

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de la cáscara de diferentes variedades de granada

Jesús Balcázar B¹, Reyes López M. G., Serrano Niño J. C¹, Silva Jara J. M¹, Castañeda Saucedo M. C², Cavazos Garduño A^{1*}

¹ Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Olímpica, 44430 Guadalajara, Jal.

² Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Av. Enrique Arreola Silva No. 883, colonia centro, C. P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México. *Correo: adriana.cavazos@academicos.udg.mx

Palabras clave: *Wonderful, Verde, Tecozautla*, ultrasonido, inhibición.

Introducción

De acuerdo a la OMS, el uso desmedido de antibióticos en la producción de alimentos y su amplia liberación involuntaria en el medio ambiente ha provocado resistencia y ha supuesto consecuencias negativas para la salud pública. La aparición de microorganismos, incluso de agentes patógenos, resistentes a antibióticos ha provocado que algunas enfermedades sean difíciles de tratar. Además, existe una creciente preocupación de la población por una alimentación natural, con la menor cantidad de compuestos químicos industriales. Esto implica un desafío y una necesidad de encontrar nuevos antimicrobianos.^[1]

La granada (*Punica granatum L.*) es una fruta antigua que se consume ampliamente como fruta fresca y en jugo. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que esta fruta posee actividades antibacterianas, atribuyéndose los beneficios a su amplia gama de fitoquímicos, que en su mayoría son polifenoles, incluidos principalmente elagitaninos hidrolizables y antocianinas.^[2]

Del fruto se distinguen tres partes principales, la cáscara, los arilos que son sacos que contienen jugo y las semillas de granada. La proporción en peso de fruto para la cáscara y las semillas está alrededor del 50 y 12 % del total del peso de la fruta, aunque de acuerdo con la variedad pudiese existir algunas diferencias. La cáscara de granada es considerada un desecho una vez que el jugo se ha extraído, sin embargo, por su composición se puede considerar como un co-producto con potencial debido a que contiene un alto contenido de polifenoles en comparación con su concentración en cualquier otra parte de la fruta, principalmente taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido gálico y elágico) y flavonoides (antocianinas, catequinas y otras sustancias complejas).^[3] El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del método de extracción y la variedad de granada en la actividad antimicrobiana de los extractos de cascara de granada.

Metodología

Procesamiento de la materia prima

Los frutos de granada de las variedades Wonderful, tecozautla y Verde se obtuvieron de productores locales de Ciudad Guzmán, Jalisco. Las cáscaras de granada se desinfectaron empleando una solución de hipoclorito de sodio (5 ml/L). La cáscara se secó en una estufa a 50°C y una vez seca se redujo el tamaño empleando un mortero y un molino eléctrico.^[4] Finalmente, el polvo obtenido se tamizó empleando un tamaño de malla 30.

Obtención de los extractos

Extracción por maceración: Se puso en contacto el polvo de la cáscara de granada con etanol en una relación 2:10 (p/v), por 48 h a temperatura ambiente y con agitación a 50 rpm, una vez que transcurrió el tiempo se filtró el solvente y se secó al vacío con un rotavapor a una temperatura no mayor a 55 °C.^[5] Las variedades procesadas para la obtención de extractos fueron verde, tecozautla y wonderful.

Extracción por ultrasonido: Se puso en contacto la cáscara de granada de la variedad wonderful con etanol, se homogeneizó y se sonicó, empleando un equipo de ultrasonido (Branson 550). Se trabajó con lotes de 8 g de harina de cáscara en una relación 2:10 (p/v), se filtró el solvente y se secó al vacío para eliminar el solvente con un rotavapor a una temperatura no mayor a 55 °C.^[6]

Caracterización por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los extractos fueron analizados empleando un equipo FT-IR (Cary 630, Agilent Technologies) con la finalidad de comparar la presencia de grupos funcionales en los distintos extractos. Se registraron los espectros (4000 a 500 cm⁻¹) a una resolución nominal de 4cm⁻¹ y a 32 barridos por muestra.

Evaluación del efecto antimicrobiano

Las propiedades antimicrobianas de los extractos de la cáscara de las diferentes variedades de granada se evaluaron contra las siguientes cepas bacterianas: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Salmonella enteritidis*. El efecto inhibitorio se evaluó utilizando el método de difusión en pozos (método de Kirby-Bauer) sobre agar Mueller-Hinton. El cultivo fresco de cada microorganismo se inoculó en caldo soya tripticasa y se incubó a 37 °C durante 18 h. La suspensión bacteriana se preparó con una turbidez de la escala 0.5 McFarland. Las placas de agar Mueller-Hinton se inocularon con 1 mL de la cepa bacteriana bajo condiciones asépticas con la técnica de vaciado en placa y los pozos se llenaron con 80µl de las muestras de los extractos por cuadruplicado y posteriormente se incubaron a 37° C durante 6 h. Después del período de incubación, se midió el diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento. Se utilizó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml como control positivo.

Análisis estadístico

El estudio comparativo entre medias de los tratamientos realizados en las pruebas de efecto antimicrobiano consistió en un análisis de varianza (ANOVA) mediante la prueba de Fisher ($\alpha=0.05$) empleando el paquete estadístico MINITAB18®.

Resultados y discusión

Los espectros de infrarrojo (Figura 1) fueron procesados y normalizados tomando la banda más intensa como banda de referencia utilizando el software Origin Pro 8.0 para efectos de comparación con los diferentes extractos y variedades. Para el espectro A y B (extracción etanólica de cáscara de granada variedad *Wonderful* por maceración y ultrasonido, respectivamente) en la región 3698 y 3304 cm⁻¹ se asocia al modo de vibración N-H y O-H, los cuales han sido atribuidos a compuestos como el ácido tánico, elálgico y gálgico^[7], donde se muestra más abundancia en el área del espectro para la extracción asistida por ultrasonido. La señal situada hacia 2974 cm⁻¹ es atribuida al enlace C-H, en tanto que en los picos alrededor de 1721 y 1618 cm⁻¹ (injerito gráfico E) son atribuidos a enlaces, C-O y grupos carbonilo (nuevamente para el espectro por ultrasonido se vuelve a denotar más abundancia en estos modos de vibración). Las señales débiles hacia 1448, 1379 y 1274 cm⁻¹ son asignadas a las vibraciones presentes en anillos aromáticos de la cáscara de granada, la técnica de extracción por ultrasonido permite obtener extractos ricos en este tipo de compuestos que, además, poseen actividad antioxidante (polifenoles asociados probablemente a la punicalagina y el ácido elálgico)^[8]. Los picos localizados entre 1200 y 900 cm⁻¹ son frecuencias específicas para polisacáridos.

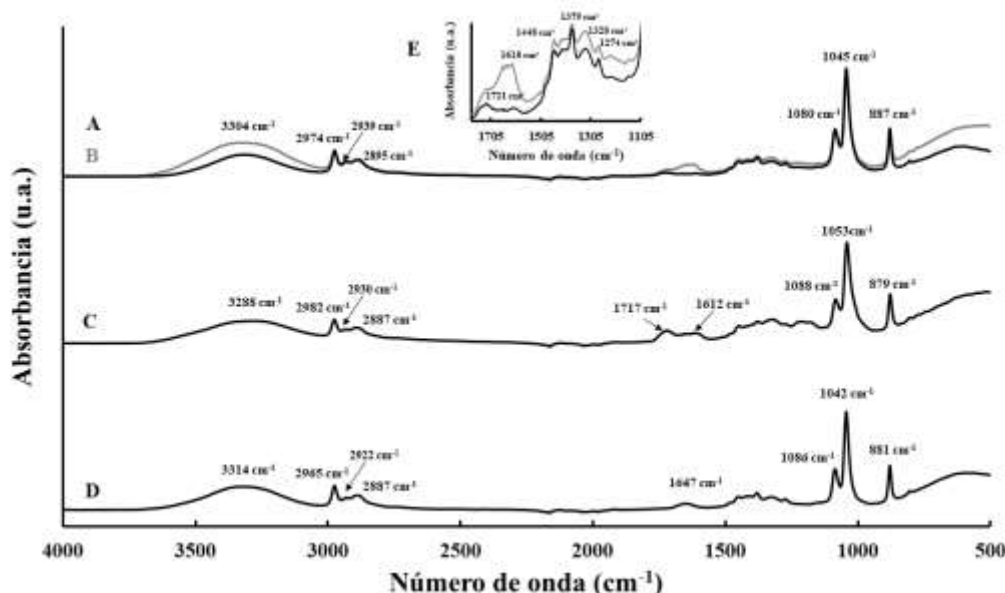


Figura 1. Espectros de infrarrojo de los extractos de cáscaras de granada en la región de 4000 a 500 cm^{-1}

1. A) Extracción por maceración variedad Wonderful, B) Extracción por ultrasonido variedad Wonderful, C) Extracción por maceración variedad Verde, D) Extracción por maceración variedad Tecozautila y, E) Injerto de la zona parcial entre 1780 y 1105 cm^{-1} de los espectros A y B.

Para el espectro C correspondiente a la variedad *Verde*, se pueden apreciar señales similares que para la variedad *Wonderful*, pero hacia las posiciones de 1717 y 1612 cm^{-1} se observan bandas más definidas que para la variedad *Wonderful*, esta banda centrada en 1717 cm^{-1} revela más abundancia para enlaces C=O (grupos carbonilos esterificados) y enlaces C=O (enlaces carboxilo no metilados)^[6]. Para la variedad *Tecozautila* (espectro D), se observa una banda ancha en la posición de 3314 cm^{-1} comparada con las variedades *Verde* y *Wonderful* bajo la misma técnica de extracción (maceración) lo cual sugiere la contribución de grupos OH, pero en esta ocasión para estructuras de polisacáridos (mucílagos o pectinas), particularmente, un solo pico se posiciona hacia 1647 cm^{-1} que revelan grupos carboxilos libres que sugieren probablemente, un grado de esterificación de las pectinas y probablemente la calidad de las mismas. Finalmente, se ha reportado que la variedad *Tecozautila* posee menor cantidad de compuestos fenólicos con respecto a la variedad *Wonderful* y *Apaceo* (semejante a variedad verde), lo cual concuerda con los espectros analizados.^[7]

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de la cáscara de granada de las variedades *Wonderful* (extracción por maceración y ultrasonido), *Verde* y *Tecozautila* (figura 2). Para la inhibición con las cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, el análisis estadístico de los resultados para la cepa de *Salmonella* muestra que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la variedad *Wonderful* extraída por maceración y la variedad *Verde*; para las cepas restantes no hay diferencia estadísticamente significativa, por lo que se tiene la misma inhibición si usamos cualquiera de las variedades e incluso para *Wonderful* en ambos tratamientos de extracción no hubo diferencia significativa; por lo que se sugiere el uso de extracción por ultrasonidos como una alternativa, ya que se requiere de menos tiempo para la extracción (menos de 1 h) y en cuanto a las variedades de granada, cualquiera podría ser candidata a usarla, sus diferencias en cuanto a características exteriores de la cáscara no afecta la concentración de compuestos con actividad antimicrobiana (sin embargo se sugiere necesario para trabajos futuros realizar la cuantificación de punicalagina, compuesto al cual se ha relacionado la actividad antimicrobiana).

Con respecto al comportamiento de las Cepas frente a los extractos, en la mayoría de los casos hubo diferencia significativa entre ellas, la cepa *E. coli* mostró menor halo de inhibición con todos los extractos comparado con las demás cepas, orden descendiente de halo inhibición fue *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp y *Escherichia coli*, por lo que el efecto inhibitorio se muestra menor para Gram negativas.

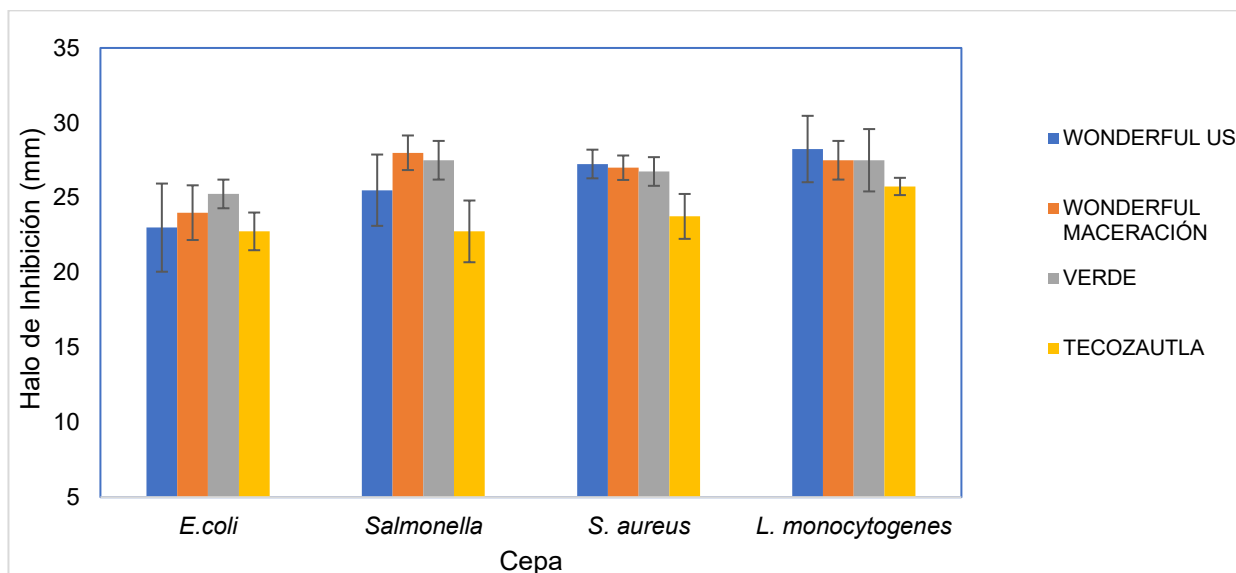


Figura 2. Actividad antimicrobiana de los extractos de las cáscaras de granada.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sobre la presencia de grupos funcionales en los extractos de la cáscara de granada exponen un contenido de polifenoles asociados probablemente a la punicalagina y el ácido elágico. Se obtuvo significativa actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Esta actividad no puede atribuirse a la presencia de una sola molécula del fruto, sino a la acción de los compuestos de carácter fenólico que ejercen efectos sinérgicos, formando un fitocomplejo activo en la inhibición microbiana.

El estudio deja abierta la posibilidad de continuar la investigación sobre este fruto y sobre su aplicación potencial como antimicrobiano natural para la industria alimentaria.^[8]

Bibliografía

1. Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. B., Bouaziz, M., ... & Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International journal of food microbiology*, 241: 123-131.
2. Beatriz Gullon, Manuela E. Pintado, Jose A. Perez- Alvarez, Manuel Viuda-Martos (2016) Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction' *Food control* 59 pp 94-98

3. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. (2014) Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174:417-425. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.035.
4. Chetmat, F., Huma, Z., Kahn, M. (2011) 'Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction', *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, pp. 813-835.
5. Azmir, J. Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., Omar, A. (2013) 'Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review', *Journal of Food Engineering*, 117, pp. 426-436.
6. J.C. Serrano-Niño, C.A. Contreras-Martínez, J.R. Solís Pacheco, A. Zamudio Ojeda, B.R Aguilar Uscanga, A. Cavazos-Garduño (2020) 'Optimization of the biosynthesis of gold nanoparticles using *Hypericum perforatum* and evaluation of their antimicrobial activity' *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19, No. 2 pp 889-902
7. Surendhiran, D., Li, C., Cui, H., & Lin, L. (2020). Fabrication of high stability active nanofibers encapsulated with pomegranate peel extract using chitosan/PEO for meat preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 23, 100439
8. Soltanzadeh, M., Peighambardoust, S. H., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Chitosan Nanoparticles as a Promising Nanomaterial for Encapsulation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract as a Natural Source of Antioxidants. *Nanomaterials*, 11(6), 1439.