



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación de la actividad antibacteriana de
extractos orgánicos de los componentes del árbol de
granada (*Punica granatum* L.)”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

Presenta:

L.N. JORGE SORIA BUSTOS

Director de Tesis

GABRIEL BETANZOS CABRERA

San Agustín Tlaxiaca Hgo., Noviembre de 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Health Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

14 de octubre de 2015
AAM/MCBS/121/2015

Asunto: Acta de impresión

Lic Jorge Soria Bustos
Candidato a Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que fue asignado a su Tesis titulada, "Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Extractos Orgánicos de los Componentes del Árbol de Granada (*Punica granatum* L.)," con el cual obtendrá el **Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis y haber realizado las correcciones acordadas, el jurado seleccionado ha decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DOCTOR MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

PRIMER VOCAL DOCTOR GABRIEL BETANZOS CABRERA

SECRETARIO DOCTOR RAQUEL CARIÑO CORTÉS

SUPLENTE DOCTOR JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA

SUPLENTE DOCTOR JUAN CARLOS CANCINO DÍAZ

Reciba un cordial saludo.



Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

MÉDICO CIRUJANO JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR

DOCTORA ARACELI ORTIZ POLO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DOCTOR JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
COORDINADOR DEL PROGRAMA

JEZC



Laboratorio de Medicina Dental - Ciudad del Conocimiento
Camino a Pachuca, Tulancingo Km. 4.5
Ministerio de la Reforma, Hidalgo, México C.P. 42194
Teléfono: 52 (711) 71 720 00 Ext. 5991
Email: info_sci@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 276773.

Durante el periodo enero-junio de 2014 se realizó una estancia internacional de investigación en el Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Universidad de Florida, en Gainesville, Florida, en los Estados Unidos, apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Nutrigenómica y de Farmacia del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo financiamiento proporcionado por el CONACYT 142035 PDC

Dedicatorias y agradecimientos

A mi madre por darme la oportunidad de vivir y por todo el apoyo que me ha otorgado a lo largo de mi vida y por siempre estar presente en mis logros y fracasos, en los momentos más alegres y más tristes de mi vida.... Te amo mucho mami.

A mis hermanas por la ayuda y apoyo brindados y por su cariño. Saben que las quiero.

A mi novia Erika por el apoyo que siempre me ha brindado desinteresadamente y por soportarme durante este proceso. Te amo noviesita.

A mis familiares que directa o indirectamente han estado presentes en las distintas etapas de mi vida. Los quiero a todos.

A mis amigos miembros del famoso “Drink Team” Fernando, Diego, Iván, Chabelita, Oyuki, Don Peter, Charly y Fabe, gracias por el apoyo y los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, me llevo un aprendizaje bueno y una bonita amistad de cada uno de ustedes.

A mis profesores que durante el posgrado me ayudaron y me exigieron, sin ellos no sabría el poco conocimiento que ahora poseo. Gracias Dr. Girón por la oportunidad que me brindó, por los regaños, exigencias y el tiempo dedicado durante mi estancia. Gracias a los Doctores Manuel, Jeanette, Raquel y a los Doctores del IPN, sus clases fueron muy buenas. Del mismo modo al Dr. Zamarripa por el apoyo que me brindó durante este tiempo y por la paciencia que siempre me tuvo.

Al Dr. Gayosso por siempre estar al pendiente de mi formación y de mis experimentos, así como la paciencia que me tuvo para que pudiera aprender temas nuevos.

Y no menos importante, quiero agradecer al Dr. Gabriel Betanzos por abrirme las puertas de su laboratorio y por aceptar que me integrara al grupo y por no ser solamente el profesor y asesor, sino también por ser mi papá científico y un buen amigo al que le guardo una gran estimación. Gracias Doc.

Finalmente gracias a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron en mi formación académica y que por cuestiones de espacio ya no pude mencionar.

INDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Granada	4
2.1.1 Características generales	4
2.1.2 Crecimiento y cultivo	5
2.1.3 Condiciones climáticas para la cosecha de la granada	6
2.1.4 Condiciones de almacenamiento del fruto.....	6
2.1.5 Producción de granada	7
2.1.5.1 Producción de granada en México	7
2.1.5.2 Producción de granada en Hidalgo	8
2.1.6 Composición nutricional de la granada	8
2.1.7 Compuestos bioactivos de la granada	9
2.1.7.1 Taninos	10
2.1.7.2 Flavonoides	11
2.1.7.3 Alcaloides	11
2.1.7.4 Ácidos orgánicos	11
2.1.7.5 Triterpenos y esteroides	12
2.1.7.6 Otros compuestos	12
2.1.8 Variaciones en el contenido de compuestos bioactivos.....	13
2.1.9 Bioactividad de la granada.....	13
2.1.9.1 Propiedades terapéuticas.....	13
2.1.9.1.1 Propiedades antibacterianas	15
2.2 Extractos de plantas medicinales.....	16

2.2.1 Métodos de extracción en plantas	17
2.2.1.1 Métodos no convencionales de extracción	18
2.2.1.2 Métodos convencionales de extracción	18
2.2.1.2.1 Maceración en plantas	18
2.3 Pruebas in vitro de susceptibilidad antimicrobianas.....	19
2.3.1 Prueba de dilución en caldo	19
2.3.2 Prueba de difusión en disco.....	20
2.3.3 Prueba de cuenta viable	20
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Tipo de estudio	24
6.2 Material botánico	24
6.3 Obtención de las muestras a analizar del granado.....	24
6.3.1 Hoja, cáscara y pericarpio.....	24
6.3.2 Semilla	26
6.3.3 Jugo	26
6.4 Determinación de porcentajes de rendimiento	27
6.5 Pruebas de solubilidad.....	27
6.6 Material biológico	27
6.6.1 Propagación y conservación de las cepas bacterianas	28
6.7 Evaluación de la actividad antibacteriana	29
6.7.1 Preparación del inóculo	29
6.7.2 Preparación de diluciones de los extractos evaluados	29
6.7.3 Determinación de la inhibición de crecimiento por método de difusión en disco.....	29
6.7.4 Determinación de la inhibición de crecimiento por método de micro-dilución en caldo	30
6.7.5 Determinación de cuenta viable por diluciones seriadas	31

6.8 Análisis estadístico	33
VII. RESULTADOS	34
7.1 Obtención de extractos	34
7.2 Porcentaje de rendimiento	34
7.3 Actividad inhibitoria por difusión en disco.....	34
7.4 Concentración mínima inhibitoria por micro-dilución en caldo	41
7.5 Inhibición del crecimiento bacteriano	46
VIII. DISCUSIÓN	58
IX. CONCLUSIONES.....	68
X. RECOMENDACIONES	69
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Componentes del árbol de granada	5
Figura 2. Estructura química de los principales compuestos bioactivos del árbol de granada	12
Figura 3. Ficha de identificación botánica del árbol de granada.....	25
Figura 4. Ejemplo de distribución utilizada para el método de difusión en disco	30
Figura 5. Distribución general de los pozos utilizada en el método de micro-dilución en caldo.....	33
Figura 6. Extractos del jugo de arilos de granada obtenidos por extracción líquido-líquido.....	34
Figura 7. Actividad antibacteriana del EBJ contra <i>M. luteus</i> y <i>P. vulgaris</i>	36
Figura 8. Actividad antibacteriana del EMP contra <i>M. luteus</i> y <i>S. aureus</i>	38
Figura 9. Actividad antibacteriana del EMC contra <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i>	39
Figura 10. Actividad antibacteriana del EMH contra <i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i>	40
Figura 11. Actividad antibacteriana del EHS contra <i>K. pneumoniae</i>	41
Figura 12. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra <i>S. aureus</i> y <i>M. luteus</i> a concentraciones de 5 mg/mL a 20 mg/mL.....	43
Figura 13. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra <i>P. vulgaris</i> y <i>P. aeruginosa</i> a concentraciones de 2.5 mg/mL a 20 mg/mL.....	43
Figura 14. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra <i>S. flexneri</i> y <i>E. faecalis</i> a concentraciones de 5 mg/mL a 20 mg/mL y 7.5 mg/mL a 20 mg/mL respectivamente.....	44
Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. typhi</i> a concentraciones de 7.5 mg/mL a 20 mg/mL y 5 mg/mL a 20 mg/mL respectivamente	44
Figura 16. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra <i>E. sakazakii</i> a concentraciones de 10 mg/mL a 20 mg/mL	45
Figura 17. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> a concentraciones de 5 mg/mL a 20 mg/mL y 5 mg/mL a 15 mg/mL respectivamente.....	45

Figura 18. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i>	47
Figura 19. Inhibición del crecimiento de <i>M. luteus</i>	48
Figura 20. Inhibición del crecimiento de <i>P. vulgaris</i>	49
Figura 21. Inhibición del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	50
Figura 22. Inhibición del crecimiento de <i>S. flexneri</i>	51
Figura 23. Inhibición del crecimiento de <i>E. faecalis</i>	52
Figura 24. Inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	53
Figura 25. Inhibición del crecimiento de <i>S. typhi</i>	54
Figura 26. Inhibición del crecimiento de <i>E. sakazakii</i>	55
Figura 27. Inhibición del crecimiento de <i>K. pneumoniae</i>	56
Figura 28. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Producción de granada de año 2010 al 2013.....	8
Tabla 2. Producción de granada en el estado de Hidalgo del año 2010 al 2013.....	9
Tabla 3. Composición nutricional por cada 100 g de porción comestible de granada.....	10
Tabla 4. Extractos de las partes de la planta de granada evaluados en cepas de bacterias	17
Tabla 5. Lista de disolventes, presiones y temperaturas para rotaevaporación	26
Tabla 6. Pruebas de solubilidad de extractos de granada.....	28
Tabla 7. Porcentajes de rendimiento de los extractos obtenidos de la planta de granada	35
Tabla 8. Diámetros de inhibición inducidos por extractos del jugo de arilos de granada.	36
Tabla 9. Diámetros de inhibición inducidos por extractos del pericarpio del fruto de granada.....	37
Tabla 10. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la cáscara del fruto de granada.....	38
Tabla 11. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la hoja del árbol de granada	39
Tabla 12. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la semilla del fruto de granada	40
Tabla 13. Crecimiento bacteriano con los controles utilizados en el método de micro-dilución en caldo.....	46

ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etilo
C+	control positivo
C-	control negativo
C1-	control negativo 1
C2-	control negativo 2
CE	control estándar
CE1	control de esterilidad 1
CE2	control de esterilidad 2
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	concentración mínima inhibitoria
DMSO	dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
EAC	extracto de acetato de etilo de la cáscara
EAG	equivalentes de ácido gálico
EAH	extracto de acetato de etilo de la hoja
EAJ	extracto de acetato de etilo del jugo
EAP	extracto de acetato de etilo del pericarpio
EAS	extracto de acetato de etilo de la semilla
EBJ	extracto butanólico del jugo
EC	equivalentes de catequina
EC3G	equivalentes de cianidin-3-glucósido
EHC	extracto hexánico de la cáscara
EHH	extracto hexánico de la hoja
EHP	extracto hexánico del pericarpio
EHS	extracto hexánico de la semilla
EMC	extracto metanólico de la cáscara
EMH	extracto metanólico de la hoja

EMP	extracto metanólico del pericarpio
EMS	extracto metanólico de la semilla
EQ	equivalentes de quercetina
ERO	especies reactivas de oxígeno
EtOH	etanol
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mbar	milibares
MeOH	metanol
n-BuOH	n- Butanol
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
pH	potencial de Hidrógeno
RAJ	residuo acuoso del jugo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
DE	desviación estándar
SIAP	Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera
TSA	agar de soya tripticaseína
TSB	caldo de soya tripticaseína
UFC	unidades formadoras de colonias

RESUMEN

La granada (*Punica granatum* L.) ha sido considerada como un alimento funcional, gracias a sus propiedades terapéuticas, entre las que se encuentra su efecto antimicrobiano, atribuido a la presencia de compuestos bioactivos de naturaleza fenólica. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la actividad antibacteriana de diversos extractos orgánicos del fruto (cáscara, pericarpio, jugo, semilla) y hoja del granado mexicano obtenidos en polaridad creciente en 11 cepas bacterianas de importancia médica que pueden estar presentes en alimentos; a través de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de micro-dilución e inhibición del crecimiento por el método de difusión en disco, conforme a los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de los Estados Unidos (CLSI). Los resultados muestran que el mayor porcentaje de rendimiento de extracción lo presentaron extractos polares y el residuo acuoso del jugo (RAJ). Por el método de difusión en disco los extractos polares y de polaridad intermedia inhibieron el crecimiento en la mayoría de las cepas probadas, siendo el extracto butanólico del jugo (EBJ) y el extracto de AcOEt del jugo (EAJ) los más efectivos, sin embargo el extracto metanólico del pericarpio (EMP) y el EBJ inhibieron el crecimiento bacteriano a menores concentraciones (1-10 mg/mL). Las cepas más susceptibles fueron *M. luteus* (2-20 mg/mL) con diámetros de inhibición de 7-17.3 mm y *P. vulgaris* (1-15 mg/mL) con diámetros de inhibición de 7.3-18.7 mm. Por el método de micro-dilución, el extracto de AcOEt del pericarpio (EAP) fue el más efectivo (CMIs de 5-15 mg/mL), presentando efecto bactericida en *P. vulgaris*, *S. aureus*, *M. luteus*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri* y *P. aeruginosa*, esta última siendo la más susceptible, ya que 4 de los 8 extractos que inhibieron su crecimiento presentaron efecto bactericida (CMIs de 2.5-17.5 mg/mL). *E. coli* fue la cepa más resistente frente a la mayoría de los extractos en ambos métodos. Los extractos de la semilla tuvieron poca o nula actividad en la mayoría de las cepas evaluadas. En conclusión, principalmente los extractos de la cáscara y pericarpio presentaron una mayor actividad antibacteriana, por lo que podrían emplearse como alternativa en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas.

Palabras clave: Granada, actividad antibacteriana, extractos orgánicos, inhibición de crecimiento, concentración mínima inhibitoria, efecto bactericida, efecto bacteriostático.

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* L.) has been considered as a functional food, due to its therapeutic properties, including its antimicrobial effect, who is attributed to the presence of bioactive phenolic compounds. The aim of this project was to evaluate the antibacterial activity of organic extracts from mexican pomegranate tree (skin, pericarp, juice, seed and leaf) obtained on increasing polarity in 11 bacterial strains of medical importance that may be present in food; by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by micro-dilution method and inhibition of growth by disk diffusion method, according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute of the United States (CLSI). The results show that the higher percentage of extraction yield was presented by polar extracts and the juice aqueous residue (JAR). By disk diffusion method, polar and medium polarity extracts inhibited growth in most of the strains tested, with the juice butanolic extract (JBE) and juice EtOAc extract (EAJ) as the most effective extracts, however the pericarp methanolic extract (EMP) and the JBE inhibited bacterial growth at lower concentrations (1-10 mg/mL). The strains who were susceptible *M. luteus* (2-20 mg / mL) with inhibition diameters of 7-17.3 mm and *P. vulgaris* (1-15 mg/mL) with inhibition diameters of 7.3-18.7 mm. By micro-dilution method, the pericarp EtOAc extract (EAP) was the most effective (MICs of 5-15 mg/mL), showing bactericidal effect against *P. vulgaris*, *S. aureus*, *M. luteus*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri* and *P. aeruginosa*, the latter being the more susceptible strain, because 4 of 8 extracts who inhibited growth showed bactericidal effect (MICs of 2.5-17.5 mg/mL). *E. coli* was the most resistant strain to most extracts in both methods. Seed extracts showed little or no activity in most strains tested. In conclusion, mainly peel and pericarp extracts had the higher antibacterial activity, and these extracts could be used as an alternative on the prevention and treatment of bacterial infections.

Keywords: Pomegranate, antibacterial activity, organic extracts, growth inhibition, minimal inhibitory concentration, bactericidal effect, bacteriostatic effect.

INTRODUCCIÓN

La granada (*Punica granatum* L.) ha sido considerada como símbolo de la abundancia y prosperidad en culturas ancestrales. Durante miles de años muchas de estas culturas alrededor del mundo han creído que este fruto tiene efectos benéficos en la salud, la fertilidad, la longevidad y el rejuvenecimiento, entre otros. El interés reciente por su estudio no solo es por su sabor, sino debido a las evidencias científicas que sugieren su actividad terapéutica para tratar y prevenir distintos padecimientos como: antioxidante, antiaterogénico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiano, entre otros. Estos efectos benéficos se le atribuyen principalmente a los compuestos fenólicos como los taninos hidrolizables y antocianinas.

El surgimiento de múltiples organismos patógenos resistentes a antibióticos, ha iniciado la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas provenientes de fuentes naturales, las cuales pueden resultar como una opción viable en el tratamiento de enfermedades infecciosas. La presencia de fitoquímicos en los componentes de la granada como fenoles, taninos, flavonoides y alcaloides, los cuales son los mayores constituyentes bioactivos de la planta, pueden ser los principales responsables de su actividad antimicrobiana natural, por lo que resulta interesante el uso de extractos o compuestos purificados a partir de los componentes del árbol de granada como agentes antimicrobianos y por lo tanto su uso en la salud humana.

En este estudio se realizó la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos provenientes de la hoja, cáscara, pericarpio, semilla y jugo del arilo del árbol de granada mexicana contra 11 cepas bacterianas de importancia médica que pueden estar presentes en alimentos.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Granado

El árbol de granada (*Punica granatum* L.), también conocido como granado, es un arbusto perenne de hoja caduca frutal que es miembro predominante de dos especies pertenecientes a la familia *Punicaceae*, el cual ha sido cultivado desde tiempos antiguos por los babilonios y judíos, quienes sentían que su fruto conocido como granada les confería poderes de fertilidad, abundancia y buena suerte, por lo que llegó a ser considerado como sagrado (1,2). En los últimos años el cultivo de granada ha ido en aumento y aunque el fruto es originario de Irán e India, su mayor producción se realiza principalmente en regiones tropicales y subtropicales del Mediterráneo como España (3,4), China, Japón, Rusia y en zonas secas de los estados de California y Arizona en Estados Unidos, esto debido al mayor interés por parte de los consumidores y a la popularidad que ha adquirido principalmente el jugo del fruto, esto debido al aumento cada vez de reportes científicos sobre los efectos benéficos en la salud y el papel que juegan sus componentes en la prevención y tratamiento de enfermedades (5–8).

1.1.1 Características generales

El árbol suele ser de tamaño pequeño, con un tronco de color rojizo, de copa extendida que contiene ramas espinosas abundantes con hojas de color rojizo (tornado a verde oscuro al madurar el árbol), son brillantes, lanceoladas y estrechas con un tamaño de 3-7 cm de largo y 2 cm de ancho (Figura 1A); produce flores de color rojo brillante que suelen contener de 5 a 8 pétalos arrugados y un cáliz rojo carnosos y tubular persistente en el fruto (Figura 1B) (9). El fruto llamado granada, es una baya carnosa conectada al árbol mediante un tallo corto, de forma redondeada y color amarillo, con un color rojizo superpuesto en la corteza o cáscara que tiene un diámetro aproximado entre 7 y 12 cm (Figura 1C) (4). El interior se encuentra separado en cámaras, las cuales cuentan con paredes membranosas y esponjosas de color blanco, llamadas pericarpio (Figura 1D), el cual separa y protege a la parte jugosa comestible del fruto llamada arilo, siendo de color blanco a rojo brillante (dependiendo la

variedad), de tamaño variado y en forma de prisma (10,11), que constituye el 50% del total del fruto (Figura 1E), del cual el 80% corresponde al jugo y el 20% restante a la semilla (Figura 1F) (8).

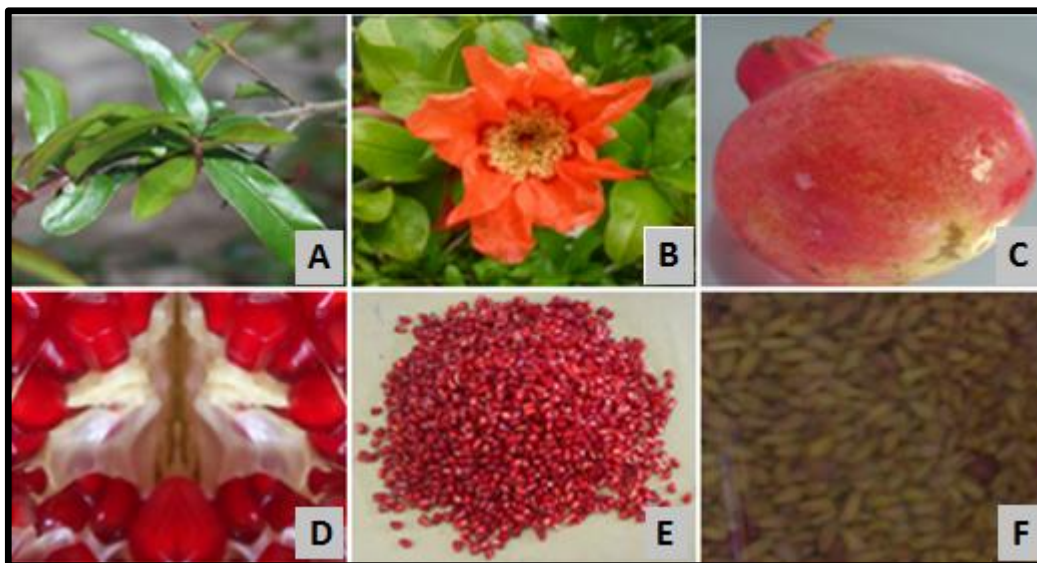


Figura 1. Componentes del árbol de granada. Hoja (A), flor (B), fruto (C), pericarpio (D), arilo (E) y semilla (F).

1.1.2 Crecimiento y cultivo

El granado naturalmente desarrolla múltiples ramas que le dan un aspecto arbustivo, que al ser cultivado de manera doméstica, tiende a crecer hasta 5 m de altura y bajo condiciones naturales, puede crecer más de 7 m. Por otro lado, existen variedades enanas que no exceden los 1.5 m (10). La mayoría de los árboles de granada son caducifolios, sin embargo han sido encontradas variedades de árboles de hoja perenne en regiones silvestres del Himalaya, en India (12,13).

El granado tiene un periodo relativamente corto de fructificación, en comparación con otros árboles frutales, ya que cuando es cultivado a partir de semillas, una pequeña proporción de plantas desarrollará flores en su primer año de crecimiento y en su segundo y tercer año, comenzarán a dar frutos (14). Aunque estos árboles crecen en regiones áridas y semiáridas, necesitan de un riego regular por goteo o aspersión, para alcanzar un rendimiento óptimo y

calidad en la producción del fruto (15), como mayor diámetro y peso (16), siendo el riego por aspersión combinado con fertilizantes, uno de los métodos que brinda mejores resultados en la cosecha (17). A medida que el fruto madura en el árbol, disminuye la acidez y hay un aumento de pH e intensidad del color y una vez que es cosechado, mantiene las mismas características que presentaba cuando se encontraba adherido al árbol, por lo que es considerado como un fruto no climatérico, conservando las mismas propiedades al ser cosechado y en el periodo post cosecha (18).

1.1.3 Condiciones climáticas para la cosecha de la granada

Como resultado de las distintas propiedades benéficas de la granada, ha aumentado su producción en numerosas regiones del mundo (19–23), por lo que la superficie dedicada a su cultivo se ha ampliado significativamente bajo diversas condiciones de crecimiento (9), entre las que se encuentran las condiciones climáticas, por lo que el fruto es cosechado en regiones áridas (Asia y América) tropicales y subtropicales (cuenca del Mediterráneo y África) donde la luz solar es intensa, los inviernos suelen ser suaves con temperaturas no menores a -12°C, con veranos secos y calurosos sin precipitaciones pluviales durante las últimas etapas de desarrollo del fruto, permitiendo llegar a condiciones óptimas al fruto para ser cosechado (9,10).

1.1.4 Condiciones de almacenamiento del fruto

Los principales problemas que se presentan durante el almacenamiento de la granada, son: la pérdida de peso y la reducción del tamaño, daños en la cáscara como el oscurecimiento de la superficie (24) y el desarrollo de putrefacción del cáliz (25); por ello se han desarrollado distintas técnicas sinérgicas para su conservación y aumento de la vida de anaquel, como saneamiento con cloro y fungicidas (26), tratamientos anti-fúngicos y atmósferas controladas previo al almacenamiento en frío (27).

Se ha demostrado que las cualidades de la granada, como los niveles de metabolitos secundarios contenidos en el fruto pueden variar dependiendo la región de cultivo, por lo

que pueden cambiar al momento de ser almacenados, debido a la susceptibilidad a ataques de patógenos, por lo que se debe tener cuidado con respecto a las condiciones de almacenamiento en cada región geográfica dependiendo del tipo de cultivo obtenido (28).

1.1.5 Producción de granada

La producción de granada a nivel mundial ha incrementado y se estima que en el año 2011 el área total dedicada al cultivo de granada en el mundo fue superior a las 300,000 hectáreas, con una producción por arriba de 3 000,000 de toneladas, de las cuales más del 76% se concentró en 5 países (India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos). Sin embargo, España, Egipto e Israel, países que se encontraron por debajo de los mayores productores, con una superficie de cultivo entre 2400 y 16000 hectáreas, son los principales exportadores y desarrolladores de nuevas variedades del fruto (29). Recientemente en Estados Unidos se ha incrementado su importancia económica, debido al aumento de la demanda por parte de los consumidores (30), llevando al desarrollo de distintas tecnologías para el procesamiento de nuevos productos que incluyan dentro de sus ingredientes, a los componentes del árbol de granada (31). Entre la amplia gama de productos de valor agregado, resaltan los jugos, bebidas envasadas, mermeladas, gelatinas, vinos y suplementos nutricios para la salud (32).

1.1.5.1 Producción de granada en México

Como se mencionó previamente, México no está ubicado dentro de los principales países productores de granada a nivel mundial, esto a pesar que su territorio cuenta con diversas regiones con condiciones climáticas óptimas para su adaptación, alta productividad y buena calidad de la fruta durante el cultivo de las variedades nacionales (33). Datos reportados por el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) muestran que durante los años 2010-2013 los principales productores de granada en el país fueron Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato respectivamente, como se muestra en la Tabla 1 (34). A pesar de las propiedades funcionales del fruto, la producción de granada es pobre, posiblemente debido a la falta de tecnologías para su procesamiento y a su bajo consumo. Actualmente la granada se consume como fruto de temporada y se usa como ingrediente en preparaciones gastronómicas y en

menor proporción como producto fresco (33,35).

1.1.5.1.1 Producción de granada en Hidalgo

Los municipios con mayor producción del fruto dentro del estado de Hidalgo, en su mayoría pertenecen a la región del Valle del Mezquital, en donde Tasquillo, Chilcuautila y Metztlán se encuentran en los primeros lugares de la producción estatal total (Tabla 2) (34).

Tabla 1. Producción Nacional de granada del año 2010 al 2013.

Estado	Producción	Producción	Producción	Producción
	2010	2011	2012	2013
	Toneladas	Toneladas	Toneladas	Toneladas
Aguascalientes	24.00	8.00	---	---
Baja california	21.00	22.40	36.00	36.50
Coahuila	125.00	110.00	70.00	100.00
Colima	140.75	130.10	114.00	60.00
Guanajuato	676.00	524.00	1,076.50	933.00
Hidalgo	1,092.50	983.00	911.80	963.10
Jalisco	63.00	57.84	55.50	58.00
Estado de México	164.00	231.50	37.50	254.50
Michoacán	40.80	48.00	40.00	32.40
Morelos	0.00	0.00	90.00	100.00
Oaxaca	1,200.67	1,362.88	1,224.04	1,471.57
Puebla	40.50	138.00	134.80	143.25
Querétaro	12.00	10.75	11.00	10.25
San Luis Potosí	55.08	54.00	46.35	55.80
Sonora	704.00	360.00	586.92	145.00
Zacatecas	12.07	11.40	10.50	11.94
Total	4,371.37	4,051.87	4,444.91	4,375.31

Fuente: SIAP (34).

1.1.6 Composición nutricional de la granada

La parte comestible del granado (fruto) es una fuente rica en vitaminas como la vitamina C y K, minerales (potasio, calcio, fósforo y hierro) y nutrientes con un bajo contenido calórico. Está compuesta principalmente por agua, hidratos de carbono y en una menor cantidad grasas y proteínas y tiene una pequeña cantidad de fibra dietética en la semilla. (Tabla 3) (4,36).

Tabla 2. Producción de granada en el estado de Hidalgo del año 2010 al 2013.

Municipio	Producción	Producción	Producción	Producción
	2010	2011	2012	2013
	Toneladas	Toneladas	Toneladas	Toneladas
Chilcuaautla	280.00	240.00	200.00	260.00
Metztitlán	67.50	75.00	60.00	61.50
San Agustín Metzquititlán	60.00	66.00	66.60	60.40
Tasquillo	625.00	546.00	529.20	504.00
Tecoautla	35.00	32.00	36.00	54.00
Zimapán	25.00	24.00	20.00	23.20
Total	1,092.50	983.00	911.80	963.10

SIAP (34)

1.1.7 Compuestos bioactivos del granado

Las distintas partes del granado contienen diversos compuestos con diversa actividad biológica de interés y en la última década se ha reportado en la literatura científica el establecimiento de posibles mecanismos farmacológicos del fruto, así como, los compuestos químicos responsables de esta actividad. Algunos estudios han dilucidado que extractos provenientes de la corteza, raíces, flores y hojas del árbol tienen beneficio medicinal (37,38). Diversos esfuerzos se han realizado para poder identificar los constituyentes del granado (principalmente del fruto), llevando al aislamiento y caracterización de la estructura de diversos compuestos los cuales han sido categorizados como compuestos polifenólicos incluyendo a taninos, flavonoides, alcaloides, ácidos orgánicos, triterpenos y esteroides, entre otros (38). Los fenoles totales se encuentran en una concentración de 250 mg/100 mL

de jugo, siendo elevada en comparación con el vino tinto (203 mg/100mL) y el té verde (103 mg/100 mL) (6,39).

Tabla 3. Composición nutricional por cada 100 g de porción comestible de granada.

Constituyente	Concentración
Agua (g)	80-82.3
Energía (kcal)	63-78
Proteínas (g)	05-0.95
Lípidos (g)	0.3-0.9
Carbohidratos (g)	16.4
Fibra (g)	0.2-0.6
Cenizas (g)	0.5
Potasio (mg)	259
Fósforo (mg)	8.0
Calcio (mg)	3.0
Sodio (mg)	3.0
Hierro (mg)	0.3
Vitamina C (mg)	4-6
Vitamina K (mg)	4.6
Ácido pantoténico (mg)	0.596
Vitamina B1 (mg)	0.03
Vitamina B2 (mg)	0.03
Vitamina B3 (mg)	0.03

Dipak, et al. (4)

1.1.7.1 Taninos

Los taninos hidrolizables de diversas estructuras incluyen elagitaninos y galotaninos, siendo los compuestos mayoritarios contenidos en diversas partes del árbol de granada. Los galotaninos se encuentran principalmente en hojas (raramente reportado en otras partes del árbol) pueden ser considerados como derivados del ácido gálico (40). Los elagitaninos principalmente se encuentran en la corteza del árbol, el pericarpio, flores y semillas (38,41,42). La punicalagina (Figura 2B) y la punicalina (Figura 2C) son los principales elagitaninos presentes en el pericarpio y cáscara del fruto, en menor cantidad en la corteza y prácticamente indetectables en las hojas. Este tipo de compuestos son derivados del ácido

elágico (Figura 2A), el cual es abundante en todas las partes del árbol y su contenido puede ser mayor a 0.1% en las flores y hasta 0.2% en el pericarpio y hojas (40).

1.1.7.2 Flavonoides

Los flavonoides que se han aislado a partir de la granada incluyen flavonas, flavonoles y antocianidinas, siendo los dos últimos, los compuestos responsables del color brillante del jugo y pericarpio, aumentando o disminuyendo la concentración dependiendo del tiempo de maduración del fruto. Las flavonas y flavonoles son los flavonoides mayoritarios presentes en pericarpio y hojas (38).

1.1.7.3 Alcaloides

La presencia de alcaloides, principalmente pertenecientes al grupo de las piperidinas (peletierinas, pseudopeletierinas, isopeletierinas y metil-iso-peletierinas) ha sido reportado en el fruto, en las cortezas de la raíz y del tallo del árbol (43). Del mismo modo han sido encontrados otros alcaloides los cuales pertenecen al grupo de las pirrolidinas en raíz y tallo (44).

1.1.7.4 Ácidos orgánicos

Las semillas son ricas en ácidos grasos insaturados, incluyendo ácido punícico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linolénico, aportando un aproximado de 15.26% del peso total de la semilla (5,45). El jugo contiene principalmente ácidos grasos de cadena lineal, de los cuales los ácidos cítrico y málico son los compuestos principales, con un contenido cercano a 4.85 y 1.75 g/L respectivamente (46). Ácidos fenólicos como el gálico (Figura 2D), caféico, fumálico, clorogénico y p-cumárico, usualmente están presentes en el jugo y el pericarpio (47–49).

1.1.7.5 Triterpenos y esteroides

Triterpenos sin glicosidación son frecuentemente encontrados en flores y en semillas. Estos compuestos incluyen a los ácidos ursólico, oleanólico, maslínico, punicanólico, betulínico y friedelina (50,51). Esteroides como el estigmasterol, campesterol, β -citosterol, daucosterol y esteroides sexuales como estrona, testosterona, y estriol se encuentran únicamente en la semilla del fruto (38,52,53).

1.1.7.6 Otros compuestos

Han sido reportados otros compuestos en la parte comestible del fruto como cumarinas y lignanos en la semilla (41) y sacáridos como glucosa, fructosa y sacarosa en el jugo (54).

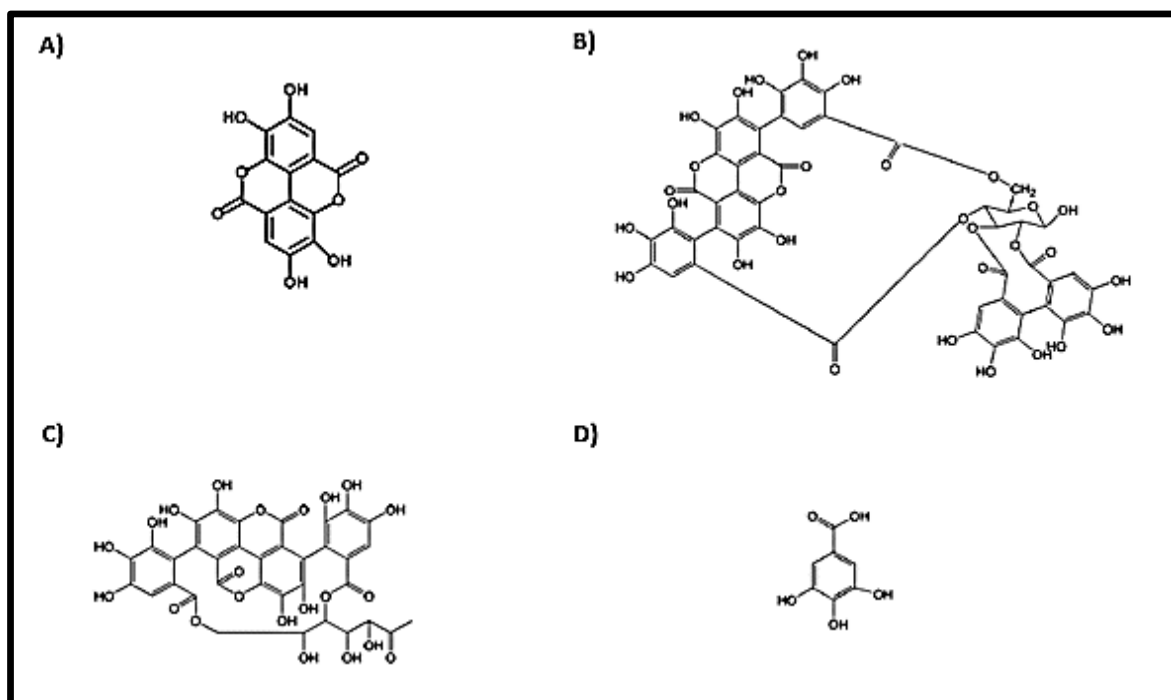


Figura 2. Estructura química de los principales compuestos bioactivos del árbol de granada. Elagitaninos derivados del ácido elágico (A): punicalagina (B) y punicalina (C). Ácido gálico (D). Modificado de Mertens-Talcott, *et al.* (30) y Medjakovic, *et al.* (23).

1.1.8 Variaciones en contenido de compuestos bioactivos

Las variaciones en el contenido de los componentes del árbol y fruto de la granada dependen de distintos factores como: la región de cultivo, el clima, la madurez del fruto, las prácticas de cultivo y las condiciones de almacenamiento (49,55,56), ocasionando diferencias significativas en el contenido de ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, azúcares, vitaminas hidrosolubles y minerales (57–61). Se ha reportado que la variedad mexicana de granada cosechada en el estado de Guanajuato presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con la variedad Wonderful, la cual es la más cosechada y comercializada a nivel mundial. La variedad dulce de granada mexicana en contenido de fenoles solubles totales (14639.2 mg EAG/L), flavonoides (1557.3 mg EQ/L), taninos totales (28136.3 mg EC/L) y antocianinas (402.7 mg EC3 G/L) presenta un contenido mayor de este tipo de compuestos en comparación con la variedad Wonderful, la cual para fenoles totales presenta 12524.8 mg EAG/L, para flavonoides 1779.38 mg EQ/L, para taninos totales 12669.5 mg EC/L y en el caso de antocianinas 113.91 mg EC3 G/L. la única variación en la que la granada mexicana muestra un contenido inferior es en el contenido de punicalaginas, ya que la granada dulce contiene 13.78 mg/L a diferencia de la Wonderful la cual contiene 15.34 mg /L (62).

1.1.9 Bioactividad de la granada

1.1.9.1 Propiedades terapéuticas

Desde la antigüedad, se le han atribuido a la granada distintos usos terapéuticos, por lo que ha llegado a ser considerada como un alimento funcional, esto debido a los componentes contenidos en las partes distintas del árbol y fruto (8,63). Una variedad amplia de extractos obtenidos a partir de los componentes de la granada se han utilizado en distintos países del mundo como medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades como disentería, acidosis, helmintiasis, hemorragias y enfermedades respiratorias (64–66). En la actualidad, el auge que ha tenido el consumo del fruto principalmente, ha ido en aumento, debido a que estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* han demostrado diversos beneficios a la

salud, especialmente los compuestos fenólicos (1,4,8,23). Las sustancias antioxidantes presentes principalmente en hojas y fruto del árbol han sido estudiadas extensamente, debido a su alta capacidad antioxidante, siendo ésta la base para el estudio de otras actividades. Se ha reportado que el jugo y el extracto acuoso de la hoja pueden atrapar efectivamente radicales libres como las especies reactivas de nitrógeno, óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno (ERO) dentro de las que destacan el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, siendo sus efectos superiores significativamente, comparados con extractos de otros frutos (67–70). Como protector vascular, los extractos del fruto (pericarpio, jugo y semilla) y la hoja han demostrado efectos benéficos en estudios de regulación de lípidos en sangre (57,71–75). Un ejemplo de ello es que se ha reportado que la fracción activa en las hojas para la regulación lipídica, son los taninos, los cuales pueden disminuir el colesterol total, lipoproteínas de muy baja densidad y triglicéridos, aumentando la concentración de colesterol de alta densidad, por lo tanto juega un papel positivo en el tratamiento de desórdenes metabólicos lipídicos y obesidad (74). La actividad antihipertensiva de los polifenoles de la granada, ha sido principalmente reportada en el jugo y pericarpio, encontrándose disminución en la presión sistólica y disminución del daño por estrés oxidativo en estudios *in vivo* (68,76–78). Estudios realizados en los últimos años, también han demostrado que diversos constituyentes de la granada como el jugo, presentan efectos positivos en la prevención de la aterogénesis y atenuación de la aterosclerosis, incrementando la expresión y actividad de enzimas antioxidantes como la paraoxonasa-1 tanto en modelos animales como en humanos (79,80). Como anticarcinogénicos, ensayos realizados usando distintos extractos (jugo, aceite de la semilla y cáscara) en células cancerígenas provenientes de la próstata tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado potencialmente la disminución en la invasión y proliferación de estas células, mediante disrupción del ciclo celular, inducción a apoptosis e inhibición de crecimientos tumorales, demostrando un efecto sinérgico de extractos provenientes de las distintas partes del fruto que el tratamiento con un solo extracto (52,81,82). Extractos de la flor de granada se han usado en experimentos en ratas para probar su potencial hipoglucemiante, observándose una mejoría en la sensibilidad a insulina (4,79) y disminuyendo esteatosis hepática en modelos animales con diabetes tipo 2 y obesidad (83). En el caso del consumo del jugo, investigadores han concluido que a pesar de los azúcares presentes naturalmente, éstos no

provocan eventos de hiperglucemia o hipoglucemia en pacientes con diabetes (84). Como antiviral, los taninos que se encuentran presentes en el pericarpio y jugo, juegan un papel especial en el efecto antiviral, debido que tiene la característica de poder precipitar proteínas, lo cual afecta adversamente a las enzimas involucradas en el ciclo de vida del virus (38), por lo que diversos estudios han demostrado el potencial de extractos de polifenoles, y principalmente de punicalaginas, que pueden inactivar distintos tipos de virus (85–88).

1.1.9.1.1 Propiedades antibacterianas

Históricamente las enfermedades producidas por patógenos han ido en aumento, siendo causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y actualmente, debido al incremento de patógenos resistentes a fármacos, existe especial interés en la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas de fuentes naturales y en este sentido el uso de plantas y preparaciones hechas a base de ellas para tratar infecciones es una práctica milenaria que se realiza en distintas regiones de la población mundial, especialmente en países en vías de desarrollo donde hay dependencia de la medicina tradicional para tratar una variedad amplia de enfermedades infecciosas y no infecciosas (89–92). Diversas plantas medicinales usadas tradicionalmente, producen distintos compuestos variados de propiedades terapéuticas conocidas, siendo opciones viables para inhibir el crecimiento de patógenos o matarlos sin presentar toxicidad en las células huésped; siendo buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos ya que en comparación con compuestos químicos sintéticos, suele haber efectos secundarios que pueden manifestar, o a la aparición o reaparición de organismos patógenos y a su resistencia a antibióticos (93). Las investigaciones con compuestos derivados de plantas son reportadas con mayor frecuencia en distintas partes del mundo (94–97).

La granada tiene una larga historia como antibacteriano que se remonta a los tiempos bíblicos, donde los egipcios usaron granadas para tratar diferentes infecciones (43,66). A través de los años ha habido estudios realizados en distintas partes del mundo, evaluando los efectos antibacterianos en distintas cepas de bacterias patógenas, no patógenas y resistentes a antibióticos. Estos estudios normalmente determinan la potencia bactericida y bacteriostática de los diferentes extractos de la planta de granada contra una gama amplia de

cepas, usando ensayos *in vitro* de difusión en disco para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Estos extractos han demostrado en investigaciones diversas tener actividad antimicrobiana frente a una variedad amplia de microorganismos que pueden influir en la salud humana, entre los que se encuentran *Aeromonas hydrophila*, *Helicobacter pylori*, *Aeromonas sobria*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Chryseobacterium sp.*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paraaeruginosa*, *Salmonella aeruginosa*, *Salmonella aeruginosamurium*, *Salmonella enterica serovars*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, y *Shigella spp.* (19,43,98–103). Los extractos usados para estos estudios fueron obtenidos de diferentes partes del fruto (fruto total, cáscara, arilo, jugo y pericarpio) utilizando distintos disolventes (Tabla 4). Se ha observado que en general los extractos metanólicos del fruto y en específico la cáscara muestran una mayor actividad antibacteriana (100,104–108), aunque esto puede diferir dependiendo de la variedad de granada estudiada (98). Los extractos metanólicos son ricos en taninos hidrolizables (punicalinas y punicalaginas), ácido elágico y ácido gálico, y se cree que estas moléculas pueden ser las responsables de la actividad antibacteriana del fruto (1,106); por otro lado, existe la idea de que moléculas como las antocianinas y flavonoles presentan actividad antibacteriana sinérgica con los compuestos antes mencionados (109). Existen reportes que sustentan que la actividad antibacteriana es mayor contra bacterias Gram positivas (Gram +) en comparación con bacterias Gram negativas (Gram -) (106).

1.2 Extractos de plantas medicinales

Los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos a partir de plantas dependen principalmente del método de extracción (110). La extracción es el primer paso crucial en el análisis de plantas medicinales, ya que es necesaria para extraer los componentes químicos deseados a partir de los materiales vegetales para su posterior separación y caracterización, por lo que juega un papel importante en el desarrollo de las investigaciones y sus resultados. La operación básica de extracción incluye pasos como el secado de los materiales vegetales,

molienda para obtener una muestra homogénea, y a menudo la mejora de la cinética de extracción aumentando el contacto de la muestra con el disolvente (111). La extracción con disolventes es el método más usado (112), por lo que su selección depende en gran medida de la naturaleza química específica del compuesto bioactivo a aislar. La extracción de compuestos hidrofílicos utiliza disolventes polares, tales como metanol, etanol o acetato de etilo. Para la extracción de compuestos lipofílicos, puede utilizarse hexano, diclorometano o una mezcla de diclorometano/metanol en una proporción 1:1 (113). Como los compuestos blanco pueden ser polares o no polares y termolábiles, deben tomarse en cuenta distintos aspectos que pueden afectar el proceso de extracción, como las propiedades de la parte de la planta, el disolvente, la temperatura, la presión y el tiempo (114).

1.2.1 Métodos de extracción en plantas

Diferentes métodos de extracción han permanecido vigentes durante siglos y una gran variedad de procedimientos nuevos han surgido en las últimas décadas, que pueden ser utilizados para obtener extractos a partir de materiales de plantas, los cuales también pueden ser usados para extraer compuestos bioactivos (110). La obtención de extractos de plantas puede hacerse por métodos no convencionales y convencionales.

Tabla 4. Extractos de partes de la planta de granada evaluados en cepas de bacterias.

Parte de la planta	Extracto	Referencia
Cáscara	Metanólico	(100)
	Butanólico	(115)
	Hexánico	(115)
	Acetato de etilo	(115)
	Acuoso	(102,116–118)
Fruto Completo	Etanólico	(99,101,103,119)
	Acuoso	(101,119,120)
	Acetato de etilo	(121)
Arilo	Acuoso	(98,122)
Jugo	Acuoso	(120)

1.2.1.1 Métodos no convencionales de extracción

Los métodos no convencionales se han desarrollado durante los últimos 50 años y aunque implican costos mayores en su procedimiento, suelen ser menos dañinos al medio ambiente debido a la disminución del uso de productos químicos sintéticos y orgánicos, la reducción del tiempo de funcionamiento y un mejor rendimiento y calidad del extracto, aunque esto implique un mayor costo. Los métodos más destacados son el ultrasonido, campo eléctrico pulsantes de digestión enzimática, extrusión, de calentamiento óhmico, fluidos superficiales y extracción acelerada de disolventes (123).

1.2.1.2 Métodos convencionales de extracción

A partir de plantas se pueden obtener extractos y sus compuestos bioactivos por diversas técnicas de extracción clásicas. La mayoría de estos procedimientos se basan en la extracción por medio del uso de disolventes, aplicación de calor y/o de mezclas. Entre los métodos clásicos más utilizados se encuentran la extracción en Soxhlet, hidrodestilación, percolación y maceración (112,123).

1.2.1.2.1 Maceración de plantas

La maceración de plantas ha sido utilizada durante siglos para la preparación casera de tónicos, convirtiéndose en una forma popular, práctica y económica para la obtención de extractos y aceites esenciales. Este método se usa para la extracción de materiales volátiles y/o termolábiles, ya que es una extracción en frío de material sólido pulverizado en cualquier disolvente (123,124). Para la extracción a pequeña escala, la maceración consiste en una serie de pasos; en primer lugar, la molienda de los materiales de las plantas en pequeñas partículas se utiliza para aumentar el área superficial de contacto, generando una mezcla adecuada con el disolvente. En segundo lugar, en el proceso de maceración, el disolvente apropiado es añadido en un recipiente cerrado para posteriormente ser separado el líquido de la muestra sólida y por medio de filtración eliminar impurezas que puedan existir en el

líquido recuperado. La agitación ocasional puede favorecer la extracción aumentando la difusión del material para obtener mayor rendimiento del extracto objetivo (123,125).

1.3 Pruebas *in vitro* de susceptibilidad antimicrobianas

La realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tienen como objetivo evaluar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos para detectar la resistencia de patógenos comunes y asegurar la susceptibilidad a fármacos específicos para infecciones particulares, ya que existen especies que pueden poseer mecanismos de resistencia adquiridos, por ejemplo cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Enterococcus* y *Streptococcus pneumoniae*. Los métodos de prueba más utilizados incluyen micro-dilución en caldo o métodos automatizados. Los métodos manuales que proporcionan flexibilidad y posibles ahorros de costos incluyen los métodos de difusión en disco y los métodos de difusión de degradado. Cada método tiene sus puntos fuertes y débiles, incluidos los microorganismos que pueden ser probados con precisión. Algunos métodos proporcionan resultados cuantitativos (por ejemplo, la CMI), y todos proporcionan resultados cualitativos utilizando las categorías susceptible, intermedio o resistente. En general, los métodos de prueba actuales proporcionan una detección precisa de mecanismos comunes de resistencia antimicrobiana (126).

1.3.1 Prueba de dilución en caldo

Uno de los métodos más antiguos en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el método de dilución en tubo. Este procedimiento implica la preparación de diluciones seriadas de antibióticos en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos de ensayo (127). Actualmente, debido a la practicidad en la mecanización y al ahorro en el uso de reactivos, se ha vuelto más popular el uso de volúmenes pequeños (microdiluciones) para el desarrollo de la prueba, empleando microplacas de 96 pozos. La concentración más baja encontrada del antibiótico que inhibe el crecimiento es considerada como CMI, considerada como una ventaja de la prueba, ya que genera un resultado cuantitativo (126,128).

1.3.2 *Prueba de difusión en disco*

El método de difusión en disco, es un método simple y práctico para realizar pruebas de susceptibilidad mediante la aplicación de inóculos bacterianos en superficies de agar generalmente Mueller-Hinton, colocando los discos previamente impregnados con concentraciones fijas del antibiótico a evaluar. Las placas se incuban 24 horas a 37°C antes de la determinación de los resultados. Las zonas de inhibición de crecimiento en torno a cada uno de los discos de antibióticos se miden en milímetros (mm) (127,129,130). El diámetro de la zona de inhibición se relaciona con la susceptibilidad de la cepa evaluada y su interpretación se realiza utilizando los criterios publicados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, pos sus siglas en inglés). Los resultados de la prueba de difusión en disco son cualitativos, en los que una categoría de susceptibilidad (susceptible, intermedio o resistente) es derivada de la prueba en lugar de la CMI (131).

1.3.3 *Prueba de cuenta viable*

Cuando se requiere investigar el número de células viables, el método comúnmente utilizado, es el conteo en placa por diluciones seriales, por lo que permite realizar una estimación cuantitativa de microorganismos viables presentes en una variedad amplia de muestras, por ejemplo alimentos, agua potable y agua purificada. Este método se realiza mediante el conteo de colonias en un medio sólido (agar) después de un cierto tiempo y temperatura de incubación aeróbica, asumiendo que cada colonia formada en la placa proviene de una célula de la muestra en estudio y sus resultados son reportados en unidades formadoras de colonias (UFC) (132).

III. JUSTIFICACIÓN

Históricamente, las enfermedades infecciosas han contribuido en las tasas de morbilidad y mortalidad humana, y en la actualidad siguen siendo una de las causas de muerte mas frecuentes en el mundo (90). Dentro de estas enfermedades, se encuentran las infecciones gastrointestinales, que representan un asunto importante para la industria alimentaria, los servicios de salud y para los consumidores de alimentos en general. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se presentan mil millones de episodios de diarrea ocasionada por infecciones en niños menores de 5 años, ocupando el tercer lugar de causas de mortalidad con 5 millones de decesos (91,92). En México, la Secretaría de Salud ha reportado que las enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias o parásitos, son la decimocuarta causa de muerte a nivel nacional, convirtiéndose en un problema de salud pública para el país (133). La proliferación y resistencia de estos patógenos a antibióticos, ha dado pauta a realizar investigaciones basadas en terapias naturales con el uso de compuestos bioactivos que puedan presentar un beneficio en el mantenimiento de la salud humana (134). La presencia de estos compuestos principalmente en el fruto del árbol de granada y sus propiedades terapéuticas reportadas, entre las que destaca su actividad antibacteriana (8,35,119) ha repercutido en la última década en el aumento de la producción y consumo del fruto en fresco o adicionado a productos a partir de extractos (32) y México, aunque no figura como productor mundial, cuenta con distintas regiones dedicadas a su cosecha y comercialización. Se conoce que la presencia y contenido de compuestos químicos en el árbol y principalmente en el fruto pueden variar dependiendo de distintos factores (ambientales, de almacenamiento, madurez, región y prácticas de cultivo), repercutiendo en sus propiedades. En la actualidad no existen reportes de pruebas antibacterianas realizadas con extractos de la variedad mexicana de granada y es por ello que en el presente trabajo, se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos orgánicos provenientes de componentes del árbol de granada roja mexicana en 11 cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos, con la finalidad de demostrar y sugerir que sus componentes pueden ser utilizados como antibacteriano de origen natural para la prevención y tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias.

IV. HIPÓTESIS

Las extracciones orgánicas y residuo acuoso de diversas partes del árbol de granada roja mexicana tienen actividad antibacteriana en 11 cepas bacterianas de importancia médica y alimentos.

V. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Evaluar la actividad antibacteriana de extractos orgánicos y residuo acuoso provenientes del fruto (cáscara, pericarpio, jugo y semilla) y hojas de árbol de granada en cepas de bacterias de importancia médica y alimentos.

5.2 *Objetivos específicos*

1. Obtener e identificar botánicamente el fruto y hojas del granado a utilizar.
2. Obtener extracciones orgánicas de hoja, cáscara, pericarpio y semilla del árbol de granada por maceración con disolventes en polaridad creciente (Hexano, Acetato de Etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH)).
3. Obtener extracciones orgánicas y residuo acuoso del jugo de granada por extracción líquido-líquido con disolventes en polaridad creciente (AcOEt y n-Butanol (n-BuOH)).
4. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos contra 11 cepas de bacterias mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de micro-dilución y mediante la determinación de susceptibilidad por el método de difusión en placa bajo los criterios del CLSI.

5. Evaluar el efecto bacteriostático o bactericida de los extractos que presenten concentración mínima inhibitoria por medio del método de cuenta viable en placa.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 *Tipo de estudio*

La presente investigación es de tipo experimental y fue realizada en los Laboratorios de Investigación Farmacéutica y Nutrigenómica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

6.2 *Material botánico*

Los componentes del granado que se usaron para realizar el presente estudio (hojas y fruto) fueron colectados en el mes de agosto del año 2012 en la localidad de Caltimacán, municipio de Tasquillo, Hidalgo (latitud N20°32'53''; longitud O99°18'46''; altitud 1655 m). Una muestra de las hojas, tallo y fruto de la planta fueron secadas e identificadas botánicamente por el Mtro. Manuel González Ledesma en el Centro de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, quedando en el Herbario para su archivo (Figura 3).

6.3 *Obtención de las muestras a analizar del granado*

El material recolectado fue lavado con agua destilada y en el caso del fruto fue pelado y se separaron sus componentes. Para la separación del jugo y la semilla del fruto, se exprimó el arilo con ayuda de un exprimidor de presión manual casero previamente lavado y desinfectado.

6.3.1 *Hoja, cáscara y pericarpio*

Para obtener los extractos orgánicos de la hoja, cáscara y pericarpio de la planta de la granada, posterior a su separación, se pesaron 500 g de muestra previamente almacenada, secada a la sombra y a temperatura ambiente (20-25°C) durante 20 días, la cual posteriormente fue triturada en un molino manual casero para ser macerada durante 8 días

en matraces con 5L de disolvente en polaridad creciente (hexano, AcOEt y MeOH) y a temperatura ambiente, los macerados se agitaron diariamente para favorecer el proceso de extracción. Posteriormente el disolvente se sometió a filtración para eliminar impurezas y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi Laboratorium Tecnicks, Switzerland) con condiciones de presión y temperatura específicas de acuerdo al disolvente utilizado (Tabla 5). Posteriormente, se recuperó el extracto y se secó en una estufa de vacío a 40°C por 2 horas, con el objetivo de evitar que pudieran intervenir en la evaluación biológica posibles restos de los disolventes utilizados. Los extractos obtenidos fueron: de la hoja: extractos hexánico (EHH), de AcOEt (EAH), y metanólico (EMH); de la cáscara: extractos hexánico (EHC), de AcOEt (EAC), y metanólico (EMC); del pericarpio: extractos hexánico (EHP), de AcOEt (EAP), y metanólico (EMP).


 Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
 Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas

***Punica granatum* L.**

PUNICACEAE

MÉXICO. Estado de Hidalgo. Mpio. Tasquillo,
Caltimacán. Cultivada.

N 20° 32' 53''
O 99° 18' 46''

Altitud 1655 m. 15 junio 2013

G. Betanzos Cabrera 10

Proyecto: "Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de
Extractos Orgánicos de los Componentes de la Granada
(*Punica granatum* L.)". ICSA, UAEH.

Figura 3. Ficha de identificación botánica de la planta de granada.

Tabla 5. Lista de disolventes, presiones y temperaturas para rotaevaporación (135).

Disolvente	Vacío	Temperatura de ebullición
Hexano	360 mbar	40°C
AcOEt	240 mbar	40°C
n-BuOH	25 mbar	40°C
MeOH	337 mbar	40°C
Agua	72 mbar	40°C
Büchi (135)		

6.3.2 Semilla

En la obtención de los extractos orgánicos de la semilla del fruto de la granada, posterior al estrujado de los arilos y separación del jugo, 500 g de semilla fresca fue triturada en un molino manual casero para ser macerada durante 8 días en matraces con 5L de disolvente. Los disolventes fueron usados en polaridad creciente (hexano, AcOEt y MeOH) y a temperatura ambiente, siendo agitados diariamente para favorecer el proceso de extracción. Posteriormente el disolvente se sometió a filtración para eliminar impurezas y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador con condiciones de presión y temperatura específicas de acuerdo al disolvente utilizado (Tabla 5). Posteriormente, se recuperó el extracto y se secó en una estufa de vacío a 40°C por 2 horas, con el objetivo de evitar que pudieran intervenir en la evaluación biológica posibles restos de los disolventes utilizados. Los extractos obtenidos de la semilla fueron: extracto hexánico (EHS), de AcOEt (EAS) y metanólico (EMS).

6.3.3 Jugo

En la obtención de los extractos orgánicos del jugo del fruto de granada, posterior al estrujado de los arilos y separación de la semilla, se realizó una extracción líquido-líquido, colocando durante 24 horas y a 4°C, 2 L de jugo en un matraz con 5 L de disolvente. Los disolventes fueron usados en polaridad creciente (AcOEt y n-BuOH), siendo agitados cada 4 horas para favorecer el proceso de extracción. Posteriormente la mezcla se colocó en un matraz de decantación y se separó el disolvente de la fase acuosa. Posterior a la extracción con los dos disolventes utilizados, se recuperó la fase acuosa y al igual que la fase no acuosa,

se sometieron a filtración para eliminar impurezas y se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador con condiciones de presión y temperatura específicas de acuerdo al disolvente utilizado y en el caso de la fase acuosa, se contemplaron las condiciones de evaporación del agua (Tabla 5). Posteriormente, se recuperaron los extractos y el residuo acuoso y fueron secados en una estufa de vacío a 40°C por 2 horas, con el objetivo de evitar que pudieran intervenir en la evaluación biológica posibles restos de los disolventes utilizados. Los extractos obtenidos del jugo fueron los siguientes: de AcOEt (EAJ), butanólico (EBJ) y residuo acuoso (RAJ).

6.4 *Determinación de porcentajes de rendimiento*

Las 15 fracciones obtenidas, fueron colocadas en viales de vidrio con tapa, previamente rotulados y tarados. Posteriormente los viales fueron pesados para determinar el porcentaje de rendimiento en base a la cantidad de muestra utilizada al inicio de la extracción y fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

6.5 *Pruebas de solubilidad*

Se realizaron pruebas de solubilidad de los extractos con los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% y 10%, Tween 80, agua desionizada y etanol (EtOH) al 70% y 99%, presentando mayor efectividad para disolver los extractos el agua desionizada y el EtOH al 99% (Tabla 6) a excepción del EHS, debido a su naturaleza líquida, por lo que no se disolvió.

6.6 *Material biológico*

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos del árbol de granada, se evaluaron 11 cepas bacterianas, donadas por el Dr. Oscar Rodas Suárez del Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas estudiadas fueron: *Enterobacter sakazakii* (ATCC 29004) (*E. sakazakii*), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (*E. faecalis*), *Escherichia coli* (ATCC 10536) (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.*

pneumoniae), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114) (*L. monocytogenes*), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhi* (ATCC 6539) (*S. typhi*), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) (*S. flexneri*) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (*S. aureus*).

Tabla 6. Pruebas de solubilidad de extractos del árbol de granada.

Disolvente	DMSO		Tween 80		Agua desionizada	EtOH	
Concentración	5%	10%	5%	10%		70%	99%
EAJ	+	+	-	-	+	-	+
EBJ	+	+	-	-	+	+	-
RAJ	+	+	-	-	+	+	-
EHC	-	-	-	-	-	-	+
EAC	+	+	-	-	-	-	+
EMC	+	+	-	-	+	+	-
EHP	-	-	-	-	-	-	+
EAP	+	+	+	+	-	-	+
EMP	+	+	-	-	+	+	-
EHH	-	-	-	-	-	-	+
EAH	-	-	-	-	-	-	+
EMH	+	+	-	-	+	+	-
EHS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EAS	-	-	+	+	-	-	+
EMS	+	+	+	+	+	+	-

(+): Soluble. (-): Insoluble. NA: No aplica.

6.6.1 Propagación y conservación de las cepas bacterianas

Para la propagación de las cepas bacterianas usadas, se sembraron en 5 mL de Caldo Soya Trypticaseina (TSB) (Bioxon) estéril y se incubaron a 37°C por 24 horas. Para la conservación, se mezclaron 500 µL de cada una de las cepas crecidas con 500 µL de glicerol estéril en crioviales estériles de 1.8 mL, se homogeneizaron en vórtex y fueron congeladas a -70°C hasta el momento de su uso.

6.7 *Evaluación de la actividad antibacteriana*

La evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizó *in vitro* por los métodos de difusión en disco y micro-dilución en caldo y la determinación del efecto bactericida o bacteriostático por el método de cuenta viable en placa.

6.7.1 *Preparación del inóculo*

Las 11 cepas se inocularon en tubos de ensayo, colocando una asada de cada una de ellas en 3 mL de medio TSB en condiciones estériles y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se inocularon 100 µL del medio de cultivo de cada cepa en tubos de ensayo con 2.9 mL de TSB y se incubaron en agitación durante 6-8 horas hasta alcanzar 0.5 U en la escala del nefelómetro de Mc Farland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL).

6.7.2 *Preparación de diluciones de los extractos evaluados*

Se prepararon soluciones de 500 mg/mL de los extractos, diluidos en agua desionizada y EtOH al 99%, dependiendo de la solubilidad de los extractos mencionada previamente. Se homogeneizaron mediante agitación en vortex y fueron prefiltradas en filtros con membranas de 1.22 µm (Millex GV) y posteriormente en 0.45 µm, con la finalidad de eliminar partículas grandes. Finalmente las soluciones fueron esterilizadas en filtros con membranas de 0.22 µm y conservadas a 4°C hasta su utilización.

6.7.3 *Determinación de la inhibición de crecimiento por método de difusión en disco*

La evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano en difusión en disco se realizó bajo los criterios establecidos por el CLSI (136). Por triplicado, cajas de Petri con 25 mL de medio Agar de Soya Tripticaseína (TSA) (Bioxon) estéril, fueron sembradas masivamente por triplicado con cada uno de los inóculos de las cepas evaluadas, con la finalidad de obtener un césped homogéneo en la superficie del agar. Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro estériles fueron impregnados con concentraciones de 1-20 mg/µL de los extractos diluidos

previamente, y una vez secos, se colocaron en las cajas de Petri previamente sembradas con las cepas de interés. Se incluyó como control positivo un disco impregnado con Ciprofloxacina a una concentración de 5 µg/mL (91), ya que en ensayos previos fue el fármaco que presentó actividad antibacteriana en la totalidad de las cepas. Como controles negativos se incluyeron los diluyentes utilizados para homogeneizar los extractos en volúmenes iguales a los aplicados en los discos como concentración mayor, a fin de descartar cualquier actividad antimicrobiana. La distribución general de los discos impregnados con las muestras, se muestran en la Figura 4. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas y finalmente se realizaron mediciones en mm de los diámetros de inhibición en los discos con los extractos que presentaron actividad antibacteriana.

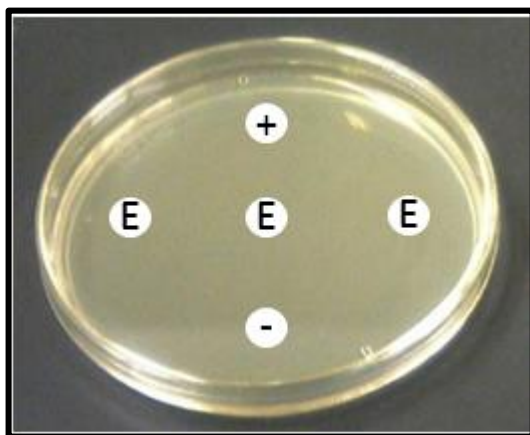


Figura 4. Distribución utilizada para el método de difusión en disco. (+): Control positivo. (-): Control negativo. (E): Extracto a diferentes concentraciones.

La susceptibilidad de las cepas evaluadas contra el extracto probado fue considerada positiva cuando se presentaron halos de inhibición iguales o mayores a 7 mm, utilizando una versión modificada de los métodos de la CLSI (103,130,136).

6.7.4 Determinación de la inhibición de crecimiento por método de micro-dilución en caldo

El método de micro-dilución se realizó bajo los criterios establecidos por el CLSI (137). En un inicio, en una microplaca de 96 pozos se colocaron 5 diluciones seriadas de 100 µL de cada extracto a probar con concentraciones finales de 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL,

10 mg/mL y 20 mg/mL (103,115,138) a los pozos previamente cargados con 100 μ L de TSB y posteriormente se agregaron 90 μ L de TSB y 10 μ L de inóculo de la cepa evaluada, obteniendo un volumen final de 200 μ L. En el caso de los extractos disueltos en EtOH, se colocaron las concentraciones exactas en cada uno de los pozos sin realizarse en cascada, y en condiciones de esterilidad se permitió la evaporación del disolvente para evitar su interferencia con la evaluación. Posteriormente se agregaron 190 μ L de TSB y 10 μ L de inóculo de bacteria. En evaluaciones posteriores, las concentraciones de los extractos fueron ajustadas de acuerdo a los resultados que se fueron presentando, con el objetivo de encontrar la CMI de cada uno de ellos. Se incluyó como control positivo (C+) Ciprofloxacina en una concentración de 5 μ g/mL, adicionada a 185 μ L de TSB y 10 μ L de inóculo de la cepa evaluada para un volumen final de 200 μ L (91). Como control negativo 1 (C1-), en 190 μ L de TSB se inocularon 10 μ L de medio con la cepa evaluada, para un volumen final de 200 μ L; como control negativo 2 (C2-), se incluyó a los diluyentes utilizados para homogeneizar los extractos en volúmenes iguales a los aplicados en cada uno de los pozos como concentración mayor, adicionando TSB y 10 μ L de inóculo de la cepa, para un volumen final de 200 μ L. Como control de esterilidad 1 (CE1) se agregó la concentración máxima del extracto probado y TSB para un volumen final de 200 μ L; como segundo control de esterilidad (CE2) se adicionaron 200 μ L de TSB. La distribución general de los extractos y controles se muestra en la figura 5. Las microplacas se incubaron en agitación a 37°C durante 48 horas. El estudio se realizó por triplicado.

La interpretación de la CMI de los extractos se determinó mediante la toma de lecturas visuales en las cuales se determinó como positiva al no presentar turbidez en los pozos comparados con los controles C+, C1-, C2-, CE1 y CE2, para la posterior medición de la inhibición del crecimiento por el método de cuenta viable.

6.7.5 *Determinación de cuenta viable por diluciones seriadas*

Se realizaron ensayos por triplicado para tener datos reproducibles del método de cuenta viable (CE) para las 11 cepas evaluadas, las cuales se inocularon en tubos de ensayo, colocando una asada de cada una de ellas en 3 mL de TSB en condiciones estériles y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se inocularon 20 μ L del medio de

cultivo de cada cepa en tubos de ensayo con 3 mL de TSB y se incubaron en agitación durante 8 horas hasta alcanzar 0.5 U en la escala del nefelómetro de Mc Farland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL). En tubos Eppendorf de 1.5 mL colocaron 190 μ L de TSB y una alícuota de 10 μ L del cultivo previamente sembrado, se agitaron en vórtex y se añadieron 100 μ L de la muestra a un tubo Eppendorf con 900 μ L de agua peptonada para obtener la dilución primaria posteriormente se realizaron 9 diluciones decimales en cascada con agua peptonada en proporción 1:10. Finalmente se tomaron alícuotas de 100 μ L de las diluciones primaria y decimales y se sembraron masivamente en cajas de Petri con TSA. Las cajas se incubaron a 37°C y se realizaron lecturas a las 48 horas. Se consideraron representativas las diluciones que presentaron el crecimiento de 30-300 UFC (132,139). Una vez seleccionadas las cajas, se promediaron los valores correspondientes de los triplicados y se calcularon las UFC, resultado de la multiplicación del número de colonias contabilizadas en la caja por el número de dilución con potencia 10 y a su vez se multiplicó por la escala utilizada (1:10) para obtener el número de UFC/mL, ejemplificado en la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = (\text{Promedio de número de colonias}) (1 \times 10^n) (10)$$

Posterior a la lectura visual de 48 horas de las microplacas, para obtener la dilución primaria se tomaron alícuotas de 100 μ L de los pozos que contenían los triplicados de las cepas y extractos evaluados y se añadieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL con 900 μ L de agua peptonada. Se realizaron 9 diluciones decimales en cascada en proporción 1:10. Finalmente se tomaron alícuotas de 100 μ L y se sembraron masivamente en cajas de Petri con TSA. Las cajas se incubaron a 37°C y se realizaron lecturas a las 48 horas. La selección de las cajas que se tomaron en cuenta para los cálculos fue considerada en base a la representatividad de las diluciones, por ello se consideraron representativas las cajas que presentaron el crecimiento de 30-300 UFC y se calcularon los logaritmos de las UFC/mL mediante la fórmula previamente descrita (132,139). Finalmente los valores obtenidos se analizaron estadísticamente en base a los valores de la estandarización de cuenta viable de las 11 cepas.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados de inhibición de crecimiento bacteriano se expresaron como la media $\pm$ DE. Para el análisis estadístico, los logaritmos de las UFC de las cepas que presentaron inhibición en su crecimiento, se realizaron pruebas de t de Student por ensayo pareado, empleando GraphPad Prism 5 software, Inc. 2007, versión 5.01, La Jolla, CA. Instat, U.S.A. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

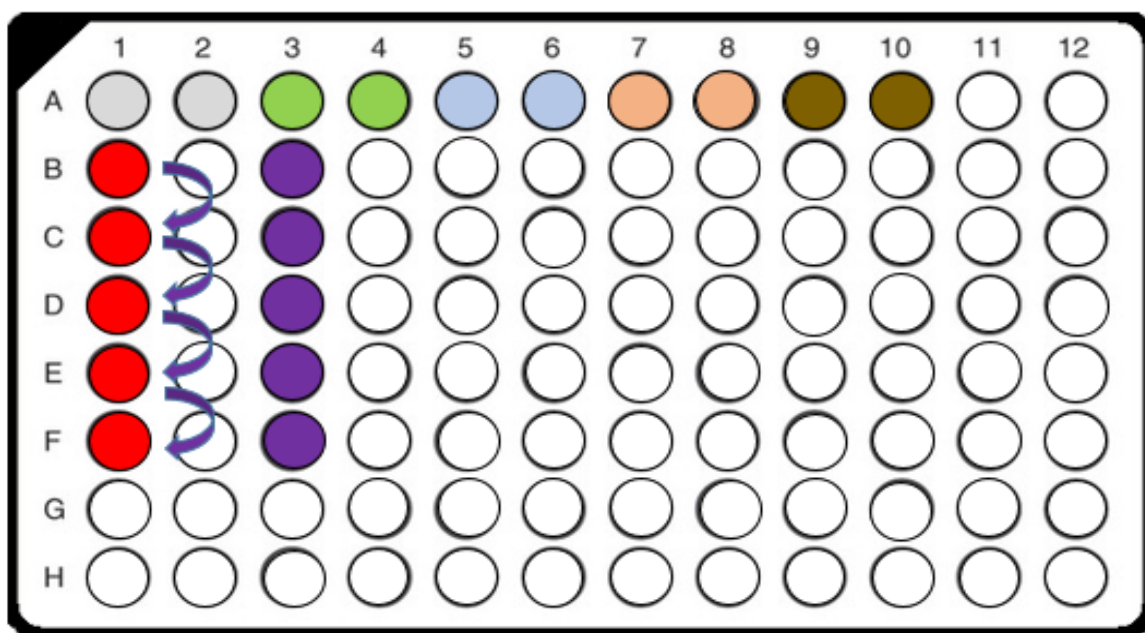


Figura 5. Distribución general de los pozos utilizada en el método de micro-dilución en caldo. A1 y A2: CE2. A3 y A4: CE1. A5 y A6: C+. A7 y A8: C1-. A9 y A10: C2-. B1-F1: Diluciones en cascada de 20-1.25 mg/mL. B3-F3: concentraciones directas de extractos diluidos con EtOH de 20-1.25 mg/mL.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención de extractos

Se obtuvo un total de 14 extractos y 1 residuo acuoso proveniente del jugo de granada. En la Figura 6 se muestran los extractos y residuo acuoso obtenidos del jugo de los arilos.

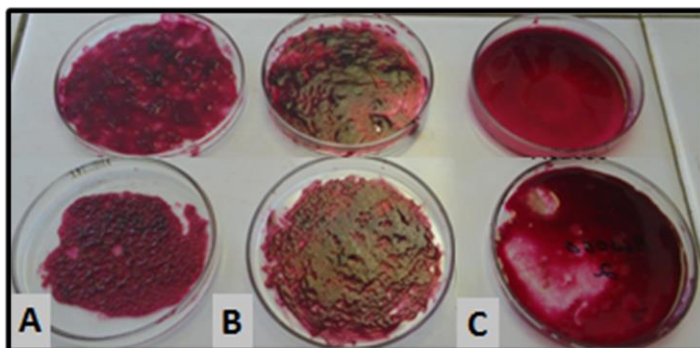


Figura 6. Extractos del jugo de arilos de granada obtenidos por extracción líquido-líquido. EAJ (A), EBJ (B) y RAJ (C).

7.2 Porcentaje de rendimiento

Posterior a la obtención de los extractos orgánicos y residuo acuoso evaluados, se obtuvo el porcentaje de rendimiento de cada uno de ellos (Tabla 7). Se puede notar que los extractos que presentaron mayor rendimiento fueron los polares: EMP (48%), EMC (30.6%), EMH (17.1%) y EMS (4.65), así como el RAJ (23.1%). En contraparte, los extractos que presentaron menor porcentaje de rendimiento fueron los no polares: EHS (0.5%), EHP y EHC (0.1%), EHH (1.3%) y EAJ (1%).

7.3 Actividad inhibitoria por difusión en disco

Se evaluaron los 15 extractos provenientes de las distintas partes del árbol de granada frente a las 11 cepas de bacterias. En la Tabla 8 se muestran los resultados de inhibición obtenidos con los extractos EAJ, EBJ y RAJ, donde se aprecia que los extractos EBJ y EAJ presentaron actividad antibacteriana en las 11 cepas evaluadas, a diferencia del RAJ, el cual solo presentó

inhibición frente a *L. monocytogenes*. Se observa que el EBJ presentó mayor efectividad a menores concentraciones en comparación con el EAJ y el RAJ. En la Figura 7 se muestran las zonas de inhibición presentadas por el EBJ frente a las cepas de *M. luteus* y *P. vulgaris*.

Tabla 7. Porcentajes de rendimiento de los extractos obtenidos de la planta de granada.

Extracto	Disolvente	Hexano	AcOEt	n-BUOH	MeOH	Residuo acuoso
Pericarpio	Peso inicial (g)	500	500	NA	500	NA
	Extracto (g)	0.82	2.40	NA	243.0	NA
	Porcentaje (%)	0.1	0.5	NA	48.6	NA
Cáscara	Peso inicial (g)	500	500	NA	500	NA
	Extracto (g)	0.60	3.80	NA	153.60	NA
	Porcentaje (%)	0.1	0.7	NA	30.6	NA
Hoja	Peso inicial (g)	500	500	NA	500	NA
	Extracto (g)	6.80	9.28	NA	85.70	NA
	Porcentaje (%)	1.3	1.8	NA	17.1	NA
Semilla	Peso inicial (g)	500	500	NA	500	NA
	Extracto (g)	2.80	15.50	NA	23.20	NA
	Porcentaje (%)	0.5	3.1	NA	4.6	NA
Jugo	Volumen inicial (L)	NA	2000	2000	NA	2000
	Extracto (g)	NA	20.1	21.8	NA	454.00
	Porcentaje (%)	NA	1.0	1.1	NA	23.1

NA: No aplica.

En la Tabla 9 se muestran las medias de inhibición obtenidas a través de la evaluación de los 3 extractos del pericarpio del fruto de la granada, en los que se observa que el EMP presentó mayor efectividad, ya que inhibió el crecimiento en las 11 cepas evaluadas y en 10 de ellas, mayor diámetro de inhibición (8-18.7 mm) a concentraciones más bajas (1-10 mg/mL) en comparación con los diámetros presentados en 8 cepas por el EAP (9-15.3 mm) con concentraciones más elevadas (3-20 mg/mL). En las pruebas realizadas con el EHC no se presentó inhibición contra las 11 cepas evaluadas. En la Figura 8 se muestran las zonas de inhibición presentadas por el EMP frente a las cepas de *M. luteus* y *S. aureus*.

Tabla 8. Diámetros de inhibición inducidos por extractos del jugo de arilos del fruto de granada.

Cepas bacterianas	Medias de diámetros de las zonas de inhibición											C+	C-
	EAJ					EBJ				RAJ			
	(mg/mL)					(mg/mL)				(mg/mL)			
	5	7	10	15	17	1	3	7	10	10	20		
<i>E. sakazakii</i>	0	0	0	9.6	10	0	0	0	8	0	0	22.3	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	8	8	8	0	0	9.33	10.3	0	0	18.3	0
<i>E. coli</i>	0	0	8	8	9.3	0	0	11.3	11.7	0	0	25.7	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	7	8.6	10	0	0	11.7	12.7	0	0	16.7	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	9	0	0	0	9.33	0	7	21.7	0
<i>M. luteus</i>	0	0	8	10.3	10.7	0	12.3	12.7	15	0	0	18.7	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	13	14	14.3	0	0	0	12	0	0	30	0
<i>P. vulgaris</i>	7.3	8	8	9	9.3	9	13.7	17	17.3	0	0	31	0
<i>S. aeruginosa</i>	0	0	19.3	20	20	0	9.33	12.3	13.3	0	0	30.7	0
<i>S. flexneri</i>	0	19.7	20.7	21	21	0	10	11.3	11.7	0	0	25	0
<i>S. aureus</i>	7	7	8	8.33	9	0	0	0	9	0	0	25	0

Los resultados se muestran en milímetros a 48 horas de incubación.

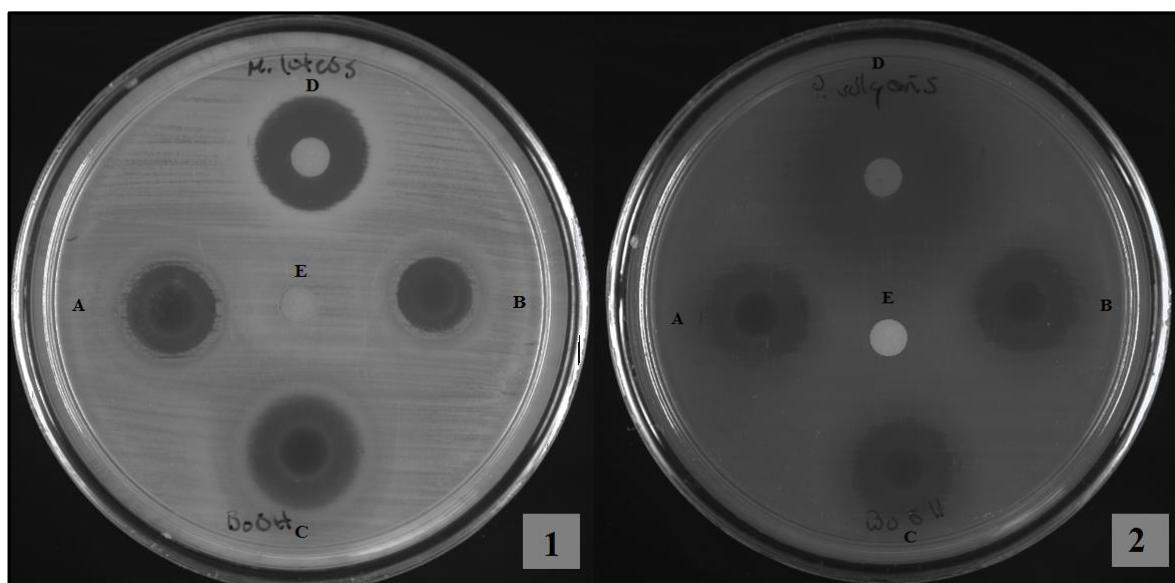


Figura 7. Actividad antibacteriana del EBJ contra *M. luteus* (1) y *P. vulgaris* (2). Concentraciones de 7 mg/mL (A), 10 mg/mL (B) y 15 mg/mL (C). Como control positivo (D) se administraron 5 µg/mL de Ciprofloxacina y como control negativo (E), agua desionizada estéril.

En la evaluación de la actividad antibacteriana con extractos de la cáscara del fruto de granada (Tabla 10), el EMC presentó una inhibición de 8-16.3 mm a menores concentraciones (2-17 mg/mL) en 10 de las 11 cepas evaluadas en comparación con el EAC, en el cual hubo inhibición en 9 cepas, con concentraciones que oscilan entre los 10-15 mg/mL. El EHC no presentó inhibición contra las 11 cepas evaluadas. En la Figura 9 se muestran las zonas de inhibición presentadas por el EMC contra las cepas de *E. faecalis* y *E. coli*, así como los respectivos controles utilizados para la prueba.

Tabla 9. Diámetros de inhibición inducidos por extractos del pericarpio del fruto de granada.

Cepas bacterianas	Medias de diámetros de las zonas de inhibición												C+	C-	
	EHP		EAP						EMP						
	(mg/mL)		(mg/mL)						(mg/mL)						
	10	20	3	5	8	10	20	1	3	5	7	10			
<i>E. sakazakii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.3	22.3	0	
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	11	11.3	11.3	14	0	0	8	9	10	18.3	0	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	13	14.7	25.7	0	
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	16.7	0	
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	10	21.7	0	
<i>M. luteus</i>	0	0	0	9	9	9.3	18.3	11	11.3	12.3	13	14	18.7	0	
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	7	7.3	9.6	16	16.3	19	20.3	20.3	30	0	
<i>P. vulgaris</i>	0	0	15.3	16.3	17	18	18	18.7	19	20	20	21	31	0	
<i>S. aeruginosa</i>	0	0	0	10.3	11	12.3	14	0	0	0	13	14.3	30.7	0	
<i>S. flexneri</i>	0	0	0	12	13	14	19	0	16.3	16.3	17.3	18.7	25	0	
<i>S. aureus</i>	0	0	0	8	9.67	10	10.3	0	9	9.6	10.7	12	25	0	

Los resultados se muestran en milímetros a 48 horas de incubación.

Los resultados de evaluación de los extractos de la hoja del árbol de granada (Tabla 11), muestran que el EMH presentó actividad en un mayor número de cepas de bacterias, al inhibir el crecimiento bacteriano en 6 de las 11 cepas evaluadas (9.33-20.3 mm) en comparación con el EAH, que presentó inhibición en 4 cepas (7-12.7 mm) y el EHH que solo presentó inhibición en 2 cepas (11 mm). Cabe recalcar que la mayor efectividad la presentó el EAH en la cepa *P. vulgaris*, ya que a una concentración de 3 mg/mL se observó un halo de inhibición con una media de 12.7 mm de diámetro. En la Figura 10 se pueden observar los halos de inhibición bacteriana del EMH frente a las cepa de *E. faecalis* y EAH frente a *S. aureus* a distintas concentraciones.

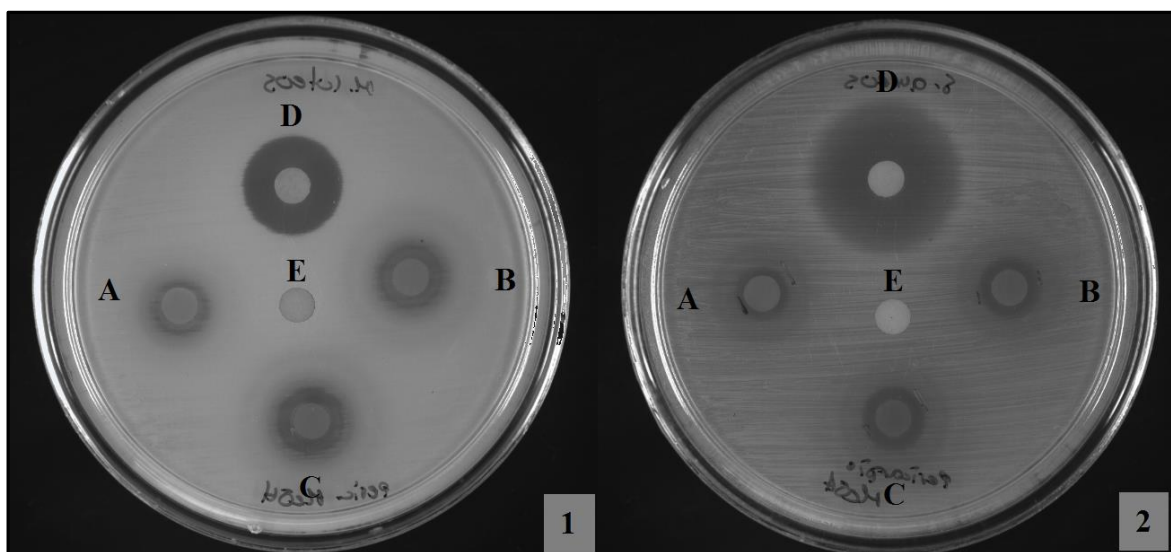


Figura 8. Actividad antibacteriana del EMP contra *M. luteus* (1) y *S. aureus* (2). Concentraciones de 1 mg/mL (A), 3 mg/mL (B) y 5 mg/mL (C); y 3 mg/mL (A), 4 mg/mL (B) y 5 mg/mL (C) respectivamente. Como control positivo (D) se administraron 5 µg/mL de Ciprofloxacina y como control negativo (E), agua desionizada estéril.

Tabla 10. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la cáscara del fruto de granada.

Cepas bacterianas	Medias de diámetros de las zonas de inhibición												C+	C-
	EHC		EAC			EMC								
	(mg/mL)		(mg/mL)			(mg/mL)								
	10	20	10	15	20	2	5	9	10	13	17	20		
<i>E. sakazakii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11.3	11.7	22.3	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	13	0	10.7	13.3	13.3	14	14.3	14.3	18.3	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	25.7	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	12	14.3	0	0	0	0	0	0	0	16.7	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	9	10.3	0	0	0	15.3	16	22.7	23	21.7	0
<i>M. luteus</i>	0	0	0	17.3	18	14	10.7	15.3	18	18	19.7	20	18.7	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	12	12.3	0	0	0	10.3	11.3	11.7	11.7	30	0
<i>P. vulgaris</i>	0	0	15	15.7	16	0	16.3	19.7	19	19	19.3	19.7	31	0
<i>S. aeruginosa</i>	0	0	8	8.33	8.33	0	0	0	11.7	14	14.3	14.3	30.7	0
<i>S. flexneri</i>	0	0	0	11	12.3	0	0	0	8	9	11.7	12	25	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	13.3	16	10	13	14	14.7	15	15.3	15.3	25	0

Los resultados se muestran en milímetros a 48 horas de incubación.

A diferencia de los extractos evaluados antes mencionados, los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana con los extractos de la semilla del fruto (Tabla 12), demostraron una menor efectividad, ya que el EHS, solo presentó inhibición en la cepa de

K. pneumoniae con una media de 7.33 mm a una concentración de 10 mg/mL (Figura 11-B y 11-C). El EAS y el EMS no presentaron inhibición en las 11 cepas probadas.

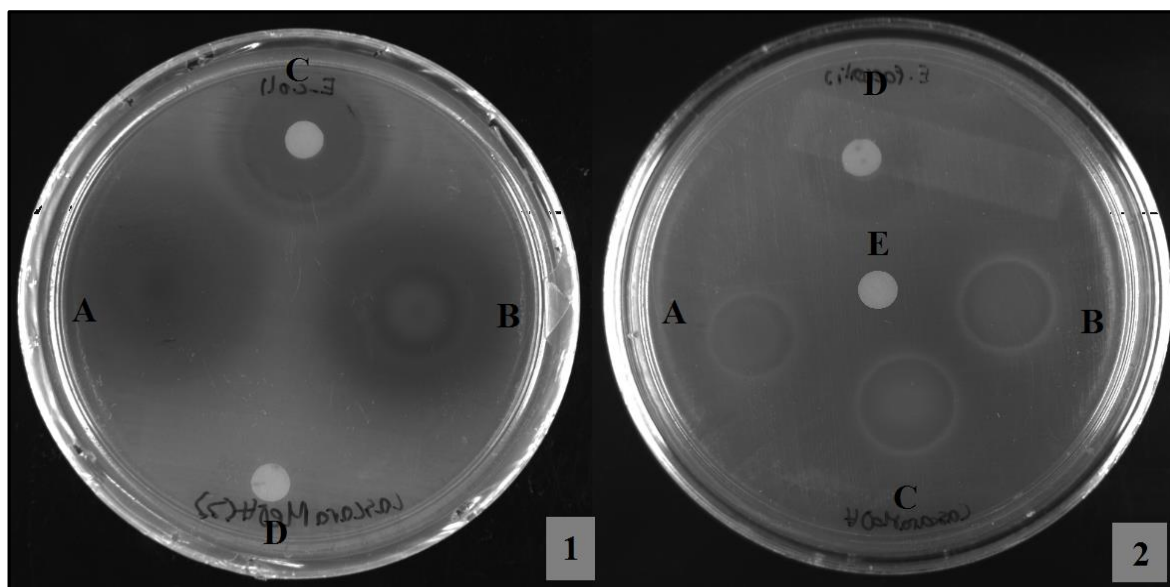


Figura 9. Actividad antibacteriana del EMC contra *E. coli* (1) y *E. faecalis* (2) a concentraciones de 15 mg/mL (A) y 17 mg/mL (B); y 9 mg/mL (A), 10mg/mL (B) y 13 mg/mL (C) respectivamente. Como control positivo (C en 1 y D en 2) se administraron 5 µg/mL de Ciprofloxacina y como control negativo (D en 1 y E en 2), agua desionizada estéril.

Tabla 11. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la hoja del árbol de granada.

Cepas bacterianas	Medias de diámetros de las zonas de inhibición											C+	C-
	EHH		EAH				EMH						
	(mg/mL)		(mg/mL)				(mg/mL)						
	15	20	3	5	10	20	4	5	7	10	20		
<i>E. sakazakii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	11.7	12	14.7	22.3	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	10	10	11	12.7	13.3	18.3	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.7	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.3	15	21.7	0
<i>M. luteus</i>	0	11	0	0	0	7	0	9.33	10	11.7	14.3	18.7	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	18	20	0	0	0	12	13.7	30	0
<i>P. vulgaris</i>	9	11	12.7	13	14.7	16	0	0	11.7	11.7	15	31	0
<i>S. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	14	30.7	0
<i>S. flexneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20.3	22.7	25	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	11	14	15.3	0	11.3	12	12	13.7	25	0

Los resultados se muestran en milímetros a 48 horas de incubación.

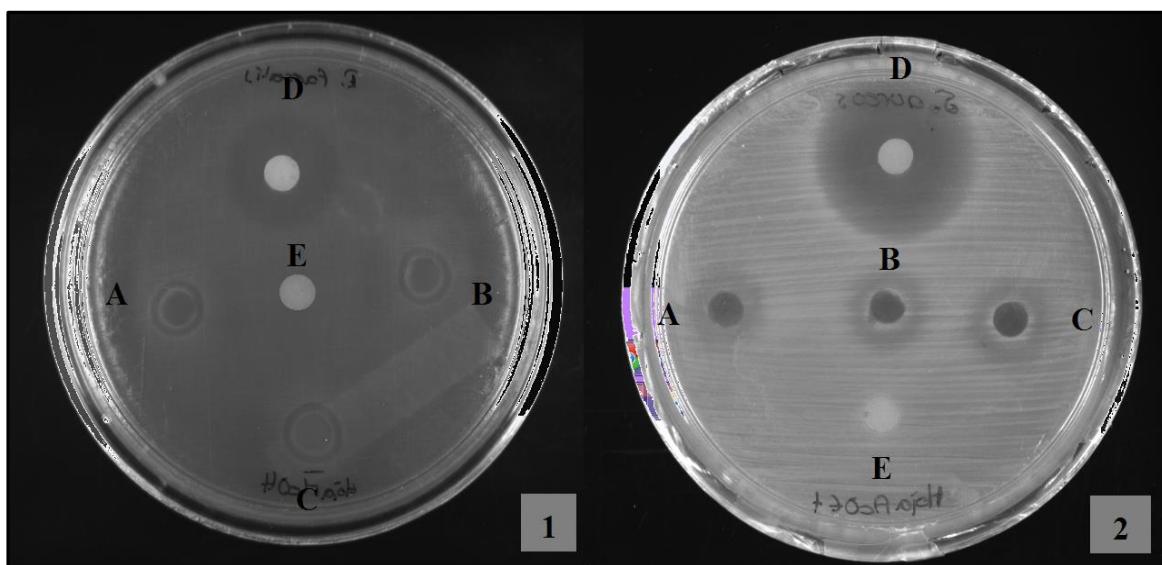


Figura 10. Actividad antibacteriana del EMH contra *E. faecalis* (1) a concentraciones de 4 mg/mL (A), 5 mg/mL (B) y 7 mg/mL (C); y del EAH contra *S. aureus* (2) a concentraciones de 5 mg/mL (A), 10 mg/mL (B) y 20 mg/mL (C). Como control positivo (C en 1 y D en 2) se administraron 5 µg/mL de Ciprofloxacina y como control negativo agua desionizada estéril (E en 1) y EtOH al 99% (E en 2).

Tabla 12. Diámetros de inhibición inducidos por extractos de la semilla del fruto de granada.

Cepas bacterianas	Medias de diámetros de las zonas de inhibición						C+	C-
	EHS		EAS		EMS			
	(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)			
	10	20	10	20	15	20		
<i>E. sakazakii</i>	0	0	0	0	0	0	22.3	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	18.3	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	25.7	0
<i>K. pneumoniae</i>	7.33	7.33	0	0	0	0	16.7	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	21.7	0
<i>M. luteus</i>	0	0	0	0	0	0	18.7	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	30	0
<i>P. vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	31	0
<i>S. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	30.7	0
<i>S. flexneri</i>	0	0	0	0	0	0	25	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	25	0

Los resultados se muestran en milímetros a 48 horas de incubación.

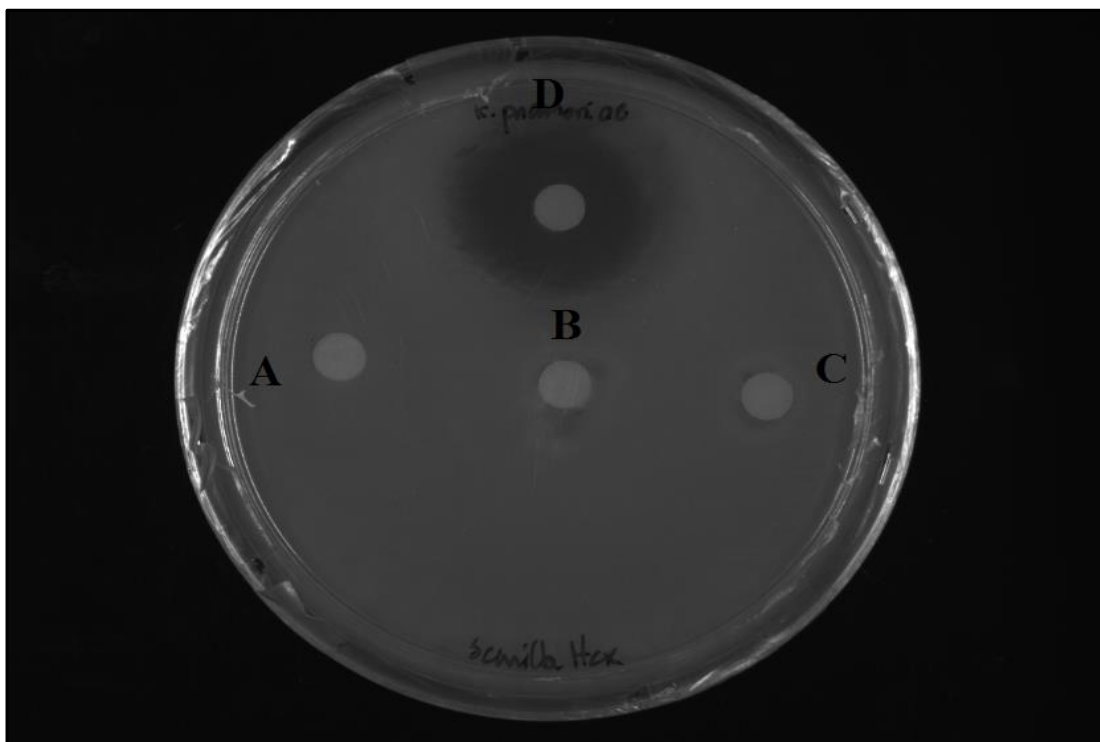


Figura 11. Actividad antibacteriana del EHS contra *K. pneumoniae*. Concentraciones de 5 mg/mL (A), 10 mg/mL (B) y 20 mg/mL (C). Como control positivo (D) se administraron 5 µg/mL de Ciprofloxacina.

7.4 Concentración mínima inhibitoria por micro-dilución en caldo

En la evaluación antibacteriana contra *S. aureus*, como se observa en la Figura 12-a, se presentó inhibición por parte de 10 de los 15 extractos probados, principalmente los provenientes de la cáscara, pericarpio y jugo, siendo de las 11 cepas bacterianas evaluadas, la más susceptible, encontrándose una CMI en un rango de 5 -20 mg/mL. Los extractos EHH, EAH, EHS, EAS y EMS no presentaron inhibición frente a esta cepa. 9 extractos presentaron actividad antibacteriana contra *M. luteus*, siendo el EAP el extracto que presentó la CMI más baja (5 mg/mL) a diferencia de los 8 extractos restantes, que presentaron una CMI de 20 mg/mL (Figura 12-b). Los extractos provenientes del jugo no presentaron actividad, así como el EHH, EHS y el EAS. En la evaluación contra *P. vulgaris* (Figura 13-a), el EMC presentó la CMI más baja (2.5 mg/mL), a diferencia de 4 de los 8 extractos restantes que presentaron inhibición, con una CMI de 20 mg/mL. Los extractos provenientes de la semilla y los extractos EAJ, RAJ, EAH no presentaron actividad. Como se observa en la Figura 13-b, 8 extractos presentaron inhibición en el crecimiento de *P. aeruginosa*, a concentraciones

que van de 2.5-20 mg/mL. Los extractos EAJ, RAJ, EHC, EHH, EAH, EHS y EAS no presentaron inhibición frente a esta cepa. El crecimiento de *S. flexneri* fue inhibido por 6 extractos, 3 de los cuales son provenientes del pericarpio, con concentraciones de 5-20 mg/mL, siendo el EAP el extracto que inhibió a una CMI menor (Figura 14-a). Los extractos del jugo y semilla, así como el EHP, EAP, EHH y EAH no presentaron inhibición. 3 de las 11 cepas evaluadas (*E. faecalis*, *L. monocytogenes* y *S. typhi*) fueron susceptibles a 5 de los 15 extractos. Contra la cepa de *E. faecalis* (Figura 14-b), se observó una CMI que va de 7.5-20 mg/mL, mostrando la menor CMI el EAC. No presentaron actividad los extractos EMC, EMP, EHH, EAH, así como los extractos provenientes del jugo, y semilla. En la evaluación contra *L. monocytogenes*, 3 de los 5 extractos a los que fue susceptible fueron provenientes de la cáscara, sin embargo el EAP mostró la mayor efectividad con una CMI de 7.5 mg/mL (Figura 15-a). Los extractos de la semilla, jugo, el EHP, EMP, EHH y EAH no inhibieron el crecimiento de esta cepa durante las evaluaciones. Como se observa en la Figura 15-b, en el caso de *S. typhi*, la mayor efectividad fue presentada por el EAP con una CMI de 5 mg/mL; los 4 extractos presentaron una CMI que se encuentra en un rango de 10-20 mg/mL. Los extractos de la semilla y jugo, así como el EHC, EMP, EHH y EAH, no presentaron inhibición contra la cepa evaluada. La evaluación de la cepa de *E. sakazakii* demostró que 4 extractos presentaron inhibición, con una CMI que va de 10-20 mg/mL, observándose que el EAC tuvo mayor efectividad (Figura 16). Los extractos provenientes del jugo y semilla así como el EMC, EHP, EMP, EHH Y EAH no presentaron actividad antibacteriana contra la cepa evaluada. La evaluación realizada contra las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* demostró que fueron las cepas que presentaron una resistencia mayor, ya que solo los extractos de polaridad intermedia EAP y EAC inhibieron el crecimiento. Como se observa en la Figura 17-a, contra a *E. coli* el EAP presentó mayor efectividad, con una CMI de 5 mg/mL, a diferencia del EAC que inhibió el crecimiento bacteriano con una CMI de 20 mg/mL; caso contrario frente a la cepa de *K. pneumoniae*, en el que la CMI fue de 5 mg/mL y para el EAP de 15 mg/mL (Figura 17-b). Los extractos del jugo, hoja, semilla, así como el EHC, EMC, EHP y EMP no presentaron inhibición ante las dos cepas antes mencionadas. En la Tabla 13 se describen los controles utilizados para el método de micro-dilución en caldo, así como los resultados obtenidos, los cuales fueron los esperados de acuerdo al

crecimiento (C1- y C2-), inhibición (C+) y ausencia de crecimiento (CE1 y CE2) de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

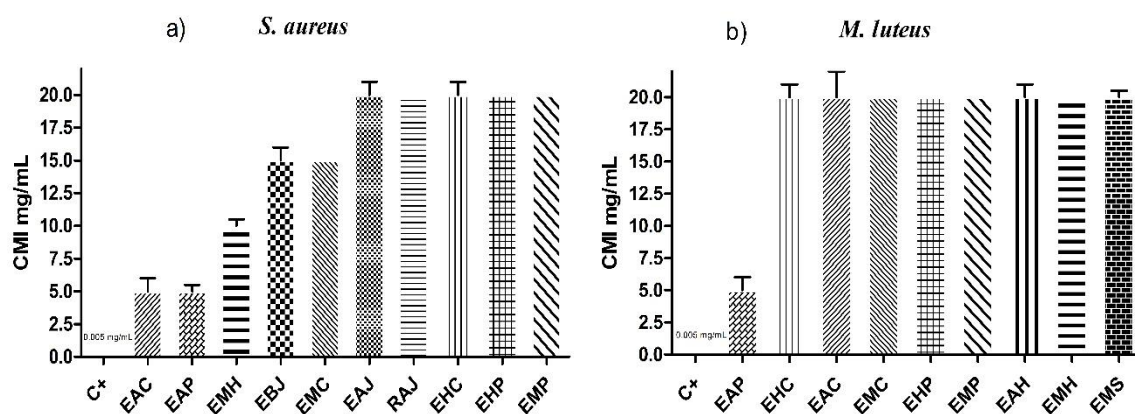


Figura 12. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra a) *S. aureus* y b) *M. luteus* a concentraciones de 5-20 mg/mL. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EMH: extracto metanólico de hoja. EBJ: Extracto butanólico de jugo. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EAJ: Extracto de AcOEt de jugo. RAJ: Residuo acuoso de jugo. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EAH: Extracto de AcOEt de hoja. EMS: Extracto metanólico de semilla. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

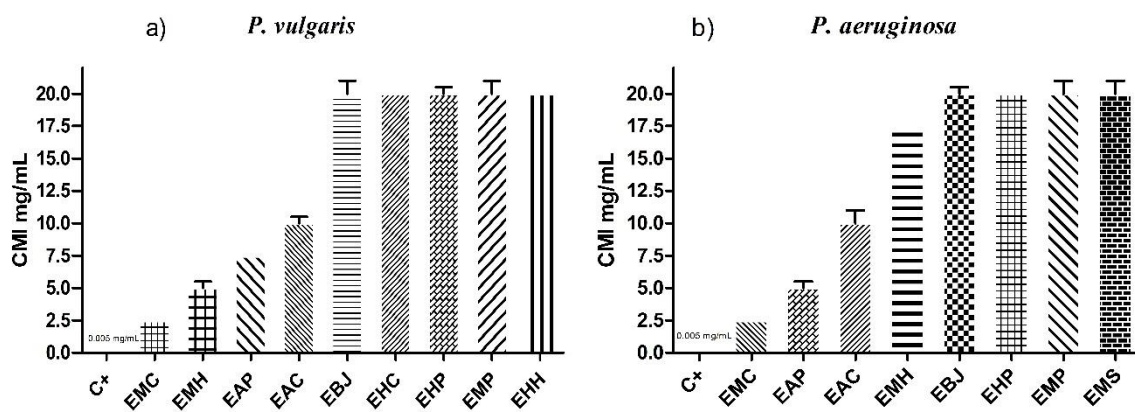


Figura 13. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra a) *P. vulgaris* y b) *P. aeruginosa* a concentraciones de 2.5-20 mg/mL. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EBJ: Extracto butanólico de jugo. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EHP:

Extracto hexánico de pericarpio. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EHH: Extracto hexánico de hoja. EMS: Extracto metanólico de semilla. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

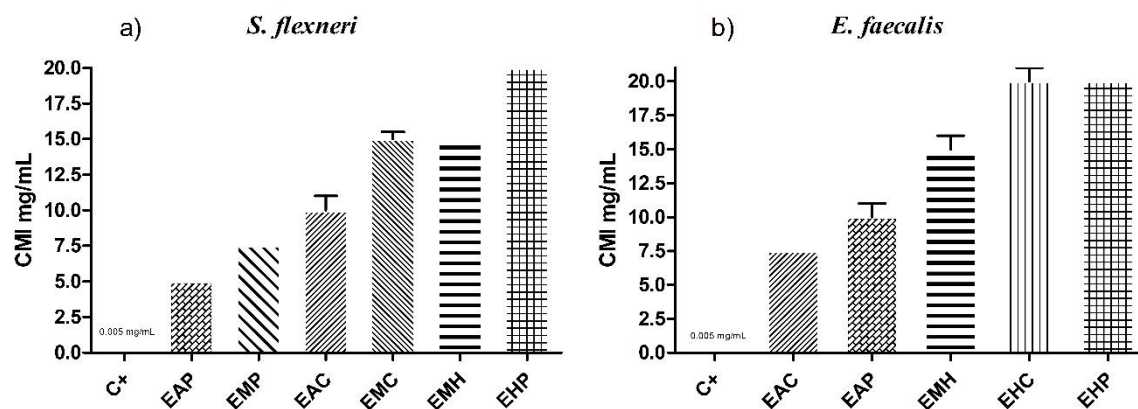


Figura 14. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra a) *S. flexneri* y b) *E. faecalis* a concentraciones de 5-20 mg/mL y 7.5-20 mg/mL respectivamente. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EHH: Extracto hexánico de hoja. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

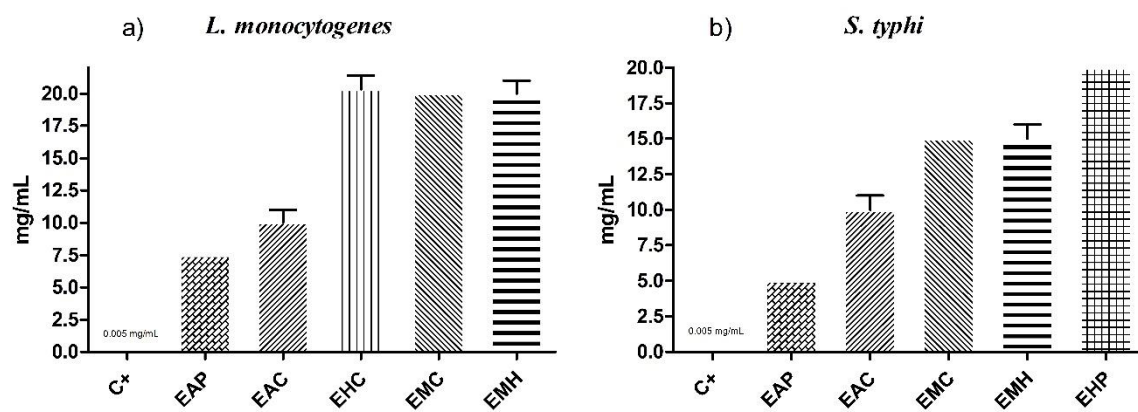


Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra a) *L. monocytogenes* y b) *S. typhi* a concentraciones de 7.5-20 mg/mL y 5-20 mg/mL respectivamente. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

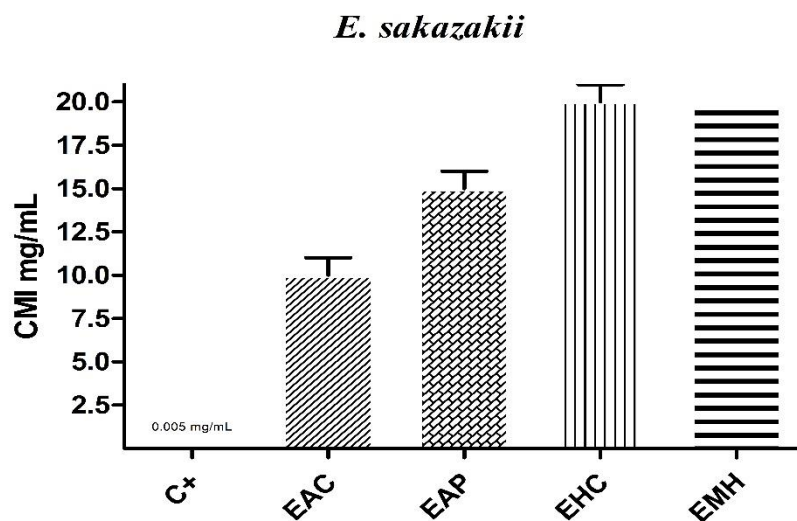


Figura 16. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra *E. sakazakii* a concentraciones de 10-20 mg/mL. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

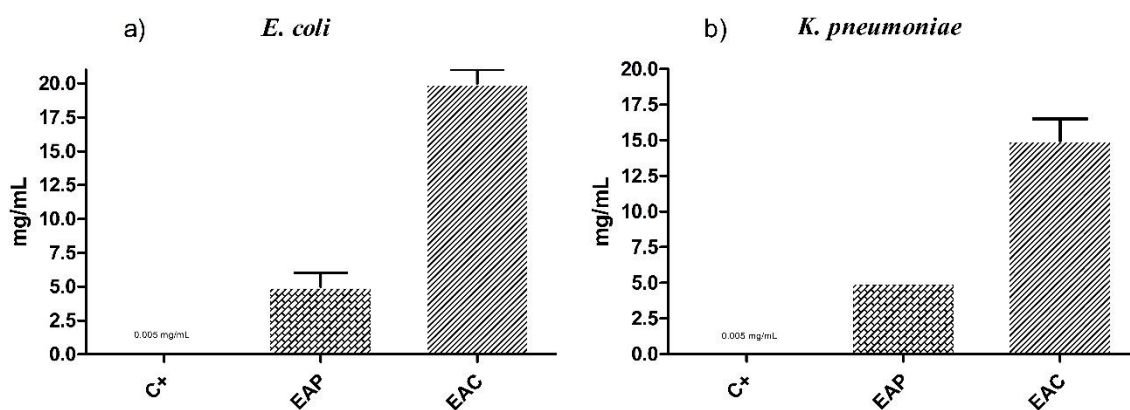


Figura 17. Concentración mínima inhibitoria de extractos del árbol de granada contra a) *E. coli* y b) *K. pneumoniae* a concentraciones de 5-20 mg/mL y 5-15 mg/mL respectivamente. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria.

Tabla 13. Crecimiento bacteriano con los controles utilizados en el método de micro-dilución en caldo.

Cepas bacterianas	Controles				
	C+	C1-	C2-	CE1	CE2
<i>E. sakazakii</i>	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	+	-	-
<i>M. luteus</i>	-	+	+	-	-
<i>P. vulgaris</i>	-	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	-	-
<i>S. aeruginosa</i>	-	+	+	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	-	+	+	-	-

Observaciones visuales después del periodo de incubación (48 horas), (-): sin crecimiento bacteriano, (+): crecimiento bacteriano. C+: TSB + antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + bacteria. C1-: TSB+ bacteria. C2-: diluyente + TSB + bacteria. CE1: extracto + TSB. CE2: TSB.

7.5 Inhibición del crecimiento bacteriano

La inhibición del crecimiento bacteriano se expresó como el logaritmo de crecimiento (log) de las UFC/mL para cada cepa durante 48 horas de incubación.

Para *S. aureus*, como se observa en la Figura 18, 2 de los 3 extractos provenientes de la cáscara y el jugo, junto al EAP presentaron la mayor inhibición en el crecimiento bacteriano, sin embargo el EAP fue el extracto que mostró mayor efectividad a una concentración más baja y con una inhibición del crecimiento mayor (0 UFC/mL), a diferencia del EHC, que mostró la menor inhibición (log 6.1 UFC/mL). Los 10 extractos presentaron una diferencia estadísticamente significativa en la inhibición del crecimiento en relación al control estándar (CE), el cual presentó un logaritmo de crecimiento de 7.4 UFC/mL. 9 extractos presentaron diferencia significativa al compararse con el control positivo (C+), lo que demuestra un efecto bacteriostático, a diferencia del EAP, el cual no tuvo una diferencia significativa con el C+, lo que sugiere que el extracto tuvo un efecto bactericida similar al del antibiótico.

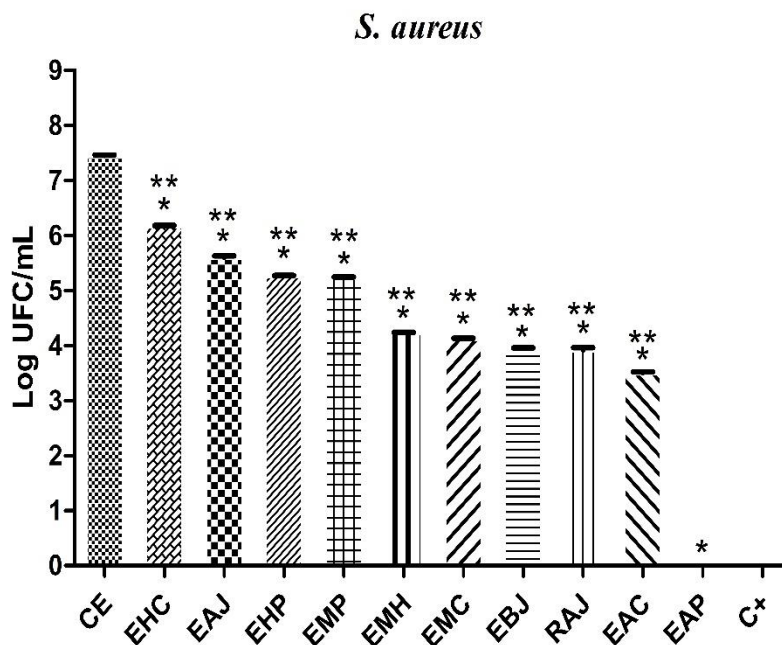


Figura 18. Inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar (TSB+ bacteria). EHC: Extracto hexánico de cáscara. EAJ: Extracto de AcOEt de jugo. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EMH: extracto metanólico de hoja. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EBJ: Extracto butanólico de jugo. RAJ: Residuo acuoso de jugo. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

Para el caso de *M. luteus*, el EAP y 2 de los 3 extractos provenientes de la cáscara (EHC y EAC) presentaron la mayor inhibición (figura 19) y en el caso del EHC y EAC inhibieron cerca del 50% el crecimiento de la cepa, pero la mayor efectividad la presentó el EAP, ya que inhibió en su totalidad el crecimiento (0 UFC/mL) a una concentración menor, comparado con los 8 extractos que también presentaron actividad antibacteriana y que junto al EAP mostraron una diferencia significativa comparados con el CE (log 7.3 UFC/mL). A excepción del EAP, los extractos presentaron una diferencia significativa con el C+, lo que indica su efecto bacteriostático y bactericida para el EAP contra la cepa evaluada.

Los resultados arrojados con *P. vulgaris*, muestran que de los 9 extractos que presentaron inhibición, el EAP fue el más efectivo (0 UFC/mL) con un efecto bactericida similar al del antibiótico, a diferencia de los 8 restantes, los cuales demuestran un efecto bacteriostático

con logaritmos de crecimiento que van de 4.96-6.55 UFC/mL, sin embargo los 9 extractos mostraron una diferencia significativa comparados con el CE (log 7.94 UFC/mL) y al ser comparados con el C+, a excepción del EAP, las inhibiciones fueron estadísticamente significativas (Figura 20).

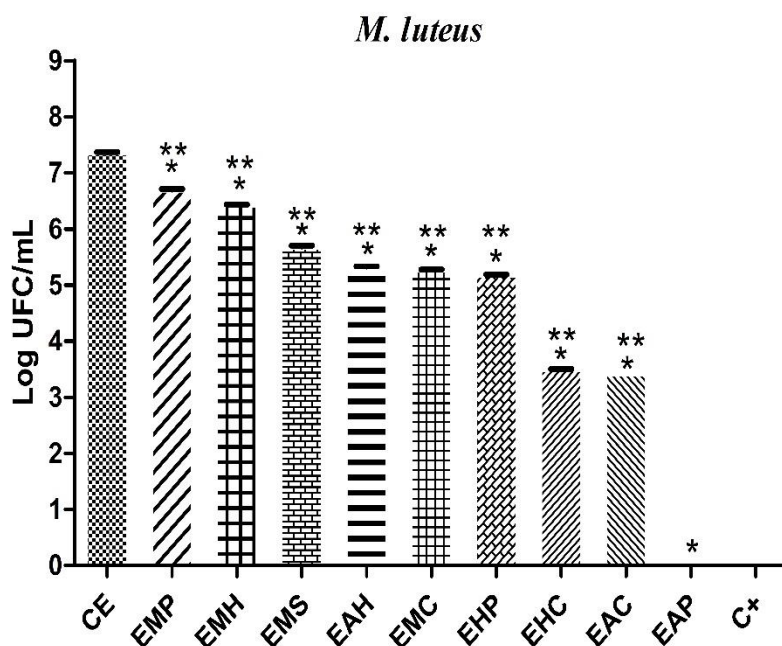


Figura 19. Inhibición del crecimiento de *M. luteus*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar (TSB+ bacteria). EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EMH: extracto metanólico de hoja. EMS: Extracto metanólico de semilla. EAH: Extracto de AcOEt de hoja. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

Como se observa en la figura 21, con *P. aeruginosa* los extractos EMC, EMH y EAP presentaron la mayor efectividad, al inhibir en su totalidad el crecimiento bacteriano (0 UFC/mL) a menores concentraciones, los cuales no presentaron diferencias significativas al compararse con el C+, mismo caso del EAC que tuvo una inhibición del 74.4% (log 2 UFC/mL) al ser comparado con el CE (log 7.81 UFC/mL) por lo que puede deducirse su efecto bactericida, caso contrario de los 4 extractos restantes los cuales pueden presentar efecto bacteriostático en el crecimiento. El extracto que menos inhibición presentó fue el

EHP (log 6.17 UFC/mL). Los 8 extractos presentaron diferencias significativas en relación al crecimiento del CE.

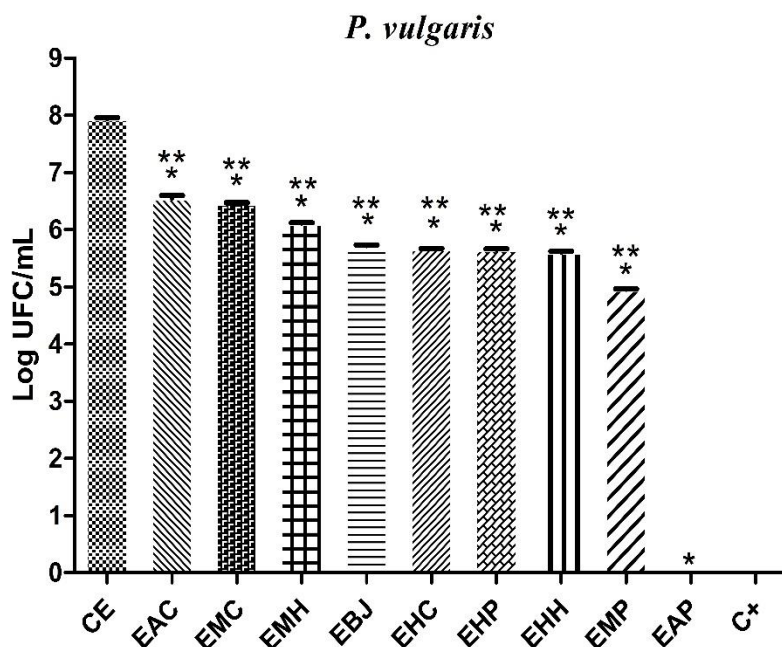


Figura 20. Inhibición del crecimiento de *P. vulgaris*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EBJ: Extracto butanólico de jugo. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EHH: Extracto hexánico de hoja. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

En cuanto a la inhibición del crecimiento de *S. flexneri* (Figura 22), los extractos EAP y EMC resultaron ser los más efectivos, debido a que inhibieron al 100% el crecimiento bacteriano (0 UFC/mL) pero a diferencia del EMC, el EAP inhibió a una concentración más baja (5 mg/mL). Estos 2 extractos no tuvieron diferencias significativas comparados con el C+, por lo que se deduce su efecto bactericida a diferencia de los 4 extractos restantes. El EMP aunque no presentó una inhibición significativa comparado con el C+, fue el extracto que más se acercó a los 2 anteriores, inhibiendo el crecimiento en un 67.5% (log 2.52 UFC/mL), comparado con el CE (log 7.75 UFC/mL), aunados a él, aunque con una inhibición menor, los 3 extractos restantes presentaron una diferencia estadísticamente

significativa en la inhibición bacteriana al ser comparados con el C+. Los 8 extractos presentaron diferencia significativa comparados con el CE, por lo que fueron efectivos en la inhibición del crecimiento.

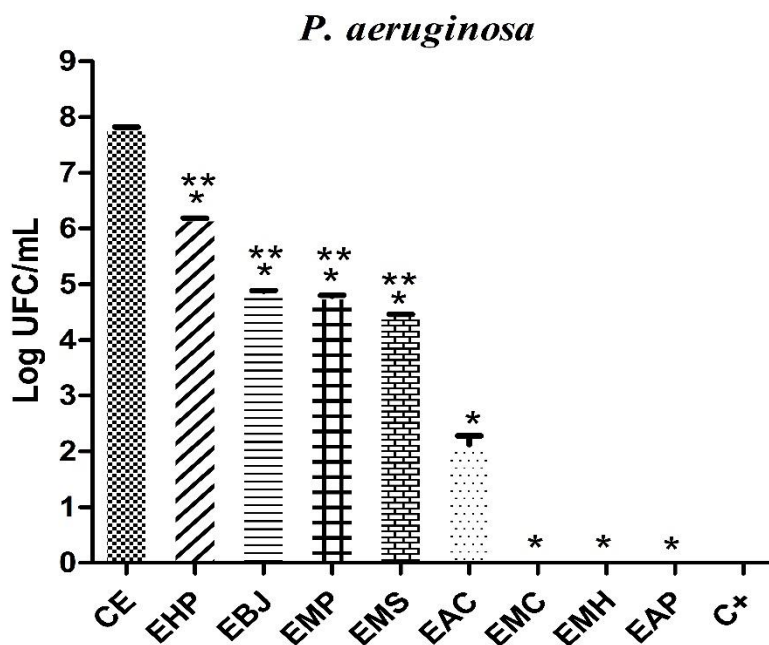


Figura 21. Inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EBJ: Extracto butanólico de jugo. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EMS: Extracto metanólico de semilla. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

Para *E. faecalis* (Figura 23), los 5 extractos presentaron diferencias significativas comparados con el CE, lo que indica su efectividad en la inhibición del crecimiento de la cepa, sin embargo al ser comparados con el C+, resultaron ser significativas sus diferencias, lo que sugiere solo un efecto bacteriostático. El EAP fue el extracto que presentó la efectividad mayor con una de las concentraciones más bajas (10 mg/mL), ya que inhibió el crecimiento bacteriano en un 53.6% (log 3.48 UFC/mL) comparado con el CE (log 7.5 UFC/mL).

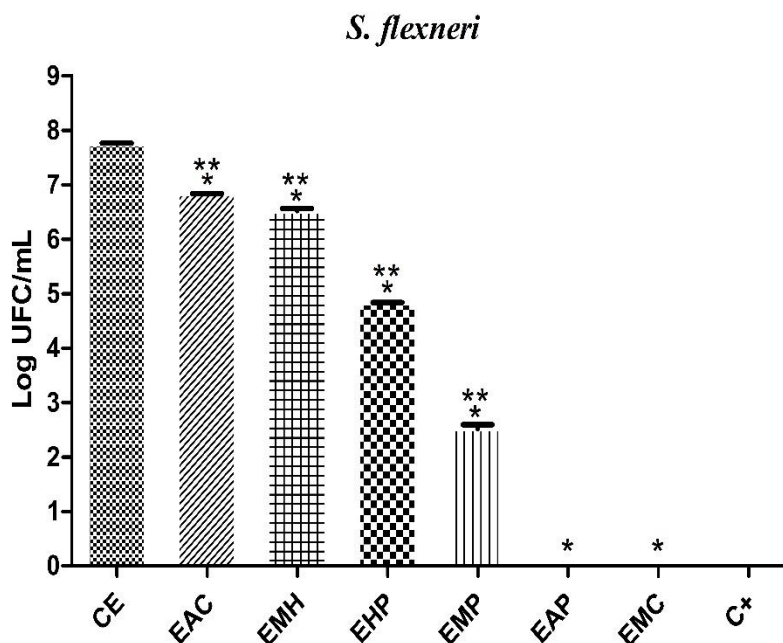


Figura 22. Inhibición del crecimiento de *S. flexneri*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. . EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EMP: Extracto metanólico de pericarpio. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EMC: Extracto metanólico de cáscara. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

En el caso de *L. monocytogenes*, como se observa en la Figura 24, el EAC seguido del EMC, resultaron ser los más efectivos al compararse con el CE (log 8.35 UFC/mL), inhibiendo en un 58% (log 3.51 UFC/mL) y 43% (log 4.76 UFC/mL) respectivamente el crecimiento bacteriano, sin embargo, los 3 extractos restantes aunque en menor proporción, también presentaron una inhibición efectiva, ya que los 5 tuvieron diferencias significativas al ser comparados con el CE, pero al ser comparados con el C+, se deduce que presentan un efecto bacteriostático, debido a que los resultados fueron estadísticamente significativos.

En cuanto a la inhibición del crecimiento en la cepa de *S. typhi*, aunque a una mayor concentración (20 mg/mL), como se observa en la Figura 25, el EHP fue el extracto más efectivo, ya que inhibió el crecimiento en un 57.1% (log 3.5 UFC/mL) comparado con el CE (log 8.16 UFC/mL), seguido por el EMH con un 41.6% de inhibición (log 4.76 UFC/mL). Los 5 extractos presentaron diferencias estadísticamente significativas al ser comparados

con el CE, lo que deduce su efectividad, sin embargo se puede observar su efecto bacteriostático, ya que fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el C+.

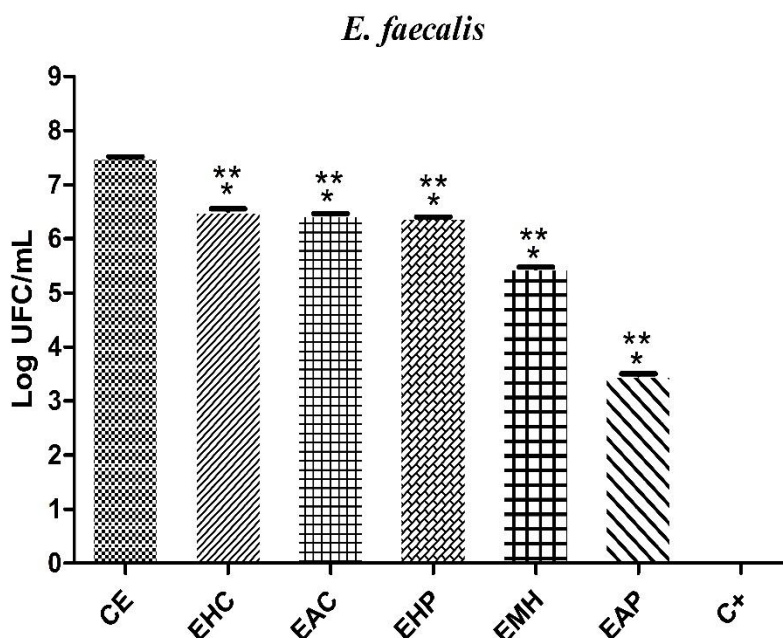


Figura 23. Inhibición del crecimiento de *E. faecalis*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. EMH: extracto metanólico de hoja. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

Como resultado de la evaluación de la inhibición en la cepa de *E. sakazakii*, se observa en la Figura 26 que de los 4 extractos que mostraron actividad, el EAP seguido del EAC mostraron ser los más efectivos, debido a que inhibieron en un 57.4% (log 3.53 UFC/mL) y 47.9% (log 4.32 UFC/mL) el crecimiento de la cepa en relación al CE (log 8.3 UFC) con las concentraciones más bajas, sin embargo los 4 extractos presentaron una diferencia estadísticamente significativa al ser comparados con el CE, sugiriendo su efectividad en la inhibición del crecimiento, pero al ser significativas las diferencias en relación al C+, esto sugiere que los 4 extractos brindan un efecto bacteriostático frente a la cepa evaluada.

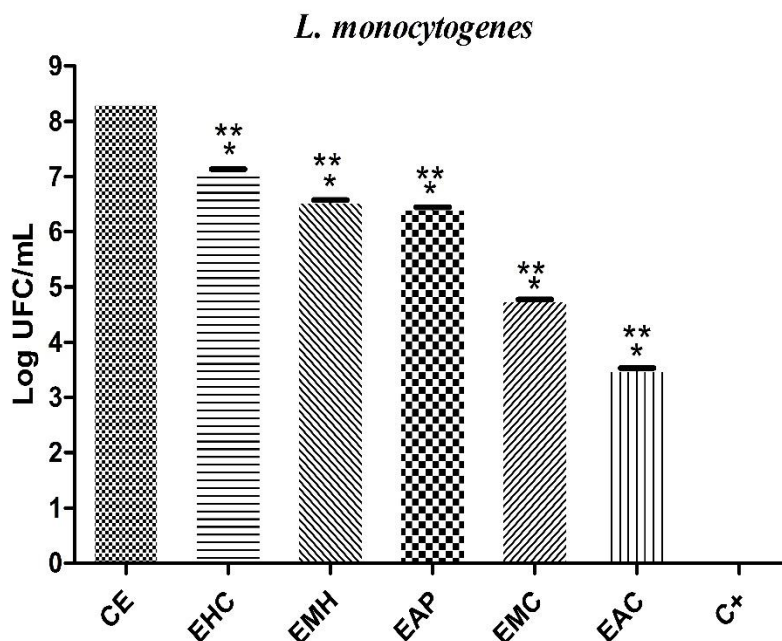


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

Como se observa en la Figura 27, la evaluación de inhibición del crecimiento de la cepa *K. pneumoniae* mostró que la mayor efectividad la presentó el EAP (0 UFC/mL) comparado con el CE (log 8.3 UFC/mL), seguido del EAC (log 5.65 UFC). Los dos extractos presentaron diferencia significativa en cuanto al crecimiento de la cepa comparados con el CE, pero solo el EAC presentó diferencia significativa al compararse con el C+, lo que indica que tuvo un efecto bacteriostático, caso contrario del EAP, el cual presentó un efecto bactericida.

En cuanto a la evaluación de *E. coli*, resultó ser la cepa más resistente (Figura 28), ya que de los dos extractos que presentaron inhibición, ninguno presenta efecto bactericida al ser comparados con el C+, ya que presentan diferencias estadísticamente significativas. El extracto con mayor efectividad fue el EAC (log 5.55 UFC/mL) comparado con el CE (log

9.37 UFC/mL). Al compararse con el CE, los dos extractos presentan diferencia estadísticamente significativa.

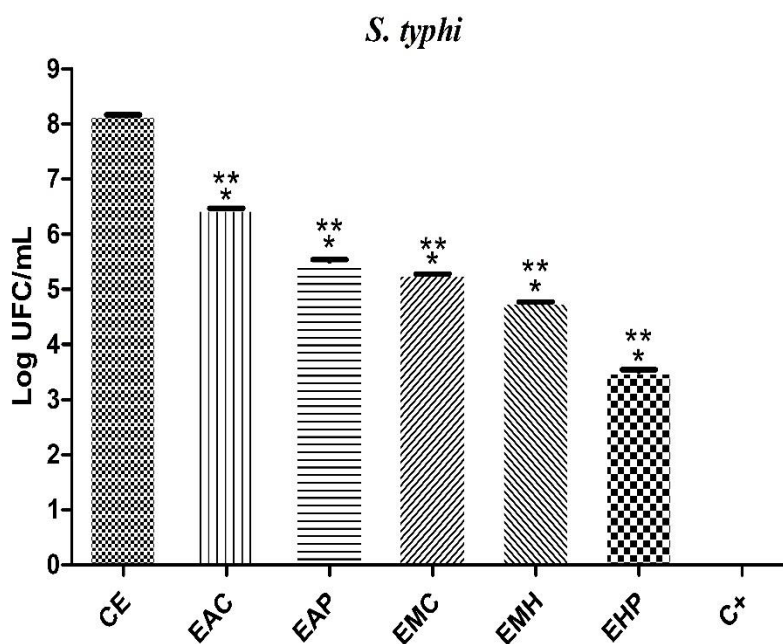


Figura 25. Inhibición del crecimiento de *S. typhi*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EMC: Extracto metanólico de cáscara. EMH: extracto metanólico de hoja. EHP: Extracto hexánico de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

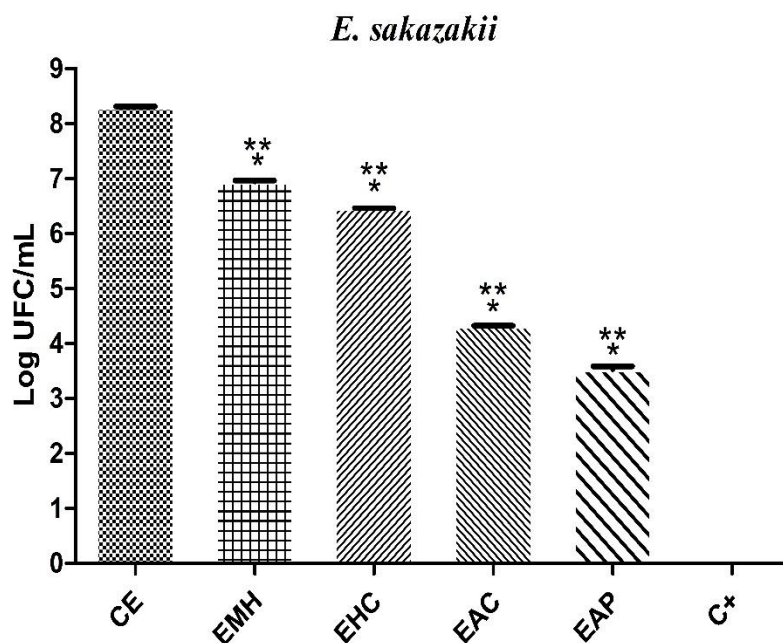


Figura 26. Inhibición del crecimiento de *E. sakazakii*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EMH: extracto metanólico de hoja. EHC: Extracto hexánico de cáscara. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

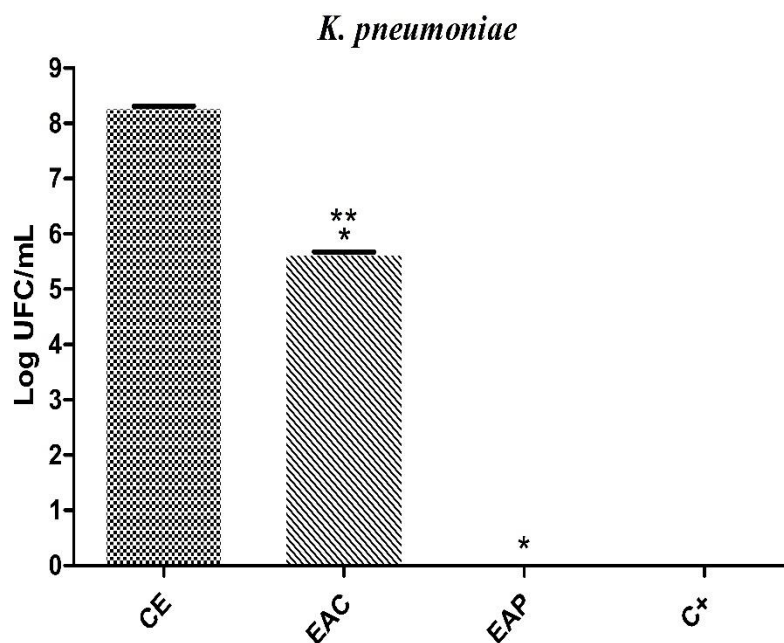


Figura 27. Inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. C⁺: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C⁺.

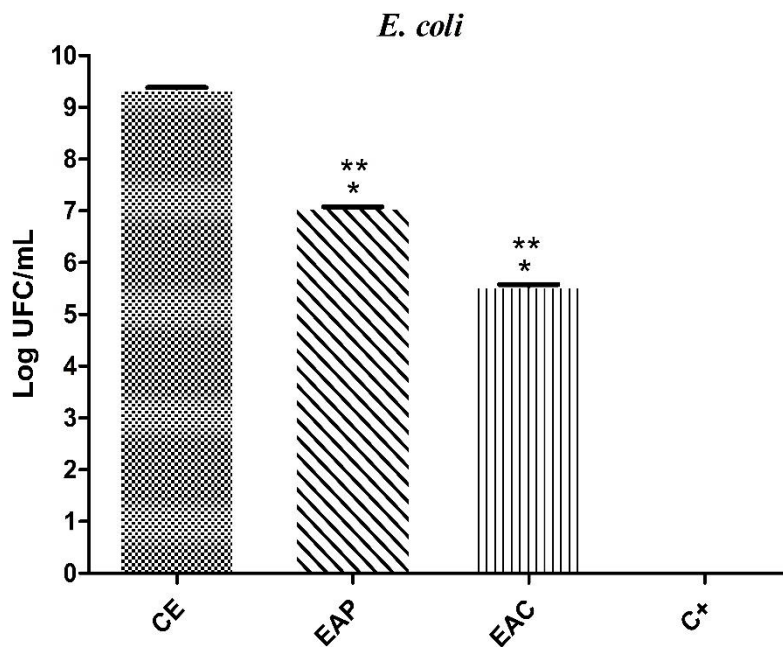


Figura 28. Inhibición del crecimiento de *E. coli*. Observaciones visuales después de las condiciones de incubación (48 horas). Ensayo por triplicado. CE: Control estándar. EAP: Extracto de AcOEt de pericarpio. EAC: Extracto de AcOEt de cáscara. C+: Control positivo (Ciprofloxacina, 5µg/mL). Las diferencias significativas ($p < 0.005$) se describen como *: Comparación entre extracto y CE; **: Comparación entre extracto y C+.

VIII. DISCUSIÓN

El empleo de plantas con fines médicos data desde tiempos antiguos (140) y hoy en día la microbiología clínica tienen 3 razones básicas para estar interesados en el tema de extractos de plantas que funjan como antimicrobianos. En primer lugar, es probable que los fitoquímicos puedan ser una buena y amplia fuente de fármacos antimicrobianos prescritos por los médicos, varios de los cuales ya han sido probados en humanos; en segundo lugar, conforme pasa el tiempo, el descubrimiento de nuevos agentes patógenos; y tercero, las habilidades notables que tienen los microorganismos para desarrollar resistencia a antibióticos (106). Es por ello que quizá el uso de extractos provenientes de las partes de las plantas y sus fitoquímicos con propiedades antimicrobianas conocidas, pueden ser de gran importancia en tratamientos terapéuticos (141). Dentro de este grupo de plantas, se encuentra el árbol de granada, el cual ha sido utilizado como medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades relacionadas con microorganismos, específicamente por su riqueza en compuestos fenólicos como los taninos, a los cuales se les atribuye dicha propiedad. (1,109,142). Existen estudios que demuestran las propiedades antimicrobianas de las distintas partes del árbol de granada, ya sea como microencapsulado (143) o extractos (Tabla 4) o en estudios biodirigidos mediante el uso de compuestos aislados de las partes del árbol (106,109,144).

Debido a que no existen reportes en la literatura sobre la actividad antibacteriana de extractos provenientes de la variedad mexicana del árbol de granada, a partir de disolventes orgánicos con distintas polaridades, se decidió realizar la obtención de los extractos orgánicos del jugo de arilo, cáscara, pericarpio, hoja y semilla, así como el residuo acuoso del jugo de arilo del árbol de granada a partir de disolventes en polaridad creciente y posteriormente evaluar su actividad inhibitoria *in vitro* mediante dos métodos distintos (difusión en placa y microdilución en caldo), con el objetivo de hacer una comparación de los resultados cualitativos y cuantitativos que arrojan estos tres métodos.

En el presente estudio, los extractos obtenidos mediante el método de maceración y que presentaron el mayor porcentaje de rendimiento fueron el EMC (30.6%), EMP (48.6%), EMH (17.1%) y EMS (4.6%); y por el método de extracción líquido-líquido el RAJ (23.1%), lo que concuerda con diversos estudios, como el realizado por Ali y cols. (145), quienes obtuvieron extractos metanólicos de cáscara del fruto de granada, reportaron mayores

rendimientos, con porcentajes de 36.8% por Soxhlet y de 44% por medio de ultrasonido. En otros estudios realizados por Wang y cols. (146) y Singh y cols. (147), se observaron rendimientos distintos a los obtenidos para el EMC, siendo de 46.5% y 9.38% respectivamente, mediante extracciones realizadas bajo condiciones mediadas por temperatura (40°C y 30°C respectivamente) y tiempo (4 horas y 1 hora respectivamente). Rashid y cols. (148), reportaron extracciones de cáscara y pericarpio de granada realizadas con etanol bajo las mismas condiciones usadas en el presente estudio, con rendimientos inferiores a los obtenidos (20% y 36% respectivamente), mismo caso en lo observado por Ampasavate y cols. (149), quienes reportan porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos de hoja y semilla ligeramente menores a los encontrados en esta investigación (11.27% y 4.46% respectivamente). Los extractos obtenidos con AcOEt, n-BuOH y hexano, presentaron porcentajes muy bajos, que van del 0.1% al 3.1%, observándose que el mejor rendimiento se presentó en los extractos obtenidos con disolventes polares (MeOH y n-BuOH), seguidos por los de polaridad intermedia (AcOEt) y el menor proporción los no polares (hexano), datos que concuerdan con investigaciones previas realizadas por otros autores (146,147,150). En el caso del jugo, no existen datos reportados actualmente de porcentajes de rendimiento obtenidos a partir de disolventes, ya que en los casos en los que se han obtenido extractos, se realizaron solo mediante extracción acuosa, sin que hayan sido reportados los porcentajes de rendimiento (151,152) o con extracciones del jugo a partir del fruto completo (108). Como se observa, existen coincidencias y variaciones entre los resultados obtenidos comparados con los reportados en la bibliografía, y esto es muy probablemente debido a que hay condiciones que influyen en la eficiencia del rendimiento, como las selecciones del método de extracción, el tipo de disolvente utilizado, la temperatura y el tiempo de contacto del disolvente con la muestra y equipo utilizado (110,111,114), además de la naturaleza de los compuestos mayoritarios que se encuentren en la parte de la planta y en el caso de las partes de la granada, es sabido que son ricas en compuestos fenólicos como las punicalaginas y punicalinas, los cuales son miscibles en disolventes polares, por lo que es común que para su obtención y purificación se realicen este tipo de extracciones (1,150). Cabe mencionar que un porcentaje de rendimiento elevado del extracto no necesariamente implica que presente una eficacia elevada, ya que su actividad depende de la presencia y concentración de compuestos activos en el extracto (150).

Por otra parte y con el objeto de evaluar la actividad antibacteriana de los 14 extractos y el residuo acuoso, se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento por el método de difusión en disco y de micro-dilución en placa frente a las 11 cepas bacterianas distintas. A excepción de los extractos provenientes de la semilla del arilo (de los cuales solo el EHS presentó actividad frente a una cepa), 5 componentes de la planta evaluados mediante el método de difusión en disco, se observó que los extractos obtenidos a partir de disolventes con características polares, seguidos de los de polaridad intermedia fueron los que presentaron inhibición en la mayoría de las cepas evaluadas, por lo contrario, los extractos obtenidos con disolventes no polares, en los cuales la actividad fue casi nula. De estos extractos, el EBJ y el EAJ presentaron la mayor actividad, ya que inhibieron el crecimiento bacteriano en las 11 cepas evaluadas, seguidos del EMP y EAP con 11 y 8 cepas, el EMC y EAC con 10 y 9 cepas y por último el EMH y EAH con 9 y 4 cepas susceptibles respectivamente. Sin embargo, se observaron diferentes efectividades dentro de los extractos ya que en su mayoría los metanólicos a menores concentraciones inhibieron el crecimiento bacteriano. El extracto con mayor efectividad fue el EMP con concentraciones que van de 1-10 mg/mL, seguido del EBJ (1-10 mg/mL), el EMC (2-17 mg/mL) y de la hoja el EAH (3-10 mg/mL). Las cepas más susceptibles fueron *M. luteus* (Gram +) y *P. vulgaris* (Gram -), ya que 9 de los 15 extractos probados inhibieron su crecimiento y 7 de ellos ocupando las concentraciones más bajas respecto a las demás cepas con menor susceptibilidad. La cepa más resistente a los extractos evaluados fue *E. coli*, con resistencia a 11 extractos, seguida de *E. sakazakii* y *K. pneumoniae*, (todas Gram -) resistentes a 10 de los 15 extractos probados. Las cepas Gram+ presentaron mayor susceptibilidad a los extractos probados a diferencia de las cepas Gram -, las cuales cuando mostraron susceptibilidad, fue a concentraciones elevadas del extracto evaluado. Es sabido que las bacterias Gram + generalmente suelen ser más susceptibles a agentes externos que las Gram- esto debido a la presencia de membrana externa, la cual les confiere una barrera más ante la acción de antimicrobianos (106,153), sin embargo de las 11 cepas (4 de ellas Gram +) por el método de difusión en disco, *L. monocytogenes* fue una de las más resistentes a los extractos evaluados, caso contrario de *P. vulgaris*, que como se mencionó anteriormente fue susceptible a un número mayor de extractos los cuales inhibieron su crecimiento a bajas concentraciones (1-10 mg/mL).

En un estudio realizado por Dey y cols. (154) en el que determinaron la actividad antibacteriana de 10 mg/mL de jugo de arilos de granada y 1 mg/mL de extracto metanólico del pericarpio contra 6 cepas de bacterias ATCC (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*, en el que se observó que el extracto metanólico del pericarpio presenta un efecto inhibitorio más fuerte que el jugo de granada, incluso a una concentración 10 veces menor, con halos de inhibición que van de los 15 mm a 23 mm de diámetro, siendo una de las cepas más susceptibles *P. aeruginosa* con un halo de inhibición de 20 mm, siendo este diámetro mayor al encontrado en el presente estudio a la misma concentración (16 mm). Por su parte, Estherlydia y cols. (155) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de cáscara y semilla y extractos acuosos de cáscara, pericarpio, semilla y fruto completo en polvo frente a microorganismos patógenos (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*), encontrando que la mayor actividad fue presentada por los extractos acuoso de la cáscara, a una concentración de 100 mg/mL frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 22 mm; para *Staphylococcus epidermidis* el metanólico de la cáscara a una concentración de 100 mg/mL y un halo de 14 mm, para *K. pneumoniae* el extracto crudo con un halo de 30 mm a una concentración de 100 mg/mL, para *P. aeruginosa*, el extracto acuoso de la cáscara con una concentración de 12 mg/mL y un halo de 14 mm y para *Candida albicans* el extracto metanólico de cáscara con un halo de 22 mm a una concentración de 100 mg/mL. En un estudio realizado por Pradeep y cols. (156) observaron que al evaluar 2.5 g/mL de extracto acetónico, metanólico y crudo del pericarpio contra 10 cepas de bacterias gastrointestinales (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* serotipo 1, *S. flexneri* serotipo 2 y *Vibrio cholerae*), el extracto metanólico y el acetónico presentaron un grado alto de actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento en todas las cepas con halos de inhibición que van de 14 mm a 25 mm y de 12 mm a 22 mm respectivamente. Por otro lado, en un estudio realizado por Choi y cols. (65) evaluaron la actividad antibacteriana de un extracto etanólico de cáscara contra una variedad amplia de cepas de *Salmonella*, entre ellas *S. typhi*, utilizando concentraciones de 100, 200 y 500 µg/mL de extracto, encontrando halos de inhibición que van de 13.3-17.3 mm. En un estudio realizado por Abdollahzadeh y cols. (153) en el que

determinaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la cáscara del fruto de granada frente a una variedad de bacterias, entre ellas *S. aureus*, encontraron que a concentraciones de 4 mg/mL, 8 mg/mL y 12 mg/mL fue inhibido el crecimiento de la con halos de inhibición de 7.5 mm, 11.5 mm y 12.5 mm, cabe resaltar que en nuestra investigación, encontramos a una concentración de 2 mg/mL un halo de inhibición mayor al reportado (10 mm) y a una concentración de 13 mg/mL un diámetro de inhibición de 15 mm. En una investigación llevada a cabo por Sadeghian y cols. (138) con extractos metanólico y acuoso de la cáscara contra 50 cepas de *P.aeruginosa*, *S. aureus* y *Candia albicans* aisladas de pacientes hospitalizados, observaron que no se presentaron inhibiciones significativas a concentraciones de 2.75 mg/mL, esto debido probablemente a la multiresistencia a antibióticos de las cepas evaluadas. También cabe señalar que las cepas empleadas en este trabajo fueron silvestres y aparentemente sin multiresistencia. En otro estudio elaborado por Al-Zoreky (105) en el cual evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de cáscara frente a 11 microorganismos entre los que destacan bacterias como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, encontró que el extracto más efectivo de los utilizados (éter dietil, metanólico al 80% y acuoso) resultó ser el metanólico al 80% a una concentración de 800 µg, inhibiendo el crecimiento en las 5 cepas, con halos de inhibición para *Listeria monocytogenes* de 20 mm, en *S. aureus* de 13 mm, en *E. coli* de 16 mm, en *P. aeruginosa* de 18 mm y en *K. pneumoniae* de 16 mm, datos que contrastan con lo encontrado en la presente investigación, en la que las concentraciones utilizadas fueron mayores y se obtuvieron halos de menor diámetro y en el caso de *E. coli* y *P. aeruginosa* no se presentó inhibición. En otro estudio realizado por Malviya y cols. (157) en el que evaluaron la actividad antibacteriana de 1.6 mg/mL de extractos de cáscara etanólicos y de metanol-agua a distintas concentraciones frente a 4 cepas de bacterias, entre ellas *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *S. typhi*, observaron que en el caso del extracto metanólico al 100% presentó inhibiciones significativas, aunque no mayores a diferencia de los demás extractos frente a las cepas evaluadas, destacando su actividad frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 24.5 mm, seguida de *S. typhi* con un diámetro de 18.3 mm y *K. pneumoniae* con un halo de 11.3 mm, datos que también difieren en lo encontrado en el presente estudio, ya que los halos fueron menores en las dos primeras cepas bacterianas y en el caso de la última cepa no se encontró inhibición.

En una investigación llevada a cabo por Hajoori y cols. (158) con extractos acuoso, metanólico, etanólico, de ácido acético y de éter petróleo de cáscara a dosis de 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL frente a cepas de bacterias dentro de las que destacan *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*, mostrando que los extractos acuoso y metanólico a una concentración de 10 mg/mL fueron efectivos contra *Salmonella typhi* (12 y 13 mm respectivamente) y *P. vulgaris* (11 mm y 12 mm respectivamente), el etanólico a una concentración de 10 mg/mL contra *E.coli* (12 mm), *Salmonella typhi* (10 mm), *P. vulgaris* (11 mm) y *P. aeruginosa* (12 mm), resultados que al ser comparados con los del presente estudio, en las 5 cepas son inferiores a los encontrados a la misma concentración (10 mg/mL) en el caso del extracto metanólico. En otro estudio realizado por Hedge y cols. (159) en el que evaluaron extractos de cloroformo, acetato de etilo, metanólico y acuoso de la hoja frente a distintos microorganismos, entre los que destacan bacterias patógenas como *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *S. typhi*, encontraron que al aplicar 35 µL de los diferentes extractos en pozos creados en placas con agar, los extraídos a partir de cloroformo presentaron inhibición contra *S. aureus* con diámetros de 10 mm y 16 mm respectivamente, mientras que el extracto metanólico fue el más efectivo al inhibir el crecimiento de las 5 cepas, con halos de inhibición de 13-30 mm. Un estudio realizado por Nuamsetii y cols. en el 2012 (160) se evaluaron 30 µL de extractos acuoso, etanólico y acetónico de pericarpio y arilos completos del fruto de granada contra 4 cepas de bacterias relacionadas con alimentos (*Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella typhimurium*) encontrando que los extractos etanólicos de la cáscara y arilo fueron los más efectivos contra las 4 cepas, en el caso de la cáscara con halos de inhibición de 26.3-31 mm y con el arilo de 19.7-24.3 mm de diámetro.

En el presente estudio, también se realizó la determinación de la CMI, para cuantificar la menor concentración en que los extractos inhiben el crecimiento bacteriano y encontramos que a diferencia del método de difusión en placa, los extractos de polaridad intermedia provenientes de la cáscara y pericarpio presentaron mayor actividad antibacteriana en relación a los extractos polares. Los extractos con mayor actividad fueron el EAP y EAC, ya que inhibieron el crecimiento de las 11 cepas evaluadas; sin embargo, la mayor efectividad la presentó el EAP, debido a que a menores concentraciones que el EAC inhibió

el crecimiento en 7 cepas, observándose CMI de 5-15 mg/mL y de 5-20 mg/mL respectivamente. De los extractos polares, el EMH tuvo la mayor actividad, inhibiendo el crecimiento de 9 cepas con CMIs que van de 5-20 mg/mL, seguido del EMC, que aunque inhibió el crecimiento de un menor número de cepas, en dos de ellas la CMI fue menor a las observadas en el EMC (2.5 mg/mL). Para los extractos no polares, también se presentaron diferencias en comparación con el método de difusión en placa, ya que a excepción del EHS, presentaron actividad, siendo el EHP y el EHC los más activos, inhibiendo el crecimiento bacteriano en 7 y 6 cepas respectivamente, con CMIs de 20 mg/mL en ambos casos. Para el jugo, el EBJ contrario a lo observado en el método de difusión, sólo inhibió el crecimiento en 3 cepas con CMIs de 15-20 mg/mL y el EAJ inhibió en 1 cepa con una CMI de 20 mg/mL. De los extractos de la semilla evaluados, solo el EMS presentó inhibición en una cepa, con una CMI de 20 mg/mL, por lo que esta parte de la planta fue la menos efectiva por este método. La cepa con susceptibilidad a un número mayor de extractos fue *S. aureus* ya que 10 de los 15 extractos evaluados inhibieron su crecimiento, seguida de *M. luteus* y *P. vulgaris* con susceptibilidad a 9 extractos, notándose que los 3 extractos provenientes de la cáscara y pericarpio presentaron inhibición frente a las 3 cepas, sin embargo *P. vulgaris* y *P. aeruginosa* fueron las cepas inhibidas a una concentración de extracto más baja, ya que frente al EMC se presentó una CMI de 2.5 mg/mL. Las cepas que tuvieron susceptibilidad a un menor número de extractos, fueron *E. coli* y *K. pneumoniae*, ya que solo el EAP y EAC inhibieron su crecimiento.

En un estudio realizado por Choi y cols. (65), al determinar la CMI de un extracto etanólico de cáscara frente a 16 cepas distintas de *Salmonella*, entre ellas de *S. typhi*, observaron que la concentración mínima inhibitoria fue de 250 µg/mL, confirmando el efecto antibacteriano del extracto frente a la cepa bacteriana antes mencionada. Estos datos difieren con los encontrados en el presente estudio, debido a que frente a la misma cepa, pero con el EMC, la CMI fue de 15 mg/mL. Por otro lado, Duman y cols. (98) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de arilos de 6 variedades distintas de granada contra 3 cepas de hongos y 7 de bacterias, entre las que destacan *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus* y *S. aureus*, encontrando una CMI de los extractos entre 30 µg/mL y >90 µg/mL. En otro estudio realizado en el 2012 (160), al evaluar la actividad antibacteriana de extractos

acuosos, acetónicos y etanólicos de arilos y pericarpio del fruto frente a 4 cepas de bacterias, entre ellas *E. coli* y *S. aureus*, encontraron que el extracto acuoso del pericarpio fue el más efectivo frente a las dos cepas, con CMI de 207 mg/mL frente a *E. coli* y <104 mg/mL frente a *S. aureus* y el extracto etanólico del arilo con CMI de 778 mg/mL para las dos cepas evaluadas. En un estudio realizado por Fawole y cols. (161) para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto metanólico de la cáscara de 7 variedades distintas de granada frente a *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, observando que estos extractos presentan un amplio espectro frente a cepas de bacterias tanto Gram+ como Gram-, encontrando CMI de 0.2-0.78 mg/mL. Por otro lado, Devi y cols. (12) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos provenientes de la cáscara, pericarpio y semilla frente a las especies de bacterias *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Proteus sp.*, determinando que el extracto de la cáscara fue el más efectivo, con CMI de 0.2-3.2 mg/mL, siendo *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.* las más susceptibles y *Proteus sp.* la más resistente. En un estudio realizado por Nascimento y cols. (103) en el que evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de 10 distintas plantas (entre las que destaca la evaluación del extracto del pericarpio de la granada) frente a 14 microorganismos distintos resistentes a antibióticos, dentro de los que se encuentran *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, determinaron que el extracto fue efectivo solo frente a *P. aeruginosa* con una CMI de 70 mg/mL. Por su parte, Braga y cols. (64) evaluaron la inhibición del crecimiento de *S. aureus* utilizando el extracto metanólico del fruto de granada, encontrando que a una concentración de 0.01% v/v el crecimiento bacteriano fue retrasado y a una concentración de 1% v/v este crecimiento fue eliminado, por lo que consideran que el extracto tuvo un efecto bactericida frente a la cepa probada.

Al evaluar el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos que presentaron inhibición frente a las cepas susceptibles, encontramos que *P. aeruginosa* fue la cepa más susceptible, debido a que 4 de los 8 extractos evaluados tuvieron efecto bactericida. El EAP fue el extracto que mostró efecto bactericida en un mayor número de cepas, ya que de las 11 cepas en las que presentó actividad, en 6 de ellas inhibió al 100% el crecimiento al no presentar diferencias significativas con el C+ ($p < 0.05$), de las cuales 2 de ellas son Gram + (*S. aureus*

y *M. luteus*) y 4 Gram - (*K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *S. flexneri*), caso contrario de las 5 cepas restantes, en las cuales tuvo un efecto bacteriostático, al presentar diferencias estadísticamente significativas en los logaritmos de crecimiento cuando se comparó con el C+, por lo que se asume que los compuestos presentes en los extractos fueron efectivos para frenar parcialmente el crecimiento bacteriano (162) mas no de manera total, lo que sugiere que los compuestos bioactivos que puedan estar presentes en estos extractos pierdan potencia durante la incubación o que las concentraciones utilizadas no sean suficientes para aumentar dicha inhibición. En contraste a los resultados anteriormente planteados, el EMC presentó efecto bactericida en 2 cepas Gram - (*P. aeruginosa* y *S. flexneri*) inhibiendo al 100% el crecimiento, presentando un efecto igual al del antibiótico empleado como C+ ($p < 0.05$), resaltando que resultó ser el más efectivo a la concentración más baja, ya que frente a *P. aeruginosa* dicho efecto lo presentó a una CMI de 2.5 mg/mL en comparación con las cepas y extractos restantes en los cuales hubo inhibición. Del mismo modo los extractos EAC y EMH presentaron efecto bactericida en *P. aeruginosa*, sin embargo aunque en el caso del EAC la inhibición del crecimiento no fue al 100%, si no del 98.1%, no presentó diferencias significativas al ser comparado con el C+, por lo que se asume un efecto bactericida. Este efecto presentado, sugiere en el caso contrario al efecto bacteriostático, que los compuestos bioactivos que pueden encontrarse en estos extractos, ya sea en mayor concentración, son letales para las bacterias como lo fue la Ciprofloxacina, que aunque al ser un producto químico sintético y que a muy bajas dosis provoca la muerte celular bacteriana en un amplio espectro de bacterias tanto Gram + como Gram -.

Los antimicrobianos naturales los cuales muestren un efecto bacteriostático o bactericida, pueden prolongar el tiempo de alargar la vida de anaquel de los alimentos y prevenir entre otras cosas, infecciones causadas por alimentos contaminados. En este caso es de resaltar que a partir de extractos que contienen compuestos químicos que se encuentran de manera natural en los alimentos como es el caso de los componentes de la granada, puedan presentar un efecto similar al de un antibiótico aunque dicho efecto se presente a mayores dosis. La actividad antibacteriana de los componentes del árbol de granada es conocida principalmente debido a la presencia en sus componentes de compuestos fenólicos como taninos (principalmente ácido elágico, punicalina y punicalagina), flavonoides, polifenoles, antocianinas, entre otros compuestos (163,164) los cuales han sido utilizados en la medicina

tradicional (64,165–167) y que cabe resaltar que suelen encontrarse generalmente presentes en concentraciones elevadas a partir de extractos con características polares (19), como lo pueden ser en nuestro estudio los extractos metanólicos y butanólicos. Generalmente los antimicrobianos tienen diferentes umbrales de concentración para lograr la inhibición del crecimiento, los cuales dependen del mecanismo de acción frente al microorganismo, dentro de los que destacan tener como objetivos a la pared celular, la membrana celular, a enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistemas genéticos (168), por lo que los mecanismos de acción de estos compuestos fenólicos presentes en la planta de granada para inhibir el crecimiento de microorganismos es variado, como por ejemplo el presentar un efecto desnaturizante de enzimas (169), o también uniéndose estos compuestos a sustratos enzimáticos como carbohidratos, vitaminas y minerales, volviéndolos no disponibles para las bacterias (170,171), además de que los fenoles pueden ser absorbidos por la pared celular, resultando en una disrupción de la estructura y función de la membrana plasmática y así también causando precipitación de proteínas de membrana (161,172) o alterando la síntesis de ácidos nucleicos como el ADN y ARN (172).

En general, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden en algunos casos con los reportados previamente en la literatura, pero en otros fueron distintos, esto debido posiblemente a la gran diversidad en composición y concentración de compuestos bioactivos en las distintas partes de la granada mexicana, por lo que en futuras investigaciones deberán dirigirse para el aislamiento y caracterización de los compuestos de los componentes del árbol de granada mexicana y su posterior utilización en un estudio biodirigido para conocer los mecanismos de acción responsables de la actividad antibacteriana dicha actividad.

IX. CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento lo presentaron los extractos polares y el RAJ.
2. Los extractos polares y de polaridad intermedia presentaron inhibición en la mayoría de las cepas por el método de difusión en disco, siendo el EBJ y el EAJ los más activos.
3. El EMP y EBJ fueron los extractos más efectivos al inhibir el crecimiento a menores concentraciones (1 mg/mL a 10 mg/mL).
4. Las cepas más susceptibles por el método de difusión en disco fueron *M. luteus* y *P. vulgaris* y por el método de micro-dilución *S. aureus*, *P. vulgaris*, *M. luteus* y *P. aeruginosa*.
5. La cepa más susceptible por el método de micro-dilución con efecto bactericida fue *P. aeruginosa*.
6. El EAP fue el extracto más efectivo en el método de micro-dilución.
7. La cepa más resistente a los extractos evaluados fue *E. coli*.
8. Las cepas Gram + fueron más susceptibles a los extractos probados.
9. Los 3 extractos provenientes de la semilla de la granada presentaron poca o nula actividad.

X. RECOMENDACIONES

Debido a que la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó a partir de extractos de los componentes de la planta de la granada y las concentraciones encontradas son ligeramente elevadas en algunos casos al compararlas con la literatura, se sugiere el poder realizar dicha evaluación mediante un estudio biodirigido con los compuestos puros para conocer cuáles son los compuestos responsables de la inhibición en el crecimiento bacteriano.

Sería conveniente el poder realizar la caracterización de los compuestos químicos presentes en las distintas partes de la variedad de granada mexicana para poder realizar a futuro una comparación en la cantidad y tipo de compuestos presentes en la variedad de nuestro país en relación a las variedades de otras regiones del mundo.

Los resultados presentados en la presente investigación se realizaron *in vitro*, por lo que sería conveniente el poder realizar pruebas similares *in vivo*, para poder conocer los efectos benéficos de los compuestos en relación a la prevención o control de infecciones.

Sería pertinente el poder llevar a cabo estudios como los realizados en el presente proyecto, pero con cepas bacterianas que sean aisladas directamente de alimentos contaminados o enfermedades nosocomiales, para poder conocer si existe un efecto benéfico frente a este tipo de microorganismos que en ocasiones suelen ser resistentes a antibióticos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev*. 2008;13:128–44.
2. Meerts IATM, Verspeek-Rip CM, Buskens CAF, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, et al. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1085–92.
3. Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer -- a mini review. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60:139–44.
4. Dipak G, Axay P, Manodeep C JK. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*: an overview. *IRJP*. 2012;3:65–8.
5. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):11–7.
6. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 2000;48:4581–9.
7. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *J Agric Food Chem*. 2002;50:4791–5.
8. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9:635–54.
9. Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Hortic Rev*. 2008;35:127–91.
10. Levin GM. Pomegranate roads: a Soviet botanist's exile from Eden. 1° ed. Baer BL, editor. Forestville, CA: Floreat Press; 2006. 15-183 p.
11. California Rare fruit Growers I. Pomegranate [Internet]. 1997. [Fecha de acceso: 10 de enero de 2015]. p. 3. Disponible en: <http://www.crfg.org/pubs/ff/pomegranate.html>
12. Devi A, Singh V, A.B. B. In-vitro antibacterial activity of pomegranate and daru (wild pomegranate) against dental plaque bacteria. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3:182–4.

13. Sharma KK, Dhillon WS. Evaluation of evergreen varieties of pomegranate under Punjab conditions. *Agric Sci Dig.* 2002;22:42–4.
14. Terakami S, Matsuta N, Yamamoto T, Sugaya S, Gemma H, Soejima J. Agrobacterium-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). *Plant Cell Rep.* 2007;26:1243–51.
15. Sulochanamma BN, Reddy TY, Subbi Reddy G. Effect of basin and drip irrigation on growth, yield and water use efficiency in pomegranate cv. Ganesh. *Acta Hort.* 2005;696:277–9.
16. Prasad RN, G.J. Bankar, Vashishtha BB. Effect of drip irrigation on growth, yield and quality of pomegranate in arid region. *Indian J Hort.* 2003;60:140–2.
17. Firake NN, Kumbhar DB. Effect of different levels of N,P and K fertigation on yield and quality of Pomegranate. *J Maharashtra Agric Univ.* 2002;27:146–48.
18. Kader AA. Postharvest biology and technology of pomegranates. En: Seeram NP, Schulman RN, Heber D, editores. Pomegranates: ancient roots to modern medicine. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p. 211–20.
19. Howell AB, D’Souza DH. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:1–11.
20. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem.* 2006;54:1928–35.
21. Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle.* 2006;5:371–3.
22. Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434:486–91.
23. Medjakovic S, Jungbauer A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. *Food Funct.* 2013;4:19–39.
24. Defilippi BG, Whitaker BD, Hess-Pierce BM, Kader AA. Development and control of scald on wonderful pomegranates during long-term storage. *Postharvest Biol Technol.* 2006;41:234–43.
25. Tedford EC, Adaskaveg JE, Ott AJ. Impact of Scholar (a new post-harvest fungicide) on the California pomegranate industry. *Plant Heal Prog.* 2005;1:1–3.

26. Adaskaveg JE, Forster H. Management of gray mold of pomegranates caused by *Botrytis cinerea* using two reduced-risk fungicides, fludioxonil and fenhexamid. *Phytopathology*. 2003;93:S127.
27. Palou L, Crisosto CH, Garner D. Combination of postharvest antifungal chemical treatments and controlled atmosphere storage to control gray mold and improve storability of “Wonderful” pomegranates. *Postharvest Biol Technol*. 2007;43:133–42.
28. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem*. 2007;55:9559–70.
29. Melgarejo P, Martínez JJ, Hernández F, Legua P, Melgarejo-Sánchez P, Martínez Font R. The pomegranate tree in the world: Its problems and uses. In: Melgarejo P, Valero D, editores. II International Symposium on the Pomegranate. Zaragoza, España: Options Méditerranéennes, Series A: Mediterranean Seminars; 2012. p. 11–26.
30. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem*. 2006;54:8956–61.
31. Singh D, Singh RK. Processed Products of Pomegranate. *Nat Prod Radiance*. 2004;3(2):66–8.
32. Prakash CVS, Prakash I. Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel-a review. *Int J Res Chem Env*. 2011;1:1–18.
33. Mercado Silva E, Mondragón Jacobo C, Rocha Peralta L, Álvarez Mayorga B. Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja. *Rev Mex ciencias agrícolas*. 2015;2:449–59.
34. SIAP (Sistema de información agroalimentaria y pesquera Agricultura). Anuario estadístico de la producción agrícola [Internet]. 2014. 2014 [fecha de cita: 5 de marzo de 2015]. p. 1. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
35. López-Mejía OA, López-Malo A, Palou E. Granada (*Punica granatum* L): una fuente de antioxidantes de interés natural. *Temas Sel Ing Aliment*. 2010;4:64–73.
36. Center for New Crops & Plant Products at Purdue University. Pomegranate [Internet]. 27 de febrero de 2011. [Fecha de cita: 12 de enero de 2015]. p. 4. Disponible en: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/pomegranate.html>

37. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007;109:177–206.
38. Wang R, Ding Y, Liu R, Xiang L, Du L. Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, Veg Cereal Sci Biotechnol.* 2010;4:77–87.
39. García VC, Pérez VA. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Aliment Nutr y Salud.* 2004;11:113–20.
40. Wang R, Xiang L, Du LJ, Wang W. The Constituents of *Punica granatum*. *Asia-Pacific Tradit Med.* 2006;3:61–70.
41. Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, et al. Bioactive Compounds from the Seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *J Nat Prod.* 2004;67:2096–8.
42. Wang R, Wei Wang, Wang L, Liu R, Yi Ding, Du L. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2006;77:534–7.
43. Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS. Antimicrobial activities of pomegranate. En: Seeram NP, R.N. Schulman RN, Heber D, editores. *Pomegranates: ancient roots to modern medicine.* New York, NY, USA: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p. 168.
44. Neuhofer H, Witte L, Gorunovic M. Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (Pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie.* 1993;48:389–91.
45. Wang H, Li Z, Li Y. The composition of the fatty acids in the seed oil of *Punica granatum* and its application. *Chinese J Oil.* 1999;23:54–6.
46. Neuhofer H. The existence of pelletierine derivatives in *punica granatum*. *World Phytomedicines.* 1990;5:604.
47. Artik N. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Process.* 1998;8:492–9.
48. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2000;891:183–8.
49. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artik N. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J Food Compos Anal.* 2002;15:567–75.
50. KRISHNA V, SHARMA S, PARECK RB, SINGH P. Terpenoid constituents from some indigenous plants. *J Indian Chem Soc.* 2015;79:550–2.

51. Huang THW, Yang Q, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, et al. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:856–62.
52. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*. 2005;23:11–20.
53. Xie Y, Morikawa T, Ninomiya K, Imura K, Muraoka O, Yuan D, et al. Medicinal flowers. XXIII. New taraxastane-type triterpene, punicanolic acid, with tumor necrosis factor-alpha inhibitory activity from the flowers of *Punica granatum*. *Chem Pharm Bull*. 2008;56:1628–31.
54. Cui S, Sasada Y, Sato H, Nii H. Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *J Japanese Soc Hortic Sci*. 2004;73:241–3.
55. Barzegar M, Fadavi A AM. An investigation on the physico-chemical composition of various pomegranates (*Punica granatum* l.) grown in Yazd. *Iran J Food Sci Technol*. 2004;1:9–14.
56. Fadavi A. Note. Physicochemical Composition of Ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Iran. *Food Sci Technol Int*. 2005;11:113–9.
57. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1062–76.
58. Mirdehghan SH, Rahemi M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Sci Hortic*. 2007;111:120–7.
59. Çam M, Hışıl Y, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*. 2009;112:721–6.
60. Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, et al. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2009;104:936–42.
61. Tezcan F, Gültekin-Özgüven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem*. 2009;115:873–7.

62. Diaz-Mena AG. Calidad nutraceutica de extractos d egranada dulce y ácida y bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo in vivo. Universidad Autónoma de Querétaro; 2014.
63. Jbir R, Hasnaoui N, Mars M, Marrakchi M, Trifi M. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. *Sci Hortic*. 2008;115:231–7.
64. Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol*. 2005;96:335–9.
65. Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, Kim MS, Sohn DH, Kim HS, Park H, Shin DW, Rho JR KD. In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against Salmonella. *Evid Based Compl Alter Med*. 2011;2011:1–8.
66. Betanzos-Cabrera G, Montes-Rubio PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Food Nutr Res*. 2015;59:27620.
67. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr*. 2002;132:461–71.
68. Xu J, Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Pang W, et al. Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2005;39:80–3.
69. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:984–93.
70. Guo CJ, Wei JY, Yang JJ, Xu J, Li YF, Pang W. The comparative study on improvement of antioxidant function in the elderly by consupcion of pomegranate or apple juices. *Acta Nutr Sin*. 2007;29:292–4.
71. Meng Z, Sun LH, Chen YY, Ye M, Su H, Xing DM, et al. The effect of pomegranate leaf tannide on hyperlipidemic models. *Chinese J Exp Tradit Med Formulae*. 2005;11:22–4.
72. Li WM, Ao MZ, Yu LJ, Ding P. Microwave assisted extraction and antioxidation of seed oil of *Punica granatum*. *Nat Prod Res Dev*. 2006;18:378–80.

73. Li WM, Ao MZ, Wang JH, Yu LJ, Zhang YZ, Wan JM. Adjustment effects of seed oil of *Punica granatum* L. on blood-lipid and lipid-hyperoxidation in hiperlipidemia rats. *Food Sci.* 2007;28:309–12.
74. Lei F, Zhang XN, Wang W, Xing DM, Xie WD, Su H, et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes.* 2007;31:1023–9.
75. Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, et al. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr.* 2001;131:2082–9.
76. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.* 2004;23:423–33.
77. Wang XY, Gao XL, Mai EM. Advances in pharmacological studies of *Punica granatum*. *China Med Her.* 2008;5:13–5.
78. Li YF, Guo CJ, Yang JJ. Comparison of the protective effects on vascular endothelial cells in oxidative stress between extracts from pomegranate peel and pulp. *Chinese J Clin Rehabil.* 2006;33:81–3.
79. Betanzos-Cabrera G, Guerrero-Solano JA, Martínez-Pérez MM, Calderón-Ramos ZG, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. *Food Res Int.* 2011;44:1381–5.
80. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies *in vitro* and in diabetic patients. *Nutrition.* 2010;26:359–66.
81. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food.* 2004;7:274–83.
82. Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4018–26.
83. Xu KZ-Y, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *J Ethnopharmacol.* 2009;123:280–7.

84. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*.2006;187:363–71.
85. Haidari M, Ali M, Ward Casscells S, Madjid M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*. 2009;16:1127–36.
86. Neurath AR, Strick N, Li Y-Y, Debnath AK. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect Dis*. 2004;4:41.
87. Zhang J, Zhan BY, Yao XJ. Experimental study on the anti-herpes virus of pomegranate rind. *Chinese J Tradit Med Sci Technol*. 1995;2:28–30.
88. Zhang J, Zhan BY, Yao XJ. In vitro inactivation of hepatitis virus B (HBV) by pomegranate rind and its clinical significance. *Pharmacol Clin Chinese Mater Medica*. 1997;13:29–31.
89. Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol*.1998;62(2):183–93.
90. Saker L, Lee K, Cannito B, Gilmore A, Campbell-Lendrum D. Globalization and infectious diseases: A review of the linkages. *Geneva: Special Topics in Social, Economic and Behavioural (SEB) Research*. 2004. 6 p.
91. Ramírez SL. Shigelosis (disentería bacilar). Salud en Tabasco. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco. 2001;7.
92. World Health Organization. Causes of death among children under 5 years [Internet]. World Health Organization. 2013 [Fecha de cita: 28 de septiembre de 2014]. p. 1. Disponible en: <http://apps.who.int/gho/data/view.wrapper.CHILDCOD2v?lang=en>
93. Höfling J, Anibal P, Obando-Pereda G, Peixoto I, Furletti V, Foglio M, et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Brazilian J Biol*. 2010;70:1065–8.
94. Grosvenor PW, Supriono A, Gray DO. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonesia. Part 2: Antibacterial and antifungal activity. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2015 Apr 2];45(2):97–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7776665>
95. Nimri LF, Meqdam MM, Alkofahi A. Antibacterial Activity of Jordanian Medicinal Plants. *Informa*. 2008.

96. Silva N, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2010;16:402–13.
97. Vashist H, Jindal A. Antimicrobial Activities of Medicinal Plants –Review. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2012;3:222–30.
98. Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*. 2009 J;14:1808–17.
99. Pasha C, Sayeed S, Ali S, Khan Z. Antisalmonella Activity of Selected Medicinal Plants. *Turkey J Biotechnol*. 2009;33:59–64.
100. Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. 2001;72:171–3.
101. Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *J Ethnopharmacol*. 2004;94:49–54.
102. Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, El Sankary W, Naughton DP. Antimicrobial pomegranate rind extracts: enhancement by Cu(II) and vitamin C combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Biomed Sci*. 2009 J;66:129–32.
103. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2000;31:247–56.
104. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*. 2012;143:397–405.
105. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol*. 2009;134:244–8.
106. Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *J Food Sci*. 2007;72:M341–5.
107. Fawole O a, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:200.
108. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Am J Agric Environ Sci*. 2010;9:273–81.

109. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73:461–7.
110. Smith RM. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A.* 2003;1000–27.
111. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8:1–10.
112. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci.* 2012;1:8–26.
113. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe D Vanden, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *J Ethnopharmacol.* 2006;106:290–302.
114. Hernandez Y, Lobo M, gonzalez M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chem.* 2009;114:734–41.
115. Machado T de B, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRN dos, Silva MG da, Kuster RM. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *J Braz Chem Soc.* 2002;13:606–10
116. McCarrell EM, Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, El Sankary W, Naughton DP. Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Complement Altern Med.* 2008;8:64.
117. Pérez C, Anesini C. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *J Ethnopharmacol.* 1994;44(1):41–6.
118. Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, Naughton DP. Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. *BMC Complement Altern Med.* 2009;9:23.
119. Parashar A, Gupta C, Gupta SK, Kumar A. Antimicrobial Ellagitannin From Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits. *Int J Fruit Sci.* 2009;9:226–31.
120. Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK, Ferreira D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric Food Chem.* 2009;57:8344–9.

121. Opara LU, Al-Ani MR, Al-Shuaibi YS. Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food Bioprocess Technol.* 2008;2:315–21.
122. Belal SKM, Abdel-Rahman AH, Mohamed DS, Osman HEH HN. Protective effect of pomegranate fruit juice against *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal histopathological changes in mice. *World Appl Sci J.* 2009;7:245–54.
123. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 2013;117:426–36.
124. Coulson JM, Richardson JF, Backhurst JR, Harker JH. Chemical Engineering. 4^o ed. Oxford, U.K.: Pergamon Press; 1995.
125. Handa SS. Maceration. En: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD, editores. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. 1st ed. Trieste, Italy: International Centre for Science and High Technology; 2008. p. 22.
126. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749–55.
127. Jorgensen JH, Turnidge JD. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editores. Manual of clinical microbiology. 9^o ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 2007. p. 1157–72.
128. CLSI. M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grew aerobically Approved Standard M7–A10 ninth edition. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement CLSI document M 100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. p. 166.
129. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493–6.
130. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests Approved standard M2–A10. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement CLSI document M 100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
131. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth informational supplement M100–S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

132. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México, DF: Diario Oficial de la Federación; 1995.
133. Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola MG C-EG. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol*. 2011;31:137–51.
134. Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol*. 2007;117:112–9.
135. BÜCHI. List of solvents [Internet]. BÜCHI List of solvents. 2014 [Fecha de cita: 6 de febrero de 2015]. p. 2. Disponible en: http://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/BUCHI_List-of-Solvents_en_0_0.pdf
136. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests Approved standard M2-A10. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing 21st informational Supplement M100 S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
137. CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 21st Informational Supplement. M100 S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
138. Sadeghian A, Ghorbani A, Mohamadi-Nejad A, Rakhshandeh H. Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. *Avicenna J Phytomedicine*. 2011;1:67–73.
139. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, DF: Secretaría de Salud; 1995.
140. Sharma A, Chandraker S, Patel VK, Ramteke P. Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Pathogens causing Complicated Urinary Tract Infections. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(April):136–9.
141. Selvamohan T, Shibila VRS, Kishore S. Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *Adv App Sci Res* 2012;3:3374–81.
142. Hedge CR, Madhuri M, Nishitha ST, Arijit D, Sourav B, C. RK. Evaluation of antimicrobial properties, phytochemical contents and antioxidant capacities of leaf extracts of punica granatum L. *J Biol Sci*. 2012;1:32–7.

143. Alvarez-Cervantes P. Evaluación de la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja (*Punica granatum* L.). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
144. Li G, Xu Y, Wang X, Zhang B, Shi C, Zhang W, et al. Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(4):313–9.
145. Ali U, Kumar P. Effect of soxhlet and ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract. *Int J Food Nutr Sc*. 2014;3:265–70.
146. Wang Z. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*. 2011;17–25.
147. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*. 2002;50:81–6.
148. Rashid M, Shabbir A, Bilal R, Hafeez A, Hannan A. Antityphoid activity of peel, pericarp and fruit extracts of *Punica granatum* (Pomegranate) in vitro. *Pakistan J Med Heal Sci*. 2013;7:381–4.
149. Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2010;4:13–21.
150. Singh M, Jha A, Kumar A, Hettiarachchy N, Rai AK, Sharma D. Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. *J Food Sci Technol*. 2014;51:2070–7.
151. Seeram NP, Zhang Y, McKeever R, Henning SM, Lee R, Suchard MA, et al. Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J Med Food*. 2008;11:390–4.
152. Braidy N, Selvaraju S, Essa MM, Vaishnav R, Al-Adawi S, Al-Asmi A, et al. Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and oxidative stress in human primary neurons. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–12.
153. Abdollahzadeh S, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *J Dent*. 2011;8:1–6.
154. Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -

lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:4302–9.

155. Janani J, Estherlydia D. Antimicrobial activities of *Punica granatum* extracts against oral microorganisms. *Int J Pharm Tech Res.* 2013;5(3):973–7.
156. Pradeep BV, Manojbabu MK, Palaniswamy M. Antibacterial activity of *Punica granatum* L. against gastro intestinal tract infection causing organisms. *Ethnobot Leaflet.* 2008;12:1085–9.
157. Malviya S, Arvind, Jha A, Hettiarachchy N. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *J Food Sci Technol.* 2014;51:4132–7.
158. Hajoori M, Naik M, Naik K, Desai S. Evaluation of antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts using different solvent system. *Int J Pharmacol Screen Methods.* 2014;4:26–31.
159. Hegde Chaitra R, Madhuri M, Swaroop T, Nishitha DA, Bhattacharya S, Rohit K. Evaluation of antimicrobial properties, phytochemical contents and antioxidant capacities of leaf extracts of *Punica granatum* L. *ISCA J Biol Sci.* 2012;1:32–7.
160. Nuamsetti, T Dechayuenyong, P Tantipaibulvut S. Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *ScienceAsia.* 2012;38:319–22.
161. Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:200.
162. Khan J., Hane S. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *Int J Appl Biol Pharm Technol.* 2011;2:23–7.
163. Sharma HK, Sharma A, Parvez Y, Shrivastava HK, Singh SK. A visionary in-vitro analysis for anti-bacterial potential using seeds of a deciduous shrub *Punica granatum*. *Euro J Exp Bio.* 2014;4:117–22.
164. Kulkarni AP, Aradhya SM. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.* 2005;93:319–24.
165. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2001;74:113–23.
166. Voravuthikunchai SP, Kitpipit L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:510–2.

167. Voravuthikunchai, S. P. Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Honda T. Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *J Heal Sci.* 2005;51:590–6.
168. Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2009;8:157–80.
169. Furneri PM, Marino A, Saija A, Uccella N, Bisignano G. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agent.* 2002;20:293–6.
170. Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. *J Chem Ecol.* 1996;22:1877–99.
171. Shahidi F, Naczk M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group; 2004. 352-355 p.
172. Hassan NA, El-Feky GS, Elegami HM. Antibacterial Activity of Thirty Two Pomegranate (*Punica granatum* L.) Accessions Growing in Egypt Fruit Peels. *World Appl Sci J.* 2013;21:960–7.