



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
COMPUESTOS AISLADOS DE LA CÁSCARA DE
LA GRANADA ROJA
(*PUNICA GRANATUM*) L.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

BLANCA ELBA CRUZ MONDRAGÓN



MEXICO, D.F.

2009



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

1er. suplente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

2do. suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111. Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Cruz Mondragón Blanca Elba

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me proporcionó.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su enseñanza y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dra. Rachel Mata Essayag por la revisión del presente trabajo, cuyos comentarios me ayudaron a mejorarlo.

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

A todos mis compañeros del Laboratorio 111, por su apoyo dentro del mismo.

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207 e IN205709.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE DIAGRAMAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Caries dentales.	4
2.2 Aspectos generales <i>Punica granatum</i> L.	7
2.2.1 Aspectos botánicos.	7
2.2.2 Aspectos etnobotánicos.	8
2.3 Composición química de <i>P. granatum</i> .	11
2.4 Actividades de <i>P. granatum</i> .	12
2.4.1 Actividad antibacteriana.	12
2.4.2 Actividad antifúngica.	14
2.4.3 Actividad Antidiarreica.	16
2.4.4 Actividad antiviral.	16
2.4.5 Otras actividades.	17
2.4.6 Compuestos aislados de <i>P. granatum</i> con actividad biológica.	18
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	26
4. PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1 Procedimientos Generales.	28
4.1.1 Análisis cromatográficos.	28
4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	29

4.2 Material Vegetal.	29
4.3 Ensayo Biológico.	29
4.3.1 Microorganismos de prueba.	29
4.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	30
4.4 Estudio Fitoquímico de la cáscara de <i>P. granatum</i> (granada).	30
4.4.1 Obtención del extracto total de la cáscara de <i>P. granatum</i> .	30
4.4.2 Fraccionamiento primario del extracto de la cáscara de granada.	31
4.4.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII.	31
4.4.3.1 Aislamiento del ácido eláxico (1).	31
4.4.4. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII-P (parte insoluble en acetato de etilo).	33
4.4.5 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII-S (parte soluble en acetato de etilo).	33
4.4.5.1 Aislamiento de la epicatequina.	36
4.4.5.2 Aislamiento del ácido gálico (3).	36
4.4.5.3 Aislamiento del ácido málico (4) a partir de la fracción F4.	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	41
7. PERSPECTIVAS	43
8. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de Etilo
BuOH	Butanol
°C	Grados Celsius
CCA	Cromatografía abierta
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CL50	Concentración Letal Cincuenta
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
g	Gramo
HSV	Virus del Herpes Genital
Hz	Hertz
Kg	Kilogramo
L	Litro
μg	Microgramo

<i>m</i>	Multiplete
M	Molaridad
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
PBS	Buffer de fosfatos
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
SSA	Secretaría de Salud
t	Triplete
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Algunos de los microorganismos aislados de la cavidad oral.	5
2	Distribución, nombres comunes, parte usada y usos de <i>P. granatum</i> .	10
3	Actividades antibacterianas y antimicóticas de los extractos de las diferentes partes de la granada contra diferentes microorganismos.	15
4	Compuestos reportados para la especie <i>P. granatum</i> .	20
5	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	28
6	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-P (Parte insoluble).	33
7	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-S (Parte soluble).	34
8	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-S4 y de la fracción FIII-P2.	34
9	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-SP2.	35
10	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-SP2-VIII.	36
11	Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total y las fracciones de <i>P. granatum</i> contra las bacterias <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	39
12	Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados de <i>P. granatum</i> contra las bacterias <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> .	40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Descripción de <i>P. granatum</i> a) Árbol; b) Hoja; c) Flor; d) Corteza del fruto; e) Fruto; f) Semilla.	8
2	Zonas de uso de <i>P. granatum</i> .	9
3	Estructuras de los compuestos aislados de <i>P. granatum</i> .	37
4	Espectro de RMN- ¹ H del ácido elágico.	44
5	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido elágico.	44
6	Espectro de RMN- ¹ H de la epicatequina.	45
7	Espectro de RMN- ¹³ C de la epicatequina.	45
8	Espectro de RMN- ¹ H del ácido gálico.	46
9	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido gálico.	46
10	Espectro de RMN- ¹ H del ácido málico.	47
11	Espectro de RMN- ¹³ C del ácido málico	47

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama	Contenido	Pág.
1	Proceso de obtención y fraccionamiento del extracto de las cáscaras de <i>P. granatum</i> .	32

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, el hombre, ha utilizado las plantas medicinales como una alternativa para tratar los diversos padecimientos que le aquejan; plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina tradicional, la cual se ha mantenido vigente durante siglos (Mitscher *et al.*, 2000).

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. Uno de los ejemplos más antiguos de escritos sobre plantas medicinales se remonta a tres mil años antes de Cristo en China. Por otra parte, los sumerios, 2,500 años AC, usaban plantas con fines curativos. Otros registros indican que los asirios conocían poco más de 250 plantas con propiedades medicinales. En Grecia Alejandro Magno en sus expediciones por varias partes del mundo introdujo un sinnúmero de plantas con propiedades curativas. Por último, en América, se utilizaban un gran número de especies vegetales con propiedades medicinales antes de la llegada de los conquistadores europeos (Hernández *et al.*, 1981).

Actualmente, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 75 % de la población mundial depende de la herbolaria, ya que además de ser una alternativa para enfrentar las enfermedades cotidianas, representa una forma accesible para el cuidado de la salud.

En el caso particular de México se posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales y su uso se remonta a la época prehispánica, época en que los pueblos indígenas se sabe, tenían estrecha relación con la naturaleza, por lo que la flora jugaba un papel importante en sus costumbres alimenticias, religiosas y sobre todo medicinales. Debido a su orografía y clima, el país cuenta con una flora diversa, dentro de esta flora, se ha estimado que entre 3,000 y 5,000 plantas tienen un potencial terapéutico benéfico y sólo el 1% de estas plantas medicinales ha sido estudiado a fondo considerando estas propiedades medicinales potenciales (Argueta, 1994).

El contar con una amplia variedad de plantas medicinales, crea la necesidad de investigar las posibilidades de empleo de las plantas en la clínica, y tomando en cuenta que las enfermedades de la cavidad oral se encuentran entre las más comunes en México (SSA., 2006), es necesario llevar a cabo mayor investigación sobre plantas con actividad antibacteriana sobre bacterias que se desarrollan en la cavidad oral, por lo que, el objetivo de este trabajo fue obtener compuestos con actividad antimicrobiana sobre bacterias presentes en la placa dentobacteriana (bioplaca), a partir de la cáscara de la especie medicinal *Punica granatum* L. (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, siendo *P. granatum* una de las 100 especies medicinales más comercializadas en México con fines curativos, tanto en centros de acopio de plantas medicinales como en mercados, tianguis y otros expendios drogas crudas y productos herbolarios terminados (Prontuario publicado por Herbolaria Universal 1997; Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2001).

La posibilidad de estudiar compuestos con actividad antimicrobiana de esta especie para la inhibición de bacterias presentes en la placa dentobacteriana, representa un gran avance para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral con productos que hasta ahora no son elegibles por la falta de conocimiento científico.

2. ANTECEDENTES

De acuerdo a la OMS las enfermedades bucodentales, como la caries dental, la periodontitis y los cánceres de la boca y la faringe son un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres. La OMS ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental.

Las enfermedades periodontales (enfermedades de las encías, mandibulares y de los tejidos que soportan los dientes) graves, pueden desembocar en la pérdida de dientes y afectan a un 5-20% de los adultos de edad madura; su incidencia varía según la región geográfica (SSA, 2006).

A pesar de los esfuerzos realizados para disminuir la incidencia de las caries dentales, continúan siendo un problema en la población infantil, la cual si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida. Se considera que la severidad y el costo social de la caries dental en niños es considerable (Villalobos *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Barbosa, 2001), ya que el 60-90% de los escolares de todo el mundo tienen caries dental. Se estima que el tratamiento de las enfermedades de la cavidad oral representa entre el 5 y el 10% del gasto sanitario de los países industrializados, y está por encima de los recursos que se destinan para este fin en los países en desarrollo (SSA, 2006).

En México las enfermedades orales de mayor incidencia y prevalencia son las caries dentales y las enfermedades periodontales, que por su magnitud y trascendencia, representan los principales problemas de salud bucal. De acuerdo con la clasificación internacional de la OMS, México se encuentra entre los países de alto rango de frecuencia en enfermedades bucales, dentro de ellas las caries dentales, que afectan a más del 90% de la población mexicana. Una de las prioridades de programas de salud pública en México es disminuir la incidencia de caries dentales, 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 (Medina *et al.*, 2006).

2.1 Caries Dentales

La OMS define a las caries, 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. Otros autores la definen como una enfermedad multifactorial en la que existe la interacción de cuatro factores principales; el huésped, la microflora, el substrato, y el tiempo (Romo *et al.*, 2004).

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 (Negroni, 2003).

La caries dental es causada por bacterias capaces de producir el ácido suficiente para descalcificar la estructura del diente, éstas forman una comunidad compleja que se adhiere a la superficie del diente en una biopelícula, comúnmente denominada placa dental, que contiene millones de bacterias de diferentes especies (Cuadro 1), destacando el *Streptococcus mutans*, que es el principal agente etiológico de las caries (Castro, 2006). Esta bacteria es un componente crítico porque fermenta los hidratos de carbono para formar ácido láctico, que desgasta los minerales del esmalte del diente y forma una mancha blanca o marrón opaca. El desarrollo de la caries depende de la frecuencia en el consumo de carbohidratos, las características de los alimentos, el tiempo de exposición, eliminación de la placa y la susceptibilidad de la persona (SSA, 2006). Estudios experimentales con animales, estudios observacionales y de intervención en el ser humano han aportado datos que muestran de forma convincente que los azúcares son el principal factor alimentario asociado a la aparición de caries dentales. Pese a su papel indiscutible en la prevención de la caries, el fluoruro no ha logrado

eliminar su aparición, y hay muchas comunidades que no consumen cantidades óptimas de fluoruros. El control del consumo de azúcares, por consiguiente, sigue siendo importante para prevenir las caries. Las investigaciones realizadas han demostrado sistemáticamente que cuando la ingesta de azúcares libres es inferior a 15 kg/persona/año el nivel de caries dental es bajo. Si la infección de la caries en el esmalte no es controlada, puede avanzar para formar una cavidad que se extiende a través del esmalte dental hacia el tejido pulpar. Si en esta etapa no se atiende, puede conducir al absceso, la destrucción del hueso y a la extensión de la infección vía circulación sanguínea (SSA, 2006).

Cuadro 1. Algunos de los microorganismos aislados de la cavidad oral.

Género	Especie
Actinobacillus	<i>A. actinomycetemcomitans</i> **
Actinomyces***	<i>A. adontolyticus</i> *, <i>A. greorgiae</i> , <i>A. gerencsseriae</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> * y <i>A. viscosus</i> .
Bacillus	<i>B. cereus</i>
Bacteroides	<i>B. capillosus</i> y <i>B. forsythus</i> **
Bifidobacterium	<i>B. denticolensi</i> , <i>B. dentium</i> , y <i>B. inopinatum</i> .
Candida	<i>C. albicans</i>
Capnocytophaga	<i>C. gingivalis</i> , <i>C. ocheracea</i> y <i>C. sputigena</i> .
Cardiobacterium	<i>C. hominis</i>
Centipeda	<i>C. periodontii</i>
Clostridium	<i>C. difficile</i> , <i>C. malenominatum</i> , <i>C. ramnosum</i> y <i>C. sporogenes</i> .
Corynebacterium	<i>C. matruchotii</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. saburrenum</i> , <i>E. saphenum</i> y <i>E. yurii</i>
Fusobacterium	<i>F. alosis</i> y <i>F. periodonticum</i>
Haemophilus	<i>H. influenzae</i>
Helcococcus	<i>H. kunzzi</i>
Herpexvirus	Herpes simples
Lactobacillus***	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. uir</i> ,

Cuadro 1. (Continuación)

Género	Especie
Lactococcus	<i>L. gamiae</i> y <i>L. lactis</i>
Leptotrichia ***	<i>L. buccalis</i>
Leuconostoc	<i>L. mesenteroides</i>
Neisseria ***	<i>N. cinerea</i> , <i>N. elongata</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> (excepcional), <i>N. lactamica</i> , <i>N. lavescens</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. paraelongata</i> , <i>N. polysaccharea</i> , <i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</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>
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 (Liébana, 2002).

2.2 Aspectos generales de *Punica granatum* L.

P. granatum pertenece a la familia Punicaceae, la cual está constituida por un sólo género Punica y dos especies originarias del Sureste de Europa y sur de Asia e isla de Socotra. Algunos autores modernos la incluyen dentro de la familia *Lythraceae*. Son plantas, principalmente, productoras de frutos comestibles.

P. granatum es una planta originaria de Irán y Afganistán, es de distribución mundial. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Esta planta es cultivada en huertos familiares (Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En las medicinas alternativas de diversas partes del mundo se le conoce con nombres variados (Cuadro 2). En el caso de México sus nombres comunes son granado, granada y Zay yay (zapoteco) (Jafri *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 1994; Ross, 1999; Martínez, 1979; Espinosa, 1994; House *et al.*, 1995; Morton, 1981).

2.2.1 Aspectos botánicos

El granado es un arbusto pequeño que mide de 3 a 4 metros de alto de madera dura y corteza escamosa, el tronco lo tiene retorcido y es de color grisáceo, tiene muchas ramas delgadas con ramificaciones que generalmente terminan en espina, copa extendida y con mucho ramaje. Las hojas son simples de color verde brillante, lustrosas por el haz y con el borde entero. Nacen opuestas o casi opuestas sobre las ramas o bien agrupadas formando hacecillos, tienen un nectario apical que segrega azúcares (fructosa, glucosa, sucrosa). Las flores son vistosas, robustas, arrugadas, de color escarlata y acampanadas, miden cerca de 3 cm de diámetro, nacen de 1 a 5 flores en la punta de la rama, florecen de mayo a agosto. El fruto al cual se le denomina balaústa (Figura 1), es una baya en forma de globo coronada por un cáliz que 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 de sabor ácido-dulce. En el interior de cada saco se encuentra una semilla triangular, blanquecina de 6 mm de largo. La granada se propaga por semilla o por estaca en

regiones semiáridas a subtropicales (Wickes *et al.*, 1898; Martínez, 1979; Morton, 1981; Espinosa, 1994; House *et al.*, 1995; Rojas, 1999; Ross, 1999).

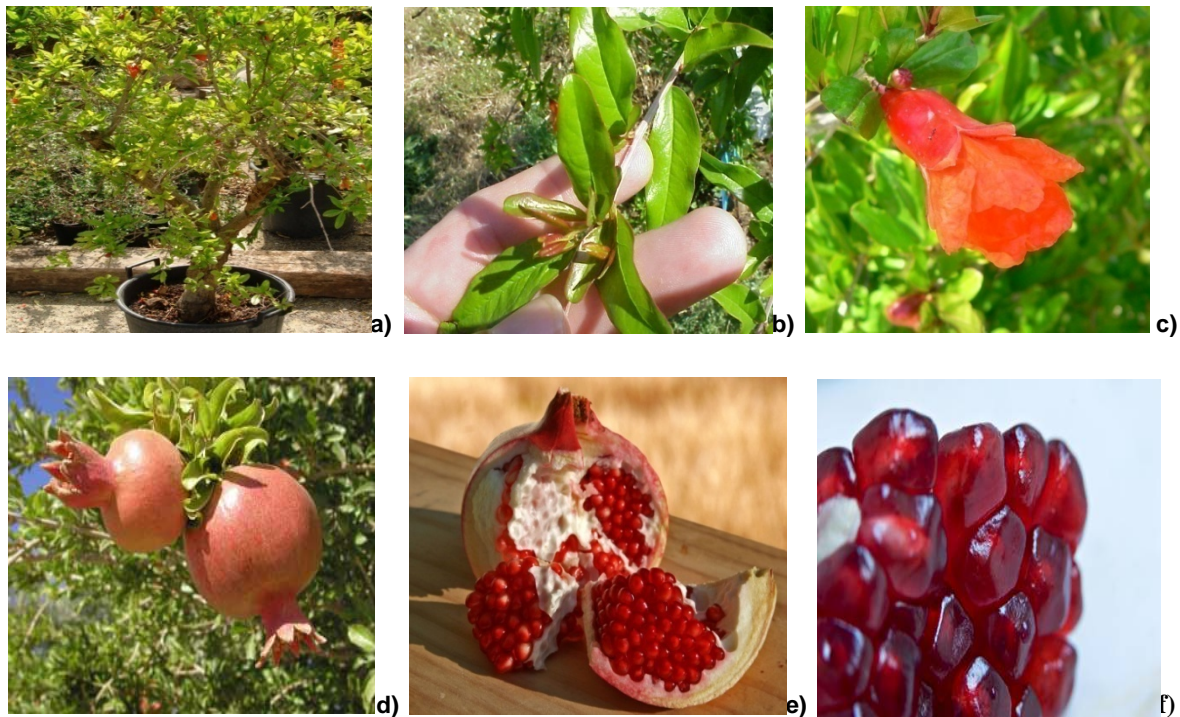


Figura 1. Descripción de *P. granatum*. a) Árbol; b) Hoja; c) Flor; d) Corteza del fruto; e) Fruto; f) Semilla.

2.2.2 Aspectos etnobotánicos

La granada ha sido utilizada durante mucho tiempo como un símbolo de nacimiento, de la vida eterna, y de la muerte. En la antigua cultura egipcia se consideró a la granada como un símbolo de prosperidad y de ambición, por lo que era común decorar los sarcófagos con esta planta, con la esperanza de volver a nacer. En la antigua mitología griega, se le conocía como el "fruto de los muertos". Para los babilonios, las semillas eran símbolo de resurrección, mientras que para los persas significaban invencibilidad en el campo de batalla. En China comían este fruto para bendecir a los recién casados (Reddy, 2004). Según en el "papiro de Ebers" (uno de los escritos médicos más antiguos, alrededor de 1500 AC), la planta fue utilizada por los egipcios como un tratamiento para la tenia y otras infecciones parasitarias (Navindra *et al.*, 2006)

Varias partes de la planta son utilizadas como remedio para tratar numerosas enfermedades en las prácticas médicas tradicionales de todo el mundo (Cuadro 2). En México se relaciona principalmente en el tratamiento de las diarreas, información descrita para el Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sonora, Tabasco y Veracruz y para la disentería en Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala. Por lo general, se ingiere el cocimiento del fruto, cáscara principalmente aunque también se utilizan la hoja, la flor, la corteza y las yemas o cogollos. En Oaxaca lo aplican a manera de lavado rectal (Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

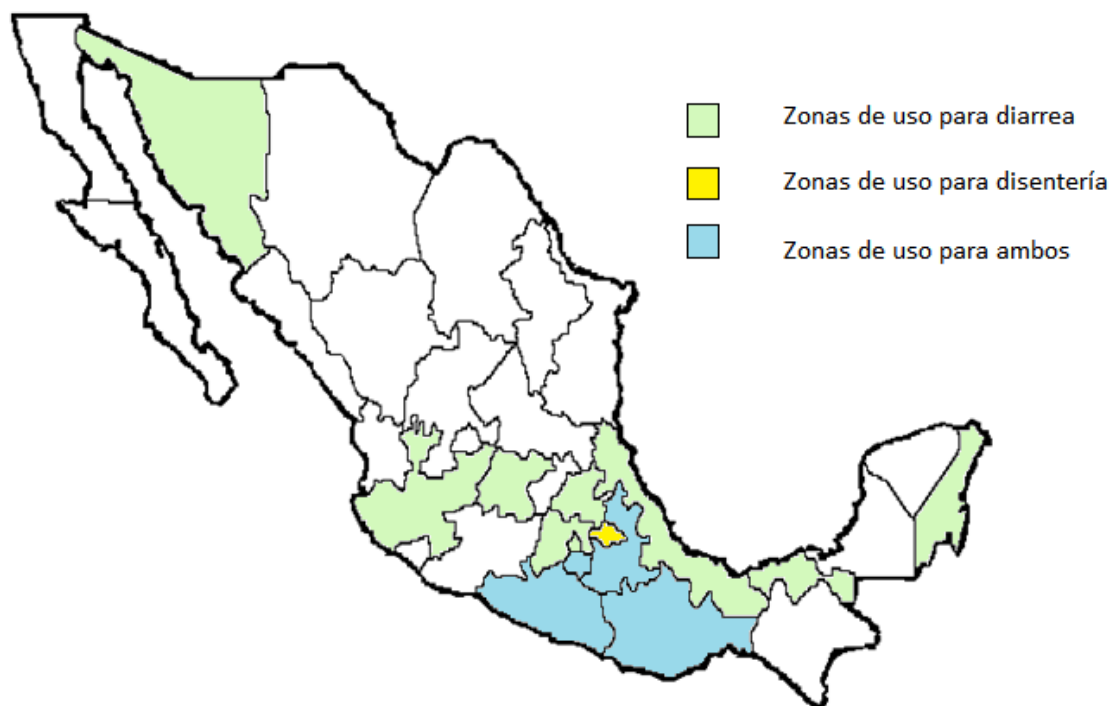


Figura 2. Zonas de uso de *P. granatum* (Argueta, 1994).

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.

Las flores y la cáscara del fruto se usan como astringente, para la diarrea, enfermedades de la boca y diabetes. La corteza es utilizada para disentería, la diarrea, bronquitis, antihelmíntico y para problemas de la bilis (Das *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Distribución, nombres comunes, parte usada y usos de *P. granatum*.

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

2.3 Composición química de *P. granatum*.

La cáscara del fruto contiene mucílagos, lignanos, caroteno, crisantemina, niacina, pectina, ácidos orgánicos (ascórbico, cítrico, málico, oxálico, pantoténico, clorogénico, neoclorogénico y 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) (Wickes *et al.*, 1898; Ross, 1999; Van Elswijk *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2002).

De la corteza de la raíz se han aislado alcaloides (peletierina, metil-peletierina, isopeletierina y pseudopeletierina), taninos (ácido granatotánico y ácido galotánico); un terpeno (ácido ursólico) y un polialcohol (manitol) (Wickes *et al.*, 1898; Rojas, 1999).

La corteza del tronco contiene taninos (ácido galotánico, ácido punicotánico, ácido elágico, ácido gálico, casuarina, casuarinina, pedunculagina, punicacorteina A-D, galoil, punicalagina y punicalina); ácidos orgánicos (ácido betulínico y ácido punícico); un esteroil (β -sitosterol); un flavonoide (higrina); un triterpeno (friedelina); un polialcohol (manitol) y alcaloides (peletierina y derivados) (Lansky *et al.*, 2007).

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) (Roos, 1999; Yehoshua *et al.*, 1999).

Las semillas contienen alcaloides (crisantemina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e icarisido, D); lípidos (octadecatrienoil glicerol, isopentil-3-O-octadeca-2-enoil glicerol); ácidos grasos (octadecenioco, octadecanioco, eicosanioco, araquídico, heneicosanoico, nonanoico, tricosanoico, esteárico, oleico, laúrico, punícico, linoléico y palmítico); esteroides (cumesterol, y daucosterol); esteroides (estradiol, estrona y estriol); 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) (Tanaka *et al.* 1986).

Las flores contienen terpenos (ácido asiático, ácido estíptico y ácido maslínico) y flavonoides (glicósidos de delphinidina, y 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) (Naz *et al.*, 2007).

2.4 Actividades de *P. granatum*.

A la granada se le atribuyen las siguientes propiedades farmacológicas: antihelmínticas, tenífugas, antibacteriales, antivirales, antifúngicas, astringentes, antidiarreicas, antidisentéricas, depurativas, inmunomoduladoras, ateroscleróticas, antiparasitarias, enfermedades periodontales, antitusivas, antipiréticas, anticancerígenas, antidiabéticas y antifertilidad (Yehoshua *et al.*, 1999; Hosseind *et al.*, 2007). De hecho, Machado y colaboradores (2003) han documentado ampliamente su uso para tratar la diarrea, disentería, y para matar las lombrices intestinales. Esto ha causado el interés de investigar a fondo otras propiedades medicinales como las antimicrobianas.

2.4.1 Actividad antibacteriana

En la literatura existen reportes que demuestran la actividad antibacteriana de *P. granatum*. La planta completa posee una alta efectividad contra *Escherichia coli* O157:H7 (Voravuthikunchai *et al.*, 2004). El extracto de la granada inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y a su enterotoxina. En cuanto al jugo de la granada, éste tiene gran actividad inhibitoria contra, *S. aureus* resistente a meticilina, *S. epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae*; además evita la adherencia de *Streptococcus mutans* y otros microorganismos en la cavidad oral (Kirilenko *et al.*, 1978). Las semillas de la granada tienen actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (De *et al.*, 1999). En un estudio, se reportó que el zumo de granada tiene acción

antibacteriana variada ya que depende de la variedad del contenido de compuestos fenólicos, pigmentos, y ácido cítrico (Kirilenko *et al.*, 1978).

Se ha encontrado en diferentes estudios, que la cáscara del fruto inhibe diversos microorganismos como; *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio Cholerae*, *S.aureus*, *Candida krusei* y *C. tropicales* (Holetzet *et al.*, 2002; Jafri *et al.*, 2000).

El extracto metanólico de la cáscara del fruto resultó ser el más eficaz contra *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, y *S. typhi* (Prashanth *et al.*, 2001).

El extracto metanólico del pericarpio de la fruta de la granada tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Navarro *et al.*, 1996).

Algunos autores infieren que la presencia de elagitaninos, galotaninos (El-Toumy *et al.*, 2001) y alcaloides (Ferrara *et al.*, 1989), en la granada podrían ser los responsables de la actividad antimicrobiana.

Por otra parte, el extracto etanólico del pericarpio fue sometido a un proceso de partición sucesivo con hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol, en el que se encontró que la fracción más activa resultó ser la fracción de acetato de etilo, la cual fue sometida a cromatografía y de la cual fue purificada la punicalagina con otros compuestos como ácido elágico. La punicalagina es un compuesto que también ha sido aislado de la cáscara de la granada y el cual ha mostrado tener actividad antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* tipo humano ATCC (Jayaprakasha *et al.*, 2003). También se encontró que tenía actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa*, y contra seis cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (Machado *et al.*, 2003).

La granada no sólo se ha utilizado para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas que afecten directamente al hombre, sino también se ha utilizado para el control de las enfermedades bacterianas de las plantas, ya que se ha

encontrado que los extractos etanólicos frescos, así como la piel seca de la granada, son eficaces inhibiendo el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, el cual provoca que se marchiten los jitomates en las cosechas (Vudhivanich, 2003)

Actividades antimicrobianas de extractos de las diferentes partes de la granada se presentan en el Cuadro 3.

2.4.2 Actividad antifúngica

En un estudio se encontró que la cáscara de la granada tiene actividad fungistática, la cual varió según el microorganismo de prueba; *Penicillium citrinum* inhibió el crecimiento en ocho días, *P. patulum* durante cuatro días, y *P. roquefortii* y *Aspergillus ochraceus* durante tres días. Sin embargo, no hubo ningún efecto sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Cuadro 3).

Estudios *in vitro* han revelado que el extracto de granada inhibe el crecimiento de bacterias bucales e inhibe diferentes especies de *Candida*, resultando ser efectivo en el 75 % de pacientes con estomatitis asociada a *C. albicans* (Machado *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2005), también presenta actividad inhibitoria contra cepas de *A. niger* resistentes a penicilina G. La parte dura y esponjosa de la fruta de la granada, incluidos los zumos frescos y esterilizados, son eficaces contra *C. micoderma* (Kirilenko *et al.*, 1978). Por último, las semillas tienen actividad antimicrobiana contra *S. cerevisiae* (De *et al.*, 1999).

Cuadro 3. Actividades antibacterianas y antimicóticas de extractos de diferentes partes de la granada contra diferentes microorganismos.

Partes de la Fruta	Disolvente usado para la extracción/Compuesto	Microorganismo de prueba	Referencia
Cáscara	-	<i>Salmonella typhi</i> y <i>Vibrio cholerae</i>	(Perez, 1994; Guevara, 1994)
	Etanol/Punicalina	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Machado <i>et al.</i> , 2002)
	MeOH	<i>S. aureus</i> , <i>Eschericia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , y <i>Candida albicans</i>	(Navarro <i>et al.</i> , 1996)
	Hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, butanol, agua/Punicalagina	Seis cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a metilicina	(Machado <i>et al.</i> , 2003)
Fruto	MeOH <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	(Gracious, 2001)
	—	<i>C. micoderma</i>	(Kirilenko <i>et al.</i> , 1978)
	MeOH, extracto acuoso	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> O26:H11, <i>E. coli</i> O111:NM, <i>E. coli</i> O22	(Voravuthikunchai <i>et al.</i> , 2004)
	Etanol	<i>S. aureus</i>	(Holetzet, 2002)
	Éter de Petróleo, cloroformo, MeOH, y agua	<i>S. aureus</i> MTCC 737, <i>E. coli</i> MTCC723, <i>Klebsiella pneumoniae</i> MTCC 109, <i>Proteus vulgaris</i> MTCC 1771, <i>B. subtilis</i> MTCC 441, <i>S. typhi</i> MTCC 537	(Prashanth, 2001)
	Etanol	<i>C. albicans</i>	(Ahmed, 2001)
Jugo	-	Actividad antibacteriana	(Kirilenko <i>et al.</i> , 1978)
Pericarpio	Punicalagina	<i>M. tuberculosis</i>	(Asres <i>et al.</i> , 2001)
	Acetato de etilo, acetona, MeOH, agua	<i>B. cereus</i> , <i>B. coagulens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , y <i>P. aeruginosa</i>	(Negi, 2003; Burapadaja, 1995)
	Punicalagina	<i>C. albicans</i>	(Burapadaja, 1995)
	MeOH, extracto acuoso	<i>S. typhi</i> (MTCC 531, B 330)	(Rani, 2004)
	Etanol	<i>Ralstonia solanacearum</i>	(Vudhivanich, 2003)
Semillas	-	<i>P. citrinum</i> , <i>P. patulum</i> ; <i>P. roquefortii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. flavus</i> , and <i>A. parasiticus</i>	(Azzouz, 1982)
	Extracto acuoso	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(De <i>et al.</i> , 1999)

2.4.3 Actividad Antidiarreica

La utilidad de la granada para el tratamiento de la diarrea ha sido reportada, estudios previos demuestran la eficacia del extracto metanólico de las semillas, como un agente antidiarreico en ratones. Se ha sugerido que el extracto de granada reduce la diarrea por la inhibición de la motilidad gastrointestinal (Navindra *et al.*, 2006).

Otros estudios evaluaron la actividad biológica de alcaloides y taninos extraídos de las raíces de la granada, usando como microorganismo de prueba a *Entamoeba histolytica* y *E. invadens*. Los resultados de estos estudios indican que 2 mL del extracto producían inhibiciones de crecimiento de estas bacterias en un orden de 100 y 40%, respectivamente. Por otra parte, los alcaloides en concentraciones de 1 mg / mL no tenían actividad amoebicida (Segura *et al.*, 1990).

2.4.4 Actividad antiviral.

Estudios realizados utilizando el extracto etanólico de las hojas de granada demostraron su efecto inhibitorio sobre la replicación del virus *Autographa California* de la poliedrosis nuclear (Erturk *et al.*, 2000).

Otros estudios realizados con la finalidad de demostrar la actividad antiviral de los extractos de granada, presentaron actividad contra un gran número de virus, destacando los virus HSV-1, HSV-2 (virus del herpes genital), RV, virus de la influenza, el VIH, la poliomielitis, y el virus de la poliedrosis (Lee *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1995; Stewart, 1998; Erturk, 2000). La actividad antiviral descrita para el extracto de granada se debe a la presencia de taninos, a los cuales se les ha demostrado actividad inhibitoria de la replicación viral.

2.4.5 Otras actividades.

El uso más frecuente de la granada en todo el mundo es como vermífugo o tenífugo (Zhicen, 1987; Kapoor, 1990). Entre otras actividades, la cáscara del fruto se utiliza para controlar fiebres intermitentes y su extracto presenta actividad antiparasitaria contra *Giardia*. Tiene actividad potencial moluscida contra *Lymnaea acuminata*, vector de *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*, agentes etiológicos de la fascioliasis endémica del ganado (Tripathi *et al.*, 2000; 2001). Por otra parte, el extracto etanólico presenta actividad moderada contra *Ascaris lumbricoides* (Raj, 1975). Por otra parte, un estudio utilizando el extracto acuoso de la corteza de granada demostró buena actividad para matar lombrices de tierra y gusanos redondos (Schubert *et al.*, 1999).

El extracto metanólico de la granada inhibe a la enzima α -amilasa, y en ratas hembra el extracto metanólico acuoso, inhibe la fertilidad de un 70 a 90% (Prashath *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 1985); mientras que a una dosis de 100 mg/Kg estimula el sistema inmune en conejos, tiene actividad astringente (Holetzet *et al.*, 2002; Jafri *et al.*, 2000); disminuye úlceras gástricas en un 74%. Por otra parte se demostró en ratas un efecto cicatrizante a dosis de 500 mg/Kg y un efecto protector a dosis de 50 mg/kg, también mostró actividad antioxidante (Prashanth *et al.*, 2001; Wickes *et al.*, 1898; Ajaikumar *et al.*, 2005; Murthy *et al.*, 2004; Chindambara *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002). Los extractos acetónico y clorofórmico mostraron actividad larvicida contra *Chrysomya aliceps* (Moorsy *et al.*, 1998).

El jugo de *P. granatum* contiene una alta proporción de minerales y compuestos polifenólicos (galocatequinas, cinidinas y pelargonidinas) los cuales se sabe tienen usos terapéuticos. El jugo y la cáscara de la granada proporcionan protección contra la hepatotoxicidad y tumores. Reduce la presión sistólica en 21% de pacientes con aterosclerosis, disminuye las lipoproteínas de baja densidad (LDL); también disminuye el 47 % de la formación de lesiones cancerosas (Aviran *et al.*, 2002; 2004; Cerda *et al.*, 2004; Seeran *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002) También muestra un fuerte poder antioxidante de los lípidos, evita la oxidación de

las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (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 colagenasa, por esta razón ha sido utilizada con éxito en la cosmetología. Se ha encontrado que en el jugo fermentado de la granada y el aceite de las semillas frías a presión provocan una inhibición significativa de la vía de los eicosanoides sobre la enzima ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Schubert *et al.*, 1999).

El extracto de la corteza del fruto inhibe la proliferación de células de leucemia promielocítica de humano HL-60; en ratas disminuye el 76 % de las lesiones gástricas inducidas con etanol, reduce los síntomas de periodontitis crónica disminuyendo la capa dentobacteriana (Kawaii *et al.*, 2004; Garzouli *et al.*, 1999; Sastravaha *et al.*, 2003; Vida *et al.*, 2003). Se le demostró actividad antioxidante a 50 ppm, actividad captadora de radical hidroxilo y oxidación de la lipoproteína de baja densidad a 100 ppm (Chindambara *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002).

El extracto de las semillas en ratas diabéticas reduce en un 52 % los niveles de la glucosa a dosis de 300 mg/Kg. Las flores reducen los niveles de glucosa en sangre en rata (Das *et al.*, 2001; Mori-Okamoto *et al.*, 2004; Jafri *et al.*, 2000; Gracious *et al.*, 2001). El aceite de las semillas en ratas macho, inhibe hasta en un 56% los tumores de colon a dosis de 100 µg/ml (Kohho, 2004).

El extracto de acetona (90%) del pericarpio de la granada causó una inhibición significativa de deshidrogenasa carbónica (Ross, 1999).

2.4.6 Compuestos aislados de *P. granatum* con actividad biológica.

En la mayoría de las plantas investigadas se han encontrado fenoles y taninos como los constituyentes activos más comunes (Tanaka *et al.*, 1991). Los principales componentes en el extracto de los frutos de la granada son taninos o polifenoles (Haslam, 1996).

En un estudio hecho por Rani y colaboradores (2004) han sugerido que la actividad antimicrobiana de granada se debió a la presencia de elagitaninos, galotaninos, y alcaloides.

Se ha reportado que de todos los extractos, la fracción metanólica del pericarpio de la granada, resultó ser la más eficaz contra los microorganismos, la cual fue sometida a la prueba de detección de alcaloides y taninos la cual dio positivo (Prashanth *et al.*, 2001). Se ha sugerido que compuestos como los taninos son responsables de la actividad antibacteriana en la granada (Machado *et al.*, 2003), ya que la granada es rica en éstos (Hussein *et al.*, 1997) y su actividad antimicrobiana, está bien establecida (Scalbert, 1991). Parece que tanto los taninos y alcaloides actúan sinérgicamente contra los microorganismos.

En el caso de su actividad como antifúngico, el mecanismo específico de acción de los taninos contra *Candida* no es clara, aunque se sugiere que los taninos pueden actuar sobre la membrana de la célula ya que estos compuestos pueden precipitar proteínas (Branting, 1989). Los taninos también inhiben muchas enzimas como glicosiltransferasas de *S. mutans* que afecta a la capacidad de atacar a la superficie dental (Kakiuchi *et al.*, 1986). La adhesión de *Candida* en las superficies de acrílico está probablemente relacionada a la presencia de *S. mutans* (Branting, 1989). Los polifenoles interfieren en proteínas salivales y algunas enzimas de bacterias orales. Además, pueden afectar y alterar las membranas bacterianas y la coagregación bacteriana.

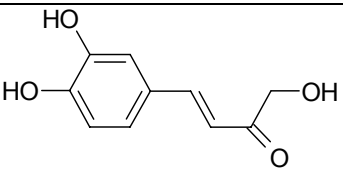
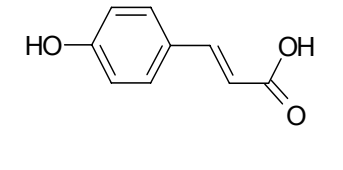
Los extractos de granada mostraron actividad antiviral contra un gran número de virus, y se ha demostrado que la actividad antiviral de sus extractos posiblemente se atribuya a los taninos (Li *et al.*, 2004).

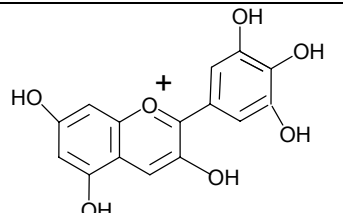
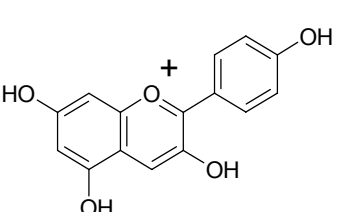
Cuadro 4. Compuestos reportados para la especie *P. granatum*.

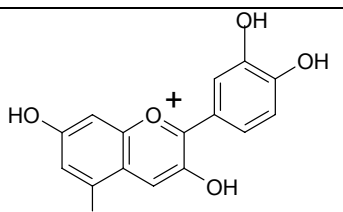
Ácidos orgánicos		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Ácido cítrico	(Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002)
	Ácido málico	(Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002)
	Ácido tartárico	(Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002)
	Ácido fumárico	(Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002)

Ácidos hidroxibenzoicos		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Ácido elágico	(Amakura <i>et al.</i> , 2000)
	Ácido gálico	(Amakura <i>et al.</i> , 2000)

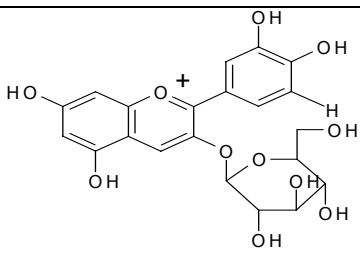
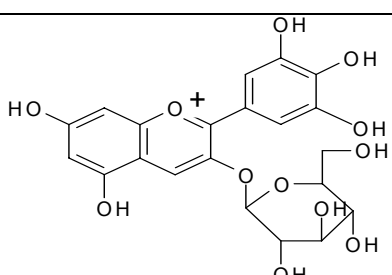
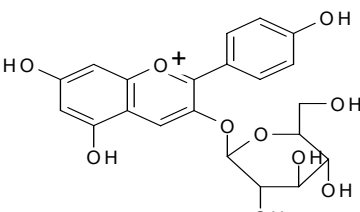
Cuadro 4. (Continuación)

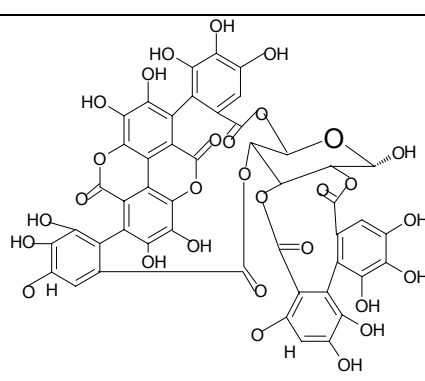
Ácidos hidroxicinámicos		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Ácido caféico	(Artik, 1998; Amakura <i>et al.</i> , 2000)
	Ácido <i>p</i> -cumárico	(Artik, 1998; Amakura <i>et al.</i> , 2000)

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

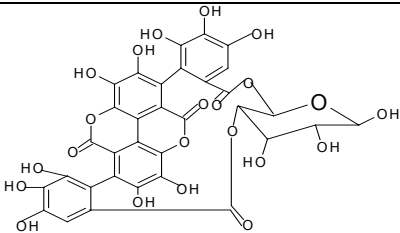
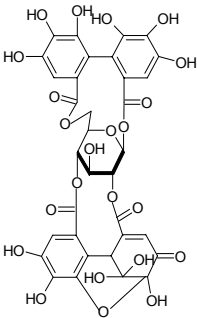
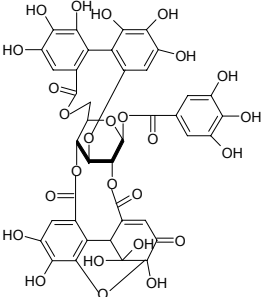
Antocianidinas		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Cianidina	(Noda <i>et al.</i> , 2002)

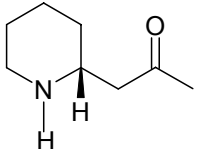
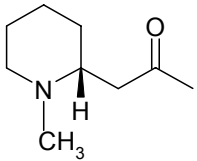
Cuadro 4. (Continuación)

Antocianinas		
Estructura	Nombre químico	Referencia
 <p>The structure shows a cyanidin cation (a flavylium ion with a positive charge on the oxygen atom) linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose ring has hydroxyl groups at the 2, 3, 4, and 6 positions.</p>	Cianidina-3-O-glucósido	(Hernández <i>et al.</i> , 1991)
 <p>The structure shows a delphinidin cation (a flavylium ion with a positive charge on the oxygen atom) linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose ring has hydroxyl groups at the 2, 3, 4, and 6 positions.</p>	Delfinidina-3-O-glucósido	(Hernández <i>et al.</i> , 1991)
 <p>The structure shows a pelargonidin cation (a flavylium ion with a positive charge on the oxygen atom) linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose ring has hydroxyl groups at the 2, 3, 4, and 6 positions.</p>	Pelargonidina-3-O-glucósido	(Hernández <i>et al.</i> , 1991)

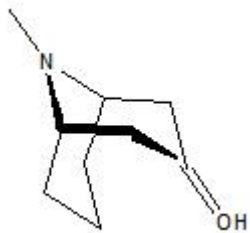
Elagitaninos		
Estructura	Nombre químico	Referencia
 <p>The structure shows a complex polyphenolic molecule consisting of a central flavan-3-ol core (epigallocatechin gallate) linked to a gallic acid moiety. It features multiple hydroxyl groups and a complex network of ester and ether linkages.</p>	Punicalagina	(Tanaka <i>et al.</i> , 1986; Gil <i>et al.</i> , 2000)

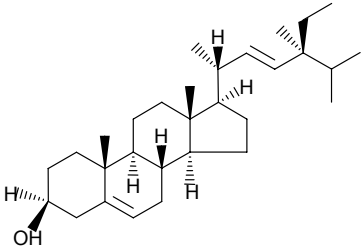
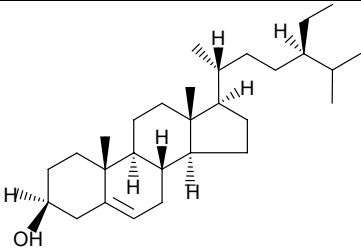
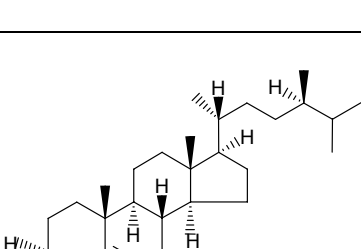
Cuadro 4. (Continuación)

Elagitaninos		
Estructura	Nombre químico	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)

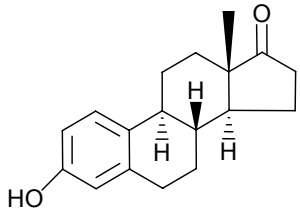
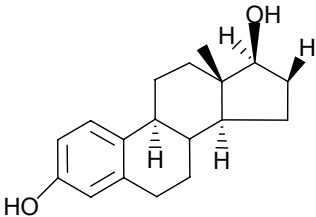
Alcaloides		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Peletierina	(Neuhofer <i>et al.</i> , 1993; Vidal <i>et al.</i> , 2003)
	Metilpeletierina	(Neuhofer <i>et al.</i> , 1993; Vidal <i>et al.</i> , 2003)

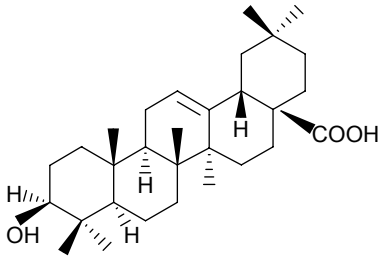
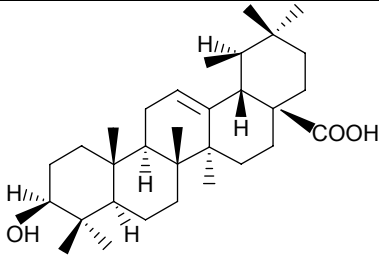
Cuadro 4. (Continuación)

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

Esteroles		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Estigmasterol	(Abd El Wahab <i>et al.</i> , 1998)
	β -sitoesterol	(Abd El Wahab <i>et al.</i> , 1998)
	Cumesterol	(Abd El Wahab <i>et al.</i> , 1998)

Cuadro 4. (Continuación)

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

Triterpenos		
Estructura	Nombre químico	Referencia
	Ácido oleanólico	(Lansky <i>et al.</i> , 2007).
	Ácido ursólico	(Lansky <i>et al.</i> , 2007).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Un aumento en el número de bacterias resistentes a los antibióticos, la falta de selectividad, la toxicidad y efectos adversos de los antibióticos utilizados con mayor frecuencia es una de las causas para estudiar la eficacia de los remedios naturales en la lucha contra los patógenos, además de que el uso de remedios naturales es idóneo debido a su menor costo.

Las investigaciones se han enfocado principalmente en el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas sistémicas mientras que menor atención se ha puesto 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.

Se ha reportado que los extractos o compuestos purificados a partir de las distintas partes de *P. granatum* (granada) tienen un gran potencial para el tratamiento terapéutico, a pesar de que no han sido completamente investigados.

Por lo anterior, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo primordial evaluar el efecto de extractos y compuestos puros aislados de la cáscara de *P. granatum* sobre las bacterias cariogénicas *S. mutans* y *P. gingivalis*.

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

1. Realizar el estudio químico biodirigido a la cáscara de *P. granatum* para el aislamiento y purificación de compuestos con actividad antibacteriana.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la especie contra patógenos orales (*S. mutans* y *P. gingivalis*).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos Generales.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) analítica y preparativa se realizaron, de acuerdo a las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diferentes dimensiones, recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm y 1 mm de espesor, respectivamente. La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con diferentes agentes cromógenos (vainillina sulfúrica al 5% y anisaldehído sulfúrico) cuya composición se muestra en el siguiente cuadro, seguido de calentamiento (110°C aprox.) hasta la visualización de los compuestos.

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Vainillina Sulfúrica 5%	1g de vainillina 1 mL HCl 100 de metanol	(Stahl, 1969)
Anisaldehído Sulfúrico	1 mL de Anisaldehído 2 mL de H ₂ SO ₄ En 100 mL de ácido acético glacial	(Colin, 2003)

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, o bien con Sephadex LH-20, empacado en columna de vidrio (5 x 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución.

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 de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H 400 MHz) y de carbono 13 (RMN¹³C, 100 MHz) se generaron en el equipo Varian modelo VNMRs, utilizando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano como referencia para los desplazamientos químicos expresados en ppm. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB).

4.2 Material Vegetal.

El Material vegetal utilizado en el presente estudio fue obtenido en el Mercado de la Merced en la Ciudad de México en el mes de Septiembre de 2008.

4.3. Ensayo Biológico.

4.3.1. Microorganismos de prueba.

Para determinar la actividad antibacteriana del extracto total, fracciones y compuestos aislados de *P. granatum* se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10499) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) por tratarse de los principales patógenos orales causantes de la caries dental y enfermedades periodontales. Para el desarrollo de *S. mutans* se utilizó caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) como medio de cultivo, incubando a 37°C bajo condiciones aerobias. Para desarrollar a *P. gingivalis* el medio de cultivo utilizado fue soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%), incubando a 37°C bajo condiciones anaerobias mediante un sistema de

recipientes de GasPack EZ (BD) conteniendo un sobre activado para la generación de CO₂ (GasPack EZ CO₂).

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

La actividad antibacteriana se expresó en términos de concentración mínima inhibitoria y se determinó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos. Los cultivos de cada microorganismo se incubaron por una noche, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos, se lavó 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS pH 6.8) y se resuspendieron con la misma solución. La suspensión celular se ajustó con un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy) de forma que cada pozo contuviera 5x10⁵ UFC/mL para *S. mutans* ó 5x10⁶ UFC/mL para *P. gingivalis*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Cada muestra se ensayó por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C bajo las condiciones correspondientes, determinando el crecimiento espectroscópicamente (A₆₆₀) después de 24 y 48 horas con una lectora de placas de 96 pozos.

Como control negativo se utilizó el medio de cultivo inoculado, mientras que el blanco fue el medio de cultivo sin inocular. El control positivo fue el medio de cultivo inoculado con gluconato de clorhexidina.

El valor de CMI para cada microorganismo se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 A₆₆₀ nm.

4.4 Estudio fitoquímico de la cáscara de *P. granatum* (granada).

4.4.1 Obtención del extracto total de la cáscara de *P. granatum*.

Se maceraron 1.21 kg de la cáscara de granada con 1.5 L de metanol durante un día, posteriormente el extracto se filtró y se concentró al vacío; obteniendo un extracto de color amarillo.

4.4.2 Fraccionamiento primario del extracto de la cáscara de granada.

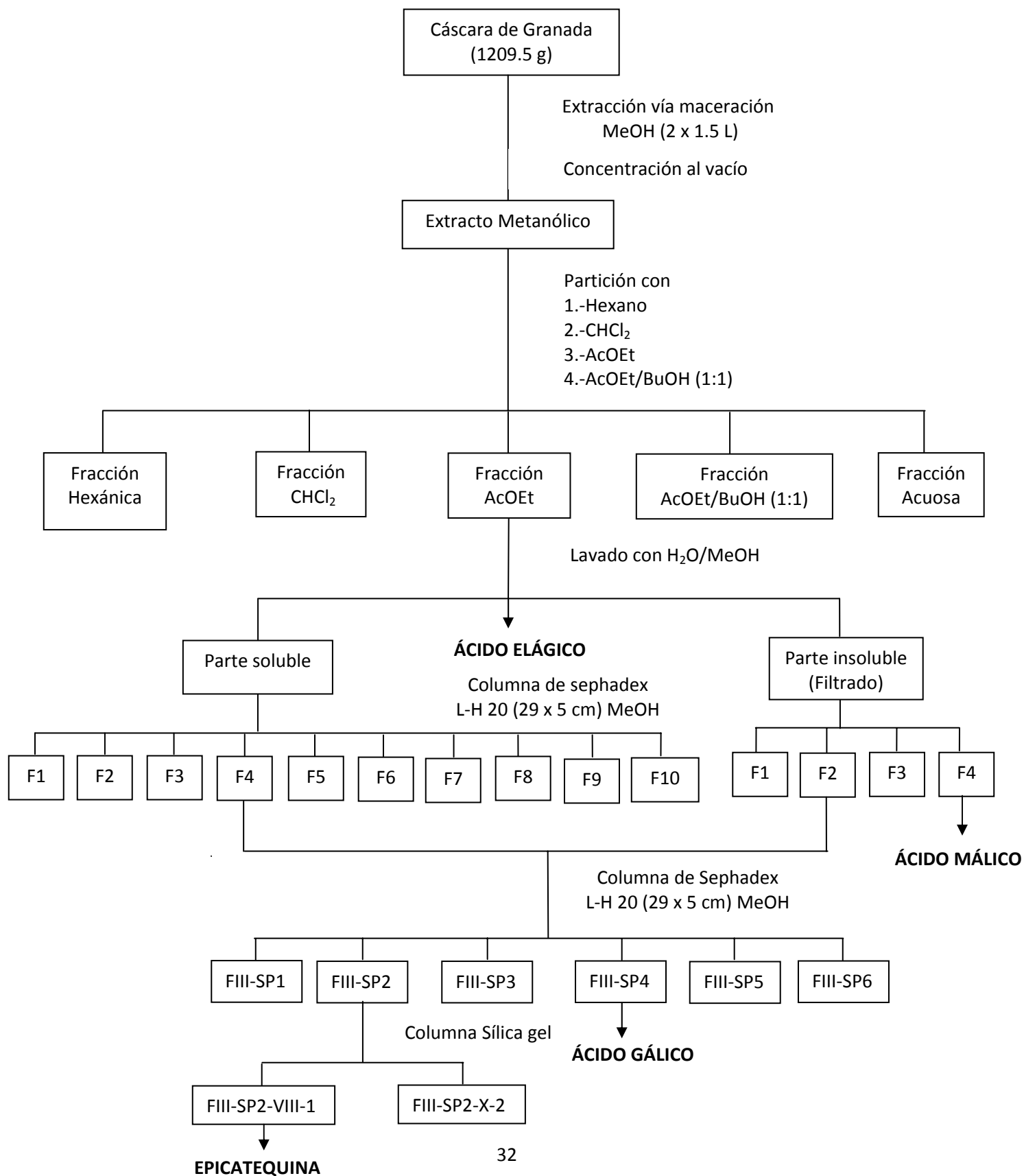
Dicho extracto se sometió a un proceso de fraccionamiento primario mediante un proceso de partición. El proceso se realizó utilizando como disolvente hexano, CH₂Cl₂, acetato de etilo y una mezcla de acetato de etilo/butanol (1:1), sucesivamente. Obteniendo 4 fracciones (Fracción hexánica (FI), Fracción de CH₂Cl₂ (FII), Fracción de acetato de etilo (FIII), Fracción de acetato de etilo/butanol (1:1) (FIV)) y Fracción acuosa (FV). El Diagrama 1 resume el proceso de fraccionamiento del extracto de *P. granatum*.

4.4.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII.

4.4.3.1 Aislamiento del ácido elágico (1).

En la fracción primaria FIII (fracción de acetato de etilo), precipitó de manera espontánea un sólido, el cual se separó por filtración, posteriormente se lavó con una mezcla de agua/metanol y se filtró al vacío obteniendo un sólido de color amarillo claro (16 mg). RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 7.45 (s, H-4, H-9), 3.34 (2, 3, 7, 8-OH); RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (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).

Diagrama1. Proceso de obtención y fraccionamiento del extracto de las cáscaras de *P. granatum*.



4.4.4. Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII-P (parte insoluble en acetato de etilo).

El filtrado de la parte insoluble, se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna abierta de Sephadex LH-20 (5 × 35 cm), utilizando metanol como eluyente. Se obtuvieron un total de 20 fracciones (50 ml) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para obtener cuatro conjuntos de fracciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-P (parte insoluble).

Sistema de Elución	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Metanol	1-2	1	FIII-P1
	3-4	2	FIII-P2
	4-6	3	
	7-8	4	
	9-10	5	FIII-P3
	11-20	6	FIII-P4

4.4.5 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FIII-S (parte soluble en acetato de etilo).

La porción soluble en acetato de etilo de la FIII (Fracción III-S) se fraccionó utilizando una estrategia similar a la descrita en el inciso 4.4.4 para la fracción insoluble FIII-P. Como resultado del proceso se obtuvieron 10 fracciones combinadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-S (Parte soluble).

Sistema de Elución	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Metanol	1	1	FIIIS-1
	2	2	FIIIS-2
	3	3	FIIIS-3
	4	4	FIIIS-4
	5	5	
	6	6	
	7-8	7	
	9-10	8	FIIIS-5
	11-13	9	FIIIS-6
	14-15	10	FIIIS-7
	16-18	11	FIIIS-8
	19-20	12	FIIIS-9
	21-25	13	FIIIS-10

Las fracciones FIII-S4 y FIII-P2 resultaron cromatográficamente similares, se reunieron. La fracción combinada se sometió a un fraccionamiento terciario sobre Sephadex LH-20 (5 × 35 cm), utilizando metanol como eluyente. Este proceso permitió el aislamiento de la (-)-epicatequina (**2**) y cantidades adicionales del ácido gálico (**3**).

Cuadro 8. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-S4 y de la fracción FIII-P2.

Sistema de Elución	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Metanol	1	1	FIII-SP1
	2-3	2	FIII-SP2*
	4	3	FIII-SP3
	5	4	FIII-SP4
	6	5	FIII-SP5
	7	6	FIII-SP6

De estas fracciones, la fracción FIII-SP2 fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria 100 g de gel de sílice y como fase móvil CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH y MeOH en diversas proporciones (Ver Cuadro). Se colectaron 116 fracciones, que mediante el revelado con vainillina sulfúrica al

1% de las placas se juntaron por su similitud cromatográfica y se obtuvieron 15 fracciones en total.

Cuadro 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-SP2.

Sistema de Elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	100	1-8	1-12	FIII-SP2-I
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	9-16	13-16	FIII-SP2-II
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	17-30	17 18 19 20-21 22-24 25-31	FIII-SP2-III FIII-SP2-IV FIII-SP2-V FIII-SP2-VI FIII-SP2-VII FIII-SP2-VIII*
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	85:15	31-42	32-33 34-46	FIII-SP2-IX FIII-SP2-X
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	43-50	47-65	FIII-SP2-XI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	51-62		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	65:35	63-64		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	60:40	65-72	66-68 69-82	FIII-SP2-XI FIII-SP2-XII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	73-80	83	FIII-SP2-XIII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	45:55	81-84		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	40:60	85-88	84-116	FIII-SP2-XIV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	35:65	89-92		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	30:70	93-96		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	25:75	97-100		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	20:80	101-104		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	15:85	105-108		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	10:90	109-112		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0:100	112-116		

La fracción FIII-SP2-VIII, se sometió a sucesivas cromatografías utilizando gel de sílice como adsorbente, obteniendo 47 fracciones. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniendo en total 4 fracciones.

Cuadro 10. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FIII-SP2-VIII.

Sistema de Elución/Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Cl ₂ CH ₂ / MeOH (8:2)	1-8	1	FIII-SP2-VIII-1
	9-17	2	FIII-SP2-VIII-2
	18-32	3	FIII-SP2-VIII-3
	33-47	4	FIII-SP2-VIII-4

4.4.5.1 Aislamiento de la epicatequina (2).

La fracción FIII-SP2-VIII-1 se sometió a un proceso de cromatografía en capa fina preparativa de sílica gel, para la cual se utilizó como fase móvil AcOEt:CH₃COOH:HCOOH:H₂O (11:1.1:1.1:2.7). Como resultado se logró la separación de una banda la cual se raspó y se colocó en un matraz con mezcla de CH₂Cl₂ / MeOH (1:1), se dejó reposar por un día. Posteriormente se filtró al vacío, para separar la sílica gel del compuesto y el filtrado fue concentrado al vacío. El compuesto se identificó como epicatequina. RMN-¹H (400 MHz, MeOH-*d*₆) δ (ppm): δ 4.81 (s, H-2); 4.17 (m, H-13); 5.95 (d, *J*= 2.4, H-6); 5.92 (d, *J*= 2.4, H-8); 6.98 (d, *J*= 2.0 H-2'); 6.76 (d, *J*= 8.0, H-5'); 6.81 (dd, *J*= 8.0, 2.0, H-6'), H-4α (*J*= 16.4, 3.6), H-4β (*J*= 16.4,3.6). RMN-¹³C (100 MHz, MeOH-*d*₆) δ (ppm): 156.56 (C-7), 156.22 (C-9), 155.93 (C-5), 144.50 (C-3'), 144.34 (C-4'), 130.85 (C-1'), 117.98 (C-2'), 114.47 (C-6'), 113.89 (C-5'), 98.66 (C-10), 94.97 (C-6), 78.45 (C-3), 78.43 (C-3), 66.06 (C-2), 27.83 (C-4).

4.4.5.2 Aislamiento de ácido gálico (3).

De la fracción FIII-SP2-VIII-4 precipitó de manera espontánea un sólido que fue identificado como el ácido gálico por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura: RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): δ 9.18 (s, 1-COOH), 6.90 (s, H-3, H-7), 3.40 (4, 5, 6-OH). RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (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).

4.4.5.3 Aislamiento del ácido málico (4) a partir de la fracción F4.

El compuesto **4** precipitó como un sólido amorfo de olor blanco, a partir de la fracción 4 y fue identificado como el ácido málico por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura: RMN-¹H (400 MHz, MeOH-*d*₆) δ (ppm): δ 4.50 (dd, *J*= 7.6, 4.4, H-2), 2.79 (dd, *J*= 16.0, 4.4, H-2a) 4.50 (dd, *J*= 16.0, 4.4, H-2b), RMN-¹³C (100 MHz, MeOH-*d*₆) δ (ppm): 175.12 (C-1); 172.76 (C-4); 67.00 (C-2); 38.6 (C-3).

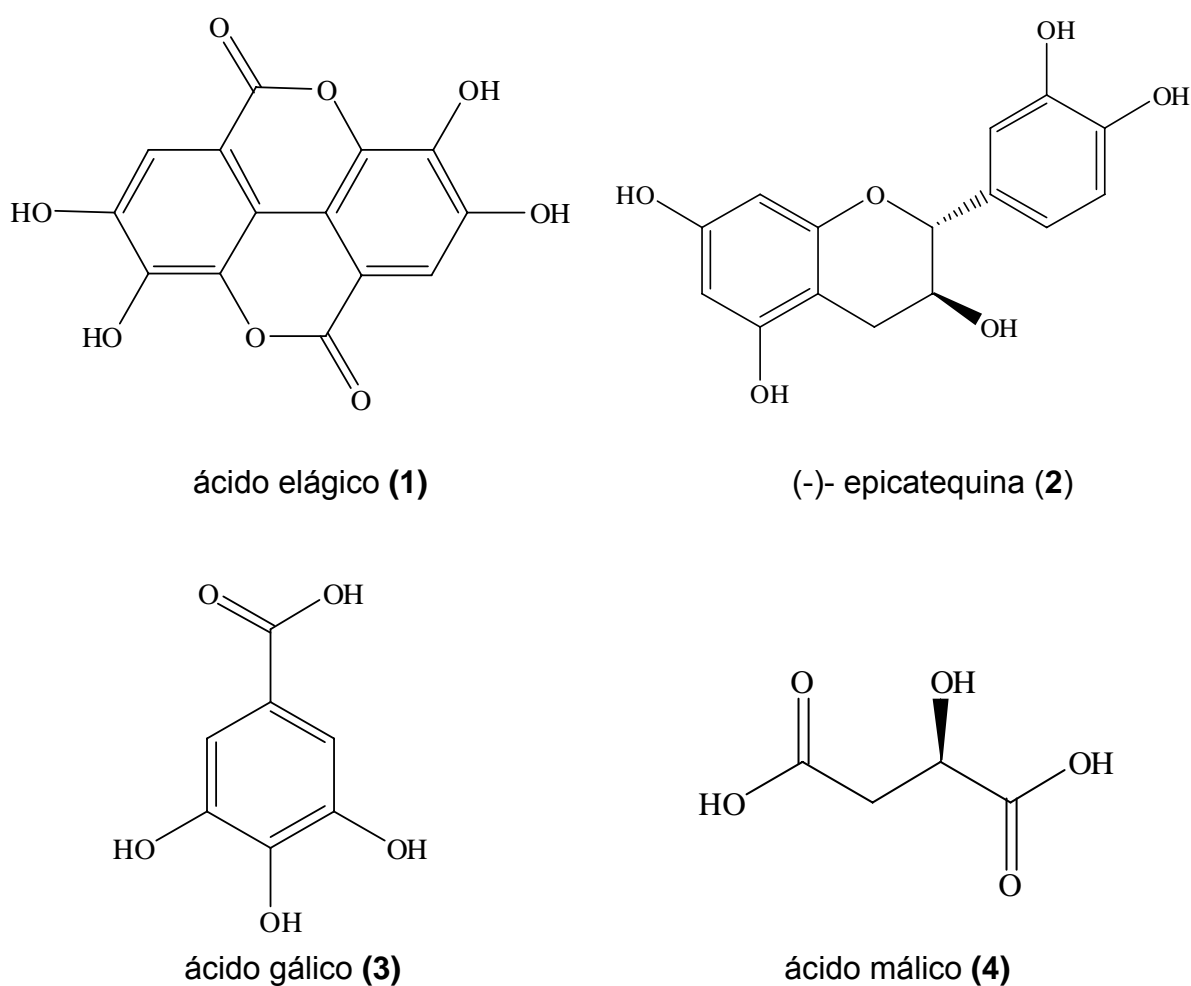


Figura 3. Estructuras de los compuestos aislados de *P. granatum*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *Punica granatum* L. (granada roja) se realizó con base en el amplio uso de esta especie en la medicina tradicional, y en específico por su uso en el tratamiento de infecciones orales, por lo que este estudio se enfocó en determinar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la cáscara de granada contra la bacteria cariogénica *S. mutans* y la bacteria causante de la gingivitis *P. gingivalis*. El proceso de maceración con metanol permitió obtener un extracto total de naturaleza viscosa y de color amarillo oscuro, con CMI de 182 µg/ml y 266 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente (Cuadro 11). Un extracto vegetal se considera activo contra las bacterias de prueba si presenta una CMI menor a 1000 µg/ml (Rivero-Cruz *et al.*, 2008).

El extracto total fue sometido a un fraccionamiento primario por partición utilizando hexano, CH₂Cl₂, acetato de etilo, y mezcla acetato de etilo/butanol (1:1), sucesivamente. Como resultado de este proceso se obtuvieron las fracciones de hexano (FI), CH₂Cl₂ (FII), acetato de etilo (FIII), acetato de etilo/butanol (FIV) y de metanol acuoso (FV), cuyas CMI's se presentan el Cuadro 11.

La fracción primaria activa FIII (fracción soluble en acetato de etilo) (Cuadro 11) fue sometida a una cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como fase móvil. De este proceso se obtuvieron 10 fracciones. Por otra parte, la fracción insoluble FIII (fracción insoluble en acetato de etilo) se sometió por separado a un tratamiento similar y de este proceso se obtuvieron cuatro fracciones. Las fracciones FIII-S4 y FIII-P2 fueron combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en una fracción FIII-SP. La fracción se recromatografió sobre Sephadex LH-20 y gel de sílice sucesivamente. Las fracciones obtenidas se evaluaron y la FIII-SP2 presentó la mejor actividad con CMI's= 46 µg/ml y 38 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente.

Cuadro 11. Actividad antibacteriana (CMI) del extracto total y las fracciones de *P. granatum* contra las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Muestra	<i>Streptococcus mutans</i> CMI (µg/ml)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI (µg/ml)
Extracto total	182	266
FI	123	266
FII	246	266
FIII	32	133
FIV	63	266
FV	123	133
CHX	3.4	2.6

CHX*: gluconato de clorhexidina

De la fracción activa FIII (CMI= 32 µg/ml y 133 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), precipitó de manera espontánea un sólido de color amarillo, el cual se identificó como ácido eláxico (**1**), que fue caracterizado por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas (Khallouki *et al.*, 2007). A partir de la fracción activa FIII-SP2 (CMI= 46 µg/ml y 38 µg/ml para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente), la cual fue sometida a sucesivas cromatografías, se aisló y se caracterizó la (-)-epicatequina (**2**) (Bejar *et al.*, 1993).

Por otra parte, de la fracción FIII-SP2-VIII-4 precipitó espontáneamente un sólido, que fue caracterizado como el ácido gálico (**3**) (Kwon *et al.*, 2007).

Por último, de la fracción 4 (FIII-P4) se aisló un sólido blanco que fue caracterizado como el ácido málico (**4**) mediante comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con datos reportados en la literatura (Caligiani *et al.*, 2007; Kilcoyne *et al.*, 2005).

Cuadro 12. Actividad antibacteriana (CMI) de los compuestos aislados *P. granatum* contra las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Compuesto	<i>Streptococcus mutans</i> CMI (µg/ml)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI (µg/ml)
Ácido elágico (1)	127	65
-(-)Epicatequina (2)	48	24
Ácido gálico (3)	111	104
Ácido málico (4)	245	126
CHX	4.2	2.7

CHX*: gluconato de clorhexidina

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La información científica que se generó en esta investigación representa una contribución al conocimiento químico y biológico de la especie *P. granatum*. El efecto antibacteriano que presenta el extracto íntegro de preparado a partir de las cáscaras de la granada y uso de la especie para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral, sustentan de manera preliminar y parcial, la eficacia de la especie en las prácticas médicas populares.

El estudio químico biodirigido del extracto preparado a partir de la cáscara la granada roja (*P. granatum*) permitió el aislamiento y caracterización de cuatro componentes previamente descritos en *P. granatum*. Los compuestos aislados fueron ácido elágico (1), la -(-) epicatequina (2), el ácido gálico (3) y el ácido málico (4).

De los compuestos aislados la -(-) epicatequina (2) presentó la mejor actividad antibacteriana sobre las bacterias *S. mutans* y *P. gingivalis* con concentraciones mínimas inhibitorias de 48 µg/mL y 24 µg/mL. Además de la actividad antibacteriana este compuesto ha mostrado propiedades como; antiulcericas, antiinflamatoria, astringente y amebicida (Calzada *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2007).

Por otra parte, el ácido elágico (1) presentó una actividad biológica moderada contra *S. mutans* con una CMI de 127 µg/mL, pero menor a la del ácido gálico (2), el cual tuvo mejor actividad con una CMI de 111 µg/mL. Con respecto a *P. gingivalis* el ácido elágico presentó mejor actividad biológica con una CMI de 65 µg/mL, mientras que el ácido gálico mostró una actividad biológica moderada con una CMI de 104 µg/mL. El ácido elágico ha demostrado que inhibe la actividad de la glucosiltransferasa de *S. mutans*; además de tener efecto antioxidante, antimutagenico, antitumoral y activador de la coagulación de la sangre (Sawamura *et al.*, 1991). Al ácido gálico en la literatura se le describe su efecto inhibitor del crecimiento de cepas de *E. coli* 0157:H7, *Corinebacterium sp.*, *B. subtilis*, *B.*

cereus, *Shigella shiga* y *V. colera*. Por otra parte, también se ha encontrado que reduce la replicación del virus del herpes genital *HSV-2*.

El ácido málico presentó la menor actividad biológica contra *S. mutans* y *P. gingivalis*. Este resultado contrasta con los reportes que se encontraron en la literatura en los cuales se describe la actividad antibacteriana del ácido málico sobre la bacteria *S. typhimurium* (Gadang., *et al* 2008).

Es importante destacar el antibiótico clorhexidina, uno de los agentes empleados con mayor frecuencia para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por bacterias en la cavidad oral presenta una CMI considerablemente menor a la de los productos aislados en este trabajo. Sin embargo, este compuesto presenta numerosas desventajas entre las cuales podemos destacar el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto lo cual limita su uso en el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral (Quiryneen *et al.*, 2000).

7. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico de la cáscara de granada con la finalidad de aislar componentes minoritarios presentes en las fracciones activas del mismo.
- Establecer el efecto de los extractos derivados de la granada y compuestos puros sobre la enzima glucosiltransferasa de *S. mutans*.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos en los extractos de la granada.

ANEXO

ESPECTROS

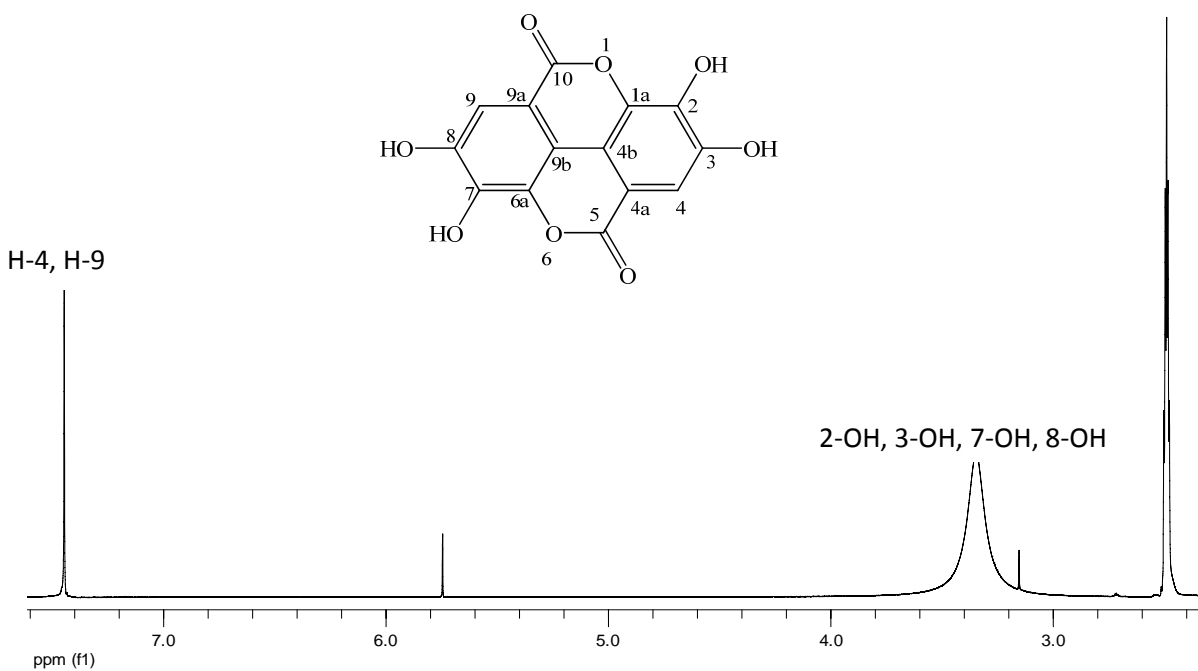


Figura 4. Espectro de RMN-¹H del ácido elágico (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

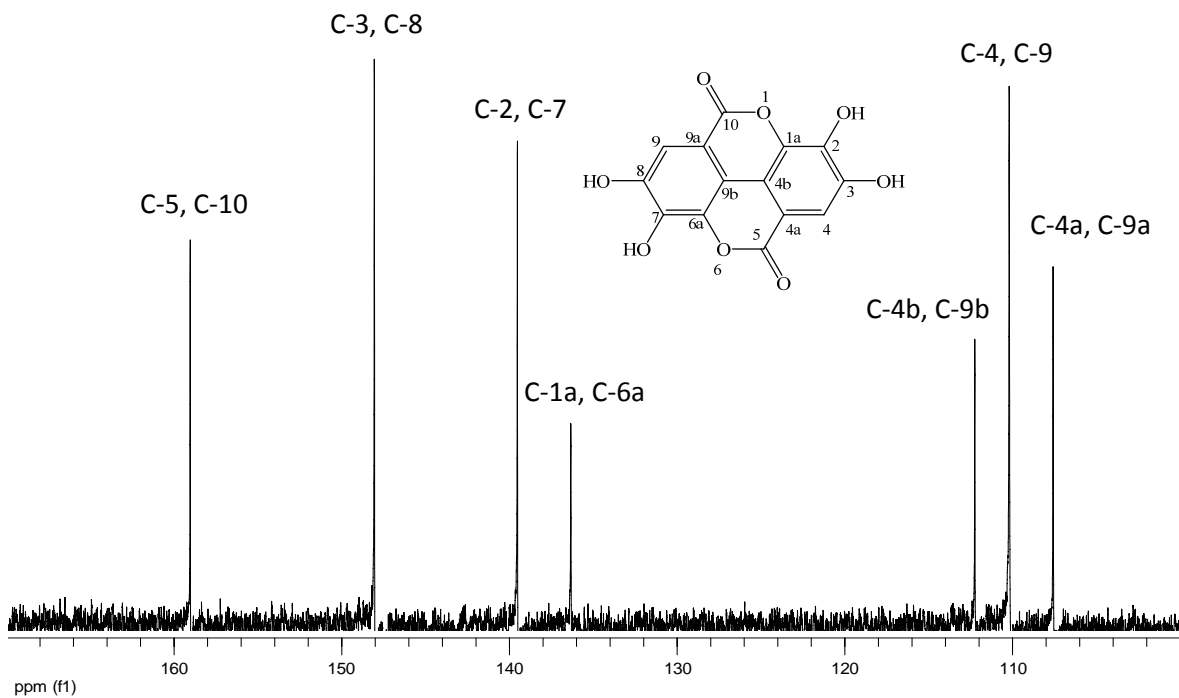


Figura 5. Espectro de RMN-¹³C del ácido elágico (DMSO-*d*₆, 100 MHz).

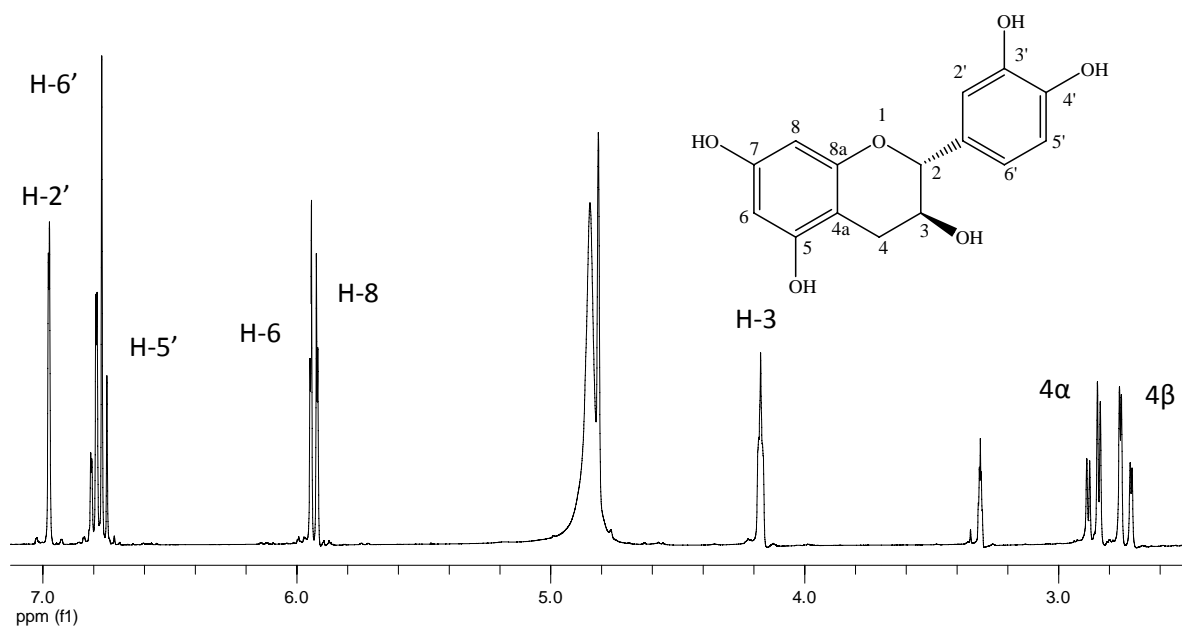


Figura 6. Espectro de RMN- ^1H de la epicatequina ($\text{MeOH-}d_6$, 400 MHz).

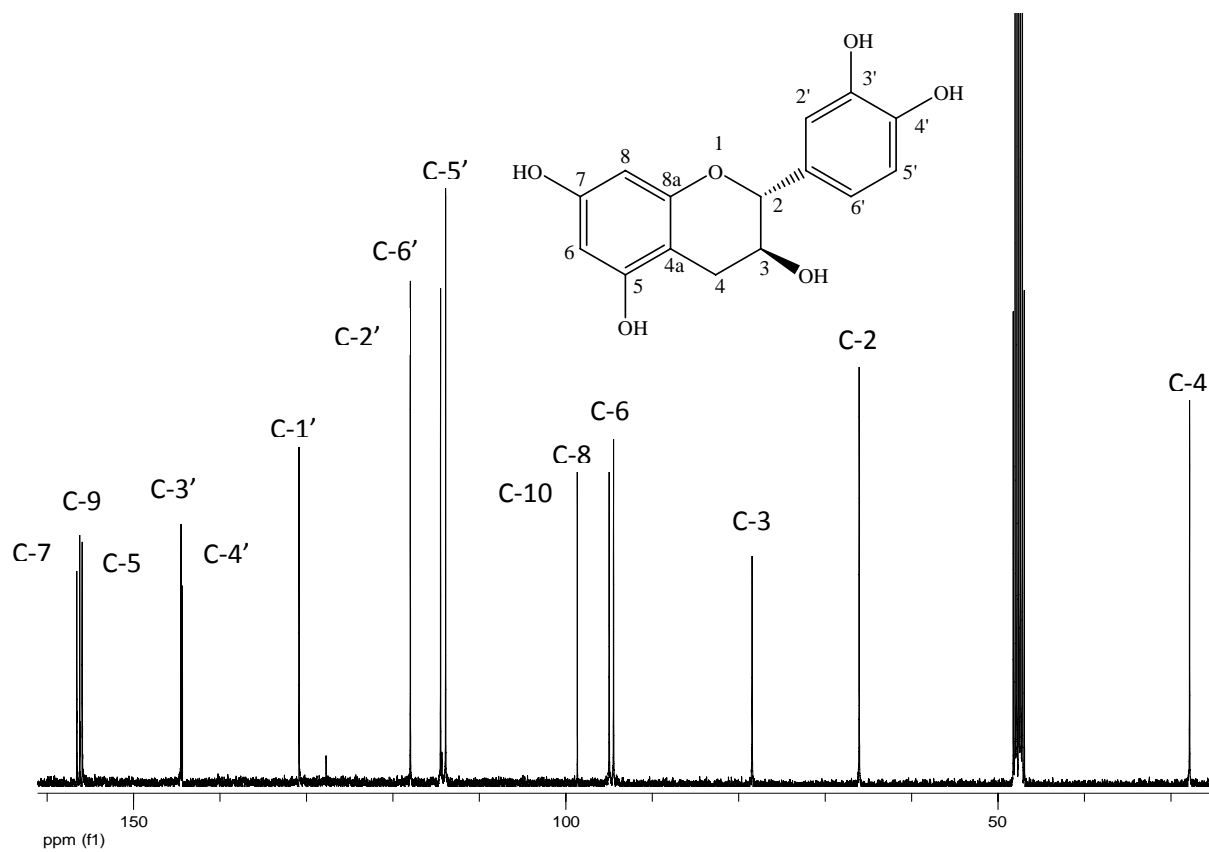


Figura 7. Espectro de RMN- ^{13}C de la epicatequina ($\text{MeOH-}d_6$, 100 MHz).

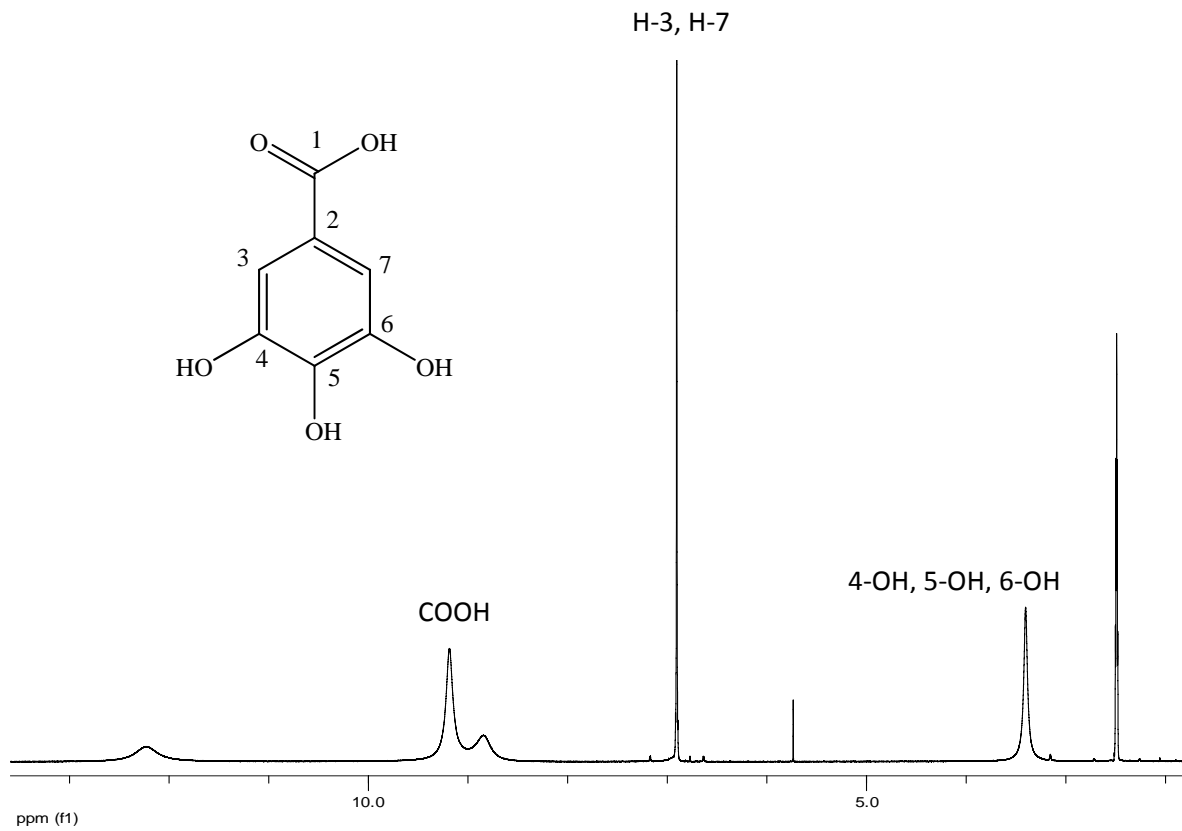


Figura 8. Espectro de RMN- ^1H del ácido gálico ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

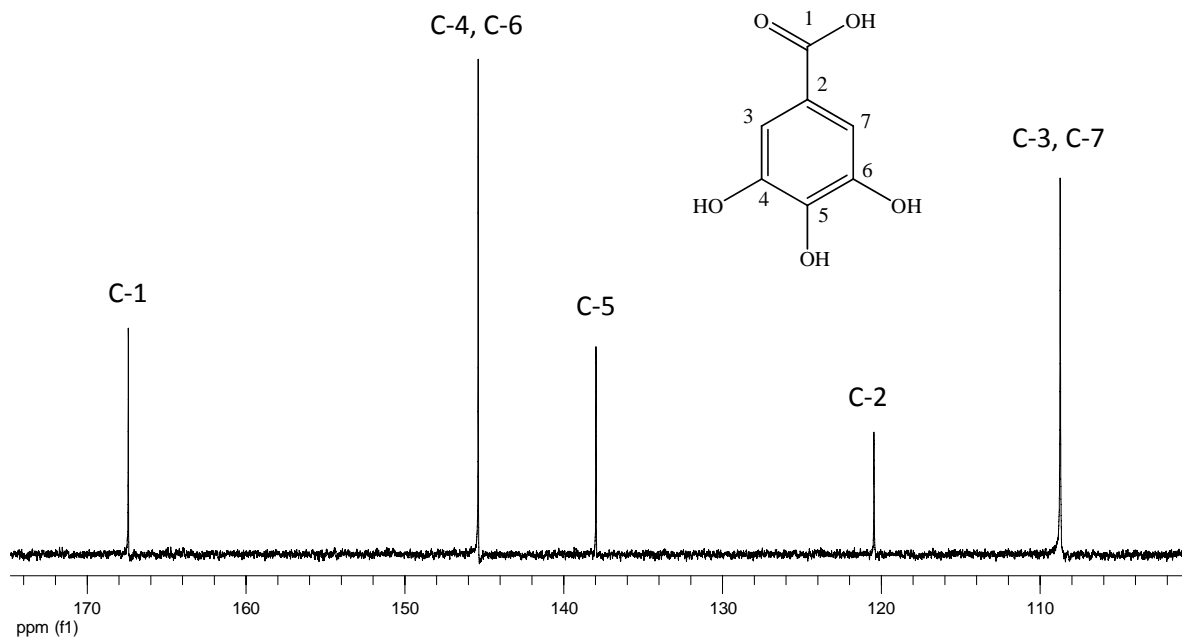


Figura 9. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido gálico ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz).

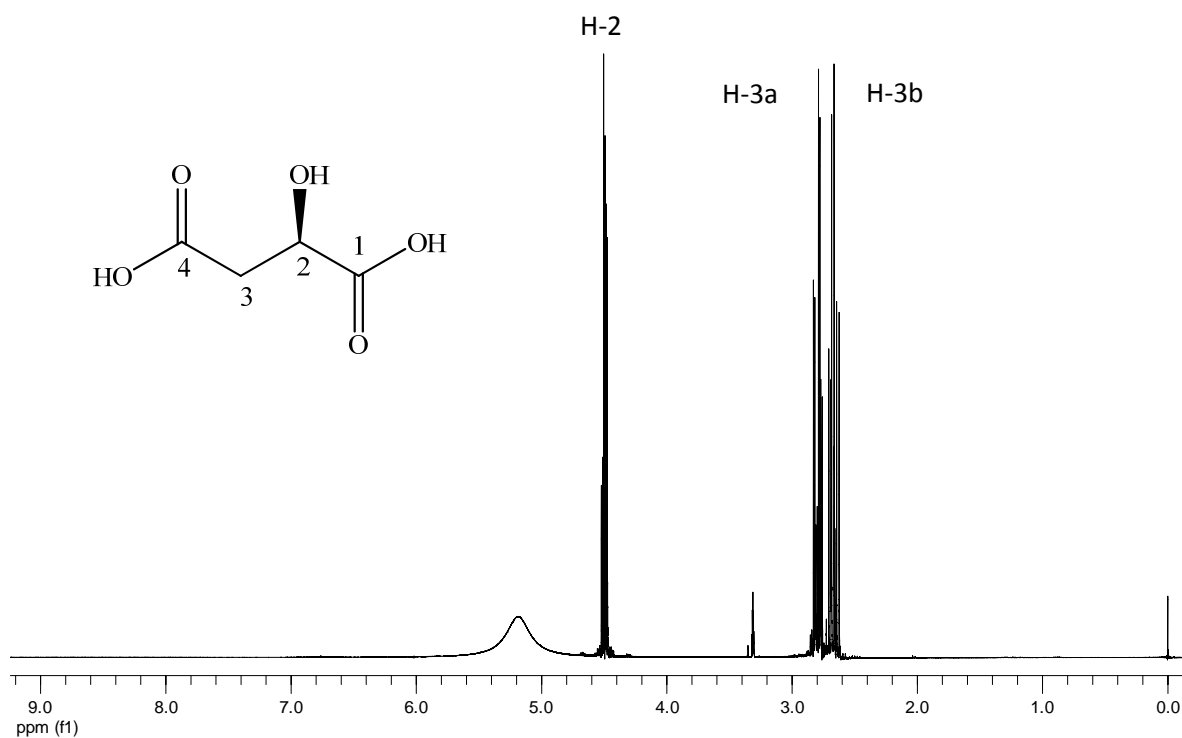


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H del ácido málico (MeOH- d_6 , 400 MHz).

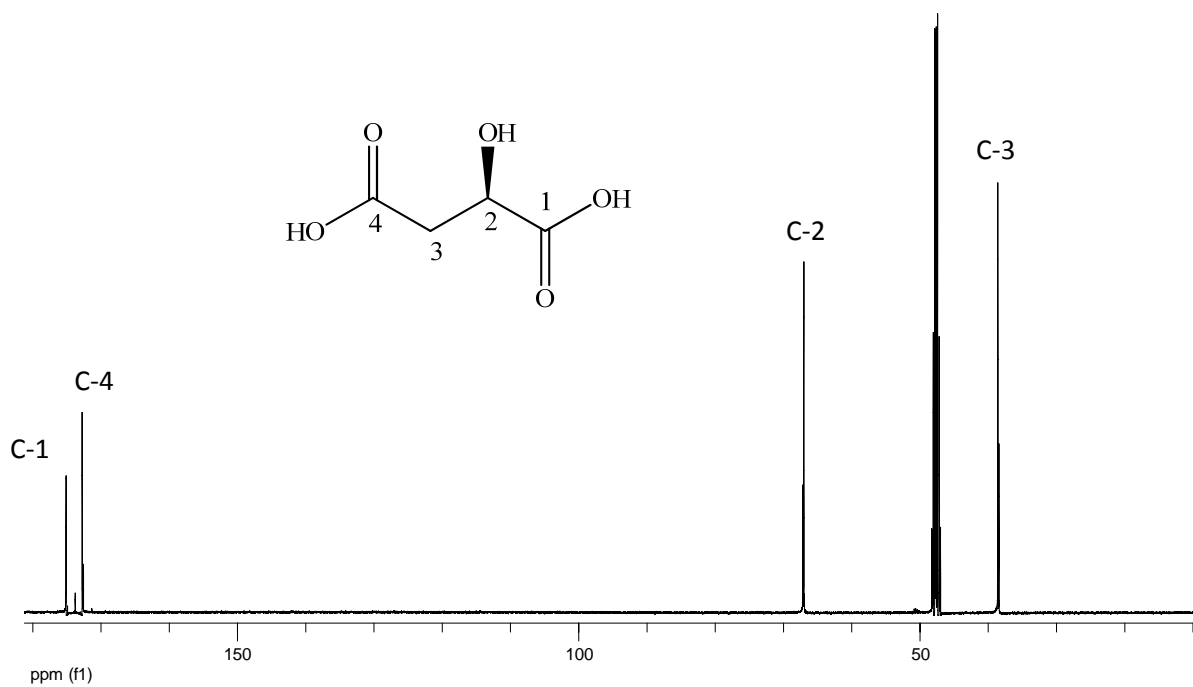


Figura 11. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido málico (MeOH- d_6 , 100 MHz).

8. 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.
- Aguilar, A Camacho, J.R. Chino, S., (1994).Herbolaria medicinal del Instituto Mexicano de seguro social. Información Etnobotánica, 1 st ed. IMSS México.
- 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.
- Ahmed, I. and Beg, A.Z., (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, *Journal Ethnopharmacology*, **74**, 113-123.
- Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babo, B. H, Padikkala, J. (2005).The inhibition of gastric mucosal injuryby *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. **1**, 171-176.
- Argueta A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I (1-583).México: Instituto Nacional Indigenista, pp 457 y 458.
- Artik, N. (1998). Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*. **8**, 492–499.
- Asres, K. et al., (2001). Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants, *Phytotherapy Research*, **15**, 323-326.
- Azzouz, M.A. and Bullerman, L.B., (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents, *Journal Food Protection*, **45**, 1298-1301.
- Barbosa A.A., Martínez T.J. (2001).Frecuencia de caries y estado nutricio en preescolares, *Revista Medica IMSS 2001*, **39**, 429-433.
- Bejar, E., Malone, M.H. (1993).Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico, Part I. *Journal of Ethnopharmacology* **39**, 141-158.
- Braga, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C.Jett, M., Takahashi, J.A., Carmo, L.S., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. a. (2005).Pomegranate extract inhinitis

Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology* **1**, 335-339

- Branting, C., Sund, M.L., and Linder, L.E., (1989). The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro, *Archives Oral Biology*, **34**, 347-353.
- Burapadaja, S. and Bunchoo, A., (1995). Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrine*, *Planta Medica*, **61**, 365-366.
- Caballero, O., Peña, B.R., Zurcher, J., Ortín, J., Martínez T. (2001). Actividad inhibitory de extractos del fruto de *Punica granatum* sobre cepas del virus de la gripe, *Revista Cubana de Química*, **13**, 106.
- Caligiani, A., Acquotti, D., Palla G. and Bocchi V. (2007). Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution¹H NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **585**, 110-119.
- Calzada, f.B (2000). Proantocianidinas de tipo A y flavonoides con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum*. S. Watson (Geranieae) y *Conyza filagoides* (D.C). Hieron (Asteraceae). Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Castro P.Tovar J. (2006). Adhesion of *Streptococcus mutans* salivary proteins in caries-free and caries-susceptible individuals, *Acta Odontologica Latinoamericana*, **19**, 59-66.
- Chidambara, M.K.N., Jayaprakasha, K-K., Singh, R.P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **17**, 4791-4795.
- Colin F. Poole. (2003). The essence of Chromatography. *Elsevier Amsterdam the Netherlands*.
- Conner, D.E., Davidson, P.M. and Branen, A.L., Marcel Dekker (1993). *Antimicrobials in food*, New York. 441–50.
- Das, A.K., Mandal, S.C., Banerje, S.K., Sinha, S., Das, J., Saha, B.P., M. (1999). Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **68**, 205-208.
- De, M., Krishna De, A., and Banerjee, A.B., (1999). Antimicrobial screening of some Indian spices, *Phytotherapy Research*, **13**, 616-618.
- El-Toumy, S.A.A., Marzouk, M.S., and Rauwald, H.W., (2001). Ellagitannins and gallotannins *Punica granatum* heart wood, *Pharmazie*, **56**, 823-824.

- Espinosa, G.V. (1994). Flora medicinal indígena de México I. Instituto Nacional Indigenista 1ª Edición. México.
- Erturk, O., Zihni, D., and Ali, O.B., (2000). Antiviral activity of some plant extracts on the replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *Turkish Journal of Biology*, **24**, 833-844.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2001).
- Ferrara, L., Schettinno O., Forgione P., Rullo V., Di gennaro S., (1989). Identification of the root of *Punica granatum* in galenic preparations using TLC, *Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale*, **65**, 385-390.
- Gadang., V.P; Hettiarachchy, N.S.; Johnson, M.G Owens C. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a Turkey Frankfurter System. *Jornal of food science*, **73**, 389-394.
- 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 H, Brandis, Díaz F.Farfan M. (2006). Prevalencia de caries rampante en niños atendidos en el centro odontopediatrico Carapa, antimano Venezuela, *Biomed*, **17**, 307-310.
- Gracious Ross, R., Selvasubramanian, S., and Jayasundar, S. (2001) Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits ó a preliminary study, *Journal Ethnopharmacololy*. **78**, 85-87.
- Guevara, J.M., Chumpitaz, J., and Valencia, E., (1994). The in vitro action of plants on *Vibrio cholera*, *Revista de gastroenterología del Peru*, **14**, 27-31.
- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *Journal Natural Products*, **59**, 205-215.
- Heftmann, E., Ko, S.T., Bennet, R.D. (1966). Identification of estrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry*. **5**, 1337.
- Hernández M.R. Gally J.M. (1981). Plantas medicinales México Árbol s.a de c.v;
- Holetzet, F.B., Pessini, G.L., and Sanches, N.R. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1027-1031.

- House, P.R., Lagos- Witte, S., Ochoa, L. (1995). Plantas medicinales comunes de Honduras. 1ª Edición. Litografía López s. de RL. Honduras. 385.
- Hosseind, S., Rahemi, M. (2007). Seasonal change of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit, *Scientia Horticulturae*. **111**, 120-127.
- Hussein, S.A.M., Heba H. Barakat, Irngard Merfort and Mahmoud A.M. nawwar (1997) Tannins from the leaves of *Punica granatum*, *Phytochemistry*, **45**, 819-823.
- Jafri, M. A., Islam, M., Javed, K., Singh, S. (2000).Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*. **70**, 309-314.
- Jayaprakasha, G.K., Tamil Selvi, A., and Sakariah, K.K., (2003) Antibacterial and antioxidant activities of Grape (*Vitis vinifera*) seed extracts, *Food Research International*, **36**, 117-122.
- Kakiuchi N.,Hattoriamba T.(1986). Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII.Inhibitory effects of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase, from *Streptococcus mutans*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 720-725.
- Kapoor, L.D., *CRC (1990)*.Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, pp. 347-349.
- Khallouki, F., Haubner R., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch H and Owen R.W.(2007) Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 472–485.
- Kilcoyne, M., Alexander S. Shashkov, Yuriy A. Knirel, Raisa P. Gorshkova, Evgeny L. Nazarenko, Elena P. Ivanova, Natalya M. Gorshkova, Sof'ya N. Senchenkova and Angela V. Savage (2005).The structure of the O-polysaccharide of the *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570 lipopolysaccharide containing a keto sugar. *Carbohydrate Research*. **31**, 2369-2375.
- Kirilenko, O.A. (1978). Antibacterial properties of juice of various types of pomegranate, *Konservnaya I Ovoshchesushilnaya Promyshlennost*, **12**, 12-3.
- Kohho, H., Suzuki, R., R., Yasuir, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., Tanaka, T. (2004). Pomegranate seed oil rich unconjugated linolonic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats cancer sorence **6**, 481-486.

- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Labbe, R.G., Shetty, K.(2007).Inhibition of *Staphylooccus aureus* phenolic phytochemicals of select linal herbs species of Lamiaceae family and likely mod of action through proline oxidation. *Food Biotechnology* **21**, 71-89
- 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
- Lee, J. and Watson, R.R., (1998). Pomegranate: a role in health promotion and AIDS In Nutrition, foods and AIDS, Watson R.R., ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 179.
- Li, Y., Linda S. M. Ooi, Hua Wang, Paul P. H. But, Vincent E. C. Ooi. (2004). Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China, *Phytotherapy Research.*, **18**, 718-722.
- Liébana, U.J. (2002).Microbiología oral: McGraw Hill-Interramericana, España pp 297-525.
- 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. (2003). *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **21**,279-284.
- Machado, T.B., Leal, I.C., Amaral, A.C., Netto-dosSantos, K.R., Silva., M.G., kuster, R. M. (2002). Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits, *Journal Brazilian Chemical Society*, **13**, 606-10.
- Martínez, M. (1979).Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.325.
- 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 Biomedical.* **17**, 274.
- Mitsner, L.A., Pillai, S., Shankel, D., (2000).Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medicinal products. *Journal of Food and Drugs Analysis*, **8**, 229-234
- Mori- Okamoto., J., Otawara-Hamamoto., Y., Yamamoto, H., Yashimura, H. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in

menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal Ethnopharmacology*, **1**, 93-101.

- Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatán. Charles C. Thomas Publisher. USA 613-614.rd
- Morsy. T.A., Mazyad, S.A., el- Shar Kawy, I. M. (1998). The larvicidal activity of solvent extracts of three medicinal plants against third i instar larvae of *Chiysomyia albiceps* Journal of the Egyptian Society of Parasitology **3**, 699-709.
- Murthy. K.N., Reddy. V.K., Veigas, J.M, Murthy. U.D. (2004). Study on wound healing activity of *Punicagranatum* peel. Journal of medicinal Food **2**, 256-259.
- Nair, R. Y Chanda, S. (2005). Anticandidal activibited in dum exhity of *Punica granatum* exhibited in different solvents. *Pharmaceutical Biology*. **1**, 21-25
- Navarro, V., Villareal Ma., Lozoya X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, *Journal Ethnopharmacology*., **53**, 143-147.
- Navindra P. Seeram Risa N.Shulman, and Davind Heber (2006). Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine, Edit. Taylor and Francois. pp 168.
- 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.
- Negi, P.S. and Jayaprakasha, G.K., (2003). Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts, *Journal Food Science* **68**, 1473-1477.
- Negroni, M. (2003). *Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica*. Médica Panamericana S.A. Argentina. pp. 220-221.
- 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.
- Perez, C. and Anesini, C., (1994). In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*, *Journal Ethnopharmacology*, **44**: 41-46.
- 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.

- Prakash, A.O., Saxena, V., Shukla, S., Tewaki, R.K. Mathur. S., Gupta, A., Sharma, S, Mathur, R (1985). Antiimplantation activity of some indigenous plants in rats. *Acta European Fertilitatis* **6**, 441-448.
- Prashanth, D., Asha, M.K., and Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*, *Fitoterapia*, **72**, 171-173.
- Prontuario publicado por Herbolaria Universal 1997.
- Quirynten, M., Teughels, W., De Soete, M., Steenberghe, D. (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology*, **28**, 72-90.
- Raj. R.K (1975). Screening of indigenous plants for antihelminthic action against human *Ascaris lumbricoies* Part- II. *Indian Journal of Phisiology and Pharmacology* 191.
- Rani, P. and Khullar, N., (2004). Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their potential against multidrug resistant *Salmonella typhi*, *Phytotherapy Research*, **18**, 670-673.
- Reddy 4. 2004 November; 8. Pomegranates: the fruity panacea. BBC News. [khttp://news.bbc.co.uk/1/hi/health/3937053.stml](http://news.bbc.co.uk/1/hi/health/3937053.stml); 006 September; 3.
- 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.
- Rojas, A.M. (1999). The virtual healer.Tlahui_Medic. México 7:1 www.tlahui.com/medic/medic7/granada.htm.
- Romo PMR Herrera MI, Alcauter ZA, Hernández ZS, Rubio C.J. (2004). Factores asociados a caries dental en escolares de C.d. Nezahualcoyotl. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **61**, 307-330.
- Roos, I.A. (1999). *Medicinal Plants of the World Chemical, Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, USA. Pp 273-279.
- Sawamura Shoichiro, Tonosaki Yasuhiro Tonosaki, Kihamada Shigeyuki (1991).Inhibitory Effects of Ellagic Acid on Glucosyltransferases from *Mutans Streptococci*. *Biotech Biochem*. **56**, 766-768
- Scalbert, A., (1991). Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, **30**, 3875.

- Schubert, S.Y., Lansky, E.P., and Neeman, I. (1999), Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids, *Journal Ethnopharmacology*, **1**,11-17.
- Secretaría de Salud A, (2006). Paula J. Moynihan. Papel de la dieta y la nutrición en la etiología y la prevención de las enfermedades bucodentales.
- Segura, J.J., Morales Ramos, L.H. Verde-star, J., Guerra, d. (1990). Growth inhibition of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* produced by pomegranate root (*Punica granatum L.*), *Archivos de Investigaciones Medicas*, **21**, 235-239.
- Singh, R.P., Chidambara, Murthy, K.N. Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the oxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1**, 81-86.
- Singhal, K.C. (1983). Antihelmitic activity of *Punica granatum* and *Artemisia siversiana* against experimental infections in mice. *The Indian. Journal of Pharmacology*, **2**, 119-122.
- Stahl, E (1969). Thin layer chromatography, A Laboratory Handbook. Segunda Edición. Springer Vela. New York. 861-879.
- Stewart, G., (1998). Antiviral and antifungal compositions comprise a mixture of ferrous salt and a plant extract of pomegranate rind, *Viburnum plicatum*, leaves or flowers, tea leaves or maple leaves in aqueous solution, *Int. Search Rep.* (patent pending, 1995), cited by Lee and Watson,.
- Tanaka, T., Moriita, A., and Nanaka, G., (1991). Tannins and related compounds C III. Isolation and characterisation of new monomeric, dimeric and trimeric ellagitannins, calamanisanin and calamanins A, B, and C, from *Terminaliacaamansani*, *Chemical of Pharmaceutical Bulletin* **38**, 60.
- 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**, 650-651.
- Tripathi, S.M. and Singh, D.K. (2000). Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* Linn. Root. Brazilian, *Journal of Medical and Biological Research* **33**, 1351-1355.
- Tripathi, S.M. and Singh, D.K., (2001). Molluscicidal activity of *Punica granatum* and *Canna indica* combination with plant derived molluscicides against harmful snail, *Malaysian Applied Biology.*, **30**, 25.

- Tripathi, S.M., Singh, V.K., Singh, D.K. (2004). Enzyme inhibition by the molluscicidal agent *Punica granatum* Linn. Bark and *Canna indica* Linn. Root, *Phytotherapy Research*, **18**, 50-506.
- Van Elswijk, D.A., Shobel, O.P., Lansky, E.P. Irth, H., Van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using online biochemical detection coupled to mass spectrometry phytochemistry **65**, 233-241.
- Vasconcelos, L.C., Samparo, M.C., Samparo, F.C., Higinio, J.S (2003). Use of *Punica granatum* as antifungal agent against associated with denture stomatitis. **6**, 192-196
- 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.
- Villalobos RJJ, Medina Vallejos SSA, Espinoza B JL. (2005). Caries dental en escolares de 6 a 12 años de Navolato, Sinaloa. *Rev Biomed* **16**, 217-219.
- Voravuthikunchai, S., Lortheernuwat, A., Jeeju, W., sririrak, T., Phongpaichit, s., Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**, 49-54.
- Vudhivanich, S., (2003). Potential of some Thai herbal extracts for inhibiting growth of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt of tomato, *Kamphaengsaen Academic Journal*, **1**, 70.
- Wickes, F.H., Uri, L.J. (1898). *Granatum* (USP) Pomegranate. King's American Dispensatory.
www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/punica.htm.
- 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, J. et al., (1995). Anti-viral activity of tannin from the pericarpio of *Punica granatum* L against genital Herpes simplex virus in vitro, *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin*, **20**, 556.
- Zhicen, L., (1987). *Colour Atlas of Chinese Traditional Drugs*, Vol. 1, Science Press, Beijing, Peoples' Republic of China, 75.