



Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* "in vitro"

Effect of the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* on "in vitro" *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* viability

Ruby Bernal Sepúlveda¹, Icela Rodríguez Haro² y Marco Salazar Castillo³

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. ³Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. UNT.

RESUMEN

Se determinó el efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto de *Punica granatum* cultivada en Chao (La Libertad, Perú) sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*. Se trabajó con cinco concentraciones del extracto (500; 250; 125; 62.5, y 31.25 mg/ mL) y Gentamicina como control positivo. El efecto se determinó siguiendo lo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): sembrando un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland en placas con Agar Mueller Hinton por la técnica placa vertida y a su vez se realizó la Concentración Mínima Bactericida a partir de las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 y 0.98 mg/mL, respectivamente, para *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa*. Se observó que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico aumenta porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana en el rango de 31,25 a 500 mg/mL. También se demostró que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *P. granatum*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Punica granatum*, Extracto hidroalcohólico, Actividad antimicrobiana

ABSTRACT

The effect of the concentration of the hydroalcoholic extract of the fruit peel of *Punica granatum* cultivated Chao (La Libertad, Peru) on the viability of *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* was determined. We worked with five concentrations of the extract (500, 250, 125, 62.5, and 31.25 mg / mL) and gentamicin as a positive control. The effect was determined following the proposal of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): planting a standardized pattern Nephelometer turbidity of 0.5 Mac Farland on Mueller Hinton Agar plates with the poured plate technique and in turn inoculum Minimum Bactericidal Concentration was based concentrations: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 and 0.98 mg / mL, respectively, for *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa*. It was observed that as the concentration increases the hydroalcoholic extract or percent inhibition relative index of antibacterial activity in the range of 31.25 to 500 mg / mL. It was also shown that the Minimum Bactericidal Concentration (CMB) for *S. aureus* and *S. aureus* ATCC 25923 is from the concentration 7.88 mg / mL, whereas *P. aeruginosa* is from 31.25 mg / mL of the extract hydroalcoholic shells ripe fruits of *P. granatum*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Punica granatum*, hydroalcoholic extract, Antimicrobial Activity

INTRODUCCIÓN

Las infecciones comunitarias y nosocomiales siguen constituyendo una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, a ello se ha sumado la aparición de nuevas enfermedades de origen bacteriano, viral y micótico; tales como, las ocasionadas por *Legionella pneumophila*, *Campylobacter*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, estafilococo dorado meticilinorresistente (MRSA), virus influenza H5N1 de la gripe aviar de humanos, entre otros¹.

Staphylococcus aureus es un patógeno que causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos, su frecuencia es alta y se estima en 28,4 casos por cada 100.000 personas de todas las edades^{2,3,4}; causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas (como osteomielitis y endocarditis), infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales^{5,6}. Aproximadamente el 15 % de los adultos sanos son portadores de *S. aureus* en la nasofaringe, aunque se ha descrito una incidencia más elevada en los pacientes hospitalizados, el personal sanitario, los sujetos aquejados de enfermedades eccematosas de la piel y aquellos que utilizan frecuentemente agujas, ya sea de forma ilegal (por ejemplo drogodependientes) o por motivo médicos (por ejemplo pacientes con diabetes insulino dependiente)⁷.

De amplia distribución en suelo, materia orgánica en descomposición, vegetales, agua y ambientes hospitalarios, *Pseudomonas aeruginosa* es otro agente etiológico de suma importancia ya que puede provocar infecciones graves como: bacteriemias, neumonía, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario, infecciones cutáneas en pacientes quemados e infecciones gastrointestinales^{8,9}. Son llamadas bacterias oportunistas y son causantes más frecuentes de las infecciones nosocomiales, debido que presentan resistencia, aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente¹⁰. Son múltiples los factores que originan este problema; sin embargo, el factor más importante es probablemente el uso excesivo e inapropiado de antibióticos a nivel nosocomial ante el temor de estar ante una cepa resistente y por haberse incrementado el número de pacientes inmunocomprometidos, con enfermedades críticas, pacientes debilitados o ancianos¹¹. La aparición de cepas resistentes trae como consecuencia el incremento en la morbimortalidad, la disminución del número de antimicrobianos disponible para el tratamiento de las infecciones, prolongación de la estadía hospitalaria y aumento del gasto hospitalario, lo que hace necesario la búsqueda de nuevas opciones o alternativas terapéuticas^{12,13}.

Frente a ello, cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental, a tal punto que el 80 % de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, utiliza a las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus enfermedades¹⁴. Un gran porcentaje de los “principios activos” están presentes en extractos y en aceites esenciales que pueden obtenerse a partir de hojas, bulbos, rizomas y frutos y contienen: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, gomas, resinas y taninos, etc., que pueden ser letales para las células microbianas (bacterias, levaduras y mohos) o simplemente servir como inhibidores de sus actividades metabólicas^{15,16,17,18}. Así, se ha demostrado la actividad antibacteriana de los extractos de frutas de *Citrus reticulata*, *C. paradise*, *Mangifera indica*, *C. sinensis*, *Psidium guajava*, *C. grandis* y *C. aurantifolia* frente a cepas Gram negativas y Gram positivas de bacterias^{20,21,22}.

Originaria del medio oriente y de la región mediterránea, *Punica granatum* (granada) es una planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas^{23,24}, es cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo²⁵, en Perú se cultiva en Ica, Lima, La libertad, Tacna, Moquegua y Lambayeque^{26,27,28}. 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 cascarras 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^{29,30}.

Considerando que los productos naturales constituyen una alternativa para las industrias químicas y farmacéuticas para obtener medicamentos que puedan combatir diversas enfermedades infecciosas y dado que nuestro país posee una variedad de plantas medicinales, entre ellas *P. granatum*, se propuso la presente investigación para determinar el efecto, a través del índice antibacteriana y la concentración mínima bactericida, del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC25932 y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio.

- Frutos maduros de *Púnica granatum* L. “granada”, recolectados en el Distrito de Chao, Provincia de Virú, Departamento de la Libertad, Perú.
- Cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* proporcionados por el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú).

Obtención del extracto hidroalcohólico de la cáscara de los frutos maduros de *Púnica granatum*

Las plántulas, ramas, flores y frutos de *P. granatum* recolectadas fueron identificadas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo. Se seleccionaron aproximadamente 2 Kg de frutos maduros, los que fueron lavados con agua destilada, luego se retiró la materia comestible a fin de obtener la cáscara, la cual fue cortada en trozos y secada en estufa, a una temperatura de 40 ° C. Los trozos fueron pulverizados en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo fino por tamizaje³¹.

El extracto hidroalcohólico se obtuvo a partir de 150g del polvo fino obtenido, mediante el método de maceración³² en 500 mL de alcohol etílico al 70% durante 8 días en oscuridad, con agitación diaria (5 minutos). Al término de este tiempo se realizó la extracción en caliente por reflujo continuo por 2 horas, luego se filtró en caliente para obtener un líquido que fue llevado a sequedad en rotavapor; obteniéndose un residuo que constituyó el extracto hidroalcohólico; a su vez se le protegió de la luz con papel de aluminio y se guardó en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso.

Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico.

Se tomó 3g de extracto y se disolvió en 3mL de agua destilada estéril, a partir de esta solución se realizaron diluciones decrecientes (factor de dilución 2) establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), a fin de obtener las concentraciones de trabajo, que fueron 500, 250, 125, 62.5, 31.25 mg/ mL respectivamente^{33,34,35}.

Activación de los cultivos y pruebas de pureza para *S. aureus*

Los cultivos de *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* se sembraron en tubos de ensayo conteniendo Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)³⁶ para su reactivación, y se incubaron a 37 °C por 20-24 horas. Las pruebas de pureza usadas fueron:

- Crecimiento en agar Baird-Parker.

A partir de los cultivos reactivado se realizaron siembras en Agar Baird-Parker³⁶ para comprobar la pureza y se incubaron a 37 °C por 48 horas, luego de lo cual se obtuvo el crecimiento de colonias negras, por la reducción del potasio telurito a telurio, rodeadas de un halo de transparencia debido a la actividad lecitinasa. Se tomaron colonias aisladas y se sembró en Agar nutritivo inclinado.

- Prueba de la coagulasa.

A los cultivos de *S. aureus* obtenidos se les realizó la prueba de la coagulasa³⁷, se agregó 0.5 mL de plasma de conejo y 50µL de cultivos sembrados previamente en caldo BHI de 18 horas de incubación se hizo una suspensión y se llevó a incubar a 37°C. Se observó cada media hora durante las cuatro primeras horas, la formación del coágulo que indica una prueba positiva.

- Tinción de Gram.

A los cultivos evaluados se les tiñó según la técnica de Gram³⁸, observándose células en forma de cocos coloreadas de color azul oscuro o violeta con su respectiva agrupación característica racimos.

Pruebas de pureza para *P. aeruginosa*.

- Crecimiento en Agar Glutamato.

A partir de los cultivos reactivados en caldo BHI se realizaron siembras en Agar glutamato³⁶ para comprobar la pureza y se incubaron a 37 °C por 48 horas, luego de lo cual se obtuvo el crecimiento de

colonias grandes mucoides o secas de color verde oscuro. Se tomaron colonias aisladas y se sembró en Agar nutritivo inclinado.

- Prueba de la oxidasa modificada.

Se utilizan tiras de papel de filtro impregnados con dicloruro de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo para oxidasa)⁶ en dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO hace que las células sean permeables al reactivo. Se extrae una colonia del medio de crecimiento y se frota en las tiras de papel. La aparición de un color azul púrpura dentro de los 30 segundos constituye una prueba positiva.

- Tinción de Gram.

A los cultivos evaluados se les tiñó según la técnica de Gram, observándose células coloreadas de color rosado en forma de bacilo (Gram negativas)³⁸.

Preparación y estandarización del inóculo bacteriano.

De la placa de cultivo en crecimiento activo (incubado a 37 OC durante 18 horas) con la ayuda de la asa bacteriológica se tomará de 2 a 4 colonias y se inoculó en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la densidad similar a la turbidez del tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland (1,5 108 cel/mL)³¹.

Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por el NCCLS, por el método de siembra de los microorganismos en medios de cultivo sólido conteniendo el extracto en estudio³³: en una caja Petri para cada bacteria con un inóculo (1.5x108 cel/mL), determinado por la escala de Mac Farland, se sembró por la técnica placa vertida conteniendo 20 mL de agar Mueller Hinton (aMH) a un pH entre 7.2 a 7.4; después, se abrió cinco pozos con un sacabocados de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, se colocó en cada pozo 30µL³¹ de cada uno de las concentraciones del extracto hidroalcohólico determinadas. Se mantuvo las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, se incubo a 37°C por 18 a 24 horas³⁹.

En una placa independiente después de sembrar en camada¹⁶ se perforó un pozo para el control negativo y en otra placa se colocó el control positivo utilizando disco estándar de gentamicina incubándose a 37°C por 18 horas a 24 horas. Se evaluó el crecimiento de los microorganismos alrededor de cada pozo. La actividad antibacteriana se determinó midiendo tres diámetros de cada halo de inhibición y se tomó como resultado el valor promedio de estas mediciones para calcular el porcentaje de inhibición relativa o índice de actividad antibacteriana, aplicando la siguiente fórmula: Halo del control positivo= Gentamicina, Halo del control negativo = Agua destilada estéril; se realizó controles de viabilidad de cada una de las cepas bacterianas, esterilidad de los extractos y del agua destilada estéril. La prueba se realizó para el extracto y cada una de las bacterias; todos los ensayos se realizaran por duplicado³¹.

Determinación de la Concentración Mínima bactericida.

Se trabajó con las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 mg/mL, respectivamente, contenidos en caldo Mueller Hinton (cMH), luego se le agrego 1000 uL de inóculo (1x106cel/mL). Se incubaron a 37oC por 18 horas, y se observó la presencia de crecimiento bacteriano por turbidez. Para determinar el crecimiento bacteriano se sembró una asada en aMH, se incubó 24 horas. (Anexo 20, 21 y 22) Se consideró que la concentración mínima bactericida correspondió a la mínima dilución del extracto hasta el cual no hubo crecimiento bacteriano visible. Se añadió tres sistemas adicionales: control positivo (cMH, extracto + bacteria), control negativo (cMH + bacteria) y uno para el control del extracto (para verificar que el extracto este estéril)³⁴.

Análisis de datos.

La asociación estadística entre el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto fueron procesados mediante la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA), utilizando el paquete estadístico SPSS v. 20.

RESULTADOS

Se encontró que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *P. granatum* el porcentaje de inhibición aumenta y la cepa *S. aureus* tiene mayor porcentaje de inhibición ($p < 0,05$) que *S. aureus* ATCC 25923, mientras que *P. aeruginosa* es la que menos porcentaje de inhibición presenta (Fig. 1).

También se encontró que la concentración mínima bactericida de *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico: 112.81 102.72 96.53 90.29 75.88 86.67 80.13 71.96 61.88 52.27 85.48 70.47 61.6 52.57 41.57 0 20 40 60 80 100 120 500 mg/mL 250 mg/mL 125 mg/mL 62,5 mg/mL 31,25 mg/mL INHIBICIÓN (%) CONCENTRACIONES *S. aureus*, *S.aureus* ATCC 25923 *P. aeruginosa* (Tablas 1, 2 y 3).

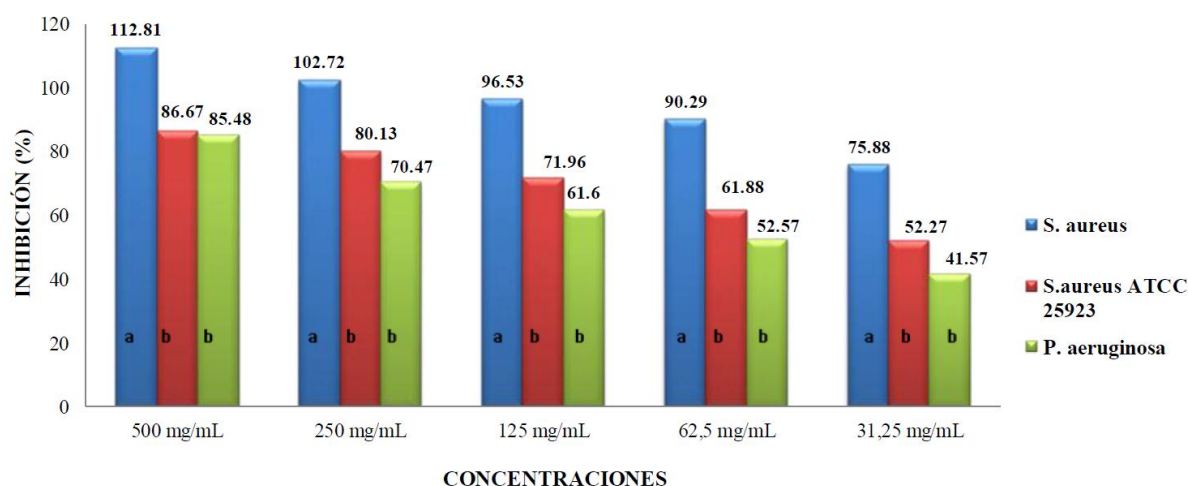


Fig. 1. Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum L.* (granada) sobre la cepa de *S.aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*. **a:** $p < 0.05$; **b:** $p > 0.0$

Tabla 1. Concentración mínima bactericida de *Staphylococcus aureus*, a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum L.* "granada".

| Concentración Mínima Bactericida de <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Concentración del extracto hidroalcohólico de las cáscaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml) | | | | | | | | | | |
| Ensayos | 62.5 (1) | 31.25 (2) | 15.75 (3) | 7.88 (4) | 3.94 (5) | 1.97 (6) | 0.98 (7) | Control positivo* (CP) | Control negativo** (CN) | Control del Extracto*** (C.E) |
| 1 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 2 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 3 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 4 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 5 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 6 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 7 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |

* caldo MH, extracto y bacteria;

** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** caldo Mueller Hinton más el extracto

(+): Crecimiento

(-): No crecimiento.

Tabla 2. Concentración mínima bactericida de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cascaras de frutos maduros de de *Punica granatum L.* "granada".

| Concentración Mínima Bactericida de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Concentración del extracto hidroalcohólico de las cascaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml) | | | | | | | | | | |
| Ensayos | 62.5 | 31.25 | 15.75 | 7.88 | 3.94 | 1.97 | 0.98 | Control positivo* | Control negativo** | Control del Extracto*** |
| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (CP) | (CN) | (C.E) |
| 1 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 2 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 3 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 4 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 5 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 6 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| 7 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |

* caldo MH, extracto y bacteria ** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** Caldo Mueller Hinton más el extracto

(+): Crecimiento

(-): no crecimiento.

Tabla 3. Concentración mínima bactericida de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cascaras de frutos maduros de de *Punica granatum L.* "granada".

| Concentración Mínima Bactericida de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Concentración del extracto hidroalcohólico de las cascaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml) | | | | | | | | | | |
| Ensayos | 62.5 | 31.25 | 15.75 | 7.88 | 3.94 | 1.97 | 0.98 | Control positivo* | Control negativo** | Control del Extracto*** |
| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (CP) | (CN) | (C.E) |
| 1 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 2 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 3 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 4 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 5 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 6 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 7 | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - |

* caldo MH, extracto y bacteria ** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** caldo Mueller Hinton más el extracto

(+):crecimiento

(-): no crecimiento.

DISCUSIÓN

Por muchos años, la medicina ha dependido del uso exclusivo de hojas, flores y cortezas de las plantas; solo recientemente se han generado estudios referentes al uso medicinal de los frutos y las cascaras de estos²⁰. Los frutos maduros de *P. granatum* constan de tres partes, las semillas, el jugo y el pericarpio incluyendo las membranas internas²⁴ en la medicina tradicional se le usa para la colitis, diarreas, flatulencias, tratamientos de las inflamaciones de las encías , garganta y su propiedad fundamental es la de vermífuga²⁸.

Debido a estos inicios se tomó un interés en el fruto maduro de *P. granatum* especialmente por la cáscara. En relación al efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de cáscaras del fruto maduro de *Punica granatum L.* sobre la cepa *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* en la Fig. 1 se puede observar que hay un porcentaje de inhibición o índice de actividad antibacteriana afectando la viabilidad de dichas cepas. Esto se debe que al extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum L.*, que viene hacer una combinación de (alcohol y agua) además de ser menos costoso y tóxico que otros solventes orgánico, permite extraer metabolitos con polaridad intermedia y alta⁴⁰ pudiendo explicarse sobre la base de la diferencia de polaridades entre ambos solventes lo cual, a su vez implica una diferencia en las naturalezas químicas y concentraciones de los principios activos que cada uno de ellos es capaz de extraer de la cáscara del fruto cuando se obtienen los extractos; a la vez que el agua posee una polaridad considerablemente mayor que el alcohol lo cual determina un mayor poder de extracción para compuestos polares como los taninos y otros compuestos con funciones químicas de naturaleza oxidante.

Debido a esto el extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *P. granatum* presenta principios activos como los taninos, flavonoides, antocianinas, saponinas, principios amargos y astringentes entre otros que se puede corroborar con trabajos realizados por Peña en el 2008 donde realizo la estandarización y tamizaje fitoquímica de extractos de frutos de *P. granatum* y a su vez se determinó de forma cualitativa la presencias de algunos de estos componentes en el extracto de estudio.

Los taninos son sustancias complejas que se presentan como mezclas de polifenoles difíciles de separar. Los taninos pueden ser tóxicos a hongos filamentosos, levaduras y bacterias⁴¹. Por lo tanto, existen tres hipótesis en cuanto a su mecanismo de acción: la inhibición de enzimas de microorganismos, ligándose como sustrato a esas enzimas; a través de su acción sobre la membrana celular, modificando su metabolismo, y por la complementación de los taninos en los iones metálicos, disminuyendo estos iones esenciales para el metabolismo de los microorganismos. Además los taninos precipitan proteínas formando una capa protectora sobre la mucosa y piel inflamada disminuyendo así el proceso inflamatorio⁴². Además se clasifican en taninos hidrolizables y condensados, lo cual los taninos hidrolizables están constituido por unidades de ácido elálgico que es un compuesto estable y con demostradas propiedades benéficas para la salud humana incluyendo efectos antivirales, antibacterianos, y antioxidantes⁴³.

Los flavonoides son estructura fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo; tiene la capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los poli péptidos de la pared celular y sobre enzimas unidas a las membranas⁴⁴, esto explicaría el mecanismo de acción de varios de sus efectos farmacológicos. Dentro de los acciones biológicas que se les atribuyen a los flavonoides se encuentra actividades antibacterianas, anti fúngicas, antivirales y antiparasitarias²⁰. Las saponinas provocan una gran disrupción de membranas, con efecto de lisis, no activos sobre todo a pH ácido⁴⁵.

En las Fig. 1 se presenta el porcentaje de inhibición o índice de actividad antibacteriana a la concentración (500 mg/ml); se observa que *S. aureus* presenta un porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana de (112,81%) en comparación a *S. aureus* ATCC 25923 que presenta (86.67%) y *P. aeruginosa* que presenta (85.48%), observándose que el mayor porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana lo presenta *S. aureus* con una diferencia significativa con respecto a las otras cepas a: $p < 0.05$. Se puede inferir que la actividad antibacteriana que presenta el extracto hidroalcohólico de cáscaras de la granada se le puede atribuir la presencia de sus metabolitos, siendo mucho más efectivo contra las bacterias Gram positivas que gram negativas; Esto se debe a que hay una mayor sensibilidad de las bacterias gram positivas que las gram negativas podría ser atribuido a diferencia en sus constituyentes en la membrana celular y su disposición^{46,47}. Las bacterias Gram positivas contienen una capa externa de peptidoglucano que es una barrera de permeabilidad efectiva por otro lado las bacterias Gram negativa como presenta una resistencia debido a la membrana externa fosfolipídicas que presenta componente lipolisacáridos estructurales que hacen impermeables a los solutos lipófilicos y las porinas q constituyen una barrera selectiva a los solutos hidrofílicos⁴⁷ y además que los compuestos fenólicos desnaturalizan enzimas, pero también pueden unirse a sustratos tales como minerales, vitaminas y carbohidratos impidiendo que estén disponibles para los microorganismos⁴⁸.

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de frutos maduros de la granada tiene un efecto bactericida sobre las tres poblaciones, lo cual se evidencia en la ausencia de crecimiento de esas bacterias; se determinó que a partir de las concentraciones 7.88mg/ml la falta de crecimiento es total y que a las concentraciones de 3.94mg/ml se aprecia crecimiento en los ensayos para ambos *S. aureus*. Con respecto a *P. aeruginosa* el extracto tiene un efecto bactericida a la concentración de 31.25 mg/mL y a partir de la concentración 15.75mg/ml se observa crecimiento en placa. En general la actividad antimicrobiana se le atribuye a los principios activos que tiene este extracto que ya ha sido mencionado al inicio.

CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum* L. afecta la viabilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*.
- El porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana está en relación directa a la concentración del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* L.
- Que el extracto hidroalcohólico tuvo mejor efecto para *Staphylococcus aureus* presentando estadísticamente diferencia significativa con respecto a las otras cepas evaluadas.
- La concentración mínima bactericida, tanto para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, es de 7.88mg/mL del extracto hidroalcohólico.
- La concentración mínima bactericida para *Pseudomonas aeruginosa* es de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez M, Batlle M, Verdera J, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58(3):207-11.
2. Lebeque Y, Morris H, Calás N. Infecciones Nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Cubana Med.2006; 45(1).
3. Paganini H, Verdaguer V, Rodríguez A, Della P, et al. M. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad de niños de la Argentina. Arch Argent Pediatr.2006; 104(4):293-298.
4. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomédica.2006; 17:287-305.
5. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico.5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
6. Sandoval C, Moreno C, Abarca K. Sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* en un lactante previamente sano. Rev Chil Infect.2011; 28(6):592-596.
7. Zambrano A, Herrera N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas la *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del hospital regional Dr. Leonardo Guzmán de Anfogasta, Chile Rev Chil Infect.2004; 21(2):117-124.
8. Cabrera C, Fabián R, Zuñiga A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Rev Colomb Med.2007; 38(2):149-158.
9. Avellaneda Y, Pecho E. Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el centro médico naval de Enero a Diciembre del 2000. (Tesis).Lima .Universidad Mayor de San Marco: 2002.
10. Zampini I,Cudmani N, Isla M.Actividad antimicrobiana de plantas medicinales sobre bacterias antibiótico-resistentes. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.Universidad Nacional de Tucumán.Argentina. Rev Argentina 2007; 41.
11. Mendoza C, Moreno M, Weil M, Elango F. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmvora* Butl y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz).Tierra Tropical. 2007; 3(1)81-89.
12. Pérez J; Isaza G, Acosta S. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. Biosalud.2007;(6):59-68.
13. Madaleno I .Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Cuadernos geográficos. Universidad de Granada, España 2007; 61-95.
14. Muñoz M. Efecto del extracto Etanólico de hojas *Passiflora foetida* “Granadilla de Culebra” sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tify* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo.

15. Benítez J, Díaz R, López J, Gajardo S, Kusch F, Rojas M. Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de pica. *Biofarvo*.2011; 19(1):1-7.
16. Cuellar O, Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. Universidad Tecnológica de Pereira.2010
17. Moreno M, Belén D, Sánchez M, Viloria M, García D. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. *Venezuela* (2004);29(9):532-538
18. Sánchez A. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. *Rev. Cubana Plant. Med. Cuba* 2005; 10 (2).
19. Gorena T, Sepulveda E, Sáenz C. Compuestos bioactivos y actividad antioxidantes de frutos de “granado” *Punica granatum* l. La alimentación Latinoamericana. Chile 2010; N O285:48-52.
20. Peña B, Morejón Z, García A, Morón F. Estandarización y Tamizaje fitoquímica de extractos de frutos de *Punica granatum* L. *Rev. Cubana Plant Med.*2008; 13(4).
21. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramirez R. *Plantas Medicinales del Perú*.1ed. Perú. Asamblea Nacional de Rectores; 2011.
22. Ríos ADA. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería.(Tesis Doctoral).México. Escuela Superior de Medicina.2006.
23. Álvarez M, Isaza G, Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (*Clavo de laguna*).*Rev Biosalud*.2005;(14):46-55.
24. Lock O. Investigación Fotoquímica- método en el estudio de productos naturales. 3era ed. Lima: Editorial pontificia; universidad católica del Perú; 1994.
25. Corzo a, Bravo E, Serrano F, Vtuone M. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatogenas. *Rev Quebrado*.2009; 17(1,2).106-114.
26. Malbrán C. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas en humanos. Buenos Aires. 2001. (42).
27. Bucay L, Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (*Hybanthus parviflorus*). (Tesis Doctoral)9. Riobamba: Escuela superior politecnica de Chimborazo.2009.
28. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3° ed. Edit. Medica panamericana. Argentina. 2003.
29. Edwin E, Sheeja E, Toppo E, Tiwari V, Dutt KR. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy) *Ars Pharm* .2007; 48 (2): 135-144.
30. Cabrera H, Morón F, Amador M.C.V. Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012;17(3):268-278.
31. De la cruz R, Aguilera A, Prado A. Biodegradación Microbiana de Elagitaninos. *Biotechnologia*. 2011; 15(3).
32. Araujo J, Salas R. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Universidad científica del sur. Perú. 2008.
33. Hernández R. Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. *Rev Cubana Med Milit* 1997; 26(1):55-62.
34. Samara N, Benites N, Cabezas F. Actividad Antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del cauca. *Biotechnologia en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011; 9(1): 8-16.
35. Kadi H, Moussaoui A , Benmehdi H, Lazouni H, Benayahia A, Nahal bouderberba N. Antibacterial activity of ethanolic and aqueousextracts of *Punica granatum* L. bark. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 1(10): 180-182.
36. Parseh H, Hassanpour S, Emam Z, Shahab A. Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) as a Tannin rich Fruit: a review. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture. Iran.2012.