



**Universidad
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
E.A.P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del
Zumo de *Punica granatum* L. “granada”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO PRESENTADO POR:**

**Br. Escobar Figueroa, Bernardita Jaquely
Br. Quispe Quispe, Lidia**

Asesor:

Dr. Félix Veliz, Luis Miguel

Co-asesor:

Q.F. Gallardo Jugo, Teresa

LIMA- PERÚ

2017

Dedicatoria

A mis amados padres Jorge Escobar y Berna de Escobar por su amor y constante apoyo en mi carrera profesional.

A mi hermanita Karim por su ayuda incondicional en cada etapa de mi vida universitaria.

A mi ahijada Aidita por estar presente en mi vida.

A mis queridos padres Eugenio Quispe Saavedra y Paula de Quispe por su apoyo incondicional.

A mi hija Sayuri Chaparro Quispe por su paciencia, amor y comprensión durante todos estos 5 años de mi carrera.

A mis hermanos Hernández, Melissa, Wilmer y Williams por su apoyo constante.

Agradecimientos

A Dios nuestro santísimo padre celestial y a su madre santísima la Virgen María, por proveernos la vida, salud y la fortaleza necesaria para poder realizar esta tesis profesional.

A la Universidad Privada Norbert Wiener por brindarnos los conocimientos necesarios para nuestra formación profesional como químicos farmacéuticos.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por apoyarnos y facilitarnos su laboratorio de Química Orgánica.

A nuestro Asesor Dr. Luis Miguel Félix Veliz por la paciencia y disposición en desarrollar nuestras ideas en beneficio de obtener un buen trabajo de investigación.

A nuestros Profesores por compartir sus conocimientos y experiencias sobre todo, a la Q.F Teresa Gallardo Jugo por su colaboración en el área de Microbiología.

A los miembros del jurado Calificador por su orientación y cuidadosa observación en nuestra investigación al Mg. Nue Martínez, Jorge, Mg. Cano, Carlos y Q.F. Gallardo Jugo, Teresa.

A nuestro amigo y compañero Blgo. Andrés García por su apoyo incondicional en el área de microbiología Clínica.

A nuestra amiga y compañera Rocío Huatuco por apoyarnos en el abastecimiento de los materiales de microbiología.

Gracias a Josué, Jairo, Michael, Jimmy, Alejandro, Sra. María y Allan por colaborarnos y apoyarnos en el abastecimiento de la muestra y desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de investigación.

Tabla de contenidos	Pág.
I. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Objetivo general	3
1.3. Objetivos específicos	3
1.4. Variables	4
1.5. Hipótesis	4
II. Generalidades	5
2.1. Marco Referencial	5
2.1.1. Antecedentes	5
2.2. Marco conceptual	9
2.2.1. Clasificación taxonómica	9
2.2.2. Distribución geográfica	10
2.2.3. Uso tradicional	11
2.2.4. Descripción botánica	11
2.2.5. Requerimientos edafoclimaticos	13
2.2.6. Variedades	14
2.2.7. Valor nutricional	14
2.3. Estudio químico	15
2.3.1. Taninos	16
2.3.1.1. Clasificación de taninos	16
2.3.1.2. Identificación de coloración	17
2.3.2. Polifenoles	17
2.3.2.1. Origen Biosintético de los polifenoles	17
2.3.2.2. Distribución	21
2.3.2.3. Estructura química de los polifenoles	21
2.3.2.4. Clasificación de los polifenoles	22
2.3.2.5. Propiedades benéficas de los polifenoles	23
2.3.3. Ácido elágico	24

2.3.4. Ácido gálico	27
2.3.5. Estudio de la Solubilidades	29
2.4. Estudio microbiológico	31
2.4.1. Antibiograma	31
2.4.2. Medio de cultivo	31
2.4.3. Método de Difusión en disco	31
2.5. Espectrofotometría UV-Visible	33
2.6. Estudio cuantitativo del ácido elágico	34
2.6.1. Mecanismo de la reacción de formación de color	34
2.7. Espectroscopia de Infrarrojo.	36
2.7.1. Reflectancia total atenuada (ATR)	36
III. Parte experimental	38
3.1 Materiales	38
3.1.1. Materiales de vidrio y otros	38
3.1.2. Equipos e instrumentos	38
3.1.3. Reactivos	39
3.1.4. Material para medios de cultivo	40
3.1.5. Material para análisis microbiológico	40
3.2 Metodología y procedimiento	41
3.2.1. Ubicación de la especie vegetal	
<i>Punica granatum L.</i> “granada”	41
3.2.2. Obtención de la muestra	41
3.2.2.1 Preparación de la muestra	41
3.2.3. Análisis fitoquímico cualitativo	44
3.2.3.1. Prueba de solubilidad	44
3.2.3.2. Análisis fitoquímico	44
3.2.3.3. Análisis volumétrico de taninos totales	44
3.2.3.4. Análisis cuantitativo de azúcares reductores directos	44
3.2.4. Análisis cuantitativo del ácido elágico.	45

3.2.5. Análisis cualitativo del ácido elálgico en espectroscopia IR	47
3.2.6. Análisis microbiológico	48
3.2.6.1. Análisis de control de muestra	48
3.2.6.2. Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición	48
3.2.6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	48
IV. Resultados	53
4.1. Clasificación Taxonómica de la especie vegetal	53
4.2. Prueba de solubilidad	53
4.3. Análisis fitoquímico	54
4.4. Análisis volumétrico de taninos totales	55
4.5. Análisis de azúcares reductores por el método de Fehling Ay B	55
4.6. Análisis cuantitativo del ácido elálgico en el extracto acetato de etilo y acetona en el zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”	56
4.7. Análisis cualitativo del ácido elálgico en espectroscopia IR	57
4.8. Análisis microbiológico	61
4.8.1. Análisis de control de muestra	61
4.8.2. Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición	64
4.8.3 Actividad antimicrobiana	66
V. Discusión	74
VI. Conclusiones	81
VII. Recomendaciones	82
VIII. Referencias bibliográficas	83
IX. Anexos	105

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla N° 1. Composición nutricional del arilo de granada.	14
Tabla N° 2. Tabla de los principales constituyentes químicos de <i>Punica granatum L.</i> árbol y fruto.	15
Tabla N° 3. Prueba de solubilidad.	53
Tabla N° 4. Análisis Fitoquímico.	54
Tabla N° 5. Análisis volumétrico de taninos totales de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	55
Tabla N° 6. Análisis de azúcares reductores de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	55
Tabla N° 7. Concentración de ácido elágico del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	56
Tabla N° 8. Concentración de ácido elágico del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	56
Tabla N° 9. Región de lectura en espectroscopia IR 450 – 4000 nm del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”	57
Tabla N° 10. Región de lectura en espectroscopia IR 450 – 4000 nm del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”	59
Tabla N° 11. Análisis de control de muestra del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	61
Tabla N° 12. Análisis de control de muestra del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	61
Tabla N° 13. Análisis de control de esterilidad en discos de inhibición en papel Watman N° 10.	64
Tabla N° 14. Análisis de control de esterilidad en discos de inhibición en papel Watman N° 10 + extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	64

Tabla N° 15. Análisis de control de esterilidad en discos de inhibición en papel Watman N° 10 + extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	64
Tabla N° 16. Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	67
Tabla N° 17. Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	69
Tabla N° 18. Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada” frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	71
Tabla N° 19. Cuadro comparativo entre la inhibición bacteriana de los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada” y la cuantificación del ácido elágico.	73

Lista de Figuras

	Pág.
Figura N° 1: Arbusto de la planta <i>Punica granatum</i> L. “granada”	9
Figura N° 2: Centro de Origen Oriente Próximo (Centro IV de Vavilov) .	10
Figura N° 3: Puntos de cultivo en el Perú	11
Figura N° 4: Partes del fruto <i>Punica granatum</i> L. “granada”	12
Figura N° 5: Biogenética de los taninos hidrolizables	19
Figura N° 6: Estructuras químicas de compuestos polifenólicos no Flavonoides.	22
Figura N° 7: Fitoconstituyentes químicos principales de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	28
Figura N° 8: Taninos hidrolizables	30
Figura N° 9: Principio de la difusión del antibiótico en el agar	32
Figura N° 10: Características de un espectrofotómetro uv-visible	33
Figura N° 11: Reacción del ácido elágico con el electrófilo NO ⁺	35
Figura N° 12: Reflectancia total atenuada.	37
Figura N° 13: Gráfica de los picos de absorción infrarroja del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L . “granada”.	58
Figura N° 14: Gráfica de los picos de absorción infrarroja del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L . “granada”.	60

Figura N° 15: Análisis de control de muestra examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	62
Figura N° 16: Análisis de control de muestra examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	63
Figura N° 17: Prueba de esterilidad de los discos en Papel Whatman N° 10 en agar Müller Hinton y agar Sabouraud.	65
Figura N° 18: Prueba de esterilidad de discos impregnados con los extractos en agar Müller Hinton y agar Sabouraud.	65
Figura N° 19: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada” en la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 correspondiente a las concentraciones del extracto: 400 mg/mL. y 300 mg/mL.	68
Figura N° 20: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada” en la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 correspondiente a las concentraciones del extracto: 500 mg/mL., 400 mg/mL. y 300 mg/mL.	70
Figura N° 21: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada” en la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	72
Figura N° 22: Planta entera de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	93
Figura N° 23: Fruto de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	93
Figura N° 24: Frutos maduros y fresco de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	93
Figura N° 25: Arilos expuestos de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	93
Figura N° 26: Separación manual de los arilos de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	94

Figura N° 27: Extracción manual del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	94
Figura N° 28: Zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	94
Figura N° 29: Extracción de la fase orgánica del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	94
Figura N° 30: Última extracción sucesiva de la fase orgánica del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	95
Figura N° 31: Filtración final del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	95
Figura N° 32: Preparación del extracto en acetona de los arilos de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	95
Figura N° 33: Maceración del extracto en acetona de los arilos de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	95
Figura N° 34: Filtración del extracto en acetona de los arilos de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	96
Figura N° 35: Extracto en acetona y Extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	96
Figura N° 36: Prueba de solubilidad del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	96
Figura N° 37: Prueba de solubilidad del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	97
Figura N° 38: Prueba fitoquímica para alcaloides extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	97
Figura N° 39: Prueba fitoquímica para alcaloides extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	97
Figura N° 40: Prueba fitoquímica para flavonoides y compuestos fenólicos del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	98

Figura N° 41: Prueba fitoquímica para flavonoides y compuestos fenólicos del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	98
Figura N° 42: Prueba fitoquímica de taninos del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	98
Figura N° 43: Prueba fitoquímica de taninos del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	99
Figura N° 44: Prueba fitoquímica de azúcares reductores del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	99
Figura N° 45: Prueba fitoquímica de azúcares reductores del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	99
Figura N° 46: Hidrólisis del extracto de acetona y acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	99
Figura N° 47: Residuo y sobrenadante del extracto de acetona y acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”.	100
Figura N° 48: Lavado del residuo en CH ₃ (CO) CH ₃ : H ₂ O :HCl _(c)	100
Figura N° 49: Lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a 538 nm.	100
Figura N° 50: Análisis cualitativo en espectroscopia IR del extracto en acetona y acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”	100
Figura N° 51: Cristal ATR transmisor de la espectroscopia IR.	101
Figura N° 52: Control de microorganismos específicos en las muestras.	101
Figura N° 53: Selección de colonias <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	101
Figura N° 54: Selección de colonias <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	101

Figura N° 55: Selección de colonias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	102
Figura N° 56: Preparación del inóculo con la escala de Mc Farland.	102
Figura N° 57: Toma de alícuota bacteriana.	102
Figura N° 58: Solución stock del extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	102
Figura N° 59: Solución stock del extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	103
Figura N° 60: Preparación de las concentraciones en el extracto de acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	103
Figura N° 61: Preparación de las concentraciones en el extracto de acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	103
Figura N° 62: Preparación de los discos de sensibilidad impregnados con los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	104
Figura N° 63: Aplicación de los discos de sensibilidad preparados con los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”.	104
Figura N° 64: Vista completa de las placas con los discos de sensibilidad.	104

Lista de anexos

	Pág.
Anexo N° 1: Constancia de clasificación de <i>Punica granatum</i> L. “granada”	105
Anexo N° 2: Preparación de medios de cultivo.	106
Anexo N° 3: Manejo del espectroscopio infrarrojo IR.	106

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

Término	Sigla/abreviatura
Grado Celsius	°C
Milímetro	mm
Centímetro	cm
Kilogramo	Kg
Gramo	g
Milígramo	mg
Microgramo	µg
Mililitro	mL
Microlitro	µL
Kilocalorías	Kcal
Lipoproteína de baja densidad	LDL
Gramo mol	gmol
Unidades Internacionales	UI
Uridina difosfato	UDP
Hexahidroxidifenico	HHDP
Dehidrohexahidroxidifenico	DHHDP
Taninos hidrolizables	HT
Reactivo de ácido Tiobarbitúrico	TBARS

Antígeno prostático específico	PSA
Ácido gálico	AG
Ácido elágico	AE
Potencial de Hidrogeno	Ph
Unidad Formadora de Colonia	UFC
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI
Metros sobre el nivel del mar	M.S.N.M
American Type Culture Collection	ATCC
National Committee for Clinical Laboratories Standards	NCCLS
Clinical & Laboratory Standards Institute	CLSI
Organización Mundial de la Salud	OMS
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	MRSA
Infecciones Hospitalarias	IH
<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia Intermedia a Vancomicina	SAIV
Unidades de cuidados Intensivos	UCI
Concentración Inhibitoria Media	IC ₅₀
Potencial de la constante de alcalinidad	pK _b
Constante de proporcionalidad	K
Ultravioleta	UV
Infrarrojo cercano	NIR

Infrarrojo medio	MIR
Infrarrojo lejano	FIR
Infrarrojo	IR
Reflectancia total atenuada	ATR
Concentración	c
Absorbancia	A
Absortividad molar	ϵ
Espesor	l
Tryptone soya broth	TSB
Trypticase soy agar	TSA
Farmacopea Americana de los Estados Unidos	USP

RESUMEN

Punica granatum L. "granada" es utilizada como parte de la medicina tradicional desde tiempos remotos para diversas enfermedades, muchos estudios han demostrado, que posee propiedades antioxidante, antiinflamatoria, antiparasitaria, antifúngico y generalmente estos estudios se han realizado sobre cáscara de granada en extractos hidroalcohólicos, pero pocas investigaciones se han realizado en zumo de granada en extractos de acetona y acetato de etilo para comprobar su actividad antibacteriana. Asimismo, evaluar la relación del contenido de un principio activo frente a esta propiedad antibacteriana. Por lo que el objetivo principal del presente trabajo es evaluar la actividad antibacteriana en los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L. "granada"*. La actividad antibacteriana se determinó mediante la prueba de sensibilidad, utilizando la técnica de difusión en disco. El fruto entero fue recolectado en el distrito de Chilca, provincia de Cañete, departamento de Lima. Los extractos se sometieron a maceración, filtración y finalmente secado. Se prepararon 4 concentraciones de extracto en acetato de etilo y acetona en el zumo de *Punica granatum L. "granada"*; 200 mg/mL. 300 mg/mL. 400 mg/mL. 500 mg/mL. Los cuales fueron enfrentados al crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las zonas de inhibición se determinó de manera cualitativa de acuerdo a lo establecido a la escala de Durafford; efecto inhibitorio *in vitro* en fitoterapia y según la CLSI en estándares antimicrobianos. Los halos de inhibición (16,5 , 14 y 12 mm) se obtuvo frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los halos de inhibición formados por *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron de 12,5 y 11 mm. y el estudio comparativo fitoterapéutico entre la inhibición microbiana y la cuantificación del ácido eláxico fue inversamente proporcional a la inhibición microbiana.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L. "granada"*.

SUMMARY

Since ancient times *Punica granatum L.* " pomegranate " has been used as part of traditional medicine for various diseases. Many studies have shown to have antioxidant, anti-inflammatory, antiparasitic, antifungal properties. Generally these studies have been carried out on pomegranate peel in hydroalcoholic extracts. But little researches have been done on pomegranate juice in extracts of acetone and ethyl acetate to check its antibacterial activity. Also, we wish to evaluate the relation of the content to the principal metabolite against to an antibacterial property. The main objective of the present work is to evaluate the antibacterial activity in the extracts of ethyl acetate and acetone of the juice of *Punica granatum L.* "pomegranate" against pathogenic bacteria. The antibacterial activity was determined by the sensitivity test, using the disc diffusion technique. The fruit of *Punica granatum L.* "pomegranate" was collected in the district of Chilca, Cañete province, department of Lima. The extracts were subjected to maceration, filtration and drying. Four concentrations of extract in ethyl acetate and acetone were prepared in juice of *Punica granatum L.* "pomegranate"; 200 mg / ml. 300mg / mL. 400 mg / mL. 500mg / mL. The study was carried out on the bacterial inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The zones of inhibition were qualitatively determined according to the established Durafford scale; Inhibitory effect *in vitro* in phytotherapy and according to the CLSI antimicrobial standards. The zones of inhibition were (16,5 , 14 and 12 mm) against the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The zones of inhibition against the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 were 12,5 and 11 mm. And comparative study between the microbial inhibition and the content of the ellagic acid was inversely proportional to the microbial inhibition.

Key words: Antibacterial activity, ethyl acetate and acetone extracts from *Punica granatum L.* juice. "pomegranate".

I. INTRODUCCIÓN

La Salud Pública enfrenta una crisis global a causa de la resistencia bacteriana. Esta crisis tiene diversas dimensiones, todas igualmente importantes: sobre uso inapropiado de los antibióticos existente que acelera exageradamente la resistencia; falta de disponibilidad de antibióticos efectivos para las poblaciones pobres y necesitadas; ausencia de innovación y desarrollo de nuevos antibióticos.¹

Staphylococcus aureus es el mayor patógeno humano causante de infecciones a la piel y tejidos, neumonía, septicemia e infecciones por dispositivos asociados. La emergencia de cepas resistentes a meticilina y otros agentes antibacteriales ha llegado a ser una preocupación mayor especialmente en el ambiente hospitalario.² *Pseudomonas aeruginosa* es causante de infecciones intrahospitalarias y concretamente de infecciones adquiridas en las unidades de cuidados intensivos (UCI), entre las que destaca la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV). Entre los pacientes con neumonía nosocomial grave que precisan ingreso en la UCI, el 42% de las diagnosticadas etiológicamente se debe a bacilos gramnegativos, y *Pseudomonas aeruginosa* es la causa en el 60% de los casos.³

Las enfermedades epidémicas emergentes o re-emergentes constituyen una amenaza permanente para la seguridad sanitaria mundial. El Duodécimo Programa General de Trabajo de la OMS define la reducción de la mortalidad, la morbilidad y las perturbaciones sociales que provocan las epidemias a través de actividades de prevención, preparación, intervención y recuperación como uno de los cinco imperativos estratégicos de la OMS para los años 2014-2019. Por ejemplo; en las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de Dengue en el mundo; en la Región del Pacífico Occidental en el 2016 se notificaron más de 375 000 casos, 176 411 de ellos en Filipinas y 100 028 en Malasia, cifras que representan una carga similar a la de años anteriores en ambos países. Hasta la semana epidemiológica 11 de 2017, la Región de las Américas había notificado 50 172 casos, cifra inferior a la registrada en el mismo periodo en años anteriores.⁴

En muchos países se usó como parte de la medicina tradicional la *Punica granatum* L.; como hojas, jugo y cáscara de fruta para disentería, dolor abdominal y antiparasitario. La química analítica de diferentes partes de la granada ha sido estudiada por muchos investigadores; encontraron que la fruta y la cáscara de granada es una fuente rica de compuestos polifenólicos y además, se informó en numerosos estudios por tener excelentes propiedades antifúngicas, antiprotozoarias, antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antibacterianas.⁵ El potencial terapéutico de la granada es amplio incluso en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, afecciones dentales, disfunción eréctil y protección contra la radiación UV .Otras aplicaciones potenciales ; isquemia cerebral infantil, alzheimer , infertilidad, artritis y obesidad.⁶

Es por ello, necesario y conveniente hacer uso de la medicina tradicional a través de las plantas medicinales que han cobrado mayor importancia ante la aparición de nuevas enfermedades y la ineficacia que al cabo de un tiempo muestran algunos antibióticos por la resistencia de los microorganismos patógenos hacia el hombre. Esto conduce a la búsqueda de metabolitos activos en los extractos de los recursos naturales. A través del estudio de las plantas medicinales permite determinar el o los principios activos en un extracto vegetal y determinar la concentración mínima de acción o el efecto sinérgico de mezclas de estos metabolitos.

Por toda esta problemática consideramos importante el desarrollo de este trabajo de investigación porque brindará una opción preventiva o curativa de las afecciones bacterianas en beneficio de la población de bajos recursos económicos.

1. 1. Planteamiento del problema

¿Tendrán actividad antibacteriana los extractos de acetato de etilo y acetona del Zumo de *Punica granatum* L. “granada”?

1.2. Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del Zumo de *Punica granatum* L. “granada”.

1.3. Objetivos específicos

Recolectar e identificar la planta entera y fruto de *Punica granatum* L. “granada”.

Preparar los extractos acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”.

Analizar los fitoconstituyentes en los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”.

Analizar cuali-cuantitativamente el ácido elálgico en el zumo de *Punica granatum* L. “granada”.

Evaluar la actividad antibacteriana del zumo de granada *Punica granatum* L. “granada” en cepas certificadas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Comparar la actividad antibacteriana entre los extractos acetato de etilo y acetona en relación a la concentración del ácido elálgico del zumo de *Punica granatum* L. “granada”.

1.4. Variables:

a).- Independiente:

Extracto en acetato de etilo

Extracto en acetona

b).- Dependiente:

Actividad antibacteriana del zumo de *Punica granatum L.* "granada"

1.5. Hipótesis.

Los extractos acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* "granada" tienen actividad antibacteriana.

II. GENERALIDADES

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Antecedentes

La actividad antibacteriana de *Punica granatum* L. “granada” ha sido documentada en diferentes medios de extracción.

El estudio del efecto antibacteriano de la cáscara de granada en extracto de Hexano, Acetato de etilo y Metanol desarrollado por *Barathikannan* en Arabia Saudita resulto los siguientes resultados: a una concentración de (2,5 mg/mL) *Escherichia coli* MTCC 441 en Hexano 8 ± 1 mm, Acetato de etilo 16 ± 1 mm, Metanol 13 ± 2 mm antibiótico patrón Estreptomina 10 ug/ disco obtuvo 24 ± 1 mm. En *Staphylococcus epidermidis* (clínica) en Acetato de etilo 10 ± 1 mm. Estreptomina patrón obtuvo 16 ± 1 mm. En Hexano y Metanol no hubo inhibición.⁷

Acerca del estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica de la *Punica granatum* L. “granada” en extractos metanólico y acuoso concluye *Sabbar* de la universidad de la India que la actividad antimicrobiana es mayor en la cáscara en extracto metanólico en comparación con el jugo de granada. En *Escherichia coli* 20 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 22 mm, *Staphylococcus aureus* 25 mm y en el jugo de granada 17 mm *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 21 mm, *Staphylococcus aureus* 23 mm. En el extracto acuoso es casi similar el resultado en la cáscara en relación al jugo de granada. En la cáscara se obtuvo *Escherichia coli* 20 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 20 mm, *Staphylococcus aureus* 25 mm, y en el jugo de granada en *Escherichia coli* 20 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 19 mm, *Staphylococcus aureus* 26 mm .⁸

La investigación realizada por *Abdullah* en Irak acerca de la actividad antibacteriana en el zumo de granada demostró que el extracto acuoso presento inhibición de 14 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* fue significativamente mayor que la de 4mm en

ciprofloxacino, amikacina 2 mm y ampicilina. Asimismo, la inhibición era de 13 mm contra *Escherichia coli* menor que ciprofloxacina de 17 mm, para la *Staphylococcus aureus* zona de inhibición fue de 14,5 mm que fue mayor en comparación 2 mm en amikacina y 8 mm para ampicilina, pero fue menor en ciprofloxacino (16 mm).⁵

En el estudio de la concentración inhibitoria máxima IC₅₀ (ug/mL) de jugos de granada Marca POMX (marca comercial) realizado por *Muntha* en la universidad de Missisipi –USA en fracciones de acetato de etilo y en extracto acuoso de jugo de granada. Se presentaron los siguientes resultados: en la fracción de acetato de etilo etOAc presento un IC₅₀ contra *Escherichia coli* de 50 ug /mL, *Pseudomonas aeruginosa* de 45 ug/mL y *MRSA* fue de 50 ug/ mL. En el extracto de zumo de granada demostró un IC₅₀ contra *Escherichia coli* de 25 ug/mL, *Pseudomonas aeruginosa* de 20 ug/ mL y *MRSA* 25 ug/mL.⁹

Los resultados de investigación acerca de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en bebidas comerciales de jugo granada y jugo fresco de granada reportado por *Betanzos-Cabrera* en México mostraron los siguientes resultados: 20% de inhibición para jugo fresco de granada y para las marcas Ocean Spray® al 20% inhibió el 100% Del Valle® 20% solo inhibió 15% de las cepas Jumex® y Sonrisa® no mostraron inhibición.¹⁰

Estudios en Brasil realizado por *Machadoa* sobre el pericarpio del fruto fresco de *Punica granatum L.* “granada” en extracto etanólico el cual ha sido sometido a fracciones de Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo y Butanol. La actividad antibacteriana por los Punicalagin fue para una concentración 250 µg – método por difusión de disco con una clara inhibición de 20mm para todas las bacterias testeadas. Y la concentración mínima inhibitoria MIC fue de 61.5 µg mL⁻¹.¹¹

Sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* in vitro en cáscara de *Punica granatum L.* “granada” en extracto hidroalcohólico realizado en

Trujillo –Perú por *Bernal* encontró que a medida que aumentaba la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *Punica granatum L.* “granada” el porcentaje de inhibición aumentaba y la cepa *Staphylococcus aureus* tuvo mayor porcentaje de inhibición ($p < 0,05$) que *Staphylococcus aureus. ATCC 25923*, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* es la que menos porcentaje de inhibición presentó. La concentración mínima bactericida de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus ATCC 25923* es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras *Pseudomonas aeruginosa* fue a partir de 31.25 mg/mL.¹²

La *Punica granatum L.* “granada” cuya especie pertenece a la familia de Lythraceae del género *Punica*. Es una planta que se origina desde hace muchos años desde los egipcios y caminantes del desierto.⁶ *Punica granatum L.* “granada” es una planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas es cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En el Perú se cultiva en Ica, Lima, La libertad, Tacna, Moquegua y Lambayeque. ¹²

El uso popular extendido de esta planta le ha otorgado propiedades útiles para la medicina; las semillas son demulcentes, la corteza y las flores se preparan para eliminar la tenia y como vermífugo en general, las flores y las cáscaras del fruto se usan como astringentes y para descargar crónicas de moco, hemorragias pasivas, enfermedades de la boca, sudor de noche, diarreas y diabetes , en el caso particular del pericarpio del fruto se emplea en diferentes preparados para tratar úlceras pépticas, lepra, inflamación, como abortivo, anticonceptivo, trastornos del tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal.^{12,13}

El ácido elálgico es un elagitanino presente en el metabolismo secundario de los vegetales, su principal característica es su capacidad antimicrobiana, antioxidante, antimutagénica, anticarcinogénica y antiviral. El ácido elálgico ha probado ser un potente antimicrobiano, se han realizado trabajos experimentales contra patógenos como *Staphylococcus aureus* en donde no permitió la coagulación del plasma en un

tiempo de incubación de 24 h a 37°C, inhibiendo el crecimiento del microorganismo. En otro estudio los precursores del ácido elágico (*Punicalagina*), obtenidos de cáscara de granada (*Punica granatum L.*), mostraron actividad antibacterial contra 18 cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (por sus siglas en inglés MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 61.5 µgmL⁻¹.¹³

Existen antecedentes que indican el potencial antimicrobiano de componentes de especies vegetales distribuidas en la zona semidesértica de México. Entre estas especies vegetales destacan la gobernadora (*Larrea tridentata Cov.*), la nuez (*Carya illinoensis*) y la granada (*Punica granatum L.*).¹⁴

Las propiedades antioxidantes del ácido elágico permiten neutralizar los radicales libres, las sustancias tóxicas y activar las enzimas antioxidantes, que contribuye a consolidar el sistema de defensa del cuerpo. Por otra parte, se han informado muchas propiedades beneficiosas en particular para el ácido elágico y compuestos fenólicos en general, propiedades antiinflamatorias, anti-microbianas y anti-alérgicos confirmadas por muchos científicos.¹⁵

El ácido gálico se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica. Parece poseer propiedades anti-fúngicas y anti-virales. El ácido gálico actúa como antioxidante y ayuda a proteger las células humanas contra daño oxidativo. Se encontró también que muestra citotoxicidad contra las células cancerosas, sin dañar las células sanas. El ácido gálico se utiliza como un astringente remoto en casos de hemorragia interna. También se utiliza para tratar la diabetes y la albuminuria.¹⁶

Los polifenoles representan uno de los componentes abundantes en la *Punica granatum L.*; la hidrólisis de estos compuestos genera monofenoles de alto interés médico-farmacéutico, alimentario, agronómico e industrial.^{13,15}

En el presente trabajo se evaluará la actividad antibacteriana de los extractos acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Clasificación taxonómica

La posición taxonómica según el herbario del museo de historia natural de la U.N.M.S.M. Ver anexo N° 1

La granada (*Punica granatum L.*) es el fruto de un árbol perteneciente a la familia *punicaceae*. Es nativo de Irán hasta el Himalaya en el norte de la india ^{9,10,17,18} y ha sido cultivado y naturalizado en toda la región del mediterráneo desde la antigüedad.^{18,19,20} Los estudios demuestran que el jugo de granada tiene una potente actividad antioxidante^{6,9,10} (capacidad de eliminar los radicales libres), significativamente más alta que los jugos de frutas más comúnmente consumidos, como la uva, el arándano, el pomelo y la naranja.¹⁰ Esta actividad se ha atribuido a los polifenoles ^{5,6,8} antioxidantes, que incluyen los elagitaninos (taninos hidrolizables) y las antocianinas (taninos condensados). ^{6,8,9,10}

La planta de granada es un arbusto erecto y su fruta es conocida por ser rica fuente elagitaninos bioactivos.¹⁹ El fruto es baya globosa, llena de lóbulos de cálices persistentes con un pericardio aleado lleno de numerosas semillas, que son redondeado por una pulpa de color rosa a rojo, transparente, jugosa, ácida y agradable. ^{9,19}

Figura N° 1: Arbusto de la planta *Punica granatum L.* “granada”

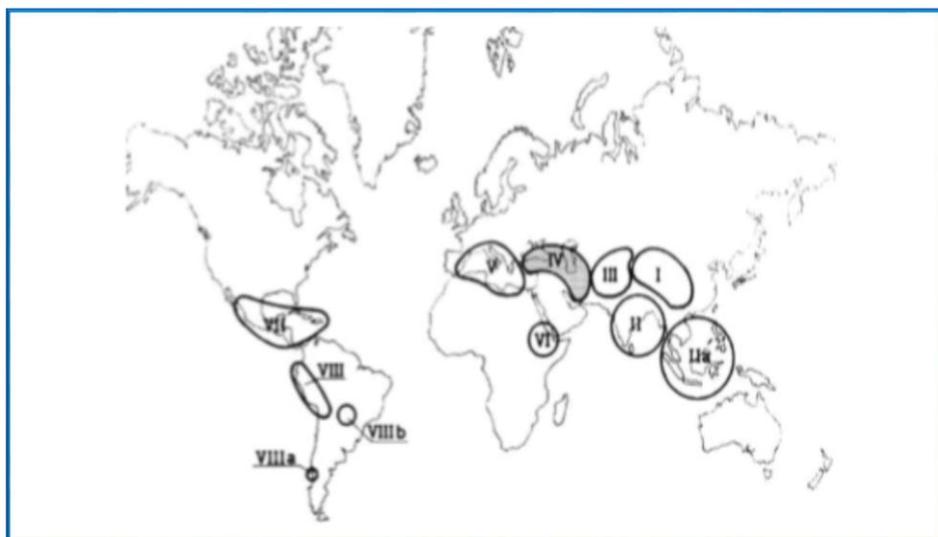


Fuente: Ilustración del cultivo del granado (Taype)¹⁷

2.2.2. Distribución geográfica

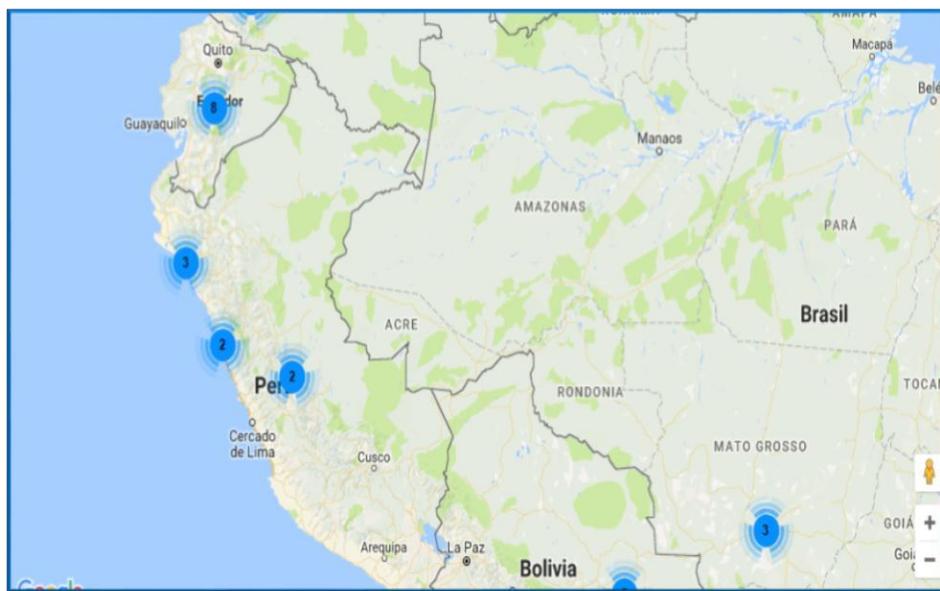
El granado es un frutal cultivado desde la antigüedad y como se ha indicado su centro de origen se encuentra en Oriente Próximo (Centro IV de Vavilov) . Desde aquí se difundió a diferentes zonas donde se cultiva y en las que existe gran diversidad genética como consecuencia de su propagación por semillas, que germinan con gran facilidad o son difundidas por aves y otros animales. La gran diversidad que presenta la especie queda patente por el gran número de variedades descritas en los diferentes países de Oriente, área mediterránea y occidente. Así en España se dispone del principal banco de germoplasma de Europa con más de 104 accesiones, y en otros países como India, Turkmenistán, Irán, etc. también existen grandes colecciones, como la existente en Irán (principal productor mundial) con más de 760 accesiones o en Turkmenistán, cuya estación experimental de recursos genéticos de plantas, creada en 1934, cuenta con 1117 accesiones.²¹ En el Perú se cultiva en Ica, Lima, La libertad, Tacna, Moquegua, Lambayeque.^{12,22}

Figura N° 2: Centro de origen Oriente Próximo (Centro IV de Vavilov) .



Fuente: Sánchez Mongue ²¹

Figura N° 3: Puntos de cultivo en el Perú



Fuente obtenida de: URL: <http://eol.org/pages/582971/maps> 21

2.2.3. Uso tradicional

El uso de la granada ha sido mencionado en la literatura antigua, incluyendo textos eyurvédicos,⁶ papiros Ebers y documentos griegos, medicina yuyani.^{6,9} Se ha utilizado como un vermífugo,^{5,6,10,11,12} astringente, bactericida, refrigerante, estimulante, afecciones estomacales, asma, bronquitis, tos, problemas cardiacos,^{9,10} disentería ⁵ , diarrea ^{6,10,11} dispepsia, fiebre, inflamación, trastornos hemorrágicos, heridas, úlceras, moretones, llagas, lesiones en la boca, vaginitis, infecciones del tracto urinario, tinte para el cabello, para mejorar la malaria, y las fiebres estacionales.^{9,10,12,23}

2.2.4. Descripción botánica¹⁷

Pequeño árbol caducifolio, a veces con porte arbustivo, de 3 a 6 m de altura, con el tronco retorcido. Madera dura y corteza escamosa de color grisáceo.

Hojas: Son de color verde brillante, lustrosas por el haz y con el borde entero. Nacen opuestas o casi opuestas sobre las ramas o bien agrupadas formando hacecillos,

tienen forma lanceolada a abovada, un pecíolo corto y son ligeramente correosas. Generalmente miden 2 - 8 x 0,8 - 2 cm, y tienen un nectario apical que segrega azúcares (fructosa, glucosa, sucrosa); las estípulas son rudimentarias y difíciles de apreciar.

Flores: Hermafroditas, solitarias o reunidas en grupos de 2 - 5 al final de las ramas nuevas y de 3 - 4 cm de diámetro. Son grandes y de color rojo, lustrosas, acampanadas, subsentadas, con 5 - 8 pétalos y sépalos, persistiendo el cáliz en el fruto. En algunas variedades las flores son abigarradas e incluso matizadas en blanco.

Fruto: Baya globosa denominada balausta, de color rojo brillante, verde amarillento, o blanquizco, rara vez violeta, cuando madura, estando coronado por el cáliz, de 5 - 8 cm de diámetro, lleno de semillas y cuenta con una cáscara coriácea.

Semillas: Son angulares y duras por dentro, la capa externa de la testa está cubierta por una capa delgada o pulpa jugosa, roja, rosa o blanco amarillenta, astringente, sub ácida o ácida.

Figura N° 4: Partes del fruto *Punica granatum* L. "granada"



Fuente: Ilustración de *Punica granatum* L. ([Otto W. Thomé](#): Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, 1885) ²⁴

2.2.5. Requerimientos edafoclimaticos ^{17,22}

- **Clima**

El clima que más conviene al granado es el clima subtropical e incluso el tropical. Los mejores frutos se obtienen en las 10 regiones subtropicales donde el periodo de temperaturas elevadas coincide con la época de maduración de las granadas. El granado exige mucha agua y frescura para sus raíces y solamente en estas condiciones es cuando da muchos frutos de buena calidad. Al mismo tiempo soporta muy bien la sequía. El granado prefiere más bien un clima templado e incluso caluroso que los relativamente fríos.

- **Suelo**

El granado no es exigente en suelo. Sin embargo, da mejores resultados en suelos profundos; le conviene las tierras de aluvión. Los terrenos alcalinos le son favorables; incluso los excesos de humedad favorecen su desarrollo. El suelo ideal debe ser ligero, permeable, profundo y fresco. Le es indiferente la alcalinidad o acidez del suelo. Es tolerante a la sequía, a la salinidad, a la clorosis férrica y a caliza activa.

- **Altitud**

Desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm

- **Temperatura**

Presenta un amplio rango de adaptación desde -5 a 30°C. Las condiciones ideales de adaptación y rendimiento se dan en climas cuyas temperaturas fluctúa entre los 15 y 25°C. En nuestro país, se adaptan muy bien a las zonas del sur de la costa central regiones de Lima e Ica. La época de cosecha se inicia en los meses de marzo a mayo.

2.2.6. Variedades^{17,22}

- **Mollar de Elche.-** Árbol muy vigoroso de rápido desarrollo, fruto grande, grano grueso, rojo oscuro y pepetilla (semilla) muy reducida y blanda.
- **Mollar Valenciana.-** Árbol vigoroso, fruto de tamaño grande, forma redondeada y aplanada, granado grueso y pepetilla muy reducida. Se caracteriza por ser de recolección temprana.
- **Acco & Shani.-** Es un árbol de tamaño mediano con un fruto (300 g) la segunda semana de febrero tiene arilos de color rojo, tamaño mediano, sabor dulce y es la segunda variedad más cultivada en el Perú.

Las variedades que se encuentran propagando con éxito en nuestro país son la “Wonderfull”, y “Mollar de Elche”.

2.2.7.- Valor nutricional

Tabla N° 1: Composición nutricional del arilo de granada

Componente	Unidad	Valor
Agua	g	80,97
Energía	Kcal	68
Proteína	g	0,95
Grasa	g	0,30
Carbohidratos	g	17,17
Fibra dietética	g	0,6
Azúcares totales	g	16,57
Vitamina C	g	6,1 x 10 ⁻³
Vitamina A	UI	108
Vitamina E	g	0,6 x 10 ⁻³

Vitamina K	g	4,6 x 10 ⁻⁶
Fitoesteroles	g	17x 10 ⁻³
α- caroteno	g	50 x 10 ⁻⁶
β- caroteno	g	40 x 10 ⁻⁶

Fuente: Carbonel y Sánchez (2012) ²⁵

2.3. Estudio químico

La importancia medicinal de la *Punica granatum L.* es sin duda la presencia de algunos de sus metabolitos especiales como: alcaloides, glucósidos, resinas, aceites volátiles, gomas y taninos, etc. Son los principales activos usualmente concentrados en los órganos de almacenaje de la planta.¹⁹ Investigaciones recientes indican los muchos beneficios terapéuticos de los constituyentes químicos de la granada; estos son el ácido elágico, ellagitaninos ¹³ (incluidos los punicalcalinos, ácido púnico, flavonoides, antocianinas, antocianidinas, flavonol estrogénicos y flavonas.^{18,20}

Tabla N° 2: Tabla de los principales constituyentes químicos de *Punica granatum L.* árbol y fruto.

1. Jugo de granada	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, catequina, quercetina, rutina, y numerosos minerales y aminoácidos.
2. Aceite de semilla de granada	95% de ácido púnico, otros constituyentes incluido el ácido elágico, esteroides y ácidos grasos.
3. Pericarpio de granada (cascara externa, recubrimiento interno)	Punicalginos fenólicos, ácido gálico otros ácidos grasos, catequina, quercetina, rutina, flavonoles, flavonas, flavonoides y antocianinas.
4. Hojas de granada	Taninos (punicalino y punicafolino) y flavonas glucosídicas, incluidas

5. Flores de granada	luteolina y apigenina. Acido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, ácido maslínico, ácido asiático, y demás constituyentes aun no identificados.
6. Tallo y raíz de granada	Numerosas piperidinas alcaloides, Ellagitaninos, incluidos punicalino y punicalagino

Fuente: Garachh, D. Et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*²⁰

2.3.1. Taninos

Los vegetales y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas. En condiciones normales, los taninos vegetales representan del 2 al 7% del peso fresco de la planta.²⁶

2.3.1.1. Clasificación de taninos

Los taninos químicamente se presentan como agrupaciones de grupos glicósidos y polifenólicos; La clasificación de los taninos se basa en los colores que forma con las sales de Fe (III). La clasificación más común de los taninos es la siguiente:²⁷

- **Taninos catecólicos (pirocatecólicos) o flovataninos.** Ejemplo: el ácido quinotánico del quino y el ácido catecutánico del catecú, presentan las siguientes características.
 - Dan catecol por calentamiento
 - Dan flobafenos rojos insolubles, por ebullición con HCl.
 - Dan solución verde con solución de FeCl₃
 - Precipitan con solución de bromo
- **Taninos Pirogalotaninos** presentes en las cortezas de roble y granado. Presentan las siguientes características:

Dan pirogalol por calentamiento

Dan ácido tánico ó ácido elágico por ebullición con HCl

Color azul con FeCl_3 .

No precipitan con solución de bromo

2.3.1.2. Identificación de coloración:

Cloruro férrico (FeCl_3). Cloruro de hierro (III) como catalizador de reacciones de alquilación de benceno. La “prueba del cloruro férrico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) ^{28,29,30}

2.3.2. Polifenoles

Se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos individuales, los cuales se han dividido en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas, como los ácidos fenólicos con esqueletos químicos de seis carbonos (C6), ligados o no con esqueletos de dos hasta cuatro carbonos (C6-C4). Ejemplos más complejos de compuestos no flavonoides son aquellos cuyos esqueletos poseen su porción C6 unida a porciones C2 y a otro anillo C6, como en el caso de los estilbenos, galotaninos o elagitaninos. Estos últimos son conocidos como taninos hidrolizables, los más complejos de los fenoles no flavonoides.²⁶

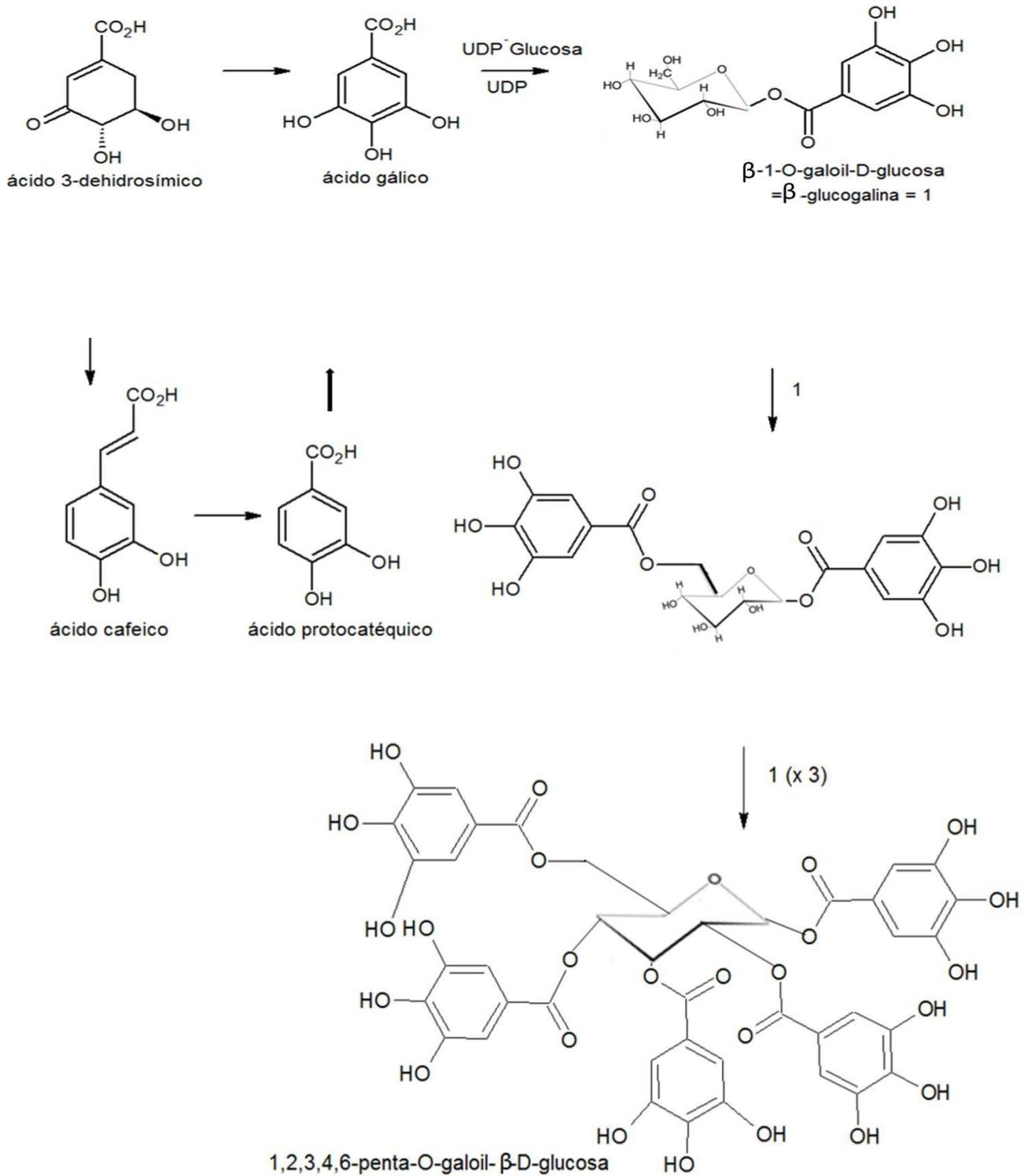
2.3.2.1. Origen Biosintético de los polifenoles

Biogenéticamente, el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es producto del metabolismo del ácido sikimico. Se forma por deshidrogenación y en algunos casos especiales por oxidación del ácido protocatéquico. La glucosilación del ácido gálico requiere la intervención de la uridindifosfoglucosa (UDP- glucosa) y la monogaloilglucosa formada –la β -glucogalina puede dar posteriormente, funcionando tanto como dador o aceptor de glucosa, a un diéster 1,6-di-O-galoil- β -D-glucosa y así sucesivamente hasta llegar a la pentagaloilglucosa. Los taninos hidrolizables son

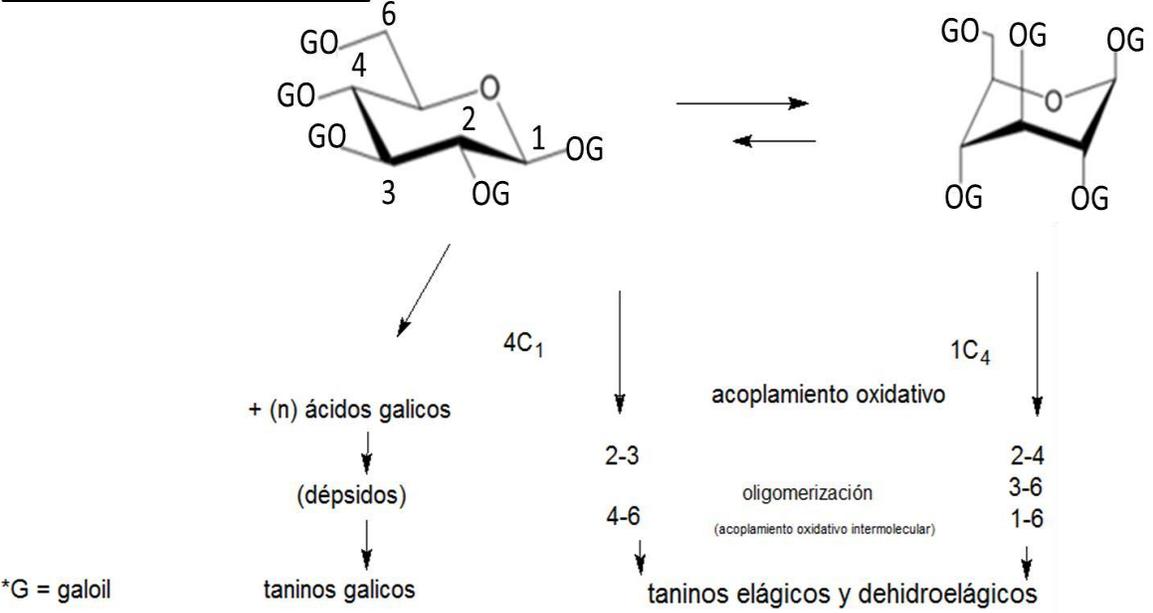
oligo o poliésteres de un azúcar y de un número variable de moléculas de ácido fenol. El azúcar, es generalmente la glucosa. El ácido fenol es el ácido gálico en el caso de taninos gálicos, o el ácido hexahidroxidifenico HHDP y sus derivados de oxidación (dehidrohexahidroxidifenico= DHHDP; ácido chebulico) en el caso de taninos elágicos.²⁹

Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente.²⁶

Figura N° 5: Biogenética de los taninos hidrolizables



Origen probable de los ésteres gálicos de glucosa y filiación de los taninos hidrolizables



Fuente: Bruneton - Farmacognosia Fitoquímica de plantas medicinales.²⁹

2.3.2.2. Distribución

Los polifenoles se originan principalmente en las plantas, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).³⁰ La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular. *Punica granatum L.* se caracterizan por tener una gran cantidad y variedad de polifenoles están los galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados, los cuales tienen funciones de protección contra mamíferos y microorganismos.¹⁴

2.3.2.3 Estructura química de los polifenoles

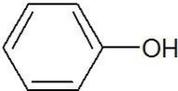
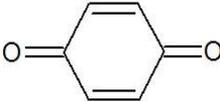
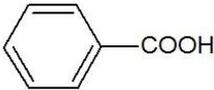
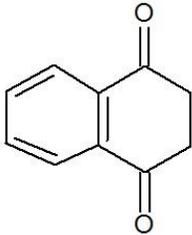
Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituciones hidroxilos, y que ocurre frecuentemente como; glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden ser solubles en agua; pueden ser detectados con el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que produce cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico.^{28,29}

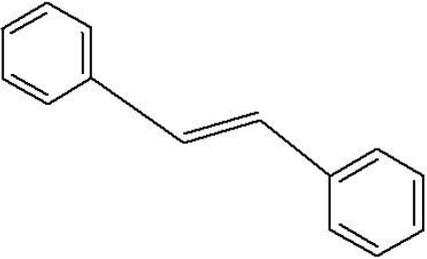
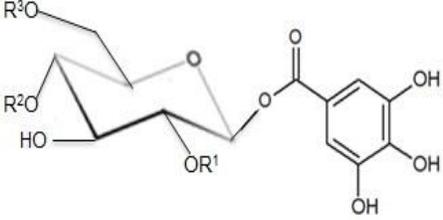
Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta los polímeros complejos de peso molecular alto (taninos). En el caso de galotaninos o elagitaninos los hidrógenos de carbono en los esqueletos básicos pueden ser sustituidos por grupos hidroxilo o carboxilo, dando lugar a compuestos específicos como el ácido gálico (ácido fenólico sustituido por tres grupos oxidrilo).²⁶

2.3.2.4. Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles se han dividido en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas, como los ácidos fenólicos, benzoquinonas, estilbenos, taninos hidrolizables etc. ^{26,27}

Figura N° 6: Estructuras químicas de compuestos polifenólicos no flavonoides

CLASE	ESQUELETO QUÍMICO	ESTRUCTURA BÁSICA
Fenoles simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácido hidroxicinámico	C ₆ -C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	

Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Taninos hidrolizables (unidades de ácido gálico o elágico unidos a carbohidratos)	Estructuras variadas	

Fuente: Vázquez-Flores Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química ²⁶

2.3.2.5. Propiedades benéficas de los polifenoles

Los polifenoles son conocidos por sus propiedades farmacológicas por ejemplo; como antioxidante, antiinflamatorio, antimutagénico, anticarcinógeno y antimicrobiano.⁶ Los taninos condensados (pro-antocianidinas) y taninos hidrolizables (HT) (ellagitaninos y gallotaninos) son altamente susceptibles a la hidrólisis tanto enzimática como no enzimática. Los productos de hidrólisis incluyen glucosa y ácido elágico o ácido gálico.¹⁸

2.3.3. Ácido elágico

- **Origen**

El ácido elágico se conoce por su nomenclatura IUPAC como 2,3,7,8-tetrahidroxichromeno[5,4,3-cde]chromeno-5,10-diona.¹⁷ El ácido elágico es un compuesto fenólico, derivado dimérico del ácido gálico, que en los frutos que lo contienen se puede encontrar en forma libre, glicosilado o como simple o complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidroxidifénico).^{13,31}

- **Peso molecular**

Su peso molecular es 302.2 g/mol, además es insoluble en agua y ligeramente soluble en solventes orgánicos.¹³

- **Punto de fusión:**

El ácido elágico es una molécula muy estable ^{13,32} (tiene un punto de fusión de 350°) y por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos.³²

- **Hidrólisis:**

Es a través de la hidrólisis ácida que se produce ácido elágico libre y la subsecuente liberación de unidades hexahidroxidifenol (HHDP) y de un grupo éster.^{13,31,33}

- **Distribución:**

La principal fuente de obtención de elagitaninos y ácido elágico es la vegetal, principalmente en las hojas, ramas, raíces, tallos, frutos y cortezas.¹³ Se encuentra en diferentes tejidos de las frutas (piel, pulpa, semillas, achenios en fresas) y a distintas concentraciones.³¹

- **Importancia**

La importancia de este metabolito radica en que su molécula tiene gran similitud con la de compuestos de naturaleza estrogénica presentes en mamíferos. Esto le ha valido ser intensamente estudiado por su posible efecto supresor de tumores cancerosos en glándula mamaria. Se ha encontrado que el ácido eláxico posee propiedades que actúan en contra de agentes que pueden resultar nocivos para la salud ³¹, como lo son los radicales libres ¹³ que son los responsables de procesos como la oxidación que se puede representar como el proceso de envejecimiento de las células del organismo.³¹

- **Aplicación terapéutica**

El ácido eláxico ha demostrado ralentizar o incluso impedir la división de las células malignas. Por otra parte, presenta una potente actividad antioxidante, impidiendo así la propagación del cáncer ⁶ e inhibir la replicación de los virus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana y el del papiloma humano.¹³ Las propiedades antioxidantes del ácido eláxico permiten neutralizar los radicales libres, quelar metales tóxicos y activar enzimas antioxidantes, contribuyendo así al fortalecimiento del sistema de defensa antioxidante del cuerpo. Además, otras propiedades beneficiosas antiinflamatorias, antimicrobianas y antialérgicas etc.^{6,15}

- **Actividad antioxidante**

Los jugos comerciales de granada muestran una actividad antioxidante tres veces mayor que el vino tinto. El principal compuesto antioxidante en el jugo de granada son los taninos hidrolizables, pero antocianidinas y derivados del ácido eláxico contenidos en el jugo, también contribuyen a la capacidad antioxidante total.¹³

- **Estudios en anti-lipoxidación o disminución de LDL**

Anderson y col., demostraron que el ácido eláxico en sinergismo con otros polifenoles reduce los niveles de LDL previniendo riesgos de problemas cardiacos y obstrucción de venas.¹³

- **Estudios en Diabetes**

El consumo de jugo de granada redujo significativamente el estrés oxidativo en pacientes diabéticos, como lo demuestra un 56 % de reducción en los peróxidos de lípidos y un 28 % de TBARS (reactivo con ácido tiobarbitúrico) en comparación con los niveles basales de suero. Los investigadores concluyeron que a pesar de los azúcares naturalmente presente en el jugo de granada, el consumo no afecta a los parámetros diabéticos.⁶

- **Estudios en cáncer de próstata**

Con la ayuda de ensayos in vitro se utilizó el suero de paciente para investigar si el consumo de jugo de granada tuvo algún efecto sobre los promedios de crecimiento o apoptosis de cáncer de próstata (células en cultivo). El suero se recogió e incubado; el crecimiento celular disminuyó en un promedio de 12 %. Este estudio indica que el jugo de granada o sus constituyentes puede tener la posibilidad de una terapia para el cáncer de próstata, particularmente en pacientes de tipo recurrente con niveles de PSA creciente.⁶ Estudios preclínicos demuestran que el jugo de granada y sus componentes inhiben el cáncer de próstata condujo a múltiples ensayos clínicos para determinar si los productos de granada podrían retrasar el crecimiento del cáncer de próstata.³⁴

- **Estudios en radiación ultravioleta y fotoenvejecimiento**

La cáscara y semilla de granada han demostrado poseer compuestos antioxidantes con aplicación potencial para proteger la piel contra los daños de la radiación ultravioleta^{6,35}. En este estudio, describe in vitro la permeabilidad de la piel y la retención de los principales polifenoles de la granada preparados con aceite de semilla de granada o aceite de triglicérido de cadena media. Estos resultados evidencian la aplicación prometedora en nanoemulsiones para mejorar la permeabilidad de los polifenoles de la granada en capas profundas de la piel.³⁵

- **Infecciones bacterianas**

El ácido elágico ha sido reportado como antimicrobiano,^{13,15,36} debido a su efecto sobre bacterias, hongos y parásitos. Se ha encontrado que algunos extractos de la planta *Pteleopsis hylodendron*, principalmente derivados del ácido elágico, presentan actividad contra determinadas bacterias patógenas, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella pyogenes*. De la planta *Punica granatum L.* se obtuvieron extractos los cuales mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* en concentraciones de 70 mg/mL.^{15,32}

2.3.4. Ácido gálico

- **Origen**

El ácido gálico (AG), también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico es un ácido fenólico presente en diversas fuentes naturales como: *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Turnera diffusa* (damiana); uva, granada, nueces, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de manzana, mango; acelgas, espinacas, café, vino tinto y té verde.³⁷

- **Hidrólisis**

Éste ácido se obtiene directamente del alimento o por hidrólisis del ácido tánico mediante una reacción con la enzima tanasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes en los galotaninos.³⁷

- **Aplicación terapéutica**

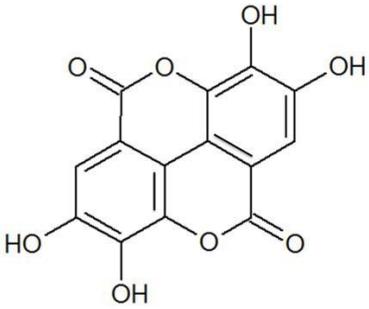
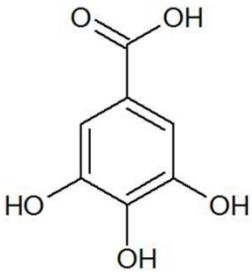
Se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante³⁷ y antibacteriana³⁸, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena. El ácido gálico tiene aplicaciones en diversas áreas, principalmente en la farmacéutica, ya que es un precursor en la manufactura de antibióticos de

amplio espectro como trimetoprima. Además, en el área de alimentos, se ha utilizado como antioxidante de grasas y aceites, así como aditivo en algunas bebidas y alimentos, evitando la oxidación de los mismos.^{16,37,38}

- **Infecciones bacterianas**

Ácido gálico presenta actividad antibacteriana ^{37,38} promoviendo la inhibición enzimática de algunos microorganismos, la interacción sobre las adhesinas (proteínas de la pared celular), y la capacidad que tienen de unirse a polisacáridos, interviniendo así, en el desarrollo microbiano.³⁷

Figura N° 7: Fitoconstituyentes químicos principales de *Punica granatum L.*

Constituyentes químicos	Estructura química
Ácido Elágico	
Ácido gálico	

Fuente: Garachh, D. Et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*²⁰

2.3.5. Estudio de la Solubilidades

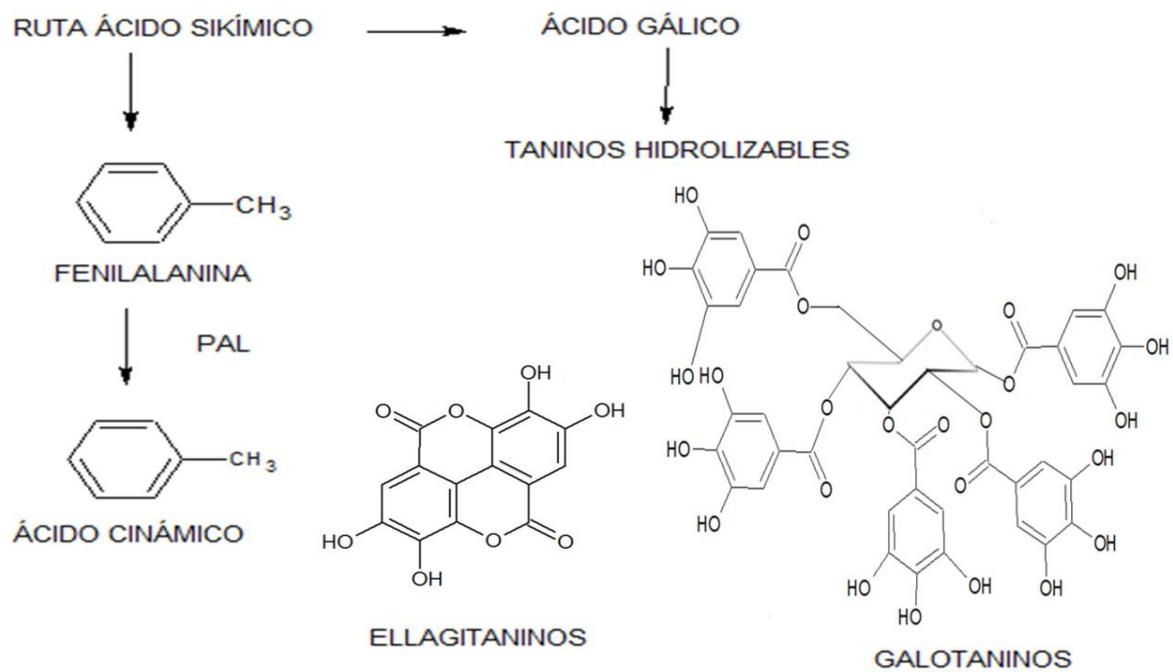
Los compuesto polifenolicos extraíbles son aquellos que se solubilizan en disolvente acuoso-orgánico con pH ácidos para una mayor resolución en la caracterización y una mayor estabilidad de determinados compuestos. Según la publicación de *Arranz* menciona que en general cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes orgánicos o la, mezcla de algunos de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida, acetato de etilo) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos.³⁹

La extracción de taninos hidrolizables se han utilizado como disolventes agua (temperatura ambiente o 90°C), 50% metanol, 50- 70% acetona o etanol/ agua en diferentes proporciones.^{29,39,40} La cantidad de compuestos fenólicos en extractos de acetona tuvieron un porcentaje de 40% seguido de metanol 31% ,etanol 25,3 %, agua 10% y acetato de etilo 0.2%.³⁹

El estudio realizado por *Al-Rawahi* demostró el fraccionamiento de la cáscara de granada en acetato de etilo era muy eficiente en la exhibición de diversos compuestos de polifenoles cuando se sometió al análisis ESI-MS / MS. ESI-MS / MS espectros de la infusión directa de *Punica granatum L.* Presento una amplia gama de compuestos fenólicos.¹⁸

Los compuestos polifenolicos extraíbles poseen pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros).^{29,39} Según su estructura química los compuestos extraíbles pueden dividirse en estructuras simples como los ácidos fenólicos (libres o esterificados) y taninos hidrolizables.²⁶ La estructura y cantidad de los compuestos polifenolicos está estrechamente ligada a su acción biológica ya que influirá en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.³⁹

Figura N° 8: Taninos hidrolizables



Fuente: Arranz S. Compuestos polifenólicos ³⁹

2.4. Estudio microbiológico

2.4.1. Antibiograma

El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.^{41,42}

2.4.2. Medio de cultivo

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó el uso de agar Muller Hinton^{43,44,45} en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido.^{41,44}

- **Composición Müller Hinton**

- Infusión de carne

- Peptona ácida de caseína

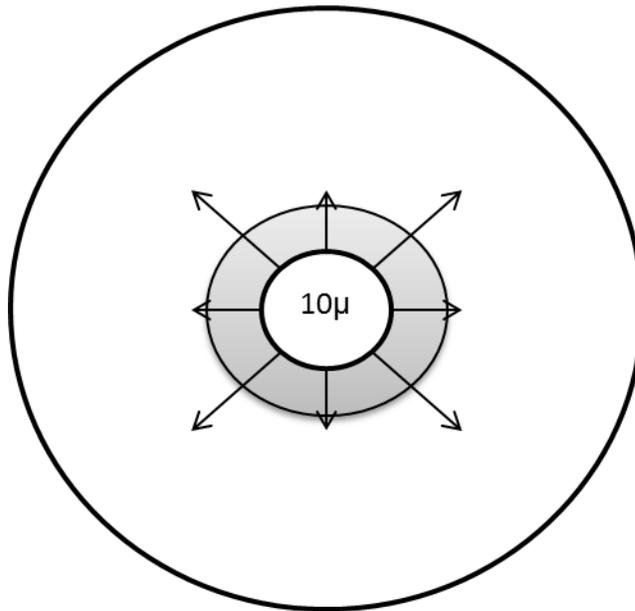
- Almidón

- Agar

2.4.3. Método de Difusión con disco

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.^{42,43,45}

Figura N° 9: Principio de la difusión del antibiótico en el agar



Fuente: Koneman - Prueba de sensibilidad de antimicrobianos ⁴⁴

2.5. Espectrofotometría UV-Visible

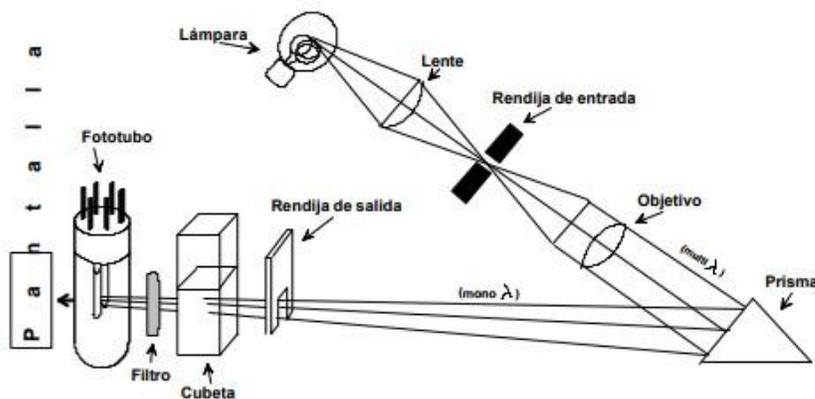
La espectroscopía UV-Visible (espectros electrónicos), se debe a la transición de los electrones más externos de los átomos de las moléculas, desde niveles fundamentales a niveles más altos de energía.

LEY DE LAMBERT-BEER

$$A = \epsilon l c$$

Donde ϵ es la absorptividad molar que es un valor constante para cada sustancia a cada longitud de onda. Si se opera, a una longitud de onda dada y con una cubeta de un determinado espesor, l , la absorbancia A , medible directamente, es proporcional a la concentración molar de la muestra, c , lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo. ^{48,49}

Figura N° 10: Características de un espectrofotómetro uv-visible



Fuente: <http://campus.usal.es/quimfis/apoyo/Carmen/Practicas/Espectrofotometria> ⁴⁹

2.6. Estudio cuantitativo del ácido elágico

Método de Wilson-Hagerman

Es un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de ácido elágico, basado en la formación del p- Nitrosfenol del producto de nitrosilación del ácido elágico. El límite de detección del método es 1 µg de ácido elágico. El método es selectivo, con reacción positiva para ácido elágico, pero no para una variedad de otros compuestos fenólicos comunes en plantas, incluidos galotaninos, elagitaninos, proantocianidinas, fenilpropanoides, flavonoides y ácido gálico. El ácido elágico forma un producto nitrosilado rojo en piridina. El producto de reacción primario eventualmente decae a un compuesto amarillo, el cual se convierte en anaranjado en solución básica. El producto de nitrosilación primario del ácido elágico es transitorio, por eso el control de la temperatura y tiempo son críticos.²⁷

2.6.1 Mecanismo de la reacción de formación de color ³³

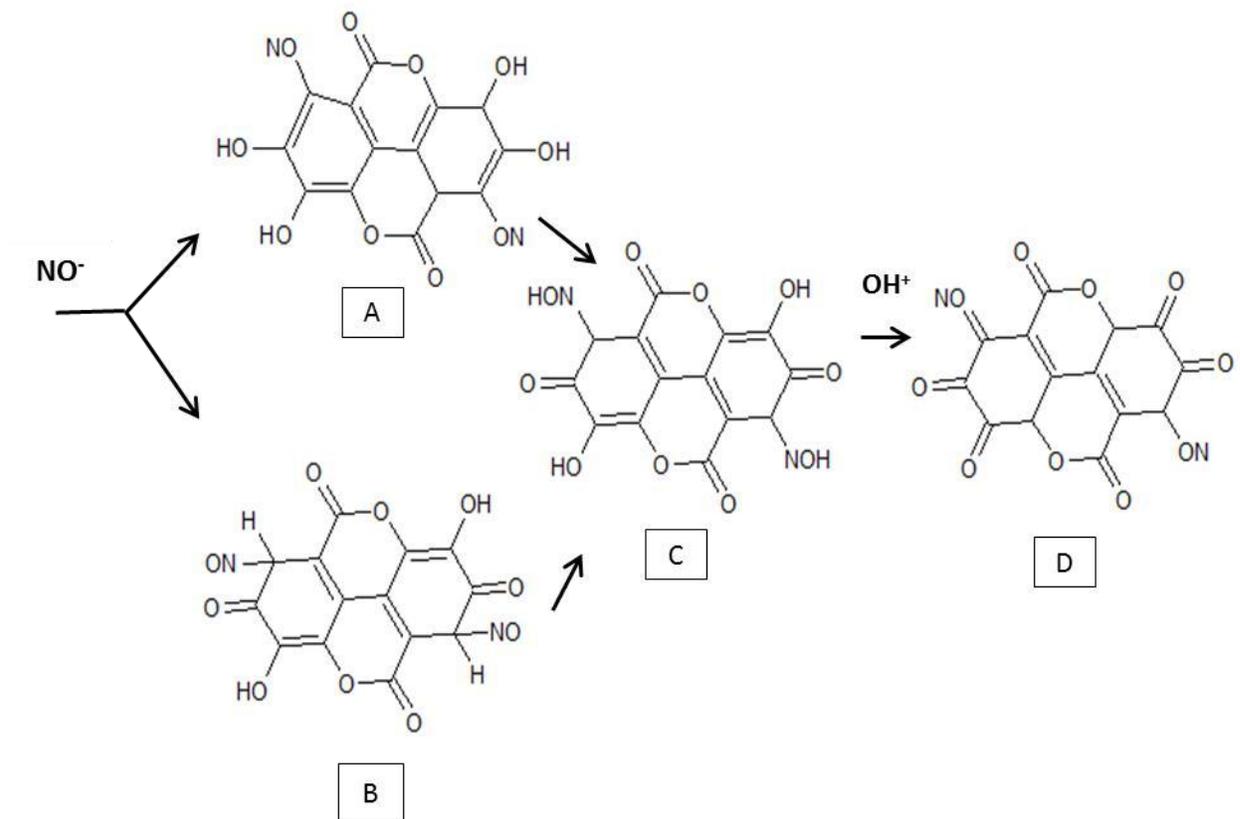
La reacción es una sustitución aromática electrofílica en la cual el NaNO_2 y el ácido son agregados a la solución para formar el electrófilo in situ. El pK_b de la piridina es 8,6 lo que implica que es una base lo suficientemente débil para no interferir con la formación del electrófilo. En medio ácido, el NaNO_2 forma los electrófilos HONO , N_2O_3 , H_2ONO^+ , NOCl y NO^+ . Probablemente la formación de electrófilos ocurre durante el decaimiento de la reacción, antes de la formación del producto primario. Existen dos carbonos equivalentes en el ácido elágico disponibles para la sustitución ambos son químicamente idénticos y probablemente ambos son nitrosilados.

La nitrosilación del ácido elágico implica uno de estos mecanismos:

- 1.- Simple sustitución del H^+ por NO^+ sobre un carbono de identidad electrónica insustituída para dar un compuesto nitrosilado (A)
- 2.- Ataque electrofílico y pérdida de H^+ del grupo ortofenol para dar la nitrosildienona neutra (B)

El producto de decaimiento es probablemente la quinona oxima (C). Cuando se agrega NaOH al producto de decaimiento, se forma un compuesto rojo-naranja vivo (producto de decaimiento ionizado), que presumiblemente es la sal ionizada de la quinona oxima (D).

Figura N° 11: Reacción del ácido elágico con el electrófilo NO^-



Fuente: Williner M. Ácido elágico en frutillas enteras y mínimamente procesadas³³

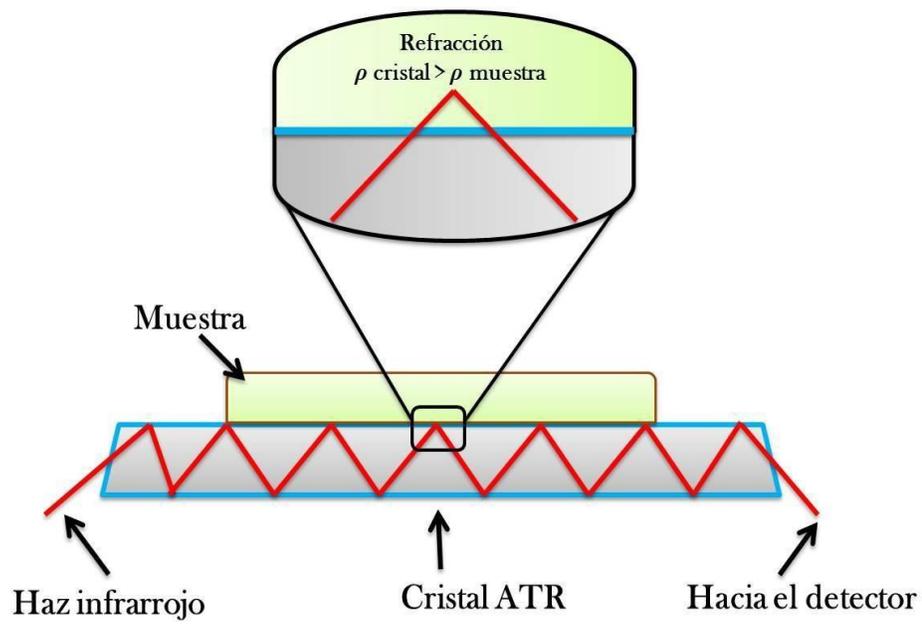
2.7. Espectroscopia de Infrarrojo.

Permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. La región infrarroja se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas.⁵⁰

2.7.1. Reflectancia total atenuada (ATR)

Es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal. Registrándose un cambio de densidad que produce una refracción en el haz infrarrojo. La profundidad de penetración de la onda evanescente dentro de la muestra es función del material del cristal y del ángulo de incidencia del haz. A menor índice de refracción y menor ángulo de incidencia, mayor penetración se consigue. La profundidad de penetración también se incrementa con la longitud de onda.⁵¹

Figura N° 12: Reflectancia total atenuada.



Fuente: Muñoz G. Esquema de la técnica de Reflectancia total atenuada.⁵¹

III- PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

3.1.1. Materiales de vidrio y otros

Frascos de vidrio con tapa de 3,0 L.
Fuentes de vidrio
Embudos de vidrio marca Pyrex
Soportes universal
Tubos de ensayos 16 X 150 mm marca Pyrex
Tubos de ensayo con tapa 20 X 200 mm marca Pyrex
Pipetas de vidrio 2,0 mL. Pyrex
Pipetas de vidrio 5,0 mL. Pyrex
Probeta de vidrio 500 mL. marca Pyrex
Probeta de vidrio 100 mL. marca Pyrex
Pinzas de acero
Asa de Kohle con mango
Cubetas de plástico para espectroscopia UV-Vis
Beakers de 50 mL, 100 mL, 200 mL. marca Pyrex
Placas Petri de plástico
Papel filtro Watman N° 10
Caja de guantes de látex
Bolsa de algodón
Jeringas descartables 1,0 mL.
Jeringas descartables 5,0 mL.

3.1.2. Equipos e instrumentos

Espectrofotómetro Genesys SUV-VIS 10 Modelo: Titerno Scientific.
Espectroscopia IR Marca Spectrum Two 89321. Resolución 4, rango de análisis 4000 - 450 nm.

Balanza analítica RADWAG modelo: AS 220.R2

Baño María Marca Memmert

Autoclave marca Memmert

Estufa Memmert

Microondas Samsung

Horno de esterilización calor seco circulación natural de aire Modelo SNe40-

Marca Memmert

Refrigeradora LG

Centrifuga Marca Hettich

3.1.3. Reactivos

Acetona

Acetato de etilo

Piridina

Ácido Sulfúrico 2N

Nitrito de Sodio 1%

Ácido Clorhídrico concentrado 95%

Agua destilada

Agua estéril

Etanol 70°

Metanol

n-Butanol

Cloroformo

Benceno

Éter de petróleo

n-Hexano

Tricloruro Férrico 5%

Zinc

Gelatina

Rv. Benedict
Rv. Molish
Rv. Bertrand
Rv. Drangendorff
Rv. Mayer
Rv. Popoff
Rv. Fehling AyB.

3.1.4. Material para medios de cultivo

Agar Müller Hinton MERCK
Agar TSA MERCK
Agar Manitol Salado MERCK
Agar Mac Conkey MERCK
Caldo TSB MERCK

3.1.5. Material para análisis microbiológico

Cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
Cepa certificada *Escherichia coli* ATCC 25922
Cepa certificada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
Discos estándar Ciprofloxacino 5ug
Discos estándar Penicilina 10 U
Discos estándar Dicloxacilina 1 ug
Extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. "granada".
Extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada".

3.2 Metodología y procedimiento

3.2.1. Ubicación de la especie vegetal *Punica granatum L.* “granada”.

La especie vegetal fue recolectada en el km 62,5 de la localidad de Chilca (Fundo San Pedro) a 5 minutos de la ciudad en la Provincia de Cañete-Lima a 500 m.s.n.m de altitud; la recolección se realizó en la estación de verano durante el mes de marzo a una temperatura de 28°C.

Hemos contado con la colaboración de una lugareña de la zona quien nos guio y llevo hasta el lugar de la especie natural, provistas de cuchillos, tijeras y bolsas necesarias para la recolección y conservación para facilitar su traslado al Centro de Investigación de Productos Naturales de la Universidad Norbert Wiener. **Ver Figuras N° 22, 23, 24, 25.**

Antes de realizar el estudio fitoquímico, la especie vegetal (hoja y fruto) se llevó al Museo de Historia Natural de la U.N.M.S.M para el estudio taxonómico.

3.2.2. Obtención de la muestra

3.2.2.1 Preparación de la muestra

La parte de la especie vegetal utilizada para la obtención de los extractos fue el zumo del fruto de *Punica granatum L.* ^{52,53,54}

1. El fruto recolectado 6,5 kg fue sometido a lavado abundante de agua corriente.
2. Se procedió a cortar y retirar la cáscara del fruto, obteniéndose así los arilos con semillas.
3. Se separó manualmente los arilos en dos partes. La primera parte se sometió a presión reducida manualmente con una gaza 30 X 25 cm obteniéndose 700 mL. de zumo. Y la otra parte se quedaron los arilos completos 1,5 Kg.

4. La primera muestra (zumo) se colocó en un matraz de 250 mL. Se añadió un volumen similar de acetato de etilo. Se realizaron tres extracciones sucesivas, recuperándose en cada parte la fase orgánica. Y la otra muestra (arilos completos) se le añadió acetona/agua (60:40).
5. Ambos extractos se sometieron a maceración por 4 días con agitación constante y protegidos de la luz.
6. Posteriormente se filtraron con papel Watman N° 10.
7. Ambas muestras se sometieron a secado en la estufa 40 °C.
8. Obteniéndose para el extracto en acetona 24,6 g y para el extracto en acetato de etilo 32 g. **Ver Figuras N° 26 - 35.**

Rendimiento (%) de la muestra:

Extracto en acetona	:3,84 %
Extracto en acetato de etilo	:2,13%



Flujograma N°1: Preparación de las muestras en acetato de etilo y acetona en el zumo de *Punica granatum L.* “granada”

3.2.3. Análisis fitoquímico cualitativo.

3.2.3.1. Prueba de solubilidad

Se colocó 20 mg del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L. "granada"* en 11 tubos de ensayo y 20 mg del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L. "granada"* respectivamente. Se le agregó 1mL de los siguientes solventes: agua destilada, etanol, metanol, n-Butanol, cloroformo, n- Hexano , acetato de etilo , acetona , benceno, éter etílico, éter de petróleo. ^{28,55} **Figura N°36-37 y Ver Tabla N°3.**

3.2.3.2. Análisis fitoquímico

Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación para determinar los diferentes constituyentes químicos en los extractos basados en la extracción de estos con solventes o reactivos apropiados. Se realizaron los siguientes ensayos: Alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, azúcares. ^{19,28,55,56} **Ver Figura N° 38 - 45. Tabla N° 4.**

3.2.3.3 Análisis volumétrico de taninos totales

Los vegetales y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas. En condiciones normales, los taninos vegetales representan del 2 al 7% del peso fresco de la planta. El método preferente para la cuantificación de taninos es con el ensayo de yodato de potasio (KIO₃).²⁶ **Ver Tabla N° 5.**

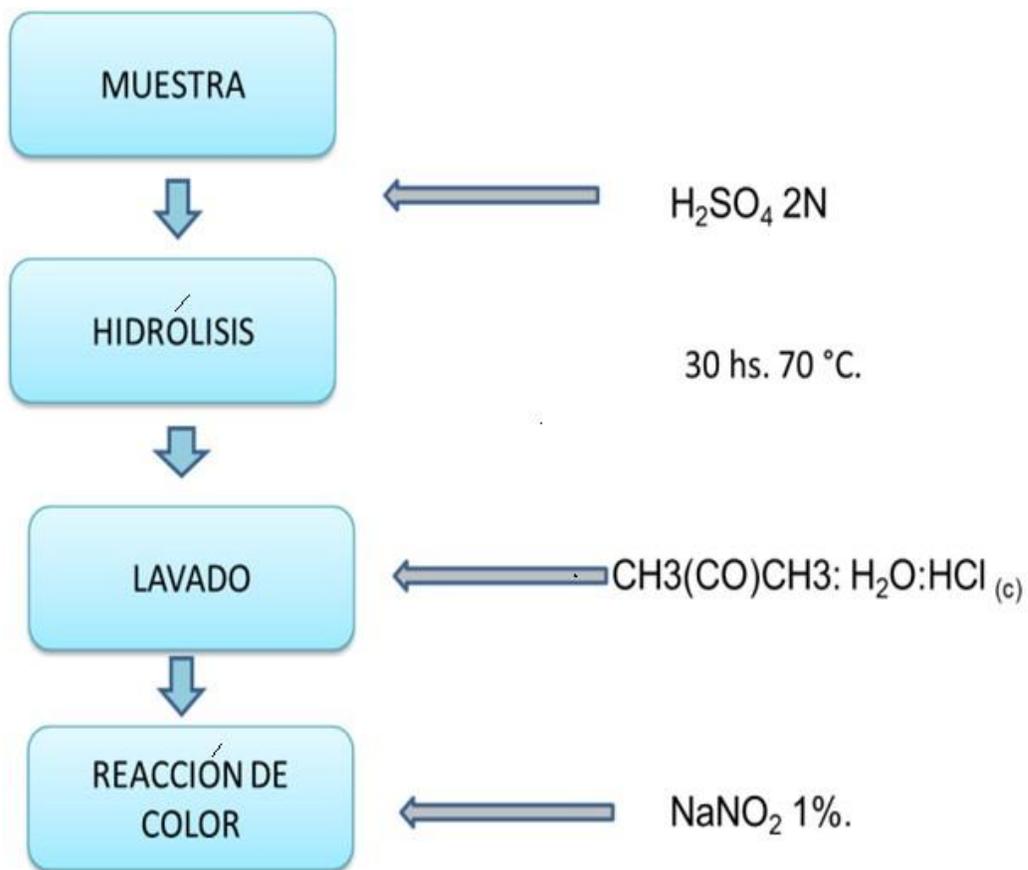
3.2.3.4. Análisis cuantitativo de azúcares reductores directos

Determina la totalidad de los azúcares reductores presentes en una muestra. Estos métodos se basan en la capacidad reductora de los distintos azúcares sobre disoluciones salinas de metales pesados (sobre todo cobre). El método preferente para cuantificar los azúcares reductores es por el método de Fehling A , B y C.^{57,58} **Ver Tabla N° 6.**

3.2.4. Análisis cuantitativo del ácido elágico.

Ambos extractos fueron sometidos al análisis cuantitativo del ácido elágico aplicando la técnica de Wilson y Hagerman. Mediante la hidrólisis con H_2SO_4 2N se liberará los elagitaninos para obtener el ácido elágico. ^{32,33}

1. Se pesó entre 0,10 -0,30 mg de muestra se colocó 1 mL de H_2SO_4 2N se llevó a 70°C por 30 horas logrando la hidrólisis.
2. La muestra se colocó a temperatura ambiente por 5 minutos luego se llevó a baño de hielo por 10 minutos.
3. Se centrifugó y el sobrenadante se eliminó. El residuo se sometió a una solución de lavado $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3:\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}^{(c)}$ (14:6:0.2) (v/v/v) se filtró cada una de las muestra con papel Watman N° 10.
4. La muestra filtrada se disolvió con piridina 5 mL.
5. Se centrifugó nuevamente para separar bien el residuo sólido del sobrenadante, donde se encuentra el ácido elágico disuelto.
6. Se colocó 2,1 mL de dicho sobrenadante en un tubo. Se agregó 0,1 ml de $\text{HCl}^{(c)}$.
7. Se llevó a baño maría 30°C por 5 min.
8. Se agregó 0,1 ml de NaNO_2 1%.Se agitó.
9. Se llevó al espectrofotómetro UV /VIS a 538 nm lectura inicial.
10. Se incubó durante 36 minutos a 30°C y se midió nuevamente la absorbancia en el espectrofotómetro a 538 nm lectura final. Todas las muestras se realizaron por triplicado. **Ver Figuras N° 46 - 49. Tablas N° 7 y 8.**



Flujograma N°2: Flujo del análisis cuantitativo del ácido elálgico en las muestras de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* "granada".

$$[\text{ácido elálgico}] = K, (A_{t=36 \text{ min}} - A_{t=0 \text{ min}})$$

Dónde:

K : Constante de proporcionalidad

$A_{t=0 \text{ min}}$: Absorbancia de la muestra a tiempo 0.

$A_{t=36 \text{ min}}$: Absorbancia de la muestra a los 36 minutos.

3.2.5. Análisis cualitativo del ácido elágico en espectroscopia IR

Ambos extractos fueron sometidos al análisis cualitativo del ácido elágico en espectroscopia IR según la técnica ATR (Refractancia total atenuada).⁵¹

1. Se colocaron las muestras sobre un cristal ATR transmisor de la espectroscopia IR Spectrum Two 89321.
2. Para un mejor contacto entre la muestra y el cristal ATR se presionó levemente con el mango de juste del equipo.
3. Se presionó background del monitor dos veces, es un barrido en blanco que nos garantiza libre de contaminación.
4. Se presionó Scan del monitor para visualizar los picos y poder identificar los grupos funcionales de las muestras, que va conectado con el equipo de análisis IR a un rango de 4000-450 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado. **Ver Figura N° 13, 14, 50, 51. Ver Tablas N° 9 y 10. Ver Anexo N° 3.**

3.2.6. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se realizó primero; el análisis de control de muestra y análisis de control de esterilidad de discos de inhibición.

3.2.6.1. Análisis de control de muestra

Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos USP 38 Cap.<62> Método de extensión en superficie.⁵⁹ Estas pruebas permitirán determinar la ausencia, o presencia limitada de microorganismos específicos que pueden ser detectados en condiciones aeróbicas con el fin de establecer la calidad microbiológica de la muestra. **Ver Figura N° 15, 16, 52. Tablas N° 11 y 12.**

3.2.6.2. Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición

Pruebas de esterilidad. USP 38 Cap.<71> Método de inoculación directa del medio de cultivo.⁶⁰ La prueba se aplica a sustancias, preparaciones o artículos cuya esterilidad es requerida por la Farmacopea. Sin embargo, un resultado satisfactorio únicamente indica que no se ha encontrado microorganismos contaminantes en la muestra examinada bajo las condiciones de la prueba. **Ver Tabla 13 – 15. Ver Figura N° 17 y 18.**

3.2.6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Método de Kirby Bauer ^{43,45}

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. Se realizó los siguientes pasos:

1. Seleccionar las colonias.
2. Preparar una suspensión del inóculo.
3. Estandarizar la suspensión del inóculo.
4. Inocular las placas.

5. Colocar discos de antimicrobiano estándar y muestra problema.
6. Incubar las placas.
7. Medir las zonas de inhibición.
8. Interpretar los resultados.

Selección de las colonias:

Uno de los pasos más importantes en el proceso de la prueba es la preparación del inóculo. Esto involucra la selección de colonias apropiadas para la prueba, su suspensión en caldo y la estandarización de la suspensión. Las cepas de trabajo fueron: **Ver Figura N° 53 - 55.**

Cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cepa certificada *Escherichia coli* ATCC 25922

Cepa certificada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Primero, se seleccionaron entre 3–5 colonias de características homogéneas utilizando una Asa de Kohle, se recogió de la placa sólo colonias bien aisladas para evitar contaminación cruzada. Para asegurarnos de la selección de colonias de prueba se realizó activación de los cultivos con Caldo TSB, prueba de identificación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con Agar Manitol Salado, para *Escherichia coli* ATCC 25922 con Agar Mc Conkey y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con agar TSA. **Ver Anexos N° 2.**

Preparación y estandarización de suspensión del inóculo:

Se utilizó para la preparación de inóculo. El método de fase logarítmica de crecimiento.⁴³ Una vez que se han inoculado las colonias en el Caldo de enriquecimiento TSB, se incubó a ± 37 °C para lograr un crecimiento en fase logarítmica. El crecimiento de fase logarítmica ocurre después de 4–6 horas de

incubación. Después, se ajustó la turbidez para que alcance al tubo N°0,5 de la escala McFarland (lo que corresponde aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). **Ver Figura N° 56.**

Inoculación de la Placa:

Se realizó el método de vertido en placa ⁵⁹, después del ajuste de las cepas de prueba, se tomó 1mL.se mezclaron con agar fundido de Müller Hinton. Este método se utilizó de manera cualitativa para determinar presencia del microorganismo de forma homogénea. **Ver Figura N° 57.**

Aplicación de los discos de antimicrobianos estándar y muestra:

Se colocó los discos estándares y discos preparados de la muestra dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa Muller Hinton. Se presionó cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar.

Los discos de sensibilidad estándar son:

Discos estándar Ciprofloxacino 5ug

Discos estándar Penicilina 10 U

Discos estándar Dicloxacilina 1 ug

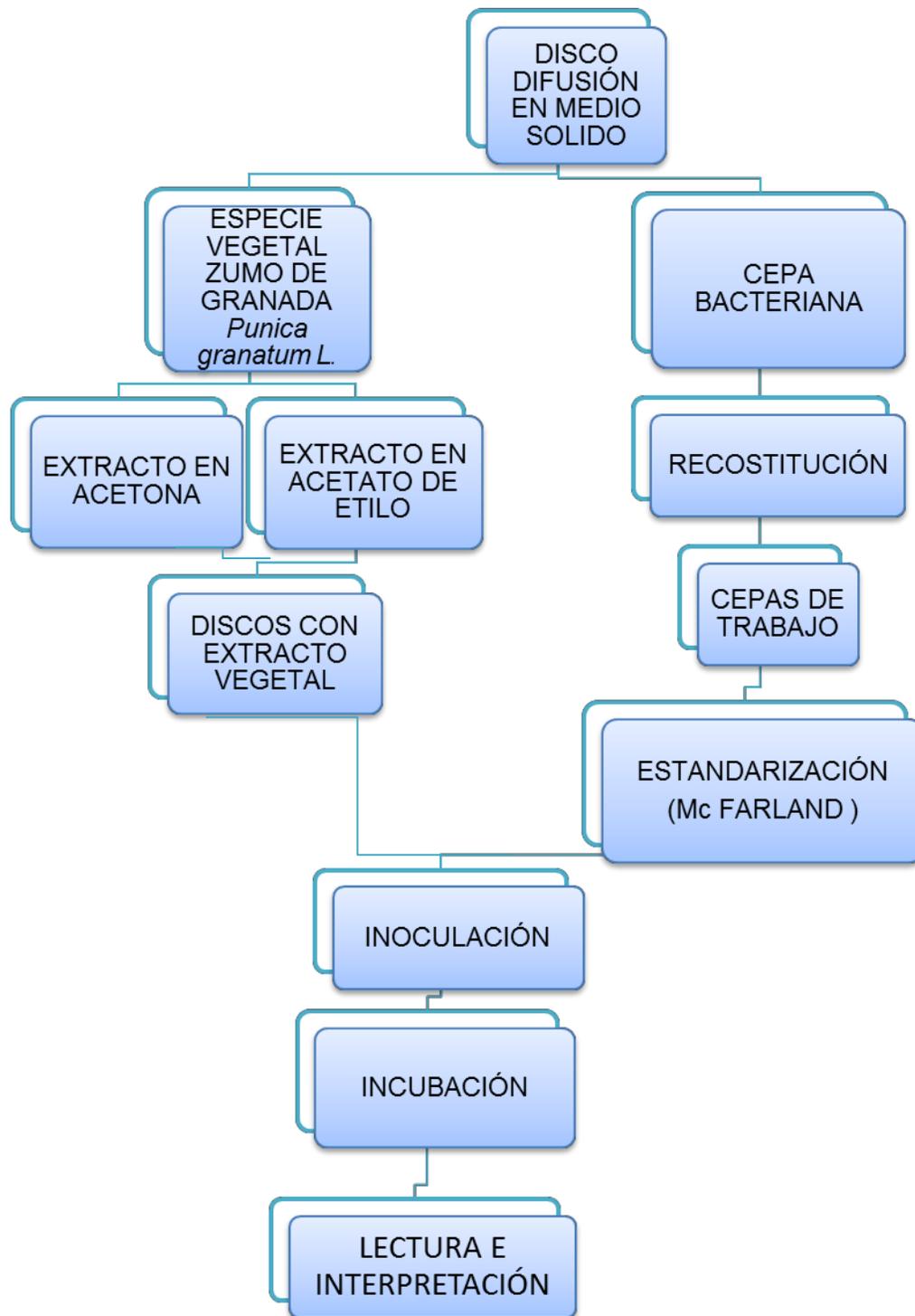
Se preparó 4 concentraciones de extracto en acetato de etilo y acetona en el zumo de *Punica granatum L.* "granada" 500 mg/mL. 400 mg/mL. 300 mg/ mL. 200 mg/mL. en discos de sensibilidad. Se procedió a agregar a cada disco 10 µL del extracto vegetal .Cuya concentración por disco fue de 1,3 µg. Los discos se prepararon con papel watman N° 10 con un diámetro de 6 mm y, posteriormente se procedió a esterilizar. Luego de la aplicación de los discos se procedió a incubar a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ de 18-24 horas. **Ver Figuras N° 58 - 64.**

Medición de las Zonas de Inhibición:

Para medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa se usó luz reflejada. Se midió redondeando al milímetro más cercano con una regla. La luz reflejada es usada para Enterobacteriaceae, como *E. coli*, otros bacilos gram negativos, estafilococos y enterococos.⁴³

Interpretación de resultados:

Se midió el punto en el cual se puede ver una demarcación obvia entre crecimiento y ausencia de crecimiento. Ver **Tabla N° 16 - 19**. Ver **Figuras N° 19- 21**.



Flujograma N°3: Flujograma del método disco difusión en medio sólido.

IV RESULTADOS

4.1. Clasificación Taxonómica de la especie vegetal

La especie vegetal fue evaluada según el sistema de clasificación Cronquist (1988).

Ver anexo N° 1.

4.2. Prueba de solubilidad

Tabla N° 3: Prueba de solubilidad de los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada"

SOLVENTES	EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO	EXTRACTO EN ACETONA
H ₂ O (d)	Soluble	Soluble
EtOH	Soluble	Soluble
MeOH	Soluble	Soluble
BuOH	No soluble	No soluble
EtOAc	No soluble	No soluble
CHCl ₃	No soluble	No soluble
Bz	No soluble	No soluble
Me ₂ CO	No soluble	No soluble
EP	No soluble	No soluble
HEx	No soluble	No soluble
Et ₂ O	No soluble	No soluble

(+) Soluble (-) no soluble

4.3. Análisis fitoquímico

Tabla N°4: Pruebas fitoquímicas de los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

PRUEBAS FITOQUIMICAS	EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO	EXTRACTO EN ACETONA
Test para alcaloides		
Mayer	-	-
Dragendorff	-	-
Wagner	-	-
Sonneschain	-	-
Popoff	-	-
Test para flavonoides y compuestos fenólicos		
FeCl ₃	+	+
AlCl ₃	+	+
Shinoda	+	+
Test para taninos		
Sal ferrica	+	+
Bicromato de potasio	+	+
Acetato de plomo	+	+
Hipoclorito de sodio	-	-
Agua de cal	+	+
Cianuro de potasio	+	+
Reactivo de Braemer	-	-
Ferrocianuro de k + amoniaco	+	+
Gelatina	+	+
Test para azúcares		
Fehning	+	+
Benedict	+	+
Pelouze	-	-

(+) presencia (-) ausencia

4.4. Análisis volumétrico de taninos totales

Tabla N° 5. Análisis volumétrico de taninos totales de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

DATOS	ESTÁNDAR	BLANCO	GRANADA
Gasto patrón (ácido tánico)	10,2mL		
Gasto del blanco		0,15 mL	
Gasto del extracto de granada			1,8 mL
% de taninos en 100 mL.			0,16 %

4.5. Análisis de azúcares reductores por el método de Fehling Ay B

Tabla N° 6. Análisis de azúcares reductores de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

DATOS	ESTÁNDAR	ZUMO DE GRANADA
Gasto titulación Fehling	24,5 mL	4,9 mL
Valor titulación Fehling	0,1225 g	2,5 g
Expresado en % concentración de azúcar reductor directo	1,225%	25%

4.6. Análisis cuantitativo del ácido elágico de los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

(Técnica de Wilson y Hagerman)

Cálculo con la fórmula

Ácido elágico= K, ($A_t=36 \text{ min} - A_t=0 \text{ min}$)

K= constante proporcionalidad

A_t = tiempo de absorbancia

Tabla N° 7: Concentración de ácido elágico del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

Extracto en acetona	
0 min	36 min
$A_t=1,137$	$A_t=1,222$
$A_t=0,720$	$A_t=0,794$
$A_t=0,923$	$A_t=1,102$
Prom : 0,927	Prom : 1,039
Concentración de ácido elágico 0,126mg / g	

Tabla N° 8: Concentración de ácido elágico del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

Extracto en acetato de etilo	
0 min	36 min
$A_t= 0,397$	$A_t= 0,526$
$A_t= 0,818$	$A_t= 1,021$
$A_t= 0,986$	$A_t= 1,219$
Prom : 0,734	Prom : 0,922
Concentración de ácido elágico 0,238mg / g	

4.7. Análisis cualitativo del ácido elágico por espectroscopia IR

Tabla N° 9: Región de lectura en espectroscopia IR 450 – 4000 nm del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

N°	Rangos	Grupos funcionales	Bibliografía según Rojo ⁶¹	Bibliografía según Subrahmanyam ⁶²	Bibliografía según Melniciuc ⁶³
1	640	Carbonílico -CO-	640-730
2	760	C ₆ H ₆ aromáticos	650-900	751
3	1045.02	esteres	1050-1300 C=O y C-O	1052-1190	1037-1326 C-O
4	1310				
5	1445	C=C	1425-1445 C=C
6	1460	Benceno	1490-1610	1500-1669	1415-1617
7	1510				
8	1613.19				
9	1700	Carbonilo	1715-1750	1725	1735
10	2840	Enlace simple C-C	2845-2915
11	2920				
12	2960	Enlace doble	2975-3080
13	3266.45	Hidroxilo	3200-3650	2800-3700	3400-3550
14	3670				

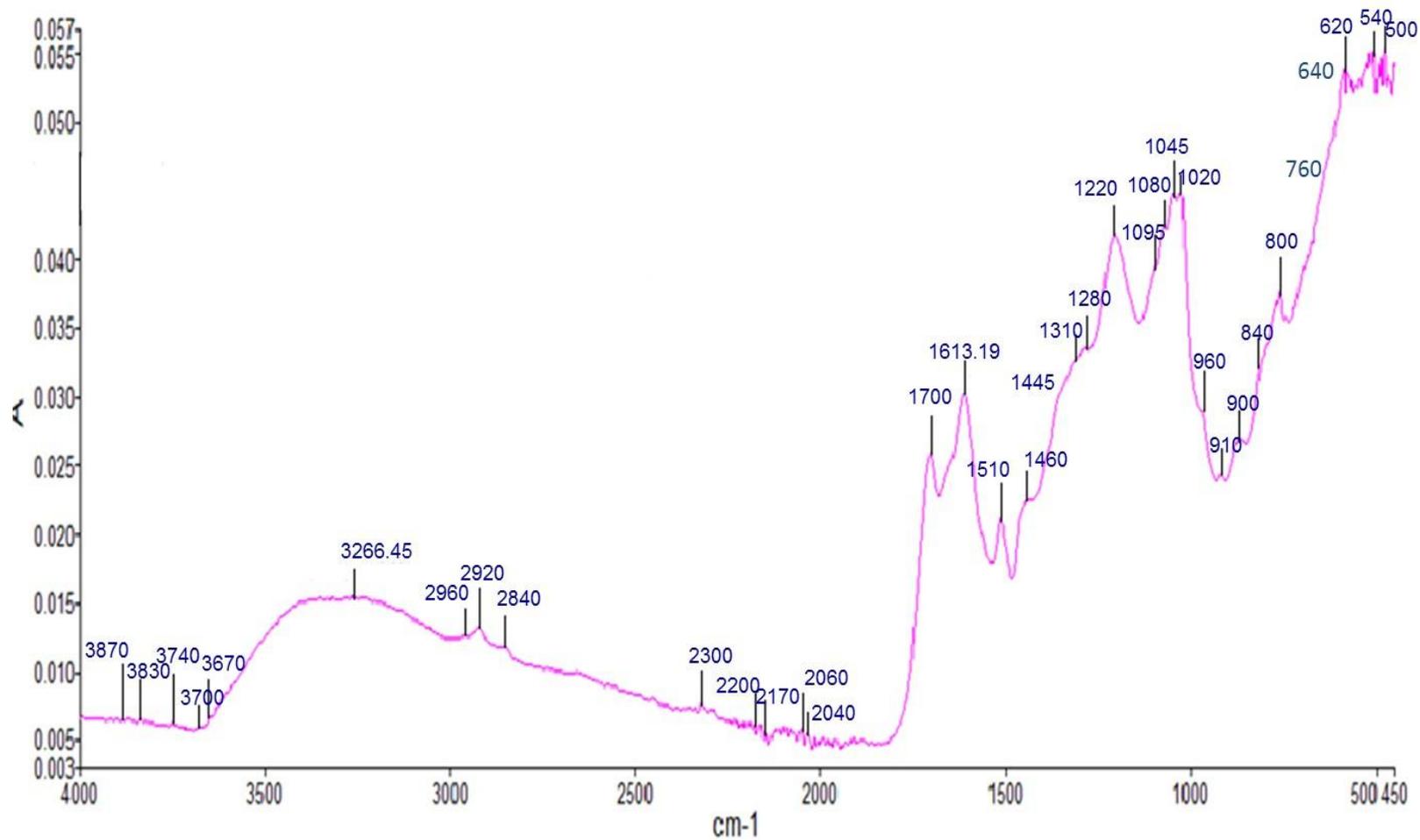


Figura N° 13: Gráfica de los picos de absorción infrarroja del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

Tabla N° 10: Región de lectura en espectroscopia IR 450 – 4000 nm del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

N°	Rango	Grupos funcionales	Bibliografía según Rojas ⁶¹	Bibliografía según Subrahmanyam ⁶²	Bibliografía según Melniciuc ⁶³
1	640	carbonilo -CO-	640-730
2	670				
3	730				
4	760	aromáticos C ₆ H ₆	650-900	751
5	1042	esteres	1050-1300 C=O y C-O	1052-1190	1037-1326 C-O
6	1046.92				
7	1320				
8	1380	-OH	1383
9	1440	C=C	1425-1445 C=C
10	1470	Benceno	1490-1610	1500-1669	1415-1617
11	1540				
12	1617.53				
13	1720	Carbonilo	1715-1750	1725	1735
14	1735				
15	2870	Enlace simple C-C	2845-2915
16	2940				
17	2980	Enlace doble	2975-3080
18	3277	Hidroxilo	3200-3650	2800-3700	3400-3550
19	3640				
20	3700				

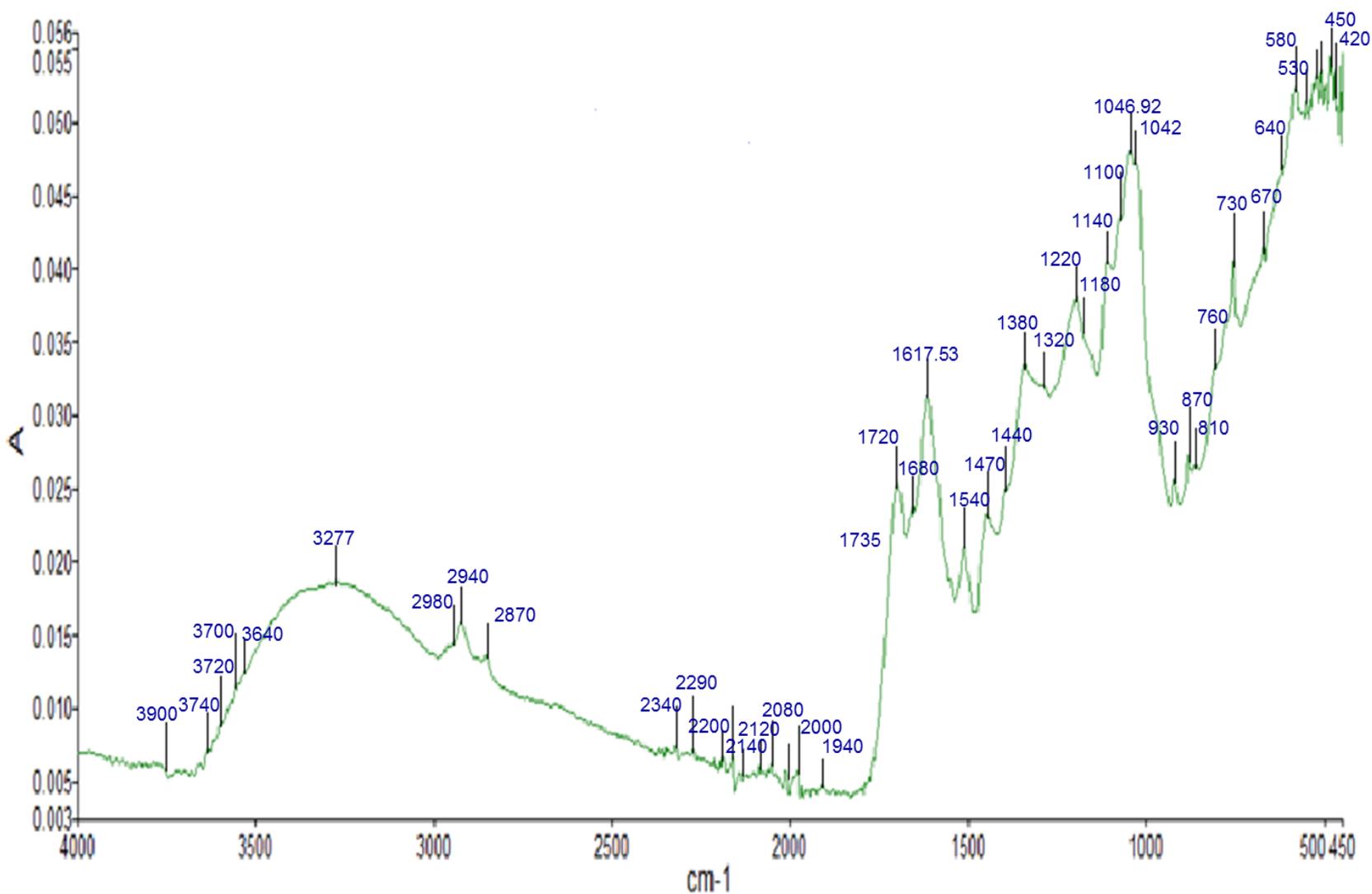


Figura N° 14: Gráfica de los picos de absorción infrarroja del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

4.8. Análisis microbiológico

4.8.1. Análisis de control de muestra

Tabla N° 11: Análisis de control de muestra del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

Extracto en acetona en el zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”	Resultado
Medio de cultivo: Manitol Salado 18 - 72 horas T° C = 32.3-32.5	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Mac Conkey 18 - 72 horas T° C = 32.3-32.5	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Sabouraud Después de 5 días a temperatura ambiente 20°C	Cumple (según la USP N° 40)

Tabla N° 12: Análisis de control de muestra del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. “granada”

Extracto en acetato de etilo en el zumo de <i>Punica granatum</i> L. “granada”	Resultado
Medio de cultivo : Manitol Salado 18 - 72 horas T° C= 32.3-32.5	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Mac Conkey 18 - 72 horas T° C= 32.3-32.5	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Sabouraud Después de 5 días a temperatura ambiente 20°C	Cumple (según la USP N° 40)

Figura N° 15: Análisis de control de muestra examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L.* “ granada”

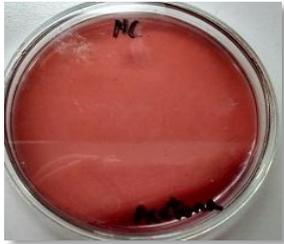
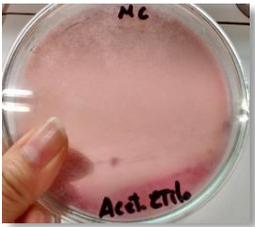
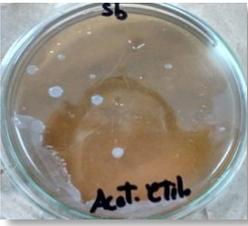
Medio de cultivo : Manitol Salado 18- 48 hras	
Día 1- T° 32.5	Día 2-T°32.3
	
Medio de cultivo : Mac Conkey 18- 48 hras	
Día 1 -T° 32.5	Día 2-T°32.3
	
Medio de cultivo : Sabouraud	
Después de 5 días a temperatura ambiente 20°C	
	

Figura N° 16: Análisis de control de muestra examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* "granada"

Medio de cultivo : Manitol Salado 18- 48 hras	
Día 1- T° 32.5	Día 2-T°32.3
	
Medio de cultivo : Mac Conkey 18- 48 hras	
Día 1- T° 32.5	Día 2-T°32.3
	
Medio de cultivo : Sabouraud	
Después de 5 días a temperatura ambiente 20°C	
	

4.8.2. Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición

Tabla N°13: Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición en papel Watman N° 10

Discos de inhibición en Papel Watman N° 10	Resultado
Medio de cultivo : Agar Müller Hinton Temperatura : 32.3 °C - 32.5°C Tiempo: 18 - 72 horas	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Agar Sabouraud Temperatura: Temperatura ambiente 20°C Tiempo: 3 días	Cumple (según la USP N° 40)

Tabla N°14: Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición en papel Watman N° 10 + extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

Discos de inhibición en Papel Watman N° 10 + Extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”	Resultado
Medio de cultivo : Agar Müller Hinton T° C : 32.3-32.5 Tiempo: 18 - 72 horas	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Agar Sabouraud T° C : Temperatura ambiente 20°C Tiempo: 3 días	Cumple (según la USP N° 40)

Tabla N°15: Análisis de control de esterilidad de discos de inhibición en papel Watman N° 10 + extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada”

Discos de inhibición en Papel Watman N° 10 + Extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum L.</i> “granada”	Resultado
Medio de cultivo : Agar Müller Hinton T° C : 32.3-32.5 Tiempo: 18 - 72 horas	Cumple (según la USP N° 40)
Medio de cultivo : Agar Sabouraud T° C : Temperatura ambiente 20°C Tiempo: 3 días	Cumple (según la USP N° 40)

Figura N° 17: Prueba de esterilidad de los discos en Papel Whatman N° 10 en agar Müller Hinton y agar Sabouraud.

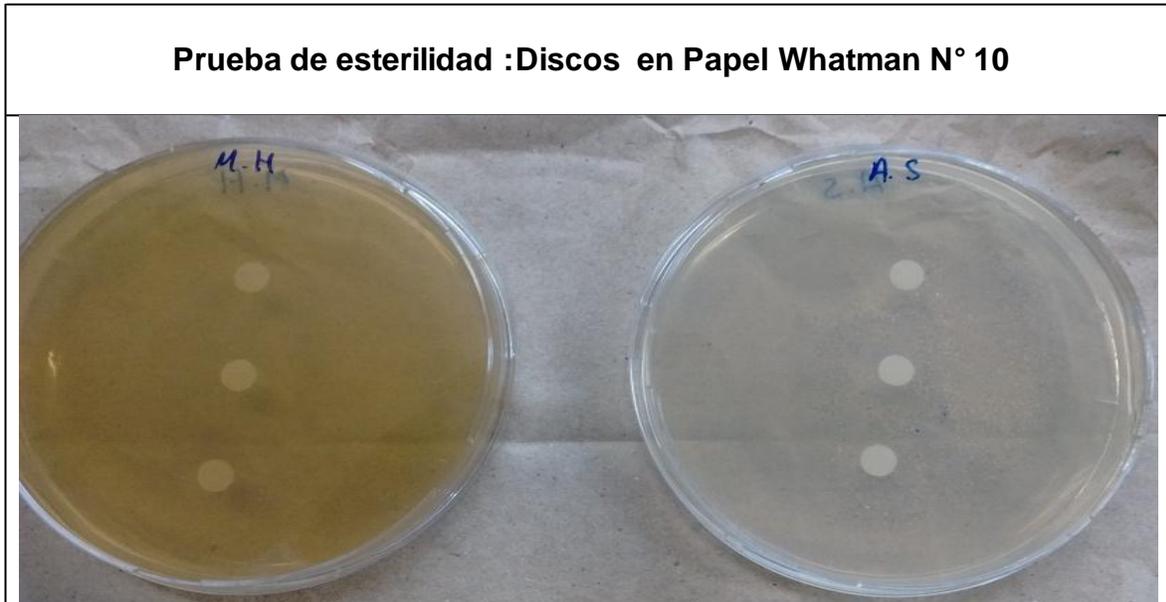


Figura N° 18: Prueba de esterilidad de discos impregnados con los extractos en agar Müller Hinton y agar Sabouraud.

Discos estériles impregnados con extracto en acetona	Discos estériles impregnados con extracto en acetato de etilo	Discos estériles impregnados con extracto en acetato de etilo y acetona
Agar Müller Hinton		Agar Sabouraud.

4.8.3 Actividad antimicrobiana

Muestras: Extracto en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”.

Concentraciones: 500 mg/mL, 400 mg/mL, 300 mg/mL, 200 mg/mL.

Microorganismos:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Método: Disco por difusión de Kirby- Bauer

Referencia según la escala de Durafford ⁶⁴

Es utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro* en fitoterapia, según su diámetro de inhibición.

S. nula: 8 mm

S. límite (sensible = +) : 9-14 mm

S. media (muy sensible = ++) : 15-19 mm

Sumamente sensible = +++ : 20 mm

Referencia según Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) ^{43,44,45}

La CLSI reconoce tres categorías de sensibilidad a los antibióticos para pruebas de dilución.

Sensible : Si responde a las dosis habituales del antibiótico.

Intermedio : Implica que la cepa puede ser inhibida por concentraciones del fármaco

Resistente : No es inhibida por las concentraciones del fármaco.

Tabla N°16: Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Halos de inhibición (mm) <i>E.coli</i> ATCC 25922	Extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Discos estándar		
	500 mg/mL	400 mg / mL	300 mg/mL	200 mg/mL	500 mg/mL	400 mg / mL	300 mg/mL	200 mg/mL	Ciprofloxacino 5µg	Penicilina 10 U	Dicloxacilina 1µg
	0	12,5	11	0	0	0	0	0	17	15,5	0
Zona de sensibilidad	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	R

(R) resistente : ≤ 10

(I) intermedio: 11-12

(S) sensible: ≥ 13

Fuente: Disk Diffusion Supplemental Tables, Performance Standard of Antimicrobial Suceptibility Testing..CLSI Document M100 –S21 . 2011.⁴⁵

Figura N° 19: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" en la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 correspondiente a las concentraciones del extracto: 400mg/mL. y 300mg/mL.

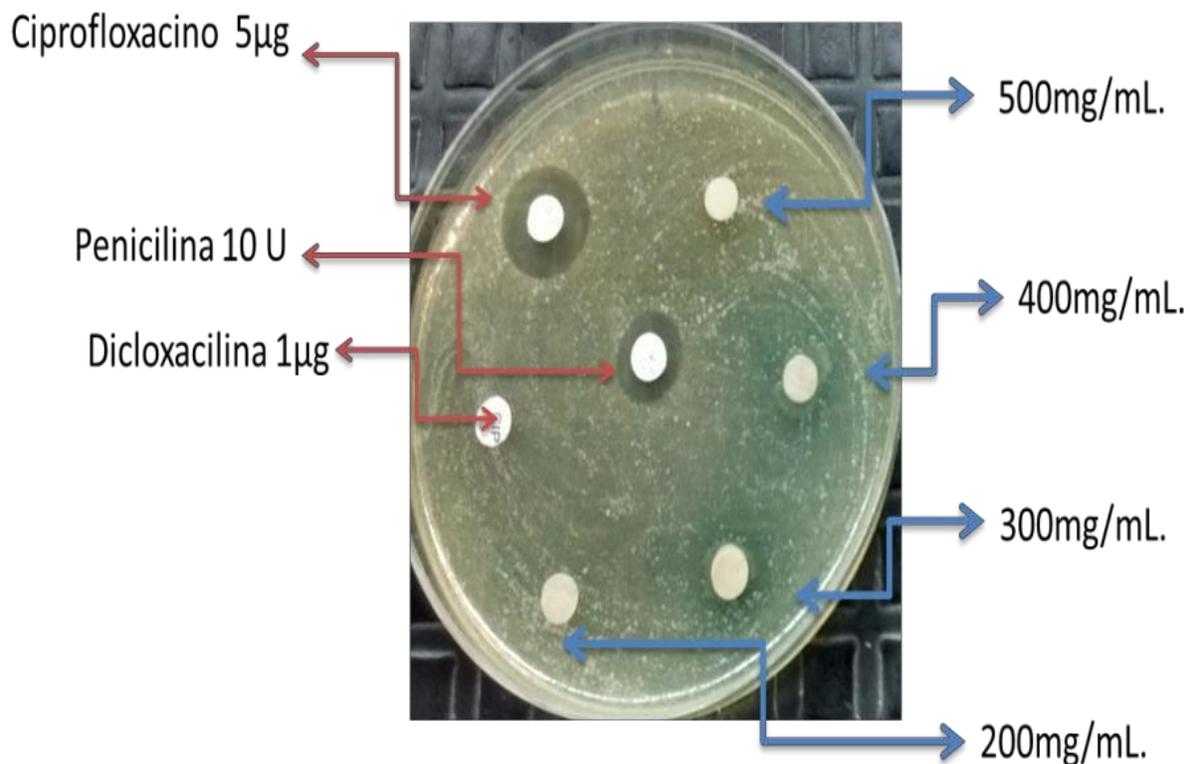


Tabla N°17: Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Halos de inhibición (mm) <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Discos estándar		
	500 mg/mL	400 mg/mL	300 mg/mL	200 mg/mL	500 mg/mL	400 mg/mL	300 mg/mL	200 mg/mL	Ciprofloxacino 5µg	Penicilina 10 U	Dicloxacilina 1µg
	16,5	14	12	0	0	0	0	0	0	2,5	21
Zona de sensibilidad	I	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S

(R) resistente : ≤ 11

(I) intermedio: 12-20

(S) sensible: ≥ 21

Fuente: Disk Diffusion Supplemental Tables, Performance Standard of Antimicrobial Susceptibility Testing..CLSI Document M100 –S21 . 2011.⁴⁵

Figura N° 20: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" en la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 correspondiente a las concentraciones del extracto: 500 mg/mL., 400 mg/mL.y 300 mg/mL.

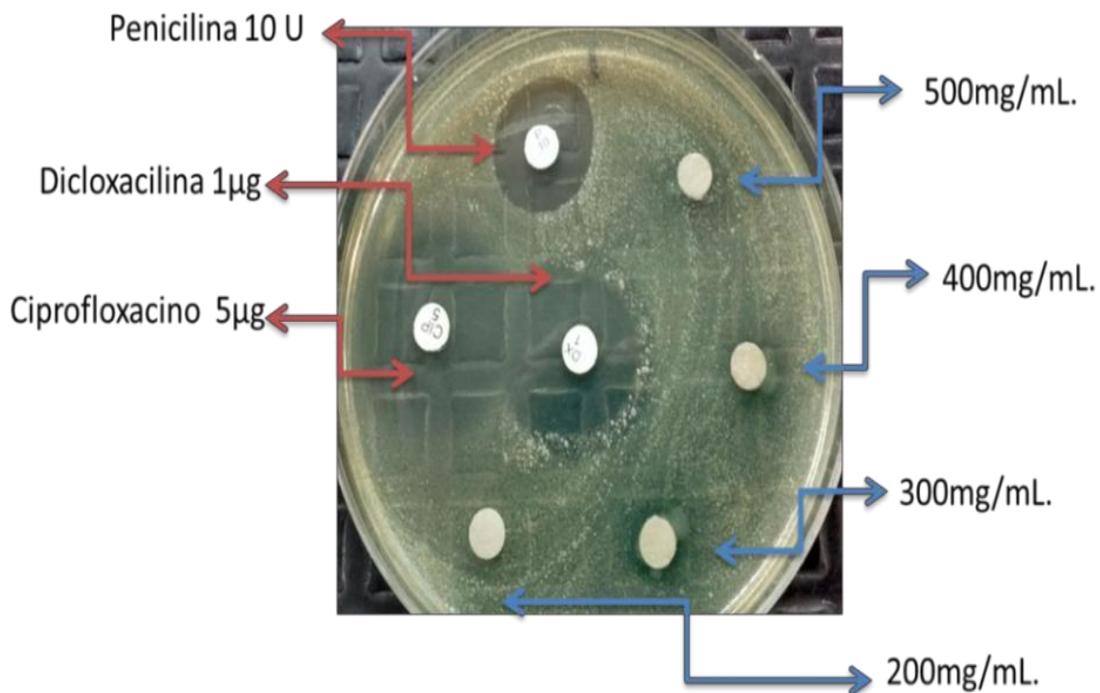


Tabla N°18: Resultado comparativo de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Halos de inhibición (mm) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Extracto en acetona del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Extracto en acetato de etilo del zumo de <i>Punica granatum</i> L."granada"				Discos estándar		
	500 mg/mL	400 mg/mL	300 mg/mL	200 mg/mL	500 mg/mL	400 mg/mL	300 mg/mL	200 mg/mL	Ciprofloxacino 5µg	Penicilina 10 U	Dicloxacilina 1µg
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	0
Zona de sensibilidad	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S

(R) resistente : ≤ 15

(I) intermedio: 16-20

(S) sensible: ≥ 21

Fuente: Disk Diffusion Supplemental tables, Performance Standard of Antimicrobial Susceptibility Testing..CLSI Document M100 –S21 . 2011.⁴⁵

Figura N° 21: Actividad antibacteriana del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. "granada" en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

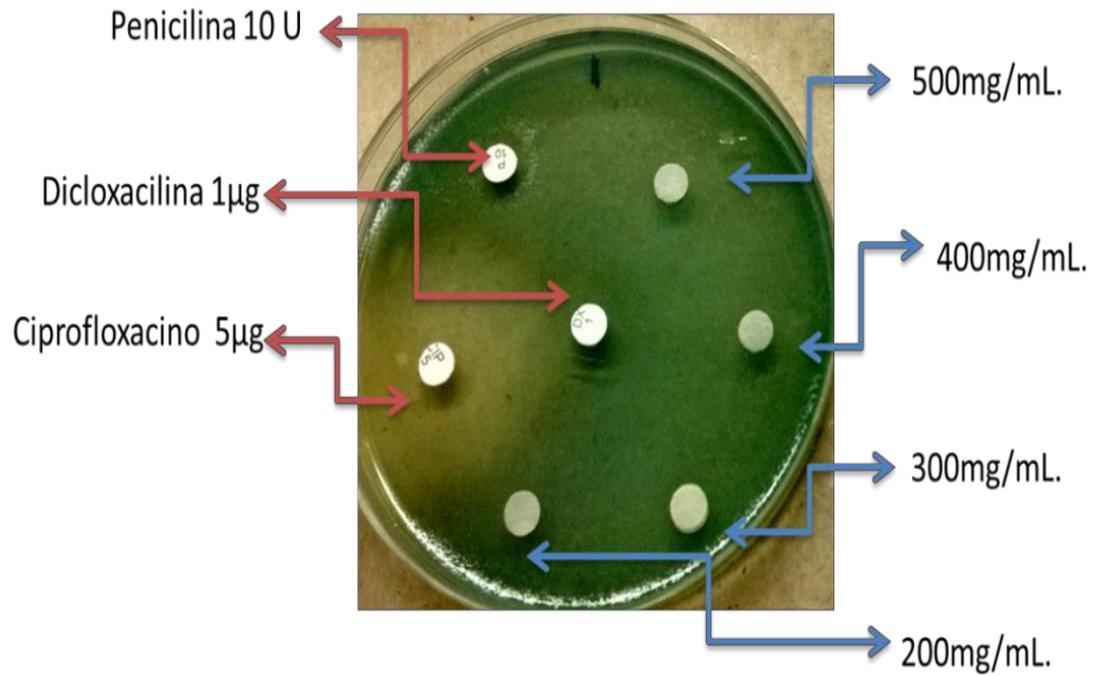
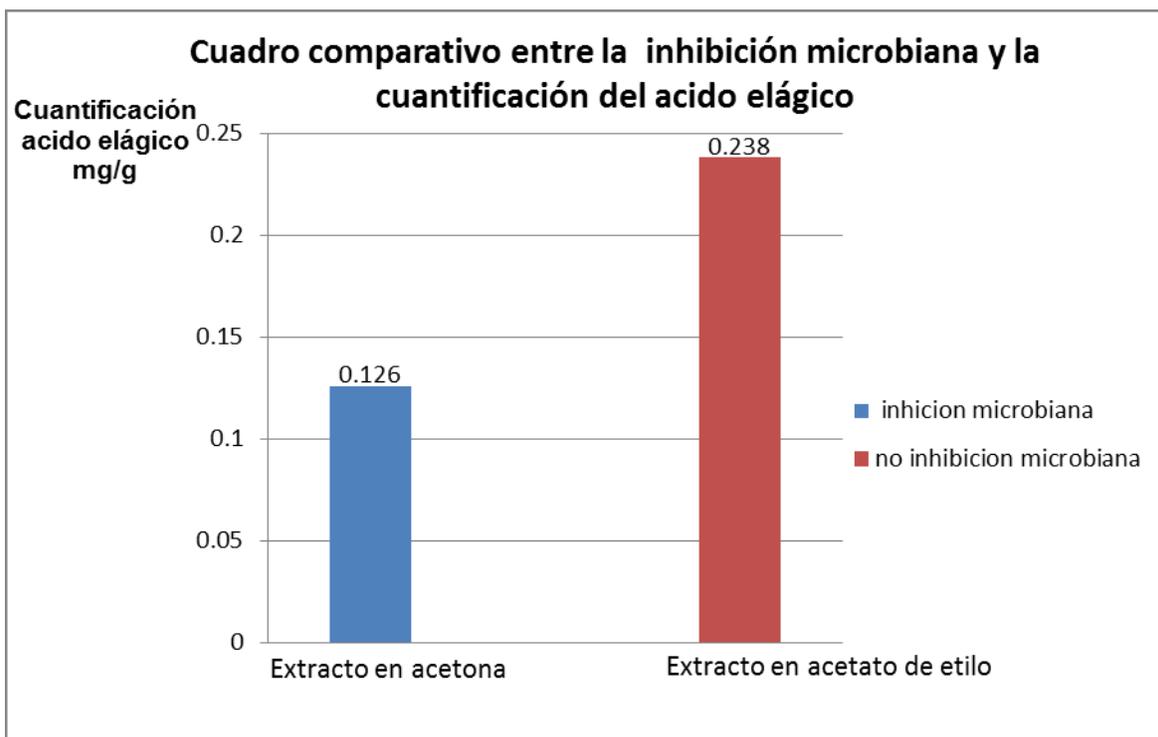


Tabla N°19: Cuadro comparativo entre la inhibición bacteriana de los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. “granada” y la cuantificación del ácido elálgico.



V. DISCUSIÓN

Punica granatum L. “granada” se le atribuyen múltiples propiedades benéficas para el ser humano por lo que nos resultó conveniente identificarlo según sistema de clasificación taxonómica; otorgada por el Museo de historia natural de la UNMSM. **Anexo N° 1.** Se realizó la extracción de taninos en acetona y acetato de etilo; se obtuvo 3,84 % en acetona y 2,13% en acetato de etilo. Bruneton y Villar ^{29,40} mencionan que para taninos la forma más eficaz de extraerlo es con acetona – agua. Para Yasoubi et al ⁶⁵ los extractos en acetona contienen altos componentes fenólicos (35,0 – 40,0 %) que no es igual a nuestros resultados.

En la prueba de solubilidad. Tabla N° 3. Figura N° 36 y 37. De los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada” se observó la solubilidad en: agua, etanol y metanol por lo que se deduce que los compuestos químicos son de estructura y naturaleza polar tal como lo menciona Lock ²⁸. **En el análisis fitoquímico. Tabla N° 4. Figura N° 38 - 45.** De los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada” se evidenció mejores resultados para flavonoides, taninos y azúcares reductores. En el análisis realizado por Kumar ⁶⁶ en el estudio fitoquímico de la fruta entera de *Punica granatum L.* “granada” indica como reacción positiva para flavonoides, taninos y carbohidratos por lo que coincide con nuestro trabajo de investigación. **En el análisis volumétrico de taninos totales.** De los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada” se encontró 0,16 %; como se observa en la **Tabla N° 5**, se encuentra dentro rango aceptable establecido por el estudio de Taipe ¹⁷; la cuantificación de taninos se encuentra directamente proporcional al cociente azúcar/acidez, que varía entre los cultivares. Además indica que el contenido de sólidos solubles es mayor al 17% y el contenido de taninos es inferior a 0,25%; este último valor se encuentra dentro de lo reportado por nuestro trabajo de investigación. **En el análisis de azúcares reductores. Tabla N° 6.**

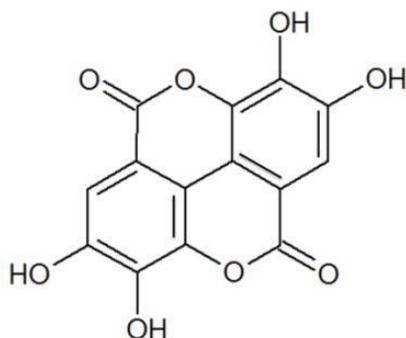
En los extractos en acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada” se encontró 25% de azúcares reductores. En comparación con el estudio reportado por Akbarpour et al. ⁶⁷; el contenido de azúcares reductores fue de 13,89 g·100 mL⁻¹ para el cultivar “Abdandan” y 29,83 g·100 mL⁻¹ para el “Naderi”. Por lo que está dentro del rango aceptable de esta investigación. La variedad también influye en el tipo y concentración de principios activos. La estructura química de los taninos hidrolizables contiene distintas porciones de glucosa, poliol y esterificaciones cruzadas diversas.²⁶

En el análisis cuantitativo del ácido elálgico. Tabla N° 7 y 8. Figura N° 46 - 49. En el extracto de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”. Se obtuvo los siguientes resultados: concentración de ácido elálgico en el extracto de acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada” fue de 0,126 mg/g y en el extracto de acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* “granada” fue de 0,238 mg/g. En relación a los resultados reportado por Salinas-Moreno ³¹ en el estudio de cuantificación de ácido elálgico del zumo de frambuesa variedad “Autumm bliss” procedente de dos localidades: Tlamimilopa Hidalgo (0,16 mg·Kg⁻¹) y Acatitlán San Mateo (1,36 mg·Kg⁻¹); demuestra que la localidad también afecta considerablemente el contenido de ácido elálgico como refleja en este estudio, un incremento del 39,6% entre los dos sitios. En el estudio de Djuric ¹⁵ evaluó el contenido de ácido elálgico en jugo de zarzamoras en el fruto de blackberry-raspberry híbrido cv. “Tayberry” (54,794 mg/100g muestra fresca) y blackberry cv. “Câcânska Bestrna” y (1,852 mg/100g muestra fresca) respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren variaciones en el contenido de ácido elálgico dependiendo de las especies y cultivares. En el trabajo de investigación de Williner ³³ reportó la cuantificación de ácido elálgico de frutillas maduras 100% color rojo variedad Camarosa con la metodología de Wilson y Hagerman (0,77 ± 0,06 mg/g peso seco) por lo que evidencia que el contenido de ácido elálgico varía en función de la variedad y grado de madurez del fruto.

En el análisis de ácido elágico de la cáscara de granada estudiado por Ascacio-Valdez ³² con la metodología de Wilson y Hagerman reportó ($85,8 \pm 1,00$ mg/g planta). Nuestros resultados se encuentran cercanos al 30% al estudio realizado por Williner ³³ ya que ambos utilizamos zumos frescos, iguales unidades de equivalencia y la misma metodología de cuantificación de ácido elágico. También consideramos importante la variación del contenido de ácido elágico por factores medio ambientales, grados de maduración y variedades. En cuanto al estudio de Ascacio-Valdez ³² quien realizó la técnica operatoria de nuestro trabajo de investigación reportó mayor cantidad, ya que la cáscara de granada por su naturaleza vegetal almacena mayor cantidad de fitoconstituyentes elágicos y ellagitaninos; tal como lo reporta Seeram y colaboradores ⁶⁸, la cáscara de granada posee 85% de elagitaninos de polifenoles totales y 1,3 % de ácido elágico. Según lo que considera Williner ³³ en el estudio de la frutilla fresca el contenido de agua en término medio es del 90%; referencia bibliográfica que consideramos importante porque el contenido de agua influye en la cuantificación de ácido elágico del zumo fresco de granada.

En el análisis cualitativo del ácido elágico en espectroscopia IR. Tabla N° 9 y 10. Figura N° 13 y 14. Se obtuvo picos de intensidad infrarroja; semejantes en el extracto de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada”; esto quiere decir, que los solventes acetato de etilo y acetona medianamente polares interactuaron con otros grupos funcionales de polifenoles hidrolizables. En el extracto de acetato de etilo según la literatura científica de Melniciuc ⁶³; los estiramientos simétricos y asimétricos de las vibraciones de mayor y menor intensidad del grupo funcional ester aparece en el rango de 1326 cm^{-1} , la mayor intensidad vibracional para los anillos aromáticos aparece en el rango de 1617 cm^{-1} , el estiramiento del carbonilo y las valencias de vibraciones para los grupos cetónicos aparece en el rango de 1735 cm^{-1} , las bandas de hidroxilos fuera del plano aparece en el rango de

1383 cm^{-1} y en el estudio realizado por Rojo ⁶¹ muestran bandas de absorción infrarroja (3200-3650 cm^{-1}) y Subrahmanyam ⁶² en el análisis estructural del ácido elágico (2800-3700 cm^{-1}) muestran bandas anchas para la identificación de hidroxilos. En cuanto, al resultado obtenido en el extracto de acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada” se evidencia en el estudio de Subrahmanyam ⁶² en la intensidad de vibración de los anillos aromáticos en el rango de 1500 cm^{-1} , para las señales de intensidad de estiramiento del grupo carbonilo se evidencia en las tablas reportadas por Rojo ⁶¹ (1715 cm^{-1}) y Subrahmanyam ⁶² (1725 cm^{-1}) respectivamente y para las bandas anchas de intensidad del grupo hidroxilo se evidencia en el reporte de Rojo ⁶¹ (3200-3650 cm^{-1}). Cabe resaltar que los compuestos orgánicos generan bandas de absorción características, en la zona de huella digital; dependiendo de la estructura de la molécula y permitiendo la identificación de compuestos específicos tal como lo menciona Muñoz. ⁵¹ De acuerdo a los datos obtenidos y comparados con los estudios de Melniciuc ⁶³ y Subrahmanyam ⁶² ; el compuesto identificado correspondería posiblemente al ácido elágico.



Representación gráfica del Ácido elágico

En cuanto al análisis de control de muestra microbiológica. Tabla N° 11 y 12. Figura N° 15 ,16. En el extracto de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada” nuestra investigación cumple con el Cap.<62> de la Farmacopea americana N°40; acerca de la calidad microbiológica en pruebas de microorganismos específicos. Esto coincide con lo señalado por Fernández ⁶⁹, sobre el control microbiológico de medicamentos no obligatoriamente estériles se deben utilizar los métodos armonizados según el documento ICH Q4B Anexo 4C, publicados en Farmacopea Europea, Farmacopea Japonesa y Farmacopea de Estados Unidos de Norteamérica. Asimismo, nuestra investigación también coincide con lo señalado por Ríos ⁷⁰, según el método de inoculación directa en placa de la Maca; obtuvieron como resultado la ausencia en las tres bacterias patógenas por lo que el producto no debe de ser portador de gérmenes infecto contagiosos. El recuento microbiano o fúngico no deberá exceder los límites recomendados por la Organización Mundial de la Salud para productos medicinales herbales de uso oral. **En el análisis de control de esterilidad de los discos de inhibición. Tabla N° 13 - 15. Figura N° 17 y 18.** En papel Whatman N° 10; cumple con la prueba exigida según el Cap.<71> de la Farmacopea americana N°40, nuestro resultado coincide con el postulado mencionado por Fernández ⁶⁹ “Si no se observa desarrollo, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad. La ausencia de contaminación microbiana no es razón suficiente, para suponer la total esterilidad del lote, por esta razón deben efectuarse las validaciones de los procesos de esterilización”. **En el análisis de la actividad antimicrobiana. Tabla N° 16 - 18. Figura N° 19 – 21.** Del zumo de *Punica granatum L.* “granada”; obtuvimos en el extracto de acetona 11 y 12,5 mm, zonas de inhibición en la cepa *Escherichia coli*. Y 12 ,14 y 16,5 mm en la cepa *Staphylococcus aureus*. Nuestros resultados se compararon de manera cualitativa según CLSI Document ⁴⁵ y la escala de Durafford ⁶⁴. Por lo que respecta, a la CLSI Document ⁴⁵, se evidencia sensibilidad intermedia para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; estos resultados se aproximan al

63% de los resultados encontrados en la investigación de Sabbar ⁸ sobre la actividad antibacterial en el jugo de *Punica granatum L.* “granada” en el extracto acuoso. Asimismo, en la escala de Durafford ⁶⁴ en la cepa *Escherichia coli* se encuentra en la escala de sensibilidad límite que va de (9 - 14 mm) y en la cepa *Staphylococcus aureus* se ubica en la escala media de sensibilidad que va de (15 - 19mm). Estos resultados se confirman al ser comparados con el estudio de Alzamora ⁶⁴ sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de plantas naturales sobre bacterias Gram (+) y Gram (-) que se ubican en la escala de sensibilidad: límite y media.

En el estudio comparativo entre la inhibición microbiana en el extracto de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* “granada” y la cuantificación del ácido elágico. Tabla N° 19. Es inversamente proporcional a la inhibición microbiana. Debido a que el extracto en acetona tuvo inhibición microbiana en comparación con el extracto en acetato de etilo. Y en relación, a la concentración del ácido elágico se obtuvo mayor valor en el extracto en acetato de etilo. Es probable, se haya presentado un sinergismo en el extracto de acetona con otros compuestos hidrolizables. Por lo contrario, en el extracto de acetato de etilo se produjo un antagonismo entre los compuestos polifenólicos hidrolizables; resultando ausencia de inhibición microbiana. El resultado obtenido en el extracto en acetona se evidenciaría la actividad antimicrobiana posiblemente por la acción sinérgica de fitoconstituyentes como el ácido gálico, tal como lo reporto Naz ³⁸ en el estudio de la actividad antibacterial de *Punica granatum L.* “granada”, demostró que altas concentraciones de ácido gálico tiene actividad antibacteriana contra cepas Gram (+) y Gram (-). Asimismo, el resultado reportado por Rosas- Burgos³⁶ menciona que altas concentraciones de punicalaginas α y β y ácido elágico fueron los responsables de la actividad antibacterial y antifúngica de la cáscara de granada. Mathabe ⁷¹ en el estudio de las zonas de inhibición bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* demostraron (12- 31

mm) en los extractos en acetona, etanol, metanol y agua. Los ensayos de actividad antibacteriana en fracciones eluidas en acetato de etilo en jugos comerciales de *Punica granatum* L. "granada" según Muntha et al.⁹ demostraron baja actividad en *Escherichia coli*, MRSA y *Pseudomonas aeruginosa*. Y los compuestos purificados de ácido elágico y punicalinas no demostraron actividad antibacteriana contra todos los microorganismos de prueba a altas concentraciones de 20 µg/mL. El resultado de nuestra investigación se explicaría por la solubilidad de los extractos con los solventes. La dependencia de la solubilidad se debe a que el anillo aromático del ácido elágico le confiere propiedades lipofílicas y los 4 grupos hidroxilo y las dos lactonas le confieren propiedades hidrofílicas, ya que funcionan con aceptores de electrones formando puentes de hidrógeno¹³.

VI. CONCLUSIONES

El extracto de acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”, tiene actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además realizamos las siguientes conclusiones específicas:

Se recolectó e identificó la planta y fruto de *Punica granatum* L. “granada.

Se preparó los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada.

Los fitoconstituyentes encontrados en los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”; fueron flavonoides, taninos y azúcares reductores.

En el análisis cualitativo en espectroscopia IR se obtuvo picos de intensidad infrarroja; que posiblemente correspondería a un polifenol hidrolizable u otro fitoconstituyente asociado al ácido elágico. En cuanto, al análisis cuantitativo del ácido elágico en el extracto en acetato de etilo se obtuvo 0,238 mg/g y en el extracto en acetona 0,126 mg/g.

El extracto en acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada” presentó actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. No se evidenció actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

La actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada” es inversamente proporcional en relación a la concentración de ácido elágico.

VII. RECOMENDACIONES

Debido a los resultados obtenidos recomendamos investigar profundamente los fitoconstituyentes responsables de la actividad antibacteriana sobre todo en el ácido gálico y Punicalaginas en el zumo de *Punica granatum L.* “granada”.

Considerando la buena actividad antibacteriana del zumo de *Punica granatum L.* “granada” frente a cepas patógenas; en especial *Staphylococcus aureus* recomendamos considerar la elaboración de formulaciones magistrales de uso tópico que ayuden al tratamiento a este tipo de infecciones.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quizhpe, A. et al .Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. Re Act latinoamericana. Impresión. Gráficas del Austro. [libro virtual]. 2014. Ecuador.Pag.15. [Fecha de consulta: 5 de junio del 2017]. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_5424.pdf.
2. Mamani E, Luján D, Pajuelo G. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Únanue. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ISSN 1025 - 5583 Págs. 120-124.Publicado: An Fac Med Lima 2006; 67(2). [Revisión: 18 de junio del 2017].
3. Vallés J, Mariscal D. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. .Revista 2005; 23(Supl. 3):30-6. España .Cap. Neumonía nosocomial .Art. Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. . [Fecha de consulta: 18 de junio del 2017].
4. Organización mundial de la salud. Información general y programas de la OMS. Notas descriptivas: Enfermedades infecciosas. Centro de prensa. [Fecha de consulta: 13 de junio del 2017]. Disponible en: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
5. Abdullah A. Hama yusf taha , Syamand A. Qadir, The antimicrobial activity of pomegranate juice,international journal of scientific & engineering research, volume 5, issue 10, Iran ,octubre-2014.[acceso: 15 de junio del 2017]. Disponible en: www.ijser.org/.../The-antimicrobial-activity-of-pomegranate-Puni.
6. Jurenka,J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review.alternative medicine review volume 13,number 2. 2008. [Fecha de consulta: 20 de junio del 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590349>
7. Barathikannan et al. Chemical analysis of *Punica granatum L.* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. BMC Complementary and Alternative Medicine (2016) 16:264 .Received: 5 January 2016 Accepted: 21 July 2016. Published: 30 July 2016. [Fecha de consulta: 18 de junio del 2017]. Disponible:<https://bmccomplementalrternmed.biomedcentral.com/.../s12906->

8. Sabbar D. et al . Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). American – Eurasian J. Agric & Environ.Sci, 9(3): 273-281, 2010.India [Fecha de consulta 23 de junio del 2017]. Disponible en : www.researchgate.net/.../262582264_Corresponding_Auth

9. Muntha K.et al. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin- rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum L.*Planta Med.New York. USA, DOI 10.1055/ s- 2007-967167-Publiced on line 2007 [PubMed]. [Fecha de consulta 23 de junio del 2017]. Disponible en : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566148

- 10.Betanzos-Cabrera G. et al. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*.Food & nutrition research. [PubMed] 2015, 59: 27620.[fecha de consulta: 05 de junio 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999265>

- 11.Machadoa T et al. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. J. Braz.Chem.Soc., Vol 13, N°5, 606-610, 2002.[fecha de consulta: 18 de Junio del 2017] . Disponible en: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103.

- 12.Bernal R, Rodríguez I, Salazar M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”.Rebiolest 2014; 2(1): e 22. [Fecha de consulta: 13 de junio del 2017].

- 13.Cruz-Atonio F. et al. Propiedades químicas e industriales del ácido eláxico .Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2010 Año 2, No. 3. México. [Fecha de consulta: 13 de junio del 2017].

- 14.Osorio-Hernández, H; et al. Efectividad biológica de extractos polifenólicos contra bacterias fitopatógenas. Proyecto CONAFOR-CONACYT-2004-13. [fecha de consulta: 30 de junio del 2017]. Disponible en : <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/>

- 15.Djurić,M. Quantitation of ellagic acid in blackberries. Serbia. Hem. Ind. 68 (2) 241–245 (2014). [Fecha de consulta: 20 de junio del 2017]. Disponible en : https://www.researchgate.net/.../267033631_Quantitation_of_ella

16. Entessar, H.A. Al-Mosawe, Iman I. Al- Saadi. The Extraction and Purification of Gallic Acid from the Pomegranate Rind. Al- Mustansiriyah J. Sci. Vol. 23, No 6, 2012. [Received 16/5/2012 – Accepted 20/6/2012].Iran. [Fecha de consulta: 19 de junio del 2017].Disponible en : www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aid=72347
17. Taype, J. El cultivo del granado.Universidad de la Molina .[Fecha de consulta: 02de Julio del 2017].
18. Al-Rawahi, A et al. Phenolic Constituents of Pomegranate Peels (*Punica granatum L.*) Cultivated in Oman. European Journal of Medicinal Plants 4(3): 315-331, 2014.Oman. [Fecha de consulta: 20 de junio del 2017]. Disponible en: www.sciencedomain.org
19. Satheesh , B. Et al. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum L.* peel, whole fruit and seeds. NUJHS Vol. 2, No.4, 2012, [Fecha de consulta: 19 de junio del 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/.../235991601_Preliminary_phytoch..
20. Garachh, D. Et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum L.* an overview.IRJP, 2012,3 (2).India.Internacional Research journal of pharmacy. . [Fecha de consulta: 19 de junio del 2017]. Disponible en:www.irjponline.com
21. Melgarejo, P. El granado, su problemática y usos. Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Escuela Politécnica Superior de Orihuela Universidad Miguel Hernández de Elche. I Jornadas Nacionales sobre el granado.Pag, 8-9.[Fecha de consulta: 02de Julio del 2017].
22. Ministerio de comercio exterior y turismo. Asistencia técnica para los planes operativos sectoriales (POS): Granada. [Fecha de consulta: 02 de Julio del 2017].Disponible en: www.mincetur.gob.pe > [Plan Estratégico Nacional Exportador > PENX 2003-2013.](#)
23. Yasoubi P, et al. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extracts. J. Agric. Sci. Technol. (2007) Vol. 9: 35-42. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017]. Disponible en : https://www.researchgate.net/.../284044212_Total_phenolic_contents_and_anti_oxidant

24. Ilustración de *punica granatum* (otto w. thomé: flora von deutschland, österreich und der schweiz, 1885) .[Fecha de consulta: 02 de julio del 2017]. Disponible en: <https://www.pinterest.com/pin/115123334199482607>
25. Maldonado O. Efecto del tiempo de exposición con ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general de arilos de granada (*Punica granatum L.*) mínimamente procesada. 2014. Perú.[Tesis para obtener el título de: ingeniera en industrias alimentarias]. [Fecha de consulta: 02 de Julio del 2017].
26. Vázquez-Flores, A. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia* .Mexico Vol. VI, No. 2 • Mayo-Agosto 2012. . [Fecha de consulta: 22 de julio del 2017]. Disponible en: [tecnociencia.uach.mx/..../Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimica ...](http://tecnociencia.uach.mx/..../Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimica...)
27. Churata M, Nina F. Resinas obtenidas por reacción de manich en polímeros naturales con $h\alpha$. [Tesis para obtener el grado de magister]. [Fecha de consulta: 30 de junio del 2017].
28. Lock, O. Investigación fitoquímica .Métodos en el estudio de productos naturales. 1 era edición. Fondo editorial de la pontificia universidad Católica. Lima. 1994. [Fecha de consulta: 19 de junio del 2017].
29. Bruneton, J. Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales. Editorial acriba.pag.365-397. 2001. [Fecha de consulta: 19 de junio del 2017].
30. Coy C, Parra J, Cuca L. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista Elementos* - Número 4 - Junio de 2014. [Fecha de consulta: 30 de junio del 2017].
31. Salinas-Moreno, Y. Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*rubus idaeus L.*) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 97-101, 2009. [Fecha de consulta: 10 de agosto del 2017].

32. Ascacio J, Aguilera A, Rodríguez R, Aguilar C. Análisis de ácido elálgico en algunas plantas del semidesierto Mexicano. Rev Mex Cienc Farm 44 (2) 2013.[Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica] [Fecha de consulta: 19 de julio del 2017].
33. Williner M. Ácido elálgico en frutillas enteras y mínimamente procesadas. 2001. Argentina [Tesis para magister en ciencia y tecnología de alimentos]. [Fecha de consulta: 19 de julio del 2017].
34. Paller CJ, Pantuck A, Carducci MA. A review of pomegranate in prostate cancer. [pubmed] Cáncer de próstata Prostatic Dis. 2017. [Fecha de consulta: 06 de julio del 2017]. Disponible en : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28440320
35. Baccarin T, Lemos-Senna E. Potential Application of Nanoemulsions for Skin Delivery of Pomegranate Peel Polyphenols.[pubmed] AAPS PharmSciTech. 2017. [Fecha de consulta: 06 de julio del 2017]. Disponible en : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597364
36. Rosas-Burgos, et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. .[pubmed] J Sci Food Agric. 2017 Feb; 97 (3): 802 – 810. [Fecha de consulta: 06 de julio del 2017]. Disponible en : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173758
37. Govea M et al. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálgico en Modelos Biológicos in vitro. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. México. 2013 Volumen 5, No 9. . [Fecha de consulta: 30 de junio del 2017].
38. Naz S, et al. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum L.* [pubmed]. J Food Sci. 2007 Nov; 72(9):M341-5. [Fecha de consulta: 06 de julio del 2017]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibacterial+activity+directed+isolation+of+compounds+from+punica+granatum
39. Arranz S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. [Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias alimentarias]. 2010. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017].

40. Villar A. Farmacología general. Cap. taninos. pág. 230.2010. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017].
41. Perea E. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Cap. [Fundamento microbiológico de la terapia] Martínez, L., Perea E. Ediciones Doyna. Pag. 200-221. España. 1992. [Fecha de consulta: 03 de julio del 2017].
42. Picazo, J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Cap 11. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad de antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017].
43. Stephen J. Cavalieri .et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Editora Marie B. Coyle Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington Seattle, Washington. [Fecha de consulta: 10 de julio del 2017]. Disponible en : www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view
44. Koneman .Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. Cap. 17 [prueba de sensibilidad de antimicrobianos] pag. 930.2006. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017].
45. National Committee for clinical Laboratory standard. Approved standard M2-A3 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Villanova. Pa. NCCLS. 1984. USA. [Fecha de consulta: 10 de febrero del 2017]. Disponible en : http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M02A12_sample.pdf
46. Suárez A, Vera V. Uso y abuso del ciprofloxacino. MEDISAN 2011; 15(3):384. [Fecha de consulta: 03 de julio del 2017]. Disponible en: www.scielo.sld.cu/pdf/san/v15n3/san18311.pdf
47. Bermeo F, Portilla V. Determinación de la actividad de sensidiscos frente a *Staphylococcus aureus* atcc® 25923 y *Escherichia coli* atcc® 25922. [Tesis previa a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador. 2009. [Fecha de consulta: 04 de julio del 2017].
48. Valls O, Del Castillo B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 1ª edición. Cap. 11 espectroscopia infrarroja pag 137-149. 2013 [Fecha de consulta: 14 de julio del 2017].

49. Universidad de Salamanca. Práctica de espectrofotometría UV-Visible. fundamento de la técnica. España. pg.2-4 [Fecha de consulta: 14 de julio del 2017]. Disponible en: <http://campus.usal.es/~quimfis/apoyo/Carmen/Practicas/Espectrofotometria.PDF>
50. Araujo P. “Espectroscopia de infrarrojo cercano como respuesta alternativa en la caracterización y valoración de crudo en la refinería de petróleo”. 2013. Perú.[Tesis para obtener el título profesional de: Ingeniero químico].[Fecha de consulta: 04 de Julio del 2017].
51. Muñoz G. Cuantificación rápida de productos de la fermentación en un biorreactor anaeróbico productor de hidrogeno.2013.Mexico. [Tesis para obtener el grado de maestro en ingeniería ambiental].[Fecha de consulta: 03 de Julio del 2017].
52. Palacios J. Formulario magistral de fitofármacos. Biblioteca Nacional del Perú .1ra edición 2016. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017].
53. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; Managing Hazardous Material Incidents, Acetone Septiembre de 1995. [fecha de consulta: 01 de julio del 2017]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts21.pdf>
54. Ficha tecnica de seguridad del aceatao de etilo. [Fecha de consulta: 04 de julio del 2017]. Disponible en : portales.puj.edu.co/doc-quimica/fds-labqca.../Acetato%20de%20etilo.pdf
55. Bonilla, P. Arroyo J, Chavez J. Estudio fitoquímico y efecto antiulceroso del extracto de hojas Vallea stipularis L.F. “chuilur” en ratas.Red acad Perú salud 14(2),2007.Facultad de farmacia y bioquímica UNMSM. Perú. [Fecha de consulta: 20 de junio del 2016].
56. Mosquera, O. Yeny Cortés, Y. Camargo, J. Caracterización fitoquímica de los extractos de acetona y contenido de lignina en culmos de Guadua angustifolia. Recursos Naturales y Ambiente/no. 65-66: 10-15. Colombia. [Fecha de consulta: 20 de junio del 2016]. Disponible en: repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr.../Caracterizacion%20fitoquimica%20de%20los...

57. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Guía de laboratorio. Determinación de azúcares reductores método de fehling – soxhlet (gravimétrico). [Fecha de consulta: 10 de julio del 2017]. Disponible en: http://avalon.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/analitica_instrumental/guia_3_3.pdf
58. Fernández I, Fuentes A, García E. Cálculo del contenido en azúcares totales en alimentos por el método de Bertrand. ETSIAMN - Universitat Politècnica de València. Departamento de Tecnología de Alimentos. [Fecha de consulta: 10 de julio del 2017]. Disponible en: www.riunet.upv.es/
59. Farmacopea Americana USP 40. Cap.<62> Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos. [Fecha de consulta: 20 de agosto del 2017]. pag 115-120
60. Farmacopea Americana USP 40. Cap.<71> Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de recuento microbiano. [Fecha de consulta: 21 de agosto del 2017]. pag 136-146.
61. Rojo, F. Tablas de espectroscopia infraroja. Disponible en www.depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IR-Tablas_33837.pdf
62. Subrahmanyam Goriparti, H, Srinivasan, S. Ellagic acid- a novel organic electrode material for high capacity lithium Ion Batteries. electronic Supplementary material (ESI) for chemical communications. Pag. 3. J. The royal Society of chemistry 2013. [Fecha de consulta: 05 de agosto del 2017] Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/248386064_Ellagic_acid.
63. Melniciuc N, Pui A, Florescu M. FTIR spectroscopy for the analysis of vegetable tanned ancient leather. European Journal of science and technology, Rumania. December 2006. Vol. 2, N° 4, 49-53. [Fecha de consulta: 05 de agosto del 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/.../242147496_FTIR_spectroscopy_for_the_analysis

64. Alzamora L. et al. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Marcos. Vol. 62, N° 2-2001. Pags. 156-161. [fecha de consulta: 20 de julio del 2017].
65. Yasoubi P, et al. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts. J. Agric. Sci. Technol. (2007) Vol. 9: 35-42. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017]. Disponible en : https://www.researchgate.net/.../284044212_Total_phenolic_contents_and_anti_oxidant
66. Kumar S, et al. Preliminary phytochemical screening of various extracts of púnica granatum peel, whole fruit and seeds. Nitte University Journal of health science Vol. 2, N°4, December 2012, ISSN 2249-7110. Mangalore. [Fecha de consulta: 01 de julio del 2017]. Disponible en : nitte.edu.in/journal/Dec2012/PPSOVEOPGP.pdf
67. Akbarpour V., Hemmati K. y Sharifani M. Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit in maturation stage. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., Vol. 6, N° 4, (2009), 411-416. . [Fecha de consulta: 4 de agosto del 2017]. Disponible en : [https://www.idosi.org/aejaes/jaes6\(4\)/6.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes6(4)/6.pdf)
68. Seeram N, Lee R y Herber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Sep Purif Technology. 2005; (41): 49-55. [Fecha de consulta: 4 de agosto del 2017]. Disponible en : www.sciencedirect.com/science/article/pii.
69. Fernández M. Manual de microbiología aplicada a la industria farmacéutica, cosmética de productos médicos. Cap IV.3 Control microbiológico de medicamentos no obligatoriamente estériles. Pag 305. [Fecha de consulta: 07 de agosto del 2017]. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/download-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

70. Rios K, Riquez Determinación del recuento microbiano de productos derivados de la maca (*lepidium meyenii* w.) utilizando placas petrifilm y su comparación con el método convencional. [Tesis para la obtención del Título de Químico Farmacéutico]. Perú. 2007. [Fecha de consulta: 07 de agosto del 2017].
71. Mathabe, M.C., R.V. Nikolova, N. Lall, N.Z. Nyazema, 2005. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 286-293. [Fecha de consulta: 07 de agosto del 2017]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/

FIGURAS



Figura N° 22: Planta entera de *Punica granatum* L. «granada»

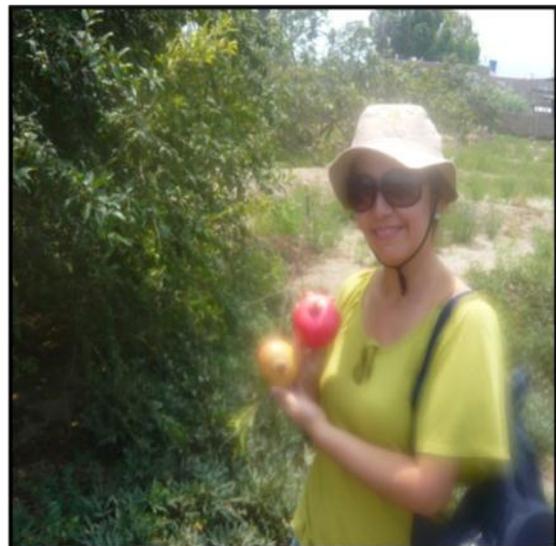


Figura N° 23: Fruto de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N° 24: Frutos maduros y fresco de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N° 25: Arilos expuestos de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N° 26: Separación manual de los arilos de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N° 27: Extracción manual del zumo de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N° 28: Zumo de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N°29: Extracción de la fase orgánica del zumo de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N°30: Última extracción sucesiva de la fase orgánica del zumo de *Punica granatum* L. «granada»

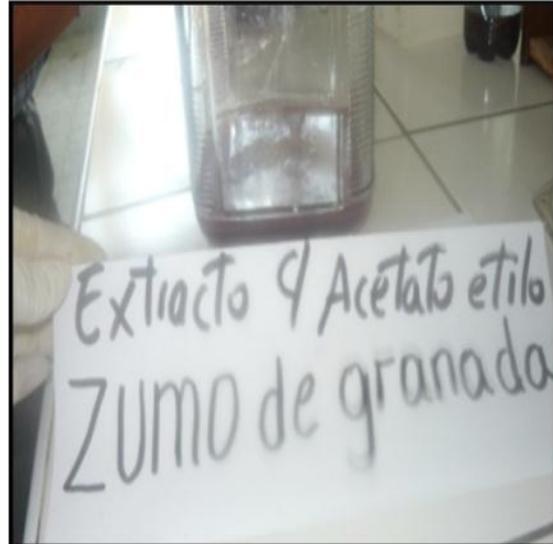


Figura N°31: Filtración final del zumo de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N°32: Preparación del extracto en acetona de los arilos de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N°33: Maceración del extracto en acetona de los arilos de *Punica granatum* L. «granada»



Figura N°34: Filtración del extracto en acetona de los arilos de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N°35: Extracto en acetona y Extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N°36: Prueba de solubilidad del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada».



Figura N°37: Prueba de solubilidad del extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada».

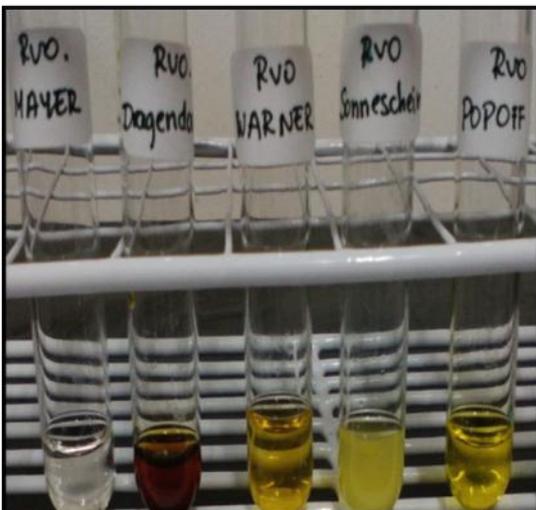


Figura N° 38: Prueba fitoquímica para alcaloides extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N° 39: Prueba fitoquímica para alcaloides extracto en acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

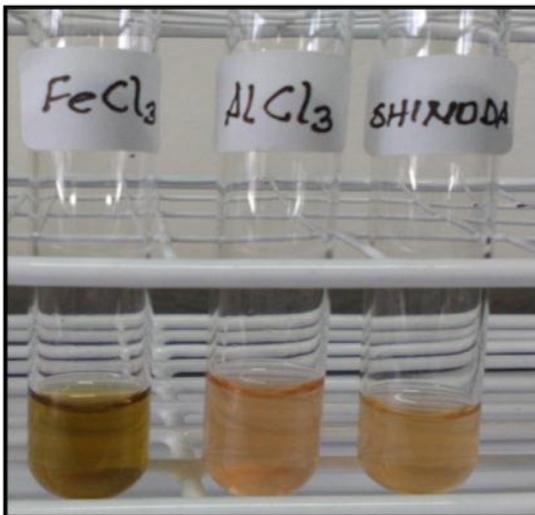


Figura N° 40: Prueba fitoquímica para flavonoides y compuestos fenólicos en el extracto de acetato de etilo en el zumo de *Punica granatum* L. «granada»

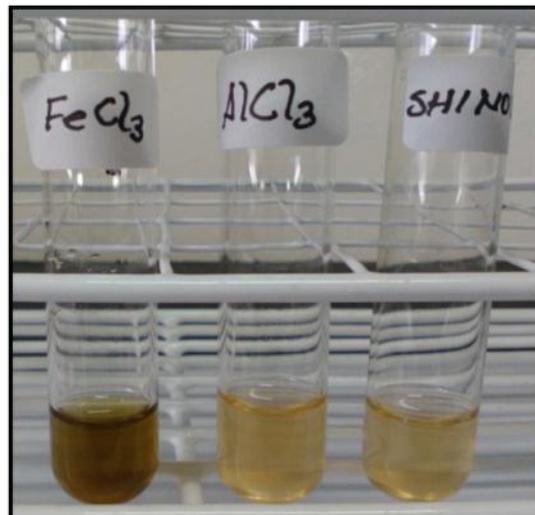


Figura N° 41: Prueba fitoquímica para flavonoides y compuestos fenólicos en el extracto de acetona en el zumo de *Punica granatum* L. «granada»

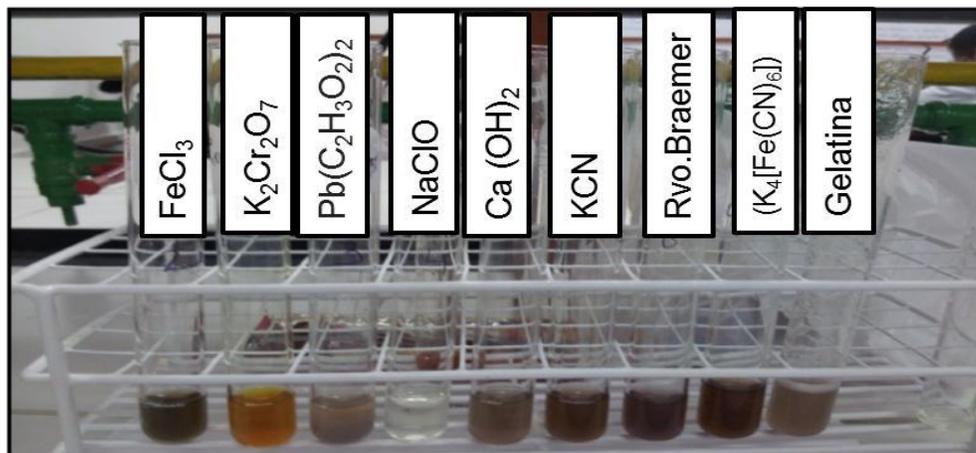


Figura N° 42: Prueba fitoquímica de taninos en el extracto de acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. «granada»

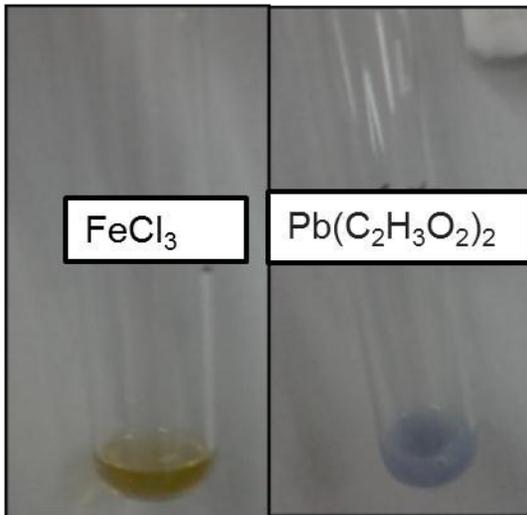


Figura N° 43: Prueba fitoquímica de taninos en el extracto de acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

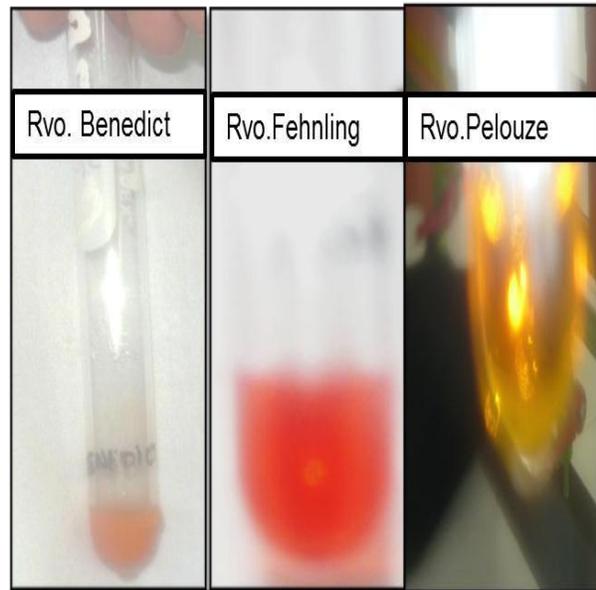


Figura N° 44: Prueba fitoquímica de azúcares reductores en el extracto de acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

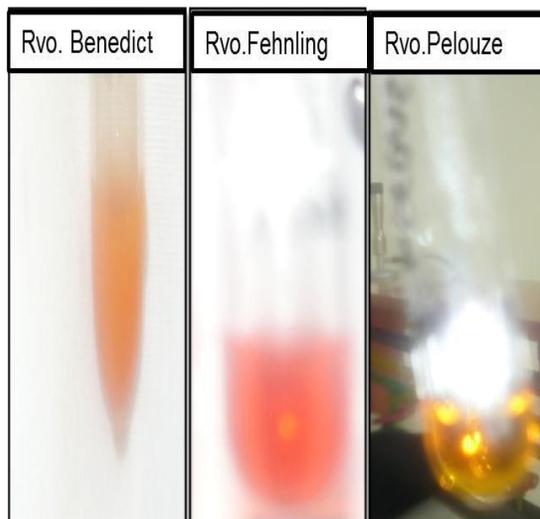


Figura N° 45: Prueba fitoquímica de azúcares reductores en el extracto de acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

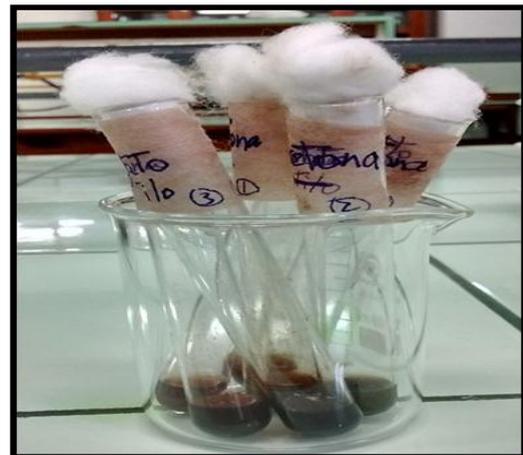


Figura N° 46: Hidrolisis del extracto de acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N° 47: Residuo y sobrenadante del extracto de acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N° 48: Lavado del residuo en $\text{CH}_3 (\text{CO}) \text{CH}_3: \text{H}_2\text{O} : \text{HCl}_{(c)}$



Figura N° 49: Lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a 538 nm.



Figura N° 50: Análisis cualitativo en espectroscopia IR en el extracto de acetona y acetato de etilo del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

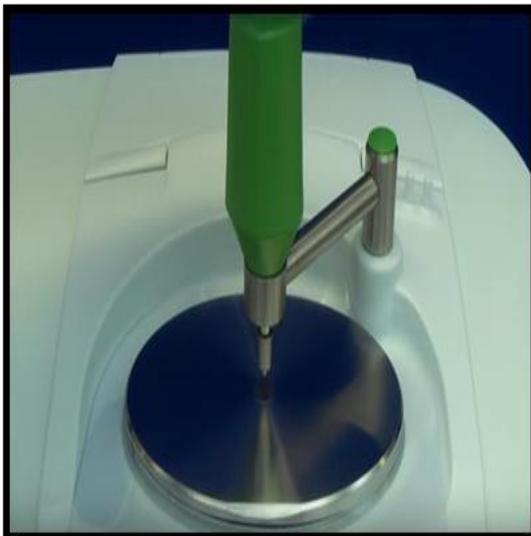


Figura N° 51: Cristal ATR transmisor de la espectroscopia IR.



Figura N° 52: Control de microorganismos específicos en las muestras.



Figura N° 53: Selección de colonias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Figura N° 54: Selección de colonias *Escherichia coli* ATCC 25922

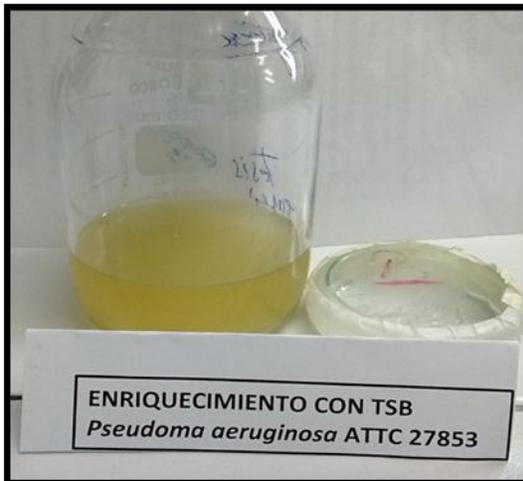


Figura N° 55: Selección de colonias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

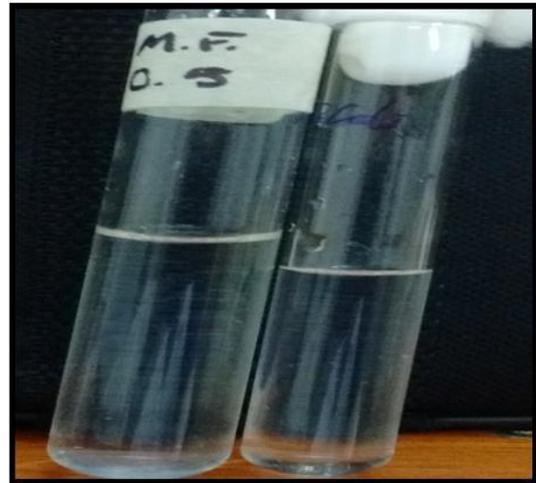


Figura N° 56: Preparación del inculo con la escala de McFarland .



Figura N° 57: Toma de alícuota bacteriana



Figura N° 58: Solución stock del extracto en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L. «granada»

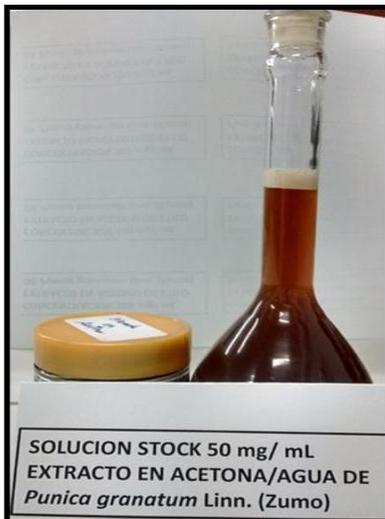


Figura N° 59:
Solución stock del
extracto en acetona
del zumo de *Punica
granatum* L.
«granada»



Figura N° 60: Preparación de las concentraciones en los
extractos en acetona del zumo de *Punica granatum* L.
«granada»



Figura N° 61: Preparación de las concentraciones en los
extractos en acetato de etilo del zumo de *Punica granatum* L.
«granada»



Figura N° 62: Preparación de los discos de sensibilidad impregnados con los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada»

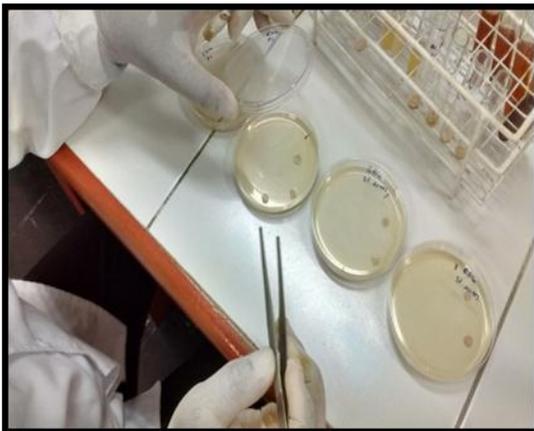


Figura N° 63: Aplicación de los discos de sensibilidad preparados con los extractos en acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L.* «granada»



Figura N° 64: Vista completa de las placas con los discos de sensibilidad.

ANEXOS

Anexo N° 1: Constancia de clasificación de *Punica granatum* L. "granada"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Carretera del Perú, DHCANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 90 -USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Fruto y hoja), recibida de **Jaquely ESCOBAR FIGUEROA**; ha sido estudiada y clasificada como: ***Punica granatum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: PUNICACEAE

GENERO: *Punica*

ESPECIE: *Punica granatum* L.

Nombre vulgar: "Granada"
Determinado por Dra. Haydee Montoya

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 05 de mayo 2014



Haydee Montoya
Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Anexo N° 2: Preparación de medios de cultivo



Anexo N° 3: Manejo del espectroscopio infrarrojo IR

