

Desarrollo de un proceso tecnológico a escala de laboratorio para la extracción de polifenoles totales del fruto de la *Punica granatum* L

Development of a lab-scale technological process for total polyphenol extraction from *Punica granatum* L. fruit

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Chanfrau, Téc. María Lidia González, Téc. Marilyn López Armas

Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Punica granatum* L., (Punicaceae) es una especie conocida en Cuba como granada. Algunos fitocomponentes presentes en la fruta muestran una fuerte actividad antioxidante. En la medicina tradicional esta planta es empleada en el tratamiento de infecciones parasitarias, diarreas y disentería, así como en el tratamiento de asma, catarro, fiebre, inflamaciones y otras. En años recientes, la actividad biológica de los polifenoles presentes en la fruta de esta especie, ha despertado el interés de los investigadores y la industria farmacéutica.

Objetivo: establecer un proceso a escala de laboratorio que permita extraer los polifenoles totales de la fruta.

Métodos: se aplicó un proceso de maceración para la extracción de los polifenoles de la fruta y se realizó la optimización de los parámetros mediante diseños experimentales. Se evaluaron las variables independientes: tiempo de extracción, relación droga-menstruo y concentración alcohólica.

Resultados: las tres variables presentaron una influencia significativa sobre el proceso de extracción de polifenoles.

Conclusiones: en las condiciones de trabajo establecidas, la extracción óptima es la siguiente: tiempo de extracción de 72 h, relación droga-menstruo de 1:20 y concentración alcohólica del 50 % (v/v).

Palabras clave: *Punica granatum* L., maceración, polifenoles, tiempo de extracción, relación droga-menstruo.

ABSTRACT

Introduction: *Punica granatum* L., (Punicaceae) is one species known in Cuba as granate. Some phytochemicals of the fruit show strong antioxidant activity. This plant is used in the traditional herb medicine to treat parasitic infections, diarrheas and dysentery, asthma, flu, fever, inflammation and other illnesses. In recent years, the biological activity of phenols present in the fruit has aroused the interest of both researchers and the drug industry.

Objective: to set a lab-scale process that makes it possible to extract total phenols from the fruit.

Methods: a maceration process was used to extract phenols from the fruit and the parameters were optimized through experimental designs. The independent variables were time of extraction, drug/menstruum ratio and alcohol concentration.

Results: the three variables had significant influences over the process of extraction of polyphenols.

Conclusions: under the set working conditions, the optimal extraction is as follows: time of extraction of 72 hours, drug/menstruum ratio of 1:20 and alcohol concentration of 50 % (v/v).

Key words: *Punica granatum* L., maceration, polyphenols, time of extraction, drug/menstruum ratio.

INTRODUCCIÓN

El estudio y desarrollo de procesos tecnológicos para la obtención de materias primas a partir de productos naturales tiene una importancia vital dentro del desarrollo de las industrias alimenticias y farmacéuticas a nivel internacional. El proceso de extracción de principios activos a partir de las plantas medicinales es uno de los pasos críticos en el desarrollo de productos naturales y su uso comercial.¹

La extracción es un proceso que envuelve la separación de la porción activa de interés de la porción inactiva mediante el empleo de un componente inerte selectivo (disolvente). Dentro de los procesos tradicionales que se emplean con esta finalidad, se encuentra la maceración, proceso en el cual la droga es colocada en contacto con un disolvente entre 24 y 72 h según el procedimiento desarrollado, a temperatura ambiental y con agitación esporádica, para que la materia soluble sea disuelta. Este proceso puede estar influenciado por el menstruo utilizado, el tiempo de maceración, la relación droga-menstruo, tamaño de partículas y la temperatura entre otros.²⁻⁵

Punica granatum L., perteneciente a la familia Punicaceae y popularmente conocida como granada, es una planta cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo y con múltiples propiedades terapéuticas (antiparasitaria, antiinflamatoria, anticatarral) de arraigado uso en la medicina tradicional de Cuba y de otros países.^{6,7} El fruto es rico en vitamina C, antocianinas, tiamina y riboflavina, así como polifenoles del tipo punicalagin y ácido elárgico, a los cuales se les atribuyen propiedades astringente, antimicrobiana, antifúngica e inhibitoria enzimática; se ha informado valores de polifenoles totales extraídos en medio acuoso y en medio etanólico de 45,8 % y 42,3 % respectivamente.⁸⁻¹⁰

En Cuba, los estudios relacionados con esta planta han estado encaminados fundamentalmente a evaluar la composición fitoquímica de la fruta y extractos obtenidos a partir de esta,⁸ la seguridad toxicológica de estos extractos,¹¹ y desde el punto de vista farmacológico a demostrar sus propiedades como antiviral¹²⁻¹⁴ y como modulador del daño inducido al ADN por un agente oxidante como el H₂O₂.¹⁵

Para ello se emplearon extractos hidroalcohólicos al 50 % v/v, elaborado por maceración de la fruta madura, en una proporción de 1:3 (w/v), durante 15 días según proceso estandarizado descrito por Iglesia.¹⁶ Este proceso tiene entre sus principales deficiencias el tiempo empleado para la maceración, lo que dificultaría su escalado a nivel industrial, dada la afectación económica que provoca un proceso que requiera tanto tiempo para su extracción.

Como parte del proyecto ramal Desarrollo de medicamentos con actividad antinfluenza a partir de extractos de frutos de *Punica granatum* L., se han comenzado a realizar estudios tecnológicos que permitan en un tiempo menor la obtención de una materia prima con calidad farmacéutica, rica en polifenoles, a partir de la fruta de esta planta. El objetivo de este trabajo fue el de establecer un proceso a escala de laboratorio que permita extraer los polifenoles totales de la fruta y a la vez permita escalar dicho proceso en las condiciones con que cuenta Cuba.

MÉTODOS

Material vegetal. Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron frutos de *Punica granatum* (madura) provenientes de la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomas Roig" en la provincia de Artemisa, colectados entre febrero y abril de 2011. Estos fueron lavados con abundante agua y conservados en temperatura de congelación hasta el momento de su utilización. Antes de emplearse el material vegetal, se dejó a que alcanzara la temperatura ambiental y se molinó en un molino de disco (CEMOTEC, Suecia) hasta alcanzar un granulometría menor de 200 µm.

Diseños experimentales. Se estudió la influencia del tiempo de maceración, concentración del contenido alcohólico del menstuo y relación droga-menstuo sobre el contenido de sólidos totales, pH del extracto y contenido de polifenoles totales. Para ello se realizaron los siguientes diseños experimentales:

Estudio de la influencia del tiempo de maceración, concentración del contenido alcohólico del menstuo y relación droga-menstuo. Se estableció un diseño factorial 2³ con un punto central (Statgraphics plus, versión 5.1). La variable X₁ se definió como tiempo de maceración, X₂ como concentración del contenido alcohólico del menstuo y X₃ como relación droga-menstuo. Las variables respuestas fueron el contenido de sólidos totales (ST), pH y contenido de polifenoles totales. Se realizaron nueve experimentos aleatorizados, replicados tres veces cada uno, para un volumen de 100 mL según lo descrito en la tabla 1.

Estudio de la influencia del tiempo de maceración y la concentración del contenido alcohólico del menstuo. A partir de los resultados alcanzados en el primer diseño, se realizó un diseño experimental de superficie respuesta 3² aleatorizado (Statgraphics plus, versión 5.1, EUA), con el objetivo de profundizar en el estudio de la influencia del tiempo de maceración y la concentración del contenido alcohólico del menstuo. Se realizaron nueve experimentos aleatorizados, replicados tres veces cada uno, para un volumen de 100 mL y una relación droga-menstuo de 1:20; para lo cual se mantuvieron las condiciones y niveles descritos en la tabla 2. Se establecieron como variables respuestas las mismas descritas con anterioridad.

Tabla 1. Diseño experimental 2³ para estudiar la influencia del tiempo de maceración, concentración alcohólica del mensturo y relación droga-mensturo

Niveles estudiados en el diseño			
Variables	Nivel bajo	Nivel alto	
Tiempo de maceración (h)	24	72	
Concentración alcohólica (%)	30	70	
Relación droga-mensturo (m/v)	5:1	1:20	
Matriz experimental			
Experimento	Tiempo de maceración (h)	Concentración contenido alcohólico en el mensturo (%)	Relación droga-mensturo (m/v)
1	48	70	12,5
2	72	50	20
3	24	30	5
4	48	30	20
5	48	50	5
6	24	30	12,5
7	24	50	12,5
8	72	70	5
9	24	70	20

Tabla 2. Diseño experimental 3² para estudiar la influencia del tiempo de maceración y la concentración alcohólica del mensturo

Niveles estudiados en el diseño			
Variables	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Tiempo de maceración (h)	24	48	72
Concentración alcohólica (%)	30	50	70
Matriz experimental			
Experimento	Tiempo de maceración (h)	Concentración alcohólica (%)	
1	24	50	
2	48	70	
3	72	50	
4	24	30	
5	48	50	
6	48	30	
7	24	70	
8	72	30	
9	72	70	

Métodos de ensayos. Las determinaciones de sólidos totales y pH se realizaron según lo establecido por la NRSP 312.¹⁷ Mientras que las determinaciones del contenido de polifenoles totales se aplicó la siguiente metodología:

Se tomó exactamente 2 mL del extracto y se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL, y se llevó a volumen con agua destilada. De esta solución se tomó 2 mL y se trasvasó a matraces aforados de 25 mL de capacidad. Se adicionó 2 mL de agua destilada, 2 mL de solución desarrolladora de color (se mezcló 10 g de tungstato de sodio con 0,2 g de ácido fosfomolibdico y se llevó a un balón de reflujo. Se adicionó 5 mL de ácido fosfórico al 85 % en 75 mL de agua destilada y se reflujo por 2 h en plancha de calentamiento. Transcurrido ese tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL; se llevó a volumen con agua destilada), se agitó y se dejó en reposo por 5 min.

Transcurrido ese tiempo se adicionó 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó y se llevó a volumen con agua destilada. Se mezcló y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm antes de transcurrir 10 minutos, para lo cual se empleó como blanco la solución preparada con agua.

Como estándar de referencia se utilizó ácido tánico. Para ello se preparó una curva de calibración a concentraciones que oscilaban entre 5 µg/mL y 50 µg/mL a partir de una solución madre de concentración de 125 µg/mL. El volumen correspondiente a cada punto se trasvasó a un matraz aforado de 25 mL, se adicionó 2 mL de agua destilada, 2 mL de solución desarrolladora de color, se agitó y se dejó en reposo por 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó y se llevó a volumen con agua destilada. Se mezcló y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm antes de transcurrir 10 minutos, con el empleo como blanco de la solución preparada con agua.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics plus (versión 5.1, EUA). El nivel de significación establecido fue el de $\alpha \leq 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados del diseño experimental para estudiar la influencia que sobre el contenido de polifenoles tenía el tiempo de maceración, la concentración alcohólica del menstuo y la relación droga-menstuo mostraron que esta última tuvo una influencia significativa ($p = 0,0413$); no ocurrió así con los otros parámetros evaluados en el diseño ($p = 0,5216$ y $p = 0,9475$ para la concentración alcohólica y el tiempo de maceración, respectivamente) (Fig. 1A).

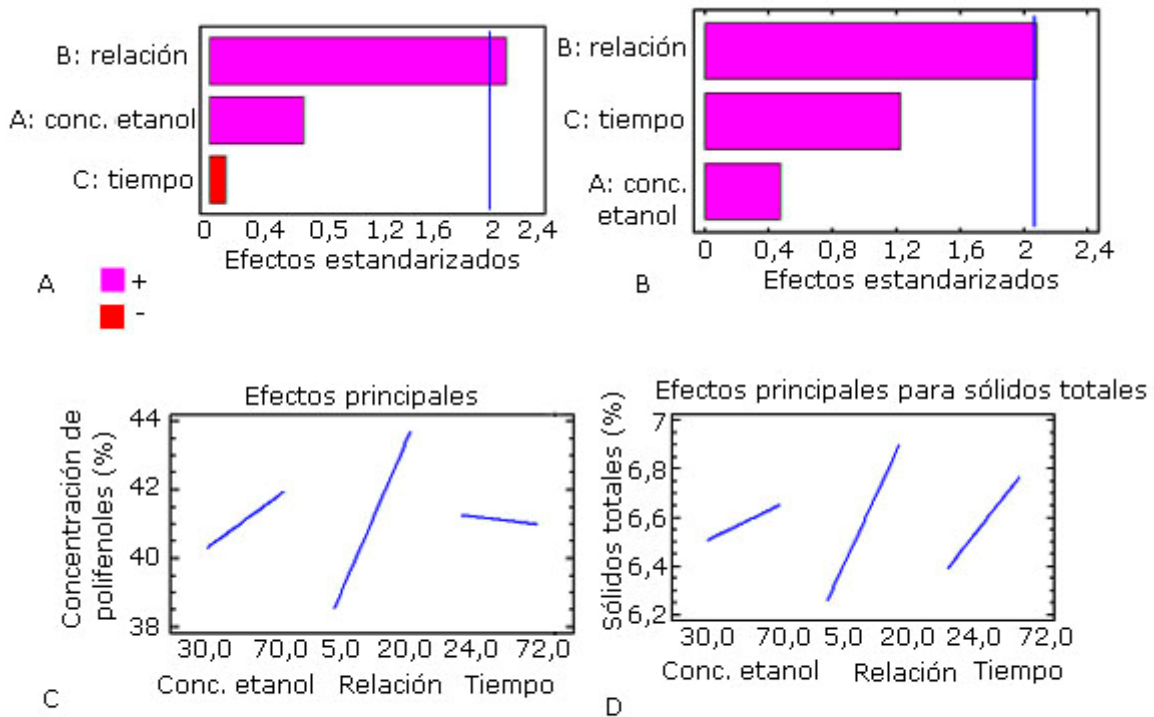


Fig. 1. Influencia del tiempo de maceración, concentración alcohólica del mensturo y relación droga mensturo (A y C polifenoles; B y D: sólidos totales).

Se observó además, que un incremento de la concentración alcohólica del mensturo favoreció el incremento de polifenoles extraídos, mientras que un incremento del tiempo de maceración disminuyó ligeramente la extracción de este componente, aspecto sin ninguna significación, por lo que prácticamente se pudiese afirmar que este parámetro no influye en el proceso (Fig. 1C).

Este comportamiento es descrito a través de la ecuación del modelo siguiente, la cual se corresponde con un modelo lineal ($r = 0,990$; $r^2 = 0,980$).

$$\% \text{ polifenoles} = 35,281 + 0,337 (R)$$

Al evaluar el comportamiento de los sólidos totales se observó que para el parámetro relación droga-mensturo los valores de significación estuvieron muy cercanos al 0,05 ($p = 0,0491$), mientras que para el resto de los parámetros ocurre un fenómeno similar al observado anteriormente para los polifenoles ($p = 0,6436$ y $p = 0,2326$ para la concentración alcohólica y el tiempo de maceración, respectivamente) (Fig. 1B). Al analizar el gráfico de efectos principales (Fig. 1D), se observó que un incremento de cualquiera de los parámetros evaluados provocó un aumento en el contenido de sólidos totales en el extracto.

Durante el análisis del comportamiento del pH, no se observó una tendencia a desviarse en el intervalo estudiado, lo que indica que estos no responden a un ajuste matemático para este sistema. Los valores obtenidos en cada experiencia estuvo entre 4,5 y 5,5, adecuados para extractos con estas características según la NRSP,¹⁶ mientras que estos presentaban la característica de ser extractos de color carmelita rojizo, similar a las características descrita por Peña y otros.⁸

A pesar de que en los resultados del diseño 2^3 no se observó una influencia significativa en las variables tiempo de maceración y concentración del contenido alcohólico del mensturo sobre el proceso de extracción a una relación droga-mensturo constante, se decidió profundizar el estudio con vistas a conocer si la interacción de estas dos variables daban origen a un modelo cuadrático, aspecto que no se observó durante el estudio. No obstante, los resultados del análisis mostraron que la interacción entre estos parámetros tiene una influencia significativa ($p= 0,0183$), lo que provocó un incremento en la extracción de los polifenoles a medida que esta se incrementó (Fig. 2).

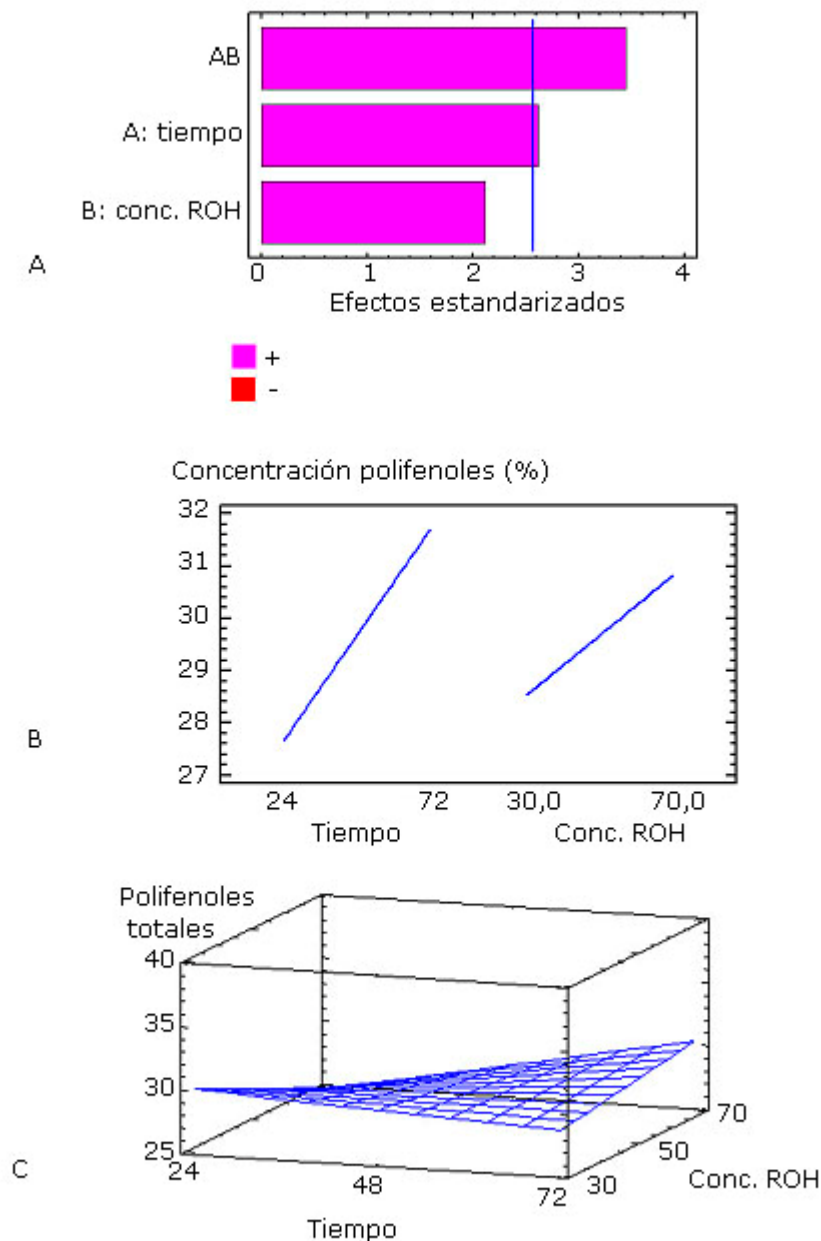


Fig. 2. Influencia del tiempo de maceración y la concentración alcohólica del mensturo.

En el caso del tiempo de maceración, que en el diseño anterior sus influencia fue pobre, se observó que cuando se trabaja a una relación droga-menstruo constante, esta juega un papel más relevante, aunque no llega a ser estadísticamente significativo este parámetro ($p= 0,05$), por lo que su incremento debe favorecer la extracción del componente de interés (Fig. 2). El parámetro concentración alcohólica no presenta estadísticamente influencia significativa en el proceso ($p= 0,0883$).

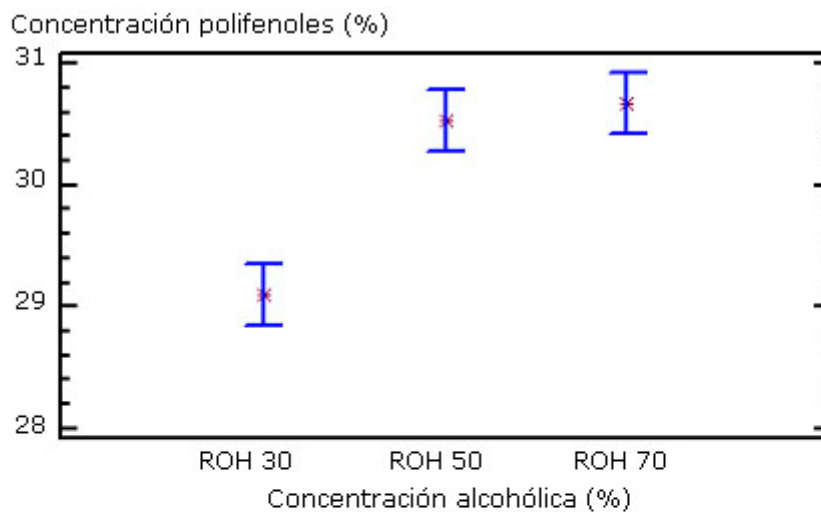
Este comportamiento es descrito a través de la ecuación del modelo siguiente, la cual se corresponde con un modelo lineal

$$\% \text{ Polifenoles} = 36,399 + 0,004 (C) (t)$$

donde:

C: concentración alcohólica

T: tiempo El pH de los extractos obtenidos en cada experiencia en este diseño y las características organolépticas fueron similares a las obtenidas en el diseño anterior.



Contraste múltiple de rango (95,0 % Duncan)	
Concentración alcohólica (%)	Concentración polifenoles (media ± DE)
30	29,10 ± 0,552 a
50	30,53 ± 0,247 b
70	30,68 ± 0,134 b

Letras diferentes difieren significativamente para $p < 0,05$.

Fig. 3. Comportamiento del proceso a las concentraciones alcohólicas del 30, 50 y 70 %, manteniéndose constante la relación droga/menstruo en 1:20 y el tiempo de maceración en 72 h.

El proceso de optimización del diseño plantea que los valores óptimos a trabajar para garantizar la máxima extracción de polifenoles serían una concentración alcohólica del 70 %, un tiempo de maceración de 72 horas y una relación droga-menstruo de 1:20. En estas condiciones se alcanzaron valores medios de concentración de polifenoles de $30,68 \pm 0,135$ %, los cuales están dentro del rango de lo informado internacionalmente (Fig. 3).¹⁰

DISCUSIÓN

Punica granatum L. es una fruta rica en componentes fenólicos, principalmente del tipo de taninos hidrolizables, del tipo elagitaninos, considerado como mayoritario el punicalagin, así como otros derivados del ácido elárgico. Estos componentes presentan una potente actividad antioxidante y a ellos se le atribuyen las principales acciones farmacológicas demostradas por diversos estudios.^{18,19}

Estudio de la influencia del tiempo de maceración, concentración del contenido alcohólico del menstuo y relación droga-menstuo

Se aplicó un diseño estadístico factorial 2³ con un punto central, en el que se consideraron como variables de interés el tiempo de maceración, la concentración del contenido alcohólico del menstuo y la relación droga-menstuo, por ser variables informadas en la literatura como determinantes para procesos de extracción. Otros parámetros como tamaño de partículas y temperatura no fueron estudiadas en esta ocasión. Se estableció que el tamaño de partícula debía ser menor que 200 µm, aspecto que se garantizó en las condiciones de molinado establecidas en la investigación, pues estudios informados en la literatura demostraron que por debajo de la misma, la eficiencia de extracción de polifenoles aumenta significativamente.⁵

Para el caso de la temperatura, aunque se ha informado que un incremento de esta favorece el proceso de extracción,⁵ en este estudio la temperatura se mantuvo en 30 ± 2 °C (temperatura ambiental), que es la temperatura de maceración que ha sido informado por diferentes autores para la obtención de extractos a partir de esta fruta.^{8,15,20}

Teniendo en cuenta los resultados del diseño y lo informado para extracción de este componente a partir de esta fruta, se consideró como relación droga-menstuo una proporción de 1:20 y estudiar con mayor profundidad la influencia de la concentración alcohólica y el tiempo de maceración, realizando un diseño experimental de superficie respuesta 3², manteniendo como variable respuesta el contenido de polifenoles totales.

Estudio de la influencia del tiempo de maceración y la concentración del contenido alcohólico del menstuo

Los resultados al aplicar este segundo diseño son interesantes, y confirman que los parámetros que más influyen sobre el proceso de maceración para extraer polifenoles de la *Punica granatum* lo constituyen la relación droga-menstuo y la interacción entre el tiempo de maceración y la concentración alcohólica del menstuo.

En la literatura pocos trabajos informan procesos de obtención de extractos de *Punica granatum*, pues en la generalidad de los casos estos son consumidos en forma de jugos naturales o fermentados.²⁰⁻²³ Uno de los estudios que más similitud presenta con los realizados en este trabajo, es el de *Qua* y otros,⁵ quienes demostraron que un incremento de la relación droga-menstuo (en su caso utilizaron agua como menstuo), a 25 ± 2 °C con agitación, favorecía la extracción de polifenoles a partir de la fruta, e informaron para la relación 1:20, valores de polifenoles de alrededor del 35 %. Por otro lado, *Jiménez* y otros¹⁰ informaron para extractos acuosos y extractos en alcohol etílico valores de polifenoles totales de 45,8 % y 42,3 % respectivamente.

En Cuba, los trabajos realizados con esta planta han estado encaminados a evaluar sus propiedades como antiviral^{12,14} y como modulador del daño inducido al ADN por un agente oxidante como el H₂O₂.¹⁵ En dichos estudios se evaluaron extractos hidroalcohólicos al 50 % v/v, elaborado por maceración de la fruta madura, en una proporción de 1:3 (w/v), durante 15 días según proceso estandarizado descrito por Iglesias.¹⁶

Este tiempo tan grande de maceración es la principal dificultad que provoca el proceso de escalado para la obtención del extracto a nivel industrial, dado que su costo económico del mismo sería elevado. Los resultados alcanzados en este estudio garantizan obtener extractos en un tiempo adecuado, con concentraciones similares a las obtenidas por otros autores.^{5,10}

Teniendo en cuenta que los estudios realizados con anterioridad en Cuba eran con una concentración alcohólica al 50 %, que en ellos fueron demostradas las actividades farmacológicas atribuidas a la planta¹¹⁻¹⁵ y que según los resultados del diseño realizados en este estudio, la concentración alcohólica tenía poca influencia significativa sobre el proceso de extracción, se decidió realizar lotes de extracto a las concentraciones alcohólica del 30, 50 y 70 %, manteniéndose constante la relación droga-menstruo en 1:20 y el tiempo de maceración en 72 h. Para ello se evaluaron tres lotes de 100 mL en las condiciones descritas y se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rangos múltiples, aplicando el procedimiento de Duncan de comparaciones múltiples, para conocer los valores medios que son significativamente diferentes entre ellos.

Los resultados al aplicar ANOVA mostraron que existe diferencias significativas ($p=0,0378$) entre ellos, lo cual se comprobó mediante la prueba de Duncan que existe diferencia significativa entre la concentración de 30 % y el resto de las concentraciones estudiadas, y que no existe diferencias significativas entre los valores obtenidos a las concentraciones de 50 % y 70 %; de manera que se identificaron dos grupos homogéneos (30 % y 50-70 %) en las condiciones de trabajo aplicadas (Fig. 3).

Lamentablemente ninguno de los trabajos realizados por autores cubanos ha declarado los valores de polifenoles totales presentes en sus extractos, por lo que no se pudo comparar los resultados de este estudio. No obstante, los resultados de esta prueba permiten afirmar que pueden ser empleados cualquiera de los dos tipos de menstros para la extracción de polifenoles totales en la *Punica granatum*.

Por tanto, partiendo de estos resultados y teniendo en cuenta que los estudios en el país se han realizado con extractos alcohólicos al 50 %, se propone que el proceso a escalar mantenga como condiciones de trabajo las siguientes: relación droga-menstruo de 1:20; tiempo de maceración de 72 h y menstruo del 50 % etanol-agua.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh J. Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. In: Swami Handa S, Singh Khanuja S, Longo G, Dutt Rakesh D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology; 2008. p. 67-82.
2. Handa S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: Swami Handa S, Singh Khanuja S, Longo G, Dutt Rakesh D. Extraction

Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology; 2008. p. 21-52.

3. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. J Food Engineering. 2007;81(1):236-42.

4. Lapornik B, Prosek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. J Food Engineering. 2005;71(2):21422.

5. Qua W, Pan Z, Ma H. Extraction modelling and activities of antioxidants from pomegranate marc. J Food Engineering. 2010;99:1623.

6. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Ciencia y Técnica, Instituto Cubano del Libro; 1974. p. 85-8.

7. Jiménez CA, Rojas N, López AM. Biological evaluation of Cuban plants (IV). Rev Cubana Med Trop. 1979;31:29-35.

8. Peña Núñez BR, Morejón Rodríguez Z, García Hernández A, Morón Rodríguez F. Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2008 [citado 4 Sept 2012];3(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400014&lng=es&nrm=iso

9. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signalling in colon cancer. J Agric Food Chem. 2006;54(3):980-5.

10. Jimenez del Rio M, Ramazanov A, Sikorski S, Ramazanov Z, Chkhikvishvili I. A new method of standartization of health-promoting pomegranate fruit (*Punica granatum*) extract. Georgian Med News. 2006;140:70-7.

11. Fernández-Calienes Valdés A, Mendiola Martínez J, Monzote Fidalgo L, García Parra M, Sariego Ramos I, Acuña Rodríguez D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana Med Trop. 2009;61(3):254-8.

12. Peña BR, Martínez MT. Inhibición de la hemoaglutinación de cepas de influenza A por un extracto liofilizado de granada BLBU. Rev Cubana Quím. 2001;XIII:395.

13. Peña BR. BLBU: un extracto de frutos de *Punica granatum* L. con actividad contra el virus de la Influenza [tesis]. La Habana: Facultad de Biología de la Universidad de La Habana; 1998.

14. Caballero O, Peña BR, Zurcher J, Ortín J, Martínez T. Actividad inhibitoria de extractos del fruto de *Punica granatum* sobre cepas del virus de la gripe. Rev Cubana Quím. 2001;XIII:106.

15. Sánchez Lamar A, Cozzi R, Cundari E, Fiore M, Ricordy R, Gensabella G, et al. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Rev Cubana Plant Med. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2005 [citado 12 Sep 2012];10(2). Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200002&lng=es

16. Iglesias J. Fraccionamiento fitoquímico del BLBu con actividad antiviral [tesis]. La Habana: Universidad de La Habana; 1990.
17. NRSP 312. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1992.
18. López Mas J; Straitenbeirger S; Peñalver M; Martínez P. Process for preparing pomegranate extracts. European Patent EP 1967079. 2010.
19. Lu J, Ding K, Yuan Q. Determination of Punicalagin isomers in pomegranate husk. Chromatographia. 2008;68:303-6.
20. PRD. PRD for Herbal Medicines. Pomegranate. Herbal Monographs. New York: Inc. at Montuale; 2000. p. 650-1.
21. Seerama N, Adams L, Henning S, Niu Y, Zhang Y, Nairb M, Heber D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem. 2005;16:360-7.
22. Haidari M, Ali M, Casscells S, Madji M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. Phytomedicine. 2009;16:1127-36.
23. Jurenka J. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. Alternative Medicine Rev. 2008;13(2):128-44.

Recibido: 30 de noviembre de 2012.

Aprobado: 5 de enero de 2013.

Jorge E. Rodríguez Chanfrau. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes. CP 10600. Plaza de la Revolución. La Habana, Cuba. Correo electrónico: jorge.rodriguez@infomed.sld.cu