



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**TEMA DE TESIS**

“Compuestos antibacterianos aislados de *Prunus domestica*  
L. (Rosaceae)”.

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. F. B. Fernando Gabriel Brindis Hernández



TUTOR: Dr. José Fausto Rivero Cruz

AÑO: 2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Fausto Rivero Cruz, por su dirección en el presente trabajo.

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

A la Dra. Rachel Mata Essayag por el apoyo y consejos brindados durante mi estancia en su laboratorio.

A los miembros del jurado por sus valiosas correcciones a este trabajo de investigación.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN 208207.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas	I
Lista de cuadros	III
Lista de tablas	IV
Lista de diagramas	IV
Lista de gráficas	IV
Lista de figuras	V

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. Enfermedades infecciosas	4
2.1.1. Clasificación de las enfermedades infecciosas	4
2.2. Enfermedades de la cavidad oral	6
2.2.1. Definición de las enfermedades de la cavidad oral y su relación con la nutrición	10
2.2.2. Microorganismos de la cavidad oral	12
2.2.3. Interacciones microbiológicas	15
2.3. Bioplacas	16
2.3.1. Fases de la formación de las bioplacas	18
2.3.2. Acondicionamiento de la superficie	19
2.3.3. Adsorción y fijación	19

2.3.4.	Maduración	19
2.3.5.	Crecimiento y dispersión	20
2.3.6.	Resistencia de las bioplacas	21
2.3.7.	Cooperatividad de las bioplacas	23
2.3.8.	Bioplacas orales o placa dentobacteriana	23
2.3.9.	Tipos de bioplacas	24
2.4.	Antecedentes de la especie <i>Prunus domestica</i>	24
2.4.1.	Antecedentes botánicos de <i>Prunus domestica</i> L.(Rosaceae)	24
2.4.2.	Estudios biológicos de <i>Prunus domestica</i>	27
2.4.3.	Estudios químicos de <i>Prunus domestica</i>	29
<b>3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
4.1.	Procedimientos generales	41
4.1.1.	Análisis cromatográficos	41
4.1.2.	Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	41
4.2.	Material vegetal	42
4.3.	Ensayos biológicos	43
4.3.1.	Microorganismos de prueba	43
4.3.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	43
4.3.3.	Medición de la formación de bioplaca por mutiespecies	45
4.3.4.	Ensayo de agregación para <i>S.mutans</i>	46
4.4.	Estudio fitoquímico de <i>Prunus domestica</i>	46
4.4.1.	Preparación del extracto orgánico de <i>Prunus domestica</i>	46

4.4.2.	Fraccionamiento primario del extracto de diclorometano	46
4.4.3.	Fraccionamiento secundario de la fracción activa FII	48
4.4.4.	Obtención del ácido ursólico	49
4.4.5.	Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII	50
4.4.6.	Obtención del 5-(hidroximetil)-2-furfural	51
4.4.7.	Fraccionamiento secundario de la fracción activa FVI	52
4.4.8.	Obtención del (3E)-4[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona	53
<b>5.</b>	<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>54</b>
5.1.	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el extracto derivado de las ciruelas pasa	54
5.2.	Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el extracto activo	55
5.2.1.	Obtención del compuesto DP-C01	57
5.2.2.	Obtención del compuesto DP-C03	58
5.3.	Caracterización estructural del producto DP-C012	58
5.4.	Evaluación del potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios y su efecto sobre la formación de bioplacas	62
5.4.1.	Efecto de los compuestos aislados sobre la agregación de <i>S.mutans</i>	63
5.4.2.	Efecto del ácido ursólico sobre la formación de bioplaca monoespecie por parte de <i>S.mutans</i>	65
5.4.3.	Desarrollo de la bioplaca mutiespecies bajo condiciones anaeróbicas	66
5.4.4.	Evaluación de la toxicidad de los compuestos aislados	68
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>71</b>

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe los metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas aislados de *Prunus domestica*, una de las veinte especies vegetales más comercializadas en todo el mundo y cuyo uso se ha extendido al tratamiento de varios padecimientos infecciosos.

A partir de frutos deshidratados de *Prunus domestica* se preparó un extracto con diclorometano que presentó propiedades antimicrobianas. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto condujo a la obtención de varias fracciones antimicrobianas designadas como F-II, F-III, F-VI. Estas fueron activas contra *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). A partir de las mismas se aislaron y purificaron el ácido ursólico, 5-(hidroximetil)-2-furfural y el (3*E*)-4-[(5-(hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona. Mediante la experimentación microbiológica adecuada se pudo determinar que el ácido ursólico es capaz de inhibir la formación de bioplaca a través de la agregación de *S. mutans*.

Los compuestos aislados no presentaron actividad fitotóxica en cuatro líneas celulares de prueba con respecto a los controles positivos paclitaxel y camptotecina.

## ABSTRACT

The present work describes the antimicrobial effects of some secondary metabolites from *Prunus domestica*. The fruit of the plant is edible and, therefore widely commercialized around the world. Recently several articles have reported the antibacterial activity of the fruit and its potential for the treatment of infectious diseases.

Dehydrated fruits of *Prunus domestica* were extracted with dichloromethane. The crude extract showed antimicrobial activity. The active extract was subjected to bioassay guided fractionation to yield three very active fractions, namely F-II, F-III, y F-VI against *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Phytochemical analysis of this fraction led to the isolation and characterization of ursolic acid, 5-(hydroxymethyl)-2-furfural and (3E)-4-[(5-(hydroxymethyl)-2-furyl]-but-3-en-2-one. Ursolic acid inhibited the development of *Streptococcus mutans* biofilms. This finding is remarkable because this oral pathogen caused dental decay and periodontal diseases. Ursolic acid was not cytotoxic against four different cell lines.

## 1. INTRODUCCION

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y su posterior introducción al mercado en los años 40's, los antibióticos han sido la piedra angular contra las infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso inapropiado, como la prescripción empírica, el abastecimiento de antibióticos de mala calidad o la interrupción del tratamiento contra la infección han originado el incremento de bacterias patógenas resistentes a ellos como un mecanismo de defensa y estrategia de supervivencia de las propias bacterias mediante el empleo de su maquinaria genética y su adaptación al medio ambiente. La resistencia a los antibioticos constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial, sobre todo en aquellas personas de bajos recursos económicos (Gibbons *et al.*, 2004; Lohner, 2001). De manera adicional, algunos factores como la superpoblación y la facilidad para viajar a diferentes regiones del mundo favorecen la propagación de los agentes infecciosos (FUNCEI, 2004).

En gran parte de los países del mundo, el uso de plantas medicinales ha perdurado a través de los siglos y es parte de su cultura. El aprovechamiento de los recursos vegetales se ha conformado con las múltiples observaciones y numerosas experiencias acumuladas por grupos étnicos y sociales que habitan en cada país, enmarcadas dentro de las condiciones y circunstancias que otorga el ecosistema, el intercambio social, las enfermedades más comunes de la región y la disponibilidad práctica del recurso. De esta manera, ciertas prácticas médicas han contribuido a la salud y bienestar de diferentes culturas (Koehn, 2005).

Además en muchos de estos países los productos farmacéuticos modernos son inaccesibles para un sector importante de la población debido a sus altos costos. Por lo tanto las plantas representan el recurso terapéutico más importante para esta población (WHO-TRM, 1998).

El reconocimiento de los beneficios médicos y económicos de la medicina verde continúa creciendo en los países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo (WHO-TRM, 1998). De tal forma que durante los últimos años la herbolaria ha tenido un resurgimiento en muchos países industrializados incluyendo Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y la Comunidad Europea (Eisenberg *et al.*, 1993; 1998; Millar *et al.*, 1997 MacLennan *et al.*, 1996). En los Estados Unidos se estima que el uso de remedios se incrementó en un 380% entre 1990 y 1997 (Eisenberg *et al.*, 1998). Este renacimiento ha sido motivado por muchos factores, incluyendo el incremento de practicantes de la medicina preventiva y la decepción de muchos usuarios de medicamentos convencionales. Estos últimos han optado por el empleo de productos botánicos con la percepción errónea de que son inocuos y libres de efectos colaterales (Mahady, 1998).

Se estima que existen 250 000 especies de plantas en la tierra de las cuales un 10% son usadas como alimento por los humanos y otras muchas de esas plantas son usadas como remedios. Estos usos se han relacionado con la presencia de compuestos fenólicos, terpenoides, flavonoides, alcaloides, quinonas, etc. Los compuestos incluidos en estas categorías son usados como antibacterianos por el hombre, por ejemplo el ácido cinámico y el ácido cafeíco que contienen un grupo fenólico en su estructura son eficaces contra virus, hongos y bacterias. Por su parte, las quinonas generan radicales libres que pueden formar complejos

irreversibles con proteínas de la pared celular bacteriana lo que les confiere gran potencial antibacteriano. Los flavonoides pueden formar complejos con proteínas solubles y de la pared celular y atravesar las membranas celulares lo que aumenta su poder antibacteriano. Ciertas cumarinas y terpenoides también poseen propiedades antibacterianas. Por último existen alcaloides con actividad antiviral y antibacteriana (Coates, 2002).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Enfermedades Infecciosas.**

En términos generales, una enfermedad puede ser definida como una función anormal de alguna estructura o sistema dentro de nuestro cuerpo. Siendo aún más específicos, una enfermedad infecto-contagiosa es una forma de enfermedad que es: infecciosa y posee el potencial de ser transmitida. El término "infeccioso" se refiere al hecho de que la enfermedad infecto-contagiosa es causada por microorganismos patógenos que penetran en un organismo y pueden auto-reproducirse y multiplicarse hasta un número considerable si no son destruidos (OMS, 2007).

#### **2.1.1. Clasificación de las enfermedades infecciosas y forma de infección.**

Los microorganismos pueden producir infecciones de manera localizada o generalizada. Al penetrar en el organismo, las bacterias producen una serie de enfermedades que pueden clasificarse en agudas, crónicas o retardadas. En el Cuadro 1 se hace una descripción de cada una de ellas (Socransky *et al.*, 2003).

**Cuadro 1.** Clasificación de enfermedades infecciosas.

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
<b>Agudas</b>	Producidas por agentes exógenos, tienen un inicio rápido y se desarrollan en días o semanas. Los microorganismos o sus productos entran en el cuerpo. La infección se suele resolver de forma rápida. Ejemplos de este tipo de infecciones son los abscesos locales producidos por <i>Staphylococcus aureus</i> , las infecciones de las vías respiratorias superiores o las infecciones gastrointestinales.
<b>Crónicas</b>	Están producidas por microorganismos exógenos que penetran en el organismo y persisten durante largos periodos, ya que las defensas del organismo no son capaces de eliminarlos. La lepra y la tuberculosis son ejemplos de este tipo de infecciones.
<b>Retardadas</b>	Los signos y síntomas de la enfermedad no aparecen hasta meses o años tras la infección inicial. Las lesiones producidas pueden persistir toda la vida. Se caracterizan por un inicio poco evidente, para manifestarse posteriormente con otros síntomas y signos. Ejemplo de este tipo de infecciones son la sífilis, la fiebre reumática, la enfermedad de Lyme y las úlceras gastrointestinales.

Las vías más comunes, mediante las cuales un organismo vivo es infectado incluye: contacto directo con los agentes patógenos, contacto piel a piel, inhalación de microorganismos aerobios, al ingerir alimentos contaminados, en heridas, por vectores (insectos), así como por contacto sexual sin protección (FUNCEI, 2004).

## **2.2. Enfermedades de la cavidad oral.**

Enfermedades orales, incluyendo caries dentales, enfermedades periodontales, desórdenes orofaciales y pérdida de los dientes, las cuales resultan en sufrimiento y dolor, dificultad para hablar y/o masticar y en casos extremos la muerte, son un problema de salud, que afecta a millones de personas en todo el mundo (Wu *et*

*al.*, 2002; ACS, 1998; Gift *et al.*, 1992). A pesar de los grandes avances en materia de salud oral, todavía existen problemas al respecto, principalmente en aquellos grupos no privilegiados de los países desarrollados y en vías de desarrollo, en los que, además de la gripe común, las enfermedades orales son la principal causa de la pérdida de días de trabajo en los adultos y de días de escuela en los niños. Todos los factores mencionados repercuten negativamente sobre la productividad así como en el aprendizaje escolar. Esto último se traduce en una mala calidad de vida y representa un obstáculo para el desarrollo de los países (NIDR, 2005; WHO, 2004; Bloom *et al.*, 1989).

La más común de las enfermedades orales es la caries dental la cual afecta entre el 60 a 90% de los niños y a la mayoría de los adultos de Asia y Latinoamérica (OMS, 2007). La caries resultan como consecuencia de la formación de la placa dentobacteriana que a su vez se origina por la interacción entre bacterias, saliva y restos de alimentos (Liébana, 2002). El grupo mutans de los estreptococos (SM), que se encuentra frecuentemente en la placa dental es considerado como uno de los principales agentes etiológicos de las caries en humanos y animales de laboratorio. Estudios epidemiológicos indican la presencia de *Streptococcus mutans* en al menos el 90% de las muestras aisladas a partir de caries dentales en humanos, mientras que, *Streptococcus sobrinus* representa la segunda especie más común de SM (Petersen *et al.*, 2004; Phan *et al.*, 2004). Entre los factores de virulencia más comunes de *Streptococcus mutans* se incluyen la adhesión, la acidogenicidad y la tolerancia a la acidez (Steinberg *et al.*, 2005; Yamanaka, 2004). Esta bacteria se caracteriza por la producción de enzimas del tipo de las glucosiltransferasas y sintetiza polisacáridos extracelulares (principalmente

glucanos insolubles en agua) a partir de los azúcares presentes en la dieta, los cuales actúan como mediadores de la adherencia de *S. mutans* y otras bacterias a la superficie de los dientes y contribuyen a la formación de la bioplaca (Koo *et al.*, 2000). De esta manera, la bacteria utiliza los azúcares contenidos en los alimentos y los transforma en ácidos, alterando el equilibrio dinámico de desmineralización-remineralización de la superficie del diente, disolviendo el esmalte y creando cavidades que son conocidas como caries (ADA, 2003).

Las enfermedades periodontales (EP) representan la segunda afección con mayor incidencia de la cavidad bucal y afectan a cerca de la mitad de las personas entre los 18 y 64 años (Rusell *et al.*, 1998). Las enfermedades periodontales pertenecen al grupo de las enfermedades inflamatorias crónicas, ocasionadas en principio, por las bacterias encontradas en la placa dentobacteriana. La gran acumulación de éstas bacterias alrededor del diente, por arriba (supragingival) o por debajo (subgingival) del borde marginal de la encía, provocan cambios en la composición microbiana *Streptococcus* dominante hacia el aumento de *Actinomyces spp* y el incremento de bacterias Gram-negativas anaeróbicas específicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, entre otras (Koo *et al.*, 2000; Quirynen, 2000). Estas bacterias activan los mecanismos inmunoinflamatorios en los tejidos periodontales, lo que conduce a la destrucción del colágeno y del hueso que soporta los dientes (Scannapieco *et al.*, 2004; Rusell *et al.*, 1998; Genco, 1992). En la clínica la enfermedad se manifiesta como un enrojecimiento en la gingiva, desprendimiento de los tejidos blandos de los dientes para producir bolsas periodontales, incremento de la movilidad de los dientes,

disminución de la habilidad para masticar y la pérdida de piezas dentales (Genco, 1992).

Las EP se agrupan bajo la denominación de gingivitis y periodontitis. La gingivitis es la inflamación de los tejidos blandos que rodean al diente, fundamentalmente la encía, sin extenderse al cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Como ejemplo, se pueden mencionar la gingivitis ulcerante-necrosante, la denominada enfermedad de Vincent o boca de las trincheras. Por otra parte, el término periodontitis se emplea para definir la inflamación de los tejidos de soporte del diente, habitualmente un cambio progresivamente destructivo con pérdida del hueso alveolar y ligamento periodontal, por complicación de la gingivitis (Liébana, 2002). La periodontitis adulta es la forma más común de EP y afecta al 10% de los adultos entre 35-44 años. La otra forma menos común es la periodontitis juvenil localizada (OMS, 2007).

La patogénesis de las EP también está vinculada con la existencia de factores locales y sistémicos en los individuos, de tal manera que la forma de los dientes y el padecimiento de enfermedades como la diabetes, la osteoporosis, , el SIDA, así como también los cambios hormonales y la administración de fármacos, son capaces de modificar la respuesta del hospedero e influir en la severidad y progresión de la enfermedad periodontal (Reichart, 2003; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Hollister *et al.*, 1993). Además, la quimioterapia o radioterapia para el tratamiento del cáncer puede dañar severamente las glándulas salivales dando como resultado boca seca con un incremento de las caries y otras infecciones orales. (Doyle *et al.*, 2005; Binley *et al.*, 2004). De manera adicional, investigaciones recientes han demostrado que las bacterias orales pueden contribuir a incrementar

el riesgo de ataques del corazón, infartos, enfermedades del pulmón y nacimientos prematuros (ADA, 2003; Liébana, 2002).

Por lo anterior, la prevención efectiva de enfermedades orales puede tener un efecto significativo en la salud y bienestar de la población en general (NIDR, 2005). Aún cuando la introducción del fluoruro ha resultado en la reducción de las caries dentales y las EP, éstas continúan siendo las enfermedades infecciosas más comunes en México y otros países (OMS, 2007). Tan solo en México, la caries y las EP afectan al 90 y 70% de la población, respectivamente. De acuerdo con la Secretaría de Salud (SSA), la gingivitis y las EP representan casos nuevos de morbilidad en los últimos años. En la Tabla 1 se presenta la tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades comprendidos en el período 2000 a 2004.

**Tabla 1.** Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades, 2000 a 2004 en la República Mexicana.

<b>(Por 100 000 habitantes)</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>Causa de casos nuevos de enfermedad</b>					
Infecciones respiratorias agudas	29 427.3	27 980.5	28 874.3	25 948.9	24 581.3
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	5 203.3	5 283.3	5 250.2	4 684.0	4 535.5
Infección de vías urinarias	2 967.1	3 240.5	3 276.0	3 154.2	3 228.2
Úlceras, gastritis y duodenitis	1 284.1	1 393.5	1 413.6	1 281.7	1 365.7
Amebiasis intestinal	1 353.4	1 237.8	1 124.8	972.6	792.2
Otitis media aguda	614.6	643.2	693.9	695.6	675.3
Hipertensión arterial	401.4	407.8	418.8	478.2	529.8
Otras helmintiasis	735.2	646.5	580.6	524.4	498.0
Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	287.2	291.3	308.6	365.0	384.0
Varicela	377.1	235.5	282.7	307.0	365.8
Gingivitis y enfermedad periodontal	<u>ND</u>	<u>ND</u>	<u>ND</u>	276.0	350.0
Candidiasis urogenital	302.5	325.8	354.8	346.3	330.9
Asma y estado asmático	261.0	275.2	274.6	289.1	289.5
Intoxicación por picadura de	<u>ND</u>	221.7	231.7	233.4	218.5

alacrán					
Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	<a href="#">ND</a>	<a href="#">ND</a>	<a href="#">ND</a>	573.9	201.7

NOTA: Con base en el último año se consideran los quince principales casos nuevos de enfermedades.

ND. No disponible.

FUENTE: SSA. SUIVE. Dirección General de Epidemiología [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx) (24 febrero del 2006).

### **2.2.1. Definición de las enfermedades infecciosas de la cavidad oral y su relación con la nutrición.**

De acuerdo a la OMS, una enfermedad bucal u oral es aquella que afecta el estado de la boca, es decir, la lengua, los dientes y las glándulas salivales que ejercen normalmente todas sus funciones, siendo, la caries dental, la periodontitis y los cánceres oral y faríngeo los padecimientos orales más representativos. De manera general, las caries y la periodontitis son ocasionadas por una alimentación desordenada desde los primeros años de vida, misma que se caracteriza por una elevada ingesta o combinación de bebidas y alimentos ácidos, pegajosos, ricos en grasas saturadas, azúcares y otros carbohidratos fermentables. A ello se suma la deficiencia del grado de higiene bucal, la vida sedentaria, los desórdenes alimenticios (anorexia y bulimia), las enfermedades agudas, crónicas y sistémico terminales que tenga cada individuo, las cuales pueden provocar la erosión del diente, debilitándolo y aumentando los riesgos de caries. Al respecto, declaraciones de la Asociación Dietética Americana (ADA) señalan que la nutrición

es un componente integral de la salud oral y que las enfermedades infecciosas orales tales como la caries y las enfermedades periodontales (EP) están directamente influenciadas por la dieta, por lo que existen pocas dudas de que las enfermedades bucales, tales como las que sufrimos actualmente sean producto de los efectos de la civilización y el cambio en el estilo del régimen alimenticio que determina su prevalencia. Un punto de mejora para una buena salud oral es considerar todas estas propiedades cariogénicas y cariostáticas de los alimentos, modificando tanto los hábitos dietéticos como las prácticas de higiene bucal mediante el empleo de pasta dental con fluoruro, el uso de hilo dental y visitas regulares al dentista (WHO, 2004; ADA, 2003).

### **2.2.2. Microorganismos de la cavidad oral.**

La flora en la cavidad oral está compuesta por bacterias, hongos y levaduras. De estos organismos las bacterias representan la mayor parte. En la boca se han identificado aproximadamente 350 especies de bacterias y este número continúa incrementándose debido a los avances recientes en biología molecular. Uno de los factores que permite la existencia de este número de microorganismos es la gran diversidad de ambientes *intra-orales* presentes. En la cavidad oral se pueden encontrar diferentes poblaciones en la mucosa, las superficies paraqueratinizadas de la mucosa (detrás de los labios y las mejillas, el paladar, la partes inferiores de la lengua y de la boca), tejidos altamente queratinizados (interior del paladar, tejidos gingivales visibles adyacentes a los dientes) y en el altamente queratinizado, texturizado y especializado dorso de la lengua. Los dientes por si mismos contienen grupos de microorganismos, en las superficies adyacentes a la gingiva, en las superficies cubiertas por la gingiva (*gingival sulcus*) y dentro de las

superficies irregulares de los dientes. Si se encuentran presentes, las prótesis para reemplazar los dientes ofrecen nichos. Muchos de los microorganismos orales se encuentran presentes en la saliva, que es excretada por las glándulas sublinguales, submandibulares y las pequeñas glándulas accesorias ubicadas en los labios, las mejillas y el paladar. El Cuadro 2 muestra los géneros y las especies de microorganismos aislados de la cavidad oral, algunos de los cuales están directamente relacionados a las caries y EP, mientras que otros son transitorios o bien, forman parte de la microflora oral (Liébana, 2002).

**Cuadro 2.** Microorganismos aislados de la cavidad oral.

<b>Género</b>	<b>Especie</b>
<i>Abiotrophia</i>	<i>A. defectiva</i> y <i>A. adiacens</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> **
<i>Actinomyces</i> ***	<i>A. georgiae</i> , <i>A. gerencseriae</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. adontolyticus</i> *, <i>A. naeslundii</i> * y <i>A. viscosus</i>
<i>Alloicoccus</i>	<i>A. otiditis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. capillosus</i> y <i>B. forsythus</i> **
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. dentium</i> , <i>B. inopinatum</i> y <i>B. denticolens</i>
<i>Bilophila</i>	<i>B. wadsworthia</i>
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i> , <i>C. sputigena</i> y <i>C. ochracea</i>
<i>Cardiobacterium</i>	<i>C. hominis</i>
<i>Centipeda</i>	<i>C. periodontii</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. difficile</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. sporogenes</i> y <i>C. malenominatum</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. matruchotii</i>
<i>Desulfomonas</i>	<i>D. pigra</i> .
<i>Desulfovrio</i>	<i>D. desulfuricans</i> .
<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i> **
<i>Entamoeba</i>	<i>E. gingivalis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>

<i>Eubacterium</i>	<i>E. brachy</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>E. saphenum</i> , <i>E. saburrenum</i> y <i>E. yurii</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. alosis</i> y <i>F. periodonticum</i>
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i> y <i>G. morbillorum</i>
<i>Globicatella</i>	<i>G. sanguis</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>Helcococcus</i>	<i>H. kunzii</i>
<i>Herpexvirus</i>	<i>Herpes simplex</i>
<i>Lactobacillus</i> ***	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. uri</i> , <i>L. casei</i> .

**Cuadro 2.** Microorganismos aislados en la cavidad oral (continuación).

<b>Género</b>	<b>Especie</b>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> y <i>L. garniae</i>
<i>Leptotrichia</i> ***	<i>L. buccalis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Mycoplasma</i>	<i>M. salivarium</i> , <i>M. pneumonie</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. bucale</i> y <i>M. orale</i>
<i>Neisseria</i> ***	<i>N. cinerea</i> , <i>N. elongata</i> , <i>N. laveszens</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. paraelongata</i> , <i>N. polysaccharea</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> (excepcional)
<i>Pediococcus</i>	<i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i> y <i>P. dexnitricus</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>P. niger</i>
<i>Peptostreptococcus</i> ***	<i>P. anaerobius</i> , <i>P. magnus</i> , <i>P. micros</i> , <i>P. indolicus</i> , y <i>P. prevotii</i>
<i>Porphyromonas</i> ***	<i>P. gingivalis</i> ** , <i>P. endodontalis</i> y <i>P. catoniae</i>
<i>Prevotella</i> ***	<i>P. melaninogenica</i> , <i>P. nigrescens</i> ** , <i>P. corporis</i> , <i>P. intermedia</i> ** , <i>P. loescheii</i> , <i>P. pallens</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. buccalis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. oulorum</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P. zoogoleoformans</i> , <i>P. dentalis</i> , <i>P. tanneriae</i> y <i>P. enoeca</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i> , <i>P. avidum</i> , <i>P. propionicus</i> , y <i>P. granulosum</i>
<i>Rothia</i>	<i>R. dentocariosa</i>
<i>Selenomonas</i> ***	<i>S. artemidis</i> , <i>S. diana</i> , <i>S. flueggei</i> , <i>S. infelix</i> , <i>S. noxia</i> y <i>S. sputigena</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
<i>Streptococcus</i> ***	<i>S. mutans</i> * , <i>S. rattus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. sobrinus</i> * , <i>S. ferus</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. pyogenes</i> y <i>S. agalactiae</i>

<i>Treponema</i> ***	<i>T. vincentii</i>
<i>Tricomonas</i>	<i>T. tenax</i>
<i>Veillonella</i> ***	<i>V. parvula, V. atypica y V. dispar</i>

\*Microorganismos directamente relacionados a la formación de placa dento-bacteriana.

\*\* Microorganismos relacionados al desarrollo de enfermedades periodontales.

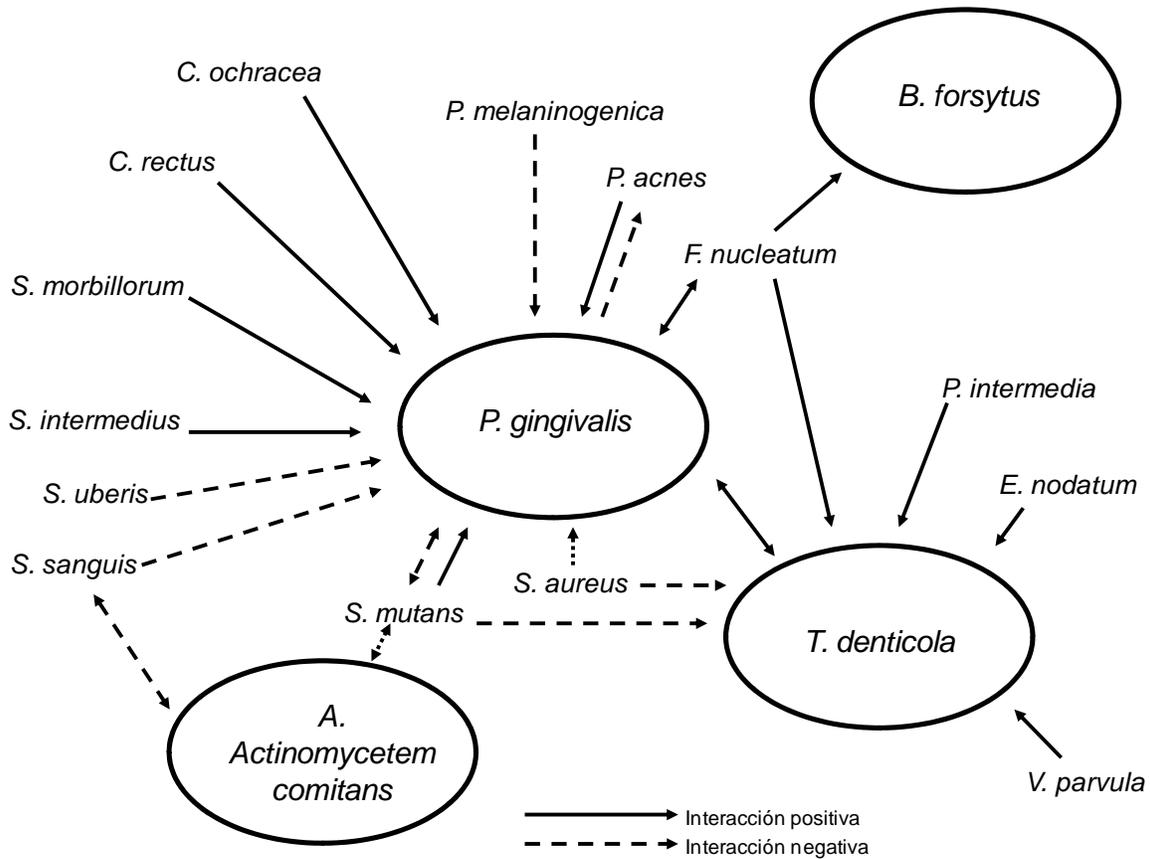
\*\*\* Géneros más representativos de la flora oral (Liébana, 2002).

### 2.2.3. Interacciones microbiológicas.

Los microorganismos patógenos y los que integran la flora normal, interactúan entre sí en la cavidad oral y lo hacen positiva y negativamente. Las interacciones positivas incluyen el mutualismo y todas las especies participantes resultan beneficiadas por la asociación, y el comensalismo cuando solo una de las especies que participan resulta beneficiada y la o las otras no reciben nada por la asociación y por último, el sinergismo cuando la suma de dos especies en asociación es mayor que si actuaran individualmente. Por otro lado, las interacciones negativas incluyen competición y antagonismo, en la primera la competición es por la multiplicación y la sobrevivencia y en la segunda una población de bacterias inhibe el desarrollo de otra población y lo hace secretando productos tóxicos como peróxido de hidrógeno, bacteriocina y ácidos orgánicos que no permiten el desarrollo de sus antagonistas (Park *et al.*, 2002).

Las interacciones bacterianas son muy importantes en el desarrollo de las enfermedades de la cavidad oral. Un ejemplo lo representan las caries, en donde el primer paso para la colonización por los microorganismos patógenos orales es la adherencia al esmalte dental (Limsong *et al.*, 2004). Este proceso no podría realizarse si primero *S. mutans* no se adhiere y produce los ácidos láctico y

acético, los cuales disminuyen el pH de la cavidad oral por debajo de 5.5, lo cual favorece la desmineralización y el inicio del proceso de las caries (Radcliffe *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Interacciones de los patógenos orales (adaptado de Mayrand *et al.*, 1998)

### 2.3. Bioplacas.

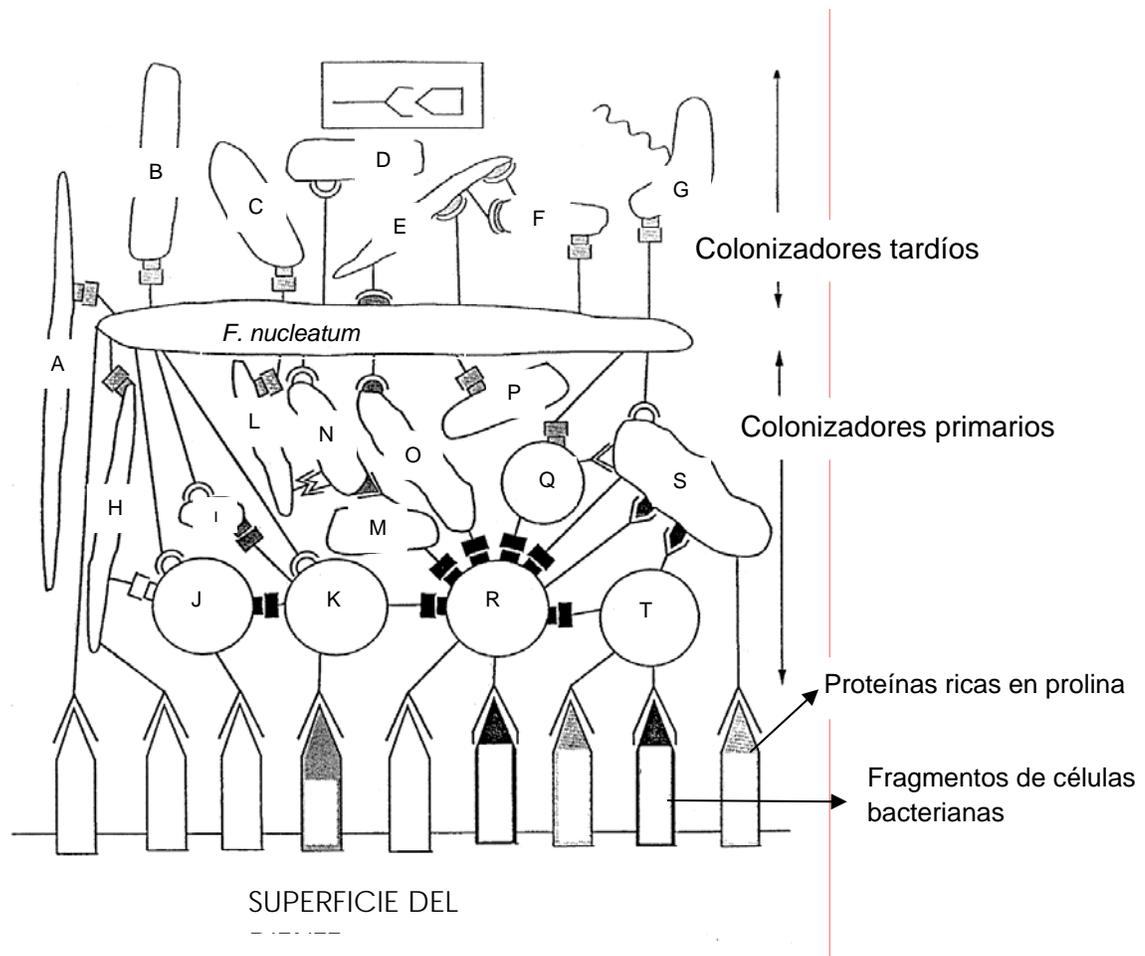
Una bioplaca, biofilm, comunidad sésil o consorcio es una población o comunidad de bacterias viviendo en estructura organizada en una interfase líquida. Estas microcolonias de bacterias están encapsuladas en una matriz compuesta de una sustancia polimérica extracelular (SPE) la cual les ayuda a adherirse a la superficie y a estabilizarse. La sustancia polimérica extracelular están formada

principalmente por polisacáridos y puede contener solo proteínas y ácidos nucleicos, las bioplacas tienen un sistema circulatorio primitivo compuesto por canales de agua por donde fluyen los nutrientes y se desechan los productos de su metabolismo (Davies, 2003).

Podemos encontrar bioplacas en todos los medios donde existen bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo requieren de un medio acuoso y de la presencia de nutrientes. Las bacterias formadoras de bioplacas pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrofílicas, bióticas o abióticas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Characklis, 1990).

Las bioplacas bacterianas comienzan a formarse cuando alguna célula individual se adsorbe inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). En la Figura 2 se ilustra el proceso de adhesión de las bacterias.

Después de la adsorción inicial, la célula comienza a reproducirse y a diseminarse sobre la superficie bajo la forma de una monocapa, mientras forma microcolonias. Las células van cambiando su comportamiento para dar origen a la compleja estructura de una bioplaca madura. El cambio más evidente es la producción de glicocalix el cual cimentará todo el conjunto (Piera, 2003; Characklis, 1990).



**Figura 2.** Formación de la biopelícula en la superficie del diente. A: *C. spullgens*, B: *A. acenomycetemcomitans*, C: *P.intermedia*, D: *Eubacterium spp*, E: *Treponema spp*, F: *P. gingivalis*, G: *S. flueggel*, H: *C. ochracea*, I: *P. acnes*, J: *S.oralis*, K: *S.gondonii*, L: *C. gingivalis*, M: *P. loesheill*, N: *A. israelí*, O: *H. parahinfluenza*, P: *P. denticota*, Q: *M. atípica*, R: *S.sangis*, S: *A. naesitindii*, T: *S.godoni*

### 2.3.1. Fases de la formación de las biopelículas.

La formación de una biopelícula, no es un proceso aleatorio sino que sigue una serie de pasos que permiten su predicción. Se han identificado cinco fases: la primera de ellas es una adsorción reversible de la bacteria a la superficie, seguida por una unión irreversible, una primera fase de maduración con crecimiento y división, la fase de producción del exopolímero y el desarrollo final de la colonia con

dispersión de células colonizadoras (Piera, 2003). En la Figura 3 se ilustran las fases de la formación de las bioplacas.

### **2.3.2. Acondicionamiento de la superficie.**

La capacidad de unirse depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices. Las bioplacas pueden desarrollarse sobre casi cualquier tipo de superficie, gracias a que previamente entra en contacto la materia orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias (Piera, 2003; Characklis, 1990).

### **2.3.3. Adsorción y fijación.**

La adhesión de los microbios a un sustrato puede ser activa (por los flagelos, pili adhesina, cápsulas y cargas de superficie) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). En unos minutos, las bacterias libres que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria. Si esta unión se mantiene suficiente tiempo se hará permanente e irreversible (Piera, 2003; Dreeszen, 2003).

### **2.3.4. Maduración.**

Una vez que las bacterias se han unido a la superficie comienza el crecimiento y la división de las células y posteriormente se inicia la fabricación de una mezcla de polímeros, limosa y pegajosa, que se excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie (Figura 3).

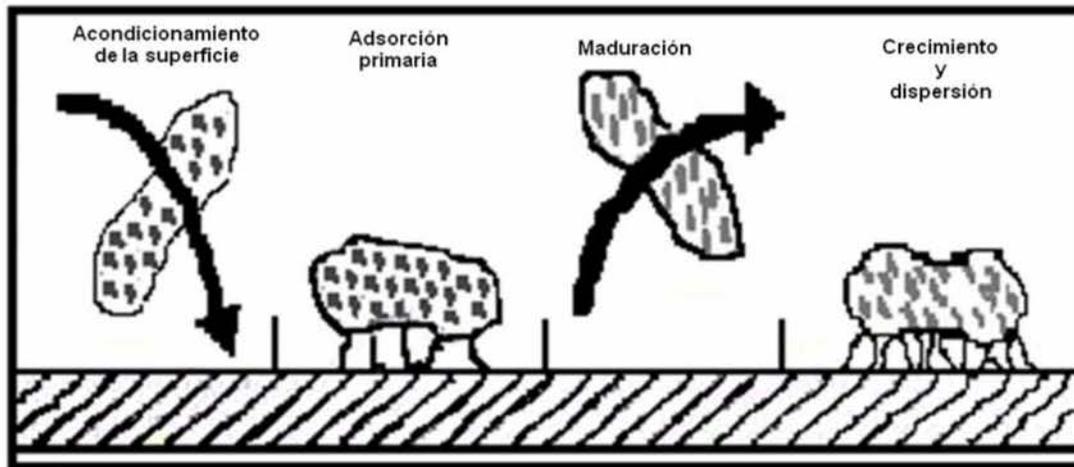
La composición del exopolímero o glicocalix es poco conocida, consta de polisacáridos de diversos azúcares como, glucosa, fructuosa, manosa, *N*-acetilglucosamina y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Este glicocalix se excreta desde la pared celular bacteriana en

formación radicular y se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes (Characklis, 1990)

En una bioplaca madura, la mayor parte de su volumen está ocupado por la matriz laxamente organizada (75-95 %) alrededor de unas pocas bacterias (5-25 %), que proporcionan una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua (Piera, 2003; Dreeszen, 2003).

#### **2.3.5. Crecimiento y dispersión.**

La colonia, en división continua, libera periódicamente células que se repartirán. Estos nuevos colonizadores se establecen fácilmente ya que aprovechan los residuos y nutrientes liberados por las primeras bacterias que formaron la bioplaca y los utilizan para preparar la nueva superficie. Esta colonización se encuentra relacionada con la evolución y la supervivencia de la bacteria a largo plazo (Piera, 2003).



**Figura 3.** Etapas de formación de una biopelícula (modificado de Characklis, 1989).

### 2.3.6. Resistencia de las biopelículas.

Las biopelículas no solo ofrecen estabilidad al crecimiento bacteriano, también le proporcionan protección a diferentes cambios en su entorno como son la exposición a ácidos, deshidratación, fagocitosis, salinidad y resistencia a agentes antimicrobianos (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). A la fecha se han propuesto tres mecanismos para explicar la resistencia de las biopelículas a los agentes antimicrobianos. La primera es la propiedad de barrera de la sustancia polimérica extracelular (SPE). Este mecanismo es importante para protegerla de superóxidos, metales e inmunoglobulinas las cuales son neutralizadas uniéndose al SPE diluyendo su concentración antes de llegar a las células bacterianas. Las propiedades de barrera incluyen también protección contra luz ultravioleta, deshidratación y actividad enzimática. El segundo mecanismo de protección involucra el estado fisiológico de los organismos de la biopelícula, ya que muchos antibióticos pueden cruzar fácilmente la SPE y para protegerse las bacterias que integran la biopelícula entran en un estado latente en donde los antibióticos no

pueden actuar ya que estos requieren un grado de actividad celular para poder ser efectivos y generalmente su mecanismo de acción involucra la desestabilización de un proceso microbiano. Por último, el tercer tipo de protección es la existencia de sub-poblaciones de fenotipos de resistencia dentro de la bioplaca, que han sido denominadas persistentes. Estas bacterias persistentes comprenden una pequeña fracción de toda la biomasa existente y representan a un nuevo fenotipo más resistente que el resto de la población. Cada uno de estos mecanismos contribuye en mayor o menor medida dependiendo del estrés en que se encuentre la bioplaca proporcionando una protección general (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Es importante destacar que los primeros colonizadores de una bioplaca concentran la materia orgánica de la superficie y metabolizan. A partir de la formación del polímero extracelular, se incrementa notablemente la capacidad de retención de nutrientes. El EPS atrapa nutrientes y otros microbios que se mezclan con los que se encuentran ahí y con sus descendientes. Las nuevas bacterias serán capaces de utilizar como nutrientes los que otras rechacen. Finalmente se unirán todos los recursos bioquímicos de las diferentes especies bacterianas, cada una con sus enzimas, para digerir aportes alimentarios que ninguna de ellas podría aprovechar en solitario (Piera, 2003; Characklis, 1990).

### **2.3.7. Cooperatividad en la bioplaca.**

Desde la bioplaca más simple hasta la de mayor complejidad, estas comunidades metabólicas cooperan de una manera compleja, como el tejido vivo de un organismo multicelular. Las diferentes especies viven en un nicho mínimo, muy

especializado y hecho a medida. Si una especie genera residuos tóxicos, otra los devorará con avidez. Así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes de la bioplaca; se reúnen las diferentes enzimas de las que disponen numerosas especies de bacterias para abastecerse de aportes nutritivos que las especies solas no pueden (Piera, 2003).

#### **2.3.8. Bioplacas de la cavidad oral o placa dentobacterina.**

La bioplaca dental es un ecosistema bacteriano complejo cuya evolución, maduración y desarrollo ocasiona la infección odontológica. Habitualmente la infección se encuentra localizada en los tejidos del propio órgano dentario y sigue un curso evolutivo crónico. El tratamiento antimicrobiano ocasiona un cambio cuantitativo y cualitativo en la composición bacteriana de la bioplaca, además de actuar en lugares no accesibles a los métodos mecánicos. Sin embargo, un mal uso de los antimicrobianos puede ocasionar selección de especies bacterianas resistentes en la biopelícula además de efectos secundarios y alteraciones en el huésped (Lopez-Piriz *et al.*, 2007).

#### **2.3.9. Tipos de bioplacas.**

Son varios los tipos de infecciones causadas por las bioplacas y podemos destacar las siguientes: endocarditis bacteriana, otitis media, prostatitis crónica, fibrosis quística, y en la cavidad oral, la caries y la periodontitis. El tratamiento de este tipo de infecciones requiere la utilización de métodos físicos y antimicrobianos. También se ha descrito su presencia en diversos tipos de prótesis: en prótesis totalmente implantadas, como las prótesis valvulares; prótesis parcialmente implantadas, como catéteres endovenosos; y en prótesis no

implantadas, como los catéteres urinarios, lentes de contacto y dispositivos intrauterinos. La invasión de estas prótesis por las bioplacas obliga a largos tratamientos y combinaciones de antibióticos o incluso a la eliminación de las mismas. (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Costerton, 1994).

## **2.4. Antecedentes de la especie *Prunus domestica*.**

### **2.4.1. Antecedentes botánicos de *Prunus domestica* L. (Rosaceae).**

*Prunus domestica* (L.), pertenece a la familia de las Rosáceas y es conocido como “ciruelo europeo” o “ciruelo”, es un árbol de limitado desarrollo, ramoso, que alcanza de entre 4 a 5 m de altura. Posee hojas caducas, pecioladas, opuestas, lisas, oblongas, dentadas, de matiz verde oscuro por el haz y más claro y vellosas por el envés. Sus flores pequeñas, pedunculadas, y de color blanco, están reunidas en corimbos axilares y terminales. Florece en primavera y produce frutos globosos, ovals, de varios colores y comestibles, comúnmente llamados “ciruelas” en México; “Pruneau d’Ente” en Francia y “plums”, en Estados Unidos (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001; CPB, 2000). El ciruelo es cultivado principalmente en países de clima templado y se clasifica con base en su época de floración, o bien, por el contenido de azúcares, consistencia de la pulpa, forma y color de sus frutos (ASERCA, 2001). Otras clasificaciones incluyen la capacidad de soportar los procesos de deshidratación de los frutos frescos, de tal manera que los frutos secos reciben el nombre de “ciruelas pasa”, “Preneau d’Agen” y “prune plums” o “dried plums” en español, francés e inglés, respectivamente (ASERCA, 2001; Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001; CPB, 2000).

En el mundo existe una amplia diversidad de ciruelas y entre sus distintos orígenes se encuentra la variedad “Myrobalan”, nativa de la región Caucásica en

el oeste de Asia (ASERCA, 2001). Otros autores sugieren la cruce entre las dos antiguas especies silvestres, *Prunus cerasifera* Ehrh y *Prunus spinosa* L., produciéndose así, las variedades comerciales que conocemos en nuestros días, las cuales fueron posteriormente cultivadas y propagadas a Europa y otros continentes. De hecho, *Prunus domestica* c.v. de A'gen, propia del sureste de Francia, fue introducida a California por Louis Pellier en 1856 (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001).

Los principales países productores de ciruela son: China, Estados Unidos, Yugoslavia, Rumania y Alemania, los cuales en su conjunto aportan cerca del 65% de la producción mundial. Más, hay que hacer notar que Estados Unidos, en particular el estado de California, destaca por ser el principal productor de ciruela para deshidratar. Para tener una idea de la importancia, California produce el 99% de ciruela deshidratada para autoconsumo así como el 70% de la producción mundial (ASERCA 2001).



Figura 4. *Prunus domestica* L. (Rosaceae), se muestra el árbol, flor y fruto.

La ciruela tiene una amplia variedad de usos, desde el consumo en fresco hasta la obtención de diversos productos a través del procesamiento de la fruta. Destaca el licor conocido como “slivovica” que se produce en Bosnia-Herzegovina. Así mismo la ciruela pasa, es ampliamente demandada dentro de la industria de la repostería (ASERCA, 2001). Además, a partir de ella se consiguen mermeladas, ates, jugos y polvos, los cuales son ampliamente conocidos y pueden conseguirse en los mercados (Nergiz *et al.*, 1997).

#### **2.4.2. Estudios biológicos de *Prunus domestica* L.**

El consumo de ciruelas deshidratadas y productos derivados de ellas producen efectos biológicos, algunos de ellos atribuidos a la presencia de minerales como el sodio y el potasio, que en conjunto, mejoran los problemas de hipertensión (Dikeman *et al.*, 2004). Además la preservación y regeneración del hueso en mujeres posmenopáusicas y ratas ovariectomizadas es debida a la acción combinada del cobre, boro, calcio y selenio (Arjmandi *et al.*, 2003; 2001). Por otra parte, el contenido de fibra dietética y la presencia de sorbitol (un azúcar característico del género *Prunus*) se relaciona con la regulación de la salud intestinal y con el efecto laxante. Al respecto, estudios recientes utilizando modelos animales y humanos han demostrado que el consumo de ciruelas pasa así como el jugo de las mismas, aumentan el contenido de humedad y suavidad en las heces, fenómenos que pueden ser explicados por la baja absorción del sorbitol y su habilidad para retener la humedad (propiedad conocida y ampliamente utilizada en la industria alimenticia y cosmética) (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001). Asimismo, la combinación de glucosa, fructosa y sorbitol con cantidades significativas de fibra dietética tienen una influencia benéfica sobre el metabolismo de los azúcares y control de la diabetes ya que reducen la concentración de glucosa sanguínea (Dikeman *et al.*, 2004; Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001). Las ciruelas pasa también contienen compuestos fenólicos responsables de sus propiedades antioxidantes (Del Caro *et al.*, 2004). Algunos estudios vinculan estas propiedades a la presencia de los ácidos clorogénico y neoclorogénico, los cuales inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro* (Chun *et al.*, 2003). En general, los compuestos

fenólicos desempeñan un papel relevante como agentes captadores de radicales libres, y por lo tanto están vinculados con la prevención de enfermedades relacionadas a la edad, además, juegan un importante papel en el metabolismo de la glucosa, prevención del cáncer, inhibición de la proteasa tipo I del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y sobre todo, poseen una potente actividad antimicrobiana (Kim *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2002). En este contexto, extractos preparados a partir de ciruelas han demostrado actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana, especialmente contra el virus de la polio, el hongo *Scopulariopsis spp* y las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001).

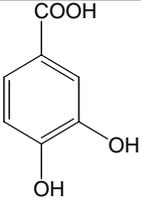
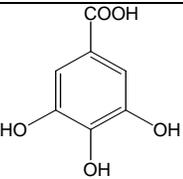
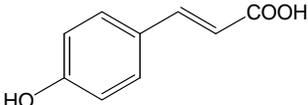
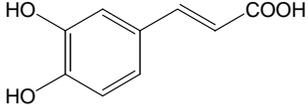
La ciruela es altamente apreciada en la medicina tradicional de México y otros países principalmente para combatir el estreñimiento, aunque también se les ha empleado contra la diarrea, tos y úlceras bucales (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001). En la India, la combinación de las ciruelas y otras plantas medicinales se usa para el tratamiento de leucorrea, menstruación irregular y malestares posteriores al aborto (Fang *et al.*, 2002).

#### **2.4.3. Estudios químicos de *Prunus domestica* L.**

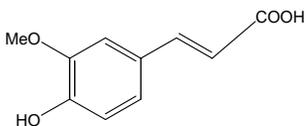
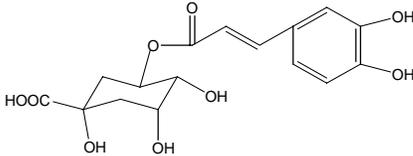
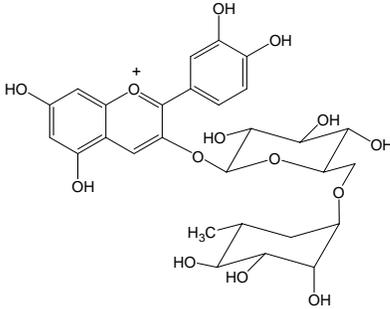
Los estudios fitoquímicos previos a partir de los frutos de *Prunus domestica* han permitido el aislamiento, cuantificación y caracterización de diversos compuestos, algunos metabolitos primarios y secundarios se muestran en el Cuadro 3. Es importante señalar que las cantidades pueden variar de acuerdo a las condiciones climáticas, el grado de madurez del fruto en la cosecha y el empleo de pesticidas, o bien, pueden concentrarse, alterarse o destruirse durante el proceso de deshidratación del fruto fresco y almacenamiento de los productos comerciales

(Lombardi-Boccia *et al.*, 2004; Dikeman *et al.*, 2004; Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001). Tal es el caso de las antocianinas, las cuales están presentes en los frutos frescos (excepto en las ciruelas amarillas) y su ausencia es característica de los frutos deshidratados. La disminución significativa de flavonoides, principalmente derivados de la quercetina, está relacionada a las reacciones de oxidación, mientras que las variaciones en el contenido de ácidos hidroxicinámicos puede deberse a la actividad enzimática de la PPO (polifenol oxidasa) durante el almacenamiento del producto (Del Caro *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2003; Piga *et al.*, 2003). Finalmente, la formación de artefactos y compuestos de alto peso molecular son debidos al calentamiento de los azúcares durante períodos prolongados (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001).

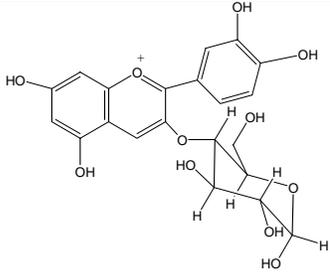
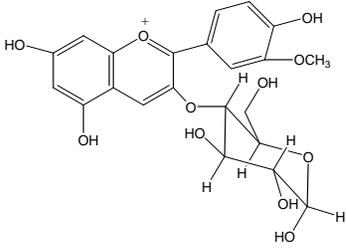
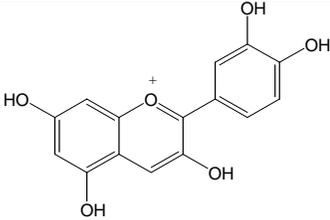
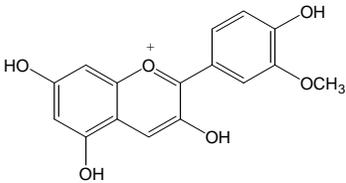
**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica*

<b>Compuestos Fenolicos Simples</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
ácido protocatequínico		Fang <i>et al.</i> , 2002
ácido gálico		Fang <i>et al.</i> , 2002
ácido <i>p</i> -aminobenzoico		Stacewicz-Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
<b>Ácidos Hidroxicinámicos</b>		
ácido <i>p</i> -cumárico		Del Caro <i>et al.</i> , 2004 Fang <i>et al.</i> , 2002
ácido caféico		Del Caro <i>et al.</i> , 2004 Fang <i>et al.</i> , 2002

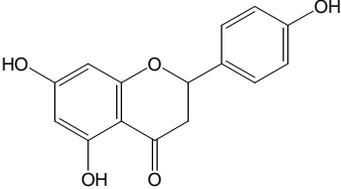
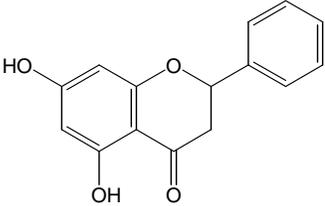
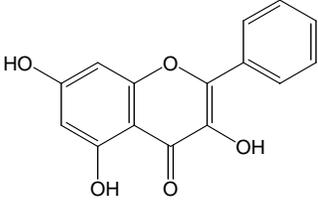
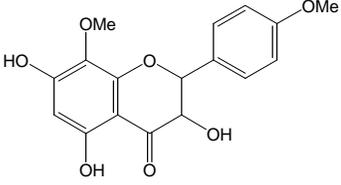
**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica L.*  
(continuación)

<b>Ácidos Hidroxicinámicos</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
ácido ferúlico		Fang <i>et al.</i> , 2002
ácido clorogénico		Del Caro <i>et al.</i> , 2004 Fang <i>et al.</i> , 2002 Piga <i>et al.</i> , 2003
<b>Antocianinas</b>		
3-O-rutinósido de cianidina		Chun <i>et al.</i> , 2003 Piga <i>et al.</i> , 2003

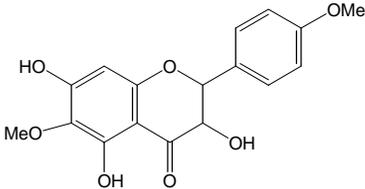
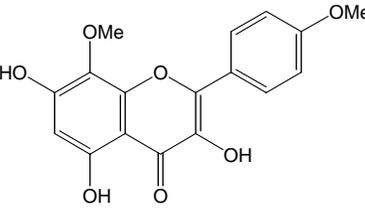
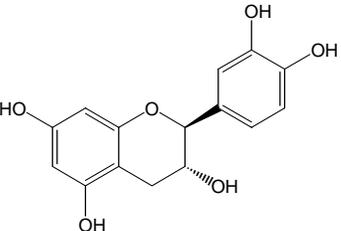
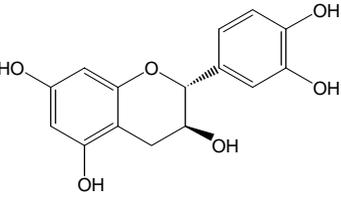
**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica* L.  
(continuación).

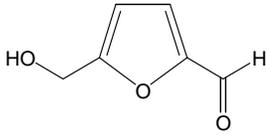
<b>Antocianinas</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
3-O-glucósido de cianidina		Chun <i>et al.</i> , 2003 Piga <i>et al.</i> , 2003
3-O-glucósido de peonidina		Chun <i>et al.</i> , 2003 Piga <i>et al.</i> , 2003
cianidina		Chun <i>et al.</i> , 2003 Piga <i>et al.</i> , 2003
peonidina		Chun <i>et al.</i> , 2003 Piga <i>et al.</i> , 2003

**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica* L.  
(continuación).

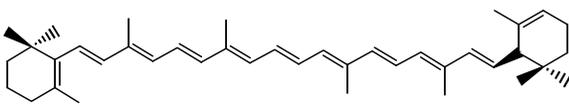
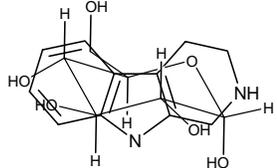
<b>Flavonoides</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
naringenina		Nagaraja <i>et al.</i> , 1964. Parmar <i>et al.</i> , 1992
crisina		Nagaraja <i>et al.</i> , 1964. Parmar <i>et al.</i> , 1992
caemferol		Nagaraja <i>et al.</i> , 1964. Parmar <i>et al.</i> , 1992
3, 5,7–trihidroxi-8,4'- dimetoxiflavonona		Parmar <i>et al.</i> , 1992

**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica* L.  
(continuación).

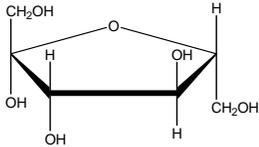
<b>Flavonoides</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
3, 5,7-trihidroxi-6,4'- dimetoxiflavonona		Parmar <i>et al.</i> , 1992
prudomestina		Nagaraja <i>et al.</i> , 1964. Parmar <i>et al.</i> ,1992
<b>Catequinas</b>		
(+)-catequina		Piga <i>et al.</i> , 2003
(-)-epicatequina		Piga <i>et al.</i> , 2003

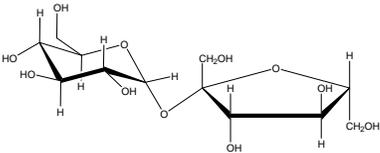
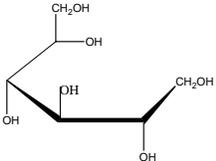
<b>Aldehídos</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
5-(hidroximetil)-2-furfural		Fang <i>et al.</i> , 2002
<b>Carotenoides</b>		

**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica.L*

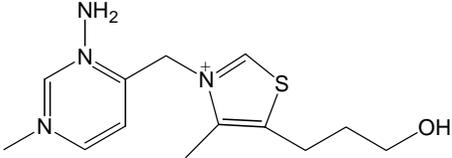
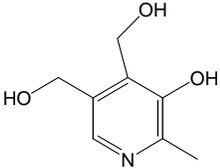
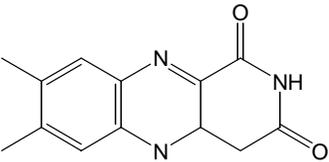
β-caroteno		Stacewicz-Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
<b>Azúcares</b>		
		Dikeman <i>et al.</i> ,
tetrahidropirrolina glucosa		Stacewicz-2004 Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001 Stacewicz-Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001

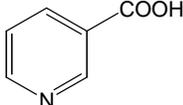
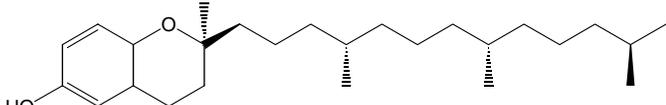
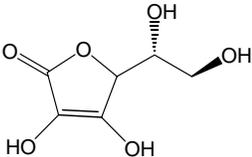
**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica L.*

fructosa		Dikeman <i>et al.</i> , 2004 Stacewicz-Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
----------	--------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

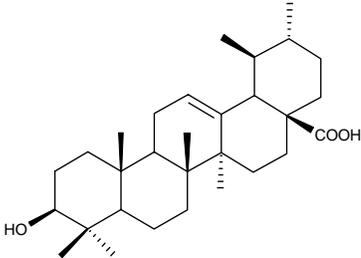
sacarosa		Dikeman <i>et al.</i> , 2004 Stacewicz- Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
sorbitol		Stacewicz- Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001

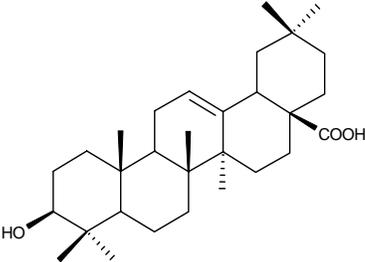
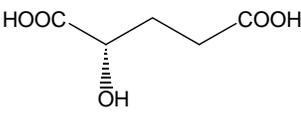
**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica* L.  
(continuación).

<b>Vitaminas</b>		
<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
tiamina		Stacewicz- Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
piridoxina		Stacewicz- Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001
riboflavina		Stacewicz- Sapuntzakis <i>et al.</i> , 2001

ácido nicotínico		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001
vitamina E		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001
vitamina C		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001

**Cuadro 3.** Compuestos reportados para la especie *Prunus domestica* L. (continuación).

Triterpenos		
Nombre químico	Estructura	Referencia
ácido ursólico		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001

ácido oleanólico		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001
<b>Otros</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
ácido málico		Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001

### 3. Planteamiento del problema

El desarrollo de resistencia, la falta de selectividad, la toxicidad y efectos adversos de los antibióticos utilizados con mayor frecuencia ha incrementado el uso de los sistemas de medicina alternativa y complementaria como una opción para disminuir estos problemas. Las investigaciones para validar el uso de estos sistemas se han enfocado principalmente en el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas sistémicas mientras que menor atención se ha prestado a las enfermedades orales ocasionadas por bacterias y levaduras. Las enfermedades de la cavidad oral incluyendo las caries dentales y las enfermedades periodontales son los padecimientos que con mayor frecuencia afectan a millones de personas de diferentes edades alrededor del mundo, las cuales resultan en sufrimiento y dolor al hablar o masticar. Además, representan la mayor causa de pérdidas de horas en el trabajo y en las escuelas. Los métodos químicos y mecánicos son utilizados para controlar la placa dentobacteriana. Sin embargo, ninguno de los agentes actualmente disponibles en el mercado como enjuagues bucales y pastas dentales que contienen productos derivados de plantas es ideal. Esto justifica la búsqueda y desarrollo de agentes alternos derivados de fuentes vegetales que sean más seguros y efectivos.

Por lo anterior, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo primordial el aislamiento y purificación de compuestos de los frutos deshidratados de *Prunus domestica* que posean actividad antibacteriana contra patógenos de la cavidad oral.

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

- i. Realizar el estudio químico biodirigido del extracto de frutos de *Prunus domestica* para el aislamiento y purificación de compuestos.
- ii. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la especie contra los patógenos orales, *S. mutans* y *P. gingivalis*

- iii. Evaluar el efecto de los compuestos puros con actividad antibacteriana, sobre la formación de las bioplacas mono especie o multiespecie.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES.**

#### **4.1.1. Análisis cromatográficos.**

La cromatografía por adsorción en columna abierta y la cromatografía por adsorción en columna al vacío se realizaron sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM. Los análisis de cromatografía en capa fina analítica (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diferentes dimensiones, recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 5%, seguido de calentamiento (110° C aprox.) hasta la visualización de los compuestos.

La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó sobre una placa de vidrio (20 cm x 20 cm) recubierta de gel de sílice (60-254, Merck, 0.25 mm de espesor).

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

Los estudios de espectroscopia y espectrometría se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla modelo 1605 marca Perkin-Elmer, en pastilla de bromuro de potasio. Los

espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 2 utilizando metanol como disolvente. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ , 360 MHz) y de carbono 13 (RMN $^{13}\text{C}$ , 90 MHz) se generaron en un equipo Varian VXR-360S para el de 360 MHz y en un equipo Varian modelo Unity-Inova para los de 400 MHz utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO}-d_6$ ; los desplazamientos químicos se reportan en (ppm) con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE) 70eV se obtuvieron en un equipo Jeol JMS-SX 102A Hewlett-Packard 5890 serie II acoplado a un cromatógrafo de gases. Se utilizó la técnica de introducción directa. En la modalidad de bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB), los espectros se registraron en el mismo equipo usando alcohol nitrobenílico como matriz. El espectro de alta resolución se realizó en un MALDI-TOF JEOL GC Mate (Research Resources Center, University of Illinois at Chicago).

#### **4.2. Material vegetal.**

El material utilizado de *P. domestica* se compró en la Ciudad de México en el mes de Febrero del año 2007. El producto de marca Mariani Kirland-Signature con número de lote 7028 describe en la etiqueta frutos de *Prunus domestica* c.v. de A'gen. Una muestra de referencia se encuentra en el Laboratorio 126 del edificio E de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### **4.3. Ensayos biológicos.**

#### **4.3.1. Microorganismos de prueba.**

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de *Prunus domestica* se eligieron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por tratarse de los principales patógenos orales causantes de las caries dentales y las enfermedades periodontales, respectivamente. Estas cepas fueron obtenidas de American Type Culture Collection y se encuentran conservadas en el Laboratorio 126 del Departamento de Farmacia, Facultad de Química y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Se utilizaron caldo infusión de cerebro-corazón (Difco, Sparks, MD) y medio soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 g/mL), hemina (5 g/mL) y nitrato de potasio (0.02 %) para desarrollar a *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente.

#### **4.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).**

La actividad antimicrobiana de los compuestos (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI) se evaluó utilizando un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos (Sarstedt, Newton, NC, EU). Los cultivos de cada especie incubados a lo largo de la noche se centrifugaron (10 000 rpm, 10 min), se lavaron 2 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy, Rochester, NY). Cada pozo contenía *S. mutans*  $5 \times 10^5$  unidades

formadoras de colonias (UFC)/mL o *P. gingivalis*  $5 \times 10^6$  UFC/mL, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se utilizaron muestras por triplicado para cada concentración de prueba.

Los controles utilizados consistieron en medio de cultivo inoculado y sin compuestos de prueba mientras que el blanco contenía únicamente medio de cultivo sin inocular. Todas las placas se incubaron a 37° C bajo condiciones atmosféricas adecuadas. *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, mientras que *P. gingivalis* se incubó en un sistema de recipientes de generación de gas GasPack EZ (BD, Sparks, Maryland, EU) conteniendo un sobre activado para la generación de CO<sub>2</sub> (GasPack EZ CO<sub>2</sub>) para crear la atmosfera anaeróbica. El crecimiento se estimó espectroscópicamente (A<sub>660</sub> nm) después de 24 y 48 horas, utilizando un lector de placas (Biorad, Hercules, CA, EU).

El valor de CMI para cada microorganismo analizado se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 A<sub>660</sub> nm. Se utilizó gluconato de clorhexidina (CHX, Sigma, St. Louis, MO, EU) como control positivo mostrando valores de CMI de 1.25 µg/mL contra *S mutans* y 0.312 g/mL, contra *P. gingivalis*.

#### **4.3.3. Medición de la formación de bioplaca multiespecies.**

Una placa reactor (FPR; BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA) acoplada a una cámara de vidrio (1.25 cm<sup>2</sup>) fue preconditionada por 1hr a 37°C con saliva artificial. Posteriormente la placa reactor se conectó a un contenedor de vidrio por medio de un tubo estéril para formar un sistema de recirculación de cultivo. En el contenedor se adicionaron 700 mL de caldo Schaedler (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) y a continuación se inoculó con 1mL de cultivo de los microorganismos de prueba y mantenido a una temperatura de 37 ± 1°C en un baño de agua. El flujo de medio de cultivo a la placa reactor fue detenido y los compuestos de prueba se adicionaron para que interaccionaran con la bioplaca. Después de 20 minutos el flujo fue reanudado por 10 min. Se mantuvieron condiciones anaeróbicas suministrando nitrógeno (O<sub>2</sub>< 0.5 ppm, BOC gases, Inc., Avondale, IL, EUA) a todo el sistema. La viabilidad de los cultivos se monitoreo utilizando como parámetros el crecimiento y desarrollo de la bioplaca utilizando técnicas de análisis de imagen. Un microscopio (Leica DMRE, Wetzlar, Alemania) fue acoplado a una cámara digital (Optronix, Buffalo, Grove, IL, EUA) y las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando un software (Image-Pro-Plus, versión 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). La viabilidad de la bioplaca fue evaluada utilizando una técnica de tinción fluorescente utilizando el kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Leiden, Holanda) (Filoche *et al.*, 2004).

#### **4.3.4. Ensayo de agregación para *S. mutans*.**

*S. mutans* fue incubado en solución reguladora de fosfatos (0.05 M, pH = 6.8) a 37°C. Después de esta incubación fueron adicionados los compuestos ácido ursólico (1), (3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (3) y 5-(hidroximetil)-2-furfural (2) los valores de densidad óptica (DO) fueron tomados a 550 nm y a diferentes tiempos (0 min, 10 min, 30 min, 60 min, y 120 min).

#### **4.4. ESTUDIO FITOQUÍMICO de *Prunus domestica*.**

##### **4.4.1. Preparación del extracto orgánico de *Prunus domestica*.**

El extracto orgánico se preparó mediante un proceso de maceración a partir de 2.5 kg de ciruelas pasa y utilizando 4L de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) como disolvente, por un periodo de 3 días. La solución resultante fue filtrada y luego concentrada al vacío obteniéndose 15.690 g de extracto de consistencia oleosa de color café. El extracto obtenido se evaluó utilizando como bacterias de prueba *Streptococcus mutans* y *Phorphyromonas gingivalis*, las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas fueron de 560.2 y 450.8 µg/mL, respectivamente.

##### **4.4.2. Fraccionamiento primario del extracto de diclorometano.**

Una porción del extracto (14.0 g) fue sometida a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en una columna al vacío (10.0 x 35 cm) empacada con 200 g de gel de sílice, utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetona (diversas proporciones, Cuadro 4) y acetona. Este proceso generó 50 fracciones de 500 mL cada una, las cuales fueron reunidas en base a su similitud

cromatográfica, obteniéndose así ocho fracciones combinadas. El diagrama 1 resume el proceso de fraccionamiento del extracto de diclorometano.

**Cuadro 4.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna al vacío del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtenido de *Prunus domestica*.

sistema de elución	de	proporción	fracciones obtenidas	fracciones reunidas	clave	peso (g)
hexano		100	1-3	1-6	FI	2.201
hexano-acetona		95:5	4-5			
hexano-acetona		90:10	6-8	7-13	FII	4.871
hexano-acetona		85:15	9-20	14-19	FIII	1.521
hexano-acetona		80:20	21-22	20-24	FIV	1.678
hexano-acetona		75:25	23-24			
hexano-acetona		70:30	25-28	25-30	FV	2.345
hexano-acetona		65:35	29-33			
hexano-acetona		60:40	34-35	31-37	F-VI	0.678
hexano-acetona		50:50	36-37			
hexano-acetona		40:60	38-39			
hexano-acetona		35:65	40-41	38-43	FVII	0.179
hexano-acetona		30:70	42-43			
hexano-acetona		20:80	44-45	44-50	FVIII	0.180
acetona		100	46-50			

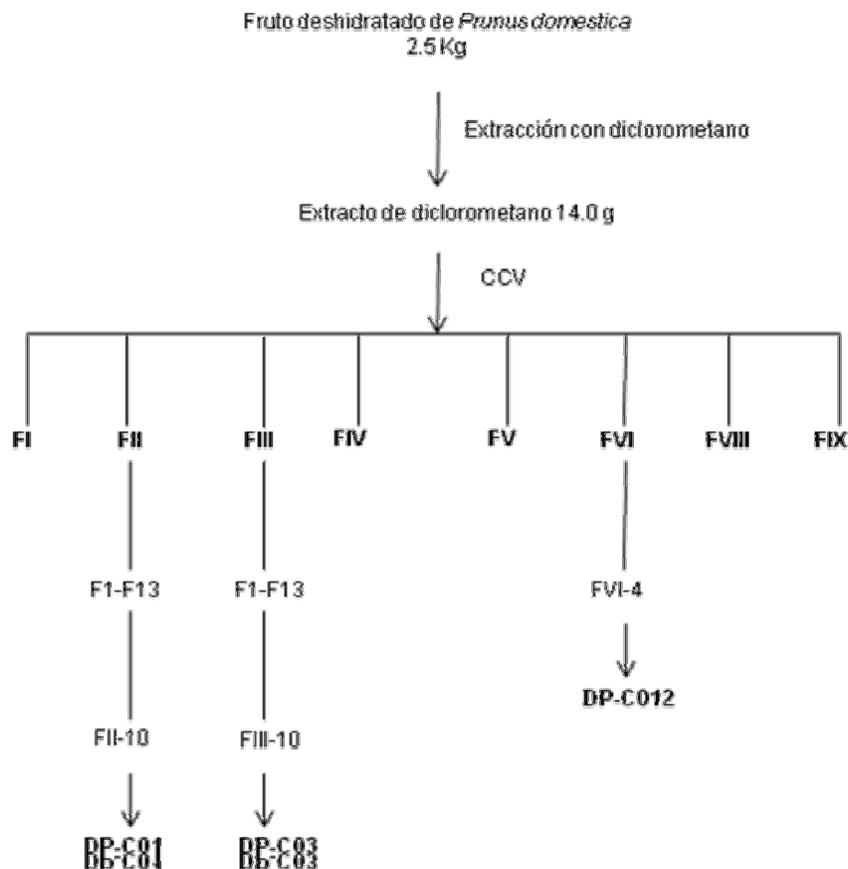
Cada una de las fracciones reunidas se evaluó utilizando como bacterias de prueba *S. mutans* y *P. gingivalis* y como resultado de este proceso se obtuvieron tres fracciones activas (FII, FIII, FIV).

#### 4.4.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FII.

La fracción FII (CMI 568.5 y 340.2  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente) fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria 150 g de gel de sílice y como fase móvil hexano, hexano-AcOEt (en diversas proporciones. Ver Cuadro 5) y AcOEt. Mediante este proceso se obtuvieron 76 fracciones que luego fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 13 conjuntos de fracciones combinadas.

**Cuadro 5.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FII.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
hexano	100	1-8	1-9	F1	0.0165
hexano-AcOEt	95-5	9-16	10-11	F2	0.2855
hexano-AcOEt	90-10	17-24	12-19	F3	0.2878
hexano-AcOEt	85-15	25-32	20-25	F4	0.2605
hexano-AcOEt	80-20	33-40	26-30	F5	0.1252
hexano-AcOEt	75-25	41-48	31-32	F6	0.0344
hexano-AcOEt	70-30	49-56	33-34	F7	0.0318
hexano-AcOEt	65-35	57-64	35	F8	0.0845
hexano-AcOEt	50-50	65-72	36-40	F9	0.0877
AcOEt	100	73-76	41-48	F10	0.1029
			49-55	F11	0.0465
			56-60	F12	0.0208
			61-76	F13	0.0299

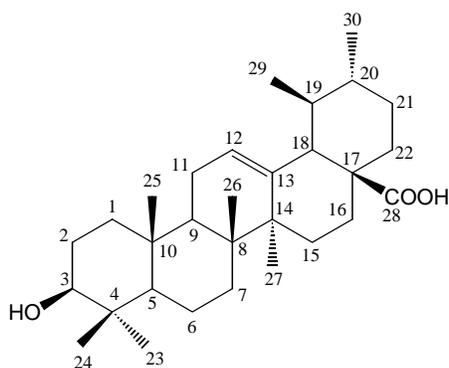


**Diagrama 1.** Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *Prunus domestica*.

#### 4.4.4 .Obtención del ácido ursólico (DP-C01).

A partir de la fracción activa FII precipitó de manera espontánea un sólido de color blanco el cual fue separado por filtración al vacío y sometido a múltiples lavados utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1). El sólido (85 mg) fue identificado como ácido ursólico por comparación de sus constantes espectroscópicas y

espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura (Mahato y Kundu, 1994) y por comparación directa con una muestra auténtica aislada previamente de *Cigarrilla mexicana*. **Ácido ursólico**: sólido amorfo de color blanco; EMIE  $m/z$  456  $[M]^+$  (5), 248 (100), 219 (6), 207 (23), 203 (33), 190 (11), 189 (13), 133 (23), 119 (10), 85 (10), 71 (14), 69 (10), 57 (19); RMN- $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta_H$  4.65 (1H, m, H-12), 3.84 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, d,  $J=11.25$  Hz, H-18), 0.53 (3H, s,  $CH_3$ ), 0.31 (3H, d,  $J=6.4$  Hz,  $CH_3$ ), 0.24 (3H, s,  $CH_3$ ), 0.35 (3H, s,  $CH_3$ ), 0.16 (3H, d,  $J=6.4$  Hz,  $CH_3$ ). RMN- $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta_C$  178.8 (C-28), ,138.7 (C-13), 125.1 (C-12), 77.1 (C-3), 58.7 (C-18), 52.3 (C-5), 41.5 (C-14).17.9 (C-29), 15.9 (C-23).



#### ácido ursólico (DP-C01)

#### 4.4.5. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII.

La fracción FIII (CMI 386.8 y 235.7  $\mu g/mL$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente) fue sometida a un fraccionamiento en columna rápida utilizando como fase estacionaria 60 g de gel de sílice 40  $\mu M$  (Baker) y como fase móvil hexano, hexano-acetona y acetona (en diversas proporciones. Ver Cuadro 6).

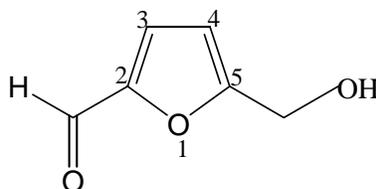
Mediante este proceso se obtuvieron 76 fracciones que luego fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 13 conjuntos de fracciones combinadas.

**Cuadro 6.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII.

<b>sistema de elución</b>	<b>de proporción</b>	<b>fracciones obtenidas</b>	<b>fracciones reunidas</b>	<b>clave</b>	<b>peso (g)</b>
hexano	100	1-8	1-9	F1	0.0165
hexano-acetona	95-5	9-16	10-11	F2	0.2855
hexano-acetona	90-10	17-24	12-19	F3	0.2878
hexano-acetona	85-15	25-32	20-25	F4	0.2605
hexano-acetona	80-20	33-40	26-30	F5	0.1252
hexano-acetona	75-25	41-48	31-32	F6	0.0344
hexano-acetona	70-30	49-56	33-34	F7	0.0318
hexano-acetona	65-35	57-64	35	F8	0.0845
hexano-acetona	50-50	65-72	36-40	F9	0.0877
AcOEt	100	73-76	41-48	F10	0.1029
			49-55	F11	0.0465
			56-60	F12	0.0208
			61-76	F13	0.0299

#### 4.4.6. Obtención del 5-(hidroximetil)-2-furfural (DP-C03).

La fracción FIII-10 fue analizada mediante cromatografía en capa fina y reveló la presencia de un compuesto mayoritario, por lo que se realizó una cromatografía preparativa en capa delgada. Este proceso permitió el aislamiento y caracterización del 5-(hidroximetil)-2-furfural. **5-(hidroximetil)-2-furfural (2)**: cera de color amarillo, EMIE  $m/z$  126  $[M]^+$ ; RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta_H$  9.45 (2-CHO), 7.16 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-3), 6.48 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-4), 4.62 (2H, s, 5-CH $_2$ ,OH); RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta_C$  180.0 (2-CHO), 161.2 (C-2), 152.4 (C-5), 123.3 (C-4), 110.0 (C-3), 57.3 (5-CH $_2$ -OH).



#### 5-(hidroximetil)-2-furfural (DP-C03)

#### 4.4.7. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FVI.

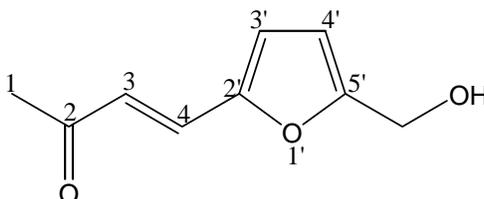
La fracción FVI (CMI 124.7 y 80.6  $\mu g/mL$  para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente) fue sometida a un fraccionamiento en columna utilizando una columna de Sephadex LH-20 (2.5 x 50 cm) como fase estacionaria y como fase móvil metanol. Mediante este proceso se obtuvieron 144 fracciones de 15 mL cada una. Las fracciones fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose ocho conjuntos de fracciones combinadas.

**Cuadro 7.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FVI.

<b>sistema de elución</b>	<b>de fracciones obtenidas</b>	<b>clave</b>
metanol	1-8	FVI-1
metanol	9-16	FVI-2
metanol	17-34	FVI-3
metanol	35-50	FVI-4
metanol	51-70	FVI-5
metanol	71-78	FVI-6
metanol	79-96	FVI-7
metanol	97-100	FVI-8

#### 4.4.8. Obtención del (3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (DP-C012).

A partir de la fracción FVI-4 precipitó de manera espontánea un sólido de color amarillo el cual fue separado por filtración al vacío. Este proceso permitió el aislamiento y caracterización de la **(3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (3)**: cera de color amarillo, EMIE  $m/z$  166.07  $[M]^+$ , 151 (16), 135 (100). RMN- $^1H$  (MeOD, 360 MHz): 6.79 (1H, d,  $J = 3.34\text{Hz}$ , H-3'), 6.45 (1H, d,  $J = 3.34\text{ Hz}$ , H-4'), 7.39 (1H, d,  $J = 15.9\text{ Hz}$ , H-4), 6.56 (1H, d  $J=15.9\text{Hz}$ , H-3), 4.55 (1H, s, 5'- $\underline{C}H_3OH$ ), 2.32 (3H, s,  $\underline{C}H_3$ ); RMN- $^{13}C$  (MeOD, 360 MHz): 200.6 (C-1), 159.7 (C-5'), 151.9 (C-2'), 118.7 (C-3'), 111.4 (C-4'), 57.1 (5'- $\underline{C}H_2-OH$ ).



**(3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (DP-C012)**

## **5. Resultados y Discusión**

El anuario estadístico del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en el año 2006 reporta que la especie *Prunus domestica* como una de las veinte especies más comercializadas en el Mundo y se ha extendido su uso con fines medicinales. En la actualidad la especie *P. domestica* se utiliza para tratar diversos trastornos entre los cuales destacan intestino perezoso, infecciones, trastornos ocasionados por la menopausia, osteoporosis (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001). La alta incidencia de padecimientos infecciosos en México y los reportes previos sobre el uso de extractos de la ciruela para tratar infecciones de la piel y su uso para preservar la carne hacen de esta especie un buen candidato para su estudio. Una vez preseleccionada la especie se procedió a realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto derivado de las ciruelas deshidratadas.

### **5.1. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el extracto derivado de las ciruelas pasa.**

La determinación del potencial antibacteriano del extracto se realizó mediante el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita (Wu *et al.*, 2002). Los resultados de esta evaluación indicaron que el extracto preparado a partir de los frutos deshidratados (ciruela pasa) de *P. domestica* presentó una concentración mínima inhibitoria de 560.2 y 450.8 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Los extractos derivados de plantas se consideran activos contra estas bacterias si su CMI es menor a 1000 µg/ml (Wu *et al.*, 2002).

## **5.2. Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el extracto activo.**

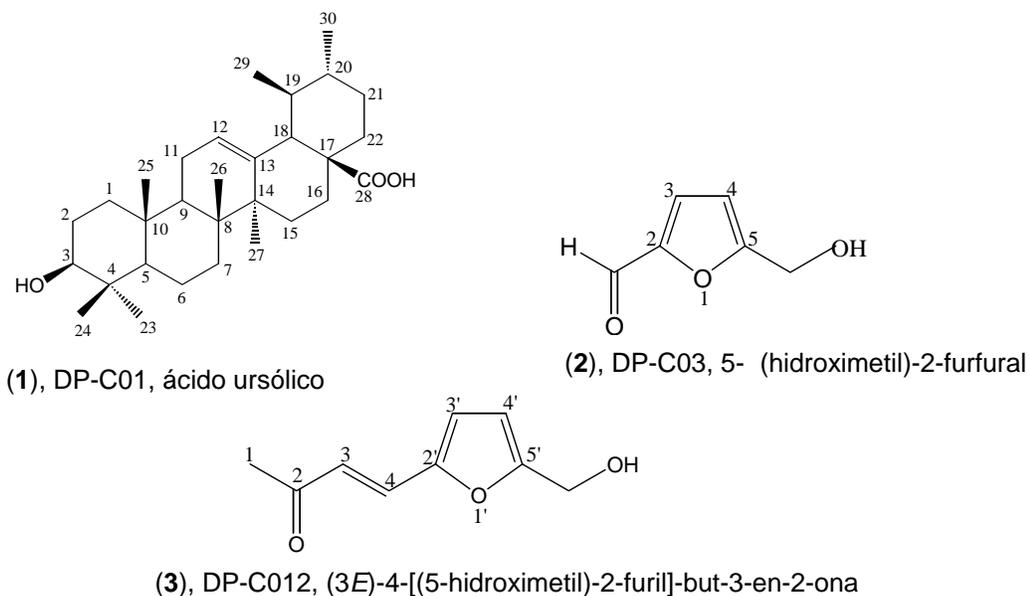
Con la finalidad de obtener los constituyentes antibacterianos se realizó un estudio fitoquímico biodirigido. Este tipo de estudios ha demostrado en diversas ocasiones ser el más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos de interés medicinal (Kinghorn *et al.*, 1995, 1993, 1992; Hamburger y Hostettman, 1991). El extracto activo se sometió a un fraccionamiento primario en columna. La actividad antibacteriana se encontró en las fracciones FII, FIII y FVI. Del fraccionamiento primario del extracto de diclorometano se obtuvo un conjunto de seis fracciones finales las cuales se probaron contra *S. mutans* y *P. gingivalis* las CMI para cada fracción se muestran en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** CMI de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento primario del extracto de diclorometano sobre las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Fracción	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>S. mutans</i>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>P. gingivalis</i>
<b>FI</b>	>1000	>1000
<b>FII</b>	568.5*	340.2*
<b>FIII</b>	386.8*	235.7*
<b>FIV</b>	>1000	>1000
<b>FV</b>	>1000	>1000
<b>FVI</b>	124.7*	80.6*
<b>FVII</b>	>1000	>1000
<b>FVIII</b>	>1000	>1000

\*fracciones consideradas activas

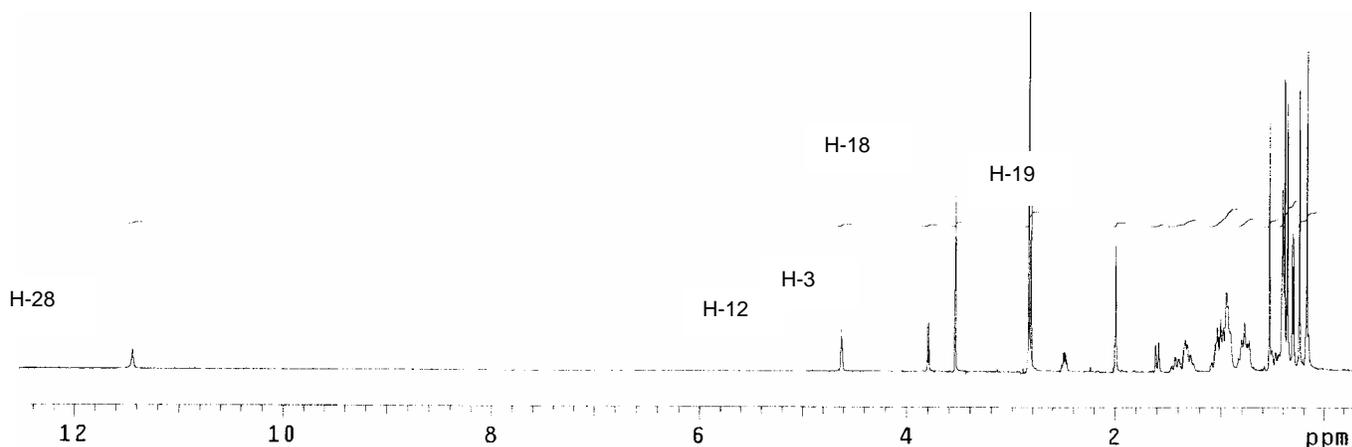
El aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas se realizó mediante el empleo de cromatografías abiertas utilizando como adsorbentes gel de sílice y Sephadex-LH20. El proceso global permitió el aislamiento y caracterización de tres metabolitos con actividad antibacteriana, uno de los cuales se describe por primera vez en la especie y representa el segundo reporte para este compuesto en la naturaleza. Los compuestos aislados se caracterizaron como el ácido ursólico (**1**), el 5-(hidroximetil)-2-furfural (**2**) y el (3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (**3**).



**Figura 5.** Compuestos activos aislados a partir de *P. domestica*

### 5.2.1. Obtención de DP-C01 (1)

De la fracción activa F-II, obtenida del fraccionamiento primario del extracto de diclorometano se obtuvieron 85 mg de un sólido que precipitó de forma espontánea, este sólido se purificó con sucesivas recristalizaciones con mezclas de metanol y diclorometano. El compuesto DP-C01 con p.f. 262-265°C fue identificado como el ácido ursólico por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura (Mahato y Kundu, 1994) y por comparación con una muestra auténtica aislada de *Cigarrilla mexicana* proporcionada gentilmente por la Dra. Rachel Mata. En la Figura 6 se presenta el espectro de RMN-<sup>1</sup>H obtenido para el ácido ursólico.



**Figura 6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para el ácido ursólico DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400MHz.

### 5.2.2. Obtención del Compuesto DP-C03. (2)

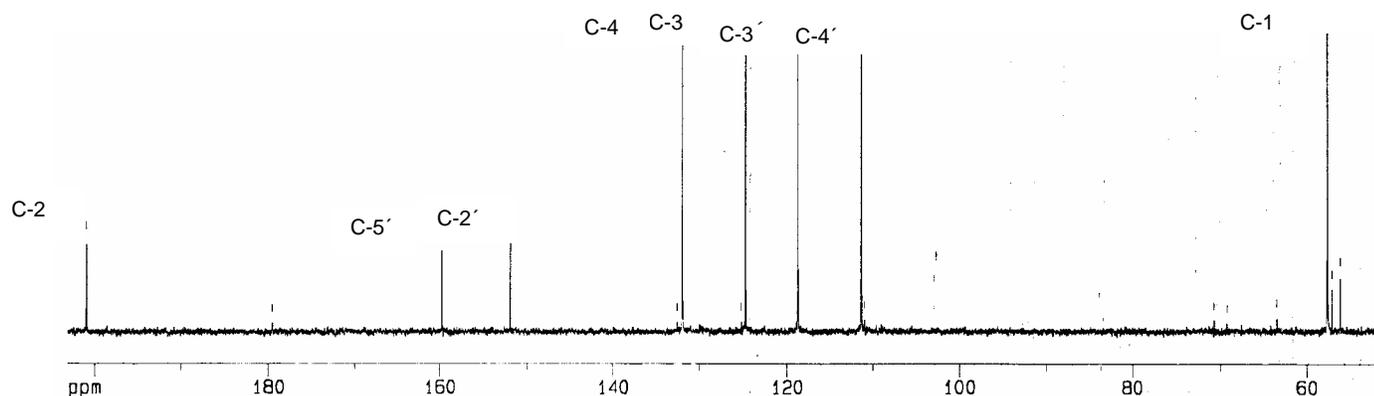
Del análisis cromatográfico de la fracción FIII-10 se obtuvo una cera de color amarillo que fue caracterizada por comparación directa con una muestra de referencia y por las constantes espectroscópicas y espectrométricas reportadas en la literatura como el 5-(hidroximetil)-2-furfural (**2**) aislado de uva pasa (Palma *et al.*, 2001).

### 5.3. Caracterización estructural del producto DP-C012 (3).

La elucidación estructural del compuesto DP-C012 se realizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos y su elucidación se describirá a detalle en esta sección.

El compuesto DP-C012 se obtuvo como una cera de color amarillo. El análisis del espectro de masas de alta resolución permitió determinar un peso molecular de 166.0617 uma y su fórmula molecular se estableció como C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, que permite un índice de deficiencia de hidrógenos de 5, el fragmento en *m/z* 135, sugiere la pérdida del fragmento [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>.

Las características del espectro de resonancia magnética para carbono trece de presentaría un compuesto furánico 2,5-disustituido (Don *et al.*, 2006) (Figura 7). Las señales diagnósticas se centran en [ $\delta_c$  200.9 (C-1)] para el carbono del grupo carbonilo y [ $\delta_c$  151.9 (C-2') y 159.7(C-5')]; para los carbonos cuaternarios que están sustituidos en el anillo de furano, [ $\delta_c$  57.1 ( $\underline{C}H_2OH$ )] para el carbono unido al grupo hidroxilo; [ $\delta_c$  115.8 (C-3) y 131.9 (C-4)] para los carbonos hidrogenados olefínicos en *trans*. Por último, las señales para los carbonos aromáticos (C-3') y (C-4') se pueden observar en 118.7 y 111.4 ppm, respectivamente.



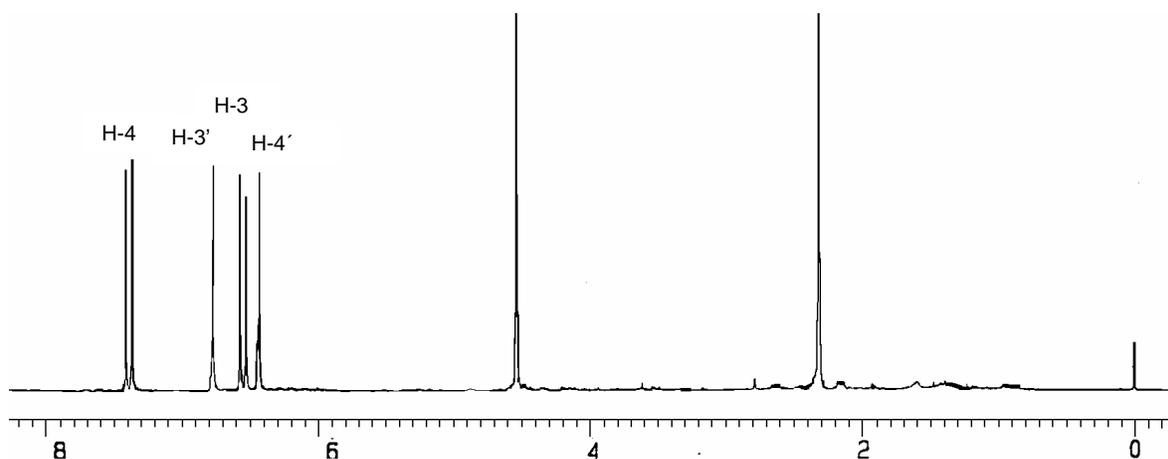
**Figura 7.** Espectro de RMN  $C^{13}$  del compuesto DP-C012 ( $CD_3OD$ , 360MHz).

Las señales más importantes observadas en el espectro de RMN $^1H$  se resumen a continuación:

En la región de los aromáticos se distinguen claramente dos pares de dobletes y dos singuletes asignables a los hidrógenos H-3' en ( 6.79  $J=3.34$  Hz) y H-4' en

(6.45  $J=3.34$  Hz) del anillo de furano y a los protones *trans* olefínicos H-3 en (6.56 , $J= 15.9$  Hz) y H-4 en (7.39,  $J= 15.9$  Hz) las señales para los protones aromáticos se observan que correlacionan en el espectro de HMQC con las absorciones en

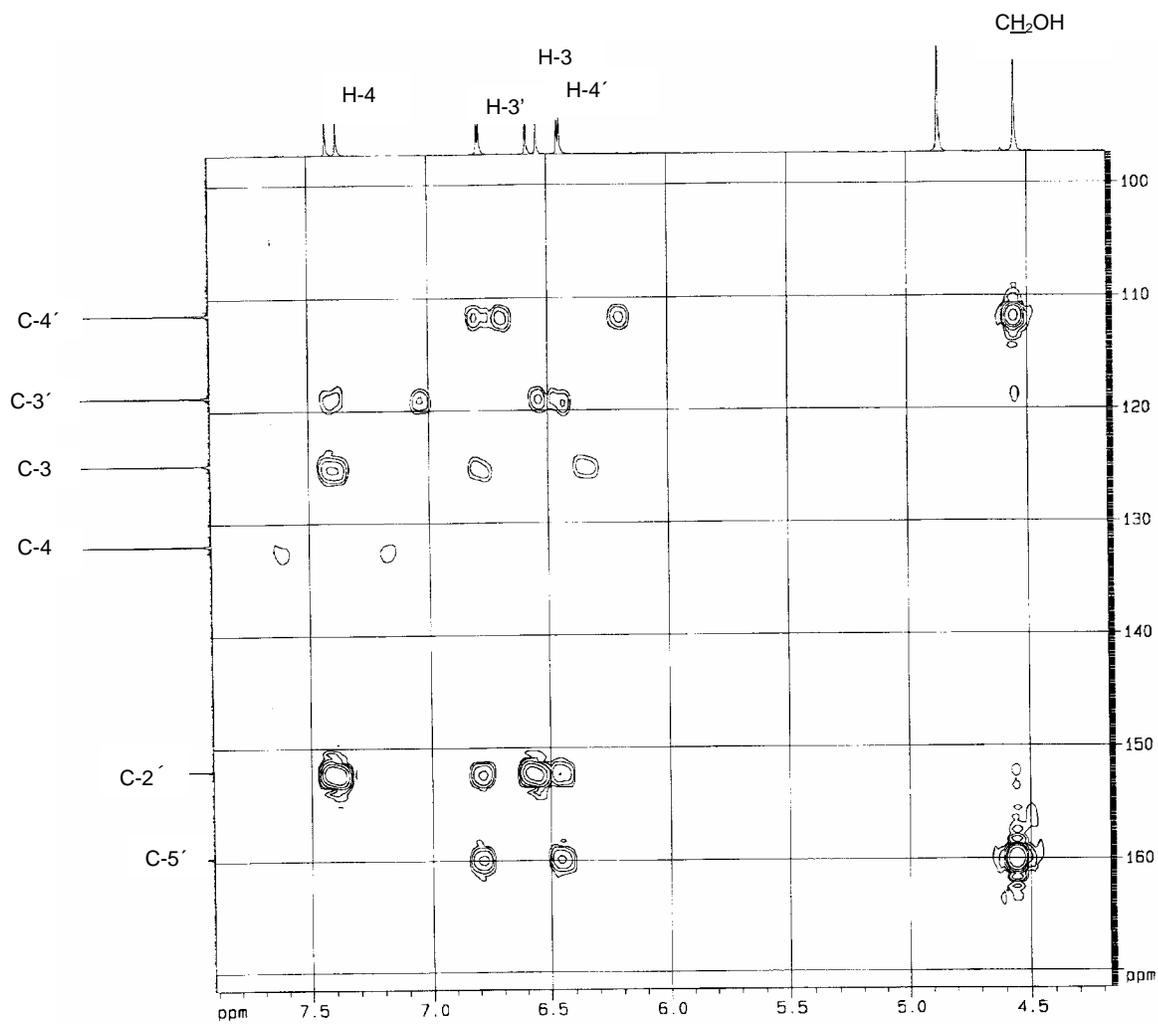
$\delta_C$ . Además, el espectro de RMN<sup>1</sup>H presenta un singulete para los dos protones equivalentes del grupo metileno oxigenado en  $\delta_H$  4.55 y finalmente para un singulete para el metilo en  $\delta_H$  2.32. En la Figura 8 se muestra el espectro de RMN<sup>1</sup>H obtenido.



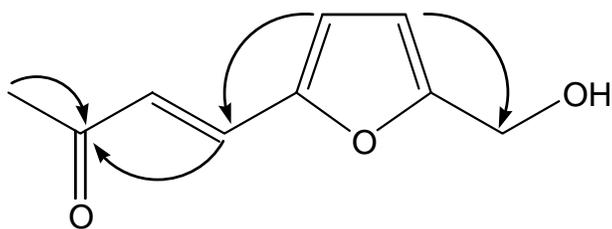
**Figura 8.** Espectro de RMN- H<sup>1</sup> del compuesto DP-C012. (CD<sub>3</sub>OD, 360 MHz).

El análisis de los principales cuadros de conectividad en el espectro de HMBC (Figura 9) del producto natural permitió corroborar las posiciones de la cadena lateral en la posición 2' y el hidroximetilo en la posición 5'. Analizando las principales correlaciones que se pueden observar las correlaciones  $\underline{C}H_2OH/H-4'$ , es congruente con la ubicación del grupo hidroxilo, C-2/H-1, H-3, H-4 confirman la posición del carbonilo y C-2'/H-4', C-5'/H-3' corroboran la posición de los carbonos cuaternarios dentro del anillo de furano. Con base en las evidencias descritas anteriormente el compuesto DP-012 se caracterizó como la (3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona la cual ha sido aislada previamente descrito como producto natural de la especie *Salvia miltiorrhiza* y fue nombrado como remanona C (Don *et al.*, 2006). En la Figura 9 se muestran las correlaciones más

relevantes observadas en el espectro bidimensional HMBC para el compuesto DP-C012 (3).



**Figura 9.** Espectro de HMBC del compuesto **DP-C012 (3)**.



**Figura 10** Correlaciones más importantes observadas en el espectro bidimensional de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -HMBC del compuesto **DP-C012 (3)**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{-H}$ (ppm)	HMBC
2'	151.9		
3'	118.7	6.79 (d, $J=3.4$ )	H-4', H-4
4'	111.4	6.45 (d, $J=3.4$ )	H-3'
5'	159.7		
1	29.7	2.32	H-2
2	200.9		
3	115.8	6.56 (d, $J=15.9$ )	H-3', H-4
4	131.9	7.39 (d, $J=15.9$ )	H-3, H-3'

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos de carbono e hidrogeno en partes por millón para el compuesto **DP-C012 (3)**.

#### 5.4. Evaluación del potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios y su efecto sobre la formación de biopelículas.

El potencial antibacteriano de los metabolitos secundarios obtenidos de *P. domestica* se determinó mediante la evaluación de sus efectos sobre el

crecimiento las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*. En general todos los compuestos aislados presentaron un efecto antibacteriano con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en el rango de 0.083 y 1.43 mM En el Cuadro 9 se presentan las CMI's para cada uno de los compuestos aislados.

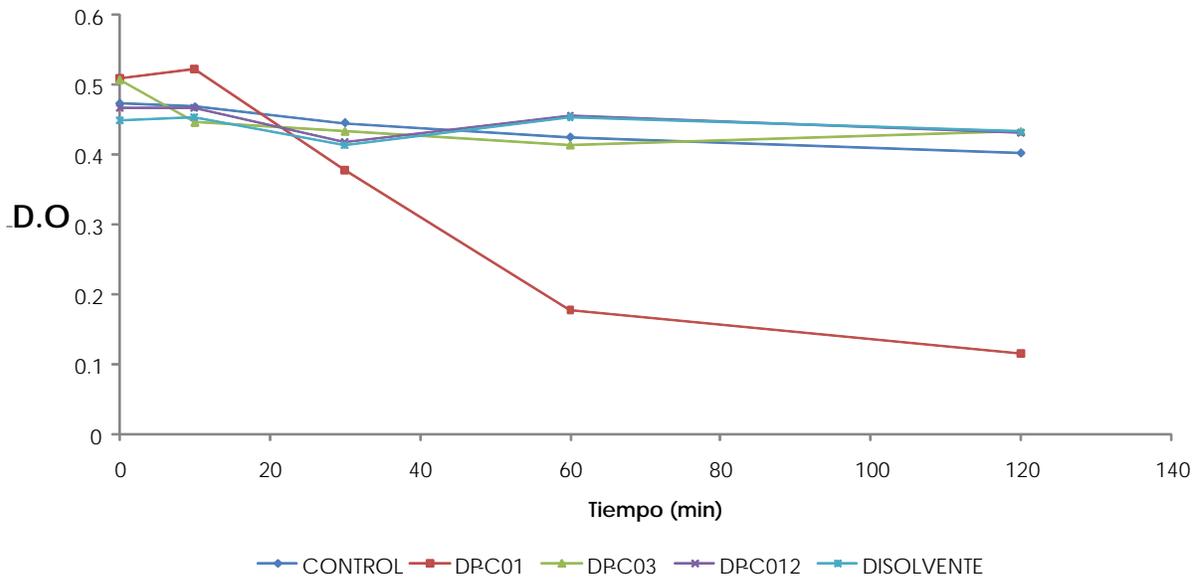
**Cuadro 9.** CMI de los compuestos aislados sobre las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Compuesto	CMI (mM) <i>S. mutans</i>	CMI (mM) <i>P. gingivalis</i>
DP-C01	0.115	0.087
DP-C03	1.43	0.956
DP-C012	0.148	0.083
CHX <sup>a</sup>	0.001	0.0003

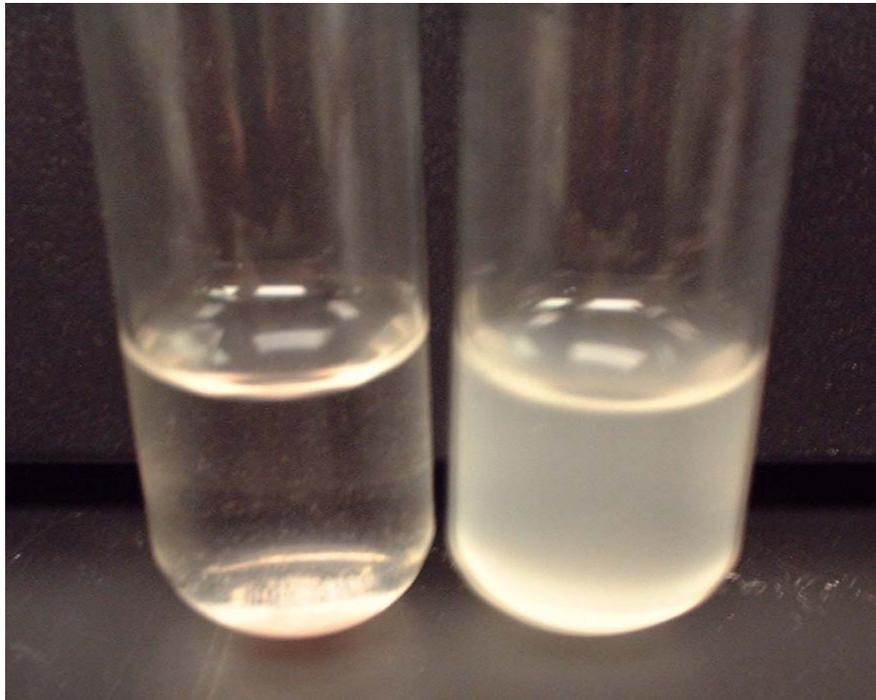
<sup>a</sup>CHX: gluconato de clorhexidina

#### 5.4.1 Efecto de los compuestos aislados sobre la agregación de *S. mutans*.

Para obtener mayor información acerca de los efectos de los compuestos aislados sobre la agregación de bacterias se decidió medir su efecto sobre la formación de agregados por parte de *S. mutans*. Los resultados de este experimento indican que solo el ácido ursólico presentó un efecto positivo sobre la agregación de *S. mutans*. En la gráfica 1 se observa que el ácido ursólico induce una agregación dependiente del tiempo con un efecto máximo a los 120 min lo cual es de gran importancia debido a que una bacteria que se agrega ya no puede formar una bioplaca en la Figura 11 se ilustra el efecto del ácido ursólico sobre un cultivo de *S. mutans*.



**Grafica 1.** Efecto de los compuestos aislados de *P. domestica* sobre la agregación de *S. mutans*



A

B

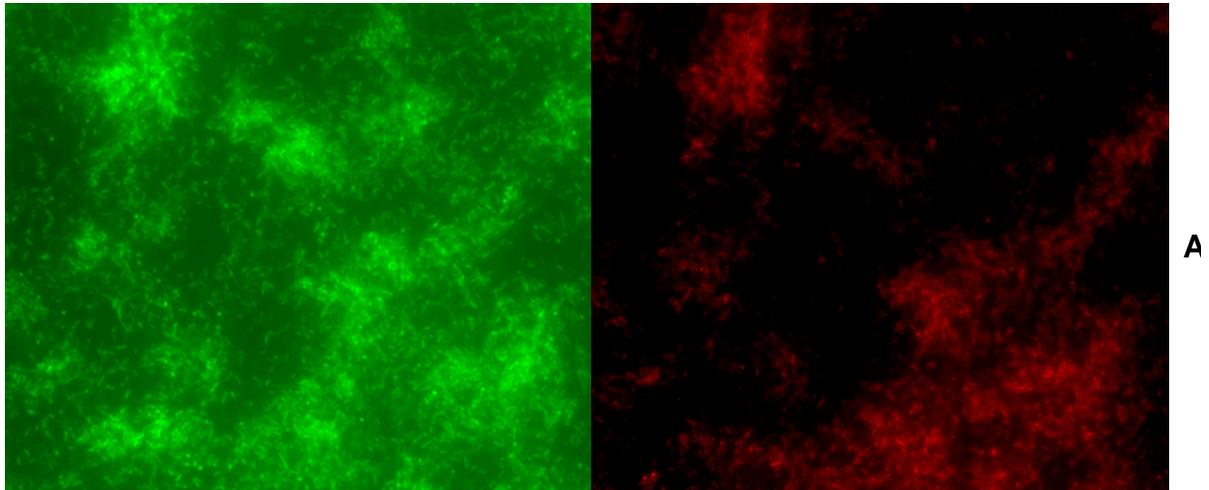
**Figura 11.** Efecto del tratamiento con ácido ursólico a 37°C durante 60 minutos. (A) cultivo tratado y (B) control (PBS).

#### **5.4.2. Efecto del ácido ursólico sobre la formación bioplacas monoespecie por parte de *S. mutans*.**

Con la finalidad de iniciar los estudios del efecto de los compuestos activos sobre la formación de una bioplaca monoespecie se decidió explorar el efecto de cada uno de los compuestos puros utilizando como especie blanco a *S. mutans*. El ácido ursólico fue el único compuesto que presentó un efecto inhibitorio sobre la formación de la bioplaca por parte de *S. mutans* a una concentración de 100.2 µg/mL. Este resultado es congruente con la inducción de la agregación de las bacterias planctónicas las cuales son necesarias para el inicio de la formación de las bioplacas.

#### **5.4.3. Desarrollo de la bioplaca multiespecies bajo condiciones anaeróbicas.**

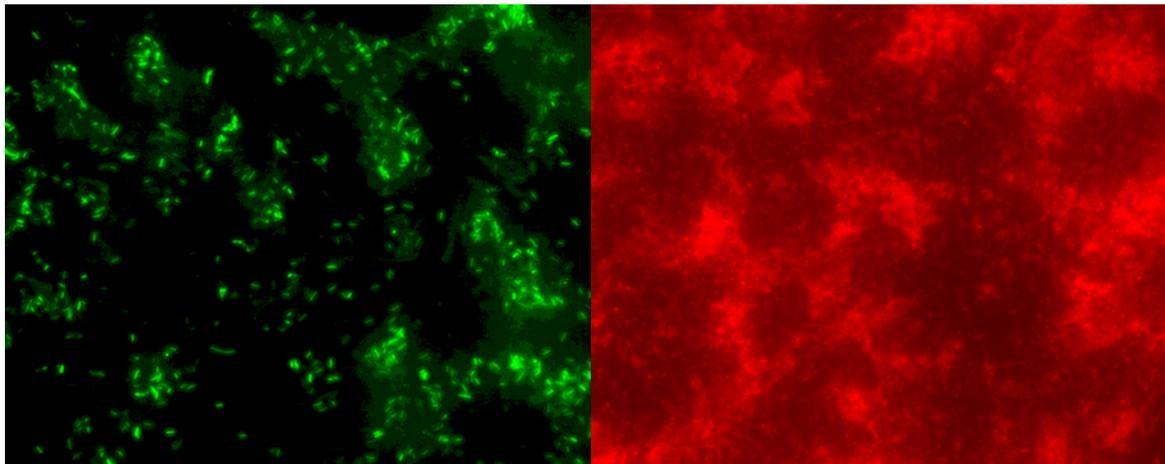
El potencial para inhibir la formación de la bioplaca multiespecies por parte del ácido ursólico se determinó utilizando tres especies de bacterias. Las especies que se utilizaron fueron *S. gordonii*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* y fueron elegidas por su rol en la agregación, colonización, patogenicidad y características morfológicas (Kolenbrander *et al.*, 2002,1990). Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto del ácido ursólico sobre la formación de la bioplaca multiespecie se muestran en la figura 12 y 13. Como se desprende de estos resultados el ácido ursólico inhibe la formación de la bioplaca formada por *S. gordonii*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*. La concentración de ácido ursólico utilizada fue 200 µg/mL. Las figuras 12 y 13 muestran la viabilidad de la bioplaca antes y después de la adición del ácido ursólico



**bacterias vivas**

**bacterias muertas**

**A**



**bacterias vivas**

**bacterias muertas**

**B**

**Figura 12.** **(A)** Bioplaca mutiespecies de *S. gordonii*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* desarrollado durante toda la noche anaeróbicamente en caldo Schaedler en condiciones anaeróbicas y de flujo antes del tratamiento con ácido ursólico (vivas/muertas = 4:1). **(B)** Bioplaca mutiespecies de *S. gordonii*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* después del tratamiento con ácido ursólico por 20 minutos (Vivas/muertas = 1:5).

#### 5.4.4. Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos aislados.

Con la finalidad de determinar el potencial citotóxico *in vitro* de los compuestos aislados se sometieron al ensayo de citotoxicidad contra un panel de líneas celulares, como podemos observar en el cuadro 10 los compuestos aislados ácido ursólico (**DP-C01**), 5-(hidroximetil)-2-furfural (**DP-C03**), (3E)-4-[(5-hidroximetil)-2-furil]-but-3-en-2-ona (**DP-C012**) no presentaron un efecto citotóxico en las líneas celulares usadas en el ensayo.

**Cuadro 10.** Citotoxicidad del compuesto DP-C012.

muestra	Línea celular <sup>b</sup>			
	Lu1	LNCaP	MCF-7	HUVEC
Extracto diclorometano <sup>a</sup>	>20	>20	>20	>20
DP-CO1	>20	>20	>20	>20
DP-CO12	>20	>20	>20	>20
DP-CO3	>20	>20	>20	>20
Paclitaxel <sup>c</sup>	>20	>20	0.4	>20
Camptotecina <sup>c</sup>	>20	>20	>20	>20

- a) Los resultados se expresan como CE<sub>50</sub> y los valores se encuentran en nM  
b) Clave para las líneas utilizadas: Lu1, cáncer de pulmón humano; LNCaP, cáncer de próstata humano dependiente de hormonas; MCF-7, cáncer de mama humano; HUVEC, células de la vena del cordón umbilical humano.  
c) Controles positivos

## 6. Conclusiones

La información científica que se generó en esta investigación representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie *Prunus domestica*.

El efecto antibacteriano que presenta el extracto íntegro preparado a partir de las ciruelas pasa y el uso de la especie para el tratamiento de infecciones y como conservador sustentan, de manera preliminar y parcial, la eficiencia de la especie en las prácticas médicas populares.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto preparado a partir de los frutos secos de *Prunus domestica* permitió establecer los compuestos antibacterianos de la especie. De acuerdo con la potencia mostrada por los constituyentes aislados de las fracciones activas se concluyó que el ácido ursólico, 5-(hidroximetil)-2-furfural y la (3E)-4-[(5-(hidroximetil)-2-furil)-but-3-en-2-ona constituyen los compuestos con actividad antimicrobiana sobre *S. mutans* y *P. gingivalis*. La actividad de los compuestos fue menor a la observada para el control positivo clorhexidina. La evidencia experimental obtenida en la presente investigación permite sugerir que el ácido ursólico además de su efecto antibacteriano promueve la agregación de *S. mutans*. Este efecto se encuentra relacionado directamente con la formación de las bioplacas ya que para que las bacterias puedan formar una bioplaca necesitan estar en su forma libre.

La presencia del (3E)-4-[(5-(hidroximetil)-2-furil)-but-3-en-2-ona constituye una aportación original al conocimiento de la química del género, ya que la presencia de este compuesto no tiene precedente. Previamente este compuesto ha sido

descrito en sólo una ocasión en la naturaleza y fue aislado por Don y colaboradores (2006) de la especie *Salvia miltiorrhiza*.

La presencia del ácido ursólico en las ciruelas pasa apoyan el uso para el tratamiento de las úlceras bucales. En este contexto, estudios previos reportan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Microsporium lenosum*, así como también, las bacterias y levaduras asociadas a la descomposición de los alimentos. Entre las propiedades quimiopreventivas del ácido ursólico están aquellas relacionadas a su capacidad para inducir apoptosis. Por otra parte, el compuesto es útil en la prevención del envejecimiento prematuro de la piel por la exposición a la radiación UV y es considerado un nuevo agente en el combate del cáncer de piel. Este triterpeno posee una amplia gama de actividades biológicas entre los que destacan: actividad antioxidante, hepatoprotectora, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, vasodilatadora, antihiperlipidémica, hipoglucemiante, y antiulcerosa.

El extracto y los compuestos aislados no presentaron una actividad citotóxica significativa sobre el panel de líneas celulares que se utilizaron.

## **7. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.**

Determinar el potencial antibacteriano de los frutos frescos de *P. serotina*.

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar los principios activos en el extracto íntegro.

Establecer un modelo *in vivo* para estudiar el efecto del ácido ursólico sobre la formación de la bioplaca.

Estudiar a detalle el mecanismo de acción mediante el cual ácido ursólico inhibe la formación de las diferentes bioplasmas.

Establecer el efecto que tienen los compuestos activos sobre la enzima glucosiltransferasa de *S. mutans* y sobre las proteasas de *P. gingivalis*.

## BIBLIOGRAFIA

- Aiyelaagbe, O. O., Adesogan, K., Ekundayo, O., Gloer, J. (2007). Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. *Phytochemistry*. Artículo en prensa. Disponible en [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- American Dietetic Association. (2003). Position of the American Dietetic Association: oral health and nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*. **103**, 615-625.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. (2001). De nuestra cosecha. Disponible en:  
<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revisas/100/ca100.pdf>
- Bardón, A., Borkosky, S., Ybarra, M. I., Montanaro, S., Cartagena, E. (2007). Bioactive plants from Argentina and Bolivia. *Fitoterapia*. **78**, 227-231.
- Basim, E., Basim, H., Ozcan, M. (2006). Antibacterial Activities of pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*. **77**, 992-996.
- Binkley, C., Furr, L. A., Carrico, R., McCurren, C. (2004). Survey of oral care practices in US intensive care units. *American Journal of Infection Control*. **32**, 161-169.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. Artículo en prensa. Disponible [www.Sciencedirect.com](http://www.Sciencedirect.com)

- Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1989). Biofilms. A Wiley-interscience publication. Estados Unidos de América. Capítulo 1
- Chun, O. K., Kim, D.O., Lee, C. Y. (2003). Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 8067-8072.
- Cipak, L., Grausova, L., Miadokova, E., Novotny, L., Rauko, P. (2006). Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Archives of Toxicology*. **80**, 429-435.
- California Dried plums. (2000). FDA Grants Name Change. CBP, Pleasanton C.A. Disponible en: <http://www.californiadriedplums.org>.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Reviews Nature Drug Discovery*. **1**, 895-910.
- Costerton, J. W. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal Bacteriology*. **176**, 2137-42.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**, 564-582.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drugs Discovery*. **2**, 114-122.
- Del Caro A., Piga, A., Pinna, I., Fenu, P. M., Agabbio, M. (2004). Effect of Drying Conditions and Storage Periodo n-Polyphenolic Content, Antioxidant Capacity, and Ascorbic Acid of Prunes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 4780-4784.

- Dikeman, C. L., Bauer, L. L., Fahey, G. C. (2004). Carbohydrate Composition of Selected Plum/Prune Preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 853-859.
- Don, M. J., Shen, C. C., Syu, W., Ding, Y., Sun, C. (2006). Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*. **67**, 497-503.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **2**, 167-93.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plant: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Microbiology*. **88**, 308-316.
- Doyle, M. J., Hunter-Rinderle, S. J., Glandorf, W. M., White, D. J. (2007). Promoting whole body health with topical oral compositions containing antimicrobials. U.S. Pat. Appl. Publ. 701848.
- Dreeszen, P. H. (2003). Biofilm. The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking water system. Edstrom Industries, Inc. Segunda Edición.
- Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S. (2007). Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *Journal Ethnopharmacology*. **112**, 590-594.
- Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Apel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., Kessler, R. C. (1998). Trends in alternative medicine use in the

United States, 1990-1997. Results of a follow-up national survey. *Journal of American Medicine Association*. **280**, 1569-1575.

- El-Emary, N. A., Khalifa, A. A., Backheet, E. Y., Abdel-Mageed, W. M. (2002). Phytochemical and biological studies on the leaves of *Tecoma mollis* Humb. And Bonpl cultivated in Egypt. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*. **25**, 207-228.
- Fang, N., Yu, S., Prior, R. L. (2002). LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 3579-3585.
- Filoche, S. K., Zhu, M., Wu, C. D. (2004). In situ Biofilm Formation by Multi-species Oral Bacteria Under Flowing and Anaerobic Conditions. *Journal of Dental Research*. **10**, 802-806.
- FUNCEI Fundación Centro Infecto-Biológicos. (2004). Buenos aires Argentina. <http://www.funcei.org.ar/contenido.aspx?idContenido=4>
- Genco, R. J. (1992). Host Responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of Periodontology*. **63**, 338-355.
- Gonzales, G. F., Valerio, L.G. (2006). Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. **6**, 429-44.
- Grabley, S., Thiericke, R. (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Advances in Biochemical engineering/Biotechnology*. **64**, 101-54.

- Groh, B., Bauer, H., Treutter, D. (1994). Chemotaxonomical investigations of *Prunus domestica* by isoenzyme markers and phenolic compounds. *Scientia Horticulturae*. **58**, 41-51.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Drugs Discovery*. **2**, 95-108.
- Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. **30**, 3864-3874.
- Hollister, M. C., Weintraub, J. A. (1993). The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *Journal of Dental Education*. **57**, 901-912.
- Hughes, C .V., Roseberry, C. A., Kolenbrander, P. E. (1990). Isolation and characterization of coaggregation-defective mutants of *Veillonella atypical*. *Archives of Oral Biology*. **35**, S123-S125.
- Instituto Nacional Indigenista. (1994). Atlas de la medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. 1099-1100.
- Kim, D., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y. (2003). Quantification of Polyphenolics and their Antioxidant Capacity in Fresh Plum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 6509-6515.
- Kinghorn, A. D. (1992). Plants as a source of medicinally and pharmaceutically important compounds. In *Phytochemical Resource for Medicine and Agriculture*, Nigg, H. N., Seigler, D. Eds. Plenum Press, New York, 75-95.

- Kinghorn, A. D., Balandrin, M. F. (eds.) (1993). Human Medicinal Agents from Plants, Symp. Ser. No. 534, *American Chemical Society*, Washington, D. C.
- Kinghorn, A. D., Fullas, F., Hussain, R. A. (1995). Structure-activity relationship of highly sweet natural products. *Studies in Natural Product Chemistry*. **15**,3-41.
- Kirkpatrick, W. R., Revankar, S. G., McAtee, R. K. (1998). Detection of *Candida dubliniensis* oropharyngeal samples from HIV infected patients in North America by primary CHRO Magar Candida screening and susceptibility testing of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**, 3007-3012.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., Cury, J. A. (2000). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. **45**, 141-148.
- Lamont, R., Jenkinson, H. F., (1998). Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**, 1244-1263.
- Liébana, U. J. (2002). Microbiología oral. Mc Graw-Hill-Interamericana, España. 297-525.
- Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Jornual of Ethnopharmacology*. **92**, 281-289.

- Lin-Shiau, S. Y., Lo, A. H., Ho, C. T., Lin, J. K. (2003). Induction of apoptosis by rosemary polyphenols in HL-60 cells. *American Chemical Society*. **59**, 121-141.
- Loesche, W. (2007). Dental Caries and Periodontitis: Contrasting two Infections That Have Medical Implications. *Infectious Disease Clinics of North America*. **21**, 471-502.
- Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Capelloni, M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 90-94.
- Lopez.Piriz, R., Aguilar, L., Gimenez, M. J. (2007). Management of odontogenic infection of pulpar and periodontal origin. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. **12**, 154-159.
- MacLennan, A. H., Wilson, D. H., Taylor, A. W. (1996). Prevalence and cost of Alternative medicine in Australia. *Lancet*. **347**, 569-573.
- Mahady, G. B. (1998). Herbal medicine and Pharmacy education. *Journal American Pharmaceutical Association*. **38**, 274.
- Mahady, G. B. (2001). Global harmonization of herbal health claims. Part 1. *Journal of Nutrition*. **131**, 112S-1123S.
- Mahato, S. B., Kundu, A. P. (1994). <sup>13</sup>CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575.

- Mankani, K. L., Krishna, V., Manjunatha, B. K., Vidya, S. M., Singh, S. D. Jagadeesh., Manohara, Y. N., Kuppast, I. J. (2006). Hepatoprotective effects of the triterpenes isolated from the stem bark of *Diospyros cordifolia* Roxb. *Journal of Natural Remedies*. **6**, 147-152.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.186-187.
- Mayrand, D., Grenier, D. (1998). Bacterial interactions in periodontal diseases. *Bulletin de L' Institut Pasteur*. **96**, 125-133.
- Millar, W. J. (1997). Use of alternative Health care practitioners by Canadians. *Canadian Journal of Public Health*. **88**, 154-158.
- Moynihan, P. J. (2004). Papel de la dieta y la nutrición en la etiología y la prevención de las enfermedades bucodentales. Organización Mundial de la Salud. Boletín informativo.
- Nagarajan, G. R., Seshadri, T. R. (1964). Flavonoid Components of the Heartwood of *Prunus domestica* Linn. *Phytochemistry*. **3**, 477-484.
- Najjaa, H., Neffati, M., Zouari, S., Ammar, E. (2007). Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species. Artículo en prensa. Disponible [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of Plant Extracts and Phytochemicals on antibiotic-Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. **31**, 247-256.

- Nergiz, C., Yildiz, H. (1997). Research on chemical composition of some varieties of European plums (*Prunus domestica*) adapted to the Aegean District of Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**, 2820-2823.
- Organización Mundial de la Salud. (1999). Informe sobre enfermedades infecciosas.. [www.who.int/infectious-disease-report/idr99-panish/pages/textonly.html](http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-panish/pages/textonly.html).
- Organización Mundial de la Salud. (2007). Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales.
- Osawa, K., Miyasaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., y Ooshima, T. (2001). Identification of cariostatic substances in the Cacao Bean Husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *Journal of Dental Research*. **80**, 2000-2004.
- Palma, M., Taylor, L. T. (2001). Supercritical Fluid Extraction of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde from Raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**, 628-632.
- Parmar, V. S., Vardhan, A., Nagarajan, G. R., Jain, R. (1992). Dihydroflavonols from *Prunus domestica*. *Phytochemistry*. **31**, 2185-2186.
- Petersen, P. J., Wang, T. Z., Dushin, R. G., Bradford, P. A. (2004). Comparative *in vitro* activities of AC98-6446, a novel semi synthetic glycopeptide derivative of the natural product mannopeptimyci, and other antimicrobial agents against Gram-positive clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**, 739-746.

- Phan, T. N., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J. D., Marquis, R. E. (2004). Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiology and Immunology*. **1**, 31-38.
- Piera, S.G. (2003). Estudio del biofilm Formación y Consecuencias. Escola de Prevençió Seguretat Integral.
- Piga, A., Del caro, A., Corda, G. (2003). From Plums to: Influence of Drying Parameters on Polyphenols and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 3675-3681.
- Portal de la Secretaria de Salud.[http://portal .salud.gob.mx](http://portal.salud.gob.mx)
- Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., Steenberghe, D. (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology*. **20**, 72-90.
- Radcliffe, C. E., Akram, N. C., Hurrell, F., Drucker, D. B. (2002). Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*. **30**, 325-331.
- Reichart, P. A. (2003). Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections and sarcoma. *Medical Microbiology and Immunology*. **192**, 165-169.
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*. **11**, 94-100.

- Ríos, J. L., Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Jornual Ethnopharmacology*. **100**, 80-84.
- Saravanan, R., Viswanathan, P., Pugalendi, K. V. (2006). Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sciences*. **78**, 713-718.
- Scannapieco, F. A. (2004). Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease?. *Compendium Continuing Education in Dentistry*. **25**, 16-25.
- Socransky, S. S, Haffajee A. D. (2003). Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol*. **3**, 12-55.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I., y Farnsworth, N. R. (2001). Chemical Composition and Potential health effects of Prunes: A Functional Food?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **41**, 251-286.
- Steenkamp, V., Fernandes, A. C., Van Rensburg, C. E J. (2007). *Fitoterapia*. Artículo en prensa. Disponible [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E. I. (2005). Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **25**, 247-251.
- World Health Organization-Traditional Medicine. (1998).Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. WHO, Geneva, Switzerland. **1**, 5-10.

- Wu, C. D.; Wei, G. X. (2002). Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*. **18**, 443-444.
- Yamanaka, A. (2004). Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Shika Gakuho*. **104**, 115-119.
- Zomlefer, W. B. (1994). Guía de las familias de las plantas con flor, ACRIBIA, S.A. Madrid. España.168-174.
- 
-