



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POTENCIAL ANTIPLACA DEL JUGO DE  
GRANADA (*Punica granatum L.*)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A :  
GLORIA CASTAÑON NEGRÓN



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2008



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: Profesor: Maria Isabel Aguilar Laurents  
VOCAL: Profesor: Rachel Mata Essayag  
SECRETARIO: Profesor: José Fausto Rivero Cruz  
1er. SUPLENTE: Profesor: Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
2° SUPLENTE: Profesor: Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 124 y 126, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

*Rivero Cruz J.F.*  
ASESOR DEL TEMA: José Fausto Rivero Cruz

*Gloria*  
SUSTENTANTE: Gloria Castañón Negrón

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de adquirir una formación académica sólida.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su tutoría y su enseñanza compartida.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dra. Rachel Mata Essayag por la revisión de la tesis.

A las persona de la USAI por el registro y análisis de los distintos espectros utilizados en esta investigación.

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) IN208207.

# ÍNDICE

Índice.....	i
Abreviaturas.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Cuadros.....	vii
Índice de Graficas.....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1 Las plantas medicinales en México.....	2
2.2 Familia Punicaceae.....	3
2.3 Características de <i>Punica granatum</i> L.....	3
2.3.1 Descripción botánica.....	3
2.3.2 Composición química.....	4
2.3.3 Propiedades farmacológicas.....	7
2.4 Taninos.....	16
2.4.1 Estructura química.....	16
2.4.2 Propiedades físico-químicas.....	16
2.4.3 Propiedades biológicas de los taninos.....	17
2.4.4 Actividad antibacteriana.....	18
2.5 Enfermedades bucales en México.....	19
2.5.1 Etiología.....	20
2.6 Asociación entre caries dental y <i>S. mutans</i> .....	22
2.6.1 Características generales del género <i>Streptococcus</i> .....	22
2.6.2 Estructura.....	23
2.7 Grupo <i>Streptococcus mutans</i> .....	24
2.7.1 Características estructurales.....	24
2.7.2 Metabolismo de la sacarosa.....	24
2.7.3 <i>Streptococcus mutans</i> -caries..	25

<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
4.1 Procedimientos generales.....	28
4.1.1 Análisis cromatográficos.....	28
4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	28
4.2 Material vegetal.....	29
4.3 Ensayos biológicos.....	29
4.3.1 Microorganismos de prueba.....	29
4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29
4.4 Estudio fitoquímico de <i>Punica granatum</i> .....	30
4.4.1 Preparación del extracto orgánico a partir del jugo de <i>Punica                 granatum</i> .....	30
4.4.2 Fraccionamiento primario del extracto de acetato de etilo del jugo de granada.....	30
4.4.3 Fraccionamiento del secundario de la fracción activa FII.....	32
4.4.4 Obtención del ácido gálico.....	33
4.4.5 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII.....	34
4.4.6 Obtención del ácido elágico.....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del jugo de granada sobre <i>S. mutans</i> .....	35
5.2 Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el jugo de granada.....	36
5.3 Caracterización estructural del compuesto 1.....	37
5.4 Caracterización estructural del compuesto 2.....	39
5.5 Evaluación del potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios.....	42

5.6 Efecto de los compuestos aislados sobre la agregación de <i>S. mutans</i> .....	42
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	44
7. PERSPECTIVAS GENERALES.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	por ciento
AcOEt	acetato de etilo
cc	cromatografía
ccf	cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CMI	concentración mínima inhibitoria
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectrometría de masas
EMIE	espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOH	etanol
g	gramo
IR	infrarrojo
kg	kilogramo
L	litro
m/z	relación masa carga
CD <sub>3</sub> OH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahertz
mL	mililitro
mm	milímetro
MeOH	metanol
°C	grado Celsius
ppm	partes por millón
RMN- <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear protónica
RMN- <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono
s	singulete



UV	ultravioleta
$\delta$	desplazamiento químico
$\lambda_{\max}$	longitud de onda máxima
$\mu\text{g}$	microgramo
GTF	glucosiltransferasa

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción de <i>Punica granatum</i> L.....	5
<b>Figura 2.</b> Compuestos activos aislados a partir de <i>P. granatum</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de ácido gálico.....	38
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de ácido gálico.....	39
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de ácido elágico.....	41
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de ácido elágico.....	41
<b>Figura 7.</b> Efecto del tratamiento con ácido elágico.....	43

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Nombres comunes, distribución, parte usada y usos de <i>P. granatum</i> ...	6
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos reportados para la especie <i>P. granatum</i> .....	10
<b>Cuadro 3.</b> Microorganismos aislados de la cavidad oral.....	21
<b>Cuadro 4.</b> Factores metabólicos de cariogenicidad de <i>Streptococcus mutans</i> ....	26
<b>Cuadro 5.</b> Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna del extracto de <i>P. granatum</i> .....	31
<b>Cuadro 6.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para las fracciones FI-FVIII derivadas del fraccionamiento secundario del extracto obtenido a partir del jugo de <i>P. granatum</i> .....	31
<b>Cuadro 7.</b> Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción FII.....	32
<b>Cuadro 8.</b> Proceso de extracción y fraccionamiento del extracto de <i>Punica granatum</i> .....	33
<b>Cuadro 9.</b> Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII.....	34
<b>Cuadro 10.</b> Datos físicos y espectroscópicos del compuesto 1.....	38
<b>Cuadro 11.</b> Datos físicos y espectroscópicos del compuesto 2.....	40
<b>Cuadro 12.</b> CMI de los compuestos aislados sobre la bacteria <i>S. mutans</i> .....	42

## ÍNDICE DE GRAFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Efecto del ácido elágico sobre la agregación de <i>S. mutans</i> .....	43
--	----

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales de mayor prevalencia, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), son la caries dental y la enfermedad periodontal; las de frecuencia media son las anomalías cráneo-facio-dentales y maloclusiones; las de frecuencia variable son el cáncer oral, las alteraciones de tejidos dentales, los traumatismos maxilofaciales y la fluorosis dental. Todos estos padecimientos ocasionan considerables costos sociales y económicos. Los Estados Unidos Mexicanos, de acuerdo con la clasificación internacional de la Organización Mundial de la Salud, se encuentra entre los países de alto rango de frecuencia en enfermedades bucales, siendo la caries dental, la que más frecuente afecta a más del 90% de la población mexicana. Por esta razón, es indispensable unificar y establecer los criterios de atención a la salud bucal, con énfasis en la prevención, en los sectores público, social y privado.

Una gran variedad de métodos se utilizan actualmente para el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, ninguno de los agentes disponibles es ideal y frecuentemente presentan efectos adversos. Esto justifica la búsqueda y desarrollo de agentes alternos derivados de fuentes vegetales que sean más seguros y efectivos para el tratamiento de las enfermedades orales.

El presente trabajo evalúa el potencial para inhibir la formación de la placa dentobacteriana (bioplaca) en la cavidad oral por compuestos aislados de la especie medicinal *Punica granatum* (granada roja). La selección de esta especie se basó en su frecuencia de uso y en la amplia comercialización de la misma como remedio para infecciones en la cavidad oral. La posibilidad de estudiar el potencial de esta especie para la inhibición de las bioplacas en la cavidad oral, representa un gran avance para el tratamiento de estas enfermedades con productos que hasta ahora no son elegibles por la falta de conocimiento científico. Desde el punto de vista social la valoración de las plantas medicinales de uso frecuente en las prácticas tradicionales conlleva a la posibilidad de apoyar un uso racional de estos recursos sobre todo si se considera que más del 70% de la población mexicana las consume para tratar una variedad de padecimientos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Las plantas medicinales en México.

En México, la historia de la medicina herbolaria se remonta más allá de la época precolombina. El uso de hierbas como remedio no sólo ha sobrevivido, sino que ha experimentado un notable crecimiento en la pasada década frente a los grandes avances científicos y tecnológicos en la medicina. Las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas, además de representar una alternativa económica en el cuidado de la salud. Esta presencia relevante, que no es nueva pero sí se encuentra actualmente sujeta a condiciones inéditas, se da en nuestro país no solamente en el medio rural, sino también entre poblaciones urbanas como resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos<sup>1</sup>

México posee la cuarta flora más rica del mundo, además de contar con un enorme acervo de conocimientos etnobotánicos, especialmente en referencia a las plantas medicinales. El simple hecho de contar con una amplia variedad de hierbas medicinales, hace y crea la necesidad de investigar todas las posibilidades de empleo de las plantas en la clínica, además se utilizarlas de forma racional y con un instrumento que guíe su aplicación<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> SSA. (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. pp.15, 16.

<sup>2</sup> Lara. F., Márquez. C. (1996) Plantas Medicinales en México. Composición, usos y actividad biológica. Dirección General de Publicaciones UNAM. México D.F. pp. 7, 8.

## 2.2 Familia Punicaceae

La Punicaceae es una pequeña familia que comprende exclusivamente género *Punica*, con dos especies leñosas, con hojas opuestas, sencillas, enteras sin cavidades y con las estípulas reducidas. Las flores son hermafroditas y actinomorfas, poseen un cáliz con pétalos, una corola con otros tantos pétalos libres un androceo con estambres muy numerosos y un gineceo con muchos carpelos dispuestos en un único verticilo en *Punica protopunica* y en dos o más vertilicios en *P. granatum*<sup>3</sup>. Aunque esta última posee varias variedades debido a su explotación agrícola y uso ornamental, *P. protopunica* es prácticamente desconocida, está en peligro de extinción y sólo se conoce unos pocos ejemplares en la isla de Socrota<sup>4</sup>.

### 2.3 Características de *Punica granatum* L.

#### 2.3.1 Descripción botánica de *Punica granatum* L. (Punicaceae).

*Punica granatum* es un árbol cosmopolita, se conoce como granada en México. Mide de 3 a 4 metros de alto de madera dura y corteza escamosa, el tronco lo tiene retorcido y tiene muchas ramas delgadas con ramificaciones que generalmente terminan en espina, copa extendida y con mucho ramaje. Las hojas son simples, teniendo un ápice obtuso y una base aguda brillante, mide de 1 a 8 cm de largo por 0.5 a 2.4 cm de grosor. Las flores son vistosas, robustas, arrugadas, color escarlata mide cerca de 3 cm de diámetro, nacen de 1 a 5 flores en la punta de la rama, florece de mayo a agosto. El fruto (Figura 1) es una baya en forma de globo coronada por un cáliz mide de 6 a 14 cm de diámetro, la cáscara o pericarpio del fruto es brillante y correosa. En su interior hay divisiones de entre 5 a 8 compartimientos que contienen pequeños sacos de jugo rojo o rosa

<sup>3</sup> Lara, F., Márquez, C. (1996). Plantas Medicinales en México. Composición, usos y actividad biológica. Dirección General de Publicaciones UNAM. México D.F. pp. 7, 8.

<sup>4</sup> Lansky, P. E., Newman, A. R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 109. p. 177.

<sup>5</sup> Roos, I. (1999). Medicinal Plants of the World. Chemical, Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, EUA. pp. 273, 274.

de sabor ácido-dulce. En el interior de cada saco se encuentra una semilla triangular, blanquecina de 6 mm de largo<sup>5</sup>.

*Punica granatum* es una de las drogas más antiguas conocidas. Se menciona en el Papiro de Ebers de Egipto escrito aproximadamente en 1550 a de C. Es originaria de Irán y Afganistán, actualmente se distribuye mundialmente. En México se le encuentra a lo largo de la República. En la medicina alternativa de distintas partes del mundo se le conoce con nombres variados (Cuadro 1). En México se le conoce también con el nombre de granado<sup>6</sup>.

En las prácticas médicas tradicionales de todo el mundo varias son las partes de la planta que son usadas con fines curativos (Cuadro 1)<sup>7</sup>. En el caso particular del pericarpio del fruto se emplea en diferentes preparados para tratar úlceras pépticas, inflamación, como abortivo, anticonceptivo, trastornos del tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal. Así mismo, se usa para tratar diarrea, disentería y como vermífugo<sup>8</sup>.

Las flores y la cáscara del fruto se usan como astringente diarrea y diabetes. La corteza es utilizada para disentería, la diarrea, bronquitis, antihelmíntico y para problemas de la bilis<sup>9</sup>.

### 2.3.2 Composición química de *Punica granatum*

La cáscara del fruto contiene mucilagos, lignanos, caroteno, crisantemina, niacina, pectina, ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido pantoténico, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y ácido

<sup>5</sup> Roos, I. (1999). Medicinal Plants of the World. Chemical, Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, EUA. pp. 273, 274.

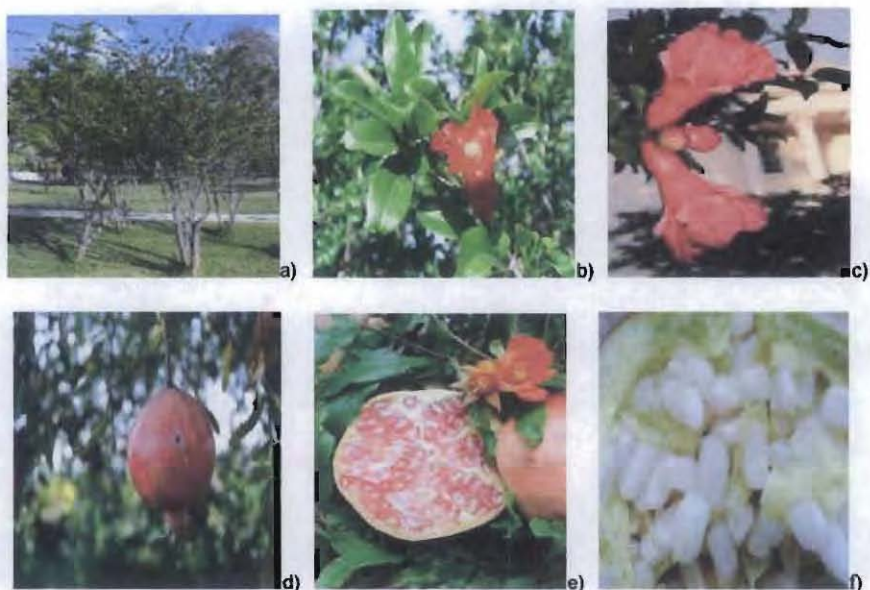
<sup>6</sup> *Ibid.*, p. 273.

<sup>7</sup> *Ibid.*, p. 273.

<sup>8</sup> Roos, I., *op cit.*, 278, 279; Yehoshua, S., Philip, E., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. 66, p. 12.

<sup>9</sup> Roos, I., *op cit.*, 277, 278; Hosseind, S., Rahemi, M. (2007). Seasonal change of mineral nutrients and phenolic in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*. 111, pp. 120, 121; Poyrazoglu, E., Goekmen, V., Artik, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15, p. 567.

cumarínico); ácidos inorgánicos (ácido bórico); taninos (cianina, ácido elágico, malvidina, pelargonidina, punicalina y punicalagina); flavonoides (luteolina, quercetina y camperol) y azúcares (glucosa, fructosa y maltosa)<sup>10</sup>.



**Figura 1.** Descripción de *Punica granatum*. a) Árbol; b) Hoja; c) Flor; d) Corteza; e) Fruto; f) Semilla.

De la corteza de la raíz se han aislado alcaloides (peletierina, metil-peletierina, isopeletierina y pseudopeletierina)<sup>11</sup>, taninos (ácido granatotánico y ácido galotánico); un terpeno (ácido ursólico) y un polialcohol (manitol).

<sup>10</sup> Lansky, P. E., Newman, A. R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 109. p 180.

<sup>11</sup> Wibaut, J.P., Hollstein, U. (1957). Investigation of alkaloids of *Punica granatum* L. *Archives of biochemistry and biophysics*. 69. pp. 27, 31; Neuhofer, H., Witte, L., Gorunovic, M., Czygan, F.C. (1993). Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie*. 48. p. 389.



**Cuadro 1.** Nombres comunes, distribución, parte usada y usos de *P. granatum*

Nombre común	Distribución	Parte usada	Usos
Apinkoya, Magraner, Manglano, Mingrana, Milingrandeira y Romazeira	España y Latinoamérica	Raíz y tronco Cáscara del fruto  Fruto	Parasitosis intestinal. Diarrea disentería e infecciones. Gripe y resfriados.
Dadima, Darim, Mathalanarakom, Pomegranate y Posnar.	India	Raíz  Fruto	Abortivo y Antihelmíntico Lepra, leucorrea y menorragia, úlceras pépticas, disentería y diarrea, colitis, cólicos, antiinflamatorio.
Granada, pomegranate y granado	Argentina, Cuba, Guatemala, Perú, Honduras, México, Venezuela Islas Canarias	Corteza del tronco, Fruto, Jugo, Raíz y Flores	Úlceras, disentería y diarrea. Antihelmíntico, detiene el sangrado excesivo de la menstruación, enteritis, infecciones del tracto respiratorio y urinario, inflamación de garganta.
Melograno, Qsur, Roma y Renato	Italia	Cáscara del fruto	Inflamación
Mkona manga	Este de África	Corteza de raíz	Antihelmíntico
Nar	Turquía	Corteza del tronco	Diarrea
Pomegranate, Roma y Romeira	Turquía, Egipto, Inglaterra, Nepal, EUA y Grecia	Cáscara del fruto, Corteza de la raíz y Tallo	Anticonceptivo y traqueobronquitis, diarrea, antihelmíntico y fiebre
Roman	Egipto y Etiopía	Fruto, Hojas y Corteza de raíz	Lesiones de piel, Antihelmíntico, antibacteriano.
Sham al-rumman	Arabia	Cáscara del fruto	Anticonceptivo
Thab thim	Tailandia	Cáscara del fruto, Raíz	Antihelmíntico, diarrea y disentería.

La corteza del tronco contiene taninos (ácido galotánico, ácido punicotánico, ácido elágico, ácido gálico, casuarina, casuarinina, pedunculagina, puniacorteina A-D, galoil, punicalagina y punicalina); ácidos orgánicos (ácido betulínico y ácido punicico); un esteroles ( $\beta$ -Sitosterol); un flavoniodo (higrina); un triterpeno (friedelina); un polialcohol (manitol) y alcaloides (peletierina y derivados)<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> Lansky, P. E., Newman, A. R *op cit.* pp. 186-188.

Las hojas tienen alcaloides (estricnina); taninos (corilagina y galoilpunicalina, ácido elágico, granatina A y B); un terpeno (ácido ursólico); flavonoides (cianidina, delfinidina, glucósido de apigenina y glicósidos de luteolina) y un azúcar (manitol)<sup>13</sup>.

Las semillas contienen alcaloides (crisantemina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e icarisido, D); lípidos (octadecatrienoil glicerol, isopentil-3-O-octadeca-2-enoil glicerol); ácidos grasos (ácido octadecenioco, ácido octadecanioco, ácido eicosanioco, ácido araquídico, ácido heneicosanoico, ácido nonanoico, ácido tricosanoico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido punicico, ácido linoléico y ácido palmítico); esteroides (cumesterol, y daucosterol); esteroides (estradiol, estrona y estriol)<sup>14</sup>; flavonoides (cianina, cianidina, fenetil rutinósido, genisteina, delfina, delfinidina, y pelargonidina, pelargonina); azúcares (manitol y fosfatidilinositol) y dos taninos (ácido 3,3-di-O-metil elágico y ácido 3,3,4-tri-O-metil elágico)<sup>15</sup>.

Las flores contienen terpenos (ácido asiático, ácido estíptico y ácido maslínico) y flavonoides (glicósidos de delfinidina, glicósidos de pelargonidina y cianidina).

El jugo se ha reportado que tiene taninos (ácido elágico, derivados de glucurónido de metil éster del ácido elágico y punicalagina)<sup>16</sup>.

### 2.3.4 Propiedades farmacológicas

*P. granatum* ha demostrado las siguientes propiedades farmacológicas: antihelmínticas, tenífugas, antibacteriales, antivirales, antifúngicas, astringentes,

<sup>13</sup> Roos, I. (1999). Medicinal Plants of the World Chemical, Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, EUA. p. 276; Yehoshua, S., Philip, E., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. 66. pp. 11, 12.

<sup>14</sup> Abd ElWahab, S.M., El Fiki, N.M., Mostafa, S.F., Hassan, A.E.B. (1998). Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatum* L. seeds. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*. 36. pp.11-15; Lansky, P. E., Newman, A. R *op cit.* pp. 188, 189.

<sup>15</sup> Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I. (1986). Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 34, pp. 650, 651.

<sup>16</sup> Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rassol, S.A., Sayeed, S.A. (2007). Antibacterial Activity Directed Isolation of Compounds from *Punica granatum*. *Journal of food science*. 72. pp. 341.

antidiarreicas, antidisentéricas, depurativas, inmunomoduladoras, ateroscleróticas, antiparasitarias, enfermedades periodontales, antitusivas, antipiréticas, anticancerígenas, antidiabéticas y antifertilidad<sup>17</sup>.

A la planta entera se le demostró una alta efectividad contra *Escherichia coli*. El extracto inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. El extracto fue efectivo en la estomatitis asociada al *Candida albicans*. El extracto metanólico inhibe a la  $\alpha$ -amilasa, y en ratas hebra el extracto metabólico acuoso, inhibe la fertilidad de un 70 a 90%.

La cáscara del fruto sirve contra fiebres intermitentes y para expulsar solitarias. Además tiene actividad *in vitro* contra *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* y *Candida tropicales*. A una dosis de 100 mg/Kg en conejos estimula el sistema inmune y tiene actividad astringente. El extracto tiene actividad contra el virus del herpes genital (HSV-2), también inhibe a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* cepas resistentes a penicilina G, tiene efecto inhibidor en células de proliferación de leucemia promielocítica de humano HL-60; en ratas disminuye el 76 % de lesiones gástricas inducidas con etanol, reduce los síntomas de periodontitis crónica disminuyendo la capa dentobacteriana<sup>18</sup>. Mostró actividad antioxidante a 50 ppm; también demostró la actividad captadora de radical hidroxilo y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad a 100 ppm.

El extracto de las semillas en ratas diabéticas reduce en un 52 % los niveles de la glucosa a la dosis de 300 mg/Kg.

<sup>17</sup> Yehoshua, S., Philip, E., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. 66. pp. 11, 12; Hosseind, S., Rahemi, M. (2007). Seasonal change of mineral nutrients and phenolic in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*. 111. pp. 120.

<sup>18</sup> Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rassol, S.A., Sayeed, S.A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum* L. *Journal of food science*. 72. pp.334, 335; Vasconcelos, L.C., Sampaio, F., Sampaio, M.C., Pereira, M., Higino, J., Peixoto, M. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J*. 17(3). pp. 223-227.

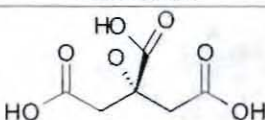
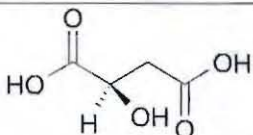
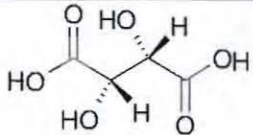
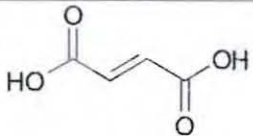
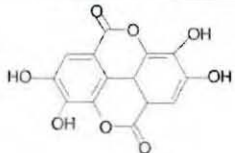
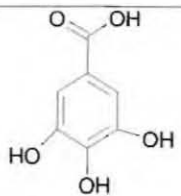
A la corteza de las ramas se le atribuye actividad astringente, antihelmíntica y antibacteriana. Las flores reducen los niveles de glucosa en sangre en rata.

El jugo de *Punica granatum* contiene una alta proporción de minerales y compuestos polifenólicos (galocatequinas, cinidinas y pelargonidinas) lo cual se sabe tienen usos terapéuticos. El jugo y la cáscara de la granada proporcionar protección contra la hepatotoxicidad, *S. aureus*, resistente a metilicina, virus del herpes genital y tumores. Reduce la presión sistólica en 21% de pacientes con aterosclerosis, disminuye las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También muestra un fuerte poder antioxidante de los lípidos, evita la oxidación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y LDL, lo cual justifica sus usos contra la arterosclerosis y como agente bioconservador en alimentos. También se ha encontrado que inhibe la actividad enzimática de la glicosiltransferasa y la colegenasa, por esta razón ha sido utilizada con éxito en la cosmetología. Evita la adherencia de *Streptococcus mutans* y otros microorganismos en la cavidad oral<sup>19</sup>.

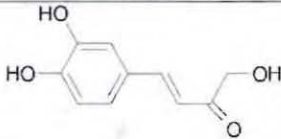
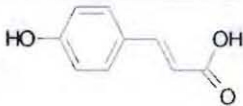
---

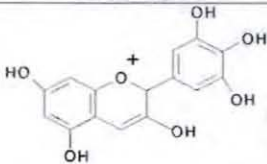
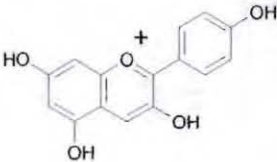
<sup>19</sup> Prashanth, D., Asha, M. K., Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Phytoterapia*. 72 p.171.

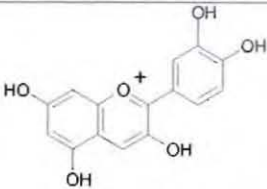
**Cuadro 2.** Compuestos reportados para la especie *Punica granatum*

<b>Ácidos orgánicos</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Ácido cítrico		Poyrazoglu <i>et al.</i> (2002)
Ácido málico		Poyrazoglu <i>et al.</i> (2002)
Ácido tartárico		Poyrazoglu <i>et al.</i> (2002)
Ácido fumárico		Poyrazoglu <i>et al.</i> (2002)
<b>Ácidos hidroxibenziocicos</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Ácido elágico		Amakura <i>et al.</i> (2000), Huang <i>et al.</i> (2005)
Ácido gálico		Amakura <i>et al.</i> (2000), Huang <i>et al.</i> (2005)

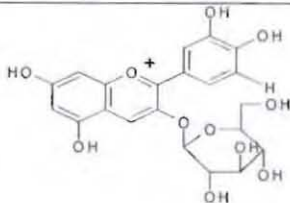
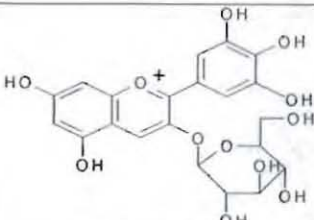
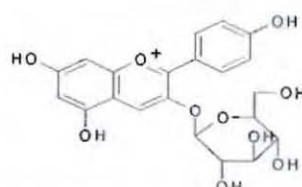
**Cuadro 2.** Continuación

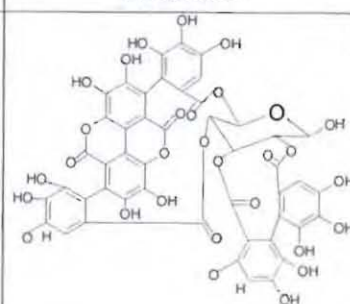
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Ácido caféico		Artik (1998), Amakura <i>et al.</i> (2000)
Ácido p-cumárico		Artik (1998), Amakura <i>et al.</i> (2000)

<b>Antocianidinas</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Delfinidina		Noda <i>et al.</i> (2002)
Pelargonidina		Noda <i>et al.</i> (2002)

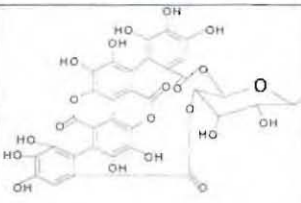
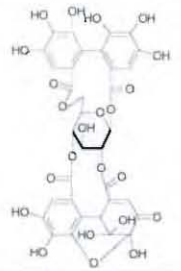
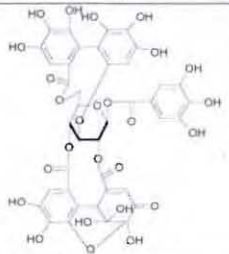
<b>Antocianidinas</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Cianidina		Noda <i>et al.</i> (2002)

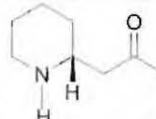
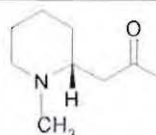
**Cuadro 2.** Continuación

<b>Antocianinas</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Cianidina-3-O-glucósido	 <p>The structure shows a cyanidin cation (a flavylium ion) with a glucose molecule attached to the C-3 position of the chromone ring. The glucose is in its cyclic pyranose form. The cyanidin core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 4'.</p>	Hernandez <i>et al.</i> (1991)
Delfinidina-3-O-glucósido	 <p>The structure is similar to cyanidin-3-O-glucoside, but the cyanidin core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3' instead of 4'.</p>	Hernandez <i>et al.</i> (1991)
Pelargonidina - 3-O-glucósido	 <p>The structure is similar to cyanidin-3-O-glucoside, but the cyanidin core has hydroxyl groups at positions 5 and 7, and a double bond at the 2-position of the chromone ring, with no hydroxyl group at the 4' position.</p>	Hernandez <i>et al.</i> (1991)

<b>Elagitaninos</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Punicalagina	 <p>The structure is a complex polyphenolic compound consisting of multiple flavan-3-ol units linked together through various glycosidic and ether linkages. It features numerous hydroxyl groups and a complex, multi-ring system.</p>	Tanaka <i>et al.</i> (1986), Gil <i>et al.</i> (2000)

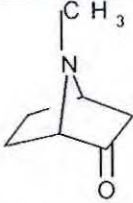
Cuadro 2. Continuación

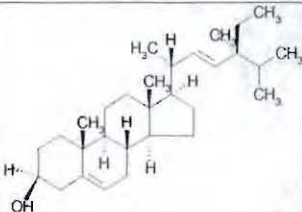
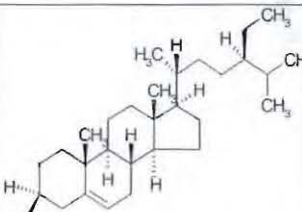
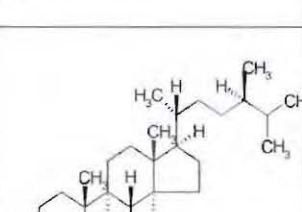
Elagitaninos		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Punicalina		Tanaka <i>et al.</i> (1986), Gil <i>et al.</i> (2000)
Granatina A		Tanaka <i>et al.</i> (1986), Gil <i>et al.</i> (2000)
Granatina B		Tanaka <i>et al.</i> (1986), Gil <i>et al.</i> (2000)

Alcaloides		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Peletierina		Neuhofer <i>et al.</i> (1993), Vidal <i>et al.</i> (2003)
Metilpeletierina		Neuhofer <i>et al.</i> (1993), Vidal <i>et al.</i> (2003)

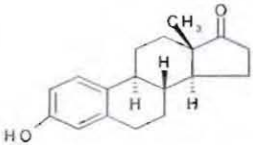
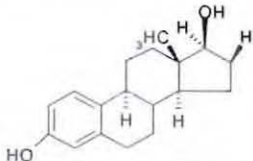


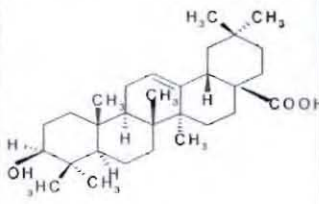
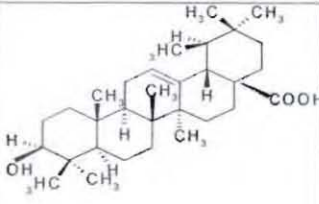
Cuadro 2. Continuación

Alcaloides		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Pseudopeletierina		Neuhofer <i>et al.</i> (1993), Vidal <i>et al.</i> (2003)

Esteroles		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Estigmasterol		Abd El Wahab <i>et al.</i> (1998)
$\beta$ -Sitosterol		Abd El Wahab <i>et al.</i> (1998)
Cumesterol		Abd El Wahab <i>et al.</i> (1998)

**Cuadro 2.** Continuación

<b>Esteroides</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Estrona		Heftmann <i>et al.</i> (1966), Dean <i>et al.</i> (1971), Abd El Wahab <i>et al.</i> (1998)
Estradiol		Abd El Wahab <i>et al.</i> (1998)

<b>Triterpenos</b>		
Nombre químico	Estructura	Referencia
Ácido oleanólico		Lansky, P. E., Newman, A. R. <i>et al</i> (2007).
Ácido ursólico		Lansky, P. E., Newman, A. R. <i>et al</i> (2007).

## 2.4 Taninos

### 2.4.1 Estructura química

Los taninos son metabolitos secundarios abundantes en las plantas que son sintetizados para protegerse de los herbívoros. Los taninos son polifenoles y se caracterizan por formar complejos con otras moléculas. Se componen de dos clases, los taninos hidrolizables y los taninos condensados. El primer grupo está formado por varias moléculas de ácidos fenólicos (el gálico o su dímero el ácido elágico), que se une por un enlace éster a un núcleo central de glucosa. Mientras que los taninos condensados (proantocianidinas) se forman por la polimerización de moléculas flavan-3-ol, también conocidos como polifavonoides<sup>20</sup>. Los taninos son derivados de la ruta del ácido sikímico.

### 2.4.2 Propiedades físico-químicas.

Los taninos se disuelven en agua formando disoluciones coloidales, pero su solubilidad varía según el grado de polimerización (disminuye conforme éste aumenta). Son solubles en alcoholes y en acetona. Las disoluciones acuosas poseen una estabilidad variable según su estructura. Como todos los fenoles, los taninos reaccionan con cloruro férrico. Precipitan de sus disoluciones acuosas con sales de metales pesados. Los taninos hidrolizables y los condensados se pueden diferenciar con base a su comportamiento en medio ácido y en caliente. Los primeros, poliésteres de glucosa se hidrolizan liberando el azúcar, ácido gálico y/o ácido hexahidroxidifénico. Este último se lactoniza rápidamente en ácido elágico. La hidrólisis de los oligómeros conduce igualmente a compuestos de 3 o 4 ciclos bencénicos cuya estructura varía según la naturaleza del enlace intermonomérico<sup>21</sup>.

<sup>20</sup> Muetzel, S., Becker, K., (2006). Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology*. 125. pp. 140,141

<sup>21</sup> Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Acribia, S.A., España. pp. 379, 380; Waterman, P., Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. pp. 100-104.

Para su caracterización el método de la vainillina es el más ampliamente utilizado este se basa en la sustitución de la vainillina por grupos hidroxifenólicos dando como resultado una coloración roja. Otro método utilizado es el de Price y Buter basado en la reducción de ión férrico a ión ferroso por los taninos y otros compuestos fenólicos para formar un complejo colorido azul de ferrocianuro-ferroso que tiene su máxima de absorción a 720 nm. Los taninos gálicos dan coloración rosa con yoduro de potasio (el ácido gálico libre se colorea en naranja con este reactivo). Los taninos elágicos se colorean con ácido nitroso en medio acético (primero sosa, después vira a púrpura y a azul)<sup>22</sup>.

Para analizar los extractos que contienen taninos se recurre a las técnicas habituales: CCF (sobre celulosa o sílice, visualizado por observación de la fluorescencia al UV y revelado con los reactivos citados anteriormente), CLAR (fases reversas, disolventes alcohólicos ligeramente ácidos)<sup>23</sup>.

#### 2.4.3 Propiedades biológicas de los taninos

La mayor parte de las propiedades biológicas de los taninos se deben al poder que poseen de formar complejos con macromoléculas, especialmente con proteínas (enzimas digestivas y otras, proteínas fúngicas o virales).

- Formación reversible de complejos. En condiciones no oxidantes y a pH fisiológico, la formación de complejos –por enlaces hidrógeno y por interacciones hidrófobas- es reversible. Los taninos posiblemente forman una capa menos hidrófila que la misma proteína en la superficie de ésta, lo que ocasiona la precipitación; establecen además enlaces entre las moléculas proteicas. La afinidad de los taninos por las proteínas es tanto más marcada cuanto más flexible sea su conformación y mayor su riqueza en prolina<sup>24</sup>.

<sup>22</sup> Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Acribia, S.A., España. p. 379; Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Ediciones Omega, S. A., España. p. 113.

<sup>23</sup> Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Acribia, S.A., España. p. 380

<sup>24</sup> Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Acribia, S.A., España. p. 382

- Formación irreversible de complejos. Teniendo en cuenta su marcada tendencia a la auto-oxidación, los taninos por ser polifenoles originan o-quinonas que, reaccionan con los grupos nucleofílicos de las proteínas, formando enlaces covalentes: la combinación es irreversible<sup>25</sup>.

#### 2.4.4 Actividad antibacteriana.

La caries dental es una enfermedad causada por *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estas bacterias producen glucosiltransferasa (GTF), la cual cataliza la formación de glucanos insolubles y solubles en agua a partir de sacarosa. La bacteria ataca a la superficie del diente y combinada con otras bacterias forma la placa dentobacteriana. Entonces, los ácidos orgánicos producidos por la degradación de la placa por otras bacterias ocasionan que el pH disminuya y en consecuencia ocurre la caries<sup>26</sup>.

Algunos polifenoles presentes en las plantas inhiben el crecimiento de *S. mutans* y la síntesis de glucanos por la GTF de *S. sobrinus* particularmente el epigallocatequingalato muestra un alto efecto inhibitorio sobre la GTF<sup>27</sup>.

Estudios previos han encontrado que el ácido elágico aislado de plantas tiene efecto inhibitorio sobre la actividad de la GTF de *S. mutans*. Este compuesto inhibe preferentemente a los glucanos solubles sintetizados por la GTF de *S. mutans* e inhibe los glucanos insolubles sintetizados por la GTF de *S. sobrinus*. Esta inhibición resulta en una reducción en la adherencia celular de *S. mutans* a la superficie del diente<sup>28</sup>. Los polímeros de polifenoles que tienen un alto peso molecular de aproximadamente 2,000 reducen el desarrollo de caries y la formación de la placa dentobacteriana e inhiben la actividad de la GTF en humanos y animales de experimentación<sup>29</sup>.

<sup>25</sup> *Ibid.* p. 382.

<sup>26</sup> Gross, G. G., Hemingway, W. R., Yoshida, T. (1999). Plant polyphenols 2. Chemistry, biology pharmacology, ecology. *Basic life sciences*. pp. 556, 575, 576.

<sup>27</sup> *Ibid.* p. 570.

<sup>28</sup> Sawamura, S., Tonosaky, Y., Hamada, S. (1992). Inhibitory effects of ellagic acid on glucosyltransferases from Mutans Streptococci. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 52. p. 766.

<sup>29</sup> Gross, G. G., Hemingway, W. R., Yoshida, T. (1999). Plant polyphenols 2. Chemistry, biology pharmacology, ecology. *Basic life sciences*. pp.578-580.

La actividad inhibitoria de los galotáninos decrece con la disminución del número de residuos de ácido gálico.

## 2.5 Enfermedades bucales en México

La salud bucal en México ha atravesado por distintas etapas en su historia y continúa actualmente su desarrollo. Los Estados Unidos Mexicanos, de acuerdo con la clasificación internacional de la OMS, se encuentra entre los países de alto rango de frecuencia en enfermedades bucales, dentro de ellas la caries dental, que afecta a más del 90% de la población mexicana<sup>30</sup>. Las prioridades a las que se aboca la política de salud bucal en México son *disminuir la experiencia de caries dental, las periodontopatías y el cáncer bucal*, para lo cual se han diseñado estrategias como son: la educación preventiva en escolares, la educación asistencial y la fluoruración de la sal de la dieta<sup>31</sup>.

El término general caries (del latín, declinar; podredumbre; descomposición seca) se refiere a: enfermedad de origen microbiano, localizada en los tejidos duros dentarios que se inicia con la desmineralización del esmalte por ácidos orgánicos producidos por las bacterias orales específicas, que metabolizan los hidratos de carbono de la dieta. Otros autores la definen como: "enfermedad multifactorial condicionada tanto en su localización y extensión como en la velocidad de progresión por elementos ya bien conocidos como son: la morfología dentaria, la localización de las acumulaciones bacterianas, la dieta, el factor tiempo, etcétera. La OMS la define como un proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y determina un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad<sup>32</sup>.

<sup>30</sup> Medina, C. E., Maupomé, G., Ávila, L., Pérez, R., Pelcastre, B., Pontigo, A. (2006). Políticas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. *Rev Biomed.* 17., pp 269, 268; SSA. (2008). Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 25, p. 1.

<sup>31</sup> Medina, C. E., Maupomé, G., Ávila, L., Pérez, R., Pelcastre, B., Pontigo, A. (2006). Políticas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. *Rev Biomed.* 17. p 274.

<sup>32</sup> Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana S.A. Argentina. p. 220; González, R., Camero, I. (2002). Microflora bucal. Méndez Editores, México. p.111.

### 2.5.1 Etiología

La caries obedece a la interacción simultánea de tres elementos o factores principales; un factor "microorganismo" que en presencia de un factor "sustrato" (dieta del individuo) logra afectar a un factor "hospedero" (también denominado diente). Estos tres elementos constituyen la base fundamental que dispara el mecanismo de acción determinante del desarrollo de la caries dental. Si estos condicionantes confluyeran sólo durante un período muy breve la enfermedad cariosa no se produciría; por lo tanto se ha agregado el tiempo de interacción de los mismos. El Cuadro 3 muestra los géneros y las especies de microorganismos aislados de la cavidad oral, algunos de los cuales están directamente relacionados a las caries y EP, mientras que otros son transitorios o bien forman parte de la microflora oral<sup>33</sup>.

La cariología moderna considera que en el desarrollo de la caries intervienen otros elementos relativos al hospedero anteriormente no considerado; ellos son los factores socioeconómicos y culturales que no sólo condicionan hábitos dietéticos y de higiene oral sino que además modulan la respuesta inmune en el ámbito de la cavidad bucal a través de la saliva y el exudado gingival<sup>34</sup>.

---

<sup>33</sup> Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana S.A. Argentina. pp. 220, 221.

<sup>37</sup> *Ibid.*, p. 220.

**Cuadro 3.** Microorganismos aislados de la cavidad oral.

<b>Género</b>	<b>Especie</b>
Abiotrophia	<i>A. defectiva</i> y <i>A. adiacens</i>
Actinobacillus	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Actinomyces	<i>A. greorgiae</i> , <i>A. gerencsseriae</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. adontolyticus</i> , <i>A. naeslundii</i> y <i>A. viscosus</i> .
Alloicoccus	<i>A. otiditis</i>
Bacillus	<i>B. cereus</i>
Bacteroides	<i>B. capillosus</i> y <i>B. forsythus</i>
Bifidobacterium	<i>B. dentium</i> , <i>B. bifidum</i> y <i>B. dentocolens</i>
Bilophila	<i>B. wadsworthia</i>
Candida	<i>C. albicans</i>
Capnocytophaga	<i>C. gingivalis</i> , <i>C. sputigena</i> y <i>C. ochracea</i>
Cardiobacterium	<i>C. hominis</i>
Centipeda	<i>C. periodontii</i>
Clostridium	<i>C. difficile</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. sporogenes</i> y <i>C. malenominatum</i>
Corynebacterium	<i>C. matruchotii</i>
Desulfomonas	<i>D. pigra</i>
Dsulfovrio	<i>D. desulfuricans</i>
Eikenella	<i>E. corrodens</i>
Entamoeba	<i>E. gingivalis</i>
Enterococcus	<i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>
Eubacterium	<i>E. brachy</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>E. saphenum</i> , <i>E. saburrenum</i> y <i>E. yurii</i>
Fusobacterium	<i>F. alosis</i> y <i>F. periodonticum</i>
Gemella	<i>G. haemolysans</i> y <i>G. morbillorum</i>
Globicatella	<i>G. sanguis</i>
Haemophilus	<i>H. influenzae</i>
Helcococcus	<i>H. kunzii</i>
Herpexvirus	<i>Herpes simplex</i>
Lactobacillus	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. uir</i> , <i>L. casei</i>
Lactococcus	<i>L. lactis</i> y <i>L. garmae</i>
Leptotrichia	<i>L. buccalis</i>
Leuconostoc	<i>L. mesenteroides</i>



**Cuadro 3. Continuación**

<b>Género</b>	<b>Especie</b>
Neisseria***	<i>N. cinerea</i> , <i>N. elongata</i> , <i>N. lavesdens</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. paraelongata</i> , <i>N. polysaccharea</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> (excepcional)
Pediococcus	<i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i> y <i>P. dextriticus</i>
Peptococcus	<i>P. niger</i>
Peptostreptococcus***	<i>P. anaerobius</i> , <i>P. mgnus</i> , <i>P. magnus</i> , <i>P. micros</i> , <i>P. indolicus</i> , y <i>P. prevotii</i>
Porphyromonas***	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> y <i>P. catoniae</i>
Prevotella***	<i>P. meningenica</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. pallesn</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. buccalis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. oulorum</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P. zoogloformans</i> , <i>P. dentales</i> , <i>P. tanneriae</i> y <i>P. enteca</i>
Propionibacterium	<i>P. acnes</i> , <i>P. avidum</i> , <i>P. propionicus</i> y <i>P. granulosum</i>
Rothia	<i>R. dentocariosa</i>
Selenomonas***	<i>S. artemidis</i> , <i>S. diana</i> , <i>S. flueggei</i> , <i>S. ifelixa</i> , <i>S. noxia</i> y <i>S. sputigena</i>
Staphylococcus	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
Streptococcus	<i>S. mutans</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. ferus</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. pyogenes</i> y <i>S. agalactiae</i>
Treponema***	<i>T. vincentii</i>
Tricomonas	<i>T. tenax</i>
Veillonella***	<i>V. parvula</i> , <i>V. atypica</i> y <i>V. dispar</i>

\* Microorganismos directamente relacionados a la formación de placa dentobacteriana.

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

\*\*\* Géneros más representativos de la flora oral.

## 2.6 Asociación entre caries dental y *S. mutans*

### 2.6.1 Características generales del género *Streptococcus*

Se presentan como cocos gram-positivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas. Son aerobios, aunque pueden desarrollarse en condiciones anaerobias. Carecen de catalasa y su tolerancia al oxígeno se debe a peroxidasa flavinicas y pseudocatalasas. Presentan un metabolismo fermentativo y producen

esencialmente ácido láctico; la producción de ácido puede ser tan importante que el descenso del pH provocaría su autólisis. Su temperatura óptima de desarrollo es de 36+/- 1°C<sup>35</sup>.

### 2.6.2 Estructura

Desde el punto de vista estructural y dependiendo de las especies pueden distinguirse, además del ADN cromosómico, citoplasma, mureína o peptidoglicano, membrana citoplasmática, cápsula y otros elementos de gran interés.

**Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:** Están íntimamente ligados al peptidoglicano. Intervienen en proceso de adhesión, mediante interacciones iónicas, se asocia a fimbrias y a proteínas superficiales de la pared celular.

**Carbohidratos de la pared celular:** Embebidos y sobresaliendo del peptidoglicano, intervienen en proceso adhesivo, de agregación y congregación bacteriana.

**Proteínas de la pared celular:** Como los anteriores, también están asociadas a la mureína, muestran actividades enzimáticas como glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, aunque su procedencia real sea la membrana citoplasmática. Algunas proteínas se comportan como adhesinas fijándose a superficies blandas de forma individual, asociadas superficies duras a través de receptores de la película adquirida.

**Fimbrias:** También intervienen en la adhesión a tejidos del hospedador y fenómenos de agregación y congregación bacteriana.

**Capa mucosa:** Constituida por polisacáridos extracelulares (realmente, homopolisacáridos) de los tipos glucanos, fructanos o ambos, es de gran

---

<sup>35</sup> Montanaro, L., Campoccia, D., Rizzi, S., Donati, M., Breschi, L., Prati, C., Arcilola, C. R. (2004). Evaluation of bacteria adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*. 25. p. 4457.

importancia en los fenómenos adhesivos, especialmente en la formación de placas dentales<sup>36</sup>.

## **2.7 Grupo *Streptococcus mutans***

### **2.7.1 Características estructurales**

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

En su pared presentan proteínas frecuentemente antigénicas y también involucradas en diversos fenómenos: fijación de glucanos, adhesión a la película adquirida y adhesión interbacteriana por interacciones proteína-proteína o lectina-carbohidratos que a veces se ve favorecida por la saliva gracias a la mediación conjunta de cationes y glucoproteínas salivares<sup>37</sup>.

### **2.7.2 Metabolismo de la sacarosa**

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

<sup>36</sup> Bagg, J., MacFarlane, T. W., Poxton, R., Miller, C., Smith, A. (1999). p. 252; González, R., Camero, I. (2002) Microflora bucal. Méndez editores. México. pp. 111-114; Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana S.A. Argentina. pp. 236, 239, 230.

<sup>37</sup> Liébana, U.J. (2002). Microbiología oral. Mc Graw-Hill-Interamericana, España. 297-525.

intracelularmente. Con respecto a los primeros, los estreptococos del grupo mutans tienen glucosiltransferasas tanto las que producen glucanos insolubles como las que las generan glucanos solubles. No todas las especies del grupo mutans poseen fosfofructosiltransferasa. La importancia de estos compuestos en la cavidad oral radica en que: a) los glucanos insolubles forman parte de la matriz celular de las placas y, además, son fundamentales en los fenómenos de adhesión a tejidos del hospedador y a bacterias y b) los glucanos solubles y los fructanos son elementos de reserva nutricional<sup>38</sup>.

### 2.7.3 *Streptococcus mutans*-caries

La formación de la caries dental es causada por la colonización y la acumulación de microorganismos orales, y la adhesión es el primer paso en el proceso de colonización. Algunos estreptococos, especialmente *S. mutans*, ha sido implicado como la principal causa de la caries dental. *S. mutans* puede sintetizar glucanos a partir de sacarosa con ayuda de glucosiltransferasas (GTFs) y con esto una adherencia firme a la superficie del diente. Un enfoque prometedor para la profilaxis de la caries dental se basa en la inhibición de la adherencia de *S. mutans* a la hidroxiapatita y así evitar la posterior colonización en la superficie del diente<sup>39</sup>. *S. mutans* produce tres tipos de GTFs (GTF<sub>B</sub>, GTF<sub>C</sub>, y GTF<sub>D</sub>), cuya acción cooperativa es esencial para dicha adhesión celular<sup>40</sup>.

<sup>38</sup> Browgardt, C. M., Wen, Z. T., Burne, R.A. (2004). RegM is required for optimal fructosyltransferase and glucosyltransferase gene expression of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 204. p. 75. 204, 75; Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Medica Panamericana S.A. Argentina. pp.332, 333.

<sup>39</sup> Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology* 92. p. 281.

<sup>40</sup> Matsumoto, M., Hamada, S., Ooshima, T. (2003). Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiology Letters* 228. p. 73.

**Cuadro 4.** Factores metabólicos de cariogenicidad de los estreptococos del grupo mutans.

- Poder acidógeno. Producen ácidos
- Poder acidófilo. Son muy tolerantes a los ácidos
- Poder acidúrico. Siguen produciendo ácidos a pH ácido
- Rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos
- Pueden conseguir el pH crítico para la desmineralización del esmalte más rápidamente que cualquier otro microorganismo de la placa
- Producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa y su movilización
- Producción y movilización de polisacáridos intracelulares\*
- Producción de dextranasas y fructanasas

\* *S. sobrinus* posee algunas características diferentes del resto de las especies cariogénas para el hombre; tiene menor poder acidogéno pero es más acidúrico y no sintetiza polisacáridos intracelulares<sup>41</sup>.

<sup>41</sup> Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana S.A., Argentina. p. 567.

### 3. Planteamiento del problema

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

Por lo anterior, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo primordial comprobar la actividad antimicrobiana de compuestos del jugo de *Punica granatum* que posean actividad antibacteriana contra patógenos de la cavidad oral.

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

1. Realizar el estudio químico biodirigido al jugo de *Punica granatum* para el aislamiento y purificación de compuestos con actividad antibacteriana.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la especie contra los patógenos orales *S. mutans* y *P. gingivalis*.
3. Evaluar el efecto de los compuestos puros con actividad antibacteriana, sobre la formación de bioplacas monoespecie.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES**

#### **4.1.1 Análisis cromatográficos**

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

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

Los estudios de espectroscopía y espectrometría se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla modelo 1605 marca Perkin-Elmer, en pastilla de bromuro de potasio. Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro US-Vis Lambda 2 utilizando metanol como disolvente. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H, 300 MHz) y de Carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C, 75 MHz) se generaron en un equipo Varian VXR-300S utilizando CDCl<sub>3</sub> o DMSO-*d*<sub>6</sub>, los desplazamientos químicos se reportan en (ppm) con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE) 70eV se obtuvieron en un equipo Jeol JMS-SX 102a Hewlett-Packard 5890 serie II acoplado a un cromatógrafo de gases. Se utilizó la técnica de introducción directa.

## 4.2 Material vegetal

El Jugo de *P. granatum* utilizado en el estudio se compró en la Ciudad de México en el mes de Marzo del año 2008. El producto fue de la marca Langers, número de lote 092507.

## 4.3 Ensayos biológicos

### 4.3.1 Microorganismos de prueba

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

### 4.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La actividad antimicrobiana de los compuestos se evaluó utilizando un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos (Sarstedt). Los cultivos de cada especie incubados a lo largo de la noche se centrifugaron (10000 rpm, 10 min), se lavaron 2 veces en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8) y se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy). Cada pozo contenía *S. mutans*  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, el compuesto de prueba en dilución seriada y el medio de cultivo apropiado. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba.



Los controles utilizados consideraron un medio de cultivo inoculado, sin compuestos de prueba mientras que el blanco contenía únicamente medio de cultivo sin inocular. Todas las placas se inocularon a 37°C bajo condiciones atmosféricas adecuadas, *S. mutans* se inoculó en condiciones aerobias. El crecimiento se estimó espectroscópicamente ( $A_{660}$  nm) después de 24 y 48 horas, utilizando un lector de placas (Biorad).

Los resultados se expresan como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Esta se define como la mínima concentración del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05  $A_{660}$  nm. Se utilizó gluconato de clorhexedina (CHX, sigma, St. Louis, MO, EU) como control positivo.

#### **4.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL JUGO DE *Punica granatum* (granada).**

##### **4.4.1 Preparación del extracto orgánico a partir del jugo de *Punica granatum*.**

El extracto orgánico se preparó mediante un proceso de partición a partir de 5 litros de jugo de granada y utilizando 5L x 3 de una mezcla de acetato de etilo y 1-butanol (1:1) como disolvente de extracción. La solución resultante secó utilizando sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío obteniéndose 5.690 g de extracto de consistencia oleosa de color rojo oscuro. El extracto obtenido evaluó utilizando como bacterias de prueba *Streptococcus mutans* y *Phorphyromona gingivalis*.

##### **4.4.2 Fraccionamiento primario del extracto del jugo de granada.**

Una porción del extracto (4.0 g) fue sometida a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en Sephadex LH-20 (50 x 3.5 cm), utilizando como fase móvil diclorometano, mezclas de diclorometano-metanol (1:1) y metanol. Este proceso generó 50 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron reunidas con base a su similitud cromatográfica, obteniéndose así ocho fracciones combinadas

(Cuadro 5). El Cuadro 5 resume el proceso de fraccionamiento del extracto de *P. granatum*.

**Cuadro 5.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna del extracto de *P. granatum*.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-3	1-6	FI	0.201
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Metanol	50:50	4-5	7-13		
Metanol	100	9-50	14-19	FII	0.802
			20-24	FIII	0.120
			25-30	FIV	0.069
			31-37	FV	0.151
			38-44	F-VI	0.189
			45-47	F-VII	0.125
			48-50	F-VIII	0.179

Cada una de las fracciones reunidas se evaluó utilizando como bacterias de prueba *S. mutans* y *P. gingivalis*. Las concentraciones mínimas inhibitorias para cada una de las fracciones se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para las fracciones FI-FVIII derivadas del fraccionamiento secundario del extracto obtenido a partir del jugo de *P. granatum*.

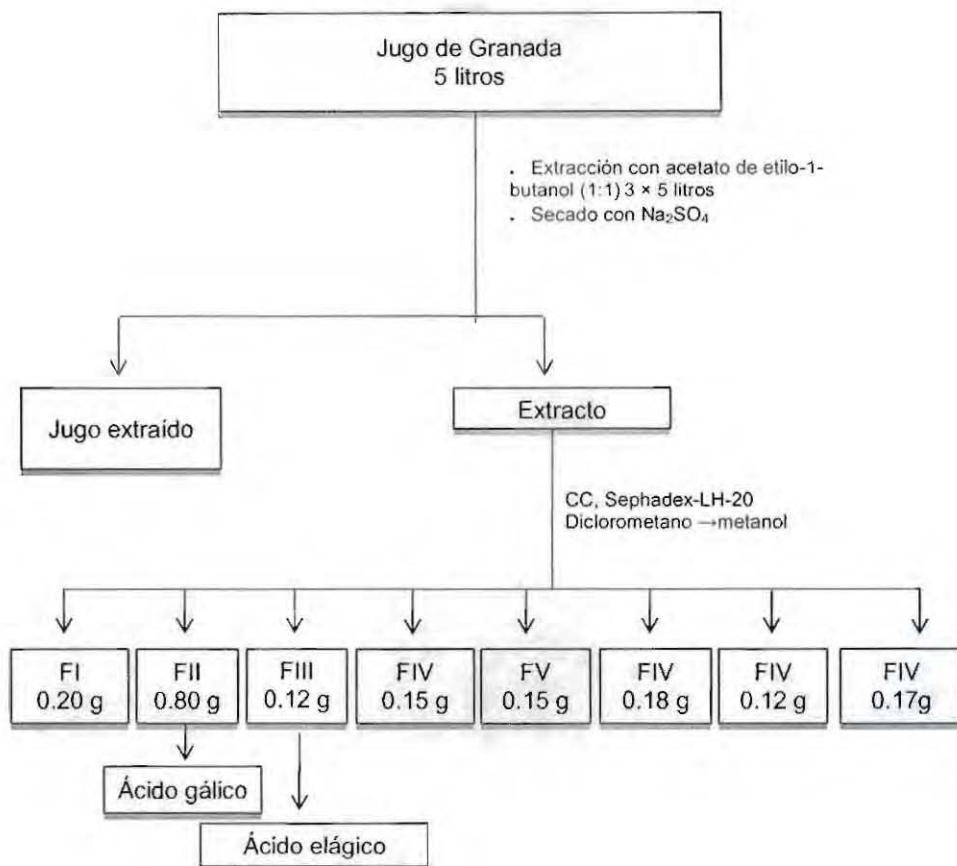
FRACCIÓN	CMI (µg/mL) <i>S. mutans</i>	CMI (µg/mL) <i>P. gingivalis</i>
FI	>1000	>1000
FII	568.5	440.2
FIII	686.8	735.7
FIV	>1000	>1000
FV	>1000	>1000
FVI	124.7	80.6
FVII	>1000	>1000
FVIII	124.4	79.7

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

La fracción FII fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria 150 g de gel de sílice y como fase móvil diclorometano, diclorometano-metanol en diversas proporciones (Ver Cuadro 7) y metanol. Mediante este proceso se obtuvieron 76 fracciones que luego fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 13 conjuntos de fracciones combinadas.

**Cuadro 7.** Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción FII.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-8	1-9	F1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95-5	9-16	10-11	F2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90-10	17-24	12-19	F3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	85-15	25-32	20-25	F4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80-20	33-40	26-30	F5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	75-25	41-48	31-32	F6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70-30	49-56	33-34	F7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	65-35	57-64	35	F8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50-50	65-72	36-40	F9
MeOH	100	73-76	41-48	F10
			49-55	F11
			56-60	F12
			61-76	F13



**Cuadro 8.** Proceso de extracción y fraccionamiento de *Punica granatum*.

#### 4.4.4 Obtención del ácido gálico (1).

A partir de las fracciones FII-2 y FII-3 precipitó de manera espontánea en un sólido amorfo de color amarillo oscuro el cual fue separado por filtración al vacío y sometido a múltiples lavados utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1) en frío. El sólido (285 mg) fue identificado como el ácido gálico por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas previamente en la literatura y por comparación directa con una muestra auténtica comercial de Sigma-Aldrich.

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

La fracción FIII fue sometida a un fraccionamiento en columna rápida utilizando como fase estacionaria 60 g de sílica gel C<sub>18</sub> (Sigma-Aldrich) y como fase móvil agua-metanol en diversas proporciones (Cuadro 8) y metanol. Mediante este proceso se obtuvieron 36 fracciones que luego fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 5 conjuntos de fracciones combinadas.

**Cuadro 9.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Agua-metanol	70-30	1-3	1-4	FIII-1
Agua-metanol	60-40	4-6	5-10	FIII-2
Agua-metanol	50-50	7-11	11-16	FIII-3
Agua-metanol	30-70	12-17	17-29	FIII-4
Agua-metanol	20-80	18-22	30-36	FIII-5
Agua-metanol	10-90	23-26		
Metanol	100	27-36		

#### 4.4.6 Obtención del ácido elágico (2).

La fracción FIII-2 fue analizada mediante cromatografía en capa fina y reveló la presencia de un compuesto mayoritario contaminado. El sólido se lavó con metanol. Este proceso permitió el aislamiento de un compuesto que fue caracterizado como el ácido elágico (2).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al anuario estadístico del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en el año 2006, *Punica granatum* es una de las veinte especies más comercializadas en el Mundo y se ha extendido su uso con fines medicinales. De tal forma que la persistencia de *P. granatum* para tratar diversos trastornos entre los cuales destacan parasitosis intestinal, diarrea, disentería, cólicos, gripe, inflamación, infecciones de la cavidad oral y de los riñones hacen de la especie un candidato para su estudio. Una vez preseleccionada la especie se procedió a realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto del jugo de granada utilizando como microorganismos de prueba a la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y a la periodontopática *Phorphyromonas gingivalis*.

### 5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del jugo de granada sobre *S. mutans*.

La determinación del potencial antibacteriano del jugo se realizó mediante el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita por Rivero-Cruz<sup>42</sup>. Los resultados de esta evaluación indicaron que el jugo de granada era activo contra las especies *S. mutans* y *P. gingivalis* con Concentraciones Mínimas Inhibitorias de 568.5 y 440.2 µg/mL respectivamente. Los extractos derivados de plantas se consideran activos contra esta bacteria si su CMI es menor a 1000 µg/mL<sup>43</sup>.

---

<sup>42</sup> Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *Journal of Ethnopharmacology*, 119, pp. 99-103.

<sup>43</sup> Wu, C. D., Wei, G. (2002). Tea as a functional food for oral health, *Nutrition*, 18, pp. 443-444.

## 5.2 Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el jugo de granada.

Con la finalidad de obtener los constituyentes antibacterianos se realizó un estudio fitoquímico biodirigido del jugo de granada. Este tipo de estudio ha demostrado en diversas ocasiones ser el más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos de interés medicinal (Rivero-Cruz, 2008a; 2008b). El jugo de granada se sometió a una extracción utilizando como disolvente una mezcla de acetato de etilo-1-butanol (1:1). Del fraccionamiento primario del extracto se obtuvo un conjunto de ocho fracciones finales las cuales se probaron contra *S. mutans* y *P. gingivalis*.

El aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas se realizó mediante el empleo de cromatografías abiertas utilizando Sephadex LH-20 y gel de sílice fase reversa ( $C_{18}$ ). El proceso global permitió el aislamiento y caracterización de dos metabolitos activos mayoritarios con actividad antibacteriana descritos previamente en la especie. Los compuestos aislados se caracterizaron como el ácido gálico (**1**) y el ácido elágico (**2**) (Figura 2).

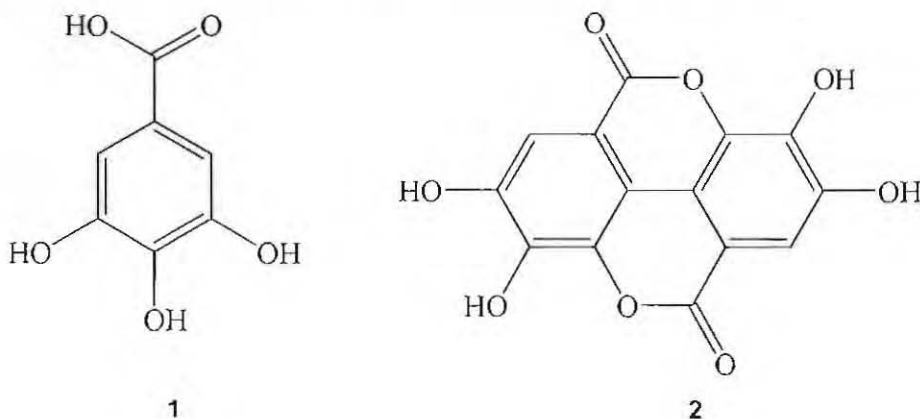
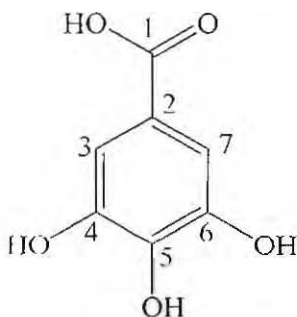


Figura 2. Compuestos activos aislados a partir de *P. granatum*

### 5. 3 Caracterización estructural del compuesto 1.

De las fracciones combinadas activas FII-2 y FII-3 obtenidas del fraccionamiento secundario mediante Sephadex LH-20 se obtuvieron 285 mg de un sólido que precipitó de forma espontánea; este sólido se purificó con sucesivas recristalizaciones con mezclas de metanol y diclorometano. El compuesto **1** fue identificado como el ácido gálico por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura<sup>44</sup> y por comparación con una muestra auténtica obtenida de Sigma-Aldrich. En el Cuadro 6 se resumen los datos. En las Figuras 3 y 4 se muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.



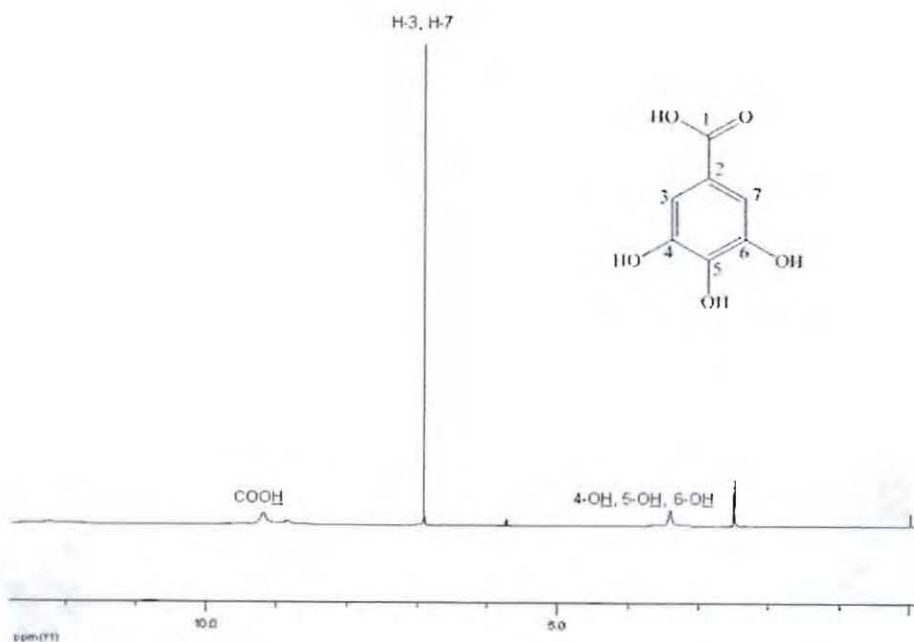
Ácido gálico (1)

<sup>44</sup> Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, D., Rakariyalham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* 100, p. 1047; Chen, Z., Liu, Y., Yang, S., Song, B., Xu, G., Bhadury, P., Jin, L., Hu, D., Liu, F., Xue, W., and Zhou, X. (2008). Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, p. 1338; Lua, J., Weib, Y., Yuan, Q. (2007). Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Separation and Purification Technology* 55, 43.



**Cuadro 10.** Datos físicos y espectroscópicos del compuesto 1

p.f. (°C)	250-252 °C
IR $\lambda_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	2661-3493 (-OH), 1691 (C=O), 1612, 1541 y 1431 (aromaticidad)
RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ (ppm)	9.18 (s, 1-COOH), 6.90 (s, H-3, H-7), 3.40 (4, 5, 6- OH)
RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ (ppm):	167.40 (C-1), 145.38 (C-4, C-6), 137.96 (C-5), 120.46 (C-2), 108.73 (C-3, C-7)



**Figura 3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido gálico (1, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz).

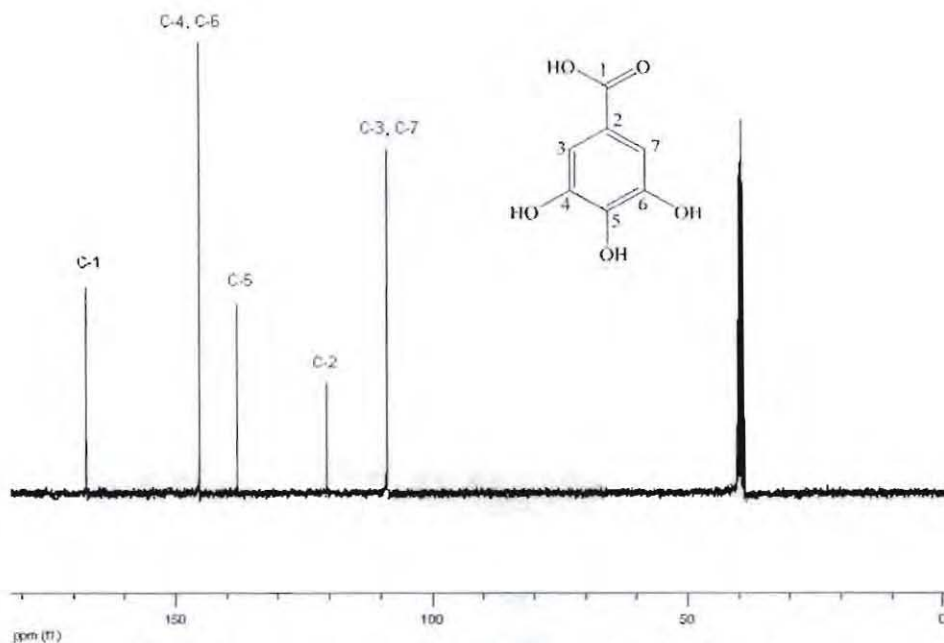
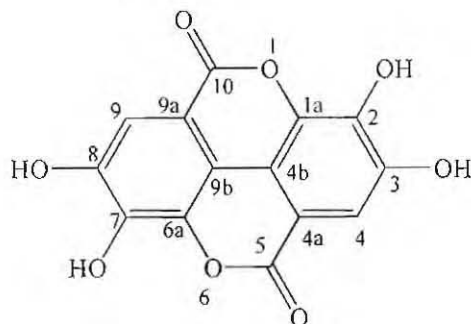


Figura 4. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del ácido gálico (1 DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

#### 5.4 Caracterización estructural del compuesto 2.

El compuesto **2** se aisló a partir de FIII-2 como un sólido amorfo de color blanco el cual fue purificado por recristalización utilizando metanol. Su espectro de IR mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (banda amplia  $3400\text{-}3218\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo de lactona ( $1748\text{ cm}^{-1}$ ) y aromaticidad ( $1603$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$ ). Los máximos de absorción observados en el espectro de UV  $\lambda_{\text{max}} = 256$  y  $293\text{ nm}$  confirmaron la naturaleza aromática del producto. La fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$ , la cual permite 12 grados de insaturación. En el Cuadro 11 se resumen los datos físicos y espectroscópicos del compuesto **2**.



Ácido elágico (2)

**Cuadro 11** Datos físicos y espectroscópicos del compuesto 2.

pf (°C)	230-232
IR $\lambda_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	3400-3218 (-OH), 1748 (carbonilo de lactona), 1603 y 1590 (aromaticidad)
UV $\lambda_{\max}$ (nm)	202, 293, 356
RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ (ppm)	7.45 (s, H-4, H-9), 3.34 (2, 3, 7, 8-OH)
RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ (ppm):	136.33 (C-1a, C-6a), 139.52 (C-2, C-8), 148.05 (C-3, C-8), 112.25 (C-4, C-9), 107.57 (C-4a, C-4b), 112.25 (C-4b, C9b), 159.03 (C-5, C-10).

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) del producto natural presenta el perfil del ácido elágico. En el espectro se observa una señal en la región de los hidrógenos aromáticos: un singulete con desplazamiento químico de 7.45 ppm asignable a los protones aromáticos H-4 y H-9. En 3.34 ppm se observa una señal ancha asignable a hidrógenos de los grupos OH.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan sólo siete señales diferentes lo que indica la presencia de una molécula dimérica, seis de las señales son asignables a un anillo aromático (148.05, 139.52, 136.33, 112.25, 110.27 y 107.57 ppm) y la señal restante con un desplazamiento químico de 159.03 ppm es congruente con la presencia de grupos carbonilo.

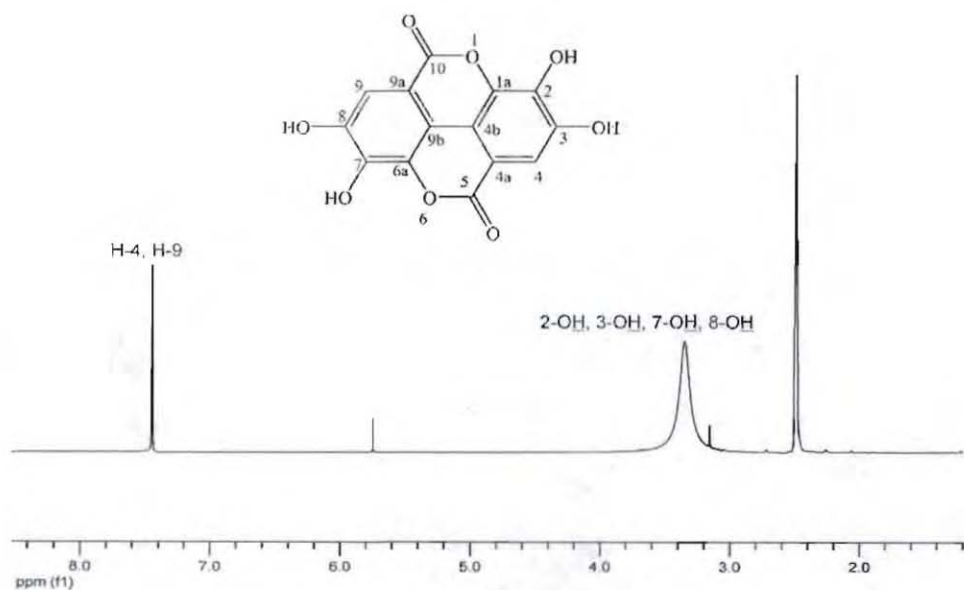


Figura 5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido elágico (2 DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz).

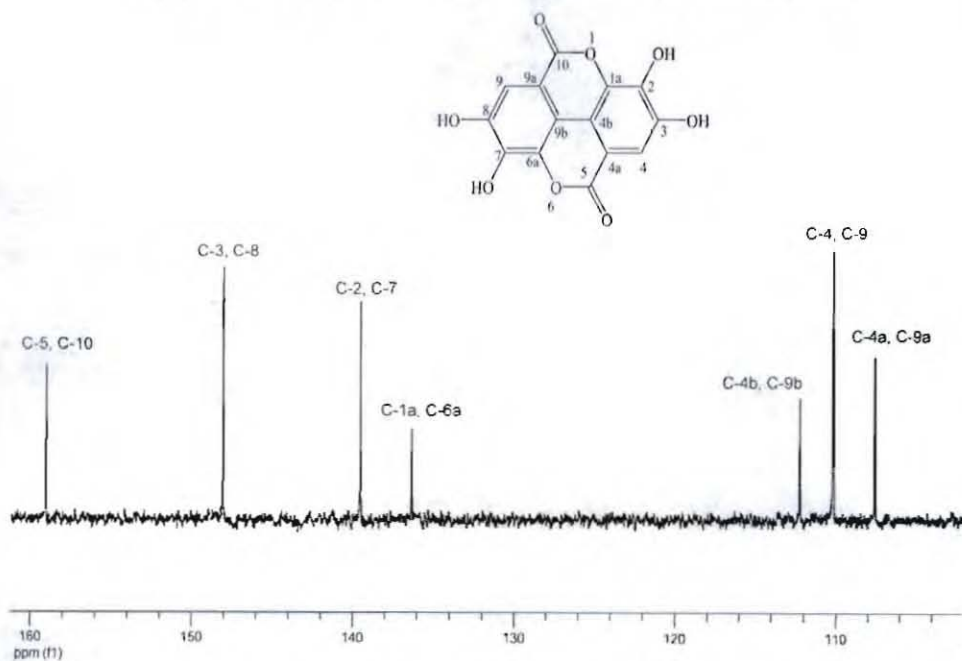


Figura 6. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del ácido elágico (2 DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz).

### 5.5 Evaluación del potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios.

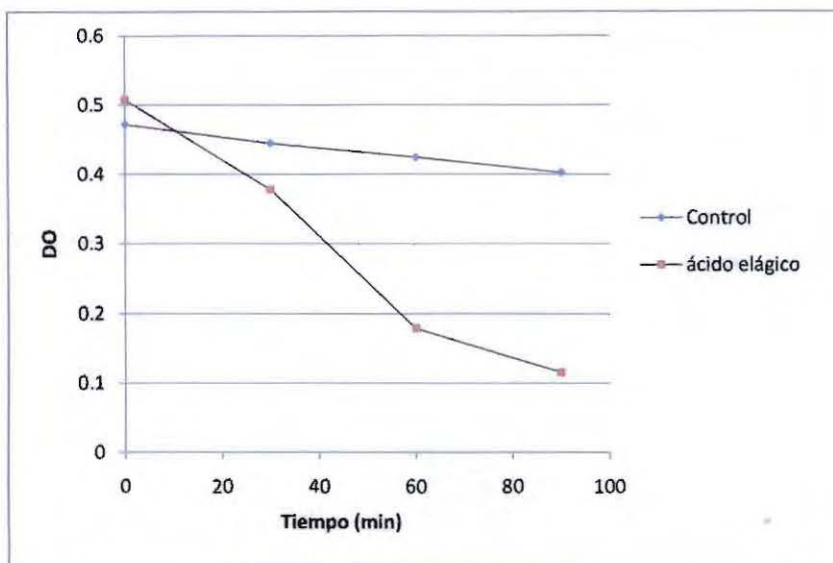
El potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios obtenidos de *P. granatum* se determinó mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*. Los dos compuestos aislados presentaron un efecto antimicrobiano con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en un intervalo de 40.3 y 125.9  $\mu\text{g/mL}$ . En el Cuadro 12 se presentan las CMI's para cada uno de los compuestos aislados.

**Cuadro 12.** CMI de los compuestos aislados sobre la bacteria *S. mutans*.

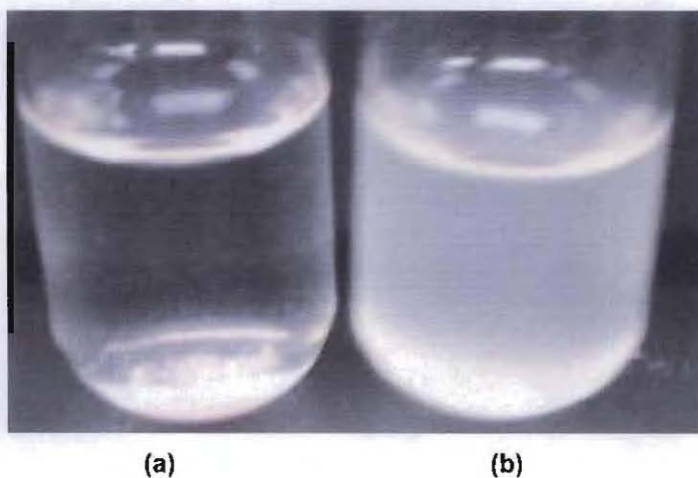
Compuestos	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>S. mutans</i>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>P. gingivalis</i>
1	125.9	40.3
2	94.2	25.8

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

Para obtener información acerca de los efectos de los compuestos aislados sobre la agregación de bacterias se decidió medir su efecto sobre la formación de agregados por parte de *S. mutans*. Los resultados de este experimento indican que el ácido elágico presenta un efecto positivo sobre la agregación de *S. mutans*. En la Gráfica 1 se observa que el ácido elágico induce una agregación dependiente del tiempo con efecto máximo a los 90 min y la Figura 2 ilustra el efecto del ácido elágico sobre un cultivo de *S. mutans*.



**Gráfica 1.** Efecto del ácido elágico sobre la agregación de *S. mutans*.



**Figura 7.** Efecto del tratamiento con ácido elágico a 37°C durante 90 min. (a) cultivo tratado y (b) control de células en solución amortiguadora de fosfatos.

## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La información científica que se generó en esta investigación representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie *Punica granatum*. El efecto antimicrobiano que presenta el extracto preparado a partir del jugo de la granada y el uso de la especie para el tratamiento de diarrea, disentería, e infecciones de la cavidad oral y de los riñones sustentan de manera preliminar y parcial la eficiencia de la especie en las prácticas médicas populares.

El estudio fitoquímico biodirigido del jugo de granada permitió el aislamiento y caracterización de los ácidos gálico (1) y elágico (2). Los compuestos aislados presentaron una actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de *S. mutans*. La actividad de los compuestos puros fue menor a la observada para el control positivo clorhexidina. La evidencia experimental obtenida en el presente estudio sugiere que el ácido elágico además de su efecto antibacteriano promueve la agregación de la bacteria *S. mutans*. Además de la actividad antibacteriana este ácido ha mostrado actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, ambas causantes de diarrea. Otros estudios previos reportan actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* y *Prevotella intermedia*. El ácido elágico también posee una amplia gama de actividades biológicas entre las que destacan: antioxidante, antimutagénico, antitumoral y activador de la coagulación de la sangre.

Por otro lado el ácido gálico presentó una actividad antibacteriana menor a la del ácido elágico. Sin embargo, en la literatura se describe su efecto inhibidor del crecimiento de cepas de *Escherichia coli* 0157:H7, *Corinebacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella shiga* y *Vibrio colera*. Por otra parte, también se ha encontrado que reduce la replicación del virus del herpes genital HSV-2.

## 7. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

Continuar con el estudio fitoquímico del jugo de granada con la finalidad de aislar compuestos presentes en menor cantidad en las fracciones activas del mismo.

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

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar los principios activos en el jugo de granada y en los extractos de la granada.

Establecer el efecto del jugo, extractos derivados de la granada y compuestos puros sobre la enzima glucosiltransferasa de *S. mutans*.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abd El Wahab, S.M., El Fiki, N.M., Mostafa, S.F., Hassan, A.E.B. (1998). Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatum* L. seeds. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*. **36**, 11–15.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*. **896**, 87–93.
- Artik, N. (1998). Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*. **8**, 492–499.
- Bagg, J., MacFarlane, T. W., Poxton, R., Miller, C., Smith, A. (1999). Essentials of microbiology for dental students. Oxford University Press Inc., USA. 229-239, 252.
- Basile, A., Ferrara, L., Pezzo, MD., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol*. **31;102(1)**:32-6.
- Browgardt, C. M., Wen, Z. T., Burne, R. A. (2004). RegM is required for optimal fructosyltransferase and glicosyltransferase gene expression of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. **204**, 75-79.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Acribia, S.A., España. 366-384, 852.
- Burnett, G., Scherpe, H., Schuster, G. (1990). Manual de microbiología y enfermedades infecciosas de la boca (Vol. 2). Limusa S.A. de C.V, México. 323, 329-336.
- Cai, L., Wu, CD. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod*. **59(10)**: 987-90.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn J. D., Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*. **100**, 1044-1048.

- Chen, Z., Liu, Y., Yang, S., Song, B., Xu, G., Bhadury P., Jin, L., Hu, D., Liu, F., Xue, W. and Zhou, X. (2008). Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L.) Meeb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **16**, 1337-1344.
- Cui, S.M., Sasada, Y., Sato, H., Nii, N. (2004). Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **73**, 241–243.
- Da Mota Menezes, V., Atallah, NA., Lapa, AJ., Catapani, WR. (2006). Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* st. Hil. extract (mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial. *Helicobacter*. **11**(3): 188-95.
- Dikeman, C. L., Bauer, L. L., Fahey, G. C. (2004). Carbohydrate composition of selected plum/prune preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 853-859.
- De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., Vlietinck., A. (1999). Condensed vegetables tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical systematics and ecology*. **27**, 445-459.
- Evans, W. (1991). Farmacognosia. Interamericana Mc Graw-Hill, México. 216, 416, 625.
- SSA. (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Mexicanos. 15-16.
- SSA. (2008). Epidemiologia. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica. **25**, 1-4.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, 4581–4589.
- González, R., Camero, I. (2002). Microflora bucal. Méndez Editores, México. 111-114.
- Gross, G. G., Hemingway, W. R., Yoshida, T. (1999). Plant polyphenols 2. Chemistry, biology pharmacology, ecology. Basic life sciences. 555-566, 575-585.

- Heftmann, E., Ko, S.T., Bennet, R.D. (1966). Identification of estrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry*. **5**, 1337.
- Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F.A., Artes, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*. **210**, 39–42.
- Hosseind, S., Rahemi, M. (2007). Seasonal change of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*. **111**, 120-127.
- Kapoor, L., (2001). Handbook of ayurvedic medicinal plants. CRC Press LLC, USA. 280, 281.
- Kim, T.J., Weng, W.L., Stojanovic, J., Lu, Y., Jung, Y.S., Silva, J.L. (2008). Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* **71**(7):1465-8.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Ediciones Omega, S. A., España. 113-116.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Fröhner, C.R., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Trybala, E., Bergström, T., Barardi, C.R., Simões, C.M. (2008). Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol Pharm Bull.* **31**(5):903-7.
- Lansky, P. E., Newman, A. R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. **109**, 177–206
- Liébana, U.J. (2002). Microbiología oral. Mc Graw-Hill-Interamericana, España. 297-525.
- Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*. **92**, 281-289.
- Lua, J., Weib, Y., Yuan, Q., (2007). Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current

chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*. **55**, 40-43.

- Matsumoto, M., Hamada, S., Ooshima, T. (2003). Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiology Letters*. **228**, 73-80.
- Medina, C. E., Maupomé, G., Avila, L., Pérez, R., Pelcastre, B., Pontigo, A. (2006). Políticas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. *Rev Biomed*. **17**, 269-286.
- Montanaro, L., Campoccia, D., Rizzi, S., Donati, M., Breschi, L., Prati, C., Arcilola, C. R. (2004). Evaluation of bacteria adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*. **25**, 4457-4463.
- Mosaddik, MA., Haque, ME. (2003). Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniotalamin isolated from *Bryonopsis laciniosa*. *Phytother Res*. **17**(10):1155-7.
- Muetzel, S., Becker, K. (2006). Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology*. **125**, 139-149
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rassol, S. A., Sayeed, S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum* L. *Journal of Food Science*. **72**, 341-345.
- Nawars, M. A., Hussein, S. A., Merfort, I. (1994). NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*. **36**, 793-798.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S., Sayeed, S. (2007). Antibacterial activity directed to isolation of compounds from *Punica granatum*. *J Food Sci*. **72**(9):M341-5.
- Negroni, M. (2003). Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana S.A., Argentina. 220-225, 324-330, 567.

- Neuhofer, H., Witte, L., Gorunovic, M., Czygan, F.C. (1993). Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie*. **48**, 389–391.
- Noda, Y., Kaneyuka, T., Mori, A., Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 166–171.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. **66**, 2012–2031.
- Prashanth, D., Asha, M. K., Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Phytoterapia*. **72**, 171-173.
- Poyrazoglu, E., Goekmen, V., Artik, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. **15**, 567–575.
- Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *Journal of Ethnopharmacology*, **119**, 99-103.
- Rivero-Cruz, J. F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C.D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*). *Phytochemistry Letters*. doi: 16.1016/j.phytol.2008.07.07.
- Roos, I. (1999). Medicinal Plants of the World Chemical, Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, USA. 273-281.
- Samaranayake, L. P., Jones. B., Scully, C. (2002). Essential microbiology for dentistry. Churchill Livingstone, China. 219-223.
- Shibata, H., Kondo, K., Katsuyama, R., Kawazoe, K., Sato, Y., Murakami, K., Takaishi, Y., Arakaki, N., Higuti, T. (2005). Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**(2):549-55.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I., Farnsworth, n. r. (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: A functional food?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **41**, 251-286.

- Sawamura, S., Tonosaky, Y., Hamada, S. (1992). Inhibitory effects of ellagic acid on glucosyltransferases from Mutans Streptococci. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. **52**, 766-768.
- Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I. (1986). Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **34**, 650-655.
- Thiem, B., Goślińska, O. (2004). Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia*. **75**(1): 93-5.
- Trease, G., Evans. W., (1987). Tratado de farmacognosia. Nueva editorial interamericana., México. 383-394.
- Tyler, V., Brady, L., Robbers, J. (1988). Pharmacognosy. Lea & Febiger, USA. 77-80.
- Vasconcelos, L.C., Sampiaio, F., Sampaio, M.C., Pereira, M., Higino, J., Peixoto, M. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J*. **17**(3), 223-227.
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P.M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **89**, 295-300.
- Waterman, P., Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Balckwell Scientific Publications, USA. 12-16, 100-104.
- Wibaut, J.P., Hollstein, U. (1957). Investigation of alcaloids of *Punica granatum* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **69**, 27-32.
- Wu, C. D., Wei, G. (2002). Tea as a funtional food for oral health, *Nutrition*, **18**, 443-444.
- Yehoshua, S., Philip, E., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. **66**, 11-17.

- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D.A., Barrow, C. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. **18**, 445-450.