



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE LAS HOJAS DEL
NÍSPERO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

GARCÍA FIGUEROA MEJÍA GLORIA NIZAGIE



México D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

- PRESIDENTE:** Dr. Arturo Navarro Ocaña
- VOCAL:** M. en C. José Alberto Rivera Chávez
- SECRETARIO:** Dr. José Fausto Rivero Cruz
- 1er. SUPLENTE:** Dra. Mabel Clara Fragoso
- 2° SUPLENTE:** M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

García Figueroa Mejía Gloria Nizagie



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella y en especial, a la Facultad de Química por ayudarme en mi formación como profesionista.

A mi asesor, el Dr. Fausto Rivero Cruz, por su dirección y apoyo en el presente trabajo.

A los miembros del jurado, el Dr. Arturo Navarro Ocaña y el M. en C. José Alberto Rivera Chávez por sus valiosas correcciones a este trabajo de investigación.

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

Al proyecto DGAPA-UNAM 205709 por el apoyo financiero, para la realización de este proyecto.



i	Lista de abreviaturas
ii	Lista de tablas
ii	Lista de diagramas
iii	Lista de figuras
1	1. INTRODUCCIÓN
5	2. ANTECEDENTES
5	2.1 Enfermedades infecciosas
5	2.2 Caries dental
5	2.2.1 Microorganismos de la cavidad oral
6	2.3 Biopelículas
9	2.3.1 Ciclo vital de las biopelículas
11	2.3.2 Estructura de la biopelículas
13	2.3.3 Mecanismos de resistencia de la biopelículas
15	2.3.4 Resistencia de las biopelículas
15	2.3.4.1 Resistencia adquirida
16	2.3.4.2 Resistencia intrínseca
16	2.4 Antecedentes de <i>Streptococcus mutans</i>
16	2.4.1 Características estructurales
16	2.4.2 Metabolismo de la sacarosa
18	2.5 Antecedentes del níspero
18	2.5.1 <i>Eriobotrya japonica</i>
18	2.5.2 Sinonimia botánica
18	2.5.3 Clasificación científica de <i>Eriobotrya japonica</i>
19	2.5.4 Características botánicas y ecológicas
20	2.5.4.1 Descripción del árbol del níspero
21	2.5.4.2 Hojas
21	2.5.4.3 Raíz
21	2.5.4.4 Tronco
22	2.5.4.5 Flor
22	2.5.4.6 Fruto
23	2.5.5 Fenología
23	2.5.6 Características agro-climáticas
23	2.5.6.1 Clima
24	2.5.6.2 Suelo
24	2.5.6.3 Agua
24	2.5.7 Importancia económica del cultivo



24	2.5.8 Distribución geográfica
25	2.5.9 Historia del níspero
26	2.5.10 Usos de <i>Eriobotrya japonica</i>
26	2.5.10.1 Etnobotánica
27	2.5.10.2 Usos no medicinales
28	2.5.11 Composición química de <i>Eriobotrya japonica</i>
37	2.5.12 Farmacología
38	2.5.14 Toxicidad
39	3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
41	4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
41	4.1 Procedimientos generales
41	4.1.1 Análisis cromatográfico
41	4.1.2 Determinación de las constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas
42	4.2 Material vegetal
42	4.2.1 Recolección de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i>
42	4.3 Ensayo Biológico
42	4.3.1 Microorganismos de prueba
43	4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
44	4.4 Estudio fitoquímico de <i>Eriobotrya japonica</i>
44	4.4.1 Proceso de extracción
44	4.4.2 Fraccionamiento primario
46	4.4.3 Fraccionamiento secundario
48	4.4.4 Obtención y purificación de los triterpenoides a partir de las fracciones F002-VI y F002-X
48	4.4.4.1 Obtención de la mezcla ácido ursólico y oleanólico (F002-VI)
52	4.4.4.2 Obtención del ácido corosólico (F002-X)
55	4.5 El efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento de la bacteria <i>S. mutans</i>
56	5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
60	6. RESUMEN Y CONCLUSIONES
61	7. PERSPECTIVAS
62	8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

Lista de Abreviaturas

A continuación se presenta una lista con las abreviaturas que aparecen durante la redacción de este trabajo.

Abreviaturas	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
AC	Ácido corosólico
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
BHI	Infusión de cerebro-corazón
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Cm	Centímetros
CHX	Clorhexidina
EPS	Matriz de exopolisacáridos
eV	Electro volts
Exto.	Extracto
G	Gramos
H	Hora
Hz	Hertz
MeOH	Metanol
Nm	Nanómetros
Mg	Miligramo
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ppm	Partes por millón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbón 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
TPA	Promotor de tumores en la piel
UFC	Unidad Formadora de Colonias
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación

Lista de Tablas

- | | |
|-------|--|
| 18 | Tabla 1. Clasificación científica de <i>Eriobotrya japonica</i> (Instituto de Ciencias Naturales, 2011) |
| 29-36 | Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero |
| 43 | Tabla 3. Controles del ensayo biológico |
| 44 | Tabla 4. Cantidad obtenida del extracto metanólico |
| 45 | Tabla 5. Cantidad obtenida en el fraccionamiento primario |
| 46 | Tabla 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F002 |
| 57 | Tabla 7. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) del extracto y las fracciones de <i>E. japonica</i> para <i>S. mutans</i> |

Lista de Diagramas

- | | |
|----|--|
| 45 | Diagrama 1. Fraccionamiento primario |
| 47 | Diagrama 2. Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto metanólico del níspero |

Lista de Figuras

- 8 **Figura 1.** Modelo espacio-temporal de la colonización bacteriana bucal que ilustra la forma en que las bacterias colonizadoras iniciales reconocen los receptores de la película salival y las coagregaciones entre colonizadores iniciales, fusobacterias y colonizadores tardíos de la superficie dentaria (Kolenbrander, *et al.*, 2002)
- 11 **Figura 2.** Etapas en la formación del biopelícula. Adaptado de Svensalery Bergenholtz, 2004
- 19 **Figura 3.** *Eriobotrya japonica* A: rama con frutos jóvenes. B: detalle de indumento de la cara inferior de la hoja. C: rama florífera. D: flor vista de arriba. E: flor en vista lateral. F: frutos (Delucchi *et al.*, 2010)
- 20 **Figura 4.** Árbol de *Eriobotrya japonica*
- 21 **Figura 5.** Hojas de *Eriobotrya japonica*
- 22 **Figura 6.** Flores blancas de *Eriobotrya japonica*
- 23 **Figura 7.** Frutos de *Eriobotrya japonica*
- 25 **Figura 8.** Usos registrados de *Eriobotrya japonica* en México
- 42 **Figura 9.** Hojas de *E. japonica* recolectadas
- 48 **Figura 10.** Estructura química del ácido oleanólico y del ácido ursólico
- 49 **Figura 11.** Espectro de masas de la mezcla ácido ursólico y oleanólico
- 50 **Figura 12.** Espectro de RMN-¹H de la mezcla ácido ursólico y oleanólico (400 MHz, Piridina-*d*₅)
- 51 **Figura 13.** Espectro de RMN-¹³C de la mezcla de ácido ursólico y oleanólico (400 MHz, Piridina-*d*₅)
- 52 **Figura 14.** Estructura química del ácido corosólico
- 53 **Figura 15.** Espectro de RMN-¹H del ácido corosólico (400 MHz, Piridina-*d*₅)
- 54 **Figura 16.** Espectro de RMN-¹³C del ácido corosólico (400 MHz, Piridina-*d*₅)



1. INTRODUCCIÓN

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte la ha encontrado en la naturaleza, en muchos casos, asociado con aspectos mágico-religiosos. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la física y la medicina (Cortez *et al.*, 2004).

La medicina tradicional se ha utilizado desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud a nivel de la comunidad (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011).

El descubrimiento del Continente Americano facilitó la fusión de diversas culturas, así como el enriquecimiento de los conocimientos médicos que los colonizadores poseían. Los conocimientos propios de los europeos fueron enormemente reforzados por los chamanes indígenas que les transmitieron vastos conocimientos respecto al empleo terapéutico de las plantas, animales y minerales del Continente Americano, los cuales eran ya preparados en forma de infusiones, cocimientos, emplastos, ungüentos y aceites, que favorecían la aplicación de los recursos naturales para padecimientos particulares de aquella época (Cortez *et al.*, 2004).

En México el uso de plantas medicinales está ligado al desarrollo de las culturas prehispánicas, donde su comercialización fue de gran importancia (Legorreta-Arellano, 1989), además la conquista permitió que la mayor parte de los conocimientos herbolarios de los indígenas fueran documentados en códices (Pérez-Tamayo, 1997). En las crónicas de la Nueva España, se relata el uso y comercialización de raíces y hierbas medicinales (Rodríguez, 1975).

De los principales legados sobre herbolaria y medicina de las culturas mesoamericanas tenemos aquellos que se realizaron a la llegada de los franciscanos a la Nueva España (1529). Entre ellos destaca Fray Bernardino de



Sahagún quien se estableció en el Colegio Imperial de Santa Cruz de Tlatelolco, que fue la primera casa de estudios superiores fundada en el México antiguo (1536). Con respecto a los aztecas, Sahagún fue comisionado en 1557 para recopilar datos acerca de los indígenas, de quienes recaba información en su idioma original, el náhuatl. Su trabajo conocido como *Códice Florentino*, en náhuatl, y su versión en español como *Historia General de las cosas de la Nueva España* (De Sahagún, 1982), es un trabajo pionero de la etnografía Azteca en la que describe los nombres, los usos de múltiples plantas medicinales y materiales de origen animal utilizados por los indígenas para el tratamiento de diversas enfermedades. De entre esas plantas destacan también las que poseen efectos psicotrópicos (Murillo *et al.*, 1984; Díaz, 1994; Lozaya-Legorreta, 1994). Por otro lado, Martín de la Cruz, un curandero indígena, describe los métodos curativos conocidos por él, los cuales se basan en el uso de plantas, derivados de animales y algunos minerales. Como resultado, en 1552 aparece un códice en latín llamado *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, cuya importancia no sólo radica en el vasto conocimiento herbolario, sino en su contenido artístico al estar ilustrado con dibujos de plantas medicinales a color (mediante pigmentos vegetales y animales), sus nombres en náhuatl, la descripción de sus efectos y su aplicación. La versión en latín fue hecha por Juan Badiano, con cuyo nombre se conoce en la actualidad a dicho códice (Cortez *et al.*, 2004).

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar; un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Argueta *et al.*, 1994; 2009). Una de las fuentes más antiguas del origen de medicamentos, indiscutiblemente son las especies vegetales. Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina que han existido por cientos de años. Estos sistemas continúan desarrollando actualmente un papel esencial en la salud (Paolini *et al.*, 1998); la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que, aproximadamente el 80 % de los habitantes a nivel



mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Laza *et al.*, 2003).

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un reto científico de aplicación inmediata en la medicina. Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios; de éstos, un porcentaje importante posee cierta actividad contra microorganismos (Domingo *et al.*, 2003).

Unas de las enfermedades microbianas más comunes son las de la cavidad oral, las cuales se incrementan por ciertos factores de riesgo, entre los que destacan aquellos relacionados con las principales enfermedades crónicas como son las cardiovasculares, cáncer, afecciones respiratorias crónicas, VIH y diabetes. Además de otros factores como una dieta alta en carbohidratos, uso de tabaco y consumo de bebidas alcohólicas. Y de manera muy importante, la falta de higiene bucodental (OMS, 2007).

La caries dental, aunque no se considera un peligro para la vida (Burnett, 1990), es producto de una serie de cambios originados por bacterias específicas, entre ellas *Streptococcus mutans* como principal agente etiológico (Balakrishnan *et al.*, 2000), presente en la biopelícula de la placa bacteriana supragingival, dichas bacterias mediante sus factores de virulencia son capaces de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad en los tejidos duros del diente, debido al desequilibrio iónico en el proceso de mineralización y desmineralización, resultante del metabolismo de carbohidratos (Guilarte, 2001), la caries todavía es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, debido a que afecta la calidad de vida de quienes la padecen (Infirris *et al.*, 1980).

Por ello, es fundamental la búsqueda de tratamientos alternos para enfermedades infectocontagiosas. El níspero es conocido en la medicina tradicional como un remedio para tratar enfermedades infecciosas de la cavidad oral y se considera



como una excelente alternativa en lugar de los antibióticos y preparados que se utilizan como tratamiento para las enfermedades infecciosas. Las hojas del níspero no son tóxicas y posee propiedades antiinflamatorias, antiviral, antihipercolesterolemica, antibióticas, antioxidante y dermatológicas, entre otras.

Es importante destacar que gran parte de la población indígena y de escasos recursos en nuestro país recurren al uso de la medicina tradicional (Lozoya, 1999). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la composición química de muchas especies. Por lo tanto, es necesario desarrollar investigaciones conducentes a determinar la composición química y las posibles actividades de las plantas medicinales utilizadas por la población mexicana.



2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades infecciosas

Una enfermedad puede ser definida como una función anormal de alguna estructura o sistema dentro del cuerpo. El término infeccioso se refiere al hecho de que la enfermedad infecciosa es causada por microorganismos patógenos que penetran en un organismo y pueden auto reproducirse y multiplicarse hasta un número considerable (OMS, 2007).

2.2 Caries dental

Según la OMS, la caries dental se puede definir como proceso patológico localizado, de origen externo, que se inicia tras la erupción dentaria y que determina un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad (OMS, 1987).

Las lesiones cariosas se inician por la desmineralización de la superficie externa del esmalte debido a los ácidos orgánicos producidos localmente por las bacterias que fermentan los carbohidratos de la dieta. Con la pérdida progresiva del mineral de los dientes y la destrucción secundaria de la proteína del diente por la acción bacteriana se forman cavidades. Si este proceso continúa y no es atendido se destruye la mayor parte del diente, conduciendo con frecuencia a infecciones de la pulpa del diente e infecciones de los tejidos circundantes (Burnett, 1990).

2.2.1 Microorganismos de la cavidad oral

La cavidad oral es uno de los sitios anatómicos más densamente poblados por bacterias, hongos y levaduras; se han aislado alrededor de 500 especies diferentes de microorganismos, de las cuales al menos el 70% corresponden a bacterias y este número continúa incrementándose debido a los avances tecnológicos recientes.



Estos microorganismos colonizan las superficies orales, en donde forman consorcios microbianos conocidos como biopelículas. Dentro de los microorganismos que forman estos consorcios en la cavidad oral, *Streptococcus mutans* ha sido reconocido como el patógeno responsable de la caries dental. Sin embargo, *S. mutans* no siempre comprenden la porción mayoritaria de la microflora inicial en las lesiones y enfermedades bucales, pero su número se incrementa considerablemente conforme las enfermedades progresan. Las enfermedades orales como la caries dental y mal olor bucal comienzan siempre en la interfase entre el ecosistema microbiano y el tejido del hospedero, en casos graves estas infecciones orales pueden producir infecciones en órganos adyacentes como enfermedades del aparato respiratorio (Takahashi, 2005).

2.3 Biopelículas

La placa dental es el término comúnmente utilizado para la formación de la biopelícula en los dientes. Consiste en una tendencia natural de los microorganismos a adherirse a superficies bióticas y abióticas para multiplicarse y sumergirse en una matriz viscosa extracelular (Jass *et al.*, 2003).

En una boca saludable, la superficie disponible para la colonización es el esmalte, un tejido duro y altamente calcificado. El esmalte de los dientes segundos después de limpiarlos se cubre con una película formada por las moléculas presentes en la saliva las cuales se unen selectivamente a la superficie del diente; por ejemplo proteínas ricas en prolina, histatina y estaterina las cuales actúan promoviendo la adherencia de algunas bacterias importantes (*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Propionibacterium acnes*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella loescheii*, *Veillonella atypica*, *Eikenella corrodens*, *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Actinomyces israelii*, *Prevotella denticola*, *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* y algunos microorganismos anaerobios pigmentados de negro). Una vez que las bacterias libres flotantes se adhieren a la superficie éstas emiten señales químicas para coordinar la



diferenciación y formación de la biopelícula (Figura 1), incluyendo la síntesis de una cubierta protectora de naturaleza polisacárida (Jass *et al.*, 2003).

En casi todos los casos, la biopelícula desempeña un papel fundamental en la supervivencia y la propagación de los microorganismos en el interior del huésped. Ello se debe a la proximidad física de otras células ya que favorece las interacciones sinérgicas incluso entre miembros de especies distintas, la transferencia horizontal de material genético entre microorganismos y la utilización conjunta de subproductos metabólicos. La matriz de exopolisacáridos (EPS) que opera a modo de escudo ofrece protección a las bacterias patógenas ante los cambios del entorno (humedad, temperatura y pH) y protección frente al sistema inmunitario de un huésped infectado o frente a depredadores. Las biopelículas destacan también por su resistencia a concentraciones extraordinariamente elevadas de antibióticos, que incluso a dosis menores, resultan letales para sus homólogos planctónicos (Harrison *et al.*, 2006).

Las bacterias en las diferentes zonas de la biopelícula experimentan diferentes microambientes y desarrollan diferentes propiedades fisiológicas, incluyendo la resistencia a los agentes antibacterianos. La reducción de la susceptibilidad a los antibacterianos por parte de las bacterias en las biopelícula, puede ser ocasionalmente extrema; se ha propuesto que es ocasionada por una variedad de factores, como la reducción drástica del oxígeno y los nutrientes dentro de la biopelícula; el acceso reducido de los antibacterianos a las células; las interacciones químicas entre los compuestos antibacterianos y los componentes orgánicos de la biopelícula, principalmente con la espesa matriz polimérica extracelular, y a la producción de enzimas degradativas/neutralizantes (Gilbert *et al.*, 2002; Davies, 2003; Simões *et al.*, 2009).

Las bacterias patógenas tienen la habilidad para liberar proteínas efectoras en las células hospederas con la finalidad de mimetizar, suprimir o modular las vías de señalización defensiva del hospedero, y para incrementar la adaptabilidad del patógeno. Por otro lado el hospedero, ha desarrollado mecanismos complejos



para reconocer a las bacterias patógenas. Las plantas reconocen distintas moléculas efectoras producidas por las bacterias patógenas, mientras que los animales reconocen patrones moleculares conservados, tales como aquellos derivados de los polisacáridos o los peptidoglicanos (Staskawicz *et al.*, 2001).

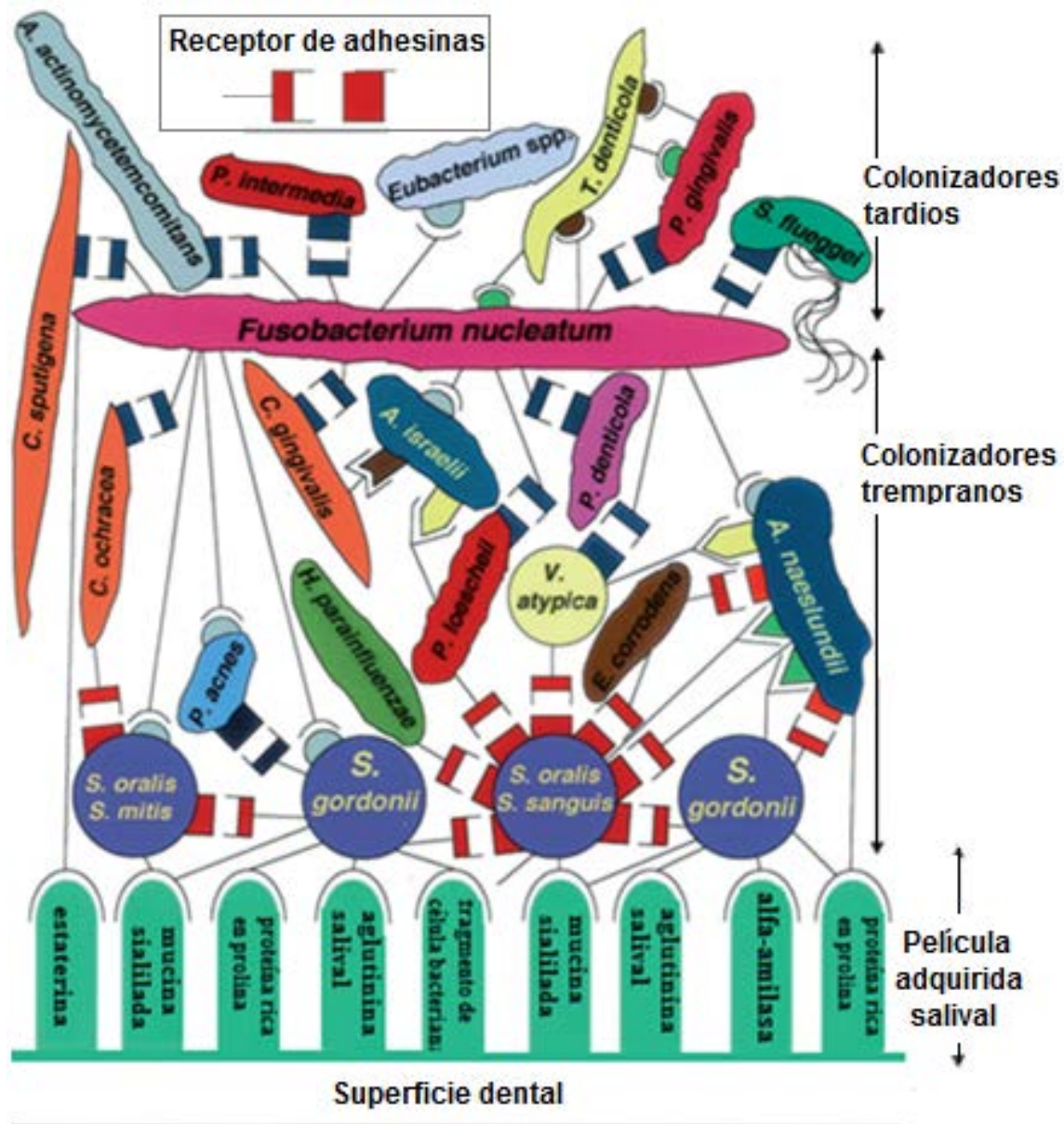


Figura 1. Modelo espacio-temporal de la colonización bacteriana bucal que ilustra la forma en que las bacterias colonizadoras iniciales reconocen los receptores de la película salival y las coagregaciones entre colonizadores iniciales, fusobacterias y colonizadores tardíos de la superficie dentaria (Kolenbrander, *et al.*, 2002).



2.3.1 Ciclo vital de las biopelículas

La biología de las biopelículas se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. El ciclo vital es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento (Figura 2).

Primera fase (adhesión, 0-4 horas). Inicialmente se lleva a cabo vía fuerzas fisicoquímicas entre la bacteria y la superficie del diente recubierta, incluyendo fuerzas atractivas de Van der Waals. En esta fase hay una alta hidrofobicidad de la superficie que puede facilitar la adhesión. Las bacterias una vez que perciben una superficie, proceden a formar una unión activa vía apéndices, como fimbrias, flagelos o pili (Nazar, 2007).

La motilidad otorgada por flagelos, ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no es un requisito esencial, puesto que las bacterias Gram positivas, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, son inmóviles y también poseen la capacidad de formar biopelículas (Nazar, 2007).

La adhesión firme resulta de interacciones entre las moléculas (adhesinas), sobre la superficie celular de los microorganismos y receptores en la película. La única bacteria detectada en esta etapa temprana son cocos o cocobacilos y siempre se encuentran localizados en las depresiones de la superficie del esmalte (Wilson *et al.*, 2003).

Se ha descrito que la colonización microbiana incrementa a medida que aumenta la aspereza de la superficie, debido a que el área de superficie es mayor.

Durante la **segunda fase (crecimiento, 4-24 horas)**, la bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. El número de bacterias comienza a incrementar rápidamente después de 8-12 horas y gradualmente forma una



monocapa sobre la superficie. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula, y éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional (Wilson *et al.*, 2003; Nazar, 2007).

Finalmente, la **tercera fase (desprendimiento)**, después que la biopelícula ha alcanzado la madurez algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación y desarrollo la biopelícula. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas a la biopelícula o de procesos activos inducidos por este.

Los tres mecanismos principales para generar desprendimiento son:

- Erosión o deslizamiento: remoción continua de pequeñas partes de la biopelícula.
- Separación: remoción rápida y masiva.
- Abrasión: liberación por colisión de partículas de líquido circundante de la biopelícula.

La separación es menos frecuente que la erosión y se piensa que resulta de depletar los nutrientes u oxígeno al interior de la biopelícula (Nazar, 2007).

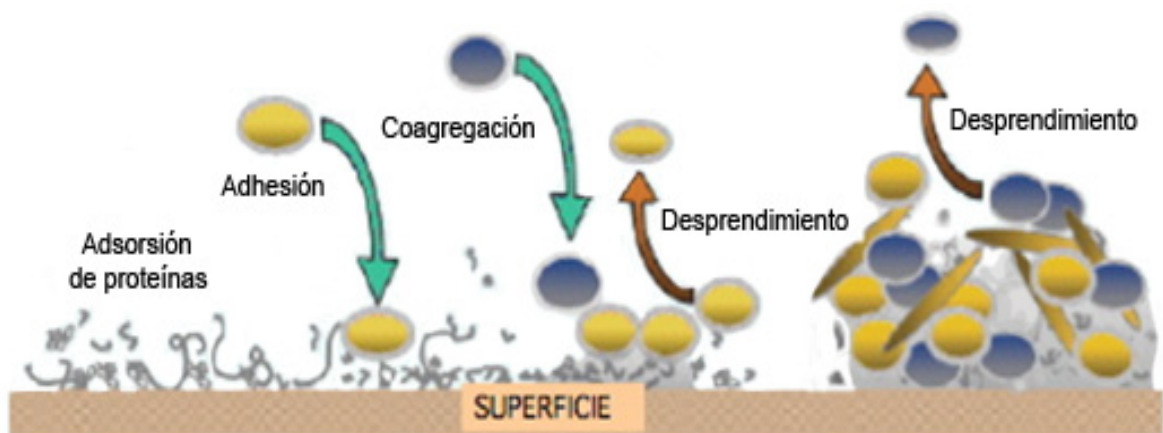
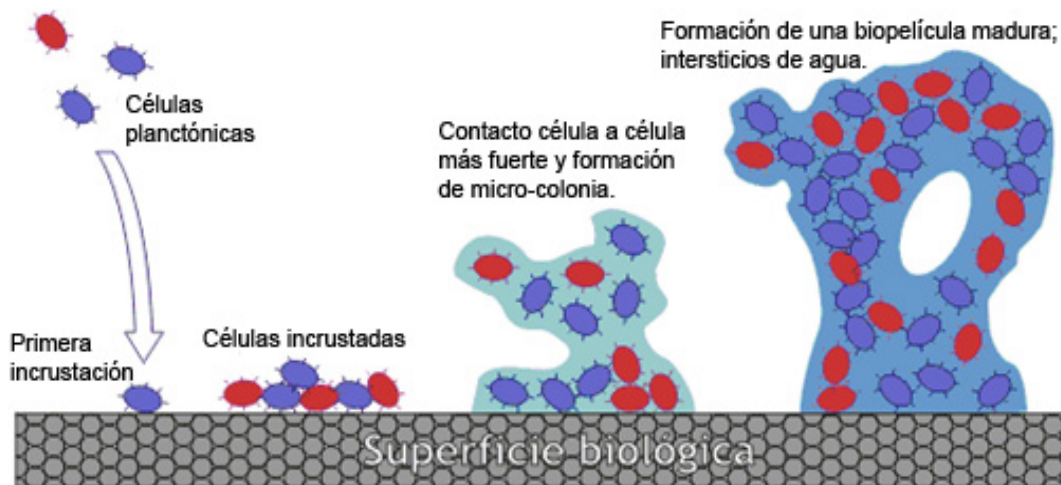


Figura 2. Etapas en la formación del biopelícula. Adaptado de Svensalery Bergenholtz, 2004.

2.3.2 Estructura de la biopelículas

La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este componente a representar hasta el 97% de ésta (Nazar, 2007). Además de agua y bacterias, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. En menor cantidad se



encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). En la matriz también pueden hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medioambiente en el cual se desarrolla la biopelícula (Figura 2).

Además, los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitiría interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Post *et al.*, 2004). La producción de EPS es influida por la calidad nutricional del medioambiente. Se ha observado que un incremento en la concentración de nutrientes está correlacionado con un aumento en el número de células bacterianas adheridas (Thomas *et al.*, 2006; Lasa *et al.*, 2011).

La arquitectura de la matriz no es sólida. Las bacterias viven en asociaciones celulares que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas. Estas asociaciones están compuestas por microcolonias de diferentes células bacterianas, tanto aerobias como anaerobias, englobadas por exopolisacáridos y separadas unas de otras por espacios intersticiales llamados canales de agua, que permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias ubicadas en su interior, incluso aquellas situadas en las zonas más profundas de la biopelícula.

Asimismo, constituyen un mecanismo para la remoción de productos de desecho metabólico (Nazar, 2007).



2.3.3 Mecanismos de resistencia de la biopelículas

Las biopelículas confieren estabilidad ambiental a las bacterias para crecer, además proporcionan protección a los cambios ambientales como: pH, deshidratación, salinidad, agentes antimicrobianos y fagocitosis.

Es difícil erradicar a las biopelículas dada su resistencia, definida como la habilidad de un microorganismo para crecer en presencia de una elevada concentración de antimicrobiano o un pequeño grupo de cepas, en las cuales la concentración mínima inhibitoria (CMI) se ha incrementado. En una biopelícula la susceptibilidad a los antibióticos puede disminuir de 10 a 1000 veces (Herrera, 2004).

Las biopelículas presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped. Las biopelículas, revestidas con SPE, conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las bacterias. La biopelícula provee una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del huésped, como opsonización, lisis por complemento, y fagocitosis (Post *et al.*, 2004); las biopelículas provocan respuestas inmunes celular y humoral, demostradas por la identificación de citoquinas liberadas por leucocitos expuestos a biopelículas. Sin embargo, debido a su aislamiento del entorno por la matriz y su reducido estado metabólico, esta respuesta sistémica es muy pequeña (Nazar, 2007).

Otra ventaja, extremadamente importante desde el punto de vista clínico, es que las biopelículas son muy resistentes a los antibióticos, siendo capaces de sobrevivir frente a concentraciones antibióticas miles de veces mayor respecto a las bacterias planctónicas.



Para intentar explicar esta resistencia se han planteado diversas hipótesis:

- Penetración lenta o incompleta del antibiótico en la biopelícula: Se debe a que la matriz de exopolisacáridos constituye una barrera que impide este ingreso. Si bien estudios *in vitro* muestran que algunos antibióticos logran ingresar con cierta facilidad, debido a que no existiría una barrera genérica a su difusión a través de la matriz, se postula que si el antibiótico logra ser desactivado en ésta por acción de polímeros extracelulares, puede tener tan sólo una difusión limitada dentro de la biopelícula (Post *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006).
- Causas metabólicas: Una baja actividad metabólica de las biopelículas por limitación de oxígeno y nutrientes puede causar que ingresen en un estado de lentificación o cese de su mitosis, especialmente aquéllas situadas más profundamente, con lo cual dejan de ser susceptibles a los antimicrobianos. Además, se ha descrito la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de biopelículas debido a consumo completo del oxígeno en las capas superficiales (Post *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006).
- Cambios genéticos: Se producen modificaciones en la fisiología de las bacterias y aparición de genes específicos, producto de cambios genéticos, que potenciarían mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. Según diversos investigadores, esta resistencia se debe principalmente a modificaciones fenotípicas en las biopelículas (Lasa *et al.*, 2011).
- Formación de esporas: Esta hipótesis plantea la posibilidad de génesis de una subpoblación de biopelículas con un estado fenotípico muy especial y altamente protegido. Este planteamiento es apoyado por investigaciones que muestran resistencia en biopelículas recientemente formadas, aún cuando estos son demasiado delgados para constituir una barrera a la penetración de agentes antimicrobianos (Nazar, 2007).

Es preciso tener presente que los antibióticos utilizados rutinariamente en clínica han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas. Lo



anterior debido a que los estudios de sensibilidad o antibiogramas que se realizan habitualmente están diseñados para medir la susceptibilidad de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no extrapolarse a esa misma bacteria cuando lo hace en el interior de la biopelícula.

Las mismas propiedades que hacen a las biopelículas resistentes a antibióticos y al sistema inmune, también las tornan difíciles de cultivar *in vitro*. Incluso, su estado metabólico dentro de la biopelículas puede imposibilitar por completo su cultivo (Post *et al.*, 2004; Lasa *et al.*, 2011).

2.3.4 Resistencia de las biopelículas

Los microorganismos poseen mecanismos de defensa que les permiten sobrevivir bajo condiciones adversas, resultando en cambios adquiridos mediante la mutación o la adquisición de genes de resistencia a partir de otros microorganismos; o bien, se vuelvan resistentes por cambios intrínsecos de las células (Fajardo *et al.*, 2008). Los genes de resistencia adquiridos pueden permitir a una bacteria sintetizar enzimas, capaces de inactivar compuestos antibacterianos, modificar el sitio blanco, desarrollar una ruta metabólica alternativa evitando la acción del producto antibacteriano y para expresar mecanismos de salida que no permiten la interacción de las sustancias antibacterianas con el sitio blanco intracelular (Webber *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2007).

2.3.4.1 Resistencia adquirida

La adquisición de nuevo material genético por parte de las bacterias susceptibles a los antibacterianos, a partir de aquellas contrapartes resistentes puede ocurrir a través de transferencia de genes, por conjugación, transformación o transducción (Tenover, 2006).



2.3.4.2 Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca a los antibacterianos es una propiedad natural de las bacterias. Se encuentra asociada con la impermeabilidad celular proporcionada por las capas externas, limitando así la toma de antibacterianos externos (Russell, 2001).

2.4 Antecedentes de *Streptococcus mutans*

2.4.1 Características estructurales

Poseen una capa mucosa en cuya composición siempre hay glucanos tanto solubles como insolubles, por lo que poseen glucosiltransferasas de alto y bajo peso molecular. Estas enzimas, localizadas en la membrana citoplasmática, emergen sobrepasando la pared celular e incluso se excretan al medio favoreciendo el fenómeno de agregación por afinidad con los compuestos que originan. Poseen una serie de polisacáridos en la pared celular que permiten, por su diferente composición, distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h. Es posible que estos polisacáridos igualmente intervengan en fenómenos de adhesión interbacteriana.

En su pared presentan proteínas frecuentemente antigénicas y también involucradas en diversos fenómenos: fijación de glucanos, adhesión a la película adquirida y adhesión interbacteriana por interacciones proteína-proteína o lectina-carbohidratos que a veces se ve favorecida por la saliva gracias a la mediación conjunta de cationes y glucoproteínas salivares (Liébana, 2002).

2.4.2 Metabolismo de la sacarosa

El tránsito de alimentos por la cavidad oral proporciona azúcares a las bacterias, éstas fermentan, generando energía, expulsando desechos metabólicos o acumulando productos de reserva como polisacáridos de glucosa más fructosa. Ante un exceso de sacarosa disponible, éstas lo utilizan para obtener energía y sintetizar polisacáridos de reserva tanto extra como intracelularmente. Con



respecto a los estreptococos tienen glucosiltransferasas, tanto las que producen glucanos insolubles como las que las generan glucanos solubles. La importancia de estos compuestos en la cavidad oral radica en que:

- Los glucanos insolubles forman parte de la matriz celular de las placas, además, son fundamentales en los fenómenos de adhesión a tejidos del hospedador y a bacterias.
- Los glucanos solubles y los fructanos son elementos de reserva nutricional.
- Factores metabólicos de cariogenicidad de los estreptococos de la especie *mutans*.
- Poder acidógeno: produce ácido láctico como producto final del metabolismo; esto hace que el pH baje y se desmineralice el esmalte dental.
- Poder acidófilo: son muy tolerantes a los ácidos.
- Poder acidúrico: siguen produciendo ácidos a pH bajos.
- Rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos.
- Pueden conseguir el pH crítico para la desmineralización del esmalte más rápidamente que cualquier otro microorganismo de la placa.
- Producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa y su movilización.
- Producción y movilización de polisacáridos intracelulares.
- Producción de dextranasas y fructanasas (reservas de energía) (Negroni, 2003; Browgardt *et al.*, 2004).



2.5 Antecedentes del níspero

2.5.1 *Eriobotrya japonica*

Su nombre científico deriva del griego *erion* que significa lana y *botrys* que quiere decir racimo, debido a que sus flores se presentan en forma de racimos lanuginosos (Aguilar *et al.*, 2008).

2.5.2 Sinonimia botánica

Photinia japonica Gray, *Mespicus japonicus* Thunb (Argueta *et al.*, 1994; 2009).

2.5.3 Clasificación científica de *Eriobotrya japonica*

Su clasificación científica se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Clasificación científica de *Eriobotrya japonica* (Instituto de Ciencias Naturales, 2011).

Nombre Científico	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Eriobotrya
Epíteto Específico	Japonica
Autor Epíteto Específico	Lindl



2.5.4 Características botánicas y ecológicas

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.), pertenece al orden *Rosales*, familia *Rosaceae*, subfamilia *Pomoideae*. En la Figura 3 se muestra una representación de las distintas partes de la planta.

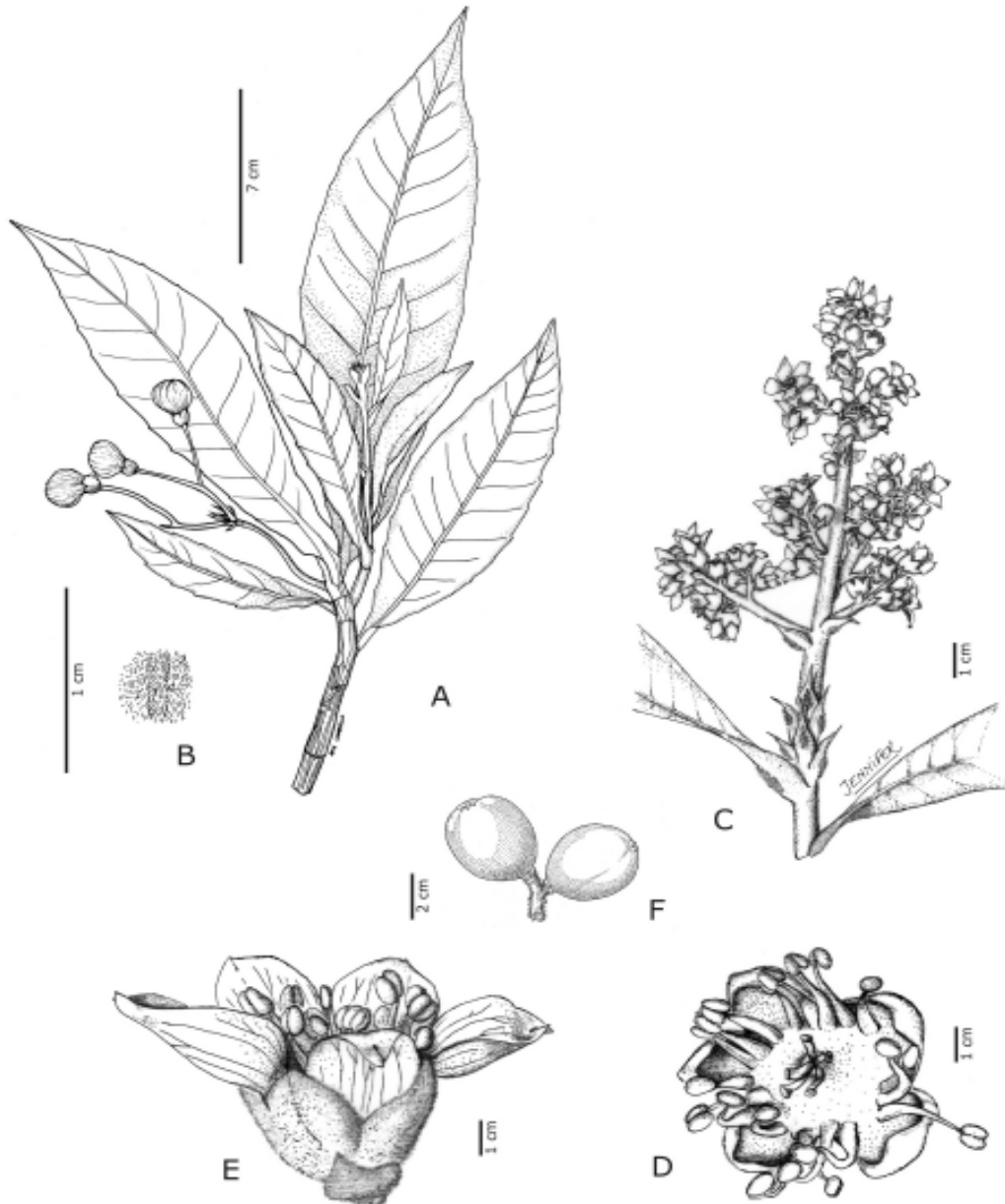


Figura 3. *Eriobotrya japonica* A: rama con frutos jóvenes. B: detalle de indumento de la cara inferior de la hoja. C: rama florífera. D: flor vista de arriba. E: flor en vista lateral. F: frutos (Delucchi *et al.*, 2010).



2.5.4.1 Descripción del árbol del níspero

El níspero es un árbol de hoja perenne, de buen porte, puede alcanzar, en condiciones de cultivo, hasta 8 m, aunque normalmente no supera la media de 5 a 6 m (Figura 4).



Figura 4. Árbol de *Eriobotrya japonica*.



2.5.4.2 Hojas

Las hojas tienen forma ovalada (Argueta *et al.*, 1994; 2009), miden entre 8 a 25 cm, según la variedad, son verde oscuro y brillante por el haz y con numerosos tricomas por el envés. Durante la floración presentan pubescencia blanquecina en ambas caras. Los bordes son aserrados, siendo la profundidad del diente y la longitud del espacio aserrado dependientes de la variedad (Figura 5; Gariglio *et al.*, 2002).



Figura 5. Hojas de *Eriobotrya japonica*.

2.5.4.3 Raíz

La raíz principal es pivotante hasta los 4-5 años de edad y puede llegar a alcanzar los 2,5 m de profundidad. Las raíces secundarias se extienden a poca profundidad (unos 25 cm), formando un amplio sistema radicular superficial.

2.5.4.4 Tronco

El tronco es erecto, de 0,75-1,25 m de altura, ramificándose a partir de ese punto en varios brazos, normalmente de 2 a 5 metros. Presenta una corteza rugosa de color gris pardo de renovación anual (Gariglio *et al.*, 2002).



2.5.4.5 Flor

La flor es blanca, pequeña y con una agradable fragancia, se encuentran agrupadas en panículas. La panícula mide entre 10 a 19 cm de longitud y tienen forma piramidal. Ésta consta de un eje principal en el que se insertan de 5 a 10 ejes que contienen un número variable de flores en racimo. El número de flores por panícula es de 110 a 150, dependiendo de la parcela y las condiciones climáticas del año (Figura 6; Gariglio *et al.*, 2002).



Figura 6. Flores blancas de *Eriobotrya japonica*.

2.5.4.6 Fruto

El fruto del níspero es carnoso, de pulpa abundante, sabor dulce y textura arenosa al paladar, de cascara gruesa de color amarillo y son muy notables por su variedad fenotípica, lo cual significa que la forma y el tamaño varían considerablemente de un árbol a otro (Gariglio *et al.*, 2002).

Cada fruto tiene una forma ovoide, de 3 a 5 cm de longitud, puede contener entre 1 y 5 semillas en forma de gota grandes, de color marrón; representan entre un 20 y un 30% del peso del fruto y están agrupadas fuertemente, formando un núcleo voluminoso. El fruto se consume fresco (Figura 7; Gariglio *et al.*, 2002).



Figura 7. Frutos de *Eriobotrya japonica*.

2.5.5 Fenología

Florece en otoño o a comienzos del invierno y los frutos maduran a finales del invierno y principio de la primavera (Delucchi *et al.*, 2010).

2.5.6 Características agro-climáticas

2.5.6.1 Clima

El níspero es un árbol frutal de clima subtropical o templado-cálido, con inviernos suaves, ya que en ésta época del año es cuando florece y se desarrolla el fruto. En zonas de clima muy frío o excesivamente cálido y húmedo crece como planta ornamental, pero no es factible alcanzar una producción comercial aceptable.

La planta tolera temperaturas de -10 °C, pero los frutos se dañan a -3 °C. En panículas sometidas a distintas temperaturas se encontró que el daño por frío fue del 10% a -2 °C, del 40-49% a -3 °C y del 100% a -4 °C, siendo el estado más sensible al momento en el que los frutos tienen alrededor de 5 mm (Gariglio *et al.*, 2002).



2.5.6.2 Suelo

El níspero se adapta bien a una amplia variedad de suelos de moderada fertilidad, desde arenosos a arcillosos, siempre que presenten un buen drenaje. El pH óptimo se sitúa entre 6 y 8; no tolera bien los suelos ácidos. Se le encuentra con frecuencia en suelos calizos y pedregosos (Gariglio *et al.*, 2002).

2.5.6.3 Agua

Aunque las necesidades de agua de este cultivo no se conocen con precisión, con pluviometrías anuales inferiores a 1200-2000 mm es necesario recurrir al riego para obtener cosechas abundantes y de calidad.

La falta de agua durante el periodo de desarrollo vegetativo (junio-agosto) reduce el número y calidad del fruto (Gariglio *et al.*, 2002).

2.5.7 Importancia económica del cultivo

Los principales productores de níspero mundialmente son China, seguido de España, Japón, Italia, Israel y Argelia; son los países que poseen la superficie más extensa de cultivo del árbol frutal (Llacer, 1994; Gariglio *et al.*, 2002).

2.5.8 Distribución geográfica

Especie nativa de China, introducida tempranamente en Japón y el sudeste asiático; ampliamente cultivada en todas partes del mundo. Cultivado como árbol frutal y asilvestrado en Europa (Azores, Península Ibérica y Creta) (Navarro *et al.*, 1998), Nueva Zelanda, Brasil y Argentina (Delucchi *et al.*, 2010).

En México hay árboles en gran parte de la república y hay uso registrado de las hojas del níspero en el Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Tlaxcala y Veracruz (Figura 8; Argueta *et al.*, 1994; 2009).



Figura 8. Usos registrados de *Eriobotrya japonica* en México.

2.5.9 Historia del níspero

El níspero japonés es originario del sudeste de China, donde se conoce desde hace 2,000 años. De allí pasó a Japón, país en el que se cultiva desde 1180 (Gariglio *et al.*, 2002).

En Europa se cultiva desde el Siglo XVIII. Se cree que fue introducido por los jesuitas, que lo llevaron de Japón a la isla Mauricio y de allí a Francia, al Jardín de las Plantas de París. Después se extendió por toda la cuenca del Mediterráneo, donde ha encontrado un hábitat muy favorable para su cultivo en países como Argelia, Turquía, Israel, Italia y España.

En España fue introducido por los marinos mercantes en la zona de Sanguto (Ciudad de Valencia, España), donde se expandió por todo el este y sudeste de la península Ibérica (Gariglio *et al.*, 2002).

El níspero llegó a Yucatán y posiblemente a otras partes cercanas del sur de México, así como del norte de Belice y el noreste de Guatemala.



La especie se encuentra en Centro América, donde al parecer ha sido cultivada desde tiempos antiguos.

Se introdujo hace mucho tiempo en toda América tropical, las Antillas, las Bahamas, las Bermudas y parte meridional de la península de Florida (Álvarez, 2010).

2.5.10 Usos de *Eriobotrya japonica*

2.5.10.1 Etnobotánica

Eriobotrya japonica se ha utilizado como una planta farmacéutica, en particular, las hojas; recientemente se ha demostrado que contiene terpenos, polifenoles y ha sido empleados para tratar aftas, amigdalitis, dispepsia, gastralgia, gingivitis, fiebre alta (Argueta *et al.*, 1994; 2009), enfermedades de piel, flemas, bronquitis crónica, enfermedades respiratorias crónicas, antitusivo, expectorante, antiinflamatorio, astringente (Atsuhide *et al.*, 2004; Delucchi *et al.*, 2010), trastornos gastrointestinales (Liang *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2004), antitumoral, para regular la presión arterial y como tranquilizante (Keller *et al.*, 2006). Además, tienen efecto hipoglucemiante (Tanaka *et al.*, 2008), y contra el cáncer (Hideyiki *et al.*, 2000).

El níspero es recomendado principalmente para curar la diabetes, se prepara un cocimiento con las hojas, se deja reposar y posteriormente se administra, sin endulzar, tres veces al día o como agua de tiempo. Estudios han informado que el extracto de hojas de *E. japonica* tiene efectos contra la diabetes (Chen *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2008).

Cuando hay problemas de várices o mala circulación, a la cocción de las hojas se le agrega corteza de pochote (*Ceiba pentandra*) y se bebe como agua de uso, la cual también sirve para limpiar el riñón y contra el ácido úrico. Además, el cocimiento del fruto y la corteza se usan para purificar la sangre y curar enfermedades del riñón. Por otro lado, se ha registrado su uso para eliminar cálculos biliares y para calmar los nervios (Argueta *et al.*, 1994; 2009).



Es importante mencionar que, una decocción de las hojas, previamente fría se aplica a nivel local en heridas, úlceras y caries (Perry, 1980).

Por último, el extracto de las semillas de *Eriobotrya japonica* tiene actividad antioxidante y es eficaz para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, como la hepatopatía y nefropatía (Atsuhide *et al.*, 2004).

2.5.10.2 Usos no medicinales

Especie sumamente difundida como ornamental y frutal. Los frutos se consumen frescos, en almíbar, desecados, confitados, en jaleas, mermeladas, dulces, tartas y budines. La miel del níspero es muy apreciada en las zonas de cultivo.

A partir del jugo fermentado se destila y elabora un aguardiente con sabor a almendras. Algunos de sus usos son:

- Forraje: las ramas tiernas se utilizan como forraje en la India y en África.
- Apicultura: las abejas son fácilmente atraídas por las flores blancas perfumadas; la miel es de color ámbar con un agradable sabor.
- Combustible: la madera tiene un valor de mercado como leña.
- Madera: es utilizada para la fabricación de instrumentos musicales (Delucchi *et al.*, 2010).

2.5.10 Composición química de *Eriobotrya japonica*

Las hojas y semillas de *Eriobotrya japonica* contienen constituyentes activos como flavonoides, ácido elágico, taninos y amigdalina (Argueta *et al.*, 1994; Atsuhide *et al.*, 2004). Estudios han informado que los extractos de semillas u hojas de *E. japonica* tienen efectos contra la diabetes y la hipoglucemia (Chen *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2008).

Estudios químicos previos realizados a las hojas de *E. japonica* han permitido la caracterización de los sesquiterpenos loquatifolina A y cuatro derivados glicosilados del herolidol, triterpenos como el ácido maslínico, y su éster metílico, el ácido tri-hidroxi-urs-12-en-28-oico, ácido ursólico y su derivado hidroxilado,



ácido torméntico, ácido corosólico, ácido oleanólico, ácido δ -oleanólico, ácido $2\alpha,3\alpha$, 23-trihidroxiolean-12-en-28-oico, metilursolato, ácido 3-O-*cis-p*-coumaroil-tormentico, ácido 3-O-*trans-p*-coumaroil-tormentico, ácido 3-epicorosolico, ácido euscáfico, ácido 1 β -hidroxieuscafico, lactona del ácido ursólico, ácido betulínico, betulinato de metilo (Norihiro *et al.*, 2005; Hui-ya *et al.*, 2010), los flavonoides hiperósido, rutina (Argueta *et al.*, 1994; 2009, Osuna *et al.*, 2005), ácido 3-O-cafeoilquinico, ácido 4-O-*p*-coumaroil quínico, quercetina, isoquercitrina, 3-O-soforosido de quercetina, 3-O-soforosido de caemferol, (-)-epicatequina, los polifenoles procianidina B-2, procianidina C-1, 1-O-feruloil- β -D-glucopiranosido y ácido 4-O- β -glucopiranosil-*cis-p*-cumárico (Hideyuki *et al.*, 2000). En los retoños se han identificado los alcaloides guanidina y su derivado metílico. De la cáscara del fruto se ha aislado el flavonoide loguatósido, y de las semillas, el glicósido cianogénico amigdalina, ácidos grasos insaturados como el ácido linolénico, esteroides vegetales, tales como β -sitosterol (Tabla 2; Atsuhide *et al.*, 2004).



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero.

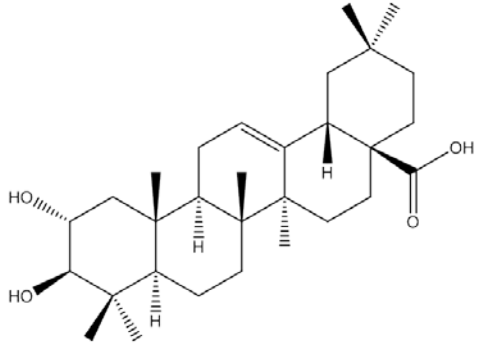
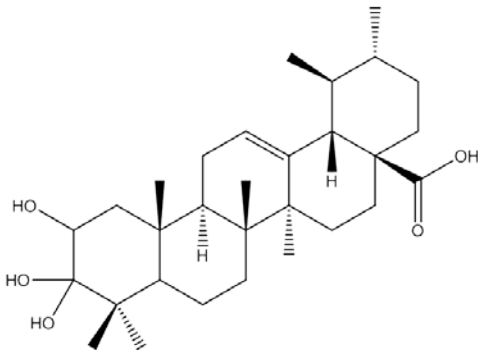
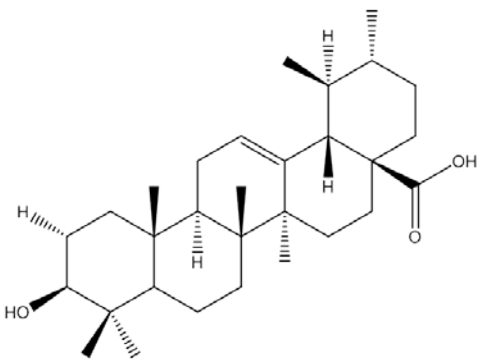
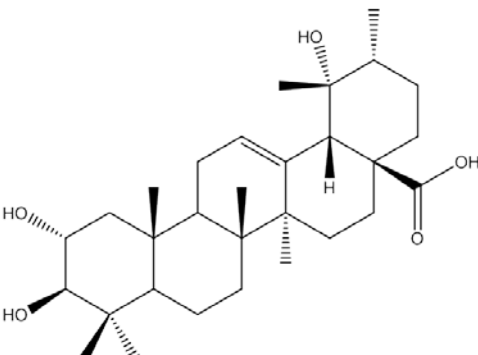
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Triterpeno	Ácido maslínico (hojas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009 Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido tri-hidroxi-urs-12-en-28-oico (hojas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009
	Triterpeno	Ácido ursólico (hojas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009 Hui-ya <i>et al.</i> , 2010 Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido tormentico (hojas)	Hui-ya <i>et al.</i> , 2010



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

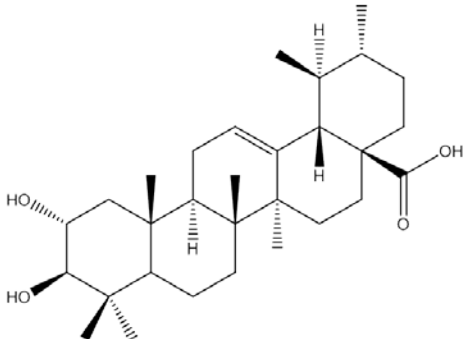
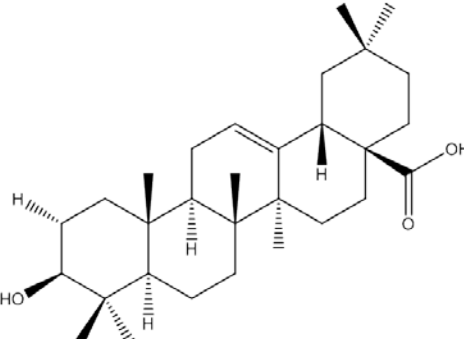
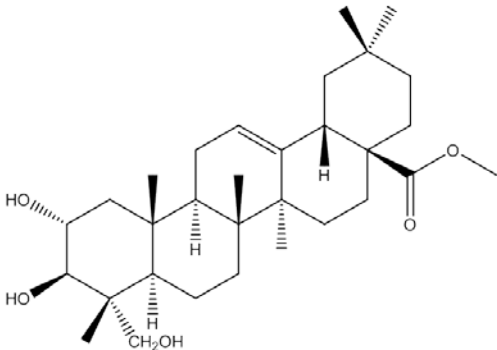
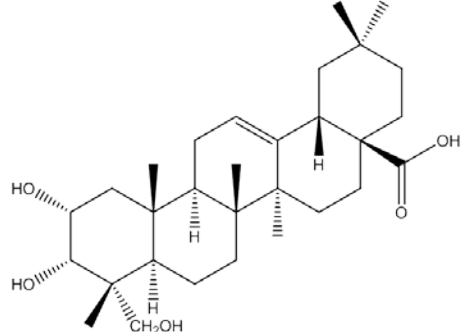
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Triterpeno	Ácido corosólico (hojas)	Hui-ya , <i>et al.</i> , 2010 Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido oleanólico (hojas)	Hui-ya <i>et al.</i> , 2010 Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Metilarjunolato (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido 2 α , 3 α , 23-trihidroxiolean-12-en-28-oico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

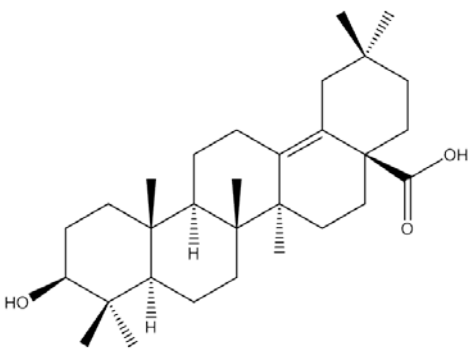
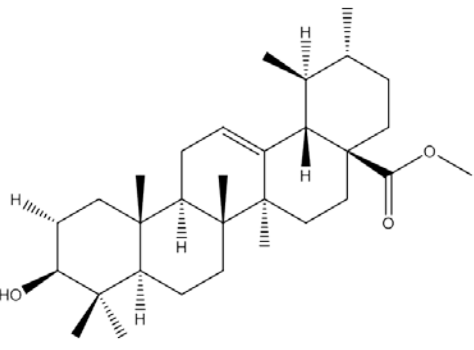
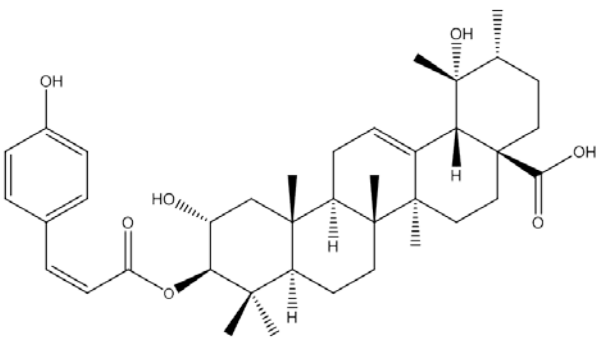
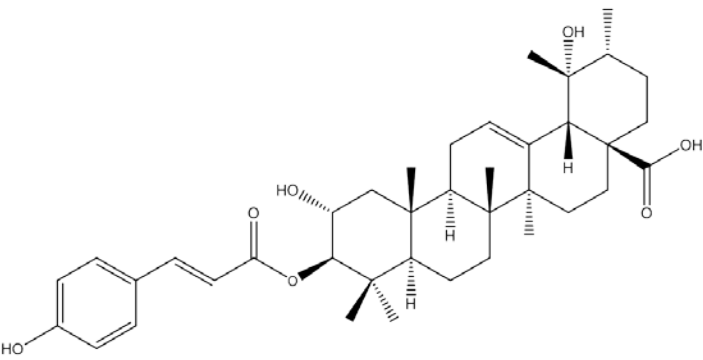
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Triterpeno	Ácido δ -oleanólico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Metilursolato (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido 3-O- <i>cis</i> - <i>p</i> -coumaroil-tormentico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido 3-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroil-tormentico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

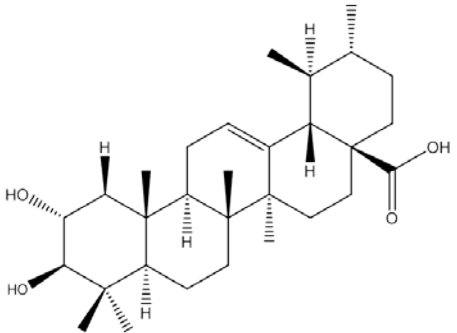
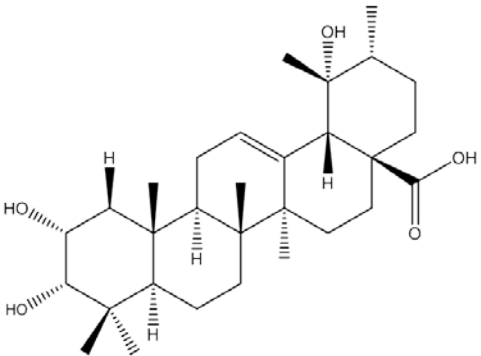
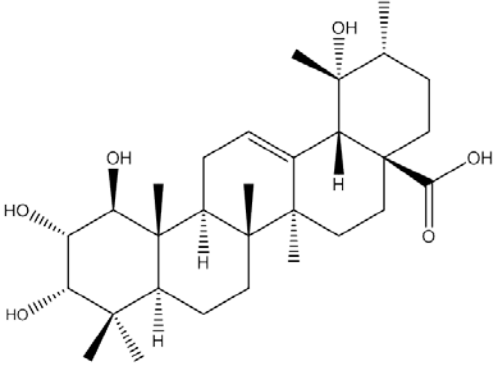
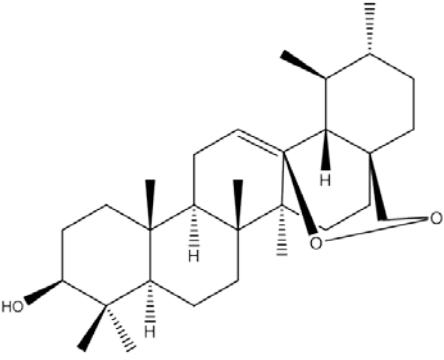
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Triterpeno	Ácido 3-epicorosólico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido euscático (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Ácido 1β-hidroxi-euscático (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Lactona del ácido ursólico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

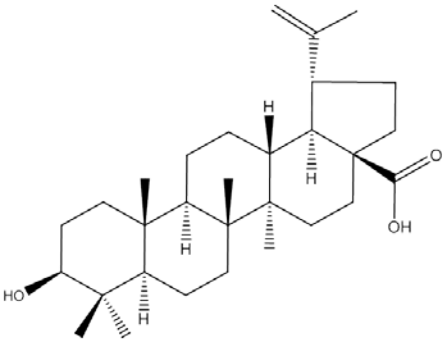
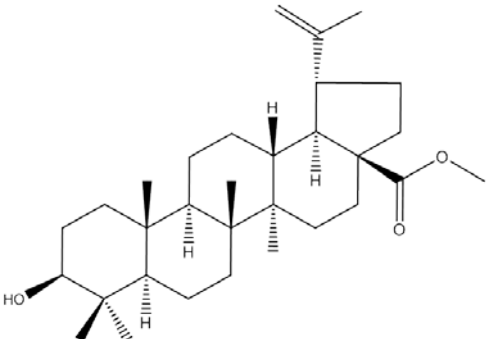
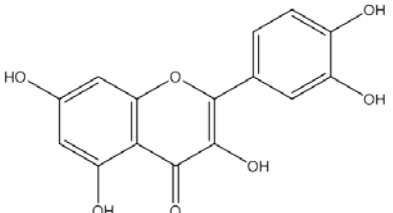
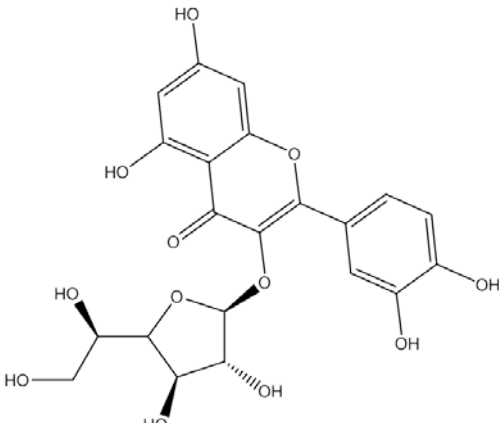
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Triterpeno	Ácido betulínico (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Triterpeno	Betulinato de metilo (hojas)	Norihiro <i>et al.</i> , 2005
	Flavonoide	Quercetina (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
	Flavonoide	Isoquercetina (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

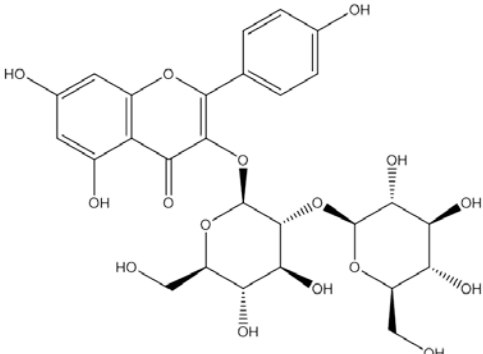
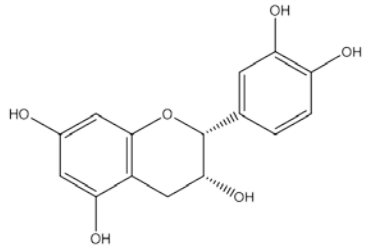
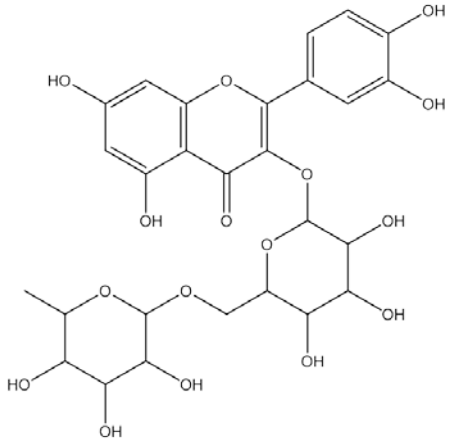
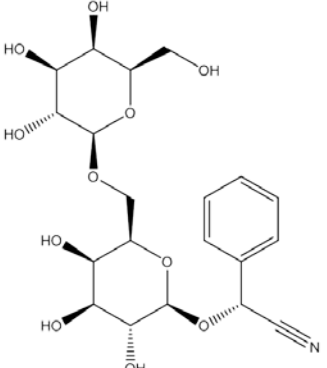
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Flavonoide	Camferol 3-O-soforosido (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
	Flavonoide	(-)-Epicatequina (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
	Glucósido Flavonoide	Rutina (hojas)	Osuna <i>et al.</i> , 2005 Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009
	Glicósido	Amigdalina (hojas y semillas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

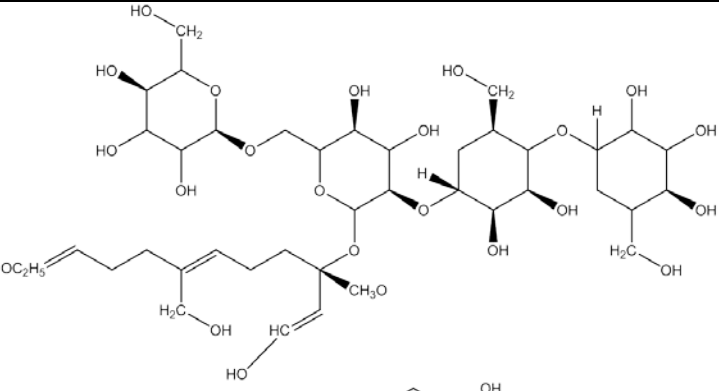
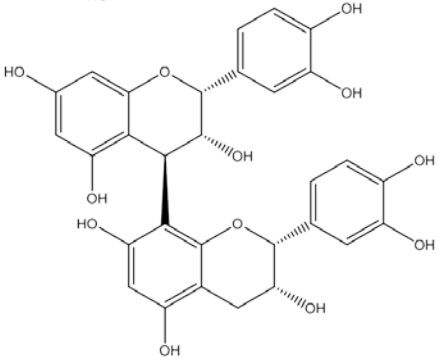
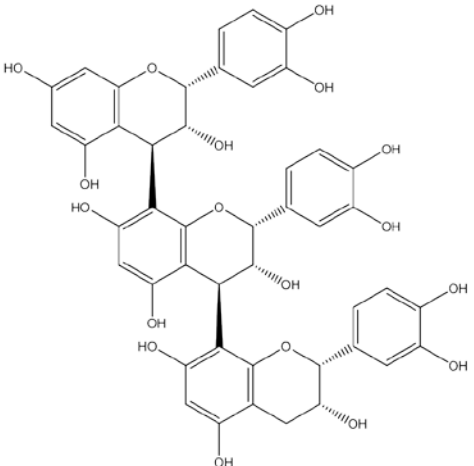
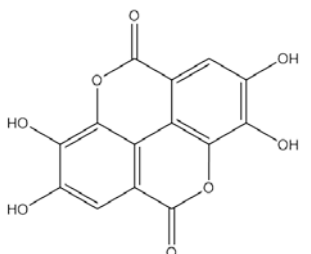
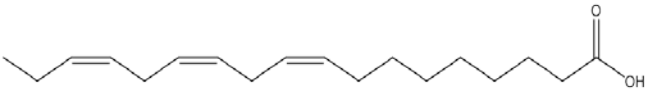
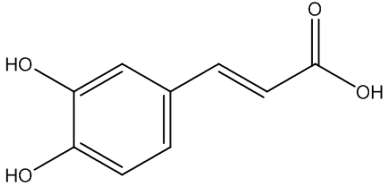
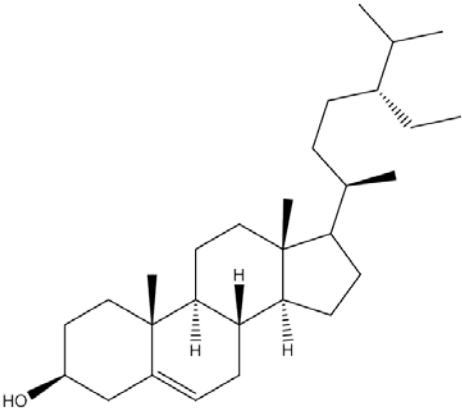
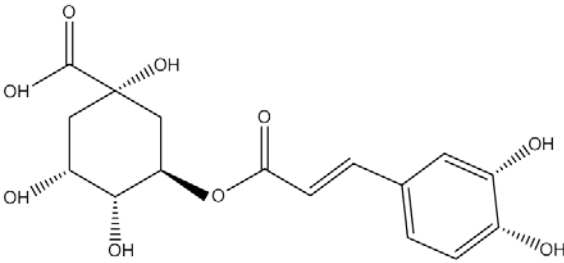
Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Sesquiterpene glicósido	loquatifolina A (hojas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994, 2009
	Polifenol	Procianidina B-2 (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
	Polifenol	Procianidina C-1 (hojas)	Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
	Polifenol	Ácido elágico (hojas y semillas)	Argueta <i>et al.</i> , 1994; 2009



Tabla 2. Estructura química de algunos compuestos presentes en el níspero
(continuación).

Estructura	Tipo	Nombre	Bibliografía
	Ácido graso	Ácido linolénico (semillas)	Atsuhide <i>et al.</i> , 2004 Junko <i>et al.</i> , 2006
	Ácido fenólico	Ácido cafeico (semillas)	Junko <i>et al.</i> , 2006
	Esteroides	β -Sitosterol (semillas)	Atsuhide <i>et al.</i> , 2004 Junko <i>et al.</i> , 2006
	Ésteres de ácidos	Ácido 5-clorogénico (semillas)	Junko <i>et al.</i> , 2006 Hideyuki <i>et al.</i> , 2000



2.5.12 Farmacología

Una decocción de la planta evaluada en conejos a las dosis de 100 y 200 mg/kg por la vía intragástrica, mostró actividad hipoglicémica. Actividad detectada también con un extracto etanólico administrado en conejos por vía intragástrica, y con un extracto metanólico a la dosis de 40 mg/kg inyectado en ratones por vía intraperitoneal (Argueta *et al.*, 1994; 2009). Los estudios, llevado a cabo por De Tommasi *et al.*, (1991), mostraron que los terpenos glicosilados y los sesquiterpenos son los componentes activos para el control de la diabetes mellitus. Otro estudio realizado en humanos adultos mostró que la administración por vía oral de la decocción a una dosis de 500 mg/ persona presenta un efecto hipoglicémico considerable (Tommasi *et al.*, 1991).

Adicionalmente, el extracto etanólico-acuoso de las partes aéreas de la planta ha mostrado actividad hipotérmica, esta cuando se administra por vía intraperitoneal a la dosis de 0.125 mg/kg en ratones. Por otra parte, los extractos acuoso y etanólico mostraron actividad antiviral débil, frente al virus *Herpes simplex 2*.

Así mismo, el extractos metanólico-acuosos de las hojas de *E. japonica* ha demostrado actividad antibiótica sobre cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis* (Kazunari *et al.*, 2008).

Otras actividades evaluadas, y que dieron resultados negativos de actividad fueron abortiva, analgésica, antiespasmódica, diurética, potenciadora de barbitúricos, espermicida y coagulante del semen. Tampoco se comprobó una actividad anti-mutagénica en extractos metanólicos de hojas y tallos (Argueta *et al.*, 1994; 2009).

Se han evaluado varios triterpenos con respecto a la actividad antiinflamatoria; frente a la inflamación inducida por TPA en ratones comparadas con dos controles positivos indometacina e hidrocortisona, los ácidos triterpénicos mostraron acción



anti-inflamatoria inducida por TPA, mostrando que el metilarjunolato, el ácido $2\alpha,3\alpha,23$ -trihidroxiolean-12-en-28-oico, el ácido 3-*O-trans-p*-coumaroil tormentico y el ácido 1β -hidroxieuscafico tienen una $DI_{50} = 0.03-0.05$ mg/oreja, comparables con la hidrocortisona la cual tiene $DI_{50} = 0.03$ mg/oreja (Norihiro *et al.*, 2005).

2.5.14 Toxicidad.

El estudio de la actividad tóxica de un extracto etanólico (al 95%) de hojas, evaluada en conejos por vía intragástrica a dosis de 200 mg/kg, no mostró signos de toxicidad. Por otra parte, una decocción administrada en adultos humanos por vía oral a la dosis de 500 mg/persona no produjo signo de toxicidad (Argueta *et al.*, 1994; 2009).



3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Es importante mencionar que las enfermedades de la cavidad oral son muy comunes en la población mundial debido al alto consumo de carbohidratos, una mala higiene bucal y la falta de tratamientos adecuados. Razón por la que es importante encontrar nuevos productos eficaces para su tratamiento. En este sentido las especies naturales, como es el níspero, representan una fuente de compuestos con actividad antibacteriana útiles para el tratamiento de estas enfermedades.

Las enfermedades de la cavidad oral no siempre son atendidas con la debida seriedad. Además de que los programas de salud existentes se enfocan principalmente a la corrección y no a la prevención del problema. Otro de los problemas que enfrentan, es el uso excesivo y la automedicación de los antibióticos, lo cual ha propiciado la aparición de bacterias resistentes, la disminución en la eficacia de los tratamientos, limitado el rango terapéutico contra patógenos ocasionando que los tratamientos se vuelvan más costosos, invasivos, peligrosos e ineficientes. Las razones antes mencionadas hacen necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas.

Las enfermedades de la cavidad oral, como la caries dental, los cánceres de la boca y la faringe representan un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres. Sin embargo, estas enfermedades han sido poco atendidas.

En el mercado existen métodos químicos y mecánicos que se utilizan para controlar la placa dento-bacteriana (biopelícula), sin embargo, la búsqueda de agentes eficientes para eliminar la placa continúa. Los productos naturales se han utilizado en la medicina tradicional y representan una alternativa para la búsqueda



de sustancias químicas novedosas para la prevención de la palca dentobacteriana y de las caries.

La búsqueda de nuevos productos contra estos padecimientos nos lleva a la medicina tradicional y a la amplia biodiversidad de fuentes naturales que existe en México.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar el potencial para inhibir el crecimiento de bacterias y aislar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de la especie *E. japonica*. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Preparar el extracto metanólico a partir de las hojas de *E. japonica*. Se obtendrá la cantidad suficiente de extracto para cuantificar el efecto inhibitorio del mismo sobre el crecimiento de bacteria patógena de la cavidad oral *S. mutans*.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto activo, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición. Esta actividad conducirá a la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Aislar los compuestos activos a partir de las fracciones primarias. Esta actividad permitirá obtener los principios activos en forma pura.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. Esta actividad permitirá establecer la estructura química de los metabolitos aislados.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales

4.1.1 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.1 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con anisaldehído sulfúrico al 1 % seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa. La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM empacado en columna de vidrio (6 × 60 cm) y fue eluida con mezcla de disolventes en orden creciente de polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol).

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 400 Hz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Los espectros se realizaron utilizando piridina-*d*₅, reportando el desplazamiento químico en ppm. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción



directa a 70 eV y bombardeos de átomos rápidos (EM-FAB) mediante la técnica de impacto electrónico (EM/IE).

4.2 Material Vegetal

4.2.1 Recolección de las hojas de *Eriobotrya japonica*

Las hojas de la especie *E. japonica* fueron recolectadas en el Campus Universitario en el mes de Julio del 2010. Una muestra de referencia se depositó en la colección de muestras del Laboratorio 111, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.



Figura 9. Hojas de *E. japonica* recolectadas.

4.3 Ensayo Biológico

4.3.1 Microorganismos de prueba

El microorganismo de prueba utilizados para determinar la actividad bacteriana del extracto metanólico, las fracciones y los compuestos aislados, fue *Streptococcus mutans* (ATCC 700611); agente causante de caries.

Para el crecimiento óptimo de dicha bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI).



4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad bacteriana se determinó con base en un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Se incubaron los cultivos de las bacterias por 24 h., posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm x 10 min, se lavaron con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8) dos veces y finalmente se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. En cada pozo se colocaron: el medio de cultivo, 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo. Las muestras se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba, utilizando diferentes controles como se muestra en la Tabla 3. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.

Tabla 3. Controles del ensayo biológico.

Controles	Bacteria y compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	Con inóculo y sin compuesto de prueba	37°C
Blanco	Sin inóculo y sin compuesto de prueba	37°C
Control positivo	Con inóculo y clorhexidina (CHX)	37°C

La bacteria *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente ($A_{660\text{nm}}$) después de 24 horas utilizando un lector de placas.

El valor de CMI para el microorganismo utilizado se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 $A_{660\text{nm}}$. Comparándolo con un control positivo que fue CHX (Tabla 3).



4.4 Estudio fitoquímico de *Eriobotrya japonica*

4.4.1 Proceso de extracción

Las hojas de *Eriobotrya japonica* se sometieron a un proceso de limpieza y secado a temperatura ambiente. Posteriormente, se molieron en un molino Willey tipo 4.

Una porción de 1844.1 g de hoja seca y molida de níspero se extrajo utilizando un proceso de maceración y como disolvente metanol por un periodo de 72 horas, el material vegetal se separo por filtración y el extracto resultante se concentró a presión reducida hasta sequedad obteniéndose un sólido de color café verdoso. El proceso de extracción se repitió 3 veces en las condiciones descritas. El extracto obtenido se evaluó utilizando como bacteria de prueba a *Streptococcus mutans*.

Tabla 4. Cantidad obtenida del extracto metanólico.

Nombre:	Cantidad obtenida
Extracto metanólico del níspero	416.1g

4.4.2 Fraccionamiento primario

El sólido resultante se resuspendió en una mezcla MeOH:H₂O (9:1), posteriormente fue sometido a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición utilizando como disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo, para cada caso 500 mL, repitiendo el procedimiento 3 veces en las condiciones descritas. Las fracciones obtenidas se concentraron al vacío, se denominaron F001, F002, F003, en la Tabla 5 se muestra el rendimiento obtenido para cada fracción.

En el Diagrama 1 sintetiza el proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto de *Eriobotrya japonica*.



Parte Experimental

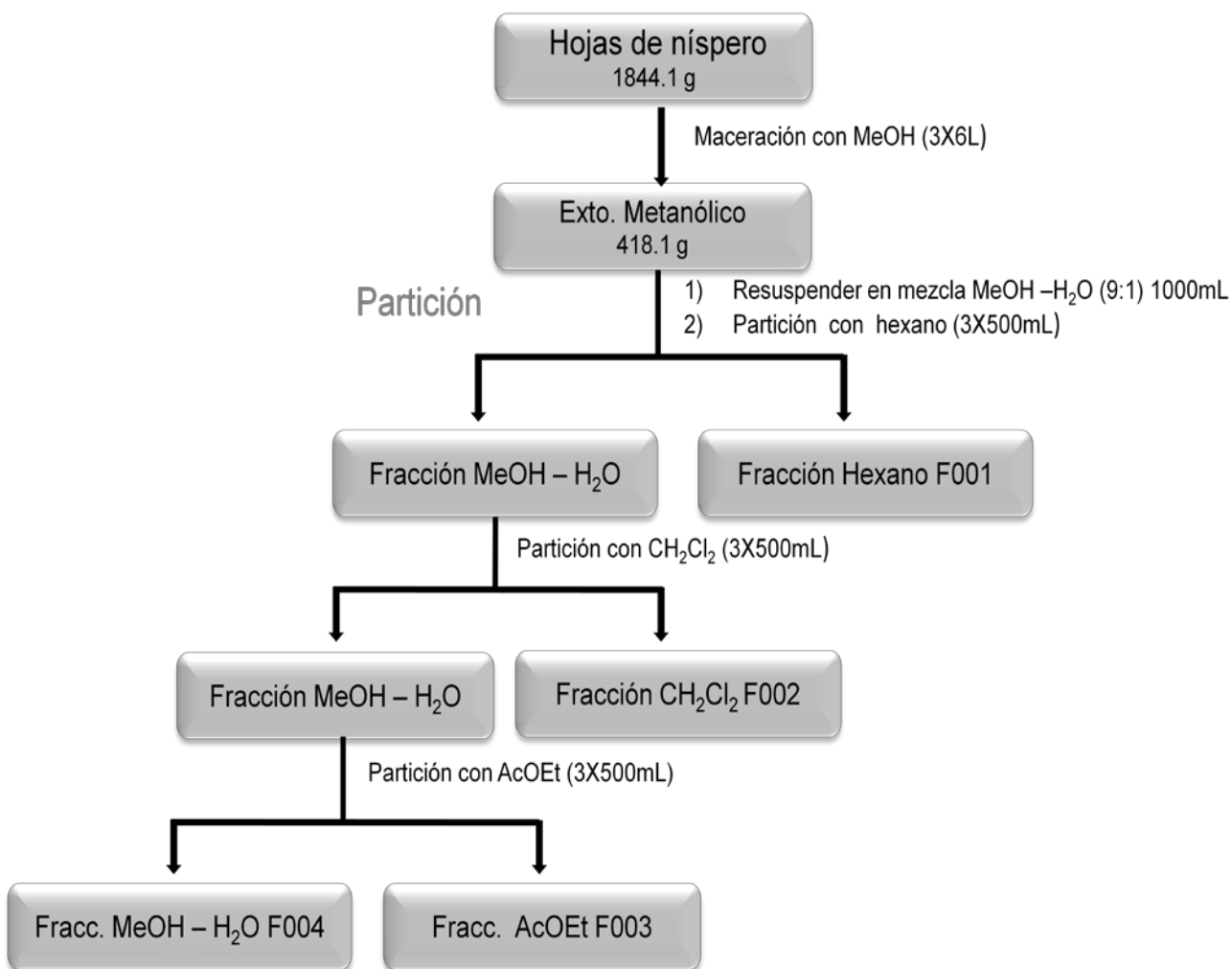


Diagrama 1. Fraccionamiento primario.

Tabla 5. Cantidad obtenida en el fraccionamiento primario.

Nombre	Cantidad obtenida
(F001) Fase con hexano	187.4 g
(F002) Fase con diclorometano	7.9 g
(F003) Fase con acetato de etilo	4.3 g



4.4.3 Fraccionamiento secundario

Una porción de la fracción F002 (7.5 g, Diagrama 1) (CMI 600 µg/mL para *S. mutans*) fue sometida a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en una columna abierta (6 × 60 cm) empacada con 85 mL de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol en polaridad creciente. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina, como resultado del fraccionamiento secundario se obtuvieron 72 fracciones de 250 mL cada una, reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica obteniéndose un total de 13 fracciones combinadas (F002-1 – F002-13) (Tabla 6). El Diagrama 2 resume el proceso de fraccionamiento secundario de la fracción F002.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F002.

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave asignada
Hexano	F1-F5	F002-I
Hexano: Acetato de etilo	F6-F7	F002-II
	F8-F9	F002-III
	F10-F13	F002-IV
	F14-F17	F002-V
	F18-F29	F002-VI
	F30-F45	F002-VII
	F46-F48	F002-VII
	F49-F50	F002-IX
	F51-F55	F002-X
	F56-F62	F002-XI
	F63-F65	F002-XII
Metanol	F66-F72	F002-XIII

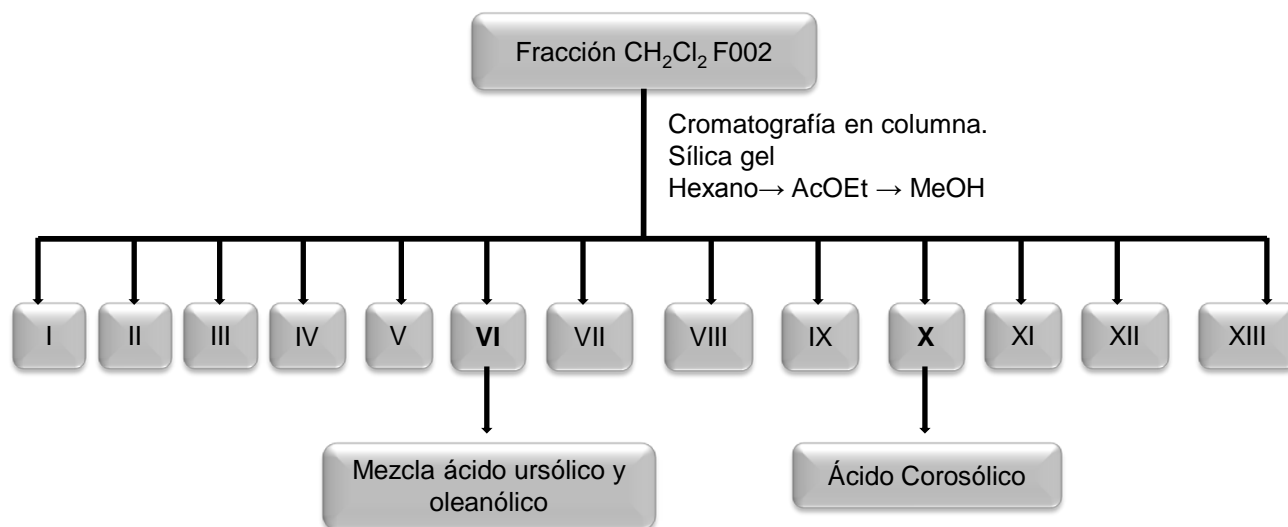


Diagrama 2. Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto metanólico del níspero.



4.4.4 Obtención y purificación de los triterpenoides a partir de las fracciones F002-VI y F002-X.

4.4.4.1 Obtención de la mezcla ácido ursólico y oleanólico (F002-VI).

A partir de la fracción secundaria F002-VI precipito un sólido de color blanco, el cual fue separado por filtración al vacío y sometido a múltiples recristalizaciones utilizando como disolventes metanol y hexano. El compuesto F002-VI se aisló como un sólido blanco soluble en una mezcla de diclorometano-metanol en caliente y en piridina. La estructura de los compuestos se estableció con base en la comparación de los datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura como una mezcla de ácidos ursólico y oleanólico (Figura 12 y Figura 13) (Seebacher *et al.*, 2003). La Figura 10 muestra la estructura química de los ácidos ursólico y oleanólico.

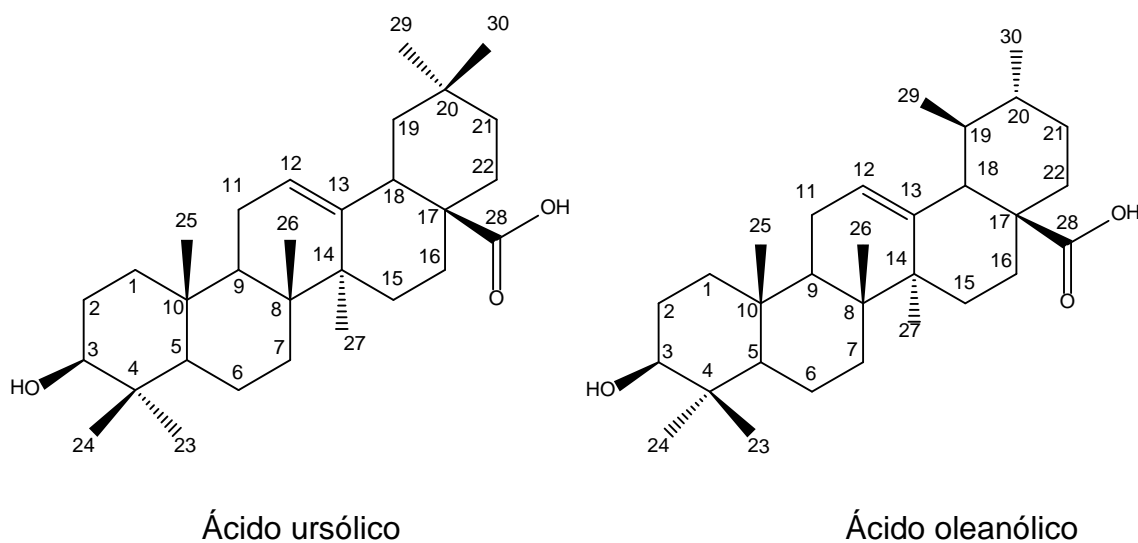


Figura 10. Estructura química del ácido oleanólico y del ácido ursólico.

En la Figura 11 se muestra el espectro de masas, en la Figura 12 el espectro de RMN - ^1H y en la Figura 13 el espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de ácido ursólico y oleanólico.

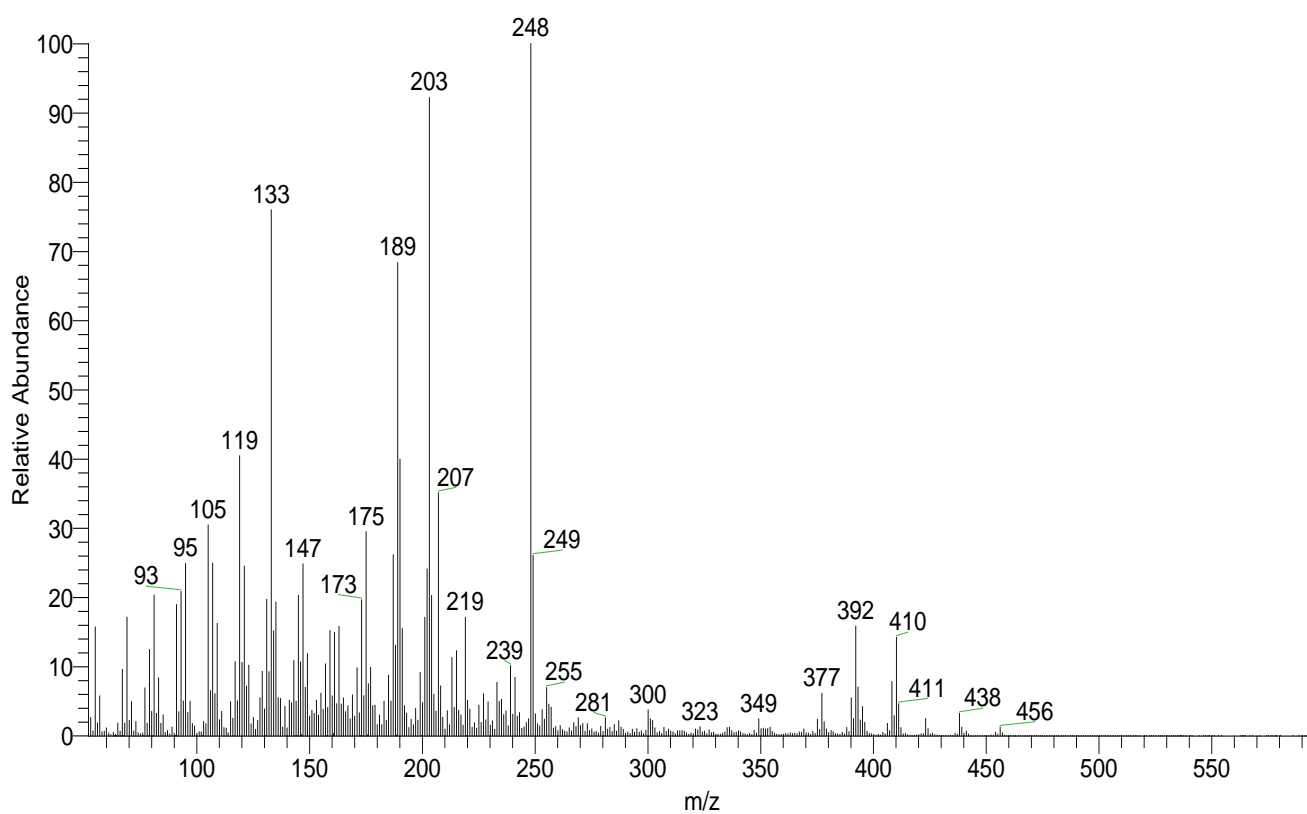


Figura 11. Espectro de masas de la mezcla ácido ursólico y oleanólico.

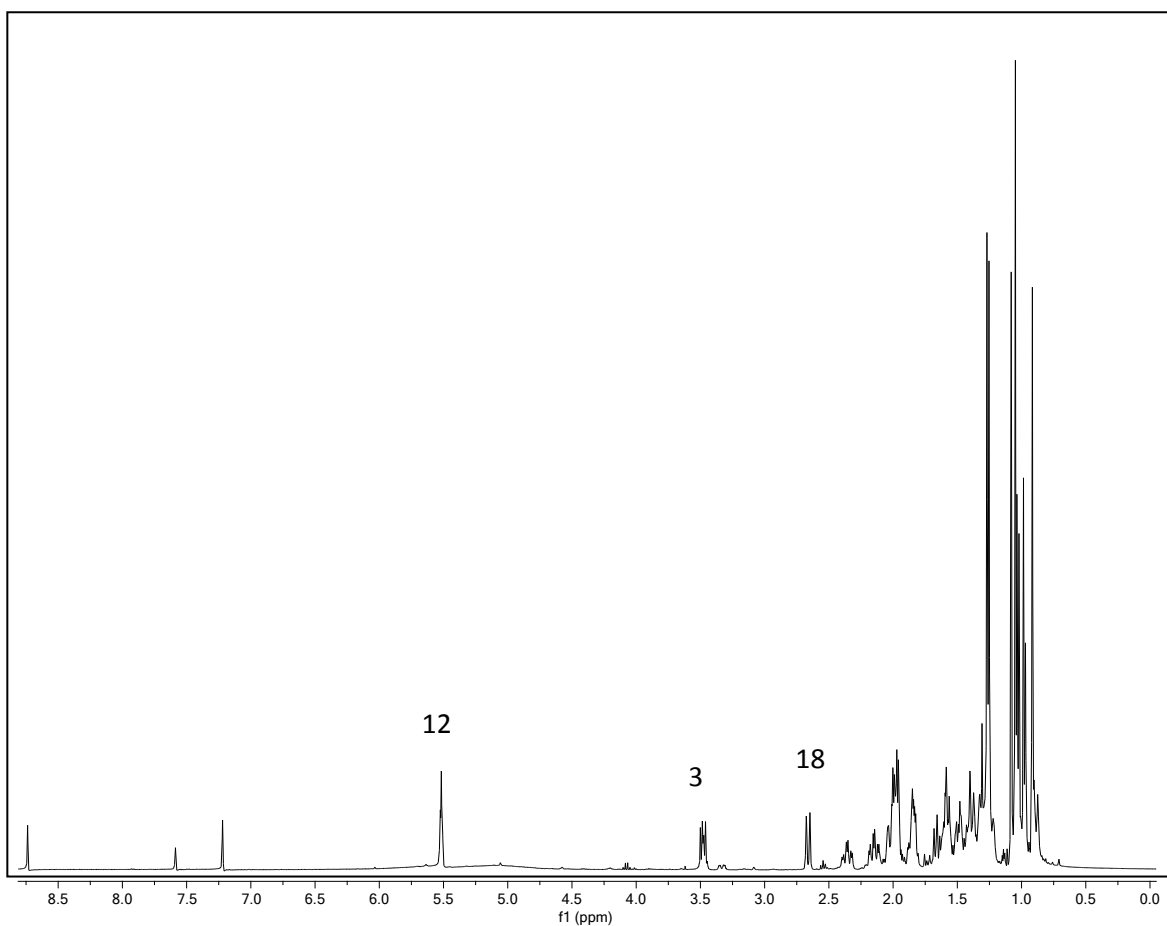


Figura 12. Espectro de RMN- ^1H de la mezcla ácido ursólico y oleanólico (400 MHz, Piridina- d_5).

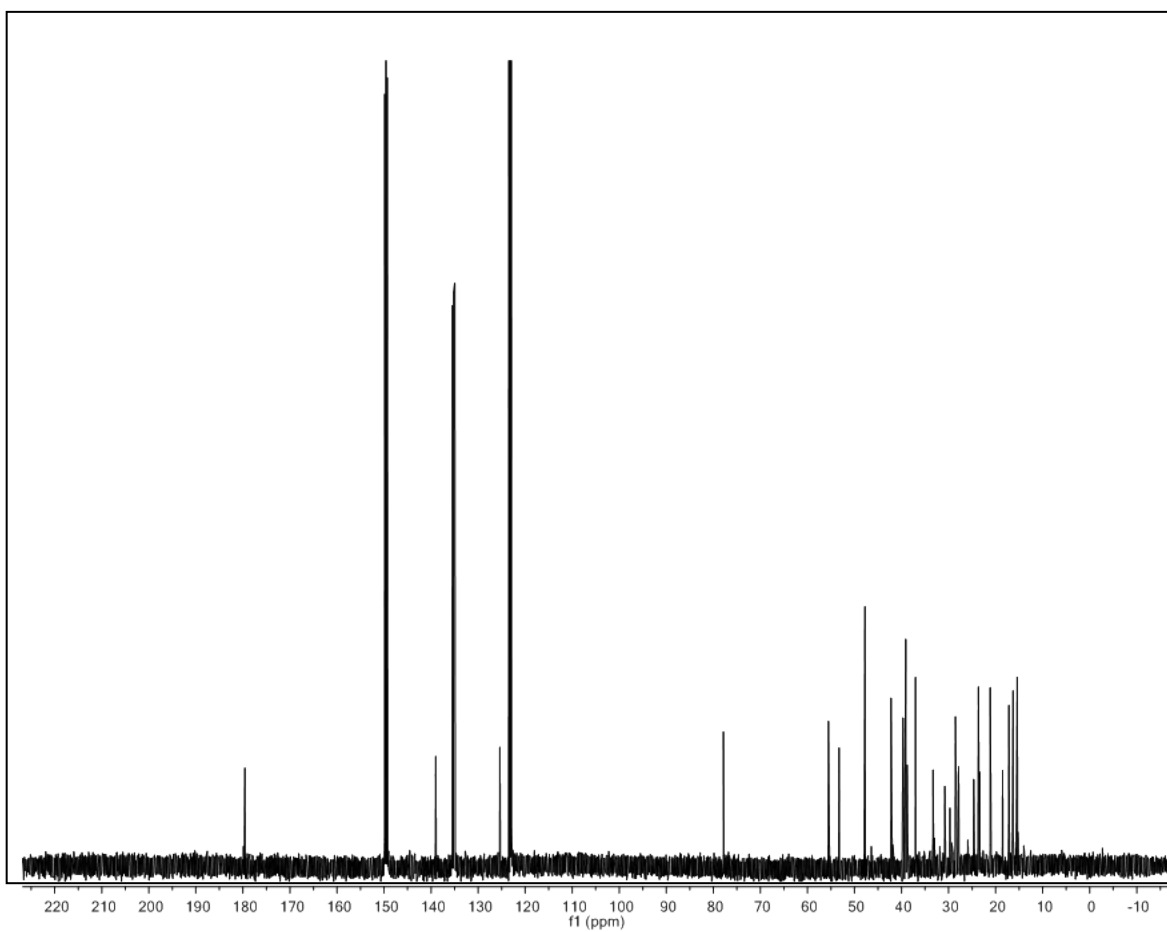


Figura 13. Espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de ácido ursólico y oleanólico (400 MHz, Piridina- d_5).



4.4.4.2 Obtención del ácido corosólico (F002-X).

Por otro lado, de la fracción secundaria F002-X precipitó un sólido de color blanco el cual fue separado por filtración al vacío y sometido a múltiples recristalizaciones y por último dos lavados con hexano. El sólido fue identificado como ácido corosólico (Figura 14) por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura (Norihiro *et al.*, 2005).

El compuesto F002-X, se aisló como un sólido blanco soluble en piridina. La estructura molecular del compuesto se estableció con base a los espectros de RMN (Figura 15 y Figura 16). En esta última el ión molecular se encuentra en una relación masa carga de m/z 495 $[M+Na]^+$. **NMR-¹H** (Piridina- d_5 , 400 MHz) δ (ppm): 0.86 (3H,d, $J=6.4$ Hz), 0.96 (3H, s), 0.99 (3H, d $J=6.2$ Hz), 1.08 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.24 (3H, s), 1.27 (3H, s), 2.70 (1H, d, $J=11.0$ Hz, H-18), 3.32(1H, d, $J=9.1$ Hz, H-3 β), 4.1 (1H, m, H-2 β), 5.5 (1H, br). **RMN-¹³C** (Piridina- d_5 ; 400 MHz) δ (ppm): 179.86 (C-28), 139.29 (C-13), 125.55 (C-12), 85.42 (C-3), 68.20 (C-2), 55.53 (C-5), 53.52 (C-18), 48.02 (C-17), 47.99 (C-1), 47.81 (C-9), 41.85 (C-14), 39.47 (C-20), 39.40 (C-19), 39.16 (C-4), 39.06 (C-8), 38.17 (C-10), 37.43 (C-22), 32.84 (C-7), 31.07 (C-21), 28.63 (C-23), 27.95 (C-15), 23.90 (C-27), 23.54 (C-16), 23.37 (C-11), 21.39 (C-30), 18.49 (C-6), 17.47 (C-29), 17.35 (C-26), 17.18 (C-25), 16.97 (C-24).

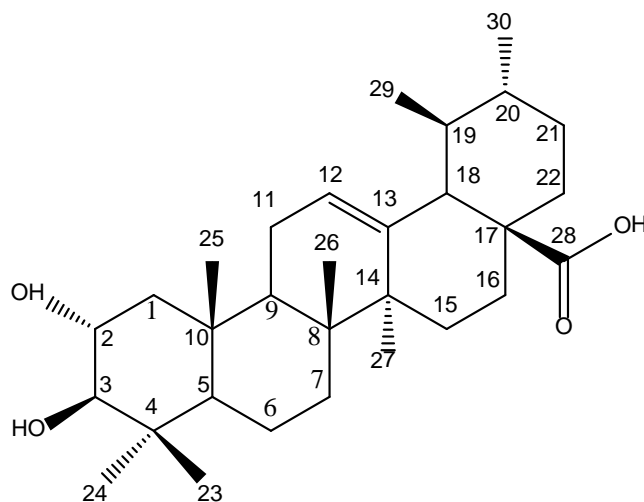


Figura 14. Estructura química del ácido corosólico.



En la Figura 15 se muestra el espectro de RMN - ^1H y en la Figura 13 el espectro de RMN- ^{13}C del ácido corosólico.

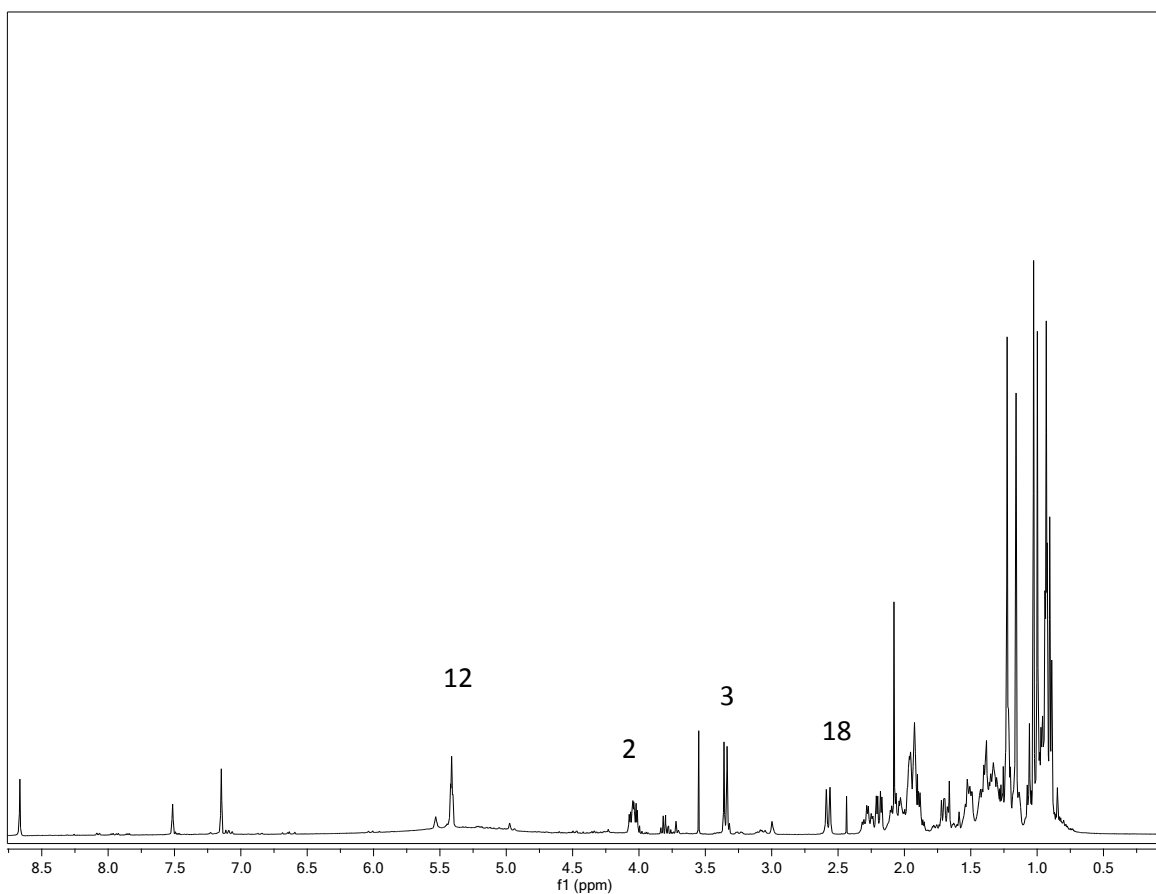


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H del ácido corosólico (400 MHz, Piridina- d_5).

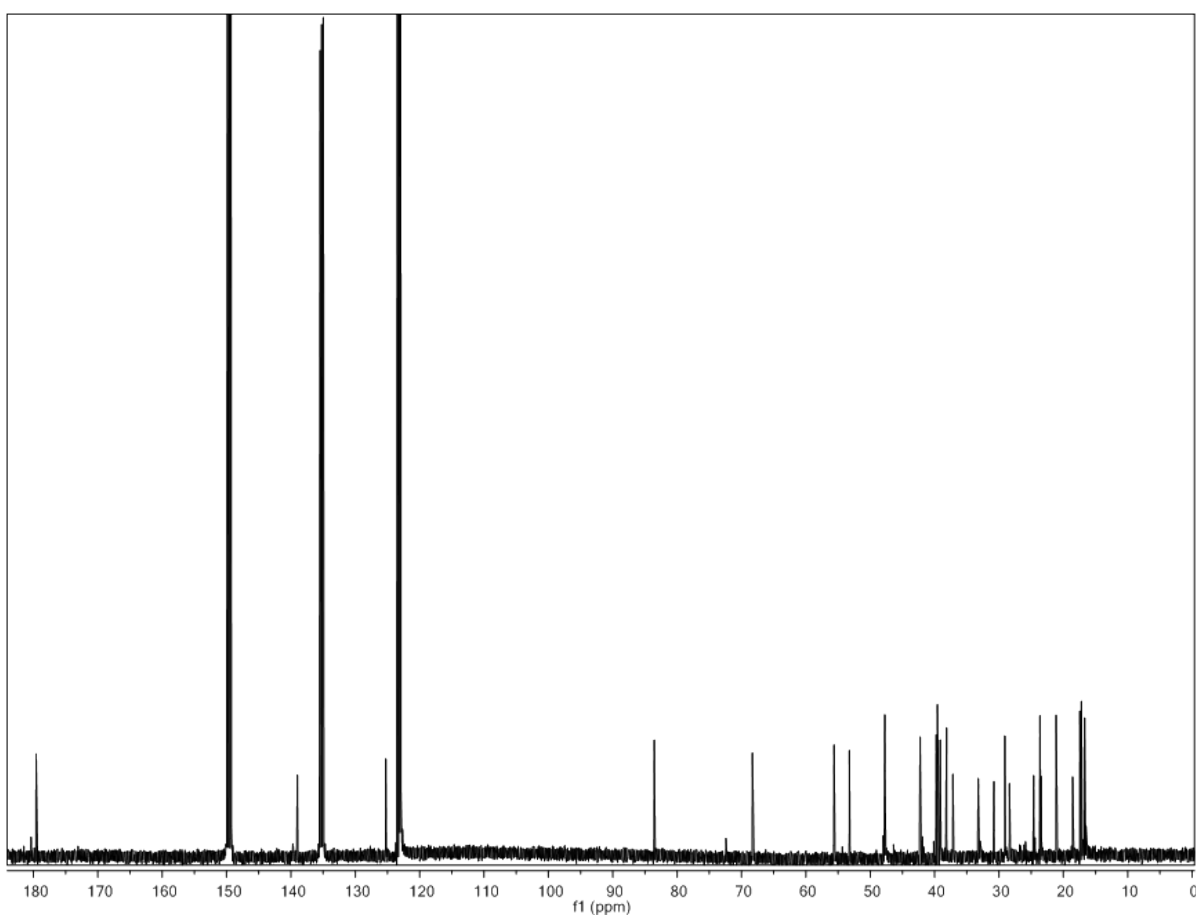


Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido corosólico (400 MHz, Piridina- d_5).



4.5 Efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento de la bacteria *S. mutans*

La determinación del potencial antibacteriano del extracto se realizó mediante el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita Rivero y colaboradores (2008). En la Tabla 7, se muestran las CMI para el extracto integro y los compuestos puros.

Tabla 7. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) del extracto y las fracciones de *E. japonica* para *S. mutans*.

Fracción	CMI
Extracto metanólico	916.6 µg/mL
F002	600 µg/mL
F002-VI	57.3 µg/mL
F002-X	125 µg/mL
CHX	1.2 µg/mL

Con base en los resultados de los CMIs, se puede concluir que los compuestos aislados poseen una actividad antibacteriana moderada sobre la bacteria patógena *S. mutans*. Al comparar la actividad obtenida para el extracto y los compuestos con el antibiótico comercial utilizado como control positivo, se observa que el gluconato de clorhexidina presenta una concentración mínima inhibitoria menor a la de los terpenoides aislados.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, la especie *E. japonica* se utiliza para tratar diversos trastornos entre los cuales podemos destacar aftas, amigdalitis, dispepsia, gastralgia, gingivitis, fiebre alta (Argueta *et al.*, 1994; 2009), enfermedades de piel, flemas, bronquitis crónica, enfermedades respiratorias crónicas (Atsuhide *et al.*, 2004), trastornos gastrointestinales (Liang *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2004), para regular la presión arterial y como tranquilizante (Keller *et al.*, 2006). Además, se le han descrito propiedades como antitusivo, expectorante, antiinflamatorio, astringente (Atsuhide *et al.*, 2004; Delucchi *et al.*, 2010), antitumoral, efecto hipoglucemiante (Tanaka *et al.*, 2008), y contra el cáncer (Hideyiki *et al.*, 2000).

La alta incidencia de padecimientos infecciosos en México y los reportes previos sobre el uso de extractos del níspero como antimicrobiano, así como su uso para el tratamiento de trastornos de la cavidad oral, hacen de esta especie un buen candidato para su estudio. Cabe mencionar que en México no se han realizado estudios conducentes para determinar la actividad de los extractos derivados de las hojas sobre el crecimiento de bacteria cariogénica, motivo por el cual, fue seleccionada esta especie para su estudio.

El bioensayo utilizado para cuantificar la actividad antibacteriana del extracto metanólico del níspero sobre el crecimiento de la bacteria patógena de la cavidad oral *Streptococcus mutans* fue el de microdilución en placa de 96 pozos y la metodología estandarizada en el laboratorio (Rivero, 2008). Los resultados obtenidos indican que el extracto del níspero inhibe el crecimiento de la bacteria seleccionada con concentraciones mínimas inhibitorias de 916.6 µg/mL.

Con base en estos resultados, se decidió continuar con un estudio biodirigido del extracto metanólico del níspero con la finalidad de aislar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana encontrada.



El extracto metanólico se sometió a una partición con disolventes de diferente polaridad. De este fraccionamiento se obtuvo la fracción activa F002 (CMI de 600 $\mu\text{g/mL}$ para la bacteria cariogénica *S. mutans*).

La fracción F002 fue sometida a un proceso cromatográfico en columna abierta, utilizando como absorbente gel de sílice y mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol en diferentes proporciones. Este proceso permitió aislar los terpenoides, ácido corosólico y una mezcla de ácido ursólico y oleanólico. Estos compuestos fueron caracterizados espectroscópicamente y espectrométricamente.

La mezcla de ácidos triterpénicos se evaluó con la finalidad de determinar su efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* y los resultados obtenidos indican que posee una concentración mínima inhibitoria de 57.3 $\mu\text{g/mL}$.

Por otra parte, es importante mencionar que al triterpeno, ácido oleanólico (AO) se le han descrito propiedades como antihepatotóxico, antiinflamatorio, cardiotónico, diurético, hepatoprotector, efecto cardiotónico (García-Granados, 2005), anticariogénico, antitumoral (Jie *et al.*, 2002), antihipertensivo, hipoglucemiante, antioxidante (Somova *et al.*, 2003), antihiperlipidémico (Liu *et al.*, 1995), antiulceros (Wrzeczono *et al.*, 1985), analgésico, antiinflamatorio y sedante (Honda *et al.*, 2000). Además, ha sido probado con éxito como agente arteroesclerótico en animales de experimentación (Parfent'eva *et al.*, 1980; Vasilenko *et al.*, 1982). Otros estudios reportan que este triterpenoide protege contra la hepatotoxicidad producida por paracetamol, cadmio, bromobenceno, tioacetamida, furosemida, D-galactosamina, endotoxinas y colchicina (Liu *et al.*, 1995). Efecto antitumoral, demostrando que las etapas de iniciación y promoción tumoral son inhibidas por el ácido oleanólico, este efecto es aun más notable en la etapa de promoción (Liu *et al.*, 1995). Actividad antimicrobiana, y un amplio espectro de actividad antifúngica especialmente contra la cepa de *Candida glabrata* (Liu *et al.*, 1995).

Otras investigaciones, reportaron los efectos inhibidores del ácido oleanólico sobre el edema inducido por carragenina en la pata de la rata (Liu *et al.*, 1995). Los



efectos antiinflamatorios del AO también fueron confirmados en estudios posteriores (Takagi *et al.*, 1980; Dai *et al.*, 1989a). Por otra parte, tiene efecto hiperlipidémico ya que experimentos en ratas con ácido oleanólico (50 mg / kg, vía oral durante 9 días), disminuye los niveles elevados de colesterol en la sangre y los niveles de lipoproteínas de más de un 40% (Singh *et al.*, 1992).

Por último, es importante mencionar que el AO ha demostrado tener actividad antimicrobiana, tales como la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y organismos Gram-negativos (Zaletova *et al.*, 1986). Este triterpeno se ha aislado previamente de especies vegetales como *Aralia chihensis* L. (Liu *et al.*, 1994b), *Beta vulgaris* L. (Yabuchi *et al.*, 1988), *Calendula officinalis* L. (Favel *et al.*, 1994) y *Ganoderma lucidum* Karst. (Hada *et al.*, 1990).

Con respecto, al triterpenoide ácido ursólico (AU) este presenta actividad antiinflamatoria (Reyes, 2009), anticancerígena, antioxidante, antihiperlipídico, efecto hipoglucemiante, antimicrobiano, antitumoral (Jie *et al.*, 2002), antiarítmica, antiulcerosa, diurético y analgésica (Somova *et al.*, 2003). Por otra parte, el AU inhibe el crecimiento de líneas celulares tumorales entre las cuales se pueden mencionar las de colón, mama, hígado, próstata y leucemia (Catherine, 2011). Estudios previos demuestran su acción antiinflamatoria ya que inhibe las vías de la ciclooxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa de los leucocitos humanos (Alcalde *et al.*, 2004).

Por otra parte, a partir de la fracción F002 se aisló el compuesto F002-X (ácido corosólico), como un polvo blanco, el cual se caracterizó siguiendo una estrategia similar a descrita para la mezcla de ácidos triterpénicos. El efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* se evaluó y la concentración mínima inhibitoria fue de 125 µg/mL.

El triterpeno ácido corosólico (AC) presenta propiedades antiinflamatorias (Yamaguchi *et al.*, 2006), efecto hipoglucemiante, el cual se demostró observando un aumento de la translocación de GLUT4 en musculo del ratón; promoviendo el



metabolismo de la glucosa y reduciendo la resistencia de la insulina; ya que actúa como un sensibilizador de la insulina mejorando la fosforilación del receptor de insulina B indirectamente mediante la inhibición de ciertas proteínas de tirosina (Shi *et al.*, 2008).

Estudios previos reportan que el AC puede mejorar la hipertensión arterial, el metabolismo lipídico anormal, el estrés oxidativo y el estado inflamatorio en un modelo animal con síndrome metabólico en ratas. Dicho lo anterior, el triterpeno puede prevenir la arterosclerosis inflamatorias (Yamaguchi *et al.*, 2006). Cabe mencionar que el AC muestra potente actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer humano (Ahn *et al.*, 1998). Este terpeno se ha aislado previamente de especies vegetales como la *Lagerstroemia speciosa* L. (Fukushima *et al.*, 2006), *Syzygium cumini* (Wen *et al.*, 2005) y *Crataegus pinnatifida* (Ahn *et al.*, 1998).



5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- ❖ El estudio fitoquímico del extracto metanólico preparado a partir de las hojas de *E. japonica*, permitió el aislamiento y caracterización del ácido corosólico y una mezcla de ácido ursólico y oleanólico.
- ❖ La información científica generada en esta investigación representa una contribución original al conocimiento químico y biológico de la especie *Eriobotrya japonica* que es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones.
- ❖ El efecto antibacteriano que presenta el extracto integro preparado a partir de las hojas del níspero, y el uso de la especie para el tratamiento de infecciones, sustenta de manera preliminar y parcial, la eficiencia de la especie en las prácticas medicas populares.
- ❖ El estudio fitoquímico biodirigido del extracto preparado a partir de las hojas del níspero, permitió establecer los compuestos antibacterianos mayoritarios de la especie.



7. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar el estudio de las fracciones secundarias de las hojas de *Eriobotrya japonica*, que no lograron ser analizadas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar y purificar otros compuestos minoritarios.
- ❖ Determinar la actividad antibacteriana de otros compuestos presentes en las hojas de *E. japonica* contra la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, Luis; Aguilar, Cristóbal (2008). Guía de plantas del Museo de la Autónoma de Andalucía. Ed. Centro de Estudios Andaluces; 45.

Ahn, Kyung-Seop; Hahm, Moon Sun; Park, Eun Jin; Lee, Hyeong-Kyu; Kim, Ik-Hwan (1998). Corosolic Acid Isolated from the Fruit of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* is a Protein Kinase C Inhibitor as well as a Cytotoxic Agent *Planta Med.*; 64: 468-470.

Alcalde, M. Teresa; Pozo, Alfonso (2004). Ácido ursólico. Revista: *Offarm: Farmacia y Sociedad*; 23 (10).

Alvarez, Juarez O. (2010). Estudio fitoquímico de *Eriobotrya japonica* (níspero). Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM, México.

Argueta, V. A. y Colaboradores (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I, México: Instituto Nacional Indigenista.

Argueta, V. A. y Colaboradores (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Edición Digital. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Níspero&id=7626>

Atsuhide, Hamada; Saburo, Yoshioka; Daisuke, Takuma; Junko, Yokota; Tailine, Cui; Masahiko, Kusunose; Mitsuhiko, Miyamura; Shojiro, Kyotani; Yutaka, Nishioka (2004). The Effect of *Eriobotrya japonica* Seed Extract on Oxidative Stress in Adriamycin-Induced Nephropathy in Rats., *Biol. Pharm. Bull.*; 27(12), 1961—1964.

Balakrishnan, M.; Simmonds, R.; Tagg R. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease, *Australian Dental Journal*; 45(4). 235-245.

Browgardt, C. M.; Wen, Z. T.; Burne, R. A. (2004). RegM is required for optimal fructosyltransferase and glicosyltransferase gene expression of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 204, 75.



Referencias bibliográficas

- Burnett, G. (1990). Manual de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de la boca. Limusa, 2ª ed. México. 323-340.
- Catherine, C. Neto (2007). Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. The Journal of Nutrition International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. J. Nutr.; 137: 186S–193S.
- Chen, J.; Li, W.L.; Wu, J.L.; Ren, B.R.; Zhang, H.Q. (2008). Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Phytomedicine; 15, 98–102.
- Cortéz-Gallardo, V.; Macedo-Ceja, J. P.; Kernandez-Arroyo, M.; Arteaga-Aureoles, G.; Espinosa-Galván, D.; Rodríguez-Landa, J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Revista Biomédica; (15): 123-136.
- Dai, Y.; Hang, B.Q.; Tan, L.W. (1989). Anti-inflammatory effect of oleanolic acid. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology; 3, 96-99.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat. Rev. Drug Discov.; 2, 114–122, 564-582.
- De Sahagún B. (1982). Historia General de las Cosas de la Nueva España. México: Porrúa.
- De Tommasi, N.; De Simone, F.; Cirino, G.; Cicala, C.; Pizza, C. (1991). Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. Planta Medica; 57, 414–416.
- Delucchi, Gustavo; Keller, Hector (2010). La naturalización del nispero, *Eriobotrya japonica* (Rosaceae, Maloideae), en la Argentina. Bonplandia, 19 (1): 71-77.
- Díaz, J. L. (1994). Accidentados albores de las ciencias fisiológicas mexicanas. Boletín de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, 1:4-6.
- Domingo, L. Brea (2003). Plantas con acción antimicrobiana, Microbiol, Rev, 16: 385-386.
- Fajardo; N., Martínez-Martín; M., Mercadillo; J. C., Galan; B., Ghysels; S., Matthijs; P., Cornelis; L., Wiehlmann; B., Tümmler; F., Baquero; J. L., Martínez (2008). The neglected intrinsic resistome. Plos One, 3, 16-19.



Referencias bibliográficas

- Favel, A.; Steinmetz, M.D.; Regli, P.; Vidal-Ollivier, E.; Elias, R.; Balansard, G. (1994). In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Pkmta Medica*, 60, 50-53.
- García-Granados López de Hierro, Andrés (2005). Composición nutracéutica obtenida de triterpenos naturales de la *Olea europaea*. Universidad de Granada Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n 18071 Granada, ES. Oficina Española de patentes y marcas. Número de publicación: 2; 267 403.
- Gariglio, Norberto; Castro, Angela; Juan, Mariano; Almela, Vicente; Agustí, Manuel (2002). El níspero japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto. Instituto Agroforestal mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Edit. Generalitat Valenciana, 9-11.
- Geilfus, Frans. (1994). Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Vol. 2. Turrialba, Costa Rica, 253.
- Gilbert, P.; Allison, D.G.; Mc Bain, A.J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Antibiotic and Biocide Resistance in Bacteria*. 92 Supp, 98S-110S.
- Guang-Yi, L.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. (1989). *Nat. Prod.*, 52, 162—166.
- Guilarte, C. (2001). Patógenos periodontales, *Odontol, Rev*, 39.
- Gupta, M.B.; Bhalla, T.N.; Gupta, G.P.; Mitra, C.R.; Bhargava, K.P. (1969). Antiinflammatory activity of natural products (I) Triterpenoids. *European Journal of Pharmacology*; 6, 67-70.
- Hada, S.; Hattori, T.; Namba, T. (1990). Dental caries prevention by traditional medicines. Effect of components of *Ganoderma lucidum* on ghrcosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical Abstracts*; 113, 91423f.
- Harrison, J. J.; Turner, R. J.; Marques, L. R.; Ceri, H (2006). Biopelículas. *Investigación y Ciencia*; 76-83.
- Herrera, M (2004). El papel del Biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *NOVA*; 2, 71-80.
- Hideyuki, Ito; Eri, Kobayashi; Yoshie, Takamatsu; Shu-Hua, L.; Tsutomu, Hatano;, Hiroshi, Sakagami; Kaoru, Kusama; Kazue, Satoh; Daigo, Sugita; Susumu, Shimura;



Referencias bibliográficas

- Yoshio, Itoh; Takashi, Yoshida (2000). Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and Their Cytotoxicity against Human Oral Tumor Cell Lines., Chem. Pharm. Bull.; 48(5) 687—693.
- Honda, T; Rounds, B.V.; Bore, L.; Finlay, H.J.; Favaloro, F.G.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M.B.; Gribble, G. W. (2000). Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. J Medical Chemistry; 43: 4233–4246.
- Hui-ya, Ho; Kuang-yao, Liang; Wen-chuan, Lin; Susumu, Kitanaka; Jin-bin, Wu (2010). Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl.
- Infirris J.S., Barmes (1980). Epidemiology of oral diseases differences in national problems. Int dent J.; 29: 183-190.
- Instituto de ciencias naturales, (<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=275710>) marzo del 2011.
- Ito H., Kobayashi E., Takamatsu Y., Li S. H., Hanano T., Sakagami H., Kusama K., Saotoh K., Sugita D., Shimura S., Itoh Y., Yoshida T. (2000). Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human tumor cell lines. Chem Pharm Bull, 48:687-693.
- Ito, H.; Kobayashi, E.; Li, S.H.; Hatano, T.; Sugita, D.; Kubo, N.; Shimura, S.; Itoh, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. J. (2002). Antitumor Activity of Compounds Isolated from Leaves of *Eriobotrya japonica* Agric. Food Chem.; 50 (8), 2400—2403.
- Jass, J.; Surman, S.; Walker, J. (2003). Biofilms Detection, Prevention and Control. Inglaterra, Willey.
- Jie, Li; Wei-Jian, Guo; Qing-Yao, Yang (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15; World J Gastroenterol; 8 (3): 493-495.
- Junko, Yokota; Daisuke, Takuma; Atsuhide, Hamada; Masahide, Onogawa; Saburo, Yoshioka; Masahiko, Kusunose; Mitsuhiko, Miyamura; Shojiro, Kyotani; Yutaka,



Referencias bibliográficas

- Nishioka (2006). Scavenging of Reactive Oxygen Species by *Eriobotrya japonica* Seed Extract. *Biol. Pharm. Bull.*; 29 (3) 467—471.
- Kazunari, T.; N., Shoko (2008). Hypoglycemic Activity of *Eriobotrya japonica* Seeds in Type 2 Diabetic Rats and Mice., *Biotechnol*; 72 (3): 686-687.
- Keller, H.; F., Romero (2006). Plantas medicinales utilizadas por campesinos del área de influencia de la Reserva de Biósfera Yabotí (Misiones, Argentina). *Bonplandia*, 15 (3-4): 125-141.
- Kolenbrander, P.; Andersen, R.; Blehert, D.; Eglund, G.; Foster, J.; Palmer, R. (2002). Communication among Oral Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3): 502.
- Lasa, I.; Del Pozo; Penades Jr.; Leiva, J. (2011). Biofilms bacterianos. www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/. Marzo.
- Laza Loaces, Dayami; Rodriguez Luis, Iraida; Sardina Cabrera, Guillermo (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med [online]*. vol.8, n.3 [citado 2011-06-30]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000300012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1028-4796.
- Lee, M.H.; Son, Y.K.; Han, Y.M. (2004). Tissue factor inhibitory sesquiterpene glycoside from *Eriobotrya japonica*. *Achr. Phar. Res.*, 27, 619–623.
- Liang, Z.Z.; Aquino, R.; Feo, V.D.; Simon, F.D.; Pizza, C. (1990). Polyhydroxylated triterpenes from *Eriobotrya japonica*. *Planta Med.*; 56, 330–332.
- Liébana, U. J. (2002). *Microbiología oral*. McGraw Hill-Interamericana, España; 297-525.
- Liu , J; Chen, X.F.; Xia, L.; Geng, X.Z.; Li, Z.S. (1987). Effect of oleanolic acid on serum glyceride cholesterol and β -lipoproteins in normal and experimental hyperlipidemic rats. *Chinese Pharmacological Bulletin*; 4: 14–15.
- Liu, J.; Liu, Y.P.; Klaassen, C.D. (1994). The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver injury in mice. *Journal of Ethanopharmacology*; 42,183-191.



- Liu, J.; Liu, Y.P.; Klaassen, C.D. (1995). The effect of oleanolic acid on chemical-induced liver injury in mice. *Acta Pharmcologica Simca*; 15, 16-23.
- Llacer (1994). Present status and future prospects of underutilized fruit tree crops in Spain. Frist meeting of the CIHEAM. Cooperative research Network on Underutilized fruit trees. Zaragoza. Spain. 63-65.
- Lozaya-Legorreta, X. (1994). Plantas, medicina y poder. Breve historia de la herbolaria mexicana. Los libros del consumidor. México: Pax México.
- Lozoya, X. (1999). Two decades of mexican ethnobotany and research in plant drugs. Research unit in pharmacology of natural products. National Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City Ciba Foundation Symposium; 185, 130-152.
- Murillo, J.R.; Tamés, R.; Arenas, C.; Díaz, J.L.; Contreras, C.M. (1984). Efecto del extracto de Tila (*Tilia mexicana*) como hipnótico potencial. En: Contreras C.M., Barragán L.A., editores. *Avances en el mecanismo de acción de fármacos*. México: Masson. 157-166.
- Navarro, C. F.; Muñoz Garmendia, S.; Castroviejo, F.; Muñoz, Garmendia; C., Navarro (1998). *Eriobotrya*. In Castroviejo S. Madrid, Real Jardfn Botánico, CSIC. *Flora Ibérica*; 6: 389-391.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*; 67, 61-69.
- Negrón, M. (2003). *Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica*. Medica Panamericana S.A. Argentina, 332, 333 y 567.
- Norihiro, Banno; Toshihiro, Akihisa; Harukuni, Tokuda; Ken, Yasukawa; Yosuke, Taguchi; Hiroyuki, Akazawa; Motohiko, Ukiya; Yumiko, Kimura; Takashi, Suzuki; Hoyoku, Nishino (2005). Anti-inflammatory and Antitumor-Promoting Effects of the Triterpene Acids from the Leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol. Pharm. Bull*; 28 (10), 1995—1999.
- OMS (1987). *Investigaciones de Salud Oral Básica: Métodos Básicos*. WHO, Ginebra.



Referencias bibliográficas

- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2007). Oral Health. Revisado el 17 de marzo del 2011 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>
- OMS (2011). http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/
- Osuna, T. L.; Aguilar, C. A.; Tapia, P. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico, Universitat de Barcelona, 17.
- Parfenteva, E.P.; Vasilenko, I.K.; Lisevitskaia, LI.; Oganessian, E.T. (1980). Effect of ursolic acid on lipid metabolism indices in experimental atherosclerosis. *Voprosii Medizinskoi Khimii*; 26: 174–179.
- Paolini, M. (1998). Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies. *Toxicol Appl Pharmacol*; 152 (2): 293-4.
- Pérez-Tamayo, R. (1997). La medicina de los pueblos primitivos. En: Pérez-Tamayo R, editor. De la magia primitiva a la medicina moderna. México: SEP, Fondo de Cultura Económica, CONACYT; 17-29.
- Perry, L. M. (1980). *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, MIT press, Cambridge, 342—343.
- Post, Jc.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L.; Ehrlich, Gd. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*; 12: 185-90.
- Reyes García, G. (2009). Proteína de choque térmico de 60 kDa de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis inducida con H₂O₂ y ácido ursólico en células mononucleares. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias. Instituto Politecnico Nacional.
- Rivero-Cruz, J. Fausto; Zhu, M.; Kinghorn, A. D.; Wu, C.D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompsonseedless raisins (*Vitis vinifera*), *Phytochemistry Letters* (2008) doi:16.1016/j.phytol.2008.07.07 Rivero-Cruz, J. Fausto. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *JEthnopharmacol* (2008), doi:10.1016/j.jep.2008.06.005
- Rodríguez, A. (1983). El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest. *Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa De Ensarriá*, 262.



- Russell, A.D. (2001). Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *J. Infect. Control*, 29, 259–261.
- Seebacher, Werner; Nebojsa, Simic; Robert, Weis; Robert, Saf; Olaf, Kunert (2003). Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. Volume 41, Issue 8, 636–638.
- Shi, L.; Zhang, W.; Zhou, Y. Y.; Zhang, Y. N.; Li, J. Y.; Hu, L. H.; Li, J. (2008). Corosolic acid stimulates glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 584 (1), 21–29.
- Shimizu, M.; Fukumura, H.; Tsuji, H.; Tanaami, S.; Hayashi, T.; Morita, N. (1986). Anti-inflammatory constituents and anti-inflammatow effect of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 2614—2617.
- Simões, M.; Bennett, R.; Rosa, E. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistance bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 1-12.
- Singh, G. B.; Singh, S.; Bani, S.; Gupta, B. D.; Banerjee, S. K. (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 44, 456-458.
- Somova, LI.; Shode, F. O.; Ramnanan, P.; Nadar, A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. *J Ethnopharmacol.*, 84(2-3), 299-305.
- Staskawicz, B. J.; Mudgett, M. B.; Dangl, J. L.; Galan, J. E. (2001). Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, 292, 2285–2289.
- Svensalery, Bergeholtz (2004). Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, 9: 27-36.
- Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 1284, 103-112.



- Tanaka, K.; Nishizono, S.; Makino, N.; Tamaru, S.; Terai, O.; Ikeda, I. (2008). Hypoglycemic activity of *Eriobotrya japonica* seed in type 2 diabetic rats and mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 72, 686–693.
- Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S.; Yoshida, T. (2002). Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*: 59, 315—323.
- Tenover, F. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control*, 34, S3–S10.
- Thomas, Jg.; Nakaishi, L. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*; 137 (suppl): 10S-15S.
- Valla, J.; L. Jankowski, D.; Bazzano, A.; J. Hernández (1999). Árboles Urbanos, en H. B. Lahitte & J. A. Hurrell (eds.). *Biota Rioplatense 4*. LOLA, Buenos Aires.
- Vasilenko, I. K.; Lisevitskaia, L.; Frolova, L. M.; Parfent'eva, E. P.; Skulte I. V. (1982). Hypolipidemic properties of triterpenoids. *Farmakologii Toxikologi*; 45: 66–70.
- Vidal, J. E. (1965). Notes sur quelques Rosacées asiatiques (III). Révision du genre *Eriobotrya* (Pomoideae). *Adansonia*; 5 (4): 537-580.
- Weeb, C. J.; W. R. Sykes; P. J. Garnockjones (1988). *Flora of New Zealand: naturalized pteridophytes, gymnosperms, dicotyledons*. Botany Division, D.S.I.R., Christchurch, New Zealand. 4, 1365.
- Webber, M. A.; Piddock, L. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51, 9–11.
- Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Wu, G.; Zhang, L.; Wu, X.; Ni, P. (2005). Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 4944–4948.
- Wilson, M.; Devine, D. (2003). *Medical Implications of Biofilms*. Cambridge; 171-177.
- Woodford, N.; Ellington, M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin. Microbiol. Infect*, 13, 5–18.



- Wrzeciono, U.; Malecki, I.; Budzianowski, J.; Kierylowicz, H.; Zaprutko, L.; Beimvik, E.; Kostepska, H. (1985). Nitrogenous triterpene derivatives. Part 10: Hemisuccunates of some derivatives of oleanolic acid and their antiulcer effects. *Pharmazie*, 40: 542–544
- Yabuchi, T.; Tanaka, T.; Sasatsuka, T.; Yamahara, J.; Fujimura, H. (1988). Extraction of oleanolic acid from sugar beets for treatment of liver failure. *Chemical Abstracts*; 108, 82.
- Yamaguchi; Kotaro, Yamada; Noriko, Yoshikawa; Kazuki, Nakamura; Jun, Haginaka; Masaru, Kunitomo (2006). Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sciences*, Volume 79, Issue 26, 2474-2479.
- Young, H. S.; Chung, H. Y.; Lee, C. K.; Park, K. Y.; Yokozawa, T.; Oura, H. (1994). Ursolic acid inhibits aflatoxin B₂- induced mutagenicity in a Salmonella assay system. *Biol. Pharm. Bull*; 17, 990-992.