



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“LAS CÁSCARAS DE *PUNICA GRANATUM* (GRANADA) COMO FUENTE DE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LINDA CECILIA GONZÁLEZ GARCÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
VOCAL: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
SECRETARIO: DR. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ  
1er. SUPLENTE: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA  
2° SUPLENTE: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA. LABORATORIO 111.

**ASESOR DEL TEMA:**

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

**SUSTENTANTE:**

LINDA CECILIA GONZÁLEZ GARCÍA



## DEDICATORIA

**A mis papás**, por ser lo mejor del mundo, por brindarme todo su cariño, atención y apoyo en todos los sentidos. Por motivarme día con día para ser una mejor persona y por ser un excelente ejemplo a seguir. Mil gracias por todos los días que han compartido conmigo y los sacrificios que han hecho por mí, así como, hacer de nosotros una familia tan funcional.

**A mi hermanito** hermoso, que siempre me ha apoyado, que ha sido también un ejemplo difícil de seguir pero excelente. Por haber compartido experiencias inolvidables, por acompañarme en el mejor viaje de mi vida. Y finalmente por siempre buscar lo mejor para mí y ayudarme a conseguirlo.

**A Clemen** que se ha desvelado conmigo y me da tanta felicidad.

**A mis amigos**, que han sido una parte super importante en mi vida, que me han cuidado, y me han regalado tantos momentos de felicidad, tristeza, diversión y ñoñez.

Mil gracias a Paola, la Claudia, Betsy, Zeta P., Gracy y Dany que han depositado toda su confianza en mí y han estado conmigo durante todos estos años.

Gracias a mis amigos, compañeros y colegas: Mitchel, Ivan, Karina, Xanat, Lalo y Ana. Por haber compartido conmigo momentos especiales e inolvidables y por haberme ayudado a vivir y concluir esta etapa de mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la oportunidad que me brindó para realizar mis estudios. Especialmente a la Facultad de Química por permitir mi crecimiento y formación académica, profesional y personal gracias a los profesores que forman parte de ella y comparten sus conocimientos y experiencias con los alumnos.

A mi tutor el **Dr. Fausto Rivero Cruz**, por brindarme su confianza para poder participar en este proyecto, por ser un excelente maestro y guía para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Rachel Mata Essayag** y a la **Dra. María Isabel Aguilar Laurents**, por su tiempo invertido en la revisión y corrección del presente trabajo y por su asistencia a mi examen.

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207 e IN205709

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 205709 por la beca otorgada para la realización de la tesis.

Al personal técnico de los laboratorios de RMN y Masas de la USAI, Facultad de Química, UNAM.

A mis compañeros del laboratorio 111 del conjunto E, por crear un ambiente agradable para poder desarrollar mi trabajo.



## Índice

TABLA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS .....	VII
TABLA DE CUADROS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1.Introducción.....	2
2.Antecedentes .....	3
2.1 <i>Medicina Tradicional en el Mundo.</i>	
2.2 <i>Generalidades de las enfermedades gastrointestinales.</i>	
2.3 <i>Tipos de diarrea.</i>	
2.4 <i>Tratamiento.</i>	
2.5 <i>Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la diarrea.</i>	
2.6 <i>Punica granatum L.</i>	
2.6.1 <i>Generalidades de Punica granatum L.</i>	
2.6.2 <i>Composición química.</i>	
2.6.3 <i>Usos terapéuticos.</i>	
3.Objetivos y Justificación. ....	28
3.1 <i>Objetivo general.</i>	
3.2 <i>Objetivos particulares.</i>	
3.3 <i>Justificación.</i>	
4.Experimental.....	31
4.1 <i>Procedimiento General</i>	
4.1.1 <i>Material Vegetal.</i>	
4.1.2 <i>Estudio fitoquímico de la especie Punica granatum L.</i>	
4.1.2.1 <i>Análisis cromatográfico.</i>	
4.1.2.2 <i>Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.</i>	
4.1.2.3 <i>Preparación del extracto.</i>	
4.1.2.4 <i>Fraccionamiento primario del extracto de Punica granatum L.</i>	



4.1.2.5 <i>Fraccionamiento secundario del extracto de Punica granatum L.</i>	
4.1.3 <i>Ensayo biológico</i>	
4.1.3.1 <i>Determinación del efecto relajante del extracto, fracciones y productos puros sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo</i>	
4.1.3.2 <i>Aislamiento del íleon.</i>	
4.1.3.3 <i>Sistema de registro.</i>	
4.1.3.4 <i>Evaluación del efecto relajante.</i>	
5. Resultados y Discusión.....	38
5.1 <i>Evaluación biológica del extracto de granada sobre la motilidad intestinal.</i>	
5.2 <i>Evaluación biológica de los compuestos aislados del extracto de granada sobre la motilidad intestinal.</i>	
6. Conclusión .....	44
7. Perspectivas.....	45
8. Bibliografía.....	46



## TABLA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de la población y número de países con acceso regular a medicamentos básicos. ....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Grado de uso de medicina tradicional en el mundo.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Mapas de mortalidad. ....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Compuestos utilizados para el tratamiento de diarrea.....	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Fruto (granada) de la especie <i>Punica granatum</i> L. ....	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Compuestos aislados de las cáscaras-pericarpio de la granada.....	<b>39</b>
<b>Figura 7.</b> Curva concentración-respuesta del efecto excitatorio inducido por el extracto total de la cáscara de la granada.....	<b>40</b>
<b>Figura 8.</b> Curvas concentración – respuesta de los compuestos evaluados sobre el íleon aislado de cobayo. A. Epicatequina. B. Ácido málico. C. Ácido gálico.....	<b>42</b>





## TABLA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de Powell de diarrea crónica.....	<b>8</b>
<b>Cuadro 2.</b> Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3.</b> Compuestos identificados en diferentes partes de la especie <i>Punica granatum</i> L.....	<b>21</b>
<b>Cuadro 4.</b> Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna de la fracción activa FII. ....	<b>34</b>
<b>Cuadro 5.</b> Valores de $EC_{50}$ y $E_{max}$ del efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducido por los compuestos aislados a partir de la cáscara-pericarpio de la especie <i>Punica granatum</i> y el control positivo.....	<b>43</b>
<b>Diagrama 1.</b> Proceso de extracción y fraccionamiento de la cáscara y pericarpio del fruto de <i>Punica granatum</i> L.....	<b>35</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

CE <sub>50</sub>	concentración efectiva media
cm	Centímetro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
E <sub>max</sub>	efecto máximo
g	Gramos
<i>G. lamblia</i>	<i>Gardia lamblia</i>
LGS	Ley General de Salud
mg	Miligramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
<i>Punica g.</i>	<i>Punica granatum</i>
EE	error estándar
SNE	Sistema Nervioso Entérico
µg	Microgramos





## 1. Introducción.

En los últimos años, el uso de medicina tradicional se ha expandido alrededor del mundo y ha ganado popularidad al utilizarse en los tratamientos alternativos o complementarios a la medicina convencional (NCCAM, 2010).

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud en países subdesarrollados durante el año 2009 permitieron conocer que el 80% de la población utiliza las plantas para el cuidado primario de la salud. Los ejemplos más notorios los encontramos en países africanos y latinoamericanos.

Uno de los principales problemas de salud en los países en vías de desarrollo son las infecciones gastrointestinales y la diarrea. Estadísticas de la OMS indican que la diarrea representa la segunda causa de muerte infantil en Lationamérica (OMS, 2010). La definición de diarrea es el aumento en el número y/o alteración de la consistencia de las heces en relación con el ritmo habitual de defecación; es un síntoma asociado a un problema gastrointestinal y sus causas son diversas, siendo las más comunes las infecciones enterales causadas por bacterias, virus y parásitos (Inarejos, 2004).

En México se cuenta con una riqueza y tradición ancestral acerca del uso de plantas medicinales. Se estima que en la actualidad cerca de 3000 especies son usadas con esa finalidad (Linares *et al.*, 1999). La especie *Punica granatum* es una planta popular cultivada en México, conocida como “granada roja”. Su fruto se consume y es utilizado para la preparación de jarabe. Esta planta es utilizada en la



medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea, empacho, vómito, fuegos, entre otros.

## **2. Antecedentes**

### *2.1 Medicina Tradicional en el Mundo*

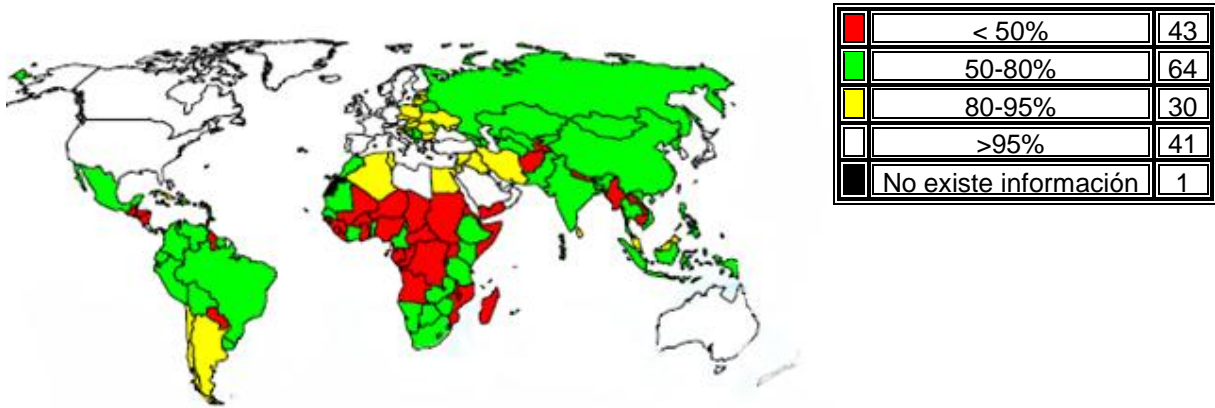
El uso de plantas con fines terapéuticos ha sido importante en la historia de la medicina, su importancia se evidencia desde la edad Media Paleolítica, es decir, hace aproximadamente 60, 000 años (Lietava, 1992).

Los documentos conocidos más antiguos que mencionan plantas con propiedades curativas son las tablas de los sumerios donde se describe el uso de plantas para el tratamiento de distintas enfermedades, escrito hace más de 4000 años, así como el Papiro de Ebers con una antigüedad de 3500 años aproximadamente (Kong *et al.*, 2003). En nuestro país, el uso de plantas con fines curativos ha sido una tradición desde la época prehispánica hasta la época actual, teniéndose como primer registro un mural en Teotihuacán de hace aproximadamente 1700 años. Actualmente, la Secretaria de Salud en la Ley General de Salud promueve el uso y desarrollo de la medicina tradicional mexicana (Lozoya, 1997; LGS, 2009).

En la actualidad de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) más de un tercio de la población mundial no tiene acceso a medicamentos básicos.

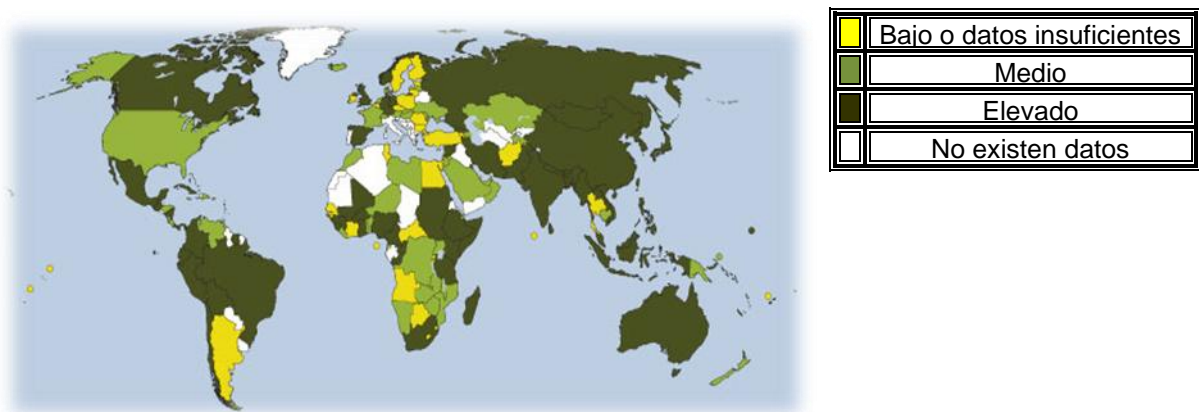


**Figura 1.** Porcentaje de la población y número de países con acceso regular a medicamentos básicos. Adaptado de OPS, 2005.



En la región de África, Latinoamérica y Asia el 80 % de la población depende de la medicina tradicional para obtener atención primaria de salud.

**Figura 2.** Grado de uso de medicina tradicional en el mundo. Adaptado de Bodeker *et al.*, 2005.



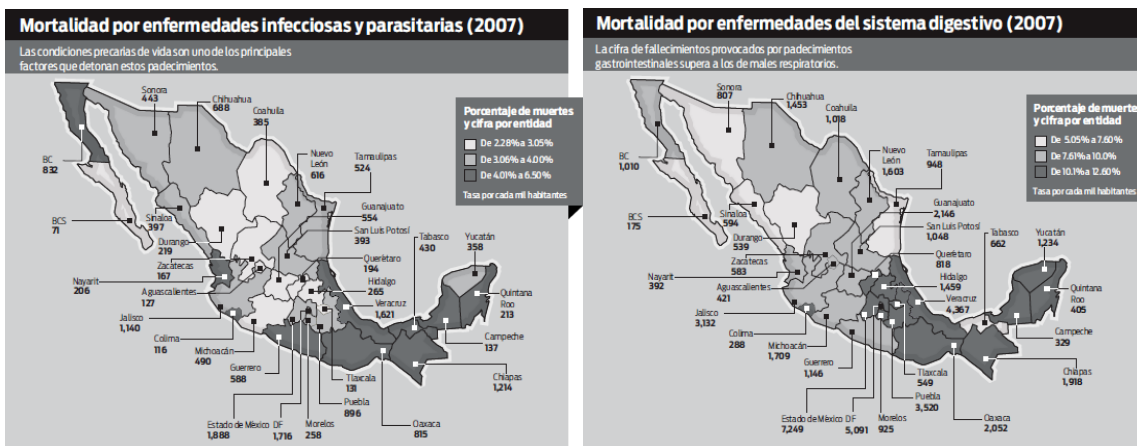
## 2.2 Generalidades de las enfermedades gastrointestinales.

La diarrea infecciosa es uno de los problemas de salud más grave y frecuente en países en vías de desarrollo y un problema de mortalidad infantil en el mundo.



En el mundo de acuerdo a la OMS las enfermedades infecciosas intestinales están entre las primeras causas de muerte infantil, siendo ésta la segunda más mortal. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía en el 2008 la tercera causa de muerte infantil en menores de 0 a 4 años son las enfermedades infecciosas intestinales y ocupan el lugar 19 en la mortalidad total. En otros países en vías de desarrollo como Belice y Uruguay las enfermedades por infecciones intestinales son la segunda causa de muerte infantil (OPS, 2005).

**Figura 3.** Mapas de mortalidad. Adaptado de el centro de estudios e investigación en desarrollo y asistencia social. Basado en INEGI, 2007.



La diarrea es un síntoma frecuente de las infecciones gastrointestinales, que pueden ser causadas por una variedad de bacterias, virus, parásitos y helmintos. Existen diferentes definiciones de diarrea según diferentes autores. Para poder entender mejor su significado es importante saber que la palabra diarrea deriva del griego *dia* (a través) y del latín *rheein* (flujo o salida). Desde el punto de vista fisiopatológico se define como heces que contienen demasiada agua, debido a que ésta representa un proceso de secreción intestinal activa en la que se pierde la



capacidad de absorción del agua y electrolitos, lo cual determina un aumento de la motilidad intestinal. La OMS define diarrea como tres o más evacuaciones al día ó un número mayor a lo usual para cada individuo. Todas las diarreas, se deben a alteraciones en los desplazamientos del agua y sodio, consiste en una pérdida excesiva de agua y electrolitos por las heces, resultado de un desequilibrio entre los procesos secretores y absortivos de estas sustancias, pudiendo ocasionar con ello la deshidratación y desnutrición en la población infantil.

El mecanismo infeccioso patogénico de la diarrea puede ser de tipo invasor, colonización del tracto intestinal y toxigénico.

### *2.3 Tipos de diarrea.*

La diarrea es causada por la alteración de las funciones básicas del tubo digestivo y para identificarla se clasifica en seis tipos:

#### *Diarrea osmótica.*

Tipo de diarrea ocasionada por efecto digestión/absorción y aparece de forma característica cuando se retienen en la luz intestinal sustancias no absorbibles, de origen exógeno o endógeno (Arellano, 2006).

#### *Diarrea secretora.*

Este tipo de diarrea es causada en situaciones donde la secreción de electrolitos y agua supera la capacidad de absorción del intestino (Arellano, 2006).

#### *Diarrea motora*

Diarrea causada por modificación del tránsito intestinal. Son responsables de este tipo de diarrea el aumento y la disminución de la motilidad intestinal. La aceleración de la motilidad puede reducir el tiempo de contacto entre el contenido intestinal y la



mucosa y no permite que la absorción sea completa. La disminución de la motilidad ocasiona diarrea de manera indirecta al promover el crecimiento bacteriano (Arellano, 2006).

#### Diarrea exudativa.

Diarrea que se produce por una lesión de la mucosa intestinal, en este tipo de diarrea se vierte sangre, pus y moco a la luz del intestino. Las causas de diarrea exudativa son múltiples, pero se agrupan como infecciosas, inflamatorias, isquémicas y neoplásicas (Arellano, 2006).

#### Diarrea aguda

Esta diarrea se caracteriza por un comienzo brusco, tiene un corto periodo de incubación, duración de horas a pocos días, es decir, es autolimitante y su principal consecuencia es que conduce fácilmente a la deshidratación y sus complicaciones pueden causar la muerte. Su causa suele ser infecciosa, puede ser de tipo bacteriana producida frecuentemente por *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolítica*, viral producida por rotavirus frecuentemente y parasitaria usualmente por *Gardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* o *Cryptosporidium* (Vargas, 1998). En el mundo, la diarrea aguda llega a producir en el mundo 5 millones de muertes por consecuencia de deshidratación, aproximadamente el 85% de estas muertes se producen en niños menores de 2 años (Curtis *et al.*, 1998).

#### Diarrea crónica

Esta diarrea se caracteriza por la disminución de la consistencia de la materia fecal a expensas del contenido líquido con tránsito intestinal acelerado. Tiene un





comienzo insidioso, su duración es de más de dos semanas, no es autolimitante y sus causas no suelen ser de tipo infeccioso y son clasificadas de acuerdo con Powell como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Clasificación de Powell de diarrea crónica. Adaptado de Vargas, 1998.

<b>Clasificación</b>	<b>Causas y Origen</b>
<b>Malabsorción</b>	Mala digestión intraluminal (cirrosis y obstrucción biliar, sobrecrecimiento bacteriano, insuficiencia pancreática exócrina). Malabsorción mucosa (Fármacos, enfermedades infecciosas, enfermedades del sistema inmunológico, esprue tropical, esprue celiaco, dermatitis herpetiforme, enfermedad de Whipple, abetalipoproteinemia). Obstrucción linfática (Linfangiectasia intestinal). Causas mixtas de esteatorrea (síndrome de intestino corto, enfermedades metabólicas).
<b>Diarreas que reaccionan rápidamente</b>	Ingestión de sustancias no absorbibles (Magnesio y Sodio). Malabsorción de carbohidratos (sorbitol, fructosa, tránsito intestinal acelerado, glucosa, galactosa y deficiencia de disacaridasas). Diarrea por ácidos biliares (resección de íleon, cortocircuito intestinal, malabsorción congénita de ácidos biliares, diarrea posvotomía).
<b>Diarrea que puede o no reaccionar rápidamente</b>	Síndrome del intestino irritable. Alergia a alimentos. Colitis microscópica. Colitis colagenosa Enterocolitis eosinofílica.



**Cuadro 1.** Clasificación de Powell de diarrea crónica (continuación). Adaptado de Vargas, 1998.

<b>Diarreas inflamatorias</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal. Gastroenteritis eosinofílica. Alergia a proteínas de soya y leche. Enteropatías a perdedoras de proteínas. Enterocolitis crónica por radiación. Diversas (tuberculosis, <i>Clostridium difficile</i> , entre otros).
<b>Diarreas que no reaccionan rápidamente</b>	Síndrome carcinoide. Gastrinoma. Vipoma. Carcinoma medular de tiroides. Glucagonoma. Adenoma vellosa. Mastocitosis sistémica. Diarrea ficticia. Diarrea crónica idiopática y pseudocólera pancreático. Diarrea del diabético. Diarrea del alcohólico. Diarreas congénitas secretoras.



## 2.4 Tratamiento

La intensidad del tratamiento de la diarrea aguda depende del diagnóstico diferencial y de la edad del paciente. Es importante mencionar que la diarrea es también un mecanismo de defensa del organismo para eliminar los agentes causantes de la infección.

La prioridad en el tratamiento de diarrea es la rehidratación oral, esto no reduce el volumen de la diarrea, sin embargo, la absorción de los electrolitos administrados facilita la corrección del desequilibrio hidroelectrolítico al mismo tiempo que el organismo elimina a los agentes patógenos.

El tratamiento de la diarrea crónica debe basarse en las causas, síntomas y complicaciones. En el tratamiento sintomático se emplean medicamentos que influyen en los mecanismos de absorción y movimiento intestinal, en algunos casos, se recomiendan los derivados de los opiáceos, como difenoxilato [1], que no es recomendable en niños ni en ancianos y loperamida [2].

### Fármacos usados en el tratamiento de la diarrea

En la actualidad, se utilizan diferentes fármacos con acción antidiarreica que alteran los movimientos intestinales de propulsión aumentando el tiempo de absorción de líquido.

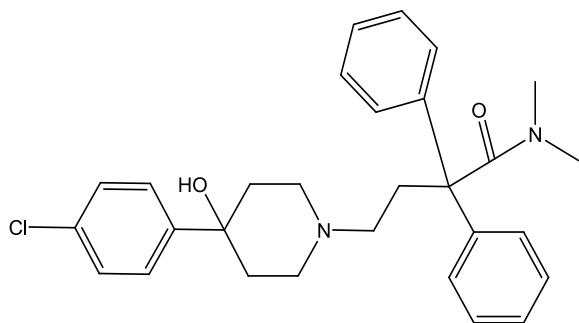
#### *Fármacos antidiarreicos de tipo opiáceo*

Estos fármacos modulan la liberación de acetilcolina e incrementan el tiempo de tránsito intestinal por reducción de la actividad peristáltica, un aumento del tono y movimientos segmentarios. Pueden retrasar la eliminación de bacterias

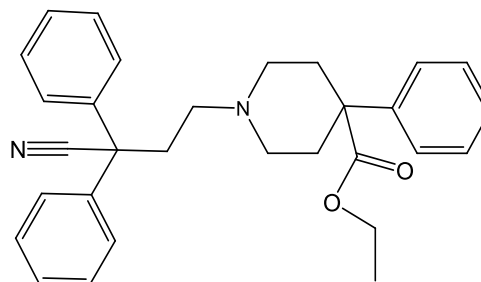


enteroinvasivas como *Shigella sp.* Algunos producen euforia y depresión respiratoria.

**Figura 4.** Compuestos utilizados para el tratamiento de diarrea.



[1] loperamida



[2] difenoxilato

#### *Modificadores de las heces*

Los modificadores fecales y los adsorbentes actúan adsorbiendo toxinas o cubriendo la mucosa intestinal al mismo tiempo que la protegen. Se utiliza, por ejemplo, el caolín que aumenta la consistencia de las heces.

#### *Tratamiento antibiótico*

Debe emplearse en pocas ocasiones ya que la mayor parte de las diarreas son autolimitadas. Se utiliza tetraciclina en caso de diarrea y cólera grave causada por *Salmonella typhimurium*. Para el caso de *Campylobacter jejuni* se utiliza eritromicina o ciprofloxacino. Sin embargo, el uso irracional de antibióticos de amplio espectro ha dado lugar a un alto nivel de resistencia a antibióticos por parte de muchas bacterias enteropatógenas, además de disminuir la flora normal de microorganismos presentes en el intestino.



## 2.5 Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la diarrea.

En la actualidad, existen diferentes medicamentos utilizados para el tratamiento de diarrea secretora siendo los opioides sintéticos los fármacos de elección para el tratamiento inespecífico de cuadros diarreicos intensos que puedan causar deshidratación, por ejemplo, la loperamida y el racecadotril. Ambos fármacos producen efectos adversos como broncoespasmos, fiebre y vómito. Además, la loperamida no debe ser administrada en niños menores de 6 años (Velázquez *et al.*, 2006).

En México y en muchos países el uso de plantas medicinales para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales es frecuente, es por ello, que el estudio farmacológico de las mismas es cada día más común. Estudios recientes han permitido conocer que especies medicinales con efecto antiespasmódico están ampliamente distribuidas en la naturaleza, comprobando su fácil accesibilidad, mostrando ser blancos para el desarrollo de agentes terapéuticos antidiarreicos.

Para poder evidenciar el efecto antidiarreico o antiespasmódico de una especie vegetal, es necesario utilizar modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009), en los últimos años, en México y en diferentes regiones del mundo se han estudiado una gran cantidad de plantas cuyos efectos antidiarreicos o antiespasmódicos han sido probados.



**Cuadro 2.** Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica. Adaptado de Astudillo-Vázquez et al., 2009.

<b>Familia botánica</b>	<b>Especie vegetal con actividad antidiarreica o antiespasmódica</b>
<b>Acanthaceae</b>	<i>Justicia insularis</i> Mull. Arg.
<b>Agavaceae</b>	<i>Dracaena afromontana</i> Mildbr.
<b>Alliaceae</b>	<i>Allium cepa</i> L. var. (tropea)
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Alternanthera repens</i> Kuntze
<b>Anacardiaceae</b>	<i>Cyrtocarpa procera</i> Kunth
<b>Annonaceae</b>	<i>Annona senegalensis</i> Pers.
<b>Apiaceae</b>	<i>Angelica radix</i> <i>Carvi fructus</i> <i>Heracleum thomsoni</i> C. B. Clarke <i>Heteromorpha trifoliata</i> L.
<b>Apocynaceae</b>	<i>Amsonia elliptica</i> (Thunb.) Roem. & Schult. <i>Holarrhena antidysenterica</i> Wall
<b>Araceae</b>	<i>Acorus calamus</i> L.
<b>Araliaceae</b>	<i>Hedera helix</i> L.
<b>Asclepiadaceae</b>	<i>Calotropis gigantea</i> R. Br. <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br <i>Cynachum acutum</i> L.
<b>Asteraceae</b>	<i>Achillea millefolium</i> L. <i>Atractylodes coreana</i> <i>Atractylodes lancea</i> <i>Bidens odorata</i> Cav. Bässler <i>Brickellia paniculata</i> (Miller) Robinson <i>Brickellia veronicaefolia</i> (Kunth) Gray <i>Archibaccharis androgyna</i> (Brandegee) <i>Carthamus oxycantha</i> Bieb <i>Aster squamatus</i> (Spreng) Hier. <i>Atractylodes coreana</i> Kitamura <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC <i>Baccharis heterophylla</i> H.B.K. <i>Baccharis serraefolia</i> DC. <i>Conyza filaginoides</i> (D.C.) Hieron <i>Egletes viscosa</i> (L.) Less <i>Emilia coccinea</i> (Sims) G. Don



**Cuadro 2.** Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica (continuación). Adaptado de Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009.

<b>Familia botánica</b>	<b>Especie vegetal con actividad antidiarreica o antiespasmódica</b>
<b>Berberidaceae</b>	<i>Berberis aristata</i> DC <i>Berberis vulgaris</i> L. var. <i>asperma</i> Don.
<b>Bignoniaceae</b>	<i>Crescentia alata</i> Kunth
<b>Bixaceae</b>	<i>Bixa orellana</i> L.
<b>Boraginaceae</b>	<i>Borago officinalis</i> L. <i>Arnebia hispidissima</i> Lehm <i>Heliotropum kotschyi</i> Bge
<b>Brassicaceae</b>	<i>Iberis amara</i> L.
<b>Burseraceae</b>	<i>Boswellia serrata</i> Roxb
<b>Caesalpiniaceae</b>	<i>Cassia alata</i> L. <i>Cassia nigricans</i> Vahl
<b>Capparidaceae</b>	<i>Cleome viscosa</i> L.
<b>Celastraceae</b>	<i>Catha edulis</i> Forsk <i>Elaeodendron balae</i> Kosterm.
<b>Chenopodiaceae</b>	<i>Chenopodium chilense</i> Schrad <i>Chenopodium ugandae</i> Aellen
<b>Cistaceae</b>	<i>Cistus ladaniferus</i> L. <i>Cistus populifolius</i> L.
<b>Commelinaceae</b>	<i>Commelina coelestis</i> Willd.
<b>Compositae</b>	<i>Ageratum conyzoides</i> L. <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. <i>Acanthospermum hispidum</i> DC <i>Bidens bipinnata</i> L. <i>Artemisia ludoviciana</i> var. <i>mexicana</i> (Wild) <i>Artemisia monosperma</i> (Delile) <i>Calendula officinalis</i> L. <i>Conyza dioscoridis</i> (L.) Desf. <i>Conyza linifolia</i> (Wild.) Täckh. <i>Elephantopus scaber</i> L.
<b>Combretaceae</b>	<i>Guiera senegalensis</i> J. F. Gmel.
<b>Convolvulaceae</b>	<i>Convolvulus arvensis</i> (L.) Täckh. <i>Convolvulus fatmensis</i> Ktze <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.



**Cuadro 2.** Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica (continuación). Adaptado de Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009.

<b>Familia botánica</b>	<b>Especie vegetal con actividad antidiarreica o antiespasmódica</b>
<b>Crassulaceae</b>	<i>Kalanchoë pinnata</i> (Lam.) Pers.
<b>Cupressaceae</b>	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.
<b>Cyperaceae</b>	<i>Cyperus rotundus</i> L.
<b>Droseraceae</b>	<i>Drosera madagascariensis</i> DC
<b>Euphorbiaceae</b>	<i>Acalypha phleoides</i> Cav. <i>Alchornea cordifolia</i> Mull. Arg. <i>Bridelia ferruginea</i> Benth. <i>Bridelia micrantha</i> (Hochst.) Baill. <i>Euphorbia paralias</i> L. <i>Jatropha curcas</i> L. <i>Jatropha curcus</i> L. <i>Euphorbia hirta</i> L.
<b>Fumariaceae</b>	<i>Corydalis lutea</i> L.
<b>Gentianaceae</b>	<i>Gentiana spathacea</i> HBK <i>Gentianopsis paludosa</i> (Hook.f.) Ma
<b>Guttiferae</b>	<i>Garcinia kola</i> Heckel
<b>Graminaeae</b>	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.
<b>Iridaceae</b>	<i>Aristea</i> spp <i>Eleutherine bulbosa</i> Urb.
<b>Lamiaceae</b>	<i>Coleus forskohlii</i> Brit. <i>Cyclotrichium niveum</i> Boiss. Mandenova & Scheng <i>Lavandula angustifolia</i> P. Millar
<b>Leguminosae</b>	<i>Albizzia lebbeck</i> (L.) Benth. <i>Alhagi maurorum</i> Medic. <i>Daniellia oliveri</i> (Rolfe) Hutch. y Dalz., <i>Desmodium grahami</i> Gray <i>Erythrina sigmoidea</i>
<b>Liliaceae</b>	<i>Asparagus pubescens</i> Nees. <i>Asparagus racemosus</i> Wild
<b>Loganiaceae</b>	<i>Anthocleista djalonensis</i> A. Chev.
<b>Malpighiaceae</b>	<i>Galphimia glauca</i> Cav.
<b>Malvaceae</b>	<i>Gossypium barbadense</i> L.
<b>Melicaceae</b>	<i>Entandrophragma angolense</i> (Welw) C DC.
<b>Mimosaceae</b>	<i>Acacia nilotica</i> L. sin. <i>A. arabica</i> Lam.





**Cuadro 2.** Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica (continuación). Adaptado de Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009.

<b>Familia botánica</b>	<b>Especie vegetal con actividad antidiarreica o antiespasmódica</b>
<b>Moraceae</b>	<i>Ficus bengalensis</i> Linn. <i>Ficus exasperata</i> Vahl-Holl <i>Ficus hispida</i> L. <i>Ficus platyphylla</i> Del. <i>Ficus racemosa</i> Linn. <i>Ficus sur</i> Forsk
<b>Myrtaceae</b>	<i>Eugenia jambolana</i> Lam. <i>Eugenia uniflora</i> L. <i>Leptospermum ericoides</i>
<b>Papaveraceae</b>	<i>Bocconia gracilis</i> Hutch. <i>Chelidonii herba</i> <i>Chelidonium majus</i> L. <i>Corydalis meifolia</i> Wall.
<b>Papilionaceae</b>	<i>Genista tridentata</i> L.
<b>Pinaceae</b>	<i>Cedrus deodara</i> (Roxb.) Loud N. O.
<b>Poaceae</b>	<i>Cymbopogon proximus</i> Stapf.
<b>Polygonaceae</b>	<i>Calligonum comosum</i> Herit
<b>Ranunculaceae</b>	<i>Cimicifuga dahurica</i> Maxim.
<b>Rubiaceae</b>	<i>Crossopteryx febrifuga</i> Benth. <i>Heinsia pulchella</i> K. Schum.
<b>Rutaceae</b>	<i>Aegle marmelos</i> Correa <i>Agathosma betulina</i> (Bergius) Pill. <i>Agathosma crenulata</i> (L.) Pillans <i>Citrus aurantium</i> L. <i>Citrus deliciosa</i> Ten. <i>Evodia fructus</i> Hook f. et. Thoms <i>Fagara lemairei</i> De Wild. <i>Haplophyllum tuberculatum</i> Forssk
<b>Sapindaceae</b>	<i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.
<b>Scrophulariaceae</b>	<i>Bacopa monniera</i> sin. <i>Herpestis monniera</i> Linn. <i>Buddleja scordioides</i> HBK (Kunth)
<b>Solanaceae</b>	<i>Brugmansia candida</i> Pers. <i>Atropa belladonna</i> L. <i>Datura arborea</i> (L.) Mettel
<b>Sterculiaceae</b>	<i>Helicteres isora</i> Linn.



**Cuadro 2.** Ejemplos de Especies vegetales con actividad antidiarreica o antiespasmódica (continuación). Adaptado de Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009.

<b>Familia botánica</b>	<b>Especie vegetal con actividad antidiarreica o antiespasmódica</b>
<b>Umbelliferae</b>	<i>Carum carvi</i> L. <i>Ferula ovina</i> (Boiss.) Boiss. <i>Foeniculum vulgare</i> Miller
<b>Verbenaceae</b>	<i>Clerodendrum phlomidis</i> Linn. <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. <i>Lantana camara</i> L.
<b>Zygophyllaceae</b>	<i>Fagonia indica</i> Burm
<b>Zingiberaceae</b>	<i>Alpinia japonica</i> (Thunb.) Miq. <i>Alpinia speciosa</i> Schum <i>Amomum xanthioides</i> Wall. <i>Curcuma longa</i> L.

## 2.6 *Punica granatum* L.

### 2.6.1 Generalidades de *Punica granatum* L.

La especie *Punica granatum* L., es originaria y se encuentra ampliamente distribuida en el norte de África. Es cultivada en climas subtropicales y tropicales en todo el mundo y es conocida como granado en español y “pomegranate” en inglés.

Es un árbol pequeño de 3 a 4.5 m de altura, tiene hojas opuestas, enteras, elípticas, oblongas, relativamente pequeñas, con peciolo cortos y nervadura rojiza.

Su flor es larga, por lo general rojo escarlata con forma de campana con estambres y el cáliz tiene de 5 a 7 sépalos rojos, amarillos o blancos.

El fruto conocido como granada, es globoso con una superficie cerosa, rosa intenso o roja cuando el fruto es maduro y contiene numerosas semillas angulares y cubiertas.



**Figura 5.** Fruto (granada) de la especie *Punica granatum* L.

### 2.6.2 Composición química.

Durante los últimos años la especie *Punica granatum* L. ha sido una fuente de metabolitos secundarios con actividad benéfica en la salud humana muy importante. Se ha logrado identificar y aislar una gran cantidad de ellos a partir de diferentes partes de la especie vegetal, sin embargo, ésta especie presenta diferencias morfológicas dependiendo del ambiente donde crezca, por ejemplo, en un estudio realizado se evaluó la calidad de la granada en diferentes cultivos, se logró identificar diferencias significativas entre ellos en cuanto al peso de la fruta, la parte comestible, evaluación sensorial (color, olor, sabor y aceptabilidad) y en composición química (pH, acidez, vitamina C, polifenoles y azúcares totales). (Navindra *et al.*, 2006)



A continuación, se mencionan algunos compuestos que han sido identificados y aislados de la especie en algunos estudios realizados.

En la corteza, se han encontrado flavonoides diglicósidos, quercetina-3,4-dimetileter-7-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosido, quercetina, pelargonidina-3,5-diglucosido y ácido elágico. Se han aislado compuestos polifenólicos como: elagitaninos (5-O-galoilpunicacorteina D), taninos (punicacorteina D, punicalina, punicalagina, 2-O-galoilpunicalina) y galotaninos (Chauhan y Chauhan, 2001; El-Toumy y Rauwald, 2002; El-Toumy *et al.*, 2001).

Las hojas contienen galotaninos (1,2,4-tri-O-galoil- $\beta$ -glucopiranososa y 1,3,4-tri-O-galoil- $\beta$ -glucopiranososa), elagitaninos (4-di-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenil- $\beta$ -glucopiranososa), flavonoides glicosilados (4'-O- $\beta$ -glucopiranosido apigenina, 4'-O- $\beta$ -glucopiranosido luteolina y 3'-O- $\beta$ -glucopiranosido luteolina), brevifolina, corilagina, ácido elágico, granatina-B y punicafolina (Hussein *et al.*, 1997; Nawwar *et al.*, 1994).

Las flores de color rojo, contienen el pigmento 3,5-diglucósido pelargonidina, terpenos (ácido estíptico, ácido maslínico) y glicósidos de flavonoides (glicósidos de delphinidina y cianidina) (Hu *et al.*, 2001).

La parte más utilizada de la especie, es el fruto que contiene una gran proporción de compuestos polifenólicos (galocatequinas, cianidinas, taninos, ácidos, entre otros). El 52% del fruto es comestible, siendo el 78% jugo y el 22% semillas, en esta parte se ha identificado la presencia de pigmentos (delphinidina diglicósido y el penta glicósido de la malvidina). El jugo fresco es rojo intenso, y de sabor ácido y dulce dependiendo de la maduración del mismo, éste contiene un 85% de



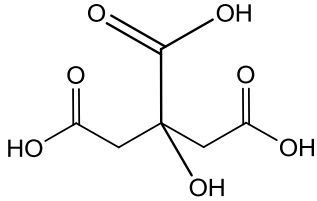
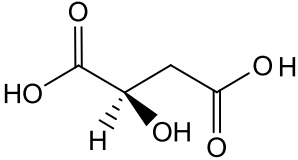
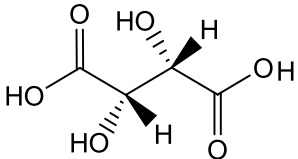
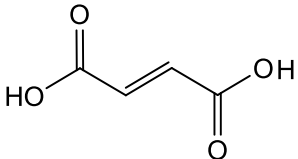
humedad, 10.6% de azúcar total y 1.4% de pectina (El-Nemr *et al.*, 1999), su acidez se debe predominantemente a los ácidos cítrico, málico, tartárico, oxálico, (-)-quínico y succínico. También se han identificado compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido clorogénico, ácido cinámico, ácidos *o*- y *p*-cumárico, catequina y quercetina), antocianinas (3-glucosa cianidina, 3-rutinoso cianidina, 3-glucosa delphinidina y 3-glucosa pelargonidina) y procianidinas (Poyrazoglu *et al.*, 2002; Amakura *et al.*, 2000; Artik *et al.*, 1998).

Las semillas contienen alta proporción de ácidos (ácido caprílico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico), proteínas, fibra,  $\beta$ -sitosterol, estrógenos y glicósidos (glucosa, galactosa y xilosa) (Sarmakhmatov *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 1995).

La cáscara de granada aunque no es comestible, es comúnmente utilizada para preparar infusiones y té con fines medicinales. Ésta contiene polisacáridos solubles, al igual que las semillas y se reconoce como una fuente importante de taninos, polifenoles (granatina B, 3-O glucósido pelarginidina, quercemetrina, ácido gálico, punicalina, punicalagina y corilagina), flavonoides (quercetina-3,4-dimetileter, 7-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil, (1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosido, quercetina, pelargonidina-3,5-diglucosido y ácido elágico) y como pigmento una mezcla de malvidina y glicósidos petunidina pentosa (Mavlyanov *et al.*, 1997; Chauhan and Chauhan, 2001).

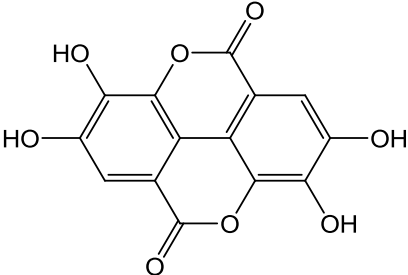
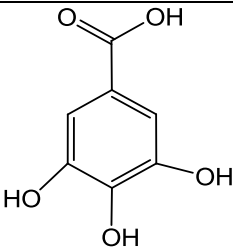
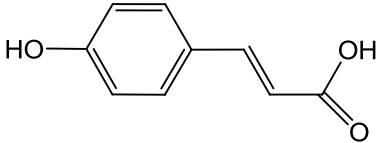
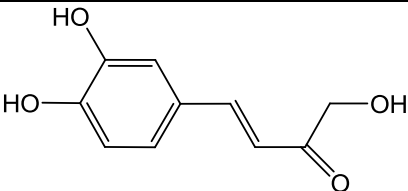


**Cuadro 3.** Compuestos identificados en diferentes partes de la especie *Punica granatum* L.

Parte vegetal	Compuesto reportado	Estructura	Referencia
Fruto	Ácido cítrico		Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002; Amakura <i>et al.</i> , 2000
Fruto	Ácido málico		Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002; Amakura <i>et al.</i> , 2000
Fruto	Ácido tartárico		Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002; Amakura <i>et al.</i> , 2000
Fruto	Ácido fumárico		Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002; Amakura <i>et al.</i> , 2000

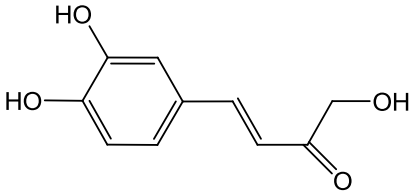
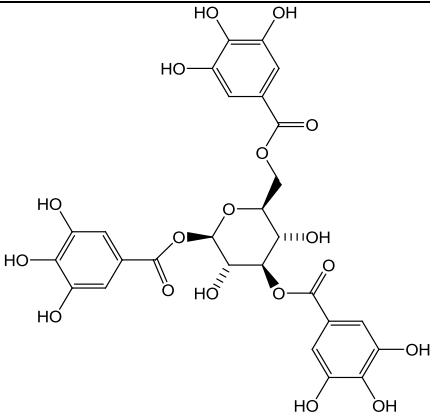
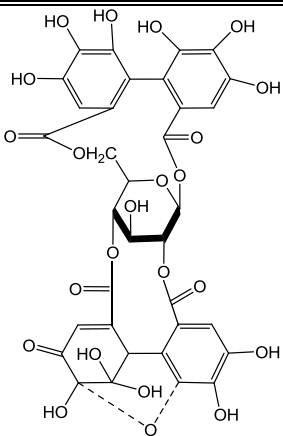


**Cuadro 3.** Compuestos identificados en diferentes partes de la especie *Punica granatum* L. (continuación).

Parte vegetal	Compuesto reportado	Estructura	Referencia
Hojas Fruto	Ácido elágico		Hussein <i>et al.</i> , 1997; Nawwar <i>et al.</i> , 1994; Amakura <i>et al.</i> , 2000
Fruto	Ácido gálico		Hussein <i>et al.</i> , 1997; Nawwar <i>et al.</i> , 1994
Fruto	Ácido <i>p</i> -cumárico		Artik <i>et al.</i> , 1998
Fruto	Ácido caféico		Artik <i>et al.</i> , 1998



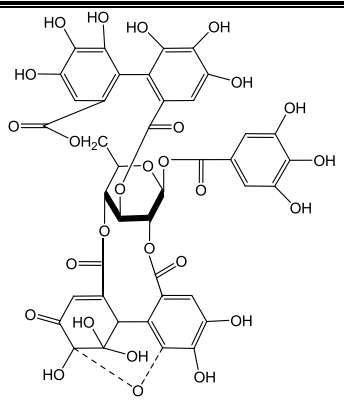
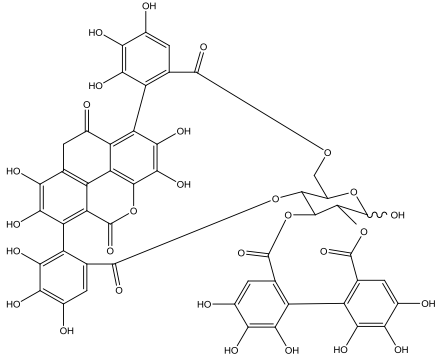
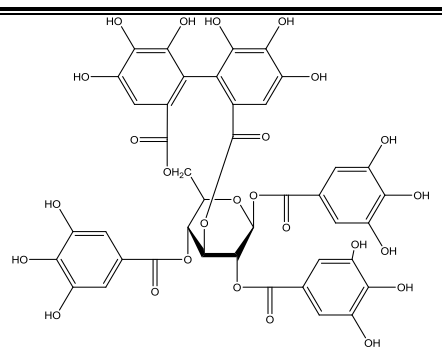
**Cuadro 3.** Compuestos identificados en diferentes partes de la especie *Punica granatum* L. (continuación)

Parte vegetal	Compuesto reportado	Estructura	Referencia
Fruto	Ácido caféico		Artik <i>et al.</i> , 1998
Hojas	Corilagina		Nawwar <i>et al.</i> , 1994
Hojas	Granatina A		Tanaka <i>et al.</i> , 1986





**Cuadro 3.** Compuestos identificados en diferentes partes de la especie *Punica granatum* L. (continuación)

Parte vegetal	Compuesto reportado	Estructura	Referencia
Hojas	Granatina B		Tanaka <i>et al.</i> , 1986
Corteza	Punicalagina		El-Toumy y Rauwald, 2002
Hojas	Punicafolina		Tanaka <i>et al.</i> , 1986



### 2.6.3 Usos terapéuticos

La mayor parte de la especie, es decir, las flores, corteza, hojas, semillas, fruto y cáscara se utiliza en la medicina herbolaria y ha sido utilizada por diferentes culturas desde hace mucho tiempo, prueba de esto el Papiro de Ebers (1550 A. de C.) donde se describe el uso de la corteza como antihelmíntico.

En la medicina tradicional se utiliza esta planta para la expulsión de lombrices principalmente como tenicida. En Asia e India, las semillas se utilizan para enfermedades estomacales y la pulpa se usa para problemas de corazón. En china es utilizada como antibacteriana y antiinflamatoria.

El interés en la granada como una especie medicinal y nutracéutica se incrementó partir del año 2000 al encontrar en diferentes bases de datos más de 200 artículos relacionados a la especie con diferentes actividades farmacológicas y biológicas.

De manera general, las actividades farmacológicas reportadas son: antihelmíntico, antibacteriano, antineoplásico, hipoglicémico, antidiarreico, antifúngico, antiinflamatorio, antimalárico, antioxidante, antiviral, como protector gástrico, larvicida y molusquicida (Jurenka, 2008).

Dentro de la búsqueda de compuestos con actividad antidiarreica, diferentes extractos de especies vegetales se han estudiado debido a las propiedades que se les atribuyen en la medicina tradicional. En estos extractos, se busca actividad antimicrobiana y/o propiedades antidiarreicas tales como: efectos antiespasmódicos, retraso en el tránsito intestinal, estimulación de la absorción de agua y disminución de la secreción de electrolitos. Esta actividad en conjunto con la actividad antibacteriana, antiparasitaria o antiviral atribuida a algunas especies, es



la razón para considerar a las plantas una fuente importante de compuestos para el tratamiento de diarrea, al poder eliminar al patógeno causante de la infección intestinal y combatir los síntomas diarreicos de dicha enfermedad.

En la actualidad, se han estudiado diferentes plantas a las que se les atribuyen propiedades útiles en el tratamiento de la diarrea, tal es el caso de *Calotropis gigantea* conocida como “algodón de seda” con actividad antibacteriana y con propiedades antidiarreicas relacionadas con la alteración de canales de cloro (Ahmad *et al.*, 2006). La especie vegetal *Punica granatum* L. ha sido blanco de investigaciones que muestran algunas de sus propiedades terapéuticas; se ha demostrado que el extracto de pericarpio de la granada posee actividad antiviral contra Herpes (Zhang *et al.*, 1995), además de tener actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias causantes de enfermedades diarreicas, ejemplos de ello, la actividad antibacteriana mostrada para diferentes cepas de *Salmonella sp.* donde la MIC se encontró en un rango de 62.5 a 1000  $\mu\text{g/ml}$  y para *E. coli* un MIC de entre 30 y 90  $\mu\text{g/ml}$  (Choi *et al.*, 2009; Ahmet *et al.*, 2009). Al encontrar actividad en el extracto de granada, se ha decidido buscar compuestos bioactivos en el mismo que puedan tener mejor actividad biológica, tales como la (-)-epicatequina, presente en el extracto de cáscara-pericarpio de granada como se mostró en este trabajo experimental. Al realizar una revisión sobre las propiedades terapéuticas de la (-)-epicatequina se encontró que presenta actividad antisecretora en un ensayo in vitro utilizando toxina de *Vibrio cholerae*, y actividad antiparasitaria para *E. histolytica* y *G. lamblia*, mostrando así ser un compuesto bioactivo que puede ayudar en el tratamiento de enfermedades infecciosas que producen diarrea



(Velázquez *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2007). Otro de los compuestos que lograron ser aislados en este trabajo fue el ácido gálico, cuya actividad fue relajante sobre el músculo liso intestinal, y se encontró en la literatura que dicho compuesto tiene actividad antidiarreica proporcionada por la capacidad del mismo para evitar la unión de la toxina lábil enterotoxigénica de *E. coli* (Chen *et al.*, 2006). Ambos compuestos son importantes y pueden ser un blanco en futuras investigaciones para el desarrollo de compuestos para el tratamiento de diarrea infecciosa por su actividad antimicrobiana y por su efecto sobre el músculo liso intestinal.



### **3. Justificación y Objetivos.**

#### *3.1 Justificación.*

En México se registra una alta morbilidad por enfermedades infecciosas intestinales. De acuerdo con el documento: Mujeres y Hombres en México, 2009 - elaborado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2006 se registraron en el país 82 mil 112 egresos hospitalarios por enfermedades infecciosas intestinales, cifra mayor a la presentada por egresos hospitalarios debido a neumonías, los cuales llegaron en ese mismo año a 69 mil 646 casos.

De acuerdo con los datos del INEGI, las enfermedades intestinales infecciosas se situaron en ese año en el lugar dieciséis de las causas de morbilidad en el país, mientras que las neumonías ocuparon el sitio dieciocho.

Por otra parte, de acuerdo con el Boletín de Vigilancia Epidemiológica, de la Secretaría de Salud, hasta la semana catorce del 2009 se registraron once mil 755 casos acumulados de fiebre tifoidea en México, de los cuales tres mil 289 casos corresponden a hombres y ocho mil 466, a mujeres. Esta cifra es ligeramente superior a la alcanzada para la misma semana del 2008, en la que se habían registrado once mil 120 casos.

Con lo que respecta a la paratifoidea y otras salmonelosis, hasta la semana 14 del 2009 se habían acumulado treintaicinco mil 260 casos, de los cuales once mil 83 corresponden a hombres y veinticuatro mil 177, a mujeres. Esta cifra es muy superior a la registrada para la misma semana del 2008, en la que se contabilizaron veintiocho mil 735 casos.



En lo que se refiere a las infecciones intestinales debidas a virus y otras “mal definidas”, el Boletín Epidemiológico na 14 del 2009 un total de un millón 32 mil 18 casos, de los cuales 476 mil 144 corresponden a hombres y 555 mil 874, a mujeres. Esta cifra es ligeramente menor a la registrada en la misma semana del 2008, que corresponde a un millón 91 mil 560 casos.

Otros padecimientos que registran un alto número de egresos hospitalarios en el país son los generados por intoxicación alimentaria bacteriana, los cuales son generados por la ingestión de alimentos que contienen toxinas, elementos patógenos, bacterias o sustancias orgánicas perjudiciales.

En este caso, hasta la semana 14 del 2009 se registraron ocho mil 930 casos, de los cuales cuatro mil 151 corresponden a hombres, y cuatro mil 779, a mujeres. La cifra rebasa a la registrada en la misma semana del 2008, pues en ese año se registraron siete mil 914 casos.

En lo que respecta a enfermedades infecciosas intestinales, hasta la semana 14 del 2009 se habían registrado un millón 242 mil 326 casos, de los cuales 562 mil 515 corresponden a hombres y 679 mil 811, a mujeres; esta cifra es inferior a la registrada en el misma semana del 2008, en la que se contabilizaron un millón 299 mil 815 casos.

En la medicina convencional existen tratamientos para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales, sin embargo, son caros y presentan numerosos efectos colaterales. Por las razones antes mencionadas existe la necesidad de buscar nuevos compuestos que demuestren mayor seguridad y efectividad que los ya existentes en el mercado para el tratamiento de estos padecimientos.



Evidencias científicas han demostrado que en las plantas medicinales existe una fuente importante de nuevos compuestos y que el conocimiento etnomédico es un criterio útil para seleccionar las plantas a estudiar.

La granada roja (*Punica granatum*) es utilizada en la medicina tradicional de nuestro país como antibacteriana, antihelmíntica, antineoplásica y para tratar enfermedades gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994; Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2010). Con base en lo anterior se plantearon los objetivos que se mencionan a continuación.

### 3.2 *Objetivo General.*

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto sobre la motilidad intestinal del extracto etanólico y compuestos derivados de la cáscara y pericarpio del fruto de *Punica granatum* L. con la finalidad de cumplir con el objetivo principal del proyecto se plantearon los siguientes objetivos particulares.

### 3.3 *Objetivos Particulares.*

3.1 Preparar el extracto etanólico a partir de la cáscara y pericarpio del fruto de *P. granatum* L. y aislar compuestos derivados del mismo.

3.2 Cuantificar la motilidad intestinal del extracto etanólico y de los compuestos derivados de la cáscara y el pericarpio de la granada utilizando el modelo de íleon aislado de cobayo.



## 4. Experimental

### 4.1 *Procedimiento General.*

#### 4.1.1 *Material Vegetal.*

El material vegetal utilizado se compró en el Mercado de la Merced en la ciudad de México localizado en la Delegación Venustiano Carranza. Una muestra de referencia se encuentra en el laboratorio 111 del edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 4.1.2 *Estudio fitoquímico de la especie Punica granatum L.*

##### 4.1.2.1 *Análisis cromatográfico.*

Para el fraccionamiento primario se utilizó una cromatografía en columna al vacío (VCC) utilizando como fase estacionaria 500 g de resina polimérica Amberlita XAD-16 (tamaño de partícula 0.56-0.71 mm). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron mediante los métodos convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con celulosa de 10 x 20 cm (Merck), utilizando como sistema de elución CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (1:4). Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) y posteriormente, se utilizó como agente cromógeno FeCl<sub>3</sub>. En el fraccionamiento secundario se utilizó una columna abierta de Sephadex LH-20 (4.5 x 41cm) utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>O, MeOH y mezclas de MeOH/H<sub>2</sub>O.





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

El registro de los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos aislados se realizó en la Unidad de Apoyo a la Investigación (USAI) del edificio B de la Facultad de Química de la UNAM.

Para obtener espectros de IR se utilizó un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer FT 1605, en película. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un Thermo-Electron DFS (Double Focus Sector) por introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un equipo Varian, modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron utilizando  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

#### 4.1.2.3 *Preparación del extracto.*

Se realizó el proceso de separación mecánica de la pulpa y el pericarpio-cáscara de granada, el material vegetal (pericarpio-cáscara) de granada fue secado y molido utilizando un molino de cuchillas Wiley Modelo 4.

El material vegetal seco y molido se extrajo tres veces utilizando un proceso de maceración con 5L de EtOH.

El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida obteniendo un sólido color café oscuro.



#### 4.1.2.4 *Fraccionamiento primario del extracto de Punica granatum.*

Una muestra de 38.4 g del extracto obtenido fue fraccionado en una columna al vacío utilizando Amberlita XAD-16 (500 g) y como eluyente agua, mezclas de agua-metanol y acetona en diferentes proporciones. De este fraccionamiento primario se obtuvieron tres fracciones combinadas (FI-FIII). La presencia de elagitaninos se identificó en la fracción FII utilizando el reactivo de nitrito de sodio y ácido acético.

#### 4.1.2.5 *Fraccionamiento secundario del extracto de Punica granatum.*

Se realizó el fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex LH-20 (4.5 × 41cm) de la fracción activa FII utilizando una muestra de 2.026 g y usando como eluyente mezclas de agua y metanol en diferentes proporciones. Como resultado de este proceso se obtuvieron un total de 38 fracciones (100ml), reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica utilizando como revelador  $\text{FeCl}_3$  al 5%. Como resultado del proceso se obtuvieron siete de fracciones secundarias (FII1-FII7).

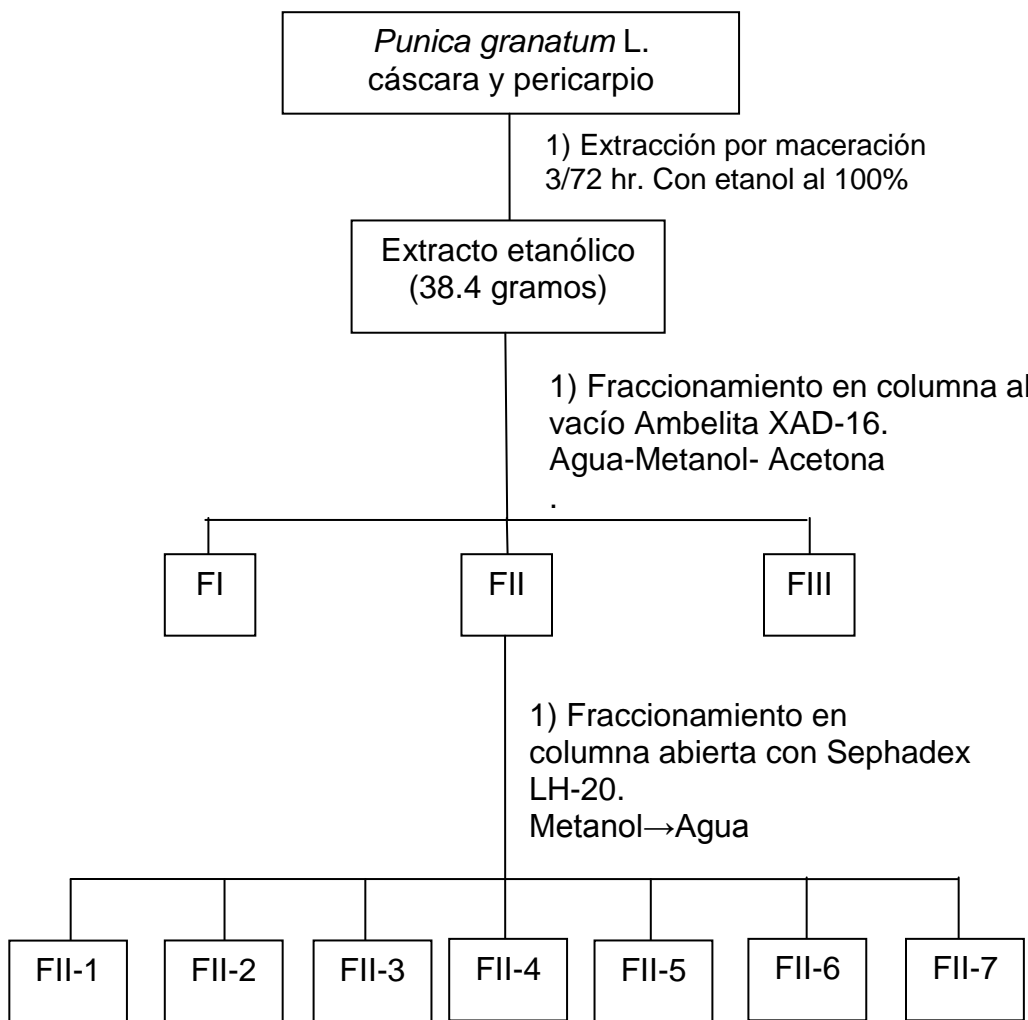


**Cuadro 4.** Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna de la fracción activa FII.

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	20:80	1-4	1-9	1.017
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	30:70	5-9	10-11	0.283
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	40:60	10-12	12-22	0.219
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	50:50	13-24	23-30	0.092
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	60:40	25-26	31-32	0.048
<b>MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	80:20	27-32	33-34	0.113
<b>MeOH</b>	100	33-40	35-38	0.108



**Diagrama 1.** Proceso de extracción y fraccionamiento de la cáscara y pericarpio del fruto de *Punica granatum* L.





### 4.1.3 Ensayo biológico

#### 4.1.3.1 Determinación del efecto relajante del extracto, fracciones y productos puros sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.

Para evaluar el efecto del extracto, fracciones y compuestos puros de la especie *Punica granatum L.* se utilizó un modelo *in vitro* de acuerdo a un diseño experimental previamente establecido (Hernández *et al.*, 2004). Posteriormente se describe el procedimiento utilizado.

#### 4.1.3.2 Aislamiento del íleon.

Para la obtención del tejido, se utilizaron cobayos macho adultos (500 - 800 g) cepa Harley, alimentados *ad libitum* y mantenidos en un bioterio con acceso libre al agua. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se realizó una incisión en el abdomen para extraer el íleon, el cual fue colocado en una solución de Krebs-Henseleit (NaCl 118mM, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>, D-glucosa 11, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25) preparada utilizando agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5).

El íleon aislado fue cortado en fragmentos de cinco centímetros (cm) y el lumen de cada segmento se lavó con la solución Krebs-Henseleit utilizando una jeringa con aguja de punta roma. Posteriormente, se cortaron secciones de un centímetro.



#### 4.1.3.3 Sistema de registro.

Para evaluar el efecto de las muestras de prueba sobre la contracción espontánea del íleon, los segmentos se colocaron en celdas que contenían la solución Krebs-Henseleit burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) a una temperatura de 37 °C. Para el registro de contracciones, se utilizó un sistema de registro isométrico por medio de transductores de fuerzas (Grass, Modelo FT03) acoplado a un polígrafo de cuatro canales de registro (Grass, Modelo 7D). La fuerza de tensión utilizada para cada segmento fue de un gramo.

#### 4.1.3.4 Evaluación del efecto relajante.

Con la finalidad de estabilizar el tejido a condiciones *in vitro*, cada segmento de íleon se incubó y se mantuvo en la solución Krebs-Henseleit por un periodo de 30 minutos con una tensión constante de un gramo, posteriormente se registró por diez minutos la actividad espontánea del íleon para obtener un periodo de control.

En la evaluación de las muestras, terminando el periodo de control se registró durante diez minutos el efecto del extracto de *Púnica granatum*, la epicatequina, el ácido gálico, el ácido málico y la atropina utilizando diferentes concentraciones. La magnitud de la respuesta de los efectos inhibitorios y excitatorios se determinó comparando la tensión y la amplitud de las contracciones del íleon antes y después de agregar las muestras a evaluar.

Los resultados representan un promedio de 6 réplicas ± error estándar (EE). El ajuste de las curvas se realizó mediante un análisis de regresión no lineal utilizando la ecuación general para una curva dosis- respuesta (PRISM 3.02, Graph Pad). Las



curvas concentración–respuesta se graficaron y se calculó la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ).

## 5. Resultados y Discusión

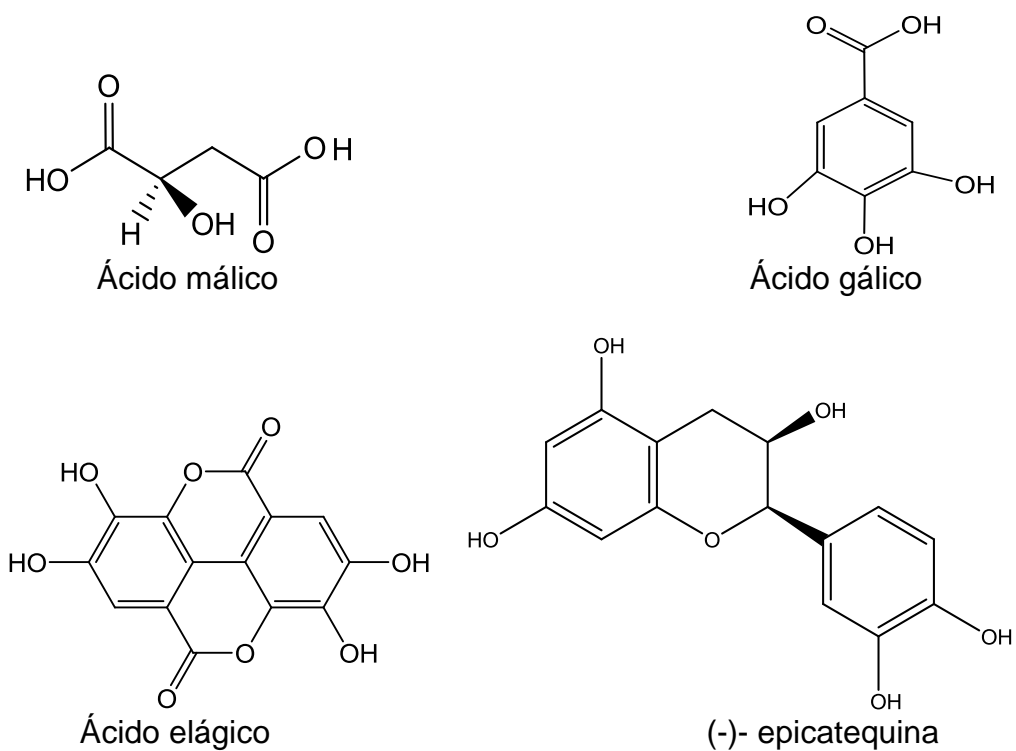
La preselección de la especie *Punica granatum*, se realizó utilizando un criterio etnomédico, tomando como referencia el uso de la granada en diferentes países para el tratamiento de diarrea, empacho, vómito, parásitos intestinales, lesiones en la cavidad bucal y trastornos respiratorios como: tos, gripe e inflamación de la garganta (Bodeker *et al.*, 2005; Navindra *et al.*, 2006). El estudio fitoquímico de las cáscaras y el pericarpio de la granada roja se realizó con la finalidad de aislar los compuestos biológicamente activos y se utilizó como ensayo biológico el modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo. La obtención del extracto se realizó mediante un proceso de maceración, tal como se mencionó en la parte experimental. Posteriormente, el extracto etanólico se sometió a un fraccionamiento primario mediante un proceso de cromatografía utilizando Amberlita XAD 16 como adsorbente. Para este proceso se utilizaron mezclas de agua-metanol en diferentes proporciones y acetona. Este procedimiento generó tres fracciones que se evaluaron utilizando el bioensayo anteriormente mencionado.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto etanólico preparado a partir de las cáscaras y el pericarpio de la granada roja permitió el aislamiento y la caracterización de los ácidos gálico, elágico, málico y la (-)-epicatequina. Los compuestos aislados en el presente estudio son conocidos y todos ellos han sido



aislados previamente de especies del género *Punica* todos los compuestos fueron caracterizados por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura y por comparación directa con muestras auténticas. En la Figura 5 se muestran las estructuras de los compuestos aislados.

**Figura 6.** Compuestos aislados de las cáscaras-pericarpio de la granada.



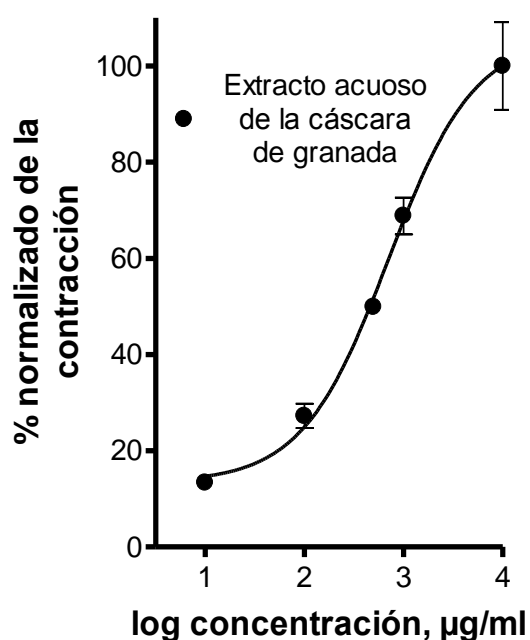




### 5.1 Evaluación biológica del extracto de granada sobre la motilidad intestinal.

Los resultados del estudio farmacológico de la especie *Punica granatum*, planta empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea y enfermedades gastrointestinales (Das *et al.*, 1999), mostraron que el extracto etanólico y la fracción FII poseían un efecto excitatorio de la musculatura lisa ya que inducen un efecto contráctil en el íleon aislado de cobayo. En la Figura 7 se muestra el efecto del extracto preparado a partir de las cáscaras de granada.

**Figura 7.** Curva concentración-respuesta del efecto excitatorio inducido por el extracto total de la cáscara de la granada. Los valores están expresados como los porcentajes normalizados de la respuesta excitatoria. El valor de 100% corresponde a la contracción inducida por la más alta concentración evaluada del extracto (10 000 µg/ml).



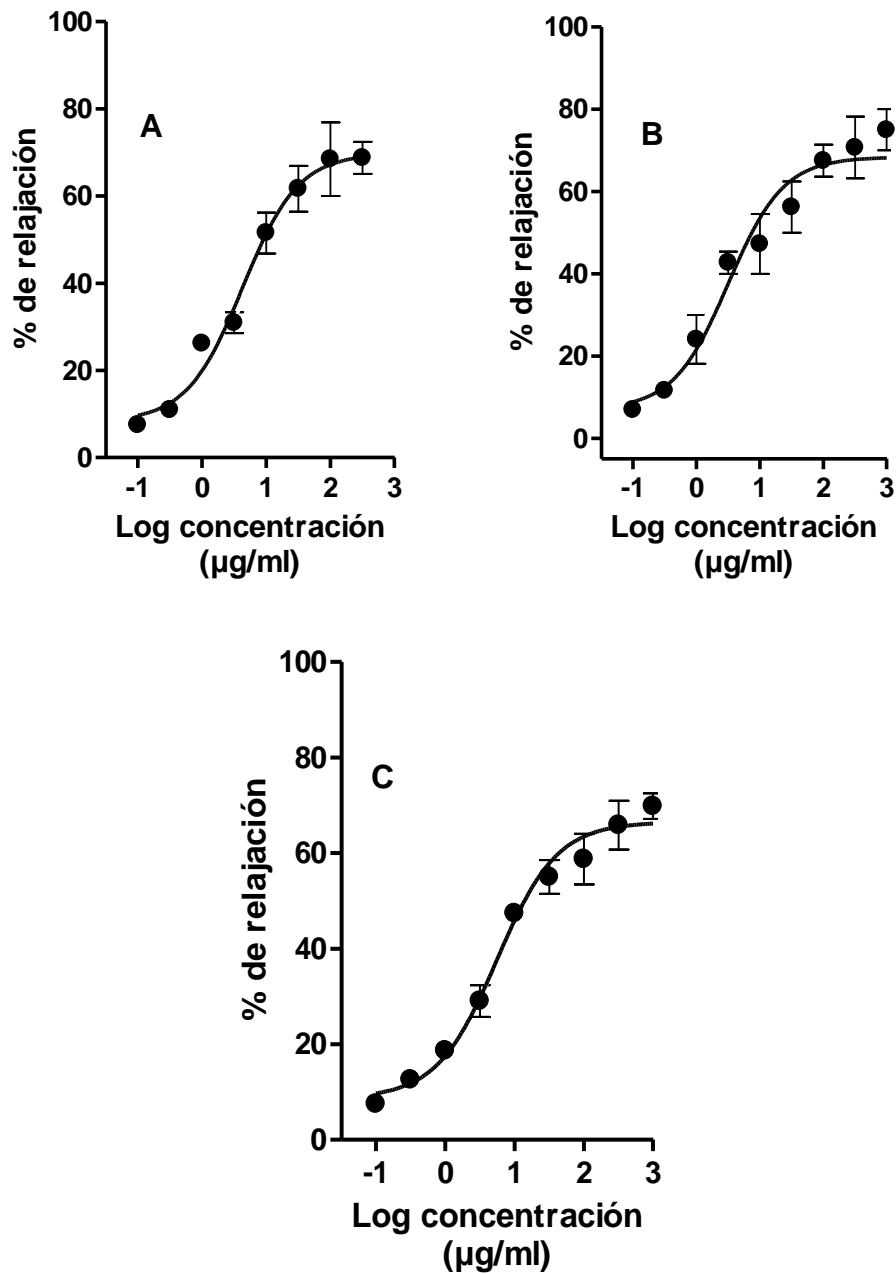


## 5.2 *Evaluación biológica de los compuestos aislados del extracto de granada sobre la motilidad intestinal.*

Se logró observar que los compuestos evaluados (ácido gálico, ácido málico y epicatequina) poseen un efecto espasmolítico dependiente de la concentración sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo, sin embargo, el efecto observado de cada uno de los compuestos presenta características diferentes. En la Figura 8 se muestran las curvas de concentración–respuesta de los compuestos evaluados. Es posible observar que la (-)-epicatequina induce una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon, dicha inhibición se mantuvo durante los diez minutos posteriores a la aplicación del compuesto, tiempo durante el cual se registran las respuestas de las muestras de prueba. El efecto inducido por el ácido málico y el ácido gálico fue transitorio y se caracterizó principalmente por una disminución en el tono del íleon, sin que se observara un efecto notable en la amplitud de las contracciones. Cabe mencionar que el tiempo de duración de la inhibición para los ácidos gálico y málico también fue dependiente de la concentración, obteniendo un máximo de  $3.7 \pm 0.2$  minutos al utilizar la máxima concentración evaluada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ). El efecto inhibitorio de las muestras evaluadas se comparó con el de la atropina (control positivo). Éste fármaco provocó una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones del íleon, la cual se mantuvo durante los 10 minutos en que fue registrado el efecto.



**Figura 8.** Curvas concentración – respuesta de los compuestos evaluados sobre el íleon aislado de cobayo. A. Epicatequina. B. Ácido málico. C. Ácido gálico.





En el cuadro 5. se muestra el efecto máximo ( $E_{max}$ ) y la  $CE_{50}$  de las muestras evaluadas así como de la atropina. Los valores de la  $CE_{50}$  correspondientes a los compuestos evaluados resultaron ser menores al del control positivo, el cual presentó un valor de 281, 239 y 380 veces respectivamente mayor al de los compuestos. Adicionalmente, en todos los casos el efecto máximo relajante inducido por los compuestos de prueba fue menor al de la atropina.

**Cuadro 5.** Valores de  $EC_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducido por los compuestos aislados a partir de la cáscara-pericarpio de la especie *Punica granatum* y el control positivo.

Compuesto	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$ (%)
(-)-Epicatequina	$4.11 \pm 0.60$	$69.8 \pm 2.7$
Ácido málico	$3.49 \pm 0.73$	$75.0 \pm 5.0$
Ácido gálico	$5.53 \pm 0.71$	$68.8 \pm 3.7$
Atropina	$0.0146 \pm 0.0019$	$85.6 \pm 1.4$

Dado que el efecto del extracto sobre la motilidad del intestino delgado es excitatorio y el efecto de los compuestos aislados es relajante, es posible sugerir que el extracto contiene sustancias con actividad de excitación y relajación sobre el músculo liso. A la fecha, la identidad de los compuestos que estimulan las contracciones del músculo liso intestinal se desconoce, aunque, es posible que la actividad de estos principios activos sea significativa y de importancia, debido a que al evaluar el efecto del extracto total la actividad predominante es de excitación como se mostró anteriormente.



El estudio realizado para evaluar el efecto sobre la motilidad intestinal, no proporciona información alguna con relación al mecanismo de acción de los principios activos probados. Por lo tanto, solamente es posible decir que la epicatequina, el ácido málico y el ácido gálico producen un efecto de inhibición sobre la contractilidad del íleon.

## 6. Conclusiones

El estudio químico biodirigido de las cáscaras-pericarpio del fruto de la especie *P. granatum* L. permitió la obtención y el fraccionamiento de un extracto etanólico con propiedades bioactivas, así mismo, se logró el aislamiento, purificación e identificación de compuestos puros con actividad biológica. Lo cual, representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie.

La presencia de (-)-epicatequina, ácido málico y ácido gálico en el extracto de cáscara-pericarpio de granada produce un efecto inhibitorio de la motilidad intestinal sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

Aunado al efecto producido por la (-)-epicatequina sobre el músculo liso intestinal, la actividad antimicrobiana de este compuesto sobre agentes causales de enfermedades gastrointestinales tales como: *G. lamblia*, *E. histolytica*, *Salmonella* sp. y *E. coli* indica la presencia de compuestos bioactivos en la especie, que pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades infecciosas de tipo diarreico.



## 7. Perspectivas

Los resultados obtenidos indican que el extracto de la cáscara-pericarpio de granada tiene un efecto excitatorio sobre la musculatura lisa intestinal, sin embargo, los compuestos responsables de dicha actividad no han sido aislados, y pueden ser de utilidad en el tratamiento de constipación o intestino perezoso, por ello, el aislamiento, purificación e identificación de estos compuestos puede ser útil en la medicina tradicional.

En este estudio se evaluó el efecto antiespasmódico de la (-)-epicatequina, ácido gálico y ácido málico, pero no fue posible conocer el mecanismo por el cual estos compuestos producen dicha actividad, por lo que, realizar estudios más específicos para elucidar el mecanismo de acción, ayudará al proponer dichos compuestos como fuente de principios activos para el tratamiento de la diarrea.



## 8. Bibliografía

- ✦ Ahmad, I.; Aquil, F.; Owais, M. *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Alemania, 2006; 249-266.
- ✦ Ahmed, R.; Ifzal, S.M.; Saifuddin, A.; and Nazeer, M. Studies on *Punica granatum*. Isolation and identification of some constituents from the seeds of *Punica granatum*. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *8*, 69-71.
- ✦ Ahmet, D.; Ozgen, M.; Dayisoylu, K.; Erbil, N.; Durgac, C. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *Molecules.* **2009**, *14*, 1808-1817.
- ✦ Alanis, A. D.; Calzada, F.; Cervantes, J. A.; Torres, J.; Ceballos, G. M. Antibacterial Properties of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 153-157.
- ✦ Al-Zoreky, N. S. Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *134*, 244-248.
- ✦ Amakura, Y.; Okada, M.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J. Chromatogr., A.* **2000**, *89*, 183-188.
- ✦ Arellano, P.J.; De Castro, S. *Manual de patología general*; Elsevier: España, 2006; 327-330.
- ✦ Argueta, A. *Nueva bibliografía de la medicina tradicional mexicana*; Instituto Nacional Indigenista: México, 1994.
- ✦ Artik, N.; Cemeroglu, B.; Murakami, H.; Mori, T. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by HPLC. *Fruit Process.* **1998**, *8*, 492-499.



- ✿ Astudillo-Vázquez. A.; Mata, R.; Navarrete, A. El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamericana de química*. **2009**, 37, 7-44.
- ✿ Bialonska, D.; Kasimsetty, S. G.; Schrader, K. K.; Ferreira, D. The Effect of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Byproducts and Ellagitannins on the Growth of Human Gut Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 8344-8349.
- ✿ Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México. Revisada el 30 de junio del 2010, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html>
- ✿ Bodeker, G.; Ong, C. K.; Grundy, C.; Burford, G.; Shein, K. *WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine, ilustrada*; World Health Organization: Kobe, 2005; 46.
- ✿ Chauhan, D.; Chsuhan, J.S. Flavonoid diglycoside from *Punica granatum*. *Pharm. Biol.* **2001**, 39, 155-157.
- ✿ Chen, J.; Ho, T.; Chang, Y; Wu, S.; Hsiang, C. Anti-diarrheal effect of *Galla Chinensis* on the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and ganglioside interaction. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 103, 385-391.
- ✿ Choi, J. G.; Kang, O. H.; Lee, Y. S.; Chae, H. S.; Oh, Y. C.; Brice, O. O.; Kim, M. S.; Sohn, D. H.; Kim, H. S.; Park, H.; Shin, D. W.; Rho, J. R.; Kwon, D. Y. *In Vitro* and *In Vivo* Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract Against Salmonella. *eCAM.* **2009**, 1-8.
- ✿ Colegate, S.; Molyneux, R. Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structural determination; CRC Press: EUA, 2008.
- ✿ Curtis, M.J.; Page, C.P.; Sutter, M. *Farmacología Integrada*; Elsevier: España, 1998; 310-313.
- ✿ Das, A. K.; Mandal, S. C.; Banerjee, S. K.; Sinha, S.; Das, J.; Saha, B. P.; Pal, M. Studies on Antidiarrhoeal Activity of *Punica granatum* Seed Extract in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, 68, 205-208.
- ✿ El-Nemr, S.E.; Ismail, I.A.; Rago, M. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Nahrung.* **1990**, 34, 601-610.





- ✿ El-Toumy, S. A.; Marzouk, M. S.; Rauwald, H. W. Ellagi- and Gallotannins From *Punica granatum* Heartwood. *Pharmazie*. **2001**, *56*, 823-824.
- ✿ El-Toumy, S. A.; Rauwald, H. W. Two Ellagitannins From *Punica granatum* Heartwood. *Phytochemistry*. **2002**, *61*, 971-974.
- ✿ García, P., Martos, M.; Fernández, T.; Del barrio, F., Salido, P. *Microbiología clínica práctica*; servicio Publicaciones UCA: España, 1994; 216-246.
- ✿ Haidari, M.; Ali, M.; Ward, C. S., III; Madjid, M. Pomegranate (*Punica granatum*) Purified Polyphenol Extract Inhibits Influenza Virus and Has a Synergistic Effect With Oseltamivir. *Phytomedicine*. **2009**, *16*, 1127-1136.
- ✿ Hernandez, J.; Rojas, J.I.; Castillo, R., Rojas A. y Mata, R. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *J. of Natural Products*. **2004**, *67*, 160-167.
- ✿ Hu, W.; Xie, Q.; Dong, R.; Dong, Y.; and Li, F. Yellow pigment from pomegranate extraction and phytochemical properties. *Shipin Gongye Keji*. **2001**, *22*, 26-30.
- ✿ Hussein, S.A.M.; Barakat, H H.; Mefort, I.; Nawwar, M.A.M. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. **1997**, *45*, 819-823.
- ✿ Inarejos, G. M. *Enfermería Pediátrica*; Elsevier: España, 2004; 235-237.
- ✿ INEGI (2008). Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “Mortalidad general”. Obtenido el 12 de febrero del 2010, de [http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general\\_ver4/MDXQueryDatos.asp](http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general_ver4/MDXQueryDatos.asp)
- ✿ INEGI (2008). Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido”. Obtenido el 12 de febrero del 2010, de <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/B D/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- ✿ Jiménez Del, R. M.; Ramazanov, A.; Sikorski, S.; Ramazanov, Z.; Chkhikvishvili, I. A New Method of Standartization of Health-Promoting





- Pomegranate Fruit (*Punica granatum*) Extract. *Georgian. Med. News.* **2006**, 70-77.
- ✿ Jurenka, J. S. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): a Review. *Altern. Med. Rev.* **2008**, 13, 128-144.
  - ✿ Kong, J.; Goh, N.; Chia, L.; Chia, T. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2003**, 24, 7-21.
  - ✿ Ley General de Salud. Publicada en el Diario Oficial de la Federación publicada en 7 de febrero de 1984.
  - ✿ Lietava, J. Medicinal plants in Middle Paleolithic grave Shanidar IV. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, 35, 263-266.
  - ✿ Linares, D.; Bye, R.; Flores, B. *Plantas Medicinales de México Usos, Remedios y Tradiciones*, Instituto de Biología; UNAM: México, 1999; 155.
  - ✿ Lozoya L. X. *Plantas, Medicina y Poder: Breve Historia de la herbolaria mexicana*, Editorial Pax: México, 1997; 24.
  - ✿ Machado, T. B.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C.; Leal, I. C.; Silva, M. G.; Amaral, A. C.; Kuster, R. M.; Netto-dosSantos, K. R. *In Vitro* Activity of Brazilian Medicinal Plants, Naturally Occurring Naphthoquinones and Their Analogues, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, 21, 279-284.
  - ✿ Machado, T.; Leal, R.L.; Amaral, F.A.; Dos Santos, N.K.; da Silva, G.M.; Kuster, M.R. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 606-610.
  - ✿ Mavlyanov, S.M.; Islam-bevok, S.Y.; Karimdzhanov, A.K.; Ismailov, A.I. Polyphenols of the fruits of some varieties of pomegranate growing in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.* **1997**, 33, 98-99.
  - ✿ Mazzon, E.; Muiá, C.; Di Paola, R.; Genovese, T.; Menegazzi, M.; De Sarro, A.; Suzuki, H.; Cuzzocrea, S. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic. Res.* **2005**, 39, 1017–1025
  - ✿ Mudzhiri, M. S. *Punica granatum* Bark Extract As a Therapeutic Agent in Tapeworm Infection. *Med. Parazitol. Mosk.* **1954**, 4, 311-313.



- ✿ Navindra, P.; Risa, N.; Heber, D. *Pomegranates : ancient roots to modern medicine*; CRC Press: USA, 2006.
- ✿ Nawwar, M.A.M.; Hussein, S.A.M. NMR spectra analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*. **1994**, *36*, 793-798.
- ✿ Nawwar, M.A.M.; Hussein, S.A.M.; Merfort, I. Leaf phenolics of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. **1994**, *37*, 1175-7.
- ✿ NCCAM (2010) National Center for Complementary and Alternative Medicine. Obtenido el 12 de febrero del 2010, de <http://nccam.nih.gov/>
- ✿ OPS (2005). Página de la Organización Panamericana de la Salud, “Base de datos de indicadores básicos en salud de la OPS”. Obtenido el 12 de febrero del 2010, de <http://www.paho.org/Spanish/SHA/coredata/tabulator/newTabulator.htm>
- ✿ Poyrazoglu, E.; Goekmen, V.; Artik, N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates. *Journal of Food composition and Analysis*. **2002**, *15*, 567-575.
- ✿ Sarmakhmatov, R.; Rakhmanberdyeva, R.K.; Rakhumov, D.A. Polysaccharides of fruits of *Punica granatum*. *Chem. Nat. Compd.*, **1999**, *35*, 96-97.
- ✿ Sayed, A. A.; Rauwald, W. H. Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry*. **2002**, *61*, 971-974.
- ✿ Seeram, N. P. Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 627-629.
- ✿ Segura, J. J.; Morales-Ramos, L. H.; Verde-Star, J.; Guerra, D. Growth Inhibition of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* Produced by Pomegranate Root (*Punica granatum* L.). *Arch. Invest Med.* **1990**, *21*, 235-239.
- ✿ Vargas D. *Gastroenterología*; Mc. Graw-Hill Interamericana: México, 1998; 426-440.



-  Velazquez, C.; Calzada, F.; Torres, J.; González F.; Ceballos, G. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *J Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 66-70.
-  Zhang, J.; Zhan, B.; Yao, X.; Gao, Y.; Shong, J. Antiviral activity of tannins from the pericarp of *Punica granatum* L. against herpes genital virus *in vitro*. *Chung-Kuo-Chung-Yao-Tsa-Chih.* **1995**, *20*, 556-558.