, 8(4).

HEIMER, S; MORRISON, R; GILMORE, M. The Enterococci, In Molecular Medical Microbiology. En: Academic Press. 2015, p.717-730.

HERRERA, A; OSPINA F, FANG, L; DÍAZ, A. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans to Antibacterial Effect from Mammea americana. En: Advances in pharmacological sciences. 2014.

JAIN, H; MULAY, S; MULLANY, P. Persistence of endodontic infection *and Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer, En: Gene Reports. 2016, vol 5, p. 112-116.

JÁTIVA, C. Texto básico de Farmacognosia y Productos Naturales. En: Centro de documentación de Reproducción de Documentos. 2000, p.56-59.

JINGLEI, M; ZHONGCHUN, T; JUNQI, L; HONGYAN, L; Xi, W. The effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine irrigants on the antibacterial activities of alkaline media against *Enterococcus faecalis*, En: Archives of Oral Biology. 2015, vol 60, N°.7, p.1075-1081.

LEÓN, M; TILLAN, J; HERNÁNDEZ, A; CADENAS, J; CALZADA, S. Efecto diurético y toxicidad aguda del *Orthosiphon aristatus* Blume (te de riñón). En: Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1996, vol.1, n°3, p.26-30.

MAGADULA, J; MASIMBA, P; TARIMO, R; MSENGWA, Z; MBWAMBO, Z; HEYDENREICH, M; BREARD, D; RICHOMME, P. Mammea-type coumarins from *Mammea usambarensis* Verdc. En: Biochemical Systematics and Ecology. 2014, vol.56, p.65-67.

MANZANO, P; ORELLANA, T; CATAGUA, D; VITERI, K; CEDEÑO, E; RUIZ, O; PERALTA, E. Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólico y etéreo de la semilla de *Mammea americana* de Ecuador. 2012, vol. 4, N°1, p.1.

MUFFLER, K; LEIPOLD, D; SCHELLER, M; HAAS, Ch; STEINGROEWER, J; BLEY, T; NEUHAUS, H; MIRATA, MSCHRADER, J; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes, En: *Process Biochemistry*, 2011, Vol.46, n°1, p.1-15.

OLAYA, J; MENDEZ, J. *Guía de plantas y productos medicinales*. En: *Serie ciencia y tecnología*, 2003, p.116, p11.

ORTEGA, L. Enterococos: actualización. En: *Revista habana ciencias médicas*. 2010, vol.9, N°4, p. 507-515.

PARDI, G; GUILARTE, C; CARDOZO, E; BRISENO, E. Detección de *enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. En: *Acta odontol. venez.* 2009, vol.47, N°1, p.110-121.

PERGAUD, L; KUETE, V. 4 - Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa, In *Medicinal Plant Research in Africa*, En: Elsevier, Oxford, 2013, p.135-202,

POOJARY, M; VISHNUMURTHY, K; VASUDEVA, A. Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*. En: *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015, vol.5, N°3, p.182-189.

RAMIREZ, L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2009. Vol.15, N°42, p. 263-268.

RAPONDA, A; FORESTIÈRES, G; SILLANS, R; TROCHAIN J. Les plantes utiles du Gabon:[Essai d'inventaire et de concordance des noms vernaculaires et scientifiques des plantes spontanées et introduites, description des espèces, propriétés, utilisations économiques, ethnographiques et artistiques]: En: *Fondation Raponda Walker-Centre culturel français de Libreville; Sépia*; 1961.

REMÓN, H; ALARCÓN, A; ALMEIDA, M; VIERA, Y; RAMOS, M; BAZAN, Y. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos secos de tinturas al 20% de *Mammea americana* L. En: *Rev Cubana Plant Med.* 2012, vol.17, N°.4, p. 300-307.

RODRÍGUEZ, C; OPORTO, G. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review, En: *Revista Odontológica Mexicana.* 2015, vol.19, p.177-182.

RODRÍGUEZ, E; CHEPE, E; VALENCIA E. Estudio etnobotánico de especies medicinales utilizadas por la comunidad de la vereda campo alegre corregimiento de siberia – cauca (Colombia. En: *Revista de ciencias.* 2013, vol.17, n°.2, p.35-49

SAVADKOUHI, S; BAKHTIAR, H; ARDESTANI, S. *In vitro* y *ex vivo* de evaluación por fugas microbiana en endodoncia: Una revisión de la literatura. En: *Diario de la Sociedad Internacional de Odontología Preventiva y Comunidad.* 2016, vol.6, N°.6, p.509-516.

SHARAPIN, N; MACHADO, L; SOUZA, E; ROCHA, E; LÓPEZ, J. Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos, En: Área de ciencia y tecnología del Convenio Andrés bello & Red Iberoamericana de Productos Fitoterapéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X del CYTED. 2000, p.198.

SHARMA, A; FLORES, R; CARDOSO, A; VILLARREAL, M. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine, En: *Journal of Ethnopharmacology.* 2016, p. 0378-8741.

SOUZA, M; DALLA, D; GABRIELLI, E; BARBOSA, M; MIYAGAKI, D; CECCHIN, D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin, En: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2017, Vol. 17, p. 92-97.

SÜLSEN, V; CAZORLA, S; FRANK, F; LAURELLA, L; MUSCHIETTI, I; CATALÁN, C; MARTINO, V; MALCHIODI, E. Natural Terpenoids from *Ambrosia*

Species Are Active In Vitro and In Vivo against Human Pathogenic Trypanosomatids. En: Neglected Tropical Diseases, 2013, vol. 7, N° 10, p. 2494.

TAIZ, L. Fisiología Vegetal. En: Publicaciones de la universitat de Jaune. 2006, vol.2, n°.10, p. 534, 554.

TOMA, W; HIRUMA, C; GUERRERO, R; SOUZA, A. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective anti effect on gastric ulcer models in mice. En: Phytomedicine. 2005, vol.12, N°.5, p. 345-350.

VELÁZQUEZ, N; VIGUERAS, J; ESCALONA, G; ARELLANO, J; GIONO, S; NAVA, M. Resistance to linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* with high-level resistance to aminoglycosides in a third-level pediatric hospital. En: Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 2010, vol.67, N°.1, p. 19-26.

VEROTTA, L; LOVAGLIO, E; VIDARI, G; FINZI, P; NERI, M; RAIMONDI A, et al. 4-Alkyl-and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. En: Phytochemistry. 2004, vol.65, n°.21, p. 2867-79.

YAHIA, E; GUTTIERREZ, F. Mamey apple (*Mammea americana* L.), En: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. 2011, p. 474-481.

YASUNAKA, K; ABE, F; NAGAYAMA, A; OKABE, H; LOZADA, L; LÓPEZ, E; et al. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. En: Journal of ethnopharmacology. 2005; Vol.97, n°.2, p. 293-299.

ANEXOS DE TABLAS

Tabla 6. Datos crudos de las absorbancias del control positivo (Kanamicina)

Measurement count: 1 Filter: 620						
	1	2	3	4	5	6
A	0,16	0,102	0,051	0,048	0,041	0,037
B	0,166	0,103	0,052	0,047	0,04	0,036
C	0,165	0,1	0,053	0,049	0,041	0,036

Tabla 7. Datos crudos de las absorbancias del control negativo (DMSO)

Measurement count: 1 Filter: 620						
	1	2	3	4	5	6
A	0,89	0,887	0,885	0,884	0,884	0,882
B	0,889	0,886	0,884	0,883	0,883	0,881
C	0,89	0,887	0,884	0,884	0,883	0,882

Tabla 8. Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de *M. americana* del primer ensayo.

Measurement count: 1 Filter: 620						
	1	2	3	4	5	6
A	0,393	0,303	0,343	0,498	0,754	0,879
B	0,389	0,305	0,344	0,497	0,752	0,874
C	0,389	0,303	0,344	0,498	0,754	0,872
D	0,399	0,37	0,469	0,561	0,648	0,701
E	0,398	0,371	0,469	0,562	0,647	0,709
F	0,398	0,371	0,497	0,563	0,647	0,709
G	0,44	0,372	0,492	0,683	0,864	0,943
H	0,439	0,371	0,495	0,685	0,865	0,945
A	0,441	0,37	0,467	0,697	0,864	0,942
B	0,397	0,461	0,577	0,663	0,864	0,9
C	0,399	0,459	0,575	0,66	0,867	0,901
D	0,399	0,461	0,575	0,662	0,867	0,901
E	0,434	0,461	0,581	0,682	0,785	0,879
F	0,439	0,469	0,583	0,681	0,787	0,878
G	0,439	0,469	0,583	0,683	0,787	0,88

Tabla 9. Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de *M. americana* del segundo ensayo.

Measurement count: 1 Filter: 620						
	1	2	3	4	5	6
A	0,394	0,308	0,348	0,498	0,758	0,867
B	0,391	0,308	0,3499	0,499	0,759	0,866
C	0,392	0,307	0,352	0,501	0,759	0,868
D	0,401	0,378	0,479	0,571	0,643	0,709
E	0,401	0,377	0,474	0,568	0,643	0,709
F	0,402	0,381	0,478	0,568	0,643	0,709
G	0,455	0,369	0,468	0,673	0,86	0,884
H	0,434	0,37	0,469	0,675	0,861	0,881
A	0,43	0,368	0,469	0,677	0,862	0,882
B	0,407	0,451	0,57	0,661	0,854	0,909
C	0,409	0,453	0,57	0,66	0,853	0,909
D	0,408	0,451	0,571	0,659	0,855	0,911
E	0,454	0,461	0,584	0,687	0,789	0,88
F	0,455	0,462	0,584	0,689	0,789	0,886
G	0,452	0,461	0,585	0,687	0,79	0,885

Tabla 10. Datos crudos de las absorbancias de los extractos de semillas de *M. americana* del blanco (tiempo cero).

Measurement count: 1 Filter: 620						
	1	2	3	4	5	6
A	0,104	0,121	0,155	0,298	0,567	0,713
B	0,109	0,126	0,153	0,296	0,56	0,718
C	0,106	0,125	0,149	0,284	0,56	0,716
D	0,115	0,195	0,292	0,367	0,46	0,591
E	0,124	0,201	0,312	0,385	0,464	0,607
F	0,121	0,202	0,302	0,391	0,47	0,609
G	0,138	0,219	0,373	0,557	0,721	0,824
H	0,154	0,23	0,385	0,569	0,721	0,842
A	0,14	0,206	0,359	0,523	0,696	0,783
B	0,155	0,215	0,357	0,454	0,616	0,725
C	0,154	0,21	0,356	0,451	0,64	0,708
D	0,158	0,212	0,369	0,468	0,623	0,732
E	0,159	0,239	0,346	0,441	0,532	0,639
F	0,164	0,241	0,343	0,443	0,533	0,658
G	0,158	0,242	0,343	0,435	0,533	0,638

Nota de anexos de tablas: Las letras representan las absorbancias de cada una de las concentraciones de los extractos con su réplica de la siguiente forma: A representa la absorbancia de extracto etanólico, B y C son sus réplicas. D representa la absorbancia del extracto hexanoico, E y F representan sus réplicas. G representa la absorbancia del extracto clorofórmico, H y A que se repite son las réplicas de la lectura del extracto clorofórmico. La segunda B representa las absorbancias del extracto de acetato de etilo, las segundas C y D representan sus réplicas. Por último, la segunda letra E representa la absorbancia de las concentraciones del extracto de acetato de etilo, F y G representan sus réplicas.

Para los controles las letras solo representan las réplicas de cada una de las concentraciones de control.

ANEXOS DE FIGURAS



Figura 7. Semillas de *M. americana* e implementos de trituración.



Figura 8. Semillas de *M. americana* trituradas.



Figura 9. Proceso de Maceración en frío de las semillas de *M. americana* en Etanol y Proceso de filtración.



Figura 10. Rotaevaporador HEIDOLPH.

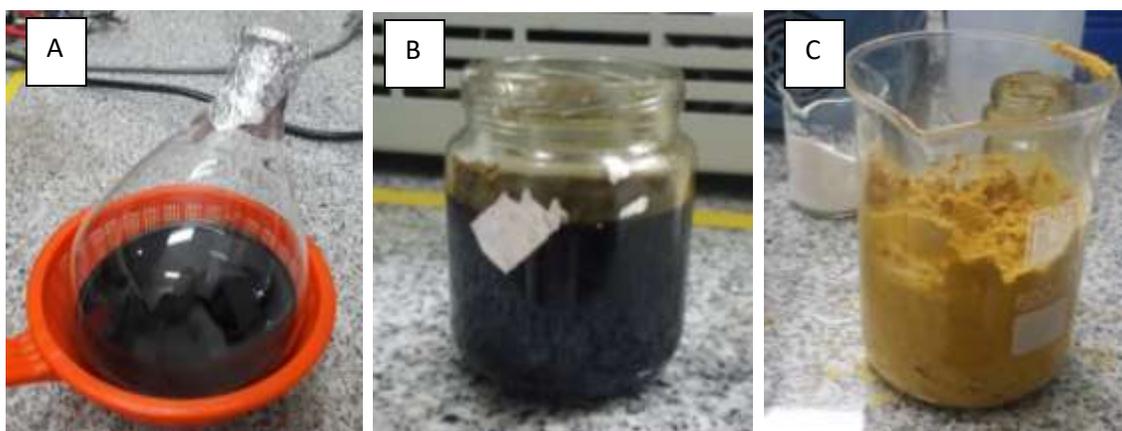


Figura 11. Proceso de absorción del extracto etanólico en Alúmina para la obtención de los extractos orgánicos. A: concentración del extracto etanólico. B: secado del extracto. C: mezcla con alúmina.



Figura 12. Incubadora BINDER.

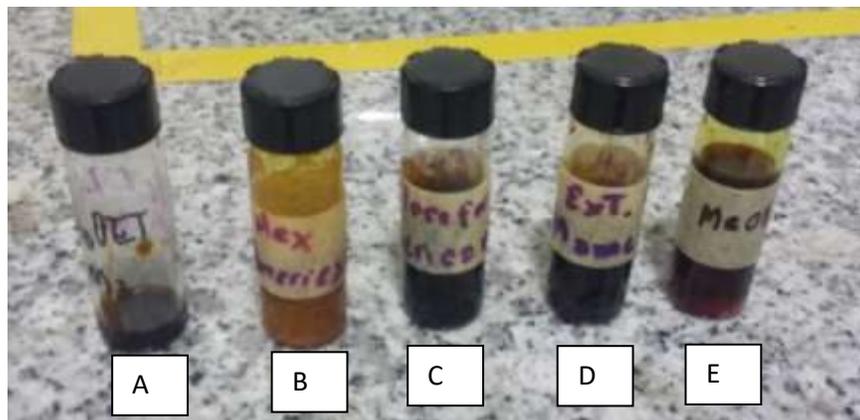


Figura 13. Subextractos de las semillas de *M. americana*. Extractos A: acetato de etilo. B: hexanoico. C: clorofórmico. D: etanólico. E: metanólico.

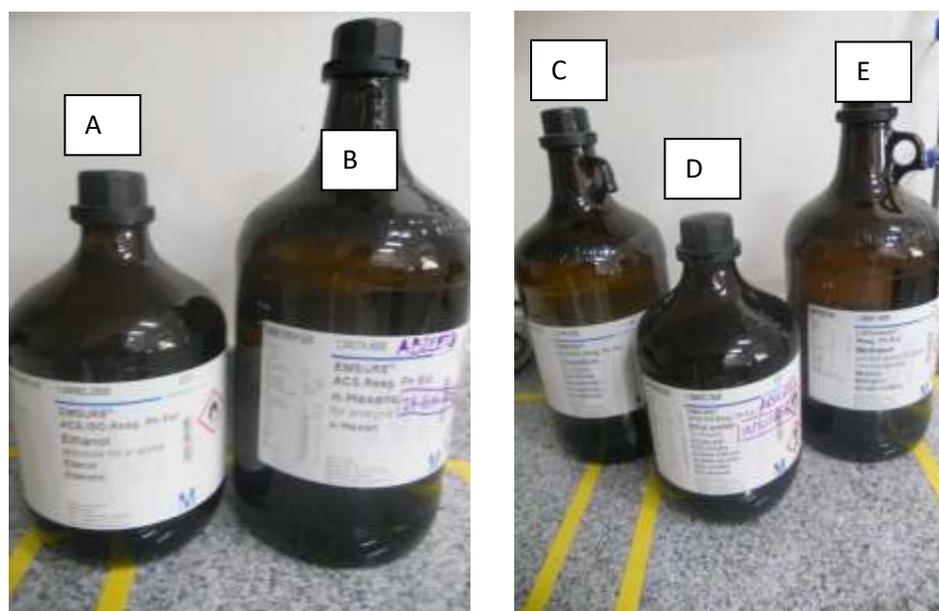


Figura 14. Solventes de grado analítico. A. etanol, B. hexano, C. cloroformo, D. acetato de etilo, E. metanol.



Figura 15. Lámpara UV con cabina oscura.

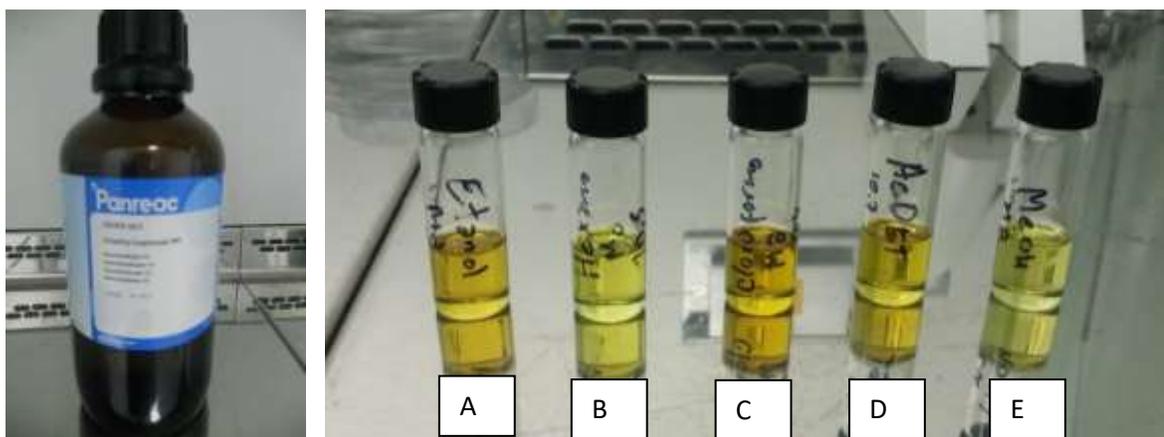


Figura 16. DMSO (Dimetilsulfoxido 99,9%). Disolución de los extractos en DMSO. Dilución del extracto: A: acetato de etilo. B: hexanoico. C: clorofórmico. D: etanólico. E: metanólico.



Figura 17. Preparación de las concentraciones de cada extracto en el medio de cultivo.



Figura 18. Medios de cultivo para la incubación de *Enterococcus faecalis*.



Figura 19. Incubadora Gemmyco, LAB incubator modelo IN-010.



Figura 20. Incubación de las placas de 96 pozos a 37°C durante 24 horas.

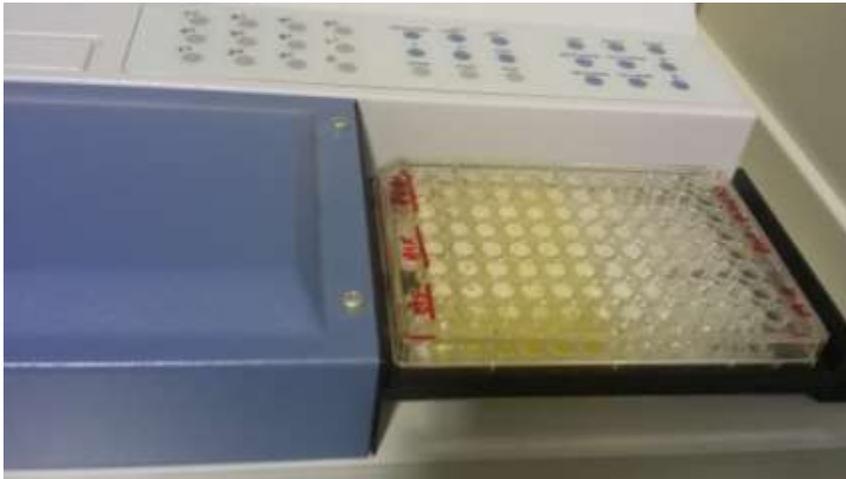


Figura 21. Toma de las lecturas en el equipo Multiskans ascent Thermo de placas de 96 pozos.