



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Actividad antibacteriana del extracto metanólico y compuestos derivados de las
hojas del níspero (*Eriobotrya japonica*)”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GUADALUPE YAZMÍN ROSAS PIÑÓN

TUTOR: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

Facultad de Química

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015.





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. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dra. María Yolanda Ríos Gómez
Secretario	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 111 del Conjunto E, Departamento de Farmacia. Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México, D.F.

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Tutor

Q.F.B. Guadalupe Yasmín Rosas Piñón

Sustentante

Este trabajo se presentó en modalidad de cartel en la 10ª Reunión Internacional en Investigación de Productos Naturales en Mérida, Yucatán, Mayo, 2014.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de Posgrado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. Becario 288882) durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. J. Fausto Rivero por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación y por la revisión del escrito.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y la corrección del mismo.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros solicitados durante el proyecto.

Al proyecto ICyT-PICSA 10-27.

Dedicatorias

A mi familia, gracias por su amor y apoyo incondicional.

“No duermas para descansar, duerme para soñar. Porque los sueños están para cumplirse” Walt Disney.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Cuadros.	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 <i>Eriobotrya japonica</i>	3
2.2 Clasificación científica de <i>Eriobotrya japonica</i>	3
2.3. Características botánicas	4
2.3.1. Descripción del árbol de <i>Eriobotrya japonica</i>	4
2.3.2. Hojas.....	5
2.3.3. Inflorescencia.....	6
2.3.4. Fruto	6
2.4. Características agro-climáticas.....	7
2.4.1. Clima.....	7
2.4.2. Suelo.....	7
2.4.3 Agua.....	7
2.5. Distribución geográfica y hábitat	8
2.6. Origen del níspero	8
2.7. Usos de <i>Eriobotrya japonica</i>	10
2.7.1 Etnobotánica.....	10
2.7.2 Usos no medicinales.....	10
2.7.3. Farmacología	11
2.7.4 Toxicidad.....	12
2.8. Composición química de <i>Eriobotrya japonica</i>.....	12
2.9 Biofilms	20
2.9.1. Definición.....	20
2.9.2. Formación de biofilms.....	20
2.10. <i>Escherichia coli</i>.....	23

2.10.1. Descripción y clasificación	23
2.10.2 Patogenicidad	23
3. Justificación	26
3.1 Objetivos.	28
3.1.1 Objetivo general.	28
3.1.2 Objetivos particulares.	28
4. Desarrollo experimental	29
4.1. Procedimientos generales de análisis	29
4.1.1. Análisis cromatográficos	29
4.1.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas	29
4.2 Recolección de las hojas de níspero	30
4.2.1 Preparación del extracto metanólico.....	30
4.2.2 Fraccionamiento primario del extracto del níspero.	30
4.2.3 Fraccionamiento secundario del extracto del níspero a partir de la fracción de MeOH acuoso	30
4.2.4. Obtención y purificación a partir de F2' de la (-)-epicatequina (C-1)	31
4.2.5. Fraccionamiento terciario a partir de F4'	31
4.2.6 Obtención y purificación del ácido corosólico (C-3) a partir de F4'-7	31
4.2.7 Obtención y purificación del ácido ursólico (C-2) a partir de F4'-9	31
4.3 Ensayo de inhibición de formación de biofilm.	33
4.3.1 Estandarización del Método.	33
4.3.2. Inhibición de la formación de biofilms (Ensayo con <i>Escherichia coli</i>)	34
4.3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas del níspero y compuesto aislado contra <i>Escherichia coli</i>	35
4.4 Cuantificación del contenido de fenoles totales	36
4.5 Cuantificación de flavonoides totales.	37
4.6 Evaluación de la actividad antioxidante.	37
4.6.1 Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•]).	37
4.6.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del catión radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).	37
4.6.3 Ensayo de decoloración de β -caroteno.....	38

5. Resultados y discusión	39
5.1 Caracterización estructural de metabolitos aislados	39
5.1.1 Caracterización estructural de (-)-epicatequina (C-1).....	40
5.1.2 Caracterización estructural del ácido ursólico (C-2).	44
5.1.3 Caracterización estructural del ácido corosólico (C-3).....	53
5.2. Evaluación de la actividad biológica.	61
5.2.1 Estandarización del ensayo de inhibición de formación de biofilm por <i>E. coli</i> O42. 61	
5.3 Ensayo de inhibición de formación de biofilm de <i>Escherichia coli</i>.	62
5.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana de las hojas de níspero y compuestos aislados contra <i>Escherichia coli</i>.	72
5.5 Contenido de fenoles totales.....	76
5.6 Contenido de flavonoides totales.	76
5.7 Evaluación de la actividad antioxidante.	77
5.7.1 Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•]).	77
5.7.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del catión radical 2,2'-azino-bis(-3- etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).....	78
5.7.3 Ensayo de decoloración de β-caroteno.....	79
Conclusiones.....	80
Perspectivas.....	82
Bibliografía	83
Anexos	90

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
AAF	Antígeno fimbrial
ABTS	2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS ^{•+}	Catión radical 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP _C	Adenosín monofosfato cíclico
BHI	Infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusion)
CCA	Cromatografía en columna abierta
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
Cm	Centímetro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlación Homonuclear ¹ H- ¹ H
CU	Ciudad Universitaria
D	Doble
D.O.	Densidad óptica
DE	Desviación Estándar
D-MEM	Medio mínimo modificado por Dulbecco
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EM	Espectrometría de Masas
EMHN	Extracto metanólico de las hojas de níspero
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
G	Gramos
GMP _C	Guanosín monofosfato cíclico
GTF	Glucosiltransferasa
H	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IE	Impacto electrónico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
M	Metro

Lista de Abreviaturas (continuación)

Abreviatura	Significado
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
Mg	Miligramo
MHz	Megahertz
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
MPLC	Cromatografía en columna de mediana presión
Nm	Nanómetro
OA	Ácido oleanólico
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
S	Segundo
ShET1	Enterotoxina de Shigella 1
SPE	Sustancia Polimérica Extracelular
ST	Toxina termoestable
TL	Toxina termolábil
TMS	Trimetilsilano
UA	Ácido ursólico
UV	Ultravioleta
VLC	Cromatografía en columna al vacío
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

Lista de Figuras

Figura 1. Árbol de <i>Eriobotrya japonica</i> .	4
Figura 2. Hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> .	5
Figura 3. Inflorescencia de <i>Eriobotrya japonica</i>	6
Figura 4. Fruto de <i>Eriobotrya japonica</i>	6
Figura 5. Estados donde se reporta el uso de <i>Eriobotrya japonica</i> en la medicina tradicional de México.	8
Figura 6. Fases de la formación del biofilm.	22
Figura 7. Procedimiento experimental del estudio químico del EMHN.	32
Figura 8. Espectro ^1H -RMN de la (-)-epicatequina (C-1), metanol- d_4 , 400 MHz.	41
Figura 9. Espectro ^{13}C -RMN de la (-)-epicatequina (C-1), metanol- d_4 , 100 MHz.	42
Figura 10. Espectro ^1H -RMN del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.	46
Figura 11. Espectro ^{13}C -RMN del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 100 MHz.	47
Figura 12. Espectro de masas del ácido ursólico (C-2).	48
Figura 13. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento ^1H - ^1H -COSY del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.	49
Figura 14. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HSQC del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.	50
Figura 15. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HMBC del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.	51
Figura 16. Espectro ^1H -RMN del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 400 MHz.	54
Figura 17. Espectro ^{13}C -RMN del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 100 MHz.	55
Figura 18. Espectro de masas FAB modo negativo del ácido corosólico (C-3).	56
Figura 19. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento ^1H - ^1H -COSY del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 400 MHz.	57

Figura 20. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HMBC del ácido corosólico (C-3), piridina- <i>d</i> ₅ , 400 MHz.	58
Figura 21. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HMBC del ácido corosólico (C-3), piridina- <i>d</i> ₅ , 400 MHz	59
Figura 22. Formación de biofilm de <i>Escherichia coli</i> . Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37°C), en dos medios de cultivo diferente (D-MEM y BHI).	62
Figura 23. Ensayo de inhibición de biofilm (controles).	63
Figura 24. Ensayo de inhibición de la formación de biofilm incubando a los 20 min., para el EMHN, (-)-epicatequina y ácido ursólico.	64
Figura 25. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMNH, ácido ursólico y (-)-epicatequina utilizando una concentración de 200 µg/mL.	65
Figura 26. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMNH, ácido ursólico y (-)-epicatequina utilizando una concentración de 20 µg/mL.	66
Figura 27. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMNH, ácido ursólico y (-)-epicatequina utilizando una concentración de 2 µg/mL.	67
Figura 28. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por el EMHN.	68
Figura 29. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por (-)-epicatequina.	69
Figura 30 Ensayo de inhibición de formación de biofilm sin incubar para el ácido ursólico.	70
Figura 31. Ensayo de concentración mínima inhibitoria de <i>Escherichia coli</i> .	73
Figura 32. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de <i>Escherichia coli</i> con ampicilina o gluconato de clorhexidina.	74
Figura 32a. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de <i>Escherichia coli</i> con (-)-epicatequina y ácido ursólico.	74
Figura 33. Efecto del EMHN sobre la formación del biofilm por <i>Escherichia coli</i> utilizando el ensayo de cristal violeta.	75

Lista de Cuadros.

Cuadro 1. Clasificación científica de <i>Eriobotrya japonica</i> .	3
Cuadro 2. Compuestos químicos encontrados en <i>Eriobotrya japonica</i> .	13
Cuadro 3. Variables que afectan la adherencia celular y la formación del biofilm.	21
Cuadro 4. Características generales de las cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas.	25
Cuadro 5. Cantidad obtenida en el fraccionamiento primario.	30
Cuadro 6. Datos espectroscópicos de la (-)-epicatequina.	43
Cuadro 7. Datos espectroscópicos del ácido ursólico.	52
Cuadro 8. Datos espectroscópicos del ácido corosólico.	60
Cuadro 9. Análisis estadístico de los valores p obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de biofilm de <i>Escherichia coli</i> O42 con el serotipo 044:H18.	71

1. Introducción.

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, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta que han utilizado plantas medicinales y otros productos de origen natural para atender sus problemas de salud y una gran mayoría, desarrollados y en desarrollo, siguen haciendo uso de ellos actualmente (Argueta *et al.*, 1994). 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 la medicina que han existido por cientos de años. Estos sistemas poseen actualmente un papel esencial en la salud, 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).

Uno de los usos descritos con mayor frecuencia para las plantas medicinales es el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales. En este contexto, tomando en cuenta que las enfermedades diarreicas son la segunda enfermedad más recurrente en México y que representan un problema de salud de alcance mundial aún no resuelto, numerosos esfuerzos se han enfocado en la investigación de recursos de origen vegetal que posean actividad sobre el desarrollo de biofilms por bacterias que ocasionan enfermedades gastrointestinales en el intestino de los seres humanos.

En este sentido, es importante mencionar que las hojas del níspero son utilizadas en diferentes países, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, la tos y bronquitis crónica. La hoja contiene una variedad de triterpenoides, incluyendo ácido torméntico (TA), ácido corosólico (CA), ácido ursólico (UA), ácido maslínico (MA) y ácido oleanólico (OA). Estudios previos han demostrado que estos triterpenoides poseen efectos tales como anti-oxidación, anti-inflamación, actividad anti-tumoral, hepatoprotección, anti-hipertensión y también se usan para el tratamiento de la diabetes y obesidad (Ho *et al.*, 2010).

Con base en los antecedentes descritos previamente, se planteó el presente proyecto de investigación que consiste en la obtención del extracto metanólico y compuestos mayoritarios derivados de la hoja del níspero con la finalidad de determinar su efecto sobre el desarrollo del biofilm mono especie por *Escherichia coli* O42 con el serotipo 044:H18.

2. Antecedentes.

2.1 *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).

2.2 Clasificación científica de *Eriobotrya japonica*.

En el **Cuadro 1** se muestra la clasificación taxonómica de *Eriobotrya japonica* (Instituto de Ciencias Naturales, 2011).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Eriobotrya japonica*.

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

2.3 Características botánicas.

2.3.1 Descripción del árbol de *Eriobotrya japonica*.

El níspero es un árbol de hoja perenne que en condiciones de cultivo puede alcanzar los 8 m, aunque normalmente no supera la media de 5 a 6 m como se muestra en la **Figura 1**.

La raíz principal es pivotante hasta los 4 a 5 años de edad, y puede alcanzar los 2.5 m de profundidad. Las raíces secundarias se extienden a poca profundidad (25 cm), formando un amplio sistema radicular superficial.

El tronco es rígido de 0.75 a 1.25 m de altura, ramificándose en 2 a 5 brazos. Presenta una corteza rugosa de color gris pardo de renovación anual.



Figura 1. Árbol de *Eriobotrya japonica*.

2.3.2 Hojas.

Las hojas son coriáceas, elíptico-lanceoladas, de 18 a 45 cm, según la variedad, cuneiformes, de haz verde oscuro, brillante y muy veloso como se ilustra en la **Figura 2**. Durante su aparición los brotes presentan pubescencia blanquecina en ambas caras. Sólo dura un ciclo de crecimiento, por lo que las ramas de 2 y 3 años están desnudas de hojas (Rodríguez *et al.*, 1983).

El níspero produce dos tipos de brotes: vegetativos y reproductivos. Las yemas vegetativas desarrollan un eje, de longitud variable, con un número medio de siete hojas en más de un 70% de los brotes.

A lo largo del periodo vegetativo tienen lugar tres brotaciones: La brotación de primavera, que se inicia a finales de febrero y se prolonga hasta el mes de mayo; esta brotación origina el 73% de los tallos nuevos y las yemas terminales se diferencian en flores durante el verano. La segunda brotación se da tras la recolección (abril-mayo) y presenta un rápido crecimiento durante un corto periodo de tiempo; en esta brotación se origina el 17% de tallos nuevos y las yemas terminales se diferencian en flores en el otoño (Ateyyeh *et al.*, 1998). La tercera brotación tiene lugar a finales del verano o principios del otoño y sus brotes son de crecimiento lento y de menor vigor. Los ramos de la primera y segunda brotación son los primeros en florecer.



Figura 2. Hojas de *Eriobotrya japonica*.

2.3.3 Inflorescencia.

Es en espiga de 10 a 19 cm de longitud y 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 como se ilustra en la **Figura 3**. El número de flores por espiga es de 110 a 150, dependiendo de las condiciones climáticas del año, etc. (Lin *et al.*, 1999). El periodo de tiempo necesario para que florezca toda la espiga varía entre 2 y 4 semanas. La flor es pequeña y con una agradable fragancia.

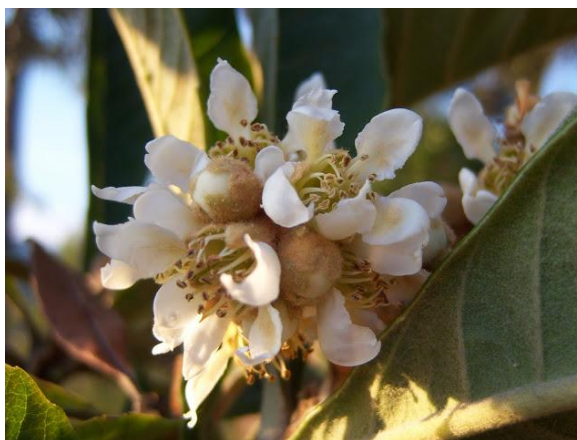


Figura 3. Inflorescencia de *Eriobotrya japonica*

2.3.4 Fruto.

Es ovalado con una longitud de 7 cm, y cuyo tejido carnoso procede del eje floral. El color de la piel varía del amarillo pálido al anaranjado, según la variedad, y la pulpa del blanco al naranja (Tous *et al.*, 1996). Contiene entre 1 y 5 semillas, grandes, marrones, que representan entre un 20 y un 30% del peso del fruto (Insero *et al.*, 1990) como se muestra en la **Figura 4**.



Figura 4. Fruto de *Eriobotrya japonica*.

2.4 Características agro-climáticas.

2.4.1 Clima.

El níspero es de clima subtropical o templado-cálido con inviernos suaves, ya que es en ésta época del año 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.

2.4.2 Suelo.

El níspero se adapta a una amplia variedad de suelos de moderada fertilidad, desde arenosos a arcillosos. El pH óptimo se sitúa entre 6-8, y no tolera bien los suelos ácidos. En suelos arenosos, con poca capacidad de retención de agua y de bajo calor específico, el fruto es de pequeño tamaño, rico en azúcares y de maduración precoz. En suelos arcillosos el fruto es de mayor tamaño pero menos sabroso y de maduración más tardía.

2.4.3 Agua.

La falta de agua durante el periodo de desarrollo vegetativo (junio-agosto) reduce la brotación. En estas condiciones, las lluvias otoñales pueden originar floraciones prematuras, expuestas en muchas zonas de cultivo a heladas. En la época del desarrollo del fruto la falta de agua reduce su tamaño final. Por el contrario, lluvias abundantes en etapas próximas a la maduración del fruto reducen la calidad organoléptica de los mismos y provocan, en muchos casos, el *cracking*.

2.5 Distribución geográfica y hábitat.

El níspero es una especie nativa de China, introducida tempranamente en Japón y el sudeste asiático; ampliamente cultivada en todas partes del mundo (Gu *et al.*, 2003). Este árbol se cultiva por sus frutos en Europa, Nueva Zelanda, Brasil y Argentina (Navarro *et al.*, 1998). En México hay árboles en gran parte de la República y hay usos medicinales registrados en el Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Tlaxcala y Veracruz (Argueta *et al.*, 1994).

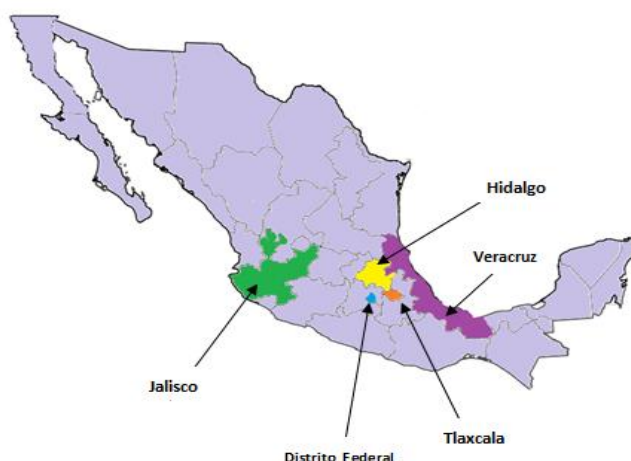


Figura 5. Estados donde se reporta el uso de *Eriobotrya japonica* en la medicina tradicional de México (Argueta *et al.*, 1994).

2.6 Origen del níspero.

El origen del níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl) se ubica en la zona media y baja del río Daduhe en China (Zhang *et al.*, 1993) y existen vestigios de su cultivo que datan de 2000 años. El uso de este árbol se extendió desde China hasta Japón, donde se describe desde el año 1180. Existen formas botánicas antiguas que llevaron a considerar que el país de origen era Japón, de ahí su nombre, pero recientemente se admite que el origen es China (Morton, 1987). Históricamente, el níspero se cultivaba como especie ornamental

debido a que no perdía las hojas, florecía en invierno y producía unos frutos muy pequeños de color anaranjado intenso que los hacía muy atractivos. Fue por esta razón que se introdujo en Europa, en 1784, en los Jardines Nacionales de París y más tarde en el Jardín Botánico de Kew, Inglaterra (Lin *et al.*, 1999). A partir de entonces, el níspero se introdujo en los países mediterráneos, Argelia, Chipre, Egipto, Grecia, Italia, España, Túnez y Turquía (Morton, 1987). Paralelamente, la especie se extendió por India, Australia, Madagascar y Sudáfrica. A principios del siglo XX, desde Japón se introdujo en California, desde Europa en Florida y desde allí a Sudamérica. En la actualidad su cultivo se extiende normalmente entre las latitudes 20° y 35° Norte y Sur.

En el siglo XIX, se comenzaron a seleccionar árboles de níspero que producían frutos de mayor tamaño y mejor sabor, aptos para su consumo, lo que permitió iniciar el cultivo de esta especie por sus frutos comestibles.

Actualmente, el níspero se cultiva principalmente en China, Japón, India, Pakistán, Madagascar, países del Mediterráneo (España, Italia, Turquía, Grecia, Israel), Estados Unidos (especialmente en California y Florida), América del Sur (Brasil, Venezuela) y Australia. El níspero se ha adaptado a la cuenca del Mediterráneo, en las mismas zonas en donde se desarrolla el cultivo de los cítricos (Llácer *et al.*, 1995).

La diversidad del género y de la especie es muy amplia. Cuarenta especies del género *Eriobotrya* y más de cien variedades de la especie *Eriobotrya japonica* han sido descritas en China (Ding *et al.*, 1995). Actualmente, se obtienen nuevas variedades por selección de plantas procedentes de semilla, como resultado de hibridaciones naturales.

El níspero llegó a Yucatán y 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.

2.7 Usos de *Eriobotrya japonica*.

2.7.1 Etnobotánica.

El níspero es recomendado para curar la diabetes en el Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Tlaxcala y Veracruz. Para el tratamiento de este padecimiento se prepara un cocimiento con las hojas o flores, se deja reposar y posteriormente se administra, sin endulzar, tres veces al día o como agua de tiempo. 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 para el tratamiento de la gota. Además, el cocimiento del fruto y la corteza se usan para purificar la sangre y curar los males del riñón. Por otro lado, se registra su uso para arrojar cálculos biliares y como tranquilizante. En el siglo XX, Luis Cabrera señala los usos siguientes: contra aftas, amigdalitis, diarreico, dispepsia, gastralgia, gingivitis, aperitivo, hemostático y nutritivo (Argueta *et al.*, 1994).

La especie *Eriobotrya japonica* posee alto valor medicinal, ya que diferentes partes de níspero se utilizan para el tratamiento de la tos (Ju *et al.*, 2003), la inflamación (Banno *et al.*, 2005), tumores (Banno *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2002), problemas hepáticos (Nishioka *et al.*, 2002), bronquitis crónica (Huang *et al.*, 2006), nefropatía (Hamada *et al.*, 2004), diabetes (Noreen *et al.*, 1988), como diurético, para la dispepsia, trastornos gastrointestinales, regular la presión arterial y como agente antipirético. Cabe mencionar que la decocción de las hojas fría se aplica a nivel local para tratar heridas, úlceras y caries (Perry, 1980). Por otra parte, otros estudios describen el efecto de los extractos metanólico-acuosos de las hojas de *Eriobotrya japonica* sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* (Kazunari *et al.*, 2008).

2.7.2 Usos no medicinales.

- Apicultura: las abejas son fácilmente atraídas por las flores blancas perfumadas; la miel es de color ámbar con un agradable sabor.
- Alimentos: los frutos se consumen frescos, en almíbar, desecados y en jaleas.
- Combustible: la madera tiene un valor de mercado como leña.
- Forraje: las ramas tiernas se emplean como forraje en la India y en África.

2.7.3 Farmacología.

La decocción de las hojas del níspero fue evaluada en conejos a dosis de 100 y 200 mg/kg por vía intragástrica y mostró actividad hipoglucémica. Otro estudio realizado en seres humanos adultos demostró el efecto hipoglucémico de la decocción de las hojas a dosis de 500 mg/persona por vía oral (Tommasi *et al.*, 1991).

Por otra parte, el extracto etanólico-acuoso de las partes aéreas del níspero, mostró actividad hipotérmica cuando se administró por vía intraperitoneal a la dosis de 0.125 mg/kg en ratones. Además, el extracto acuoso y etanólico mostraron actividad antiviral débil, frente al virus *Herpes simplex 2* (Frisbey A. y cols. 1953; Ishii R. y cols. 1984).

Otras actividad evaluada que resultó positiva fue la antihipercolesterolémica, esta prueba se realizó a partir del extracto metanólico de hojas del níspero que posteriormente fue evaluada en ratones macho por vía intraperitoneal.

Así mismo, el extracto metanólico-acuoso de las hojas del níspero ha demostrado actividad antibiótica sobre las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermiciis* (Kazunari *et al.*, 2008). Una decocción de las hojas fue evaluada sobre *Mycobacterium tuberculosis* dando como resultado una inhibición débil.

Otras actividades evaluadas del extracto etanólico-acuoso (1:1) de partes aéreas de las hojas del níspero, que dieron resultados negativos fueron abortiva, analgésica, antiespasmódica, diurética, potenciadora de barbitúricos, espermicida y anticonvulsivante. Tampoco se comprobó una actividad antimutagénica en extractos metanólicos de hojas y tallos (Argueta *et al.*, 1994).

2.7.4 Toxicidad.

El estudio de la actividad tóxica de un extracto etanólico al 95% de las 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 la vía oral a dosis de 500 mg/persona no produjo signo de toxicidad (Argueta *et al.*, 1994).

2.8 Composición química de *Eriobotrya japonica*.

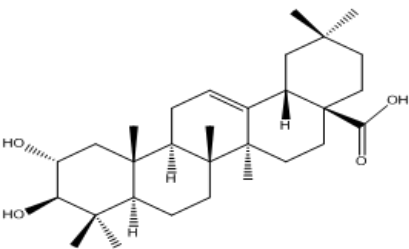
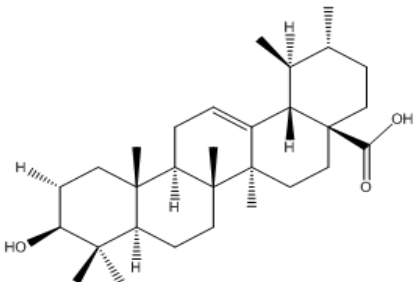
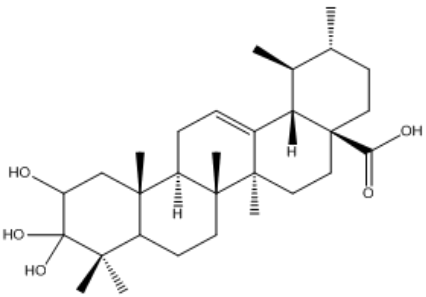
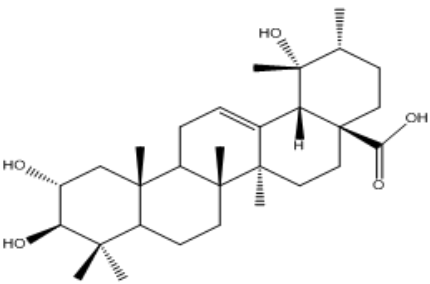
Las hojas y semillas de *Eriobotrya japonica* contienen constituyentes activos como flavonoides (Louati *et al.*, 2003), fenoles (Ding *et al.*, 2001), amigdalina (Zhuang, 2002), triterpenoides (Liang *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 2002) y carotenoides (Godoy *et al.*, 1995).

En las hojas de *E. japonica* se han detectado los sesquiterpenos loquatifolina A, y cuatro derivados glicosilados del herolidol, los triterpenos ácido maslínico, su éster metílico, el ácido tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico, ácido ursólico y su derivado hidroxilado; los flavonoides hiperósido y rutina. En los retoños se han identificado los alcaloides guanidina y su derivado metílico. De la cáscara del fruto se han aislado el flavonoide loguatósido (De Tommasi *et al.*, 1990).

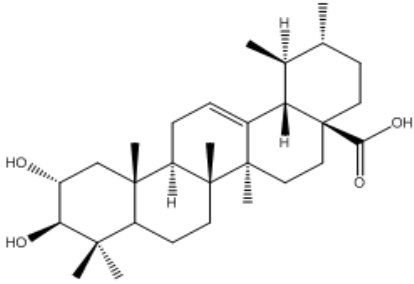
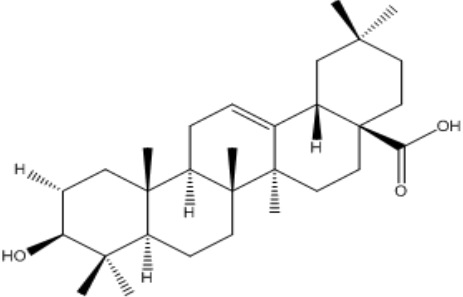
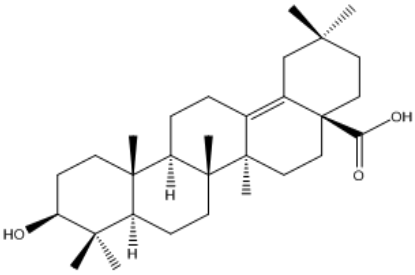
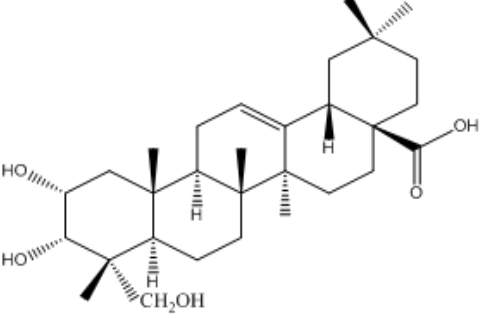
Algunos de estos triterpenoides, sesquiterpenoides, flavonoides y taninos han reportado actividad biológica como antioxidante, antiviral, citotóxica, antimutagénica, antitumoral y propiedades hipoglucemiantes (Argueta *et al.*, 1994).

El ácido oleanólico (OA) y ácido ursólico (UA) son tripernoides que predominan en *Eriobotrya japonica* y ambos han demostrado tener actividades biológicas tales como: anti-inflamatorias (Vasconcelos *et al.*, 2006), diuréticas, antitumorales (Shibata, 2001; Young *et al.*, 1994) y hepatoprotectoras (Ma *et al.*, 1982; Saraswat *et al.*, 2000). A continuación, se ilustran en el **Cuadro 2** algunos compuestos presentes en *Eriobotrya japonica*.

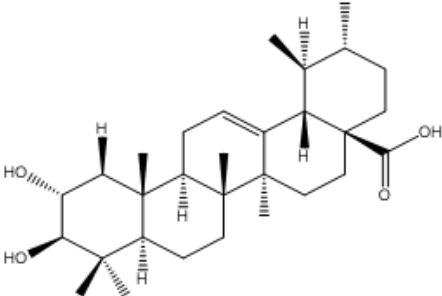
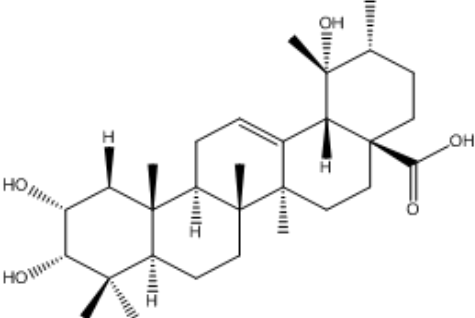
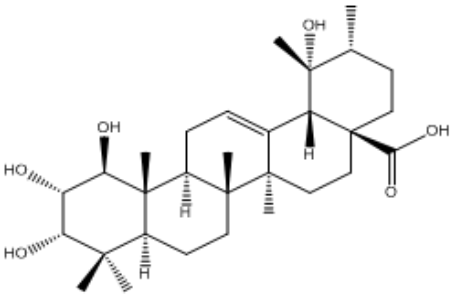
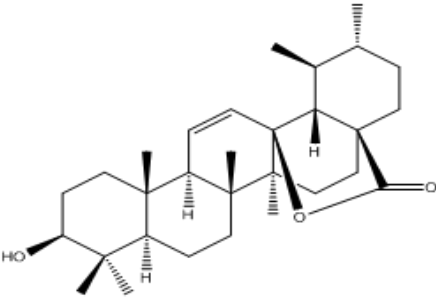
Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica*.

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Triterpenoides		
Ácido maslínico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido ursólico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido tri-hidroxi-urs-12-en-28- oico (Hojas)		Kato <i>et al.</i> , 1986
Ácido torméntico (Hojas)		 Ho <i>et al.</i> , 2010

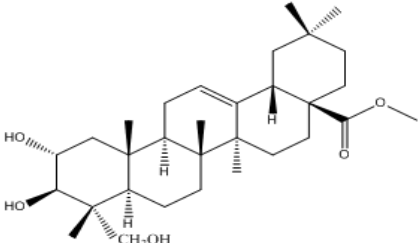
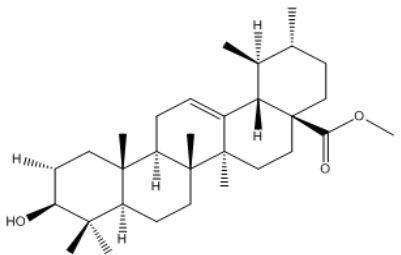
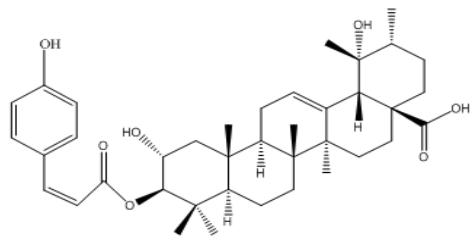
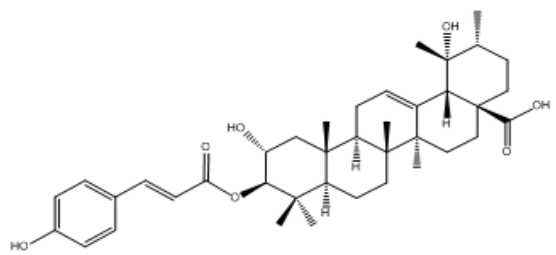
Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (Continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Triterpenoides		
Ácido corosólico (Hojas)		Zhou <i>et al.</i> , 2007
Ácido oleanólico (Hojas)		Zhou <i>et al.</i> , 2007
Ácido δ -oleanólico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido $2\alpha, 3\alpha, 23$ - trihidroiolean-12-en-28-oico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005

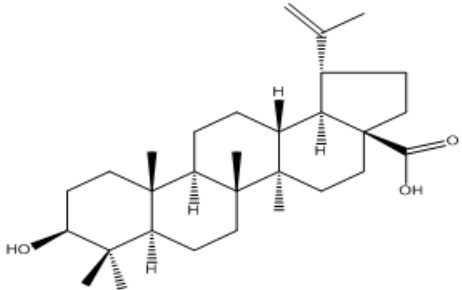
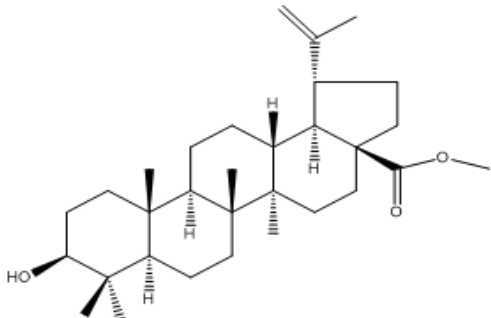
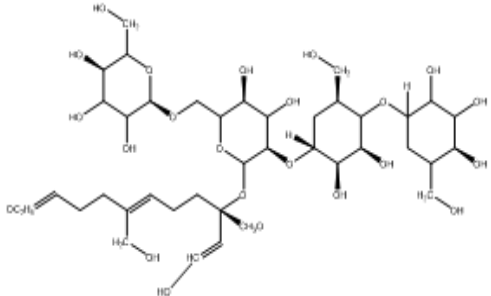
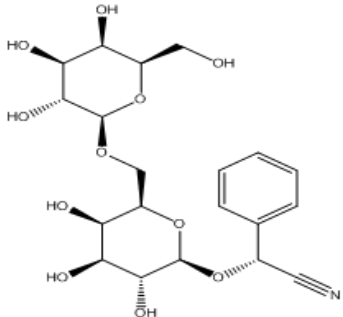
Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Triterpenoides		
Ácido 3-epicorosólico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido euscáfico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido 1β-hidroxiesucafico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Lactona del ácido ursólico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005

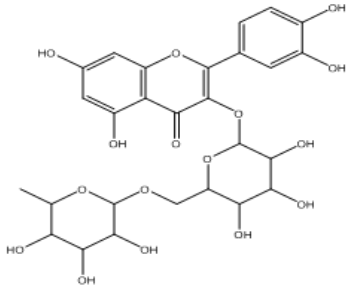
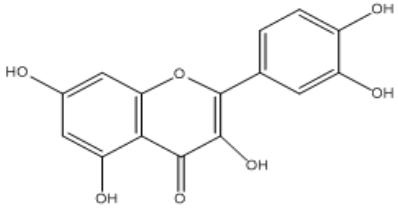
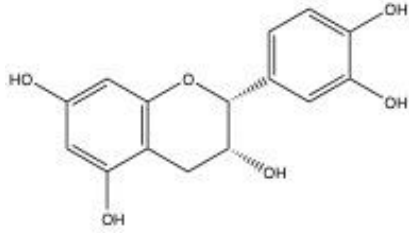
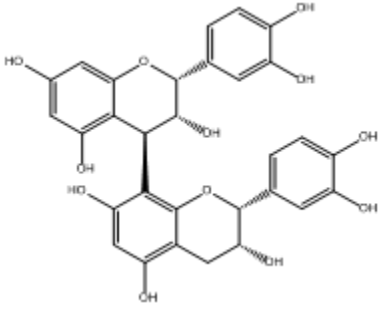
Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Triterpenoides		
Metilarjunolato (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Metilursolato (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido 3-O- <i>cis-p</i> - coumaroil-tormentico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005
Ácido 3-O- <i>trans-p</i> - coumaroil-tormentico (Hojas)		Banno <i>et al.</i> , 2005

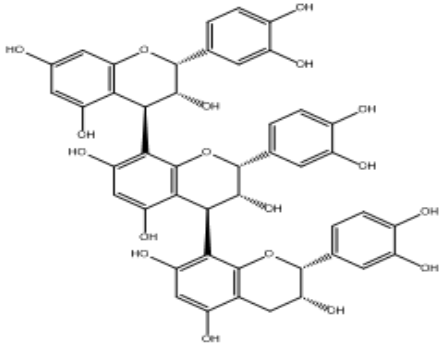
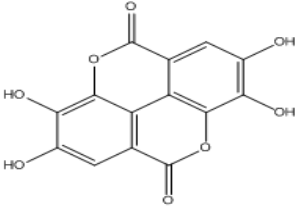
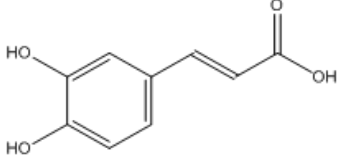
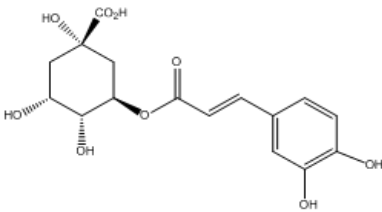
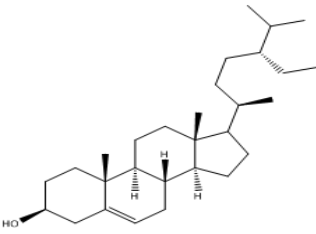
Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Triterpenoides		
<p>Ácido betulínico (Hojas)</p>		<p>Banno <i>et al.</i>, 2005</p>
<p>Betulinato de metilo (Hojas)</p>		<p>Banno <i>et al.</i>, 2005</p>
Sesquiterpeno glicósido		
<p>Loquatifolina A (Hojas)</p>		<p>Argueta <i>et al.</i>, 1994</p>
C₆-C₂ (glucósido cianogénico)		
<p>Amigdalina (Hojas y Semillas)</p>		<p>Zhou <i>et al.</i>, 2007</p>

Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Flavonoides		
<p>Rutina (Hojas)</p>		<p>Argueta <i>et al.</i>, 1994</p>
<p>Quercetina (Hojas)</p>		<p>Zhou <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>(-)- Epicatequina (Hojas)</p>		<p>Argueta <i>et al.</i>, 1994</p>
Polifenol		
<p>Procianidina B-2 (Hojas)</p>		<p>Hideyuki <i>et al.</i>, 2000</p>

Cuadro 2. Algunos compuestos químicos encontrados en *Eriobotrya japonica* (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Polifenoles		
Procianidina C-1 (Hojas)		Hideyuki <i>et al.</i> , 2000
Ácido elágico (Hojas y semillas)		Argueta <i>et al.</i> , 1994
Ácido fenólico		
Ácido cafeico (Semillas)		Yokota <i>et al.</i> , 2006
Ácido 5-clorogénico (Semillas)		Yokota <i>et al.</i> , 2006
Esteroides		
β-Sitosterol (Semillas)		Yokota <i>et al.</i> ; 2006

2.9 Biofilms.

2.9.1 Definición.

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte, y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes (Carpentier *et al.*, 1993; Costerton *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002). Las bacterias que forman los biofilms se hallan en lo que se denomina forma sésil, exhibiendo un fenotipo diferente al de esas mismas células en forma unicelular o libre (forma planctónica) con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes. Los microorganismos incluidos en ella son menos sensibles a la acción de antisépticos, antibióticos y fagocitosis (Donlan, 2002).

2.9.2. Formación de los biofilms.

La formación de los biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que su crecimiento ofrece cuatro ventajas importantes: (I) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2002).

En todos los medios donde existan bacterias se puede encontrar biofilms en el medio natural, clínico o industrial. Solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrofobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kraigsley *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2003). El desarrollo en biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad, se considera que en condiciones ambientales adecuadas la mayoría los microorganismos son capaces de formar biofilms (Donlan, 2002; Lasa *et al.*, 2009).

Por otra parte, estudios genéticos de los biofilms mono especie han demostrado que son formadas en múltiples pasos como se muestra en la **Figura 6**.

La etapa inicial del proceso de formación de los biofilms es la adherencia del microorganismo sobre la superficie, pero para que esto ocurra existe un prerequisite: la presencia de microorganismos en estado libre flotante en un medio acuoso, llamados microorganismos planctónicos. Inicialmente los microorganismos se asocian de manera reversible a la superficie y posteriormente se adhieren de forma irreversible (Waltnic *et al.*, 2000).

Durante la fase de adhesión se va a regular la expresión genética a través de varios sistemas de transducción por señales, que van a conducir hacia una cascada de diversas reacciones, permitiendo la inducción o inhibición de la transcripción de genes. Las moléculas que causan las señales, pueden ser inherentes al ambiente o ser desconocidas (Donlan, 2002). Así pues, la adhesión de las bacterias a las superficies se ve limitada por otras condiciones como se menciona en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Variables que afectan la adherencia celular y la formación de los biofilms (adaptado de Donlan, 2002).

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido	Propiedades de la célula
Textura	Velocidad del fluido	Hidrofobicidad de la superficie celular
Hidrofobicidad	pH	Fimbrias
Acondicionamiento del sustrato	Temperatura	Flagelos
	Nutrientes	Sustancias poliméricas extracelulares
	Presencia de agentes microbianos	

Los microorganismos adheridos comienzan a replicarse (y morir) y las SPE interaccionan con moléculas orgánicas e inorgánicas en el medio ambiente dando lugar al glicocálix. Esta replicación está controlada por factores como: pH, perfusión de oxígeno, osmolaridad (Dunne, 2002) y la acumulación de moléculas en la interfase sólido- líquido. En esta interfase existe una concentración mayor de moléculas de nutrientes en comparación con la encontrada en masa en el fluido, por lo tanto, la transferencia de nutrientes por difusión es más rápida a los microorganismos contenidos en el biofilm que a las bacterias planctónicas contenidas en la fase acuosa (Carpentier, 1993). Durante la reproducción bacteriana, el metabolismo de las bacterias adheridas produce desechos que sirven para el desarrollo de las células “hijas” (Dreeszen, 2003). Esto trae como consecuencia un aumento en la producción de SPE y por tanto, en el volumen del biofilm; cuando ésta madura la mayoría de su volumen (75-95 %) es ocupado por el glicocálix lleno de agua.

Cuando el biofilm alcanza una masa crítica las condiciones ambientales en los diferentes “niveles” de ésta cambian y en ocasiones se vuelven desfavorables provocando que algunas de las bacterias se vuelvan inactivas. Incluso, en algunos casos llegan a morir por la falta de fuente de carbono, la disminución del pH, variaciones en la concentración de oxígeno o por la acumulación de metabolitos tóxicos (Dunne, 2002). Por otro lado, algunas bacterias se desprenden para colonizar una superficie que provea un ambiente más favorable (Waltnic *et al.*, 2000).

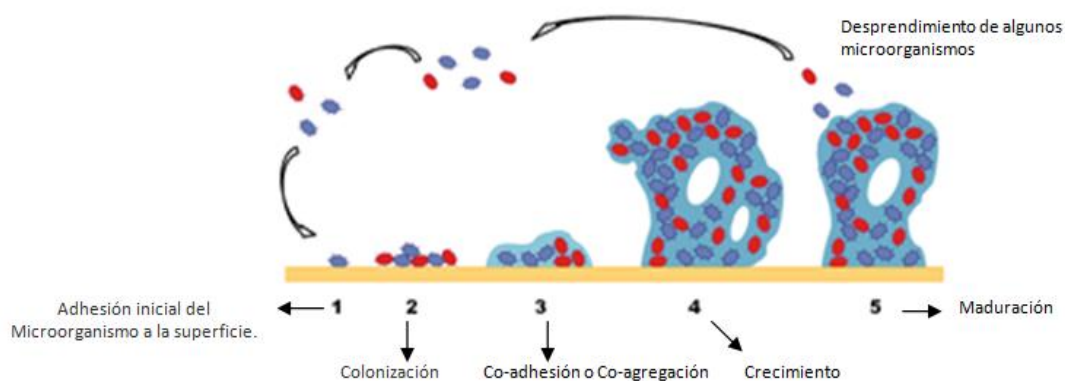


Figura 6. Fases de la formación de un biofilm. Tellez-P S. Los biofilms y su recuperación en la industria alimentaria. VISAVET Health Surveillance centre 2010.

2.10 *Escherichia coli*.

2.10.1 Descripción y clasificación.

Esta bacteria es capaz de formar biofilms forma parte del grupo de las enterobacteriáceas (*Enterobacteriaceae*) que son un grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales (Donlan, 2001; Brooks *et al.*, 2008). Esta bacteria se caracteriza por ser oxidasa negativa, catalasa positiva y reducir el nitrato a nitrito, es no formadora de esporas, anaerobia facultativa y usualmente tiene motilidad mediante flagelos aunque a veces carece de motilidad. Crece sobre peptona o medios con extracto de carne sin adición de cloruro de sodio ni otros complementos; crecen bien en agar MacConkey, forma colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos (Brooks *et al.*, 2008).

Escherichia coli es un miembro de la flora intestinal normal, incluso puede contribuir a la función normal del intestino y a la nutrición, por lo que es poco común que cause enfermedades, salvo cuando alcanza los tejidos fuera de su sitio normal en el intestino o en otros menos comunes, incluyendo el aparato urinario, vías biliares y otros en la cavidad abdominal (Brooks *et al.*, 2008).

Adicionalmente, origina diarrea (enteritis epidémica) con elevados índices de mortalidad entre la población infantil, así como meningitis y algunos casos neumonía.

2.10.2 Patogenicidad.

Escherichia coli puede estar involucrada en problemas gastrointestinales, así como en infecciones urémicas y neonatales. Dentro de las infecciones intestinales, las *E. coli* se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Las características generales de estos seis grupos se resumen en el **Cuadro 4**.

En el caso de *E. coli* enterotoxigénica se adquiere, al igual que los otros grupos patógenos de *E. coli*, por la ingestión de agua y alimentos contaminados. Las cepas de ETEC producen dos toxinas: LT (toxina termolábil) y ST (toxina termoestable), que actúan incrementando los niveles de Adenosina-5´-(AMPc) y Guanosina-5´-monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente; esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa.

En EPEC, se ha involucrado al *pilus* BFP (bundle-forming pilus) por sus siglas en inglés como un factor de virulencia característico que participa en el proceso infeccioso al promover la adherencia íntima a enterocitos; posteriormente se produce la polimerización de la actina del citoesqueleto, seguida de la destrucción de las microvellosidades. Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda.

En EIEC, el mecanismo de patogenicidad es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas; la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadenan el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*. La producción de diarrea aguda y crónica en niños se debe a la acción de las toxinas y a la adherencia al enterocito por sus fimbrias (Molina y Eslava, 2014).

Estudios epidemiológicos indican que el grupo EAEC está fuertemente asociado con síndromes diarreicos con duración de 0 a 2 semanas principalmente en niños (Nataro *et al.*, 1998). Cabe mencionar que la patogénesis de esta infección es parcialmente conocida. En varios modelos *in vivo* e *in vitro*, las cepas del grupo EAEC se adhieren a la mucosa del intestino delgado y grueso formando una biopelícula (Vial *et al.*, 1988; Tzipori *et al.*, 1992; Nataro *et al.*, 1996). Después se segregan una o más enterotoxinas, incluyendo la

enterotoxina de Shigella 1 (ShET1), la toxina codificada por plásmidos (Pet) que pueden inducir inflamación intestinal (Steiner *et al.*, 1998).

En el caso particular de la cepa patógena O42 ha demostrado que la adhesión a la mucosa del colon requiere la expresión del antígeno fimbrial AAF / II, lo que sugiere que esta adhesina es un factor de virulencia para la infección humana (Czeczulin *et al.*, 1997). La adherencia de tipo agregativo ha sido asociada con un plásmido de 65 mDa, que codifica para las fimbrias (AFF/I y AAF/II) de 2 a 3 nm de diámetro.

Cuadro 4. Características generales de las cepas de *Escherichia coli* patógenas.

Clasificación	Mecanismo de patogenicidad	Referencia
Enterotoxigénica (ETEC)	Produce al menos una de dos tipos de enterotoxinas: toxina termolábil (TL) y toxina termoestable (ST), éstas producen la salida de agua y iones.	Gillespie <i>et al.</i> , 2005. Rodríguez – Angeles, 2002.
Enteroagregativa (EAEC)	Las bacterias se adhieren a la mucosa intestinal, predominantemente del colon y forman un biofilm colonizando persistentemente el tracto gastrointestinal lo que ocasiona diarrea crónica.	Kaper <i>et al.</i> , 2004. Rodríguez-Angeles, 2002. Avelino <i>et al.</i> , 2010.
Enteroinvasiva (EIEC)	Se adhiere a las vellosidades de la mucosa invadiendo el epitelio del colon para después entrar por endocitosis a las células.	Rodríguez-Angeles, 2002.
Adherencia difusa (DAEC)	Se caracteriza por el desarrollo de grandes extensiones celulares que envuelven a las bacterias adheridas.	Kaper <i>et al.</i> , 2004.
Enteropatógena (EPEC)	Destruye las vellosidades del intestino delgado e interfiere con la cascada de señalización de las células hospederas.	Gillespie <i>et al.</i> , 2005.
Enterohemorrágica (EHEC)	Forma una verotoxina que cesa la síntesis de proteínas.	Kaper <i>et al.</i> , 2004.

3. Justificación.

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos de que ellas se extraen (Castillo-García, 2007).

Por otro lado, no se debe olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En este sentido, la fitoterapia se utiliza tanto en la prevención y en la mejora de la calidad de vida, como en el tratamiento de las enfermedades. En unos casos será suficiente para curar una patología y en otros será el coadyuvante de otras medicaciones, o ayudará a mejorar determinados síntomas asociados. Su principal campo de acción son las afecciones leves y moderadas, así como las enfermedades crónicas, y es útil por tanto en la terapia de más del 90% de las afecciones tratadas habitualmente en asistencia primaria (Castillo-García, 2007).

Es importante mencionar que la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por cultura o porque no existen otras opciones. Incluso en los países desarrollados (OMS, 2004), muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales debido a la detección de problemas de seguridad y falta de eficacia en los fármacos de síntesis así como al aumento de interés en lo natural. Por ejemplo, en encuestas de atención primaria de la salud, el 57% de los pacientes toma preparados fitoterápicos en sustitución del tratamiento médico convencional (Castillo-García, 2007).

Además, en la actualidad la falta de eficacia, el incremento de la resistencia, la toxicidad y el alto costo de los antibióticos comerciales ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales que permitan combatir procesos infecciosos que afectan a la mayor parte de la población. Por ejemplo, las enfermedades causadas por la enterobacteria *Escherichia coli* y en particular el interés por el serotipo

O44:H18, causante de diarrea en niños menores de 5 años en México, afecta por igual a ambos sexos, y a más del 80% de la población en países con bajos ingresos representando un problema de salud pública (OMS, 2013).

Escherichia coli es una especie predominante entre las bacterias anaerobias facultativas del tracto gastrointestinal (Costerton *et al* 1995). Con más de 250 serotipos, su estilo de vida comunitario y su amplia gama de herramientas genéticas han contribuido a establecer a *E. coli* como organismo modelo relevante para el estudio de la colonización superficial.

En este contexto, el estudio de especies vegetales, ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas desde el punto de vista estructural y que inhiben de manera notable la formación del biofilm, algunos ejemplos notables son los flavonoides, terpenoides y ácidos grasos (Calzada *et al.*, 2007). Estos hallazgos, en conjunto con la gran diversidad de especies vegetales en México, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos que actúen sobre las determinantes patogénicas de ciertos microorganismos como *Escherichia coli*, causantes de diarreas crónicas y trastornos gastrointestinales, tomando en cuenta que la tolerancia de los biofilms bacterianas a los agentes antimicrobianos tiene importantes consecuencias clínicas, ya que, actualmente más del 60% de las infecciones bacterianas están asociadas a formación de biofilms.

3.1 Objetivos.

3.1.1 Objetivo general.

Con base en los antecedentes descritos previamente el objetivo principal del proyecto de investigación consiste en identificar los compuestos mayoritarios presentes en las hojas del níspero (extracto metanólico) y determinar el efecto de los mismos sobre la formación de biofilms por la bacteria patógena *Escherichia coli* con la intención de contar con nuevos productos que puedan ser utilizados para el control de diarreas en la población mexicana.

El segundo objetivo planteado es determinar la capacidad antioxidante del extracto y los compuestos mayoritarios utilizando los ensayos de DPPH, ABTS y blanqueamiento de β -caroteno.

Para este fin se plantearon los siguientes objetivos particulares para el proyecto:

3.1.2 Objetivos particulares.

- Preparar el extracto metanólico de las hojas del níspero.
- Realizar el estudio químico del extracto metanólico que conlleve al aislamiento de los compuestos mayoritarios.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar el efecto del extracto metanólico derivado de las hojas del níspero sobre la formación del biofilm mono especie por la bacteria *Escherichia coli* O42 con el serotipo O44:H18.
- Evaluar el potencial antioxidante del extracto metanólico por medio del ensayo de decoloración del radical DPPH•.
- Evaluar el potencial antioxidante del extracto metanólico a través de catión radical ABTS^{•+}.
- Evaluar el potencial para detener la lipoperoxidación mediante el ensayo de decoloración de β -caroteno.

4. Desarrollo experimental.

4.1 Procedimientos generales de análisis.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ y 315 nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica (a 100 °C).

Se utilizaron 3 tipos de cromatografía:

- Cromatografía en columna al vacío (VLC: 10 cm × 20 cm) sobre gel de sílice.
- Cromatografía en columna de mediana presión (MPLC: 3 cm × 45 cm) sobre gel de sílice C-18 con tamaño de partícula 40-63 μm , malla 230-400 ASTM, en la cual se utilizó un sistema de elución 75:25 MeOH:H₂O.
- Cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20 (Fluka).

4.1.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.

Los análisis espectroscópicos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) en el edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron de un equipo Varian VRNMS 400, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en MeOH-*d*₄ y piridina-*d*₅. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.

La rotación óptica se midió en un polarímetro Jasco modelo P-1030 a 25 °C usando metanol.

Los espectros de masas se generaron en un equipo DFS (High Resolution Magnetic Sector MS) por impacto electrónico (IE) a 70 eV y en la modalidad FAB negativo y positivo en un equipo Thermo DFS.

4.2 Recolección de las hojas de níspero.

Las hojas de la especie de *Eriobotrya japonica* fueron recolectadas en el Campus de Ciudad Universitaria (Unidad de Investigaciones Antropológicas) en el mes de enero del 2014. El material vegetal se sometió a un proceso de limpieza y secado al aire libre a temperatura ambiente. El material vegetal fue identificado por la bióloga Irma Acosta del Instituto de Ecología de la UNAM. Un ejemplar de referencia se conserva bajo el código de acceso RP-001 en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la UNAM.

4.2.1 Preparación del extracto metanólico.

Las hojas de níspero (772.5 g) se molieron en un molino universal de fraccionamiento continuo (IKA JGO0007). El polvo obtenido se maceró con MeOH-H₂O en proporción 80:20 por 72 h. Posteriormente, el extracto obtenido se filtró y se evaporó el disolvente con ayuda de un rotaevaporador hasta sequedad, obteniéndose un sólido de color café verdoso. El extracto total seco tuvo un peso de 521 g.

4.2.2 Fraccionamiento primario del extracto del níspero.

Una porción de 300 g del extracto se suspendió en una mezcla MeOH:H₂O (9:1), posteriormente, la suspensión resultante se sometió a un proceso de reparto utilizando hexano (4 × 500 mL). Las particiones de hexano se juntaron y se concentraron al vacío. La fracción metanólica acuosa se concentró por separado. En el **Cuadro 5** se muestran las cantidades obtenidas para cada partición.

Cuadro 5. Cantidad obtenida en el fraccionamiento primario.

Nombre	Cantidad obtenida
Fracción de hexano	158.5 g
Fracción de MeOH acuoso	97.6 g

4.2.3 Fraccionamiento secundario del extracto del níspero a partir de la fracción de MeOH acuoso.

La fracción de metanol acuoso (97.6 g) se adsorbió en gel de sílice y se cromatografió en una columna al vacío (VLC: 10 x 20 cm). La elución se realizó utilizando un

gradiente de polaridad creciente con mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina, como resultado de este fraccionamiento se obtuvieron 19 fracciones de 500 mL cada una, reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica obteniéndose un total de nueve fracciones primarias denominadas (F1'-F9').

4.2.4 Obtención y purificación a partir de F2' de la (-)-epicatequina (C-1).

La fracción F2' (0.4225 g) se disolvió en 2 mL de MeOH y se cromatografió en una columna abierta sobre Sephadex LH-20 (2 × 60 cm). La elución se realizó de manera isocrática con metanol. Se recolectaron 10 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de 4 fracciones. De la fracción F2'-3 precipitó un sólido amarillo claro (0.3442 g) que se caracterizó por RMN-H¹ y EM como la (-)-epicatequina (C-1).

4.2.5 Fraccionamiento terciario a partir de F4'.

Se pesó 1.0 g de la fracción F-4' la cual se disolvió en 5 mL de MeOH y se cromatografió en una columna de mediana presión C-18 (3 × 45 cm). La elución se realizó empleando una mezcla de MeOH-H₂O (75:25). Se recolectaron 20 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica obteniéndose un total de 10 fracciones secundarias denominadas (F4'1 - F4'10).

4.2.6 Obtención y purificación del ácido corosólico (C-3) a partir de F4'-7.

La fracción denominada F4'-7 (0.1629 g) se disolvió en metanol y se cromatografió en una columna abierta de Sephadex LH-20 (2 × 60 cm). La elución se realizó de manera isocrática con metanol. Se recolectaron 9 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de 3 fracciones (F4'7.1 - F4'7.3). De la fracción F4'7.3 precipitó un sólido de color blanco (0.0659 g) que se caracterizó mediante el uso de RMN y EM como ácido corosólico (C-3).

4.2.7 Obtención y purificación del ácido ursólico(C-2) a partir de F4'-9.

La fracción F4'-7 (0.1629 g) se disolvió en metanol y se recromatografió en una columna abierta de Sephadex LH-20 (2 × 60 cm). La elución se realizó de manera isocrática con metanol. Se recolectaron 9 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud

cromatográfica para dar un total de 2 fracciones (F4'9.1 - F4'9.2). De la fracción F4'9.2 precipito un sólido de color blanco (0.0659 g) que se caracterizó por RMN y EM como ácido ursólico (C-2). En la **Figura 7** se resume el procedimiento experimental del estudio químico del extracto de las hojas del níspero.

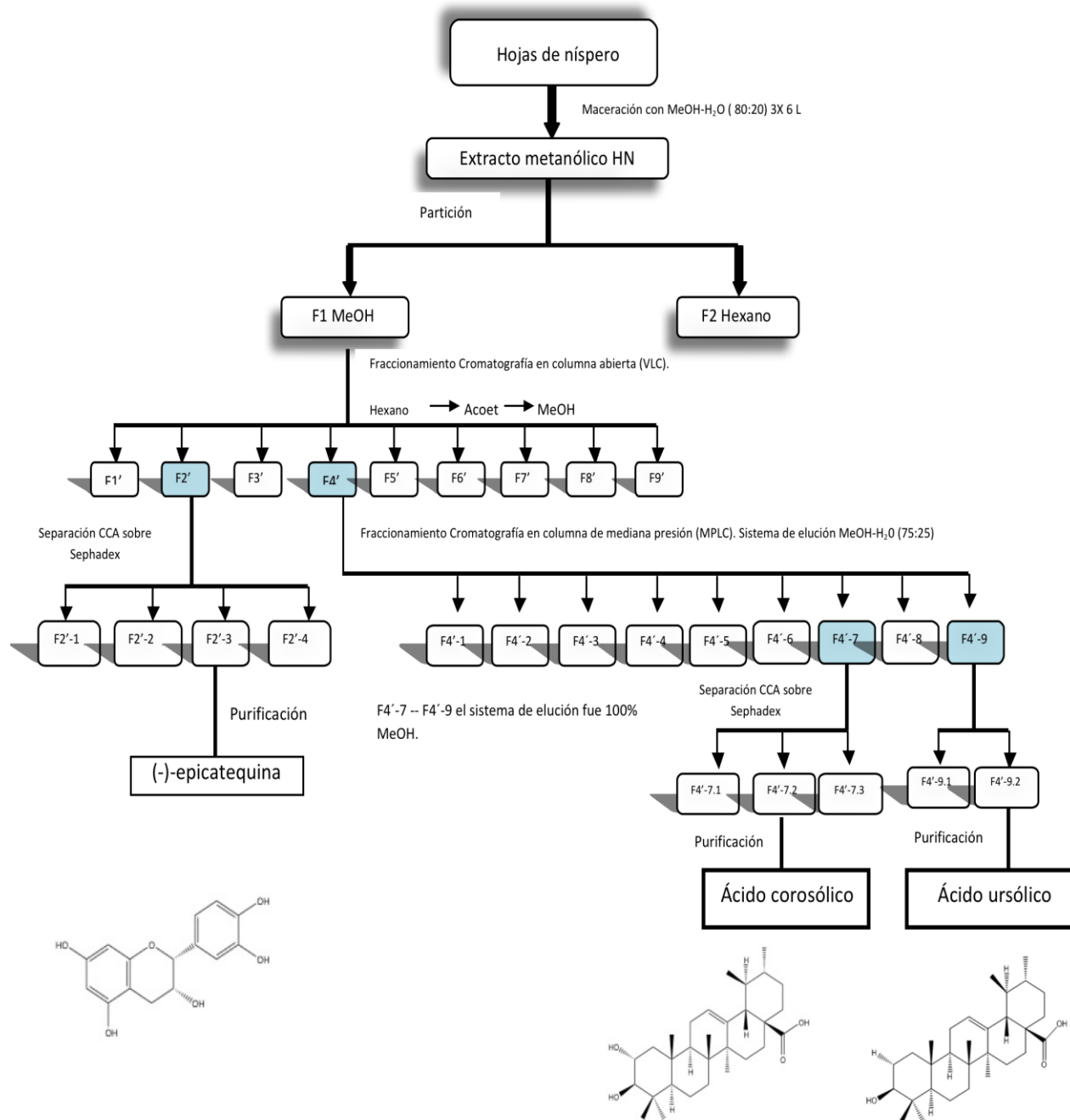


Figura 7. Procedimiento experimental del estudio químico del EMHN.

4.3 Ensayo de inhibición de formación del biofilm.

4.3.1 Estandarización del método.

Para este ensayo se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42 con el serotipo O44:H18. Las células bacterianas se transfirieron por separado de un tubo de ensayo a cajas Petri con medio BHI (Brain Heart Infussion) y se incubaron a 37°C por 24 h. Se tomaron colonias aisladas y se prepararon suspensiones bacterianas con solución salina estéril al 0.85 % y se ajustó a 67-77 % de transmitancia en un colorímetro Vitek (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter) que corresponde a 3×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

En la primera fase de esta parte del estudio se definió el tiempo óptimo para la formación del biofilm. Los tiempos de incubación de los cultivos bacterianos seleccionados fueron: 24, 48 y 72 h, en cada tiempo los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Para el estudio se emplearon placas de 24 pozos (Costar Corning Incorporated NY; USA), que se inocularon con 50 μ L del cultivo bacteriano previamente ajustado en 1000 μ L de dos medios de cultivo D-MEM y BHI. Lo anterior para definir cuál de éstos favorecía la formación del biofilm. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C a los tiempos referidos, concluido cada periodo se retiraban de la incubadora y se procedía a evaluar la formación del biofilm. Para la cuantificación del biofilm, se utilizó el método descrito por Stepanović y colaboradores con modificaciones de acuerdo a lo descrito por Burmølle y su equipo de colaboradores.

Para conocer si se formaban los biofilms, el contenido de cada uno de los pozos se retiró con una pipeta Pasteur, posteriormente para eliminar las bacterias que no se integraron al biofilm (planctónicas), se hizo un lavado por triplicado de cada pozo con solución salina estéril al 0.85%. Una vez realizados los lavados, a cada pozo se le agregó 1.0 mL de cristal violeta al 1% y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Este colorante se une a moléculas cargadas negativamente, incluyendo ácidos nucleicos y polisacáridos, de ahí que sirva como una medida general para evaluar la formación de biofilm (Burmølle *et al.*, 2006). Una vez transcurridos los 20 minutos, el colorante se retiró

con una pipeta Pasteur y se realizaron nuevamente tres lavados para eliminar el colorante no fijado al biofilm.

El cristal violeta adherido se disolvió en 1 mL de etanol al 96%, y el contenido de cada pozo se colocó en celdas de plástico con ayuda de una pipeta Pasteur para tomar la lectura de densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2). El ensayo se realizó por duplicado en dos ocasiones diferentes tanto en la fase de estandarización como posteriormente en la evaluación de la actividad de los compuestos (extracto metanólico de las hojas de níspero, ácido ursólico y (-)-epicatequina) y en la concentración mínima inhibitoria. De los resultados obtenidos en cada ensayo se eliminaron los datos que dieron las lecturas más altas y más bajas (D.O. 570 nm), se consideró la media para definir la desviación estándar y se calculó la p para definir si los resultados eran significativos ($p < 0.05$).

4.3.2 Inhibición de la formación de biofilms (ensayo con *Escherichia coli*).

Este ensayo, se realizó de acuerdo a lo descrito previamente durante la estandarización del procedimiento. En esta fase del estudio se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42 con el serotipo O44:H18. Las células bacterianas de *Escherichia coli* se transfirieron de un tubo de ensaye a cajas Petri con medio BHI (Brain Heart Infussion) y se incubaron a 37°C por 24 h. Se tomaron colonias aisladas y se prepararon suspensiones bacterianas con solución salina estéril al 0.85% y se ajustó a 67-77% de transmitancia en un colorímetro Vitek (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter) que corresponde a 3×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ mL).

Para evaluar la actividad del extracto metanólico de las hojas del níspero y posteriormente de los compuestos ácido ursólico y (-)-epicatequina, se realizó el siguiente procedimiento: en placas de 24 pozos (Costar Corning Incorporated NY; USA) se colocó la cantidad necesaria de medio BHI (900, 990, 999 μ L) y la correspondiente de cada uno de los compuestos (100, 10 y 1 μ L) por separado, para obtener las concentraciones de 200 μ g/mL, 20 μ g/mL y 2 μ g/mL tanto del extracto metanólico de las hojas del níspero como de los compuestos ácido ursólico y (-)-epicatequina, el volumen final para cada pozo fue de

1 mL, al cual se le adicionaron 50 μ L de la suspensión bacteriana previamente preparada. En los diferentes ensayos se utilizaron varios testigos: pozos únicamente con medio de cultivo sin inocular, un testigo de la cepa de *E. coli* para crecimiento bacteriano y de la formación del biofilm (positivo), pozos con medio BHI, pozos con cada uno de los compuestos y los disolventes utilizados para solubilizarlos. Estos últimos se utilizaron sin inocular la bacteria, para verificar que no existiera alguna contaminación de los mismos y que ésta influyera en los resultados finales, además se incluyeron otros pozos con disolvente e inoculados con la bacteria, para corroborar que los disolventes no fuesen los responsables de inhibir la formación del biofilm. En el ensayo se evaluó si en la actividad de los compuestos analizados influía su adición previa a los pozos, para ello se realizaron dos variantes, en la primera se agregó el compuesto a probar y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de colocar el medio de cultivo y las bacterias, en el segundo se adicionó el medio de cultivo junto con el compuesto justo antes de agregar el cultivo de bacterias. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h que fue el tiempo óptimo para la formación del biofilm.

4.3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas del níspero y de los compuestos aislados contra *Escherichia coli*.

Para evaluar si el efecto de inhibición del biofilm estaba relacionado con un efecto antimicrobiano del extracto metanólico, el ácido ursólico y la (-)-epicatequina, se realizó un ensayo de concentración inhibitoria mínima en placa de 96 pozos. Para esta fase se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42, ésta se sembró en placas de agar BHI y se incubó a 37 °C durante 18 h, para ajustar el inóculo se seleccionaron de dos a tres colonias que fueron suspendidas en solución salina (0.85%) hasta 67-77% de transmitancia en un colorímetro (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter).

En el ensayo se evaluaron el extracto metanólico de las hojas del níspero, el ácido ursólico y la (-)-epicatequina, además se utilizó un control sin inocular, un control de crecimiento bacteriano para *E. coli*, controles con ampicilina y gluconato de clorhexidina,

así como controles de los compuestos a evaluar y de los antimicrobianos, para corroborar que éstos no estuvieran contaminados e influyeran en los resultados finales.

A cada uno de los pozos de las placas se adicionaron 100 μL de medio BHI (doble concentración), posteriormente en cada una de las filas (A-H) de la columna 1 de las placas se colocaron 100 μL de cada compuesto o de cada control, alcanzando una concentración inicial de 1 mg/mL tomando en cuenta el volumen de medio BHI añadido. Se prosiguió realizando diluciones sucesivas de 100 μL hasta llegar a la columna 12. Finalmente, se añadieron 100 μL de la suspensión bacteriana de *E. coli* y las placas se incubaron por 24 h a 37 °C.

Una vez transcurrido ese tiempo, para conocer el efecto sobre la viabilidad de la bacteria y definir la CMI de cada pozo se tomaron 5 μL del cultivo y se sembraron por goteo en cajas Petri con medio BHI, las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C para que al concluir este tiempo se analizara la presencia o no de crecimiento bacteriano.

4.4 Cuantificación del contenido de fenoles totales.

La determinación de fenoles totales se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu reportada por Singleton y cols. (1999) con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos, se adicionaron 160 μL de H_2O desionizada, 20 μL de reactivo Folin (fosfomolibdato y fosfotungstato) y 20 μL de la disolución del extracto metanólico y se mantuvo 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 10 μL de una solución de Na_2CO_3 al 20% y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad por 1 h. La lectura de la absorbencia se realizó en un espectrofotómetro a 700 nm.

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico (mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra).

Cada determinación, tanto del extracto de las hojas del níspero como la curva de calibración, se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones \pm desviaciones estándar.

4.5 Cuantificación de flavonoides totales.

La cuantificación de flavonoides totales se realizó de acuerdo a la técnica de Kumazawa y cols. (2004), con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos se agregaron 100 μ L de la muestra y 100 μ L de una solución etanólica de AlCl_3 al 2%.

Se incubó la mezcla de reacción por 1 h y se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro a 415 nm.

Se realizó una curva de calibración de quercetina en un rango de concentración de 10-60 mg/mL con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de quercetina (mg de equivalentes de quercetina/g muestra).

Cada determinación, tanto del extracto de las hojas del níspero como la curva de calibración, se realizó por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones \pm desviaciones estándar.

4.6 Evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se evaluó por medio de la capacidad de neutralización del radical DPPH^\bullet y del radical peroxilo.

4.6.1 Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^\bullet).

Se utilizó el método descrito por Habsah y cols. (2004) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 100 μ L de una disolución 0.208 mM de DPPH^\bullet y 100 μ L de una disolución metanólica del extracto total. Se midió la absorbencia al cabo de 30 minutos en un espectrofotómetro a 540 nm.

4.6.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del catión radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

La determinación de la capacidad inhibitoria del catión radical ABTS^{•+}, se realizó empleando el método descrito por Kriengsak y colaboradores (2006) con algunas modificaciones. El catión radical se forma por la oxidación de la solución 7 mM de ABTS con una solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2.5 mM. La solución se conservó en ausencia de la luz hasta la utilización de esta. La prueba se realizó en una placa de 96 pozos, se adicionaron 20 µL de la muestra a diferentes diluciones (1mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL y 0.01 mg/mL) y 180 µL de la solución de ABTS^{•+} ajustada a una absorbencia de 0.70 a una longitud de onda de 700 nm. La placa se dejó incubar durante 6 minutos. Se realizó la lectura a 700 nm en un lector de ELISA BIORAD BENCHMARK. Cada muestra se realizó por triplicado. Se realizó una curva de calibración del antioxidante comercial Trolox, cuya concentración fue de 0 a 100 nm.

4.6.3 Ensayo de decoloración de β-caroteno.

Se utilizó el método descrito por Wang y cols. (2008) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consiste en una emulsión de β-caroteno de 1.0 mg/mL en CH₂Cl₂, ácido linolénico, Tween 40 y H₂O desionizada, a la cual se adicionó la disolución acuosa del extracto metanólico de la hoja de nísero a una concentración de 0.5 mg/mL. Se realizó la lectura inicial en el espectrofotómetro a 470 nm y posteriormente se sometió la mezcla de reacción a Baño María a 50 °C por 1 h, al cabo de la cual se realizó la segunda medición, utilizando como blanco una emulsión de ácido linolénico, Tween 40 y H₂O desionizada. Como estándar se usó Trolox® 0.5 mg/mL.

5. Resultados y Discusión.

En el presente proyecto de investigación se realizó el estudio químico y se determinó el efecto del extracto metanólico de las hojas del níspero recolectadas en la Unidad de Investigaciones Antropológicas en el Campus de Ciudad Universitaria sobre el crecimiento y formación de biofilms por la bacteria *E. coli* O42 serotipo O44:H18.

Las hojas del níspero se seleccionaron para su estudio con base en los usos descritos en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, (Banno *et al.*, 2005). Por otra parte, el extracto metanólico preparado a partir de las hojas presentó una notable actividad sobre el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* O42 con el serotipo O44:H18 con una CMI de 125 µg/mL y sobre la formación del biofilm mono especie por esta bacteria enteroagregativa. Adicionalmente, se realizaron las determinaciones de contenido de fenoles, flavonoides totales y la capacidad antioxidante (captura del radical DPPH[•], catión radical ABTS^{•+} y decoloración de β-caroteno) del extracto metanólico de las hojas del níspero (EMHN).

5.1 Caracterización estructural de metabolitos aislados.

Los resultados obtenidos en los ensayos preliminares permitieron seleccionar al níspero para realizar el estudio químico de su extracto metanólico. Como resultado de este estudio se aislaron el flavan-3-ol (-)-epicatequina (**C-1**), y los triterpenoides ácido ursólico (**C-2**) y ácido corosólico (**C-3**) como compuestos mayoritarios. Para la caracterización de las estructuras químicas de los compuestos aislados se usaron métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación, se discutirá la caracterización estructural de los compuestos aislados (**C-1 - C-3**).

5.1.1 Caracterización estructural de (-)-epicatequina (C-1).

El compuesto **C-1**, se aisló como un polvo de color amarillo claro soluble en metanol. La estructura se determinó utilizando técnicas espectroscópicas, espectrométricas y quiroópticas. En las **Figuras 8 y 9** se muestran los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente. Estos espectros mostraron el perfil típico de un flavonoide del tipo flavan-3-ol (Davis *et al.*, 1996). A continuación, se enumeran las señales más relevantes del espectro de ^1H -RMN:

1. En la región aromática del espectro se observaron dos dobletes en δ_{H} 5.95 (d, $J= 2.4$ Hz, H-6) y 5.92 (d, $J= 2.4$ Hz, H-8) asignables a los protones de las posiciones H-6 y H-8 del anillo A, respectivamente.
2. En δ_{H} 6.98 (d, $J= 2.0$ Hz, H-2') y δ_{H} 6.76 (d, $J= 8.0$ Hz, H-5') se observaron dos señales dobles que integraban para un protón cada una, asignables a los protones H-2' y H-5' del anillo B del flavonoide, respectivamente. Por último, en δ_{H} 6.81 (dd, $J= 8.0$ Hz, 2.0 Hz, H-6') un doble de dobles asignable al protón H-6' del mismo anillo B.
3. En δ_{H} 4.81 se observó un singulete ancho asignable al protón H-2 del flavan-3-ol.
4. En δ_{H} 4.17 un multiplete asignable al protón H-3 del flavan-3-ol.
5. En δ_{H} 2.85 (1H, dd, $J= 16.4, 3.6$ Hz, H-4 α) y 2.73 (1H, dd, $J= 16.4, 3.6$, H-4 β) se observaron dos señales dobles asignables a los protones H-4 α y H-4 β del flavan-3-ol. Estos valores se compararon con los descritos por Davis y colaboradores (1996) y Shahat (2006) para la (-)-epicatequina y la (+)-catequina y resultaron ser idénticos a los reportados para la (-)-epicatequina.

El espectro de ^{13}C -RMN, (**Figura 9**), mostró el perfil típico para una catequina y resultó idéntico a las descritas por Davis y colaboradores para la (-)-epicatequina. En el **Cuadro 6** se resumen los desplazamientos químicos y la asignación de los carbonos.

Por último, para confirmar la presencia de la (-)-epicatequina se le midió la rotación óptica al compuesto **C-1** y el valor obtenido en metanol para una concentración de 1 mg/mL fue de -53.6° . Este valor es comparable al descrito por Kashiwada (1990) para la (-)-epicatequina. Con base en las evidencias presentadas el compuesto **C-1** se caracterizó como la (-)-epicatequina.

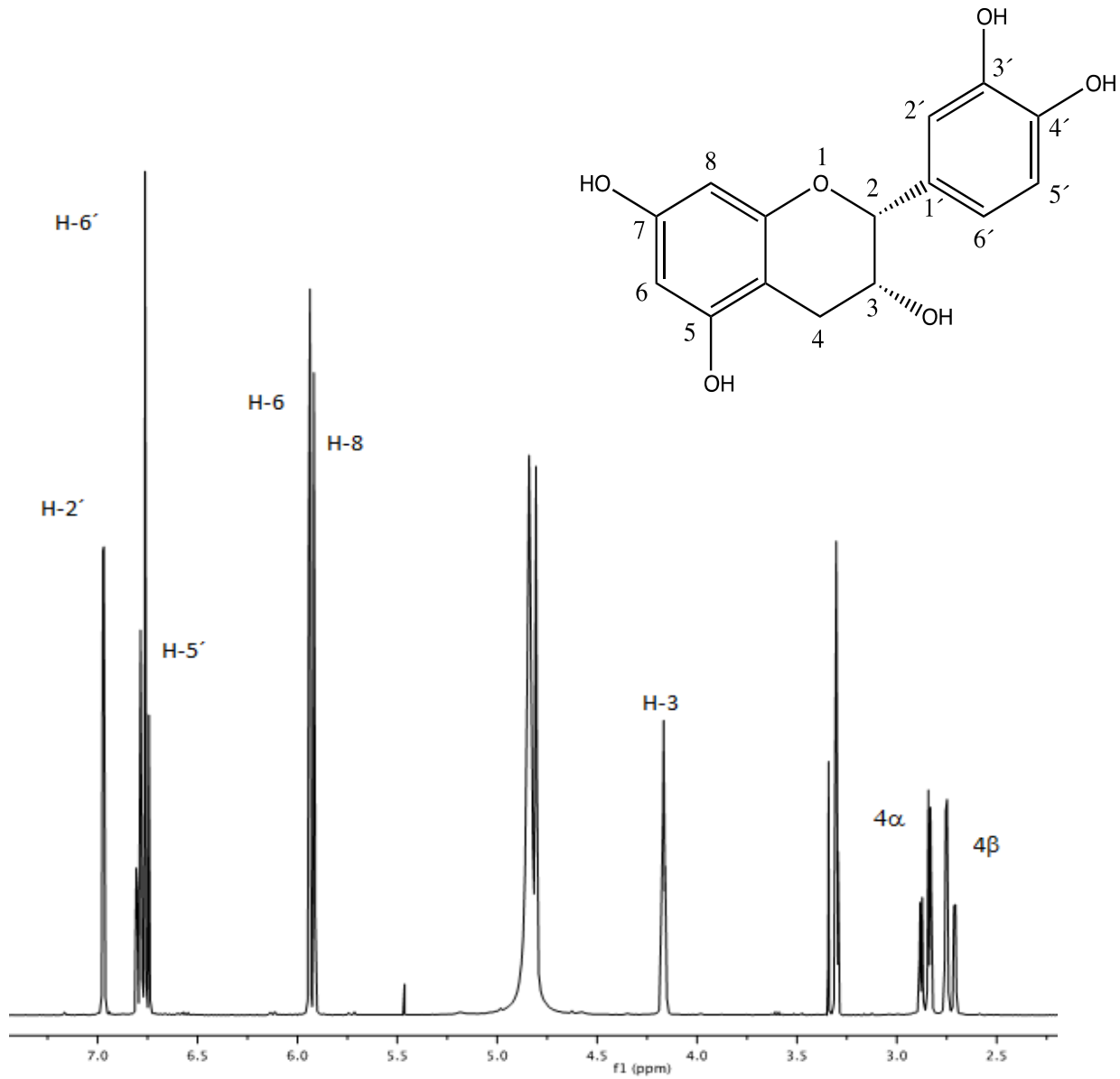


Figura 8. Espectro RMN- ^1H de la (-)-epicatequina (C-1), $\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz.

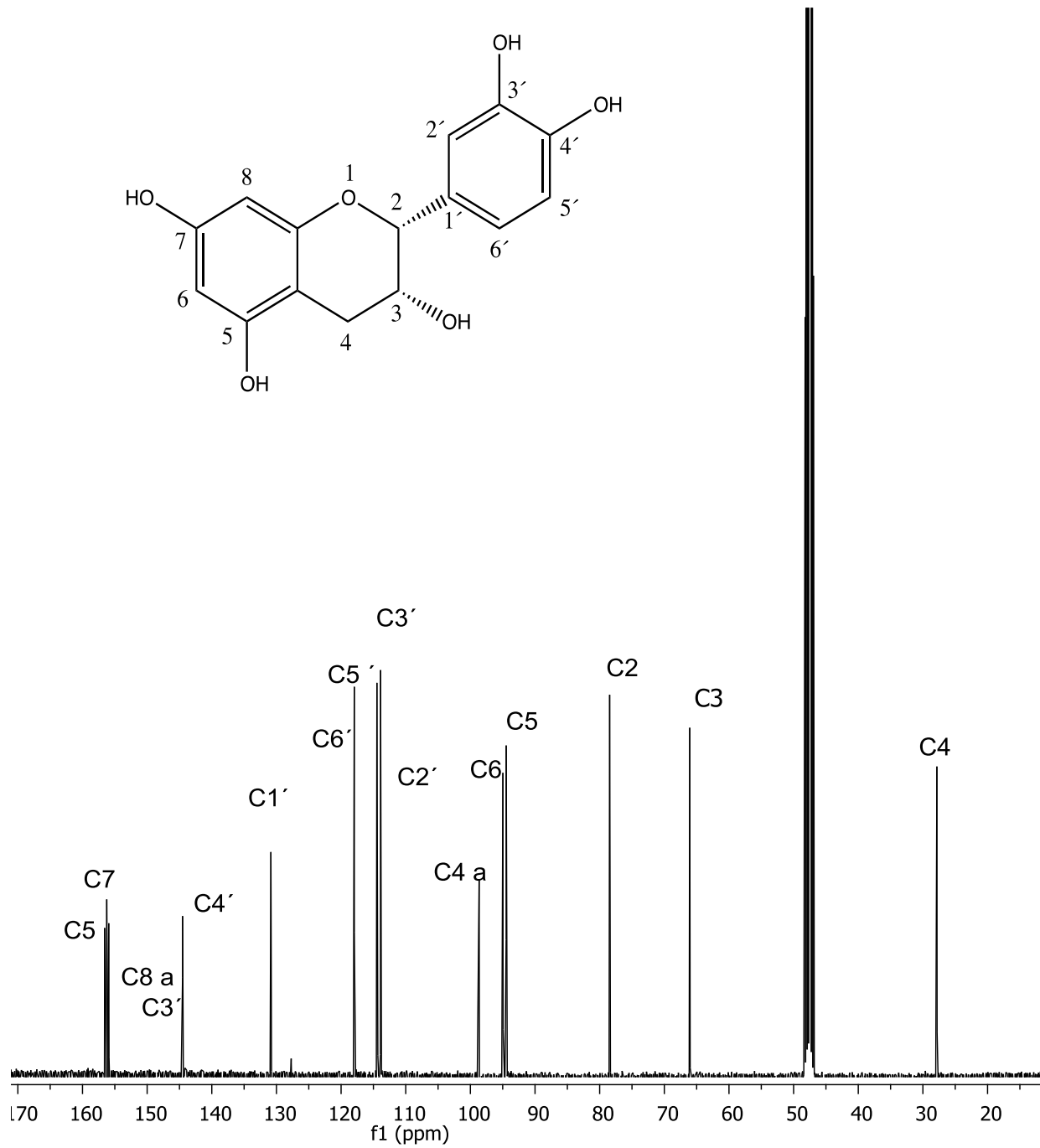


Figura 9. Espectro ¹³C-RMN de la (-)-epicatequina (C-1), MeOH-d₄, 100 MHz.

Cuadro 6. Datos espectroscópicos y espectrométricos de la (-)-epicatequina.

Fórmula	C₁₅H₁₄O₆
Estructura	
¹H RMN	(400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) δ _H 5.95 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, H-6), 5.92 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, H-8), 6.76 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-5'), 6.98 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-2'), 6.81 (dd, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2.0 Hz, H-6'), 4.81 (H-2), 4.17 (H-3), 2.85 (1H, dd, <i>J</i> = 16.4, 3.6 Hz, H-4 α), 2.73 (1H, dd, <i>J</i> = 16.4, 3.6, H-4β).
¹³C RMN	(100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) δ _C 79.4 (C-2), 66.9 (C-3), 29.1 (C-4), 99.8 (C-4a), 96.2 (C-6), 95.7 (C-8), 157.6 (C-7) 157.1(C-8a), 132.3 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.4 (C-3'), 145.3 (C-4'), 115.5 (C-5').
FAB-EM modo positivo (<i>m/z</i>)	291[M+H] ⁺

5.1.2 Caracterización estructural del ácido ursólico (C-2).

El compuesto **C-2** se aisló como un sólido de color blanco ligeramente soluble en MeOH caliente. Su fórmula molecular se estableció como $C_{30}H_{48}O_3$ con base en su espectro de masas que mostró un ion molecular de m/z 456 (**Figura 12**) y en sus espectros de 1H -RMN (**Figura 10**) y ^{13}C -RMN (**Figura 11**). A continuación se describen las señales más relevantes encontradas en los espectros de RMN:

1. En el espectro de 1H -RMN, se observó la presencia de una señal ancha en δ_H 5.52 asignable a un metino olefínico. Esta señal mostró una correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 126.1 (**Figura 14**).

2. En δ_H 3.48 (dd, $J= 9.6, 6.0$ Hz, H-3) se observó un doble de dobles que integra para un protón asignable a un metino oxigenado. Esta señal mostró correlación en el espectro de HSQC (**Figura 14**) con la señal en δ_C 78.6 y se asignó al C-3. En el espectro de HMBC (**Figura 15**) se pudo observar el acoplamiento del carbono terciario en 78.6 ppm (C-3) con los protones en δ_H 1.27 y 0.92 pertenecientes a los metilos de los C-23 y C-24 del anillo A del triterpeno.

3. En δ_H 1.02 ($J= 6.4$ Hz, H-29) y δ_H 0.97 ($J= 6.4$ Hz, H-30) se observaron dos dobletes que integraban para tres protones cada uno, asignables a dos metilos alifáticos. Estas señales mostraron correlación en el espectro de HSQC (**Figura 14**) con las señales en δ_C 17.9 ppm y 21.9 ppm correspondientes a protones de los metilos H-29 y H-30 del triterpeno.

4. Por último, se observaron cinco señales simples en δ_H 1.27 (H-23), 1.26 (H-27), 0.92 (H-24), 1.08 (H-25), 1.05 (H-26) asignables a los metilos cuaternarios.

El espectro de ^{13}C -RMN, (**Figura 11**), mostró la presencia de 30 señales y es consistente con un compuesto de naturaleza triterpénica. Las señales más relevantes corresponden a un grupo carbonilo de ácido en δ_C 180.4 (C-28) un carbono cuaternario olefínico en δ_C 139.8 (C-13), un metino olefínico en δ_C 126.0 (C-12), un metino oxigenado en δ_C 78.6 (C-3), y siete metilos (δ_C 29.3, 24.4, 21.9, 18.0, 17.9, 17.1, 16.2).

El espectro de masas (**Figura 12**), mostró un pico intenso correspondiente al ion molecular [M^+] a m/z de 456, congruente con la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. El pico base correspondió a la m/z de 248, otros fragmentos detectados fueron los de m/z 438, 411, 203 y 189. Todos estos datos espectroscópicos coincidieron con los reportados por diferentes autores para el ácido ursólico (Hamazh *et al.*, 1998).

Con base en las evidencias descritas se concluyó que el compuesto **C-2** es un triterpenoide pentacíclico de tipo ursano y se identificó como ácido ursólico a partir de la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura (Houghton *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2005).

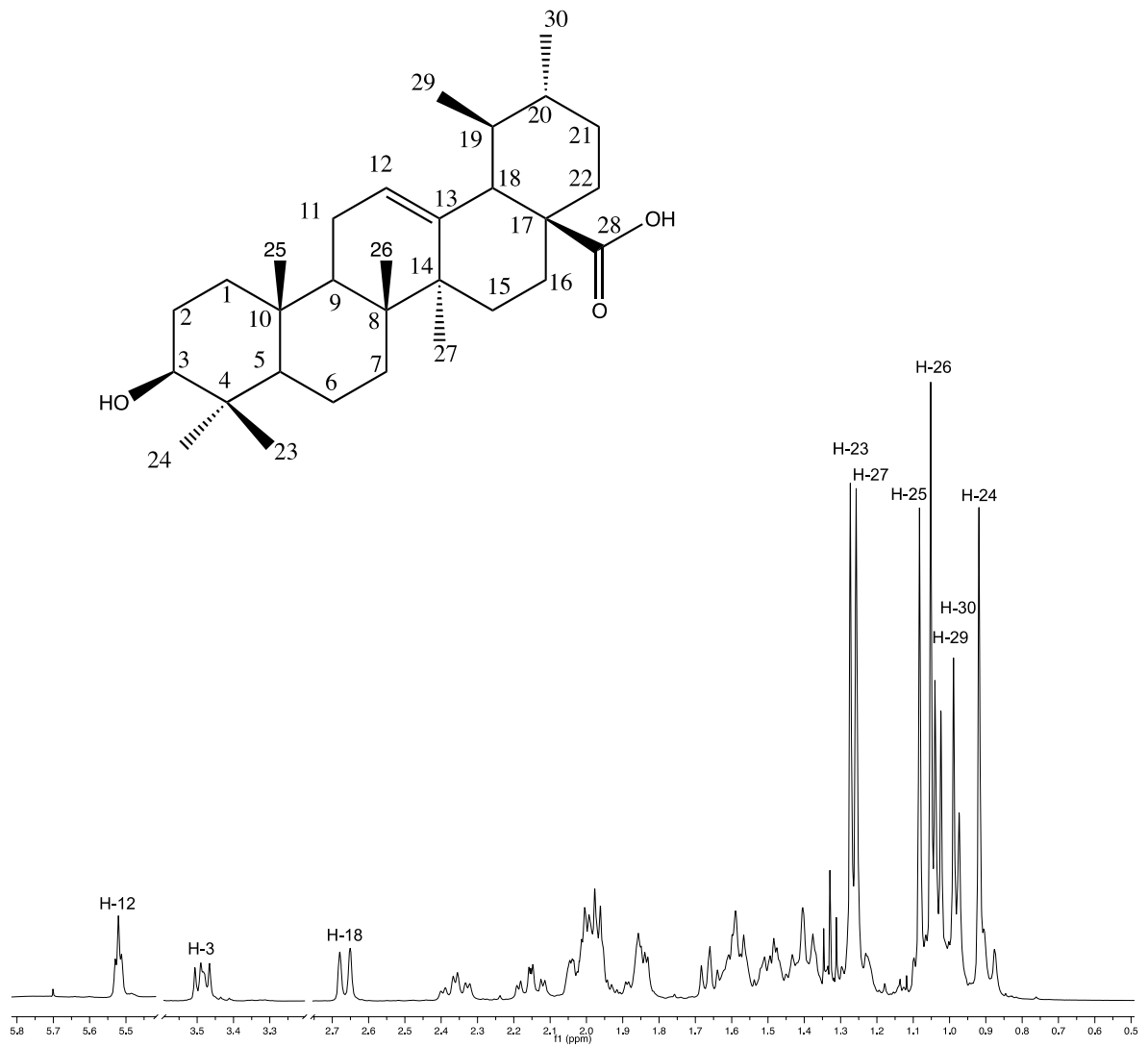


Figura 10. Espectro ^1H -RMN del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.

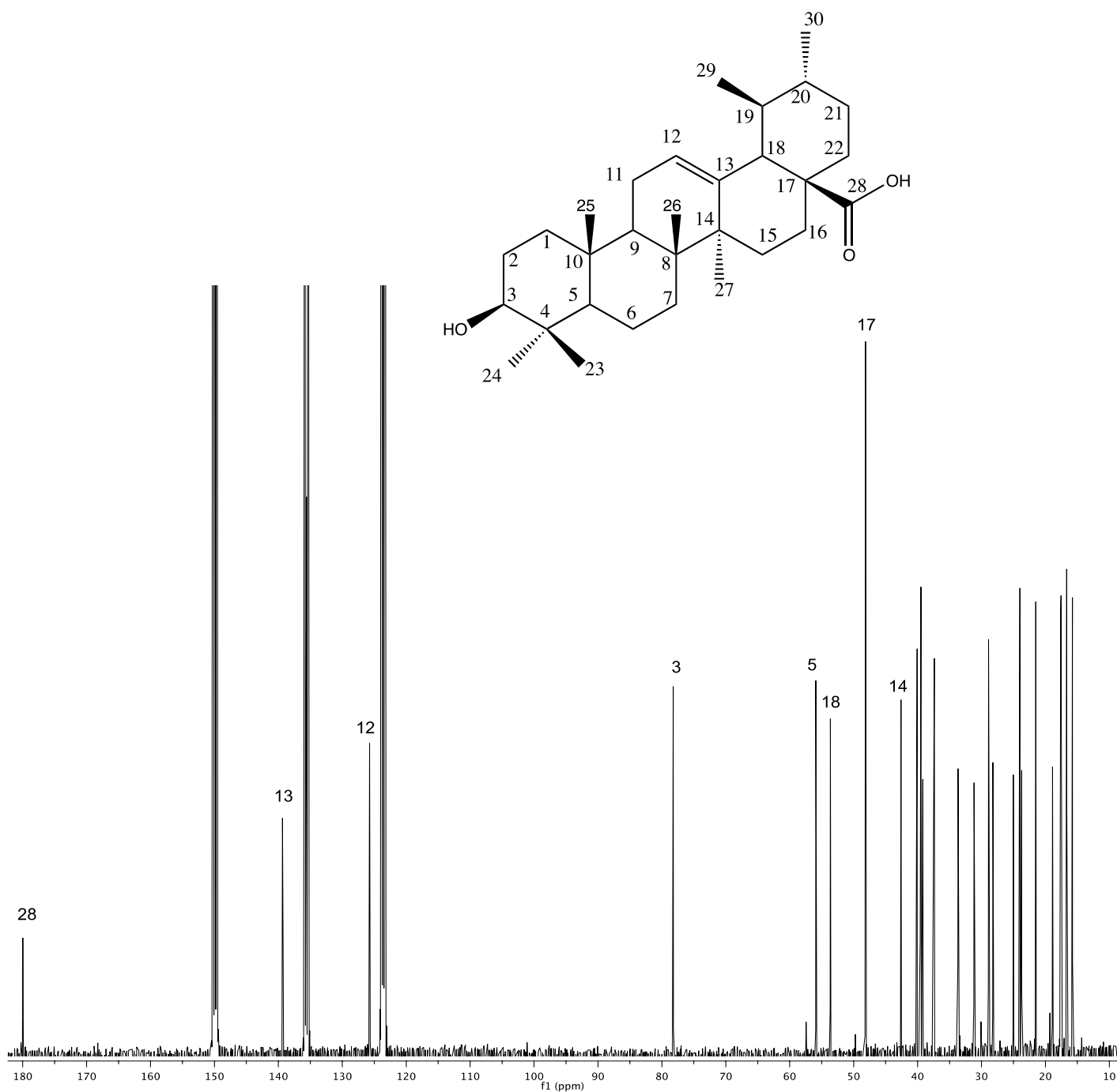


Figura 11. Espectro ^{13}C -RMN del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 100 MHz.

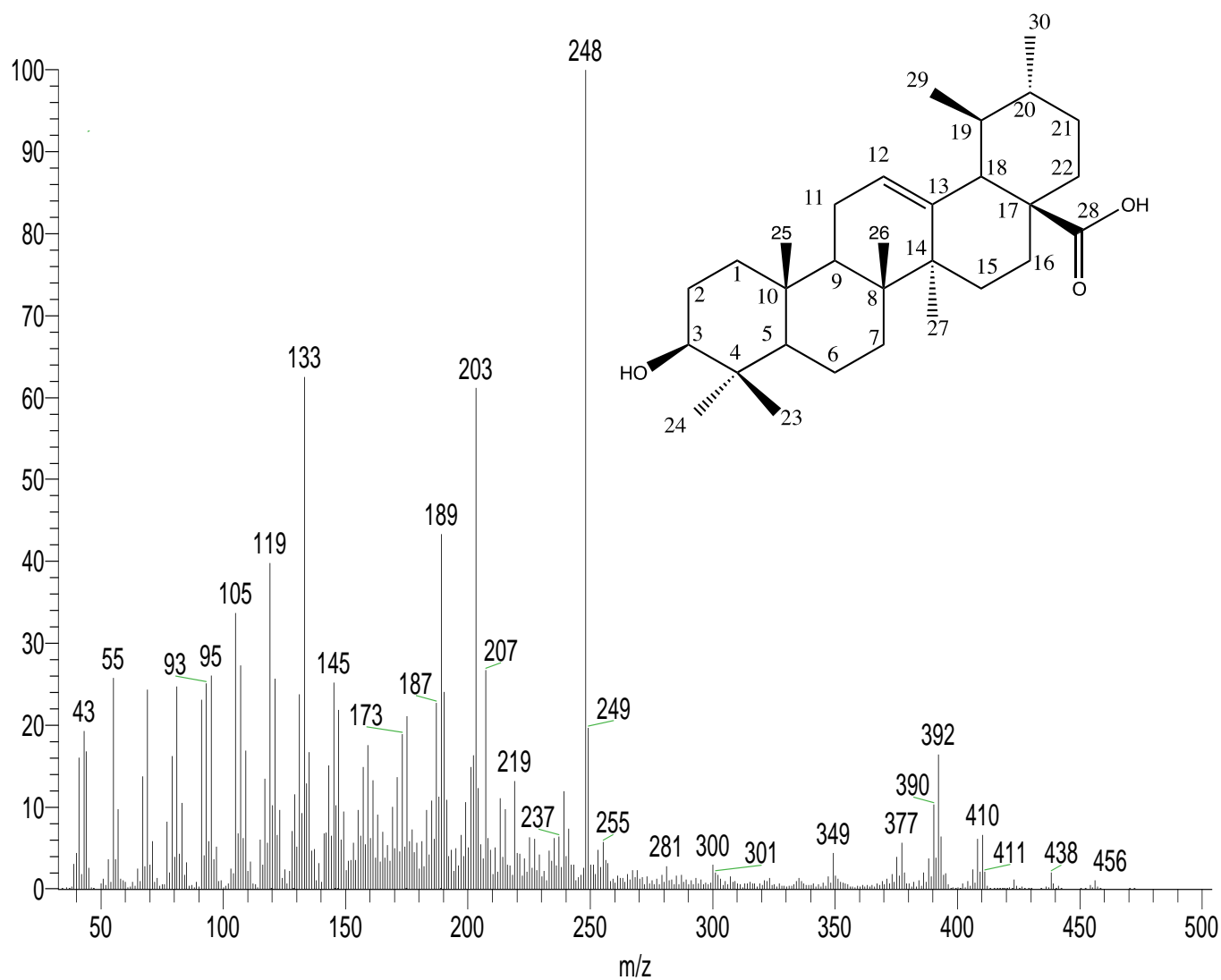


Figura 12. Espectro de masas del ácido ursólico (C-2).

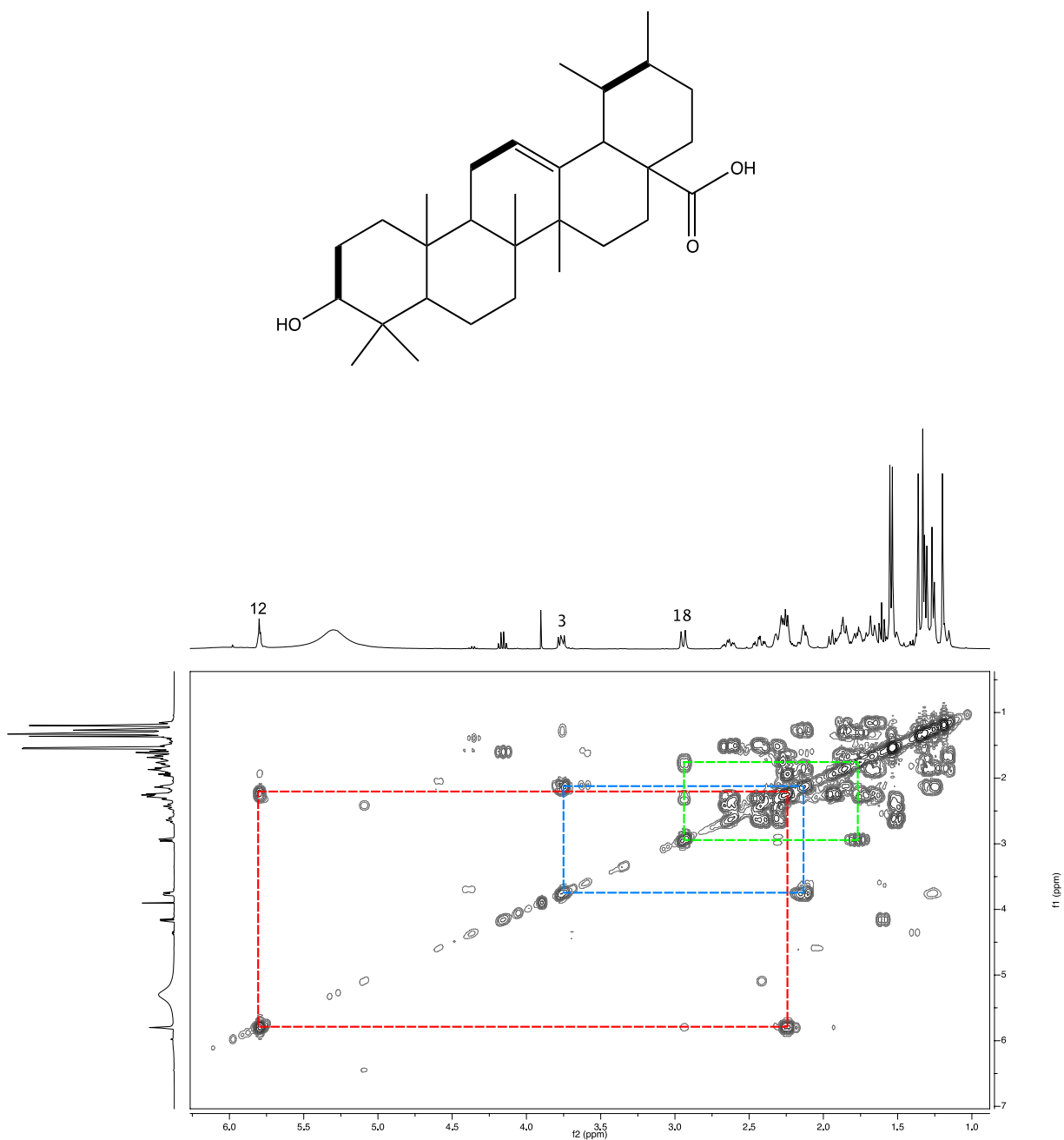


Figura 13. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento ^1H - ^1H -COSY del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.

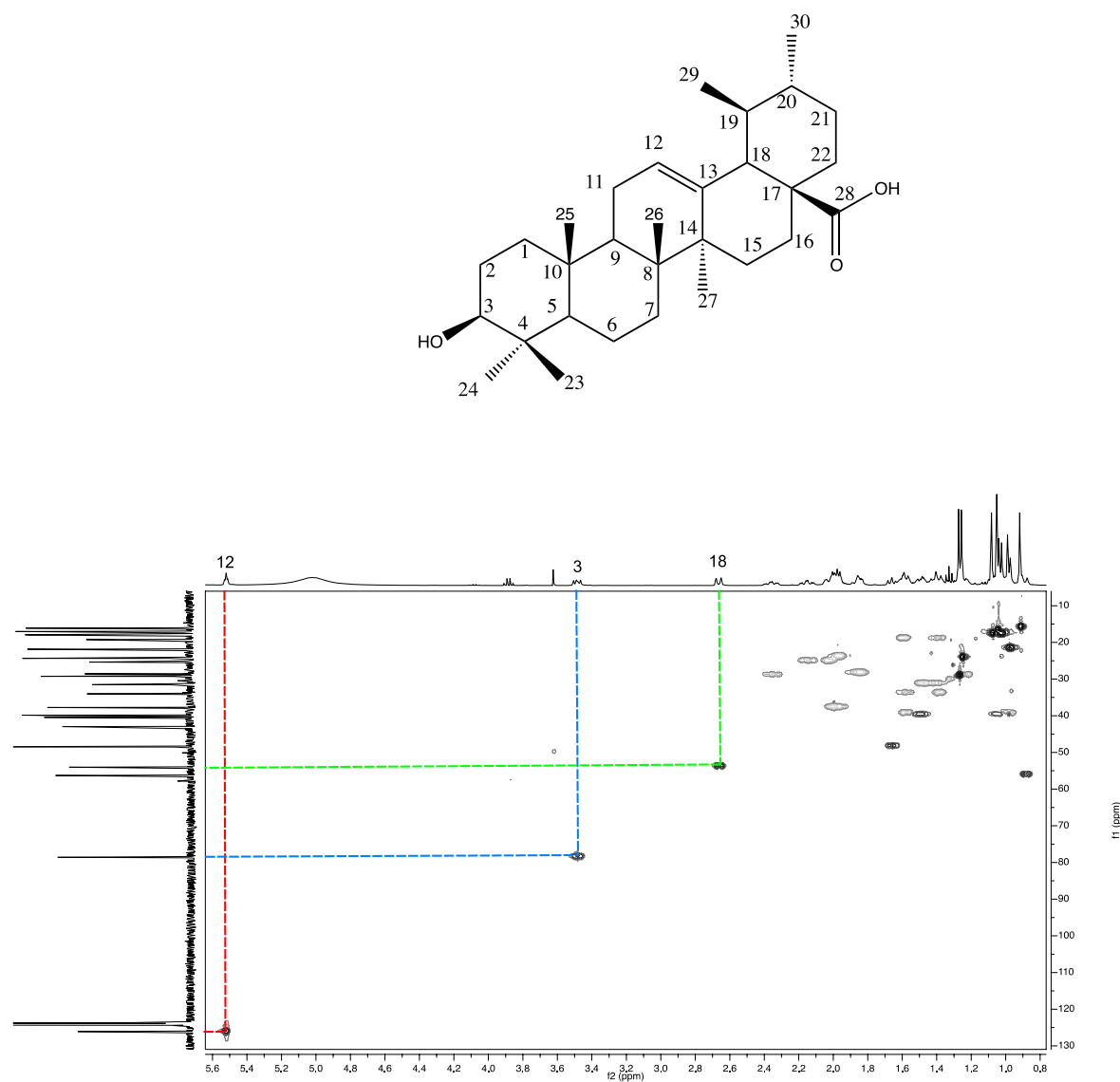


Figura 14. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HSQC del ácido ursólico (C-2), piridina- d_5 , 400 MHz.

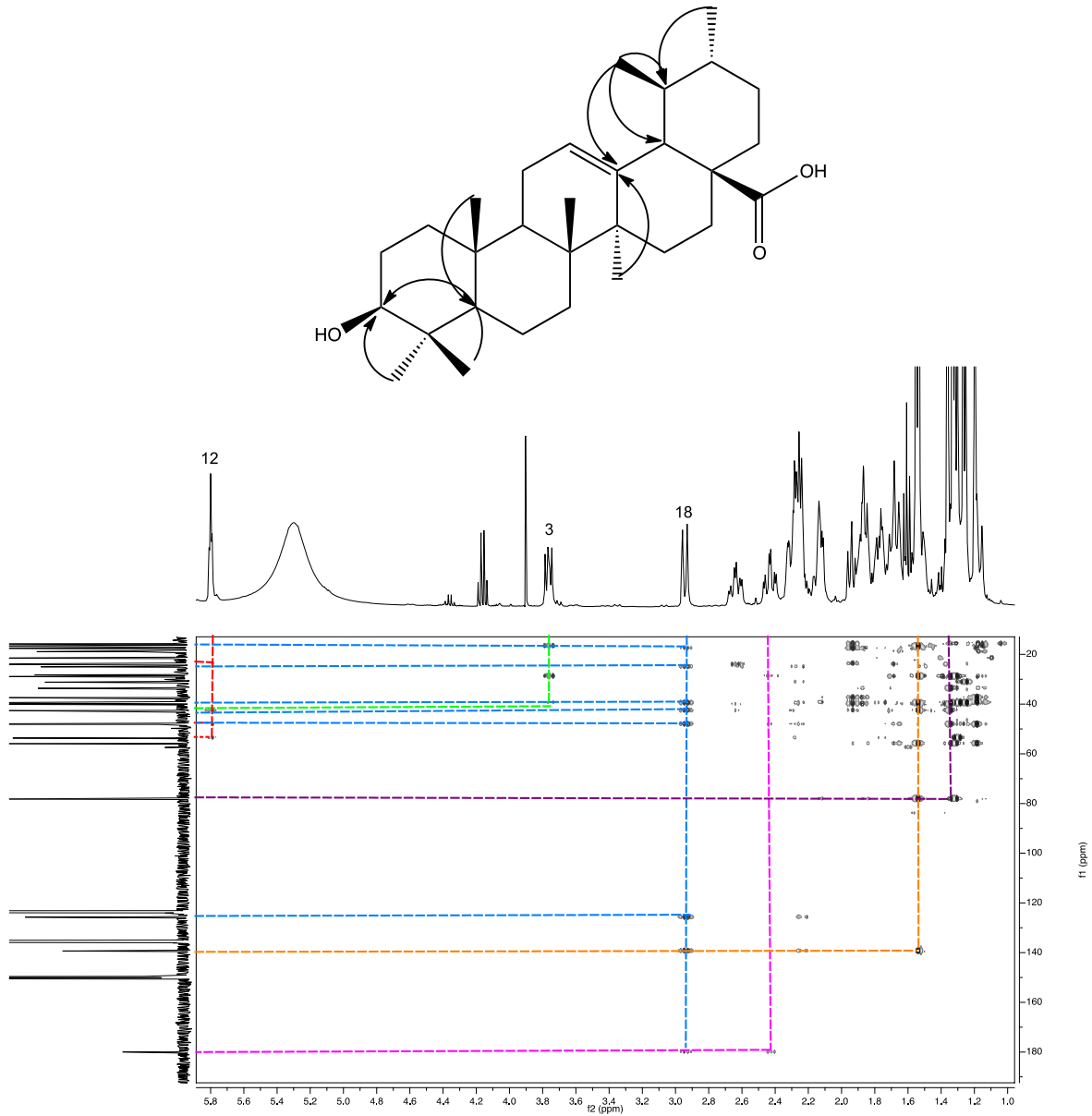
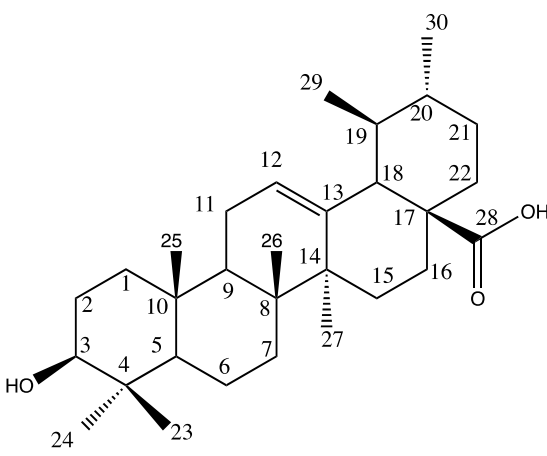


Figura 15. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento de HMBC del ácido ursólico (C-2), piridina-*d*₅, 400 MHz.

Cuadro 7. Datos espectroscópicos y espectrométricos del ácido ursólico.

Fórmula	$C_{30}H_{48}O_3$
Estructura	
1H RMN	(400 MHz, piridina- d_5) δ 5.52 (1H, br s, H-12), 3.48 (1H, dd, J = 8.0, 12.0, Hz, H-3), 2.68 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-18), 1.27 (3H, s, H-23), 1.26 (3H, s, H-27), 1.08 (3H, s, H-25), 1.05 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-29), 0.97 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-30), 0.92 (3H, s, H-24).
^{13}C RMN	(100 MHz, piridina- d_5) δ 180.4 (C-28), 139.8 (C-13), 126.0 (C-12), 78.6 (C-3), 56.3 (C-5), 54.0 (C-18), 43.0 (C-14), 29.3 (C-23), 28.6 (C-2), 25.4 (C-16), 24.4 (C-27), 24.1 (C-11), 21.9 (C-30), 18.0 (C-26), 17.1 (C-24), 17.9 (C-29), 16.2 (C-25).
IE-EM (m/z)	$[M^+]$ 456 (1), 438 (2), 411 (8), 248 (100) 203(62) y 189 (44).

5.1.3 Caracterización estructural del ácido corosólico (C-3).

El compuesto **C-3** se aisló como un sólido blanco que presentó una baja solubilidad en MeOH caliente. Su fórmula molecular se estableció como $C_{30}H_{48}O_4$ con base en su espectro de masas en la modalidad FAB negativo que mostró un ion pseudo molecular de m/z 471 $[M-H]^-$. A continuación se describen las señales más importantes de sus espectros de RMN- H^1 (**Figura 16**) y RMN- C^{13} (**Figura 17**).

El espectro de RMN- H^1 de (**C-3**) fue muy similar al espectro registrado para el ácido ursólico (**C-2**). La principal diferencia encontrada fue la presencia en δ_H 4.12 (H-2) de un ddd ($J= 9.6, 9.6$ y 3.2 Hz) que integraba para un protón. Esta señal mostró correlaciones en el espectro de COSY con la señal en δ_H 3.43 (H-3). En el espectro de HSQC esta señal mostró correlación con la señal en δ_C 69.1 (C-2). Otra correlación encontrada fue en el espectro de HMBC en δ_H 3.43 (H-3) con las señales δ_C 40.3 (C-4), 48.5 (C-1) y 69.1 (C-2).

Con base en las evidencias antes descritas el compuesto (**C-3**) se caracterizó como ácido corosólico (Kuang *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2005). En el **Cuadro 8** se muestra la estructura química y las constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido corosólico (**C-3**).

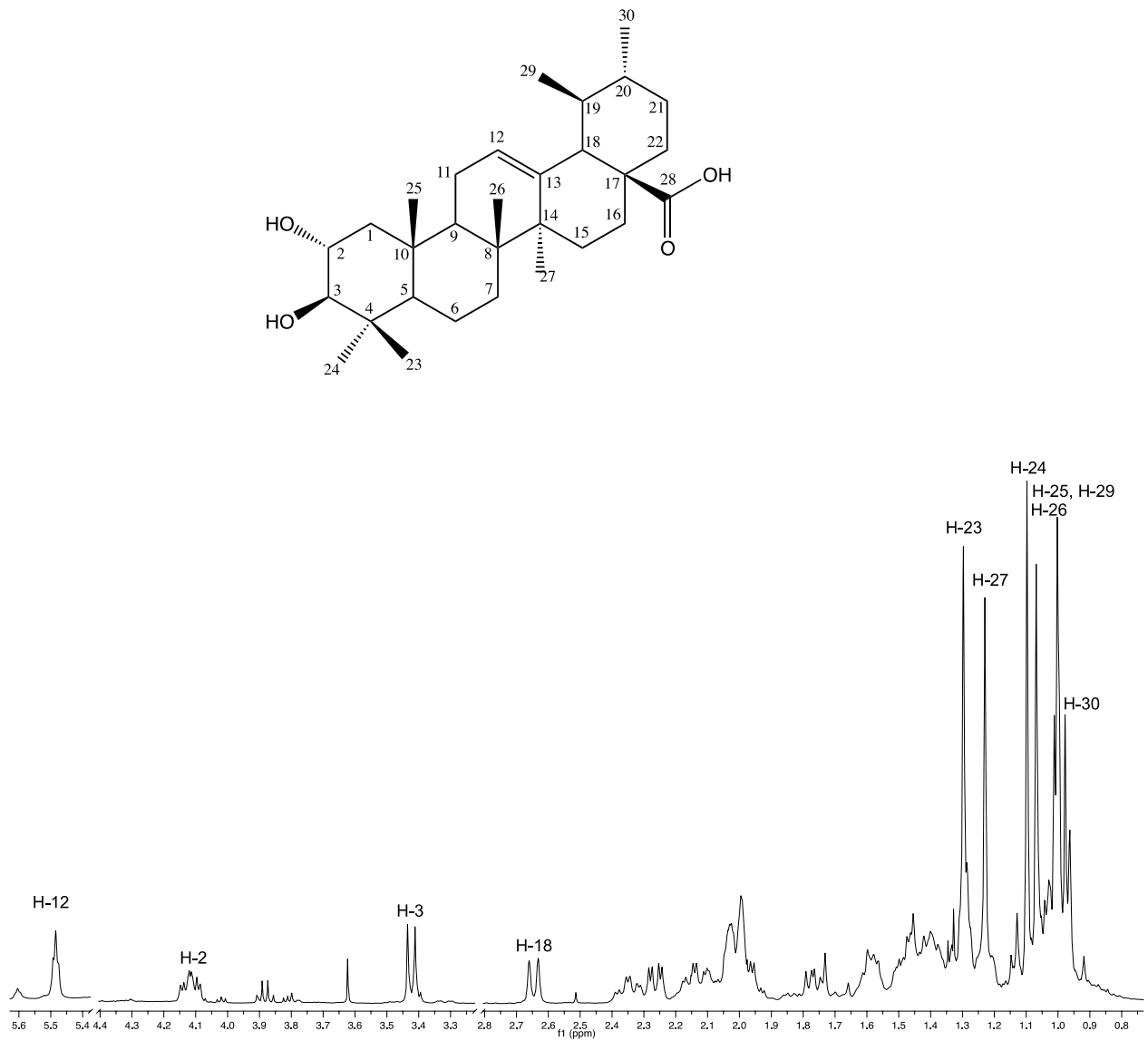


Figura 16. Espectro RMN- ^1H del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 400 MHz.

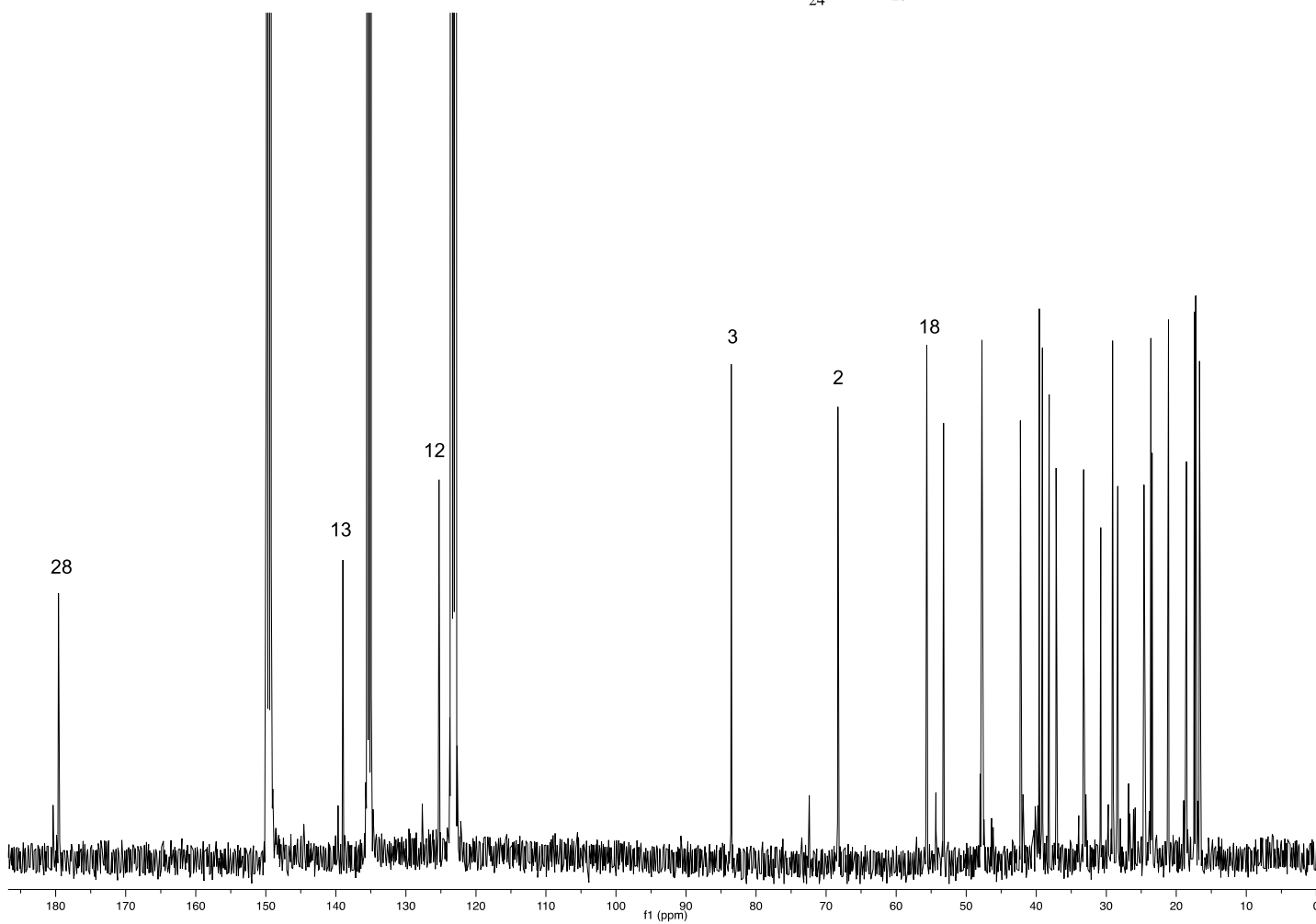
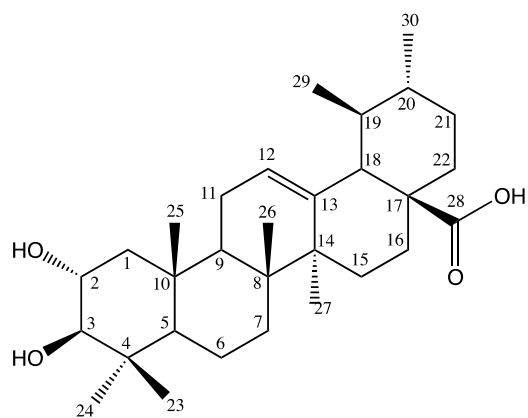


Figura 17. Espectro ^{13}C -RMN del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 100 MHz.

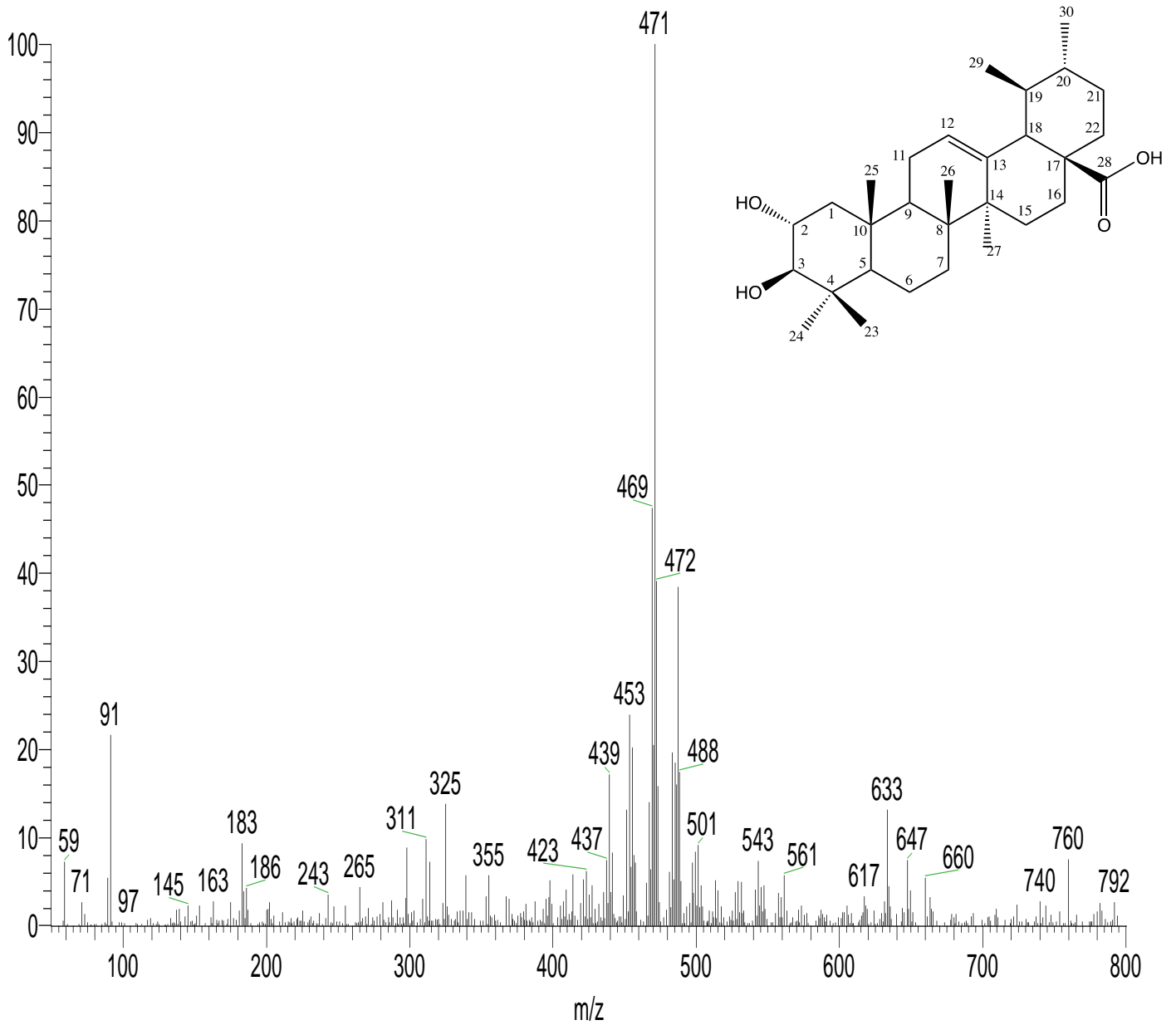


Figura 18. Espectro de masas FAB modo negativo del ácido corosólico (C-3).

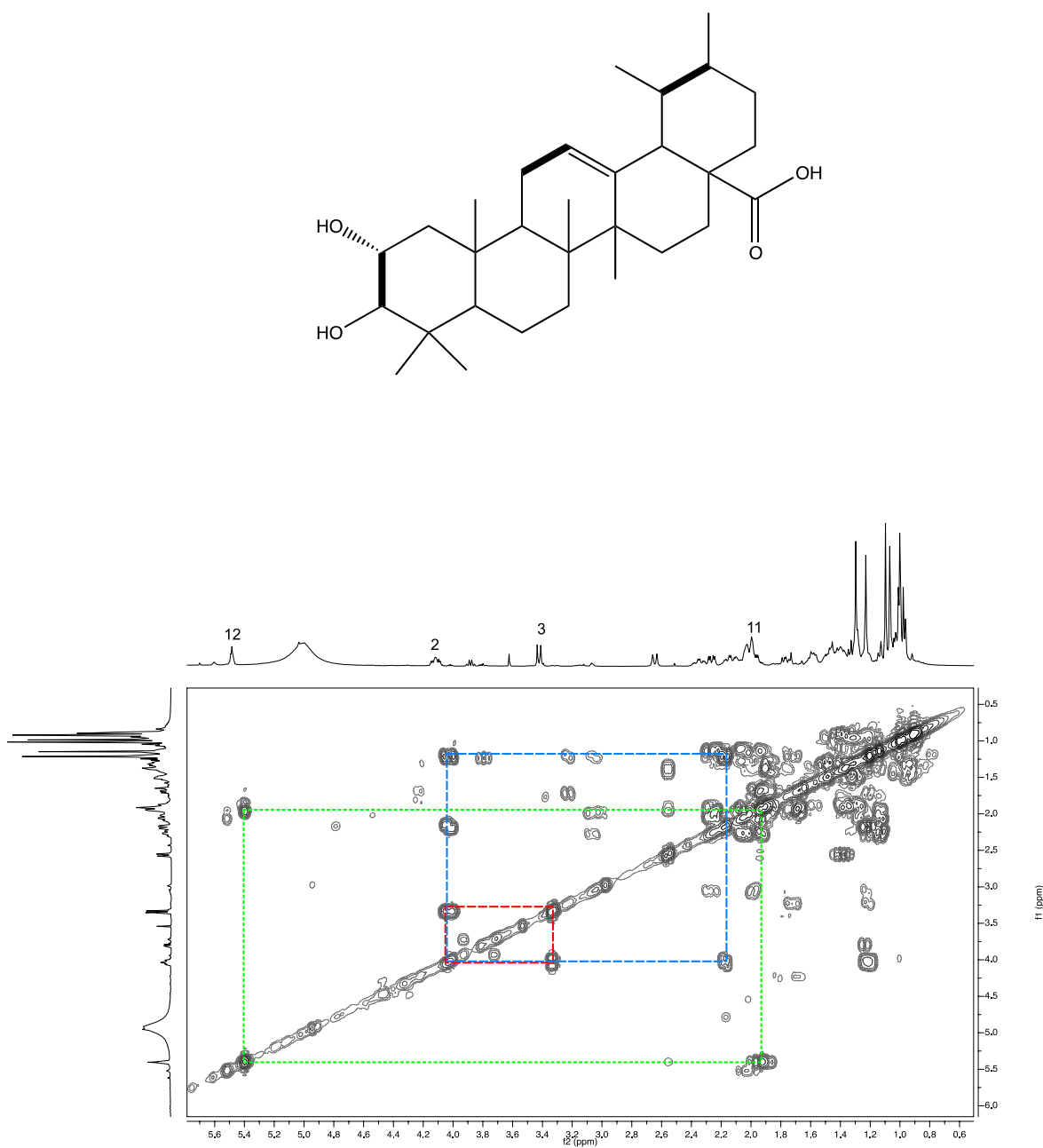


Figura 19. Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento ^1H - ^1H -COSY del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 400 MHz.

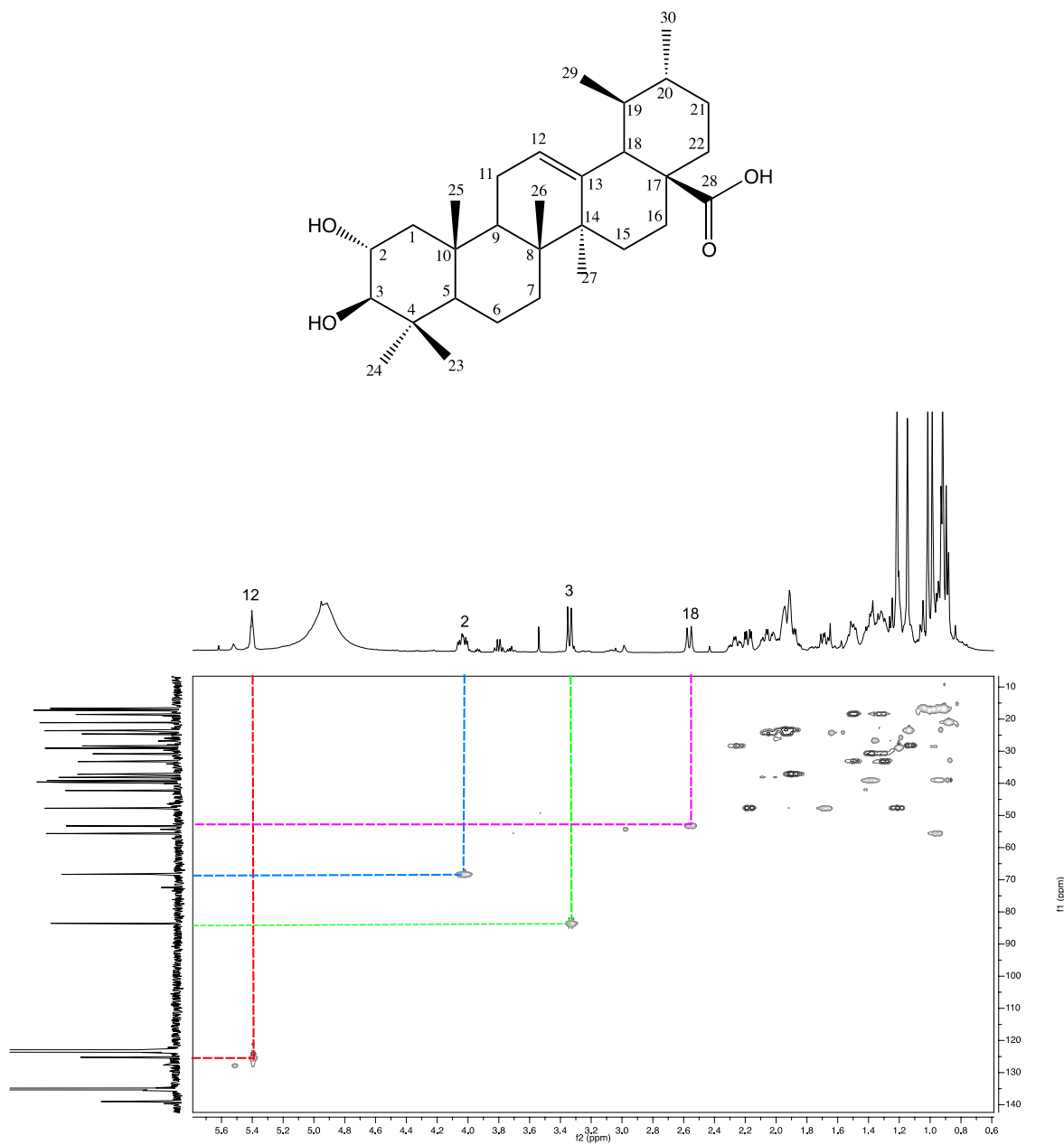


Figura 20. Espectro y correlaciones más importantes en el experimento de HSQC del ácido corosólico (C-3), piridina-*d*₅, 400 MHz.

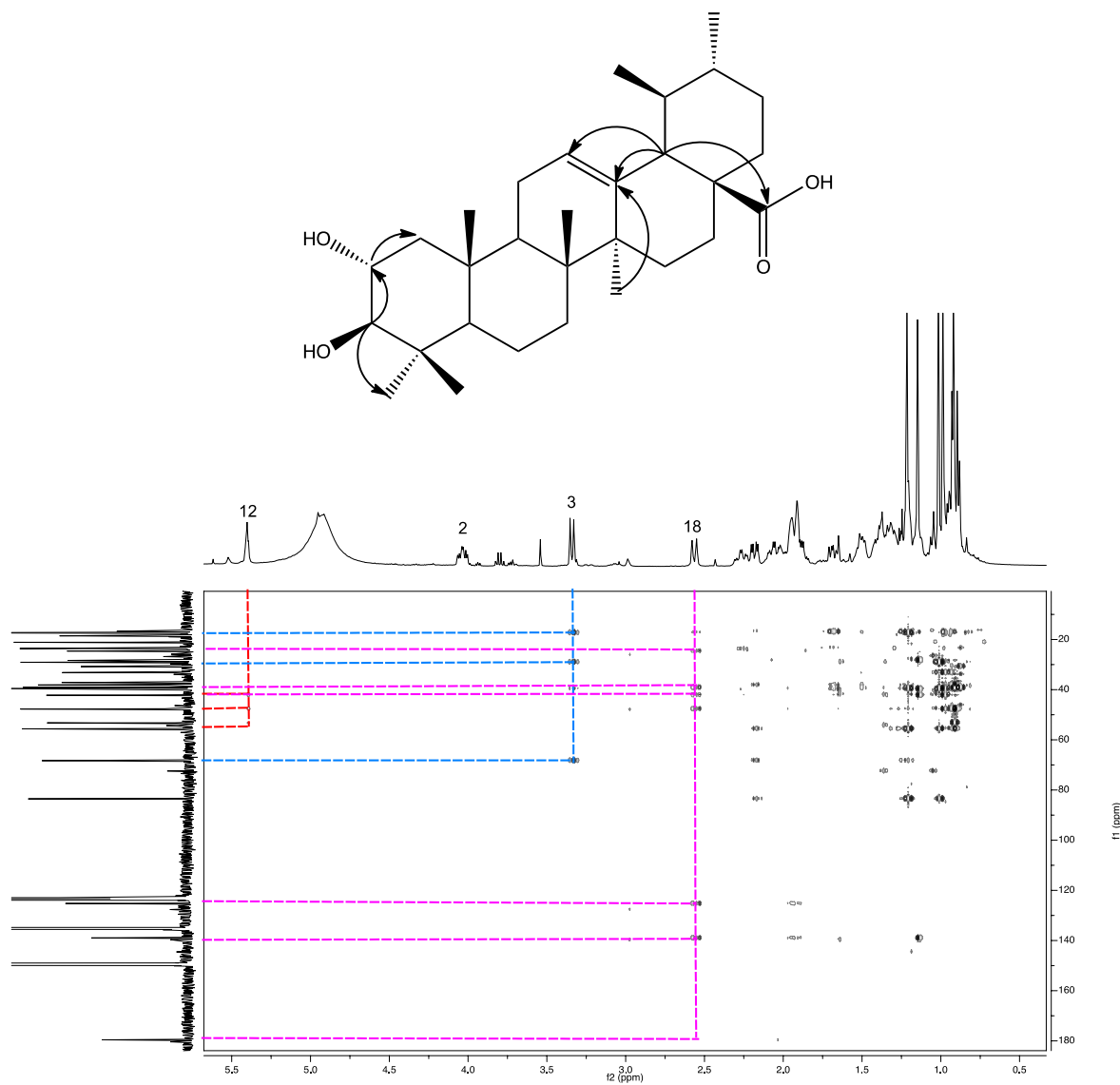


Figura 21. Espectro y correlaciones más importantes en el experimento de HMBC del ácido corosólico (C-3), piridina- d_5 , 400 MHz.

Cuadro 8. Datos espectroscópicos del ácido corosólico.

Fórmula	C₃₀H₄₈O₄
Estructura	
¹H RMN	(400 MHz, Piridina- <i>d</i> ₅) δ 4.12 (1H, ddd, <i>J</i> = 4.0, 9.5, 11.0 Hz, H-2), 3.43 (1H, d, <i>J</i> = 9.5Hz, H-3), 5.49 (1H, br s, H-12), 2.65 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H-18), 1.30 (3H, s, H-23), 1.23 (3H, s, H-27), 1.10 (3H, s, H-24), 1.07 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-25), 1.00 (3H, sa, H-29), 0.98 (3H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz, H-30).
¹³C RMN	(100 MHz, Piridina- <i>d</i> ₅) δ 48.5 (C-1), 69.1 (C-2), 84.3 (C-3), 40.3 (C-4), 56.4 (C-5), 19.3 (C-6), 34.0 (C-7), 38.9 (C-10), 126.0 (C-12), 139.8 (C-13), 29.1 (C-15), 17.3 (C-25).
FAB-EM modo negativo (<i>m/z</i>)	471 [M-H] ⁻ (100), 469 (48), 472(40), 439 (18), 453 (24).

5.2 Evaluación de la actividad biológica.

5.2.1 Estandarización del ensayo de inhibición de formación de biofilm por *E. coli* O42 serotipo O44:H18.

El siguiente objetivo del estudio era evaluar el efecto del EMHN y de los compuestos aislados, sobre la capacidad de *Escherichia coli* para formar biofilms y así definir su empleo para el control de algunas enfermedades gastrointestinales como la diarrea.

El primer paso consistió en realizar la estandarización del ensayo, el cual consistió en evaluar qué medio de cultivo era más conveniente para inducir la formación del biofilm por *E. coli*. Al respecto existe cierta controversia, pues algunos autores proponen el empleo de MEM (Medio Esencial Mínimo) que es un medio utilizado para el cultivo de células y otros sugieren el empleo de BHI (Infusión Cerebro Corazón). Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio indican que hay una gran diferencia en la producción de biofilm utilizando los medios de cultivo antes mencionados, ya que la cepa de *E. coli* O42 no se desarrolló bien en el medio de cultivo D-MEM por lo que no favoreció la formación de biofilm, ya que las lecturas de D.O. fueron de 0.121 a las 24 h y 0.230 a las 48 h. El mismo ensayo con el medio BHI aportó lecturas de D.O. de 2.930 a las 24 h, 2.300 a las 48 h y 3.101 a las 72 h, resultado que muestra que *E. coli* O42 serotipo O44:H18 es una cepa excelente formadora de biofilms (**Figura 22**).

Por otra parte, también se evaluó el tiempo óptimo en la expresión de biofilm a tres tiempos de incubación (24, 48, 72 h), dando como resultado 48 h con el medio BHI, por lo que esta bacteria se caracterizó como una excelente formadora de biofilm de acuerdo a lo propuesto por Koreňová *et al.* (2008) utilizando la técnica de tinción con cristal violeta.

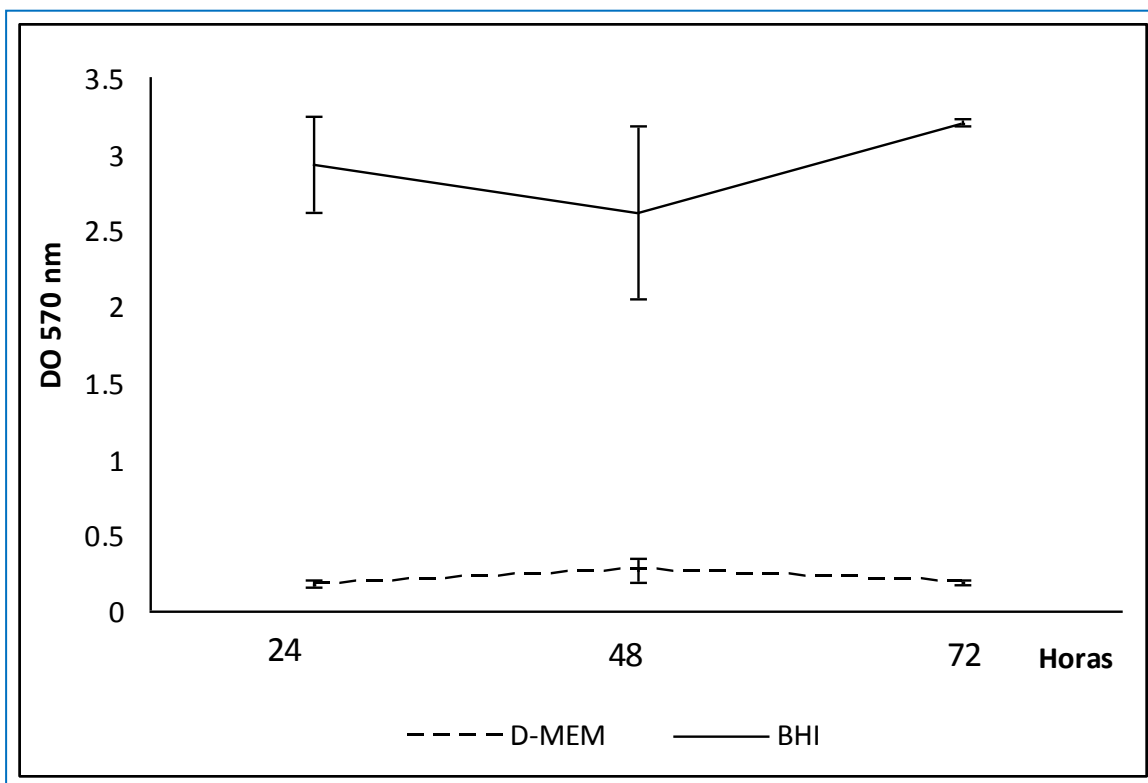


Figura 22. Formación de biofilm de *Escherichia coli*. Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37 °C), en dos medios de cultivo diferentes.

5.3. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por *Escherichia coli*.

Una vez estandarizado el método, se procedió a evaluar si el EMHN tenía efecto sobre la formación del biofilm del microorganismo en estudio. El ensayo de inhibición de formación del biofilm se realizó por duplicado en dos ensayos independientes, para el tratamiento estadístico se decidió eliminar el valor más alto y el más bajo con el propósito de dar mayor consistencia en los resultados.

Para evaluar si el extracto metanólico de las hojas del níspero, el ácido ursólico y la (-)-epicatequina por sí solos no retenían el cristal violeta, se realizaron ensayos con cada uno de los compuestos, siguiendo el mismo protocolo, empleado para la formación de biofilms. Los resultados al respecto mostraron que ninguno de los compuestos retenía al

cristal violeta, lo que permitió continuar con el ensayo de inhibición con la cepa de *Escherichia coli* (Figura 23).

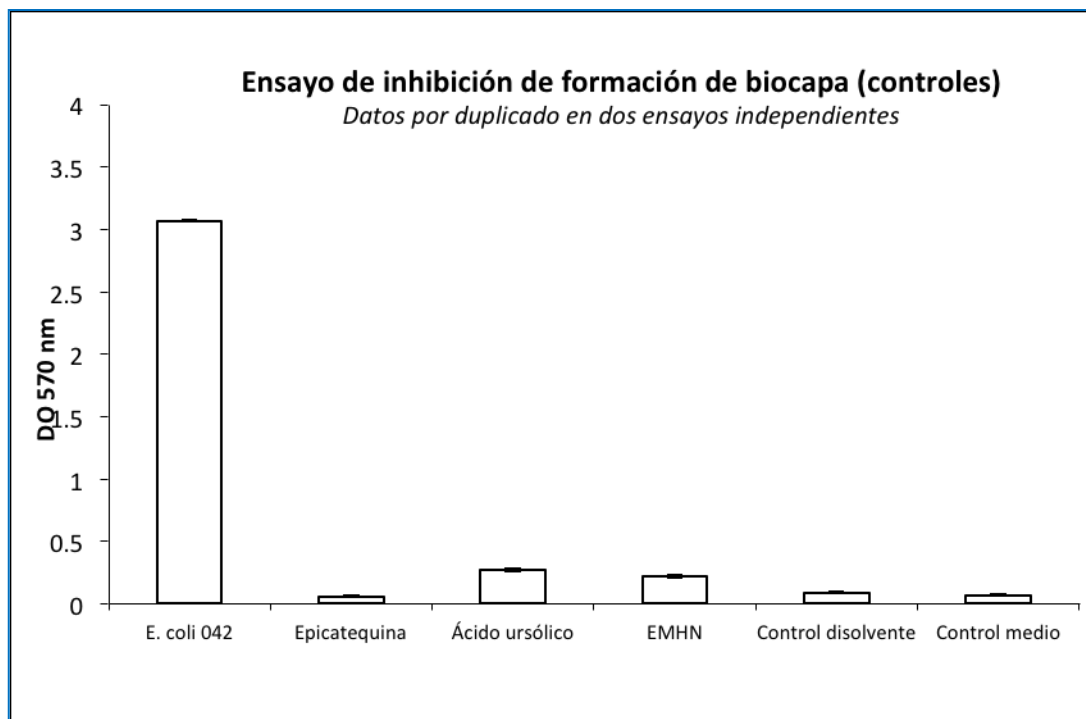


Figura 23. Ensayo de inhibición de la formación de biofilms (controles).

El ensayo con esta cepa se realizó en dos ocasiones y cada uno por duplicado; para el análisis de resultados se eliminaron los valores más altos y más bajos con los que se obtuvieron la media y la desviación estándar. Para definir el porcentaje de inhibición de la formación del biofilm, se consideró como 100% (formación de biofilm) la lectura en D.O. mostrada por el control sin tratamiento. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto EMHN tenía un efecto inhibitorio sobre la formación del biofilm. Dicha actividad fue dosis dependiente observando mayor inhibición (mayor a 90%) a la concentración más alta (200 mg/mL). Como se hizo referencia en el desarrollo experimental, el ensayo se realizó con dos variantes: una realizando una preincubación del EMHN durante 20 minutos antes de administrar la bacteria y la otra agregando al mismo tiempo el EMHN y la bacteria (Figura 24).

Además, en el estudio se utilizó como control adicional el disolvente utilizado para la extracción de los compuestos del EMHN, lo anterior se realizó para evaluar si el efecto de inhibición o retención del cristal violeta observado, pudiera estar relacionado con dichos compuestos. Los resultados mostraron que no tienen ningún efecto, por lo que estos datos corresponden exclusivamente al efecto inducido por el EMHN y los compuestos que lo componen.

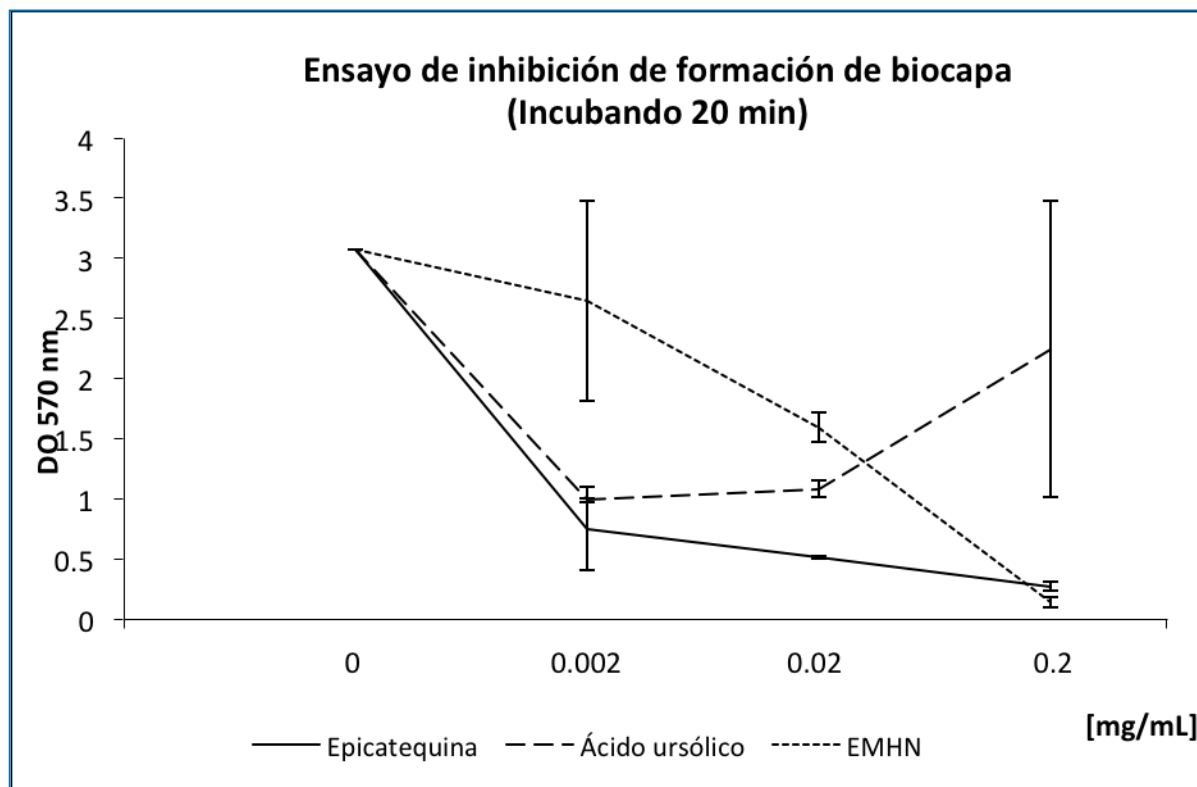


Figura 24. Ensayo de inhibición de la formación de biofilm incubando a los 20 min. para el EMHN, (-)-epicatequina y ácido ursólico.

Los resultados con la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de EMHN no mostraron diferencias entre ambas condiciones (sin incubar y preincubación) obteniendo una inhibición del 94% y 95%, respectivamente (**Figura 25**).

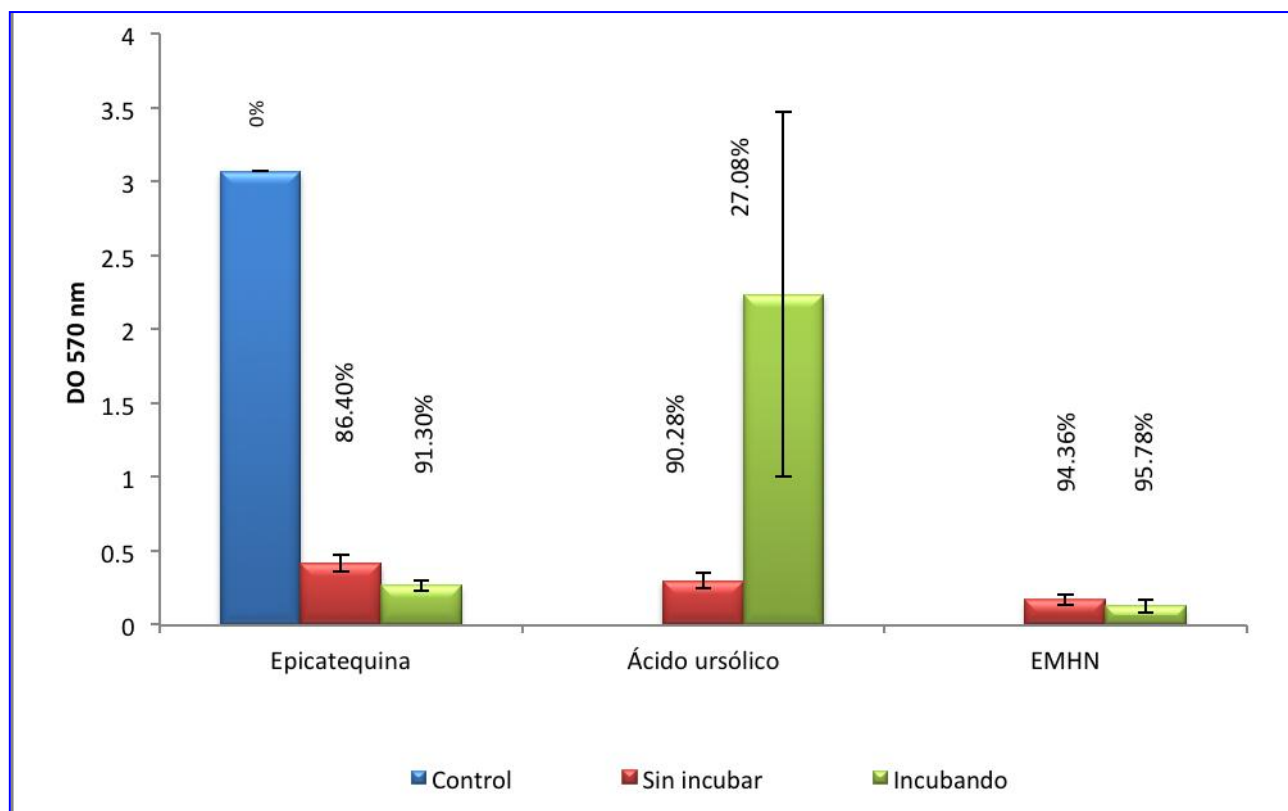


Figura 25. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMHN, (-)-epicatequina, y ácido ursólico utilizando una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

El mismo ensayo a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo una inhibición de 64 % sin incubar y de 48% preincubando (**Figura 26**).

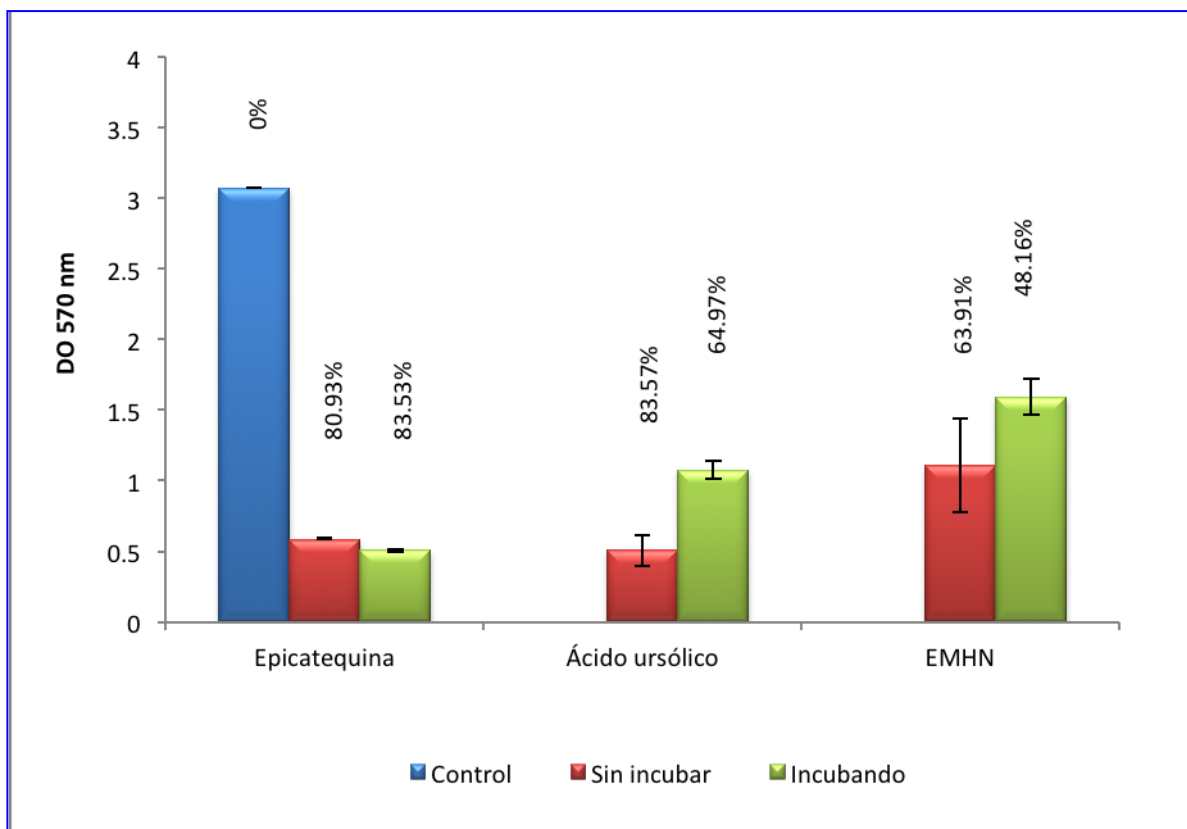


Figura 26. Inhibición de la formación de biofilm. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMHN, (-)-epicatequina, y ácido ursólico utilizando una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con relación a la dosis de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la inhibición de la formación del biofilm con la condición sin incubar fue del 40% y con incubación previa del 8% (**Figura 27**). Es importante destacar que obtener inhibición a una concentración tan baja como 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hace inferencia que el extracto tiene diferentes compuestos que le confieren esta propiedad inhibidora de formación de biofilm.

Al respecto también es importante evaluar si el EMNH activa la expresión de los genes responsables de la formación de biofilm, después de todo, sabemos que la formación de dicha estructura se ve afectada por las condiciones de crecimiento de la bacteria (planctónica o biofilm) y por condiciones ambientales (pH, fuentes de carbono, disponibilidad de carbohidratos) (Burne *et al.*, 1997).

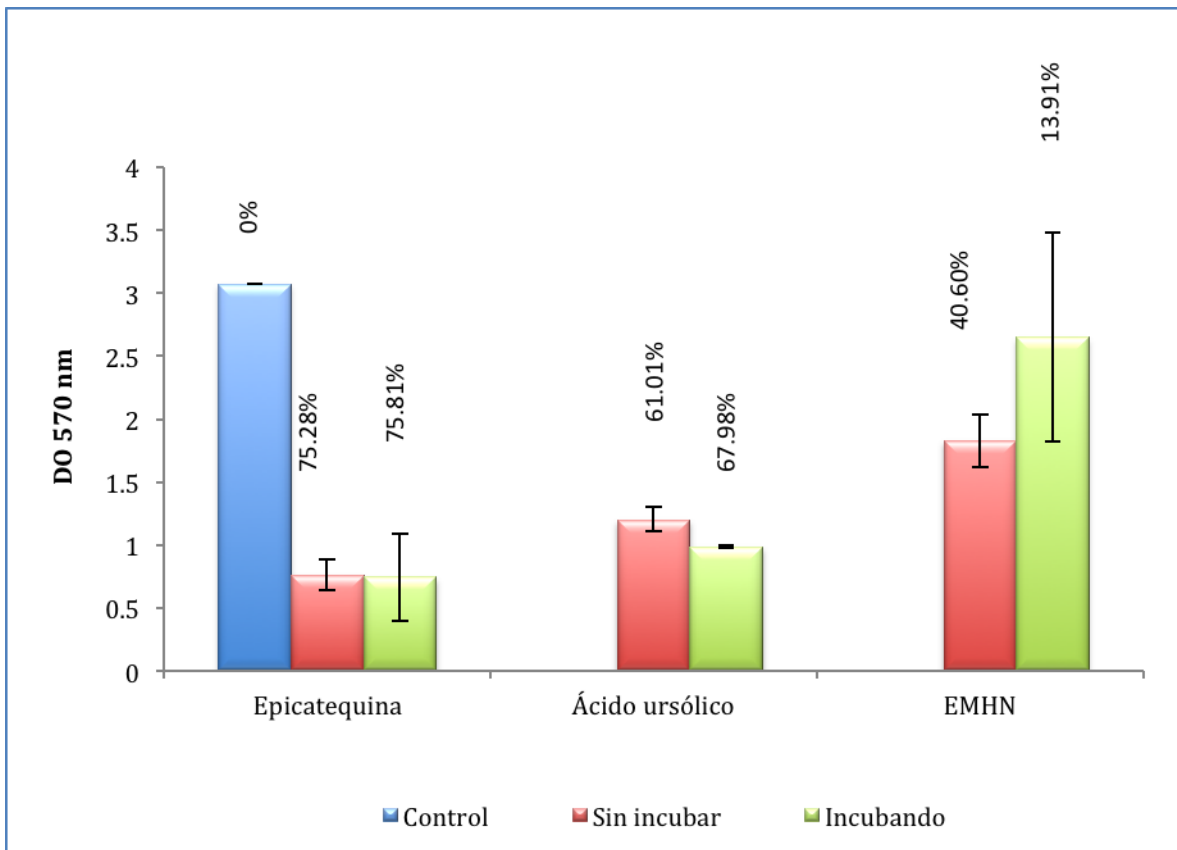


Figura 27. Inhibición de la formación de biofilm. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el EMHN, (-)-epicatequina, y ácido ursólico utilizando una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados de inhibición en la formación de biofilm de *E. coli* obtenidos con el EMHN con *E. coli* (**Figura 28**), dieron elementos para evaluar a la (-)-epicatequina (**C-1**) y ácido ursólico (**C-2**), los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del extracto metanólico. Los procedimientos para evaluar su actividad inhibitoria en la formación de biofilms, fueron los mismos utilizados con EMHN. Las concentraciones de (-)-epicatequina y ácido ursólico se ajustaron para obtener las mismas que se utilizaron con el EMHN (200, 20, y 2 $\mu\text{g/mL}$).

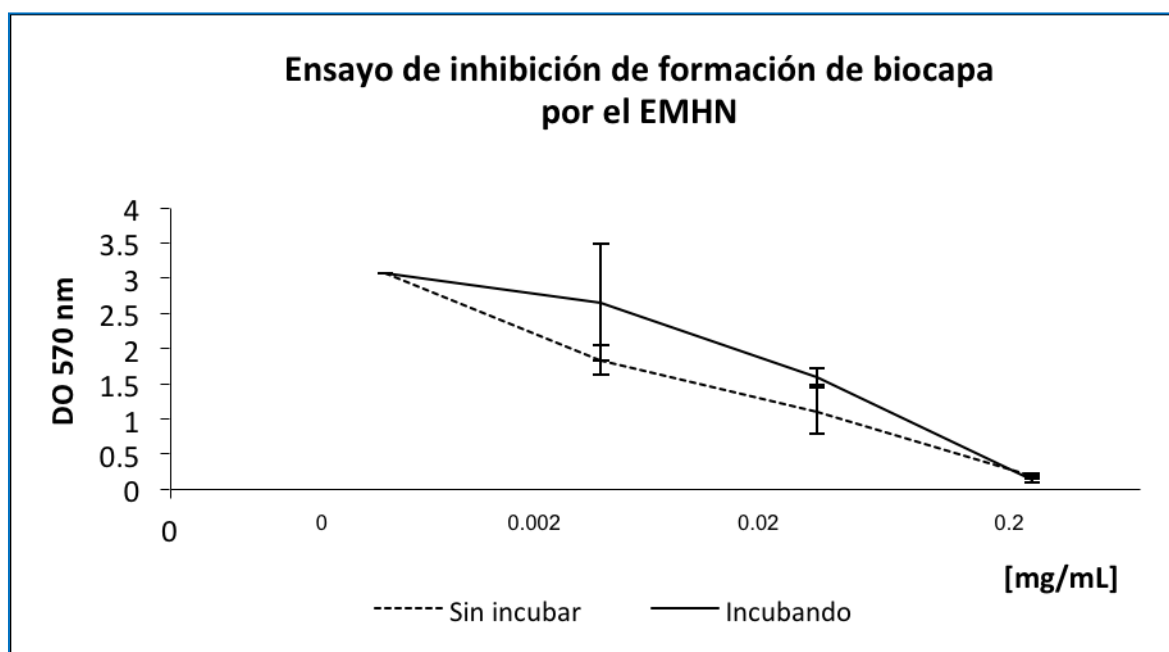


Figura 28. Ensayo de inhibición de formación de biofilm por EMHN.

Con la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de (-)-epicatequina se obtuvo una inhibición de la formación de biofilm del 86% en el ensayo sin incubar y del 91% con preincubación (**Figura 25**), en las siguientes concentraciones (20 y 2 $\mu\text{g/mL}$) la inhibición fue mayor a 80% y de 75% respectivamente como se puede observar en las **Figuras 26 y 27**. Con este compuesto la preincubación favoreció la inhibición, aunque, no distante al porcentaje de inhibición que se obtuvo sin la incubación previa del compuesto. Tomando en cuenta las desviaciones estándar obtenidas en los ensayos de (-)-epicatequina, no se identificaron diferencias entre la preincubación y el ensayo sin incubar. Este resultado permite inferir

que la (-)-epicatequina es probablemente uno de los compuestos de las hojas del níspero involucrado en la inhibición de la formación de biofilm ya que, tiene una gran actividad a concentraciones mínimas, como 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 29**).

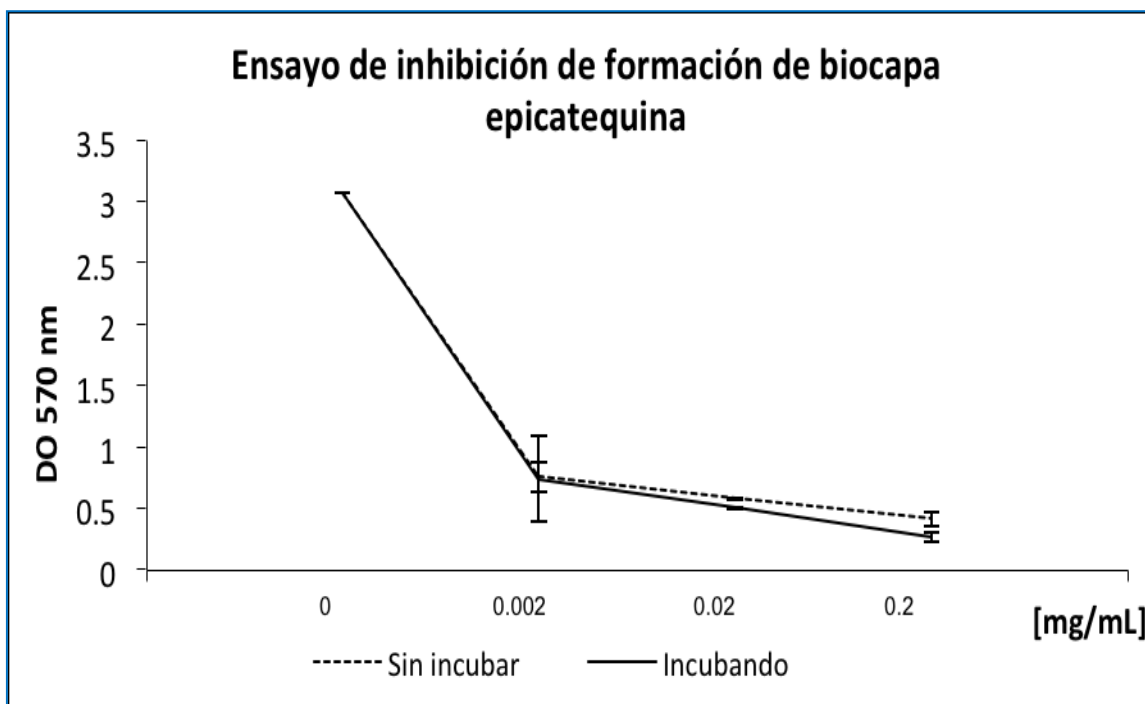


Figura 29. Ensayo de inhibición de biofilm por la (-)-epicatequina.

El otro compuesto que se probó (ácido ursólico), a la concentración más alta, causó inhibición del 90 % en el ensayo en el que no se incubó previamente y 27% cuando se realizó la incubación del compuesto 20 minutos (**Figura 25**). Con la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la inhibición sin incubación previa fue de 83 % y preincubando del 65% como se muestra en la **Figura 26**, con la concentración más baja (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la inhibición obtenida fue del 61% y 68%, respectivamente (**Figura 27**).

Aunque se observó mayor eficacia y consistencia con la (-)-epicatequina, el ácido ursólico también muestra porcentajes importantes de la inhibición de formación de biofilm (**Figura 30**).

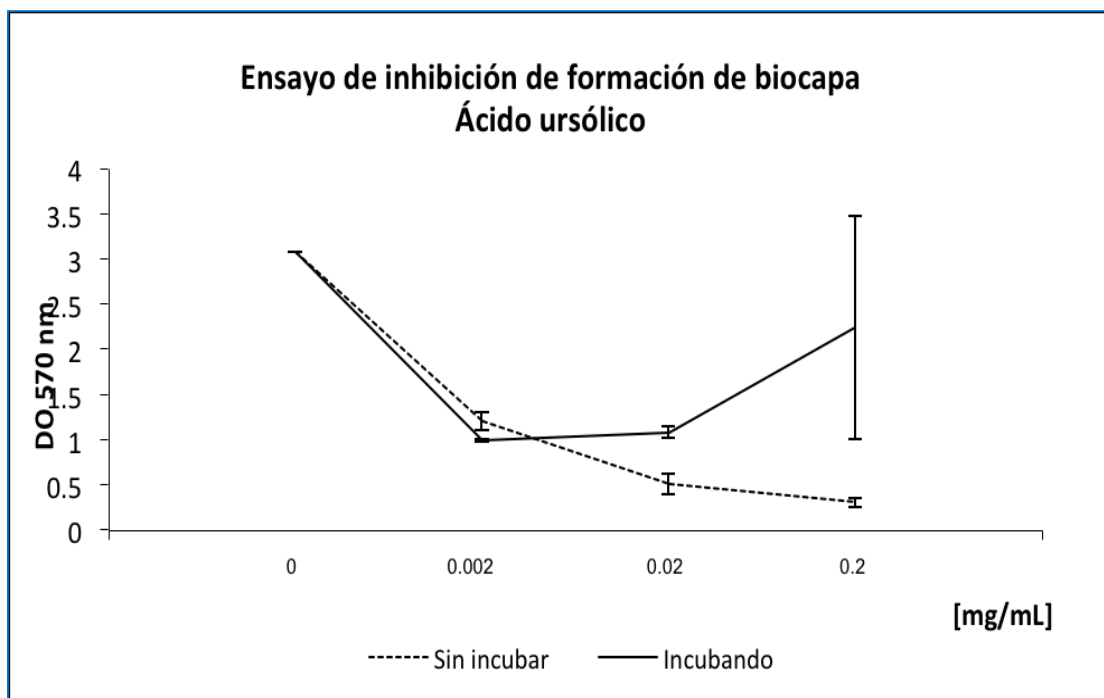


Figura 30. Ensayo de inhibición de formación de biofilm sin incubar para el ácido úrsólico.

Por otra parte, se realizó el análisis de resultados con un paquete estadístico, con la finalidad de conocer si las lecturas promedio de transmitancia obtenidas para los controles bacterianos presentaban diferencias significativas con respecto a los valores de transmitancia obtenidos utilizando EMHN y sus derivados (**Cuadro 9**). Se observó que en su mayoría existe una diferencia significativa entre los datos obtenidos principalmente cuando los compuestos no eran incubados, aún así, los resultados obtenidos cuando son incubados son en general satisfactorios. Por lo anterior, se puede mencionar que una decocción o infusión de las hojas del níspero podría funcionar para disminuir la colonización de *Escherichia coli*, sin embargo, tendría que hacerse un estudio para evaluar la influencia de las enzimas y el pH del tracto gastrointestinal sobre los compuestos químicos presentes, con la finalidad de evaluar si dichos compuestos pueden descomponerse y/o perder su actividad biológica.

A los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de formación de biofilm de *Escherichia coli* se les realizaron dos pruebas estadísticas: la desviación estándar, que sirve

para saber qué tan alejados de la media están los datos y la prueba p que sirve para saber si los datos poseen diferencia significativa con base al control establecido, en este caso el biofilm formado por el microorganismo con medio de cultivo únicamente. Cuando el valor $p < 0.05$ indica que existe una diferencia considerable en la formación de biofilm con el compuesto a prueba y la desarrollada con el control.

Para el caso de ácido ursólico y (-)-epicatequina sin incubar, todos los valores obtenidos muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$), por su parte, el EMHN únicamente muestra diferencia significativa a la mayor concentración. Cuando los compuestos fueron incubados los resultados variaron dependiendo del compuesto utilizado.

Cuadro 9. Análisis estadístico de los valores p obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de biofilm de *Escherichia coli* O42 con el serotipo O44:H18.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	Valor p Sin incubar	Valor p Incubando
EMHN	2	0.072	0.600
	20	0.072	0.035
	200	0.005	0.005
Ácido ursólico	2	0.020	0.005
	20	0.017	0.017
	200	0.007	0.515
(-)-Epicatequina	2	0.020	0.062
	20	0.001	0.002
	200	0.009	0.006

Por otra parte, cabe mencionar que la (-)-epicatequina, además de ser aislada de *Eriobotrya japonica*, también se ha encontrado en hojas del tejocote *Crataegus mexicana* DC. (Franco *et al.*, 2010) y en la especie de muérdago *Cladoclea Ioniceroides* (Alvarado *et al.*, 2005).

Con relación al ácido ursólico, éste ha sido aislado de numerosas especies con diversos orígenes filogenéticos formando parte fundamentalmente de la cera que recubre frutos y hojas (Kowalewski *et al.*, 1976), entre las familias en las que ha sido reportada su presencia está la Solaneceae (Watson y Dallwitz, 2006), de ella han sido estudiadas dos especies del género *Cestrum*: *C. parqui* (Silva *et al.*, 1962) y el *C. diurnum* L (Chakravarti *et al.*, 1964). Este género se encuentra en Cuba representado por 15 especies, de las cuales siete son endémicas, por lo que constituye una fuente amplia por estudiar.

Durante mucho tiempo se consideró que el ácido ursólico, sus sales de sodio y potasio eran inactivos desde el punto de vista farmacológico y solamente se empleaban como agentes emulsionantes en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimentos (Ishida *et al.*, 1990). Sin embargo, estudios científicos han demostrado que esta sustancia posee actividad anticarcinogénica, en cáncer de piel fundamentalmente (Shishodia *et al.*, 2003; Subbaramaiah *et al.*, 2000), antiinflamatoria (Reico *et al.*, 1991; Safayhi *et al.*, 1997), antimicrobiana (Lui *et al.*, 1995; Kowalewski *et al.*, 1976), antiviral (De Tommasi *et al.*, 1992), hepatoprotectora y antiulcerativa y puede ser usada tanto sistémicamente (Lui *et al.*, 1995) como en aplicaciones tópicas (Ishida *et al.*, 1990).

Otros estudios han demostrado que el ácido ursólico posee una potente actividad inhibidora de la degradación enzimática de la acetilcolina (Chung *et al.*, 2001), además de muy baja toxicidad aguda y crónica, lo que lo hace muy interesante.

5.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana de las hojas de níspero y compuestos aislados contra *Escherichia coli*.

Para conocer si el efecto de inhibición en la formación de biofilm de la cepa de *E. coli*, inducido por EMHN, la (-)-epicatequina y el ácido ursólico, no estaba relacionado con actividad antimicrobiana de los compuestos, se decidió realizar un ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI). Como se mencionó en el desarrollo experimental se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos y se realizaron diluciones seriadas partiendo de una concentración de 1 mg/mL y la última de 16.5 µg/mL.

De los tres tratamientos utilizados [EMHN, (-)-epicatequina y ácido ursólico] sólo la epicatequina inhibió el crecimiento de la bacteria a concentraciones menores a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 31**). En el ensayo, además se incluyeron como controles ampicilina y gluconato de clorhexidina a las concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Los resultados obtenidos por los controles mostraron inhibición del crecimiento de la bacteria incluso a concentraciones bajas. Esto se comprobó en el ensayo por goteo en las placas de agar BHI (**Figuras 32 y 32a**).

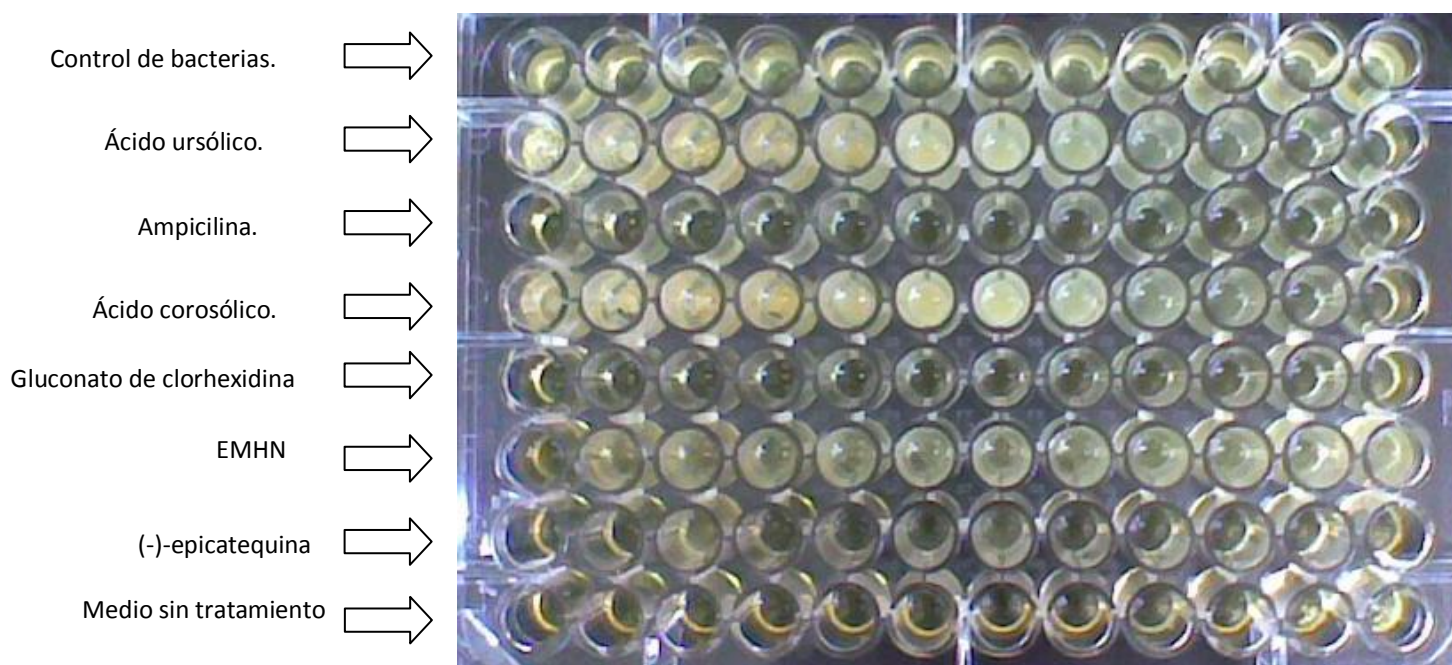


Figura 31. Ensayo de concentración mínima inhibitoria de *Escherichia coli*.

Un aspecto a considerar durante la realización del ensayo de la CMI fue la precipitación de algunos de los compuestos, principalmente de los antibióticos, lo que dificultaba las lecturas de resultados. Para evitar este inconveniente se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC), por la técnica por goteo sobre agar BHI (**Figura 32 y Figura 32a**). Los resultados obtenidos mostraron que incluso a la concentración más alta (1 mg/mL) los compuestos evaluados no impedían el crecimiento de *E. coli*, por lo que el decremento de la formación de biofilm no está relacionado con una actividad antimicrobiana.

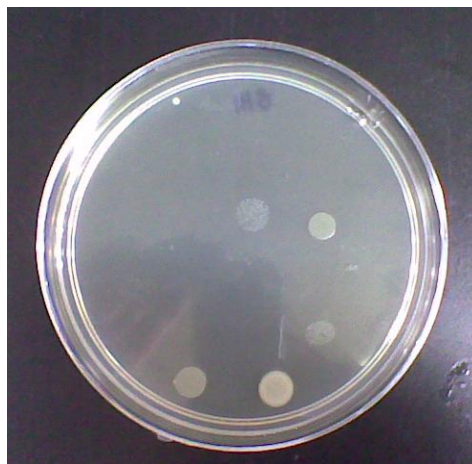


Figura 32. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de *Escherichia coli*. (*E. coli* con ampicilina o gluconato de clorhexidina).

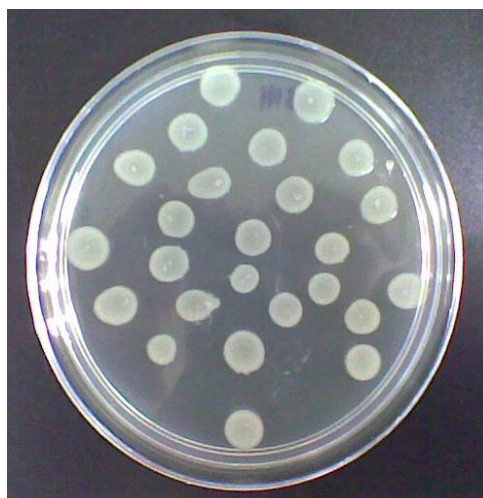


Figura 32a. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de *E. coli*. (*Escherichia coli* EMHN, (-)-epicatequina y ácido ursólico).

Con respecto a la determinación del efecto del EMNH sobre la formación del biofilm producida por la bacteria *Escherichia coli* utilizando el ensayo de cristal violeta no se observaron cambios notables en la formación del biofilm para las placas tratadas con incubación y sin incubación con el EMHN. En las **Figuras 33A– 33C** se observan las diferencias en la formación del biofilm por *E. coli* preincubando y sin incubación a concentraciones en un rango de 2 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de las hojas de níspero (EMHN). En la **Figura 33D** se observan los controles de esterilidad, control bacteriano y control de disolvente.

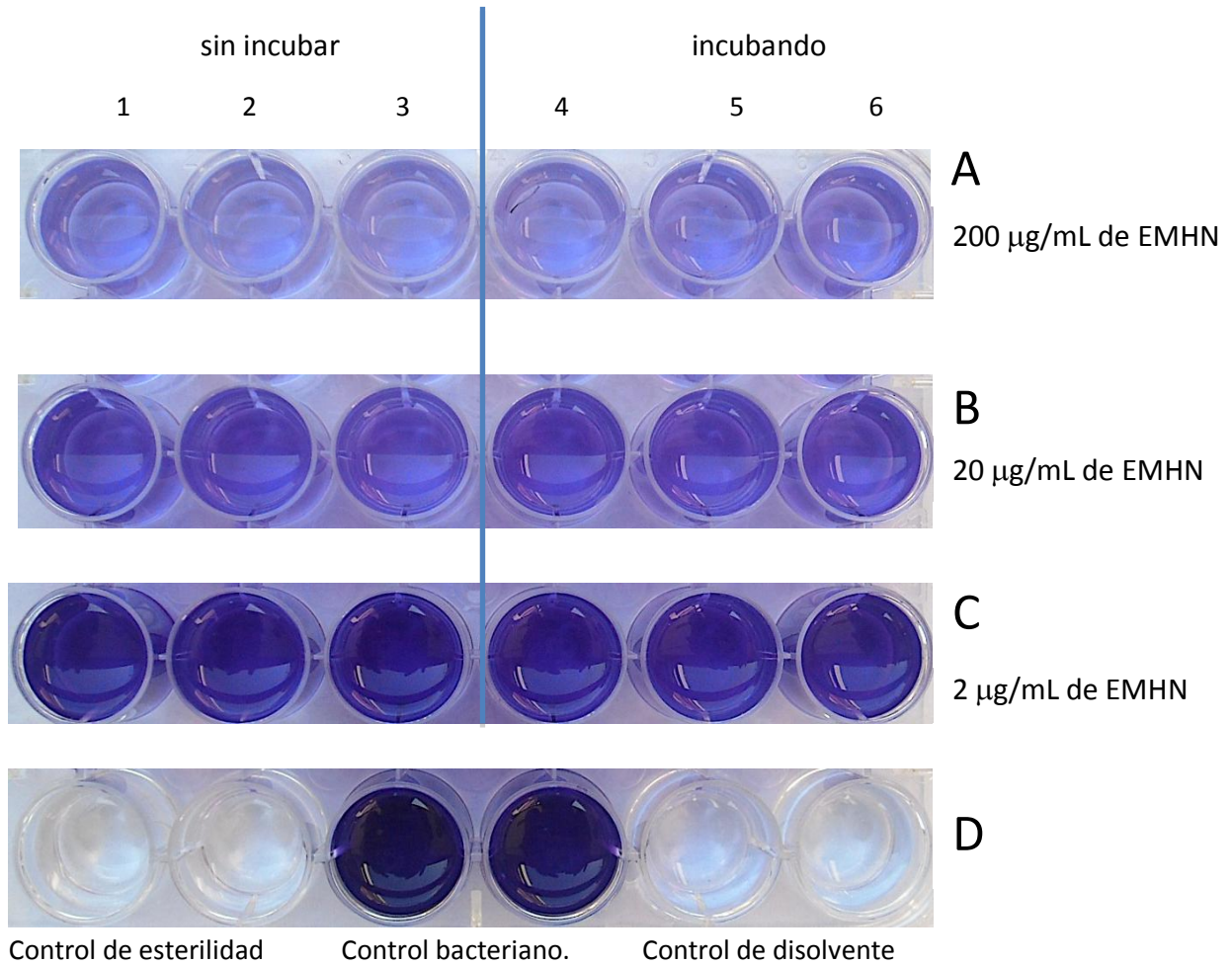


Figura 33. Efecto del EMHN sobre la formación del biofilm por *Escherichia coli* utilizando el ensayo de cristal violeta.

5.5 Contenido de fenoles totales.

El método de Folin-Ciocalteu es considerado uno de los mejores y más antiguos métodos para cuantificar el contenido de fenoles en productos naturales (Prior *et al.*, 2005). Se construyó una curva de calibración que permitió obtener la ecuación ajustada $A = 0.0036 C + 0.0331$ ($r^2 = 0.9939$). En esta ecuación se interpoló el valor de absorbencia obtenido para EMHN a una concentración de 0.01 mg/mL. Como resultado se obtuvo que el EMHN contiene 15.72 ± 3.11 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente para *Eriobotrya japonica* por Hong y colaboradores (2008).

En este contexto, los polifenoles pueden proteger a las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades causadas por los radicales libres (Cruz Manzano *et al.*, 2004). Al comparar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de níspero resulta evidente que es mayor a la descrita por Reynoso y cols. para los extractos de las flores (inflorescencias) en diferentes disolventes como cloroformo, etanol y agua, ya que los resultados oscilan entre 0.064 mg AG/g, 0.480 mg y 0.609 mg AG/g respectivamente sugiriendo que la diferencia en contenido depende de la polaridad del solvente de extracción. De los resultados obtenidos se observa que el extracto alcohólico a bajas concentraciones, evidencia mayor actividad que el extracto acuoso, sin embargo a medida que aumenta la concentración de los mismos (1000 µg/mL) dicha actividad presenta valores similares. Por lo que se concluye que *Eriobotrya japonica* contiene cantidades significativas de compuestos fenólicos por lo que se le atribuye una fuerte actividad antioxidante.

5.6 Contenido de flavonoides totales.

Los flavonoides existen ampliamente en las plantas, y se consideran importantes antioxidantes dietéticos, que desempeñan un papel muy importante en la prevención del daño oxidativo.

Para la determinación de los flavonoides totales se construyó una curva de calibración que permitió obtener la ecuación ajustada $A = 0.017 C - 0.0293$ ($r^2 = 0.9985$). En esta ecuación se interpoló el valor de absorbencia obtenido para el EMHN, a una concentración de 0.1 mg/mL. Como resultado se obtuvo que EMHN contiene 27.45 ± 2.31 mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente para *Eriobotrya japonica* propuesto por Hong y cols. (2008).

Es importante mencionar que la concentración de flavonoides en las hojas de níspero depende de diversos factores como la época de recolección, suelo en que creció el árbol, lo que trae como resultado que no exista un rango definido para algún compuesto en específico (Chunhua *et al.*, 2011).

5.7 Evaluación de la actividad antioxidante.

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo. El problema para la salud se produce cuando el aumento del contenido intracelular de los mismos sobrepasa las defensas antioxidantes de las células, induciendo el llamado estrés oxidativo. En este contexto, la capacidad antioxidante del extracto se determinó utilizando los ensayos de captura del radical DPPH[•], catión ABTS⁺ y de decoloración de β -caroteno.

5.7.1 Ensayo de decoloración del radical DPPH[•].

Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales tales como plantas medicinales y alimentos. Uno de los más utilizados es el método de neutralización o depuración del radical libre y estable 2,2-difenildipicrilhidracil (DPPH[•]), sustancia que sirve para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante (Mensor *et al.*, 2001). La solución del reactivo de DPPH[•] es de color violeta y presenta una absorbencia a 517 nm. La reacción consiste en la sustracción

de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH[•], desarrollando un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre, que se lee en espectrofotómetro, después de veinte minutos de reacción al abrigo de la luz.

En esta versión de punto final del método de DPPH, se mide el potencial de donar H en una muestra y se expresa mediante la CI_{50} (Roginsky y Lissi, 2005) y se define como la concentración, del antioxidante o compuesto de prueba requerido para reducir la cantidad de DPPH[•] en un 50% de su concentración original y permite caracterizar el poder antioxidante de la muestra (Roginsky *et al.*, 2005; Habsah *et al.*, 2004). Para el EMNH se obtuvo una $CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$. Existe una relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad depuradora de DPPH del extracto, en concordancia con resultados reportados para extractos alcohólicos de semillas de níspero que evidencian gran actividad antioxidante y son empleados para la prevención y tratamiento de algunas nefropatías (Yokota *et al.*, 2006).

5.7.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del catión radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

Este ensayo es uno de los más usados para la determinación de la capacidad antioxidante total. La base del método consiste en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrogeno o de electrones. El radical catiónico es un cromóforo altamente absorbente a una longitud de onda de 415 o 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS en presencia de peroxidasas u oxidasas. Una solución estable de ABTS^{•+} también puede ser preparada con agentes oxidantes tales como dióxido de manganeso o persulfato de potasio. La actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de absorbencia a 734 nm de la solución de ABTS, cuando se alcanza el estado estacionario. El resultado de esta prueba para el EMHN fue una $CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$. Lo que indica que el EMHN se considera un buen antioxidante, ya que se tuvieron que realizar diluciones obteniendo concentraciones en un rango de 0.001-0.01 mg/mL, en comparación a las empleadas en el ensayo de DPPH[•].

5.7.3 Ensayo de decoloración de β -caroteno.

La lipoperoxidación es un proceso cuya propagación está mediada por radicales libres en los ácidos grasos poliinsaturados. Esta reacción involucra la generación de varios tipos de radicales libres y su terminación ocurre vía enzimática o por atrapamiento de los radicales por los antioxidantes (Heim *et al.*, 2002). En este ensayo se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) del extracto metanólico y como resultado se obtuvo un porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de 86.75%.

Los hidroperóxidos del ácido linoleico atacan a las moléculas de β caroteno y como resultado se obtiene su rápida decoloración. La presencia de actividad antioxidante en el extracto sugiere su acción sobre los radicales libres formados en el sistema (Kubola *et al.*, 2008). Con este método se observa una diferencia en la capacidad de inhibir la oxidación del β caroteno. En este caso existe una significativa entre el contenido de fenoles totales, y su capacidad de antioxidante en el ensayo del β caroteno-ácido linoleico, como lo demostró Ferreres y colaboradores (2008) en frutos de *Eriobotrya japonica*.

La importancia de la capacidad antioxidante del extracto radica en su potencial para neutralizar los radicales producidos en el cuerpo cuando los mecanismos antioxidantes fallan (Ríos de Molina, 2003). Los radicales libres son especies muy reactivas que pueden causar daño a componentes de la célula como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y están asociadas a varias enfermedades (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

Conclusiones.

- ✓ El estudio químico de las hojas del níspero recolectado en la Unidad de Investigaciones Antropológicas, Ciudad Universitaria permitió el aislamiento del flavan-3-ol (-)-epicatequina (**C-1**) y de los triterpenoides ácido corosólico (**C-3**) y ácido ursólico (**C-2**). Estos compuestos fueron descritos previamente en la especie por Banno y colaboradores (2005) y Argueta (1994).
- ✓ La determinación del efecto del extracto EMHN sobre el desarrollo de la biocapa por la bacteria enteroagregativa *E. coli* O44:H18 utilizando el método de cristal violeta y las variantes de preincubación y sin incubar, permitió determinar que no existían diferencias significativas entre ambos tratamientos. Los resultados mostraron que a la concentración de 200 µg/mL la inhibición fue del 94 y 95%, respectivamente. Por otra parte, a las concentraciones de 20 µg/mL (64 y 48%) y 2 µg/mL (40 y 13%) se observaron resultados similares.
- ✓ El flavan-3-ol (-)-epicatequina, sí mostró diferencias entre los tratamientos de preincubación y sin incubar. En este caso las mayores inhibiciones se observaron en el tratamiento de incubación con porcentajes de 91, 83 y 75%, que corresponden a las concentraciones de 2, 20 y 200 µg/mL respectivamente. Con base en estos resultados se puede afirmar que la (-)-epicatequina es uno de los compuestos presente en las hojas del níspero involucrados en la inhibición de la formación del biofilm producida por el extracto EMHN. Es importante mencionar que en la literatura no existen reportes sobre el efecto antibiofilm de la (-)-epicatequina sobre la cepa de *Escherichia coli* O42 serotipo O44:H18. Otros estudios reportan el efecto antibiofilm de la (-)-epicatequina sobre la cepa K-12 (Reisner *et al.*, 2003) y en la producción de enterotoxinas de *Escherichia coli* (Calzada *et al.*, 2007).
- ✓ Los resultados obtenidos en la inhibición de la formación de la biocapa por *E. coli* en el tratamiento de incubación para la (-)-epicatequina permiten proponer el uso de este flavonoide para el tratamiento de dispositivos médicos y para evitar la colonización en superficies por bacterias patógenas.

- ✓ El ácido ursólico inhibió la formación de la biocapa por *E. coli* O44:H18 a una concentración de 200 µg/mL en un 90% en el tratamiento sin incubación. En las concentraciones de 20 y 2 µg/mL los resultados indican que las mejores inhibiciones en la formación de la biocapa se obtienen en el tratamiento sin incubación. Estos resultados sugieren que la preincubación no es la condición óptima para que el ácido ursólico inhiba la formación las biocapas formadas por *E. coli*.
- ✓ La concentración mínima inhibitoria determinada para el extracto EMNH fue mayor a 1 mg/mL. Por otra parte, para el ácido úrsólico y la (-)-epicatequina las concentraciones fueron de 500 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente.
- ✓ El contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el EMHN fue de 15.73 ± 3.11 mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto y 27.45 ± 2.31 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto, respectivamente estos resultados son comparables con los resultados obtenidos previamente para *Eriobotrya japonica* por Hong y colaboradores (2008).
- ✓ El extracto de las hojas del níspero presenta una moderada capacidad antioxidante con una CI_{50} = 100 µg/mL para DPPH• y ABTS••+ respectivamente, y una actividad moderada al Trolox® (%AA= 86.75) en el ensayo de decoloración de β-caroteno.

Perspectivas.

- ❖ Determinar el mecanismo de acción mediante el cual el EMNH y los compuestos aislados inhiben la formación de biocapa mono especie producida por *Escherichia coli* O44:H18.
- ❖ Establecer la clasificación biofarmacéutica de la (-)-epicatequina y ácido ursólico para comprobar que éstos no pierdan su actividad cuando se encuentren en el tracto gastrointestinal.
- ❖ Sintetizar polímeros en los cuales se injerte la (-)-epicatequina con la finalidad de inhibir la formación de biocapas.
- ❖ Evaluar si el EMHN tiene la capacidad de neutralizar las especies reactivas: anión superóxido, radical hidroxilo, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y peroxinitrilo.

Bibliografía.

- Aguilar, L., Aguilar, C. (2008). Guía de plantas del Museo de la Autonomía de Andalucía. Bailen: Sevilla.
- Alvarado, R. y Saavedra, R. El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo* 2005; **11**(1): 5-9.
- Argueta, A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista; México: tomo I: 319-320.
- Ateyyeh, A. y Qrunfleh, M. Studies on the loquat *Eriobotrya japonica* Lindl. *Dirasat Agricultural Sciences* 1998; **25**: 55-63.
- Avelino, F., Saldaña, Z., Islam, S., Monteiro-Neto, V., Dall'Agnol, M., Eslava, C. A., Girón, J. A. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; **300**(7): 440-448.
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., Nishino, H. Antiinflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; **28**: 1995-1999.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., Mietner, T. *Microbiología Médica*. Manual moderno: México 2008.
- Carpentier, B. y Cerf, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; **75**: 499-511.
- Castillo-García, E. y Martínez-Solís, I. *Manual de Fitoterapia*, Editorial Elsevier-Doyma, Barcelona, España 2007.
- Calzada, F., Alanís AD. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy research* 2007; **21**: 78-80.
- Cheng, Z., Moore, J., Yu, L. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; **54**: 7429-7436.
- Corteson J. W. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 1995; **15**: 137-140.
- Corteson J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318-1322.
- Chunhua, Z., Chongde, S., Kunsong, C., Xian, Li. Flavonoids, Phenolics, and Antioxidant Capacity in the Flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; **12**: 2935-2945.
- Cruz, Manzano., Sanfiel-Vasseur, E., Palacio, O. Estrés oxidativo e hipertensión esencial: una realidad clínica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2004; **23**: 3-5.
- Czeczulin, J., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997; **65**: 4135-4145.

Czczulin, J., Whittam, T., Henderson, R., Navarro- Garcia, F., Nataro, J.P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999; **67**: 2692–2699.

Davey M.E. O´Toole G.O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; **64** (4): 847-867.

De Tommasi, N., Pizza, C., Conti, C., Orsi, N., Stein, ML. Structure and in vitro antiviral of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *Journal of Natural Products* 1990; **53** (4): 830-835.

De Tommasi, N., De Simone, F., Cirino, G., Cicala, C., Pizza, C. Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Planta Medica* 1991; **57**: 414–416.

De Tommasi, N., De Simone, F., Pizza, C., Mahmood, N., Moore, P. Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties. *Journal of Natural Products* 1992; **55**: 1067-1073.

Ding, C., Chen, K., Sun, Q., T.L. Xia Q, Zhu D.W. Germplasm resources and breeding of *Eriobotrya japonica* Lindl. in China. *Acta Horticulturae* 1995; **403**: 121-126.

Ding, K., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y., Wang, C. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001; **49**: 2883–2888.

Donlan R.M. Biofilms and device-associated infections, *Emerg. Infect. Dis.* 2001; **7**(2): 277-281.

Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8** (9): 881-890.

Donlan, R.M., Costerton, W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; **15**(2):167-193.

Dreeszen P.H. Biofilm: The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking Water Systems, 2ª edición, *Edstrom Industries Inc* 2003.

Dunne, W.M., Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; **15**: 155-166.

Ferreres, F., Gomes, D., Valentao, P., Gonsalves, R., Pio, R., Chagas, E., Reabra, R., Andrade, P. Improved loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars: variation of phenolics and antioxidative potencial. *Food Chemistry* 2008; **110**: 881-890.

Franco, O., Aguirre, S., Morales, E., González, A., Gutiérrez, F. Caracterización morfológica y bioquímica de los frutos de tecojote (*Crataegus mexicana* DC.) de lema y Coyoacán. *Ciencias ergo sum* 2010; **17**(1): 61-66.

Gillespie, Stephen., Hawkey, Peter M. *Principles and practice of clinical bacteriology*, 2ª edición, Inglaterra, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

GU, C., Spongberg, A., Wu, P. *Eriobotrya* flora of china. *Raven & Y. Hong (eds.)* 2003; **9**: 138-141.

Habsah, M., Abas, F., Permana, D., Lajis, N.H., Ali., A.M., Sukari, M.S., Taufiq Y.Y., Kikuzaki, H., Nakatani, N. DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; **54**: 811-815.

Hamada, A., Yoshioka, S., Takuma, D., Yokota, J., Cui, T., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. The effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on oxidative stress in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; **27**: 1961–1964.

Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; **13**: 572–584.

Ho, H., Liang, K., Lin, W., Kitanaka, S., Wu, Jin-bin. Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; **110** (5): 588-592.

Houghton, P.J. and Lian, L.M. Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*. *Phytochemistry* 1986; **25**: 1939-1944.

Hong, Y., Lin, S., Jiang, Y., Ashraf, M. Variation in contents of total phenolics and flavonoids and antioxidant activities in the leaves of 11 *Eriobotrya* species. *Plant Foods for Human Nutrition* 2008; **63** (4): 200-204.

Huang, Y., Li, J., Cao, Q., Yu, S.C., Lv, XW., Jin, Y., Zhang, L., Zou, Y.H., Ge, JF. Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf in chronic bronchitis rats. *Life Science* 2006; **78**: 2749–2757.

Insero, O., Monastra, F., Paesano, G. Nespolo del Giappone. *L'Italia Agricola* 1990; **3**: 149-152.

Ito, H., Kobayashi, E., Li, SH., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002; **50**: 2400–2403.

Ishida, M., Okubo, T., Koshimizu, K., Daito, H., Tokuda, H., Kin, T., Yamamoto, T., Yamazaki, N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. *Chemical Abstract* 1990; **113**: 121-123.

Ju, JH., Zhou, L., Lin, G., Liu, D., Wang, LW., Yang, JS. Studies on constituents of triterpene acids from *Eriobotrya japonica* and their anti-inflammatory and antitussive effects. *Journal of Chinese Pharmacology* 2003; **38**: 752–757.

Kaper, J., Nataro, J., Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; **2**, 123-140.

Kashiwada, Y., Izuka, H., Yoshioka, K., Chen, R., Nonaka, G., Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. XCIII. Occurrence of Enantiomeric Proanthocyanidins in the Leguminosae Plants, *Cassia fistula* L. and *C. Javanica* L. *Chem. Pharm. Bull* 1990; **38** (4): 88-983.

Kazunari, T., Shoko, N. Hipoglycemic Activity of *Eriobotrya japonica* Seeds in Type 2 Diabetic Rats and Mice. *Biotechnol* 2008; **72** (3): 686-687.

Koba, K., Matsuoka, A., Osada, K., Huang, Y. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. *Food Chemistry* 2007; **104** (1): 308-316.

Kubola, J., Siriamornpun, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry* 2008; **110**: 881-890.

Kuang, H., Kasai, R., Ohtani, K., Liu, Z., Yuan, C., Tanaka, O. Chemical constituents of pericarps of *Rosa davurica* Pall, a Traditional Chinese medicine. *Pharm Bull* 1989; **37**: 2232-2233.

- Kraigsley, A., Ronney, P., Finkel, S. Dynamics of self propagating fronts of motile bacteria. 2002.
- Kriengsak, T., Unaroj, B., Crosby, K. Comparasion of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; **19**: 669-675.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004; **84**: 329-339.
- Lasa, I., Pozo, J., Penadés, J., Leiva, J. Biofilms Bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra* 2009; **28**: 1137-6627.
- Laza, D., Rodríguez, L., Sardina, G. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; 2012: **41**: 18-27.
- Lee, T-H., Juang, S-H., Hsu, F-L., Wu, C-Y. Triterpene Acids from the leaves of *Planchonella duclitan* (Blanco) Bakhuzian. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2005; **52**: 1275-1280.
- Liang, ZZ., Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C. Polyhydroxylated triterpenes from *Eriobotrya japonica*. *Planta Medica* 1990; **56**: 330–332.
- Lin, S., Sharpe, R., Janick, J. Loquat: botany and horticulture. *Horticultural Reviews* 1999; **23**: 233-276.
- Llácer, G., Aksoy, U., Mars, M. Underutilized fruit crops in the Mediterranean region. *Cahiers Options Méditerranéennes* 1995; **13**: 110.
- Ma, X.H., Zhao, Y.C., Yin, L., Han, D.W., Ji, C.X. Studies on the effect of oleanolic acid on experimental liver injury. *Acta Pharmaceutica Sinica* 1982; **17**: 93–97.
- Mensor, L., Menezes, F., Leitao, G., Reis, A., Dos Santos, T., Coube, C., Leitao, S. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free radical method. *Phytotherapy Res.* 2001; **15**: 127-130.
- Molina, L., Eslava, C. Patotipos de *Escherichia coli* diarrigénica. Texto en línea. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>. Fecha de consulta 24 de octubre 2014.
- Morton J.F. Loquat. In: "Fruits of warm climates". Creative Resource Systems. Winterville, FL; 1987: 103-108.
- Nataro, J., Kaper, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol* 1998; **11**: 142–201.
- Nataro, J., Hicks, S., Phillips, A., Vial, P., Sears, C.L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun* 1996; **64**: 4761–4768.
- Navarro, C., Muñoz, F. *Eriobotrya japonica*. Garmendia & C. Navarro (eds.). *Flora Ibérica* 1998; **6**: 389-391.
- Nishioka, Y., Yoshioka, S., Kusunose, M., Cui, T., Hamada, A., Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S. Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; **25**: 1053–1057.

- Noreen, W., Wadood, A., Hidayat, H.K., Wahid, S.A. Effect of *Eriobotrya japonica* on blood glucose levels of normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Medica* 1988; **54**: 196–199.
- Nozato, N., Matsumoto, K., Uemitsu, N. Triterpenes from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Natural Medicines* 1994; **48**: 336-339.
- Perry L. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. Attributed Properties and Uses, The Mitt Press, cambridge, Massachussetts and London, 1980. 361-363.
- Prior, R., L, Wu., X, Schaich., K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; **53**: 4290-4302.
- Procházková, D., Bousková, I., Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; **82**: 513–523.
- Reisner, A., Janus, A., Haagensen, M., Zechner, E., Molin, Soren. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology* 2003; **48**(4): 933–946.
- Ríos de Molina, M. C. El estrés oxidativo y el destino celular, *Revista Química Viva* 2003; **2**:17–28.
- Rodríguez A. (1983).El cultivo del níspero en el Valle del Algar-Guadalest. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa de Ensarriá (Alicante).
- Rodríguez-Angeles, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Pública México* 2002; **44**: 464-475.
- Roginsky V. y Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 2005; **92** (2):235–254.
- Saraswat, B., Visen, P.K., Agarwal, D.P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tetericornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytotherapy Research* 2000; **14**: 163–166.
- Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *Journal of Korean Medical Science* 2001; **16**: S28–37.
- Shimizu, M., Fukumura, H., Tsuji, H., Tanaami, S., Hayashi, T., Morita, N. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1986; **34**: 2614–2617.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999; **299**:152-176.
- Steiner, T., Lima, A., Nataro, J., Guerrant, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1998; **177**: 88–96.
- Stewart, P., Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; **358**: 135-8.

Taniguch, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, H. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry* 2002; **59**: 315–323.

Tellez-P S. Los biofilms y su recuperación en la industria alimentaria. VISAVET Health Surveillance centre 2010. Texto en línea consultado: 9-Oct-2014 .

Terry, A., Curtis, E., Pantle, R. Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; **69**: 5006-5010.

Tous J, Ferguson L. Mediterranean fruits. *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. 1996: 416-430.

Lee, T-H., Juang, S-H., Hsu, F-L., Wu, C-Y. Triterpene Acids from the leaves of *Planchonella duclitan* (Blanco) Bakhuizen. *Journal of Chinese Chemical Society* 2005; **52**: 1275-1280.

Tzipori, S., Montanar, J., Robins-Browne, R., Vial, P., Gibson, R., Levine, M.M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the genotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun* 1992; **60**: 5302–5306.

Vasconcelos, M.A., Royo, V.A., Ferreira, D.S., Crotti, A.E., Andrade, Silva., Carvalho, J.C., Bastos, J.K., Cunha, W.R. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift fur Naturforschung* 2006; **61**: 477–482.

Velázquez-Paniagua M, Prieto-Gómez B, Contreras-Pérez R. El envejecimiento y los radicales libres. *Revista de Ciencias*, 2004; **75**: 36–43.

Vial, P., Robins-Browne R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J., Nataro, J. P. Characterization of entero adherentaggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1988; **158**: 70–79.

Waltnick, P., Kolter, R. Biofilm, city of microbes, *J. Bacteriol* 2000; **182**: 2675-2679.

Wang, W., Wu, N., Y, Fu. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry* 2008; **108**: 1019–1022.

Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006; **29**: 467–471.

Young, H.S., Chung, H.Y., Lee, C.K., Park, K.Y., Yokosawa, T., Oura, H. Ursolic acid inhibits aflatoxin B1-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1994; **17**: 990–992.

Zhang, H., Peng, S., Cai, L., Fang, D.Q. The germplasm resources of the genus *Eriobotrya* with special reference on the origin of *E. japonica* Lindl. *Plant Breeding Abstracts* 1993, **63**: 772.

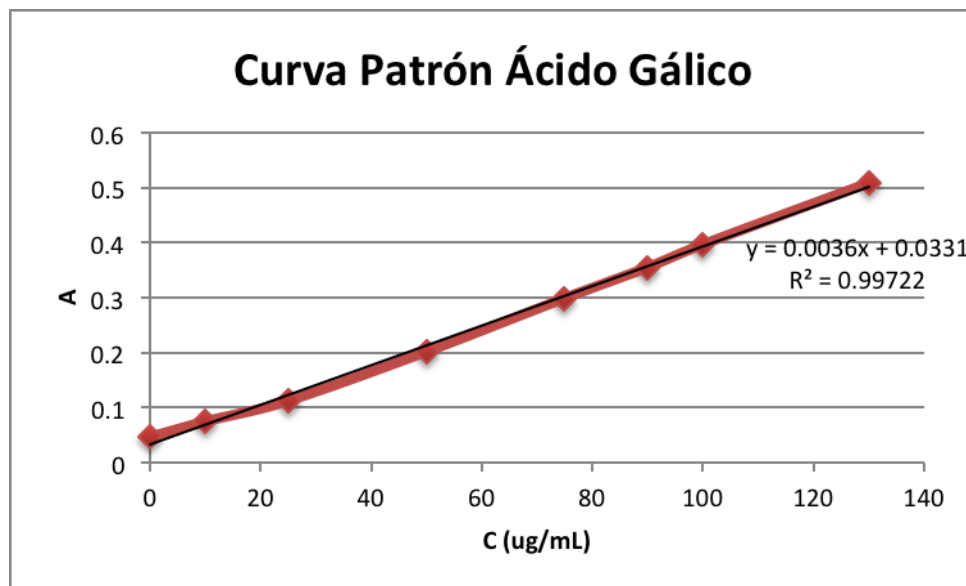
Zhou, C., Chen, K., Sun, C., Chen, Q., Zhang, W., Li, X. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Biomedical Chromatography* 2007; **21**: 755-761.

Zhu, H., Chang, L., Li, W., Liu, H. Effect of amygdalin on the proliferation of hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat. *Journal of Huazhong University Science and Technology (Medical Sciences)* 2004; **24**: 223–225.

Zhuang F. Determination of amygdalin content in *Eriobotrya japonica* leaves by high performance liquid chromatography (HPLC). *Strait Pharmaceutical Journal* 2002; **14**: 64–65

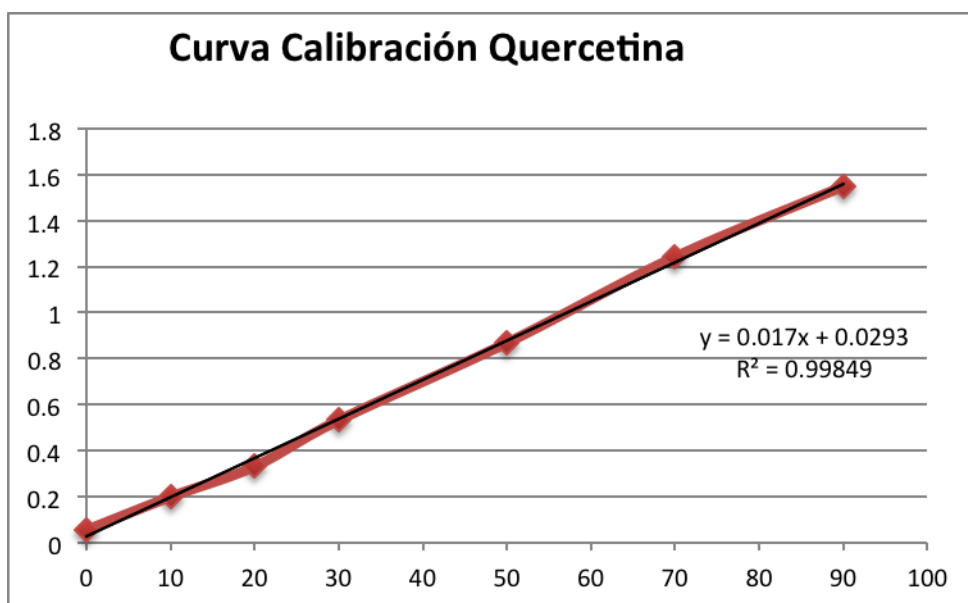
1. Curva de calibración fenoles totales.

C (µg/mL) ácido gálico	A
0	0.046
10	0.074
25	0.112
50	0.201
75	0.299
90	0.355
100	0.396
130	0.508



2. Curva de calibración de flavonoides totales.

C (µg/mL) quercetina	A
0	0.056
10	0.201
20	0.333
30	0.534
50	0.871
70	1.245
90	1.552
100	1.656



3. Curva de Cl_{50} en el ensayo de decoloración de DPPH.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Log C	%DPPH neutralizado
1000	3	74.79
700	2.8	65.31
500	2.6	61.77
300	2.4	52.19
100	2	47.26

4. Curva de Cl_{50} en el ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Log C	%DPPH neutralizado
10	1	13.31
30	1.47	24.73
50	1.69	30.15
70	1.84	31.59
100	2	46.86

5. Cálculos para el %AA en el ensayo de decoloración de β -caroteno.

Tiempo cero min.				
Réplica #	1	2	3	Promedio
Control	0.128	0.159	0.159	0.1486
EMHN	0.070	0.085	0.089	0.0813
Trolox [®]	0.068	0.054	0.053	0.0583

Tiempo 60 min.				
Réplica #	1	2	3	Promedio
Control	0.003	0.001	0.001	0.001
EMHN	0.039	0.040	0.040	0.040
Trolox [®]	0.031	0.034	0.038	0.034

$DR_C = (Lna7b)/60$ Control	$DR_S = (Lna7b)/60$ EMHN
0.083	0.011

	%AA
EMHN	86.75
Trolox [®]	41.68

%AA= porcentaje de actividad antioxidante