

# SUSCEPTIBILIDAD DE *CANDIDA ALBICANS* A EXTRACTO ETANOLICO DE CASCARA DE *PUNICA GRANATUM*

Louisiana Maco Serquén  
 Mario Moreno-Mantilla  
 Sebastian Iglesias-Osores



Departamento de Microbiología – Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Autor correspondal: Sebastian Iglesias-Osores

Correo: siglesias@unprg.edu.pe

Recibido: 16/10/2019

Aceptado: 22/11/2019

## RESUMEN

La búsqueda de compuestos con actividad antifúngica es de gran trascendencia, debido a la dificultad que se presenta al combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos. El objetivo del estudio fue determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* y la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*. Se trabajó con 4 cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) y 5 concentraciones distintas del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), considerando tres repeticiones por cada cepa. Como resultado se obtuvo que todas cepas de *Candida albicans* en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*. Para determinar la CMI se utilizó la concentración más baja (50 mg/mL) que causó susceptibilidad de todas las cepas en estudio, los valores obtenidos fueron para las C1 y C3 de *Candida albicans*, CMI de 1.56 mg/mL.; para la C4 de *Candida albicans* CMI de 3.125 mg/ mL. y para la C2 , CMI fue de 6.25 mg/mL.

**Palabras clave:** pruebas de sensibilidad microbiana, concentración mínima Inhibitoria, *Candida albicans*, *Punica granatum* (DeCS).

## SUSCEPTIBILITY OF *CANDIDA ALBICANS* TO ETHANOLIC EXTRACT OF *PUNICA GRANATUM* PEEL

### ABSTRACT

The search for compounds with antifungal activity is of great importance, due to the difficulty that occurs when combating diseases caused by pathogenic microorganisms. The objective of the study was to determine the susceptibility of the strains of *Candida albicans* against the ethanolic extract of the *Punica granatum* peel and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the *Punica granatum* peel extract on strains of *Candida albicans*. We worked with 4 strains of *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) and 5 different concentrations of the ethanolic extract of the *Punica granatum* peel (50 mg / mL, 100 mg / mL, 150 mg / mL, 200 mg / mL , 250 mg / mL), considering three repetitions for each strain. As a result, it was obtained that all strains of *Candida albicans* under study were susceptible to the ethanolic extract of the *Punica granatum* peel. To determine the MIC, the lowest concentration (50 mg / mL) that caused susceptibility of all the strains under study was used; the values obtained were for C1 and C3 of *Candida albicans*, MIC of 1.56 mg / mL; for the C4 of *Candida albicans* CMI of 3.125 mg / mL and for C2, CMI was 6.25 mg / mL.

**Keywords:** Microbial Sensitivity Tests, Minimum Inhibitory Concentration, *Candida albicans*, *Punica granatum* (MeSH).

## INTRODUCCIÓN

Aualmente 26 millones de personas padecen infección fúngica y más de 1,6 millones muere cada año (Global Action Fund for Fungal Infections). Dentro de ese contexto figura la candidiasis, enfermedad causada por especies del género *Candida*, siendo la especie más implicada *Candida albicans* (8). En dicho proceso el oportunismo de esta levadura se ve favorecido a su condición de comensal en piel y mucosas y, a factores predisponentes del individuo (21), por lo que su incidencia ha aumentado provocando un 25% de micosis superficiales y entre el 75 y 88% de infecciones fúngicas nosocomiales (8).

Sin embargo, la vulvovaginitis por *C. albicans* se encuentran entre las enfermedades que más afecta a las mujeres y al igual que la candiduria continúan siendo un problema de salud más común en las infecciones fúngicas sobre todo asociado a factores iatrogénicos de pacientes con tratamiento prolongado de antibióticos, corticosteroides, diabéticos y cateterismo. En el tracto urinario se forman microplacas blanquecinas que en pocas ocasiones llegan a los riñones, produciendo pielonefritis; entidad clínica observada con más frecuencia en recién nacidos (6,9).

En los últimos años el uso de plantas medicinales se está incrementando, alrededor del mundo, un 80% de personas que viven en países en vías de desarrollo usa exclusivamente plantas medicinales tradicionales para necesidades primarias de salud (Organización Mundial de la Salud). Dentro de ellas está la granada (*Punica granatum*), planta con múltiples propiedades terapéuticas que es empleada en diferentes países existiendo en la actualidad gran interés por el estudio de esta especie vegetal (30,36).

Diversos extractos a partir de su jugo, semillas, cáscara y fruto completo han sido empleados de la granada; de igual manera sus hojas, flores y raíces exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmínticas, antibacteriales, antitumorales, antivirales y astringentes. Incluso han sido administrados para el control de diabetes mellitus, hiperlipidemia, hipertensión, arterosclerosis, problemas bucales, infertilidad femenina, disfunción eréctil, obesidad, Alzheimer, diarrea y úlceras (36). Por tanto, hay necesidad de investigar la susceptibilidad de los extractos de la granada frente a *Candida albicans*.

En tal escenario los productos naturales constituyen una alternativa para combatir diversas enfermedades infecciosas y, dado que en nuestro país existe una variedad de plantas medicinales, fue objetivo de la presente investigación determinar la susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra

Se trabajó con 4 cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) y 5 concentraciones distintas del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), considerando tres repeticiones por cada cepa, se realizaron un total de 60 evaluaciones.

### Identificación de cepas de *Candida albicans*

La caracterización macroscópica y microscópica de *Candida albicans*, se realizó en Agar Sabouraud. Para su identificación se realizó la prueba del tubo germinativo según la Norma Técnica Peruana N° 44 del INS (17). Además de la observación de Clamidosporas, así como la identificación en Chromogenic *Candida* Agar (CCA).

### Extracto etanólico

La obtención del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* se realizó mediante el método empleado por Gonzales (18).

Prueba de susceptibilidad y CMI: Se trabajó con el método de Disco de difusión (Kirby - Bauer), y la evaluación de la CMI con el método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N°30 de INS (24).

### Análisis de datos

El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente y para el análisis estadístico de los datos, obtenidos en la experimentación correspondiente se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA).

CC. del Extracto etanólico	Halos de Inhibición por cepa			
	C1	C2	C3	C4
50 mg/mL	15,00	12,67	13,00	12,67
100 mg/mL	22,00	17,00	19,33	15,33
150 mg/mL	25,00	24,33	24,00	22,33
200 mg/mL	25,67	25,00	25,00	26,33
250 mg/mL	28,00	20,67	26,67	28,33
Promedio	23,13	20,93	21,6	21,00

Tabla N° 01. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada).

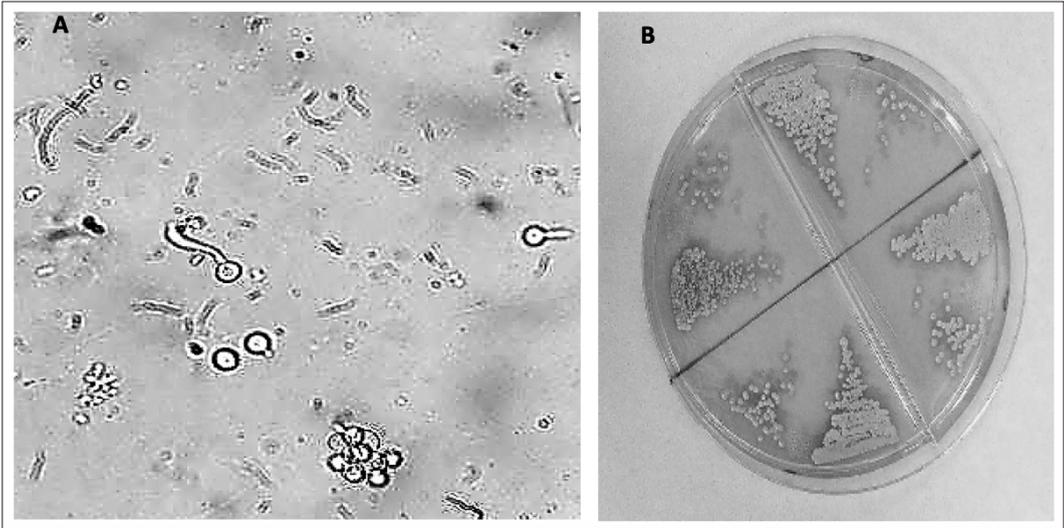


Figura 01. A) Observación microscópica, tubo germinativo de *Candida albicans*; B) Cepas de *Candida albicans* en Chromogenic Candida Agar.

## RESULTADOS

Los valores obtenidos demostraron que todas las cepas de *Candida albicans* en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, encontrándose algunas diferencias en el comportamiento de las cepas, debido a que fueron enfrentadas a diferentes concentraciones del extracto.

Se obtuvieron los promedios del diámetro en mm de los halos de inhibición para todas las cepas de *Candida albicans*, de tal manera que la C1 obtuvo un promedio de 23.13 mm de inhibición; la C2 un promedio de 20.93 mm inhibición; la C3 promedio de 21.6 mm inhibición y la C4 un promedio de 21.0 mm de inhibición.

Para determinar la CMI del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (granada) sobre cepas de *Candida albicans*, se trabajó el método de macrodilución en tubo, aplicado según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS (29).

Se utilizaron cuatro cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) y la concentración de 50 mg/mL del extracto etanólico, debido a que fue la menor concentración que ejerció susceptibilidad sobre todas las cepas de *Candida albicans* en estudio.

Se obtuvo como resultado que para la C1 y C3 de *Candida albicans* la concentración mínima que no permite su

Cepas de <i>Candida albicans</i> / CC. 50 mg/ml				
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
<b>Control positivo*</b>	-	-	-	-
<b>50 mg/mL</b>	-	-	-	-
<b>25 mg/mL</b>	-	-	-	-
<b>12.5 mg/mL</b>	-	-	-	-
<b>6.25mg/mL</b>	-	-	-	-
<b>3.125mg/mL</b>	-	+	-	-
<b>1.56mg/mL</b>	-	+	-	+
<b>0.78 mg/mL</b>	+	+	+	+
<b>0.39 mg/mL</b>	+	+	+	+
<b>0.19mg/mL</b>	+	+	+	+
<b>Control</b>	+	+	+	+
<b>Negativo**</b>	-	-	-	-
<b>Control/extrac to***</b>	-	-	-	-

(\*) Extracto + inóculo (\*\* Caldo sabouraud + inóculo (\*\*\*) Caldo sabouraud + Extracto

(+) Crecimiento; (-) No hay crecimiento

Tabla N° 02. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*.

desarrollo visible es 1.56 mg/mL, sin embargo para la C2 de *Candida albicans* la concentración mínima que impide su desarrollo es 6.25 mg/mL, a diferencia de la C4 cuya Concentración Mínima Inhibitoria es 3.125 mg/mL.



## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos nos indican que el extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* ejerce actividad antifúngica sobre *Candida albicans* (3,4,19,23,27,33,34). Los estudios revelan que esto puede ser debido a la acción de los compuestos bioactivos de la cáscara (4), ya que esta contiene alcaloides y aproximadamente 20% de taninos totales altamente concentrados (4,27) incluyendo un alto porcentaje (80%) de anómeros de punicalagina (32), granatinas A y B, gallagylidilacton, casuarinina, pedunculagina (4,5,27,34) y es fuente importante de elagitaninos (5,32), que pueden ser degradados por ácidos y bases fuertes o mediante el uso de enzimas para formar un porcentaje significativo de ácido elágico (12,32).

Un análisis realizado a la cáscara de granada muestra más de 30 compuestos detectados, que incluyen: puniacortein A, puniacortein B, puniacortein A, puniacortein B, corilagina. Los compuestos superiores al 40% fueron: glucosa, ácido cítrico, ácido cafeico, ácido punicina, pedunculagina, tellimagrandina; y punicalagina presentó el 100% de detección (4). El mismo estudio reveló el efecto de los extractos de cáscara de granada sobre la morfología y estructura de *C. albicans* y *C. krusei*, el cual se examinó mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión, con la visualización de una membrana irregular e hifas, formación de vacuolas y engrosamiento de la pared celular. Existen diferentes investigaciones sobre el uso y efectividad de *Punica granatum*. El presente estudio fue realizado a partir del extracto etanólico de la cáscara de granada, a

concentraciones de 50 mg/mL - 250 mg/mL sobre cepas de *Candida albicans*, obteniendo resultados de 12,66 mm hasta 28.3 mm de halos de inhibición; con una CMI de 1.56 mg/mL. Un ensayo similar con extracto metanólico del pericarpo de granada determinó que existe efecto inhibitorio contra las especies del género *Candida*, obteniendo la CMI a concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL; *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilopsis* fueron inhibidas a la dosis de 0.5 mg/mL y *Candida tropicalis* a 1 mg/mL (19). Cabe señalar que el tipo de extracto y la concentración de metabolitos responsables de la inhibición, que se encuentran en las distintas partes de la planta, puedan marcar las diferencias entre las experimentaciones. Según el tipo de extracto y la parte de la planta utilizada, se deduce que los extractos de *Punica granatum* son eficaces contra *Candida albicans*, notándose mayor efectividad con los extractos etanólicos del pericarpo (cáscara y corteza) de granada, asumiendo de esta manera que los principios activos están presentes en gran proporción en esta parte de la planta, así como lo señala la literatura.

Más estudios revelan que el extracto acuoso de *Punica granatum* posee efectos antifúngicos similares al miconazol (35), importante en el tratamiento antifúngico; un estudio comparativo demostró que *P. granatum* a concentración de 100 mg/mL, tiene actividad definida contra *Candida*, sin embargo el efecto de inhibición es menor que el de la nistatina (100 mg/mL); un aumento en la dosis de medicación podría alcanzar una actividad similar a la del medicamento (23).

En referencia a los promedios de los halos de inhibición obtenidos según el ANAVA existen diferencias entre las cepas evaluadas, sin embargo la prueba discriminativa de Tukey (0.5), indica que esta diferencia no es significativa; en relación a las diferentes concentraciones del extracto, se pudo observar que si existen diferencias significativas, notándose que a medida que aumenta la concentración existe mayor susceptibilidad, demostrándose que la susceptibilidad de *Candida albicans* es directamente proporcional a la concentración del extracto de *Punica granatum*.

La CMI obtenida en este estudio fue de 1.56 mg/mL, coincidiendo con los reportes de otras investigaciones que obtuvieron CMI de 0.125 mg/mL (4), 0.128 mg/mL - 1.024 mg/mL (34), 0.5–1 mg/mL (19); estos experimentos fueron realizados con extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*. Estos resultados sugieren al extracto de granada como agente antifúngico prometedor (34).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la susceptibilidad de *Candida albicans*, procedente de infecciones vaginales, frente al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, contribuyendo en la investigación de nuevas alternativas para la terapia antimicótica.

## CONCLUSIÓN

Las cepas en estudio (C1, C2, C3, C4) de *Candida albicans* son susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, a concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL y 250 mg/mL, lo cual fue evidenciado por la presencia de halos de inhibición, notándose que la cepa más resistente fue la C2 con un halo de inhibición de 20.93 mm y la cepa más susceptible es la C1 con un halo de inhibición de 23.13 mm.

Con respecto a la CMI del extracto de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*, se concluyó que la cepa más resistente C2 es inhibida a una concentración mínima de 6.25 mg/mL; mientras que la cepa más sensible C1 se inhibió a una concentración mínima de 1.56 mg/mL.

Fuente de financiación: autofinanciado.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar C, Sepúlveda L, Ascacio J, Buenrostro J, De la Cruz R, Rodríguez R, Contreras J, Aguilera A (2012). "Aspectos fundamentales de los elagitánicos de granada (*Punica granatum* L.)". Departamento de Química - Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
2. Aguilar L (2013). "Comparación del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico con el aceite esencial de

*Cymbop* "hierba luisa" sobre una cepa de *Candida albicans*". Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.

3. Aguilera A, Garcia C, Belmares R, Aguilar C (2005). "Efecto inhibitorio del ácido elágico obtenido de cáscara (*Punica granatum*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre diferentes microorganismos patógenos". Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

4. Anibal P, Peixoto I, Foglio M, Höfling, J (2013) "Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida spp*". Braz J Microbiol. Dec 17; 44(3):839-48. Brasil.

5. Arbayza J, Ruiz S, Venegas E, Ruidias D, Cosavalente K (2014). Capacidad antioxidante del zumo y de los extractos hidroalcohólico y acuoso obtenidos de *Punica granatum* y su relación con el contenido de polifenoles. Departamento de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.

6. Arenas R. Micología Médica ilustrada. 4a ed. México; 2011.

7. Bernal R, Rodríguez I, Salaz M (2014). "Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* in - vitro". Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.

8. Biasoli M. Candidiasis. Centro de Referencia de Micología. FBIOf. UNR. 2013. Argentina.

9. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4ª ed. México; 2012.

10. Bustamante O (2006). "Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de (matico) *Piper aduncum* y (cedrón) *Alloysia triphylla* sobre *Candida albicans*". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú.

11. Castillo T (2010) "Extracción y Cuantificación de Aceite Esencial de Cáscara de Granada (*Punica granatum* L.) Y Determinar su Efecto Antifúngico Sobre *Penicillium sp*". Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

12. Clifford MN, Scalbert A. 2000. Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. J. of the Sci. of Food and Agric. 80:1118-1125.

13. Córdova V, García L (2002). "Efecto inhibitorio de una solución hidroalcohólica de *Allium sativum* (Ajo) sobre cepas de *Candida albicans*". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú.

14. Cubas J, Mejía E (2004). "Efecto inhibitorio In-Vitro del extracto etanólico de propóleo sobre *Candida albicans*". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú.

15. De Souza C, Correia F, Correia C, Vieira M, Sheila J,

- Pereira M (2006) "Concentración mínima inhibitoria de adhesión de *Punica granatum* Linn (granada) gel contra *S. mutans*, *S. mitis* y *C. albicans*". Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
16. Espinoza & Vidaurre (2004). "Prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* en gestantes de los Centros de Salud Paul Harris, Atusparias, Túpac Amaru y Cerropon Chiclayo". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú.
17. Figueroa J, Peña B, Oropesa S (2005) "Actividad antiviral del extracto de *Punica granatum* L. (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C". Laboratorio Nacional de Influenza, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" Dpto. de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica. La Habana – Cuba.
18. Gonzales V (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Línea de Profundización: Tecnología en Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales departamento de Ingeniería Química.
19. Guerra M, Godoy A (2010). "Inhibición de microorganismos causantes de vaginitis y vaginosis por frutas y raíces de uso etnomédico en Guatemala" Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
20. Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
21. Giusiano G. Micosis oportunistas. Cátedra de Microbiología, parasitología e inmunología. 2011. Argentina.
22. Huamani M, Ruiz J (2005). "Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú". Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.
23. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri A (2004) The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. Escuela de Odontología, Teherán Universidad de Ciencias Médicas, Teherán, Irán
24. Montes P, Fabela H, Betanzos G (2012). "Actividad antimicrobiana de jugo fresco de granada y bebidas comerciales sobre cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de infecciones oculares." Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca- México.
25. Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. Journal of food science, 72, 341-345.
26. Opara LU, Al-Ani MR, Al-Shuaibi YS. (2010). Physico-chemical vitamin C content and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food and Bioprocess Technology, 2, 315-321.
27. Pai M, Prashant G, Murlikrishna K, Shivakumar K, Chandu G (2010). Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study. Indian J Dent Res 2010; 21: 334-6
28. Sabarburu G (2004). "Microbiología de las investigaciones vaginales en mujeres de edad fértil, prevalencia y aspectos epidemiológicos en el programa de control de ETS y SIDA (PROCTESS) Centro de Salud José Olaya. Chiclayo. Diciembre 2002 – Junio 2003". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú.
29. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. Serie de Normas Técnicas N° 30.
30. Sánchez A, Cozzi R, Cundari E; Fiore M, Ricordy R, Gensabella G, Degrassi F, De Salvia R (2005). Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Rev. Cubana Plant Med., (10) (2).
31. Saravia N, Guillintia G (2012). Actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el Fluconazol sobre *Candida albicans*. Facultad de Odontología - Universidad de San Martín de Porres, Lima - Perú.
32. Seeram N, Heber D (2005). International patent of Purification of ellagitannins. University of California. Number Publication: Wo2005097106.
33. Shafiqhi M, Amjad L, Madani M (2012). Effect of Fungal Growth Inhibition from Pomegranate Flower and Peel Extracts. Departamentos de Microbiología, Rama Falavarjan, Universidad Islámica Azad, Isfahán, Irán.
34. Shaokat S, Hameed H, Mohammad H (2007). Anti-fungal Activity of *Punica granatum* Peels, Powder and Extracts from Pathogenic Samples. Iraqi J.Pharm.Sci., Vol.16 (2).
35. Vasconcelos L, Sampaio M, Sampaio FC; Higinio JS (2003) Use of *Punica granatum* Linn as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis.
36. Ventura J, Alarcón F, Ramos R, Aguilar C (2006). *Punica granatum* L. (granada): Aspectos terapéuticos, fitoquímicos y toxicológicos. Lab. Farmacología, Dpto. Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Coahuila Mexico.
37. Yáñez G, Velasteguí J (2014). "Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*". Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador.