

## Estudio de la capacidad inhibitoria contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas de la cáscara de granado *Punica granatum L.*

Maravilla Chavarín J. A.<sup>1</sup>, Ochoa Solórzano R. E.<sup>1</sup>, Castañeda Saucedo M. C.<sup>2</sup>, Serrano Niño J. C.<sup>1</sup> y Cavazos Garduño A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán 1421, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Av. Enrique Arreola Silva No. 883, colonia centro, C. P. 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

Correo: [Jose.maravilla@alumnos.udg.mx](mailto:Jose.maravilla@alumnos.udg.mx)

### Resumen

La cáscara de granada ha sido reconocida como una buena fuente de compuestos bioactivos, que incluyen propiedades antimicrobianas. Debido a la rápida propagación mundial de aislados clínicos resistentes la necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos es de suma importancia. Se evaluó la actividad inhibitoria de diversas cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas por parte de un extracto elaborado a partir de la cáscara de granada variedad Wonderful (*Punica granatum L.*), a través del método de Kirby Bauer (difusión en placa) y determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la inhibición bacteriana entre las tres capas de *exocarpio*, *mesocarpio* y *endocarpio*, por lo que los estudios posteriores se realizaron con una mezcla de estas. La CMI fue distinta para cada cepa, desde 50 µg/mL para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* y 100 µg/mL para *Listeria monocytogenes*; sin embargo, la CMB no se pudo determinar en *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella sp.*, puesto que se mostró crecimiento inclusive con una concentración de 100 µg/mL; en *E. coli* se observó la CMB a partir de 50 µg/mL. Debido a que se obtuvo una respuesta inhibitoria por parte del extracto, se sugiere repetir la metodología llevada a cabo, modificando algunas condiciones que permitan obtener una visión más clara en CMI y la CMB.

**Palabras Clave:** Microbiología, antibiótico, actividad antimicrobiana, difusión en placa.

### Introducción

*Punica granatum L.* es un pequeño árbol de la familia *Punicaceae*. Es un arbusto originario de Asia occidental y Europa mediterránea y que también crece en las zonas de clima cálido de América y otras partes del mundo. Además del uso de sus frutos (granada), *Punica granatum* también se usa en varios sistemas de medicina tradicional contra varias enfermedades [1].

Las cáscaras en las granadas representan aproximadamente el 50% del peso total de la fruta, y la mayoría de las veces se descartan como residuos sin ninguna valorización. Sin embargo, se ha informado que las cáscaras contienen cantidades más altas de compuestos bioactivos y actividades biológicas aún más fuertes que el jugo. La cáscara de granada ha sido reconocida como una buena fuente de antioxidantes dietéticos con potenciales beneficios terapéuticos, que incluyen propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antiobesidad, antidiabéticas, antiulcerogénicas, antihipertensivas y antimutagénicas [2]; es una fuente importante de compuestos bioactivos como ácido elágico y sus derivados, elagitaninos como punicalina y punicalagina, así como ácido hexahidroxidifénico [3].

Los agentes antimicrobianos son fundamentalmente importantes para reducir la carga mundial de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la aparición y diseminación de la cepa multirresistente (MDR) en bacterias patógenas se ha convertido en una amenaza significativa para la salud pública, ya que hay menos, o incluso a veces ninguno, agentes antimicrobianos efectivos disponibles para la infección causada por bacterias patógenas, según la evidencia. Debido a la rápida propagación mundial de aislados clínicos resistentes, la necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos es de suma importancia [4].

Debido a esto, el objetivo del presente trabajo se enfoca en el estudio de la actividad inhibitoria de un extracto elaborado a partir de la cáscara de granada variedad *Wonderful* sobre diversas cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante la evaluación del efecto antimicrobiano y bactericida que este extracto posee, pudiendo ser utilizados para estudios y aplicaciones posteriores.

## Metodología

### *Frutas de granada*

Las frutas de granada de la variedad *Wonderful* fueron recolectadas en Ciudad Guzmán, Jalisco, en septiembre del 2019. Las frutas se pelaron manualmente, recolectando las tres diferentes capas que fueron utilizadas en el estudio: endocarpio, mesocarpio y exocarpio. La cáscara fue secada en una estufa de desecación y luego fue pulverizada con un molino eléctrico.

### *Preparación de extractos*

Para la obtención de los extractos, se colocaron 16 g de cáscara seca en un vaso de precipitado con 80 mL de metanol al 80%, dejando 48 h en reposo. La solución fue filtrada y, posteriormente, se evaporó el metanol en estufa de desecación a 40 °C. Los extractos secos se disolvieron en caldo soya tripticasa a una concentración de 400 mg/mL y esterilizados a través de un filtro de jeringa estéril de 0.22 µm marca Luzeren.

### *Microorganismos y condiciones de cultivo*

Las propiedades antibacterianas de los extractos de granada fueron evaluadas contra las siguientes cepas bacterianas: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Las cepas fueron activadas y mantenidas a 37 °C antes de su uso. Las cepas activas para las pruebas antimicrobianas se sembraron en caldo Mueller-Hinton (MH) a 37 °C durante 8 h, para después de este tiempo ajustar a una concentración de 0.5 en la escala Mc Farland.

### *Diferenciación inhibitoria de endocarpio, mesocarpio y exocarpio*

Para la diferenciación de la actividad inhibitoria entre las tres capas de las cáscaras de granada se utilizó el método de Kirby Bauer (difusión en placa), con las cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria sp.*, con las cuales se hizo la prueba de cada capa por duplicado.

### *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y ensayos de Concentración Mínima Bactericida (CMB)*

La CMI se determinó utilizando un ensayo de acuerdo con la metodología reportada por Wafa y colaboradores [1] con algunas modificaciones. Fueron evaluadas concentraciones del extracto en un rango de 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 mg/mL. El inóculo bacteriano se encontraba a una concentración final de 10<sup>6</sup> CFU/mL de caldo Mueller Hinton, y en el cual fueron añadidos las diferentes concentraciones de los extractos para hacer un volumen final de 5 mL en cada tubo. El experimento también incluyó un control de crecimiento y un control de esterilidad. La prueba fue realizada por triplicado, e incubada durante 24 h a 37 °C y 120 rpm. La concentración del extracto a la cual no hubo crecimiento microbiano visible fue considerada como la CMI.

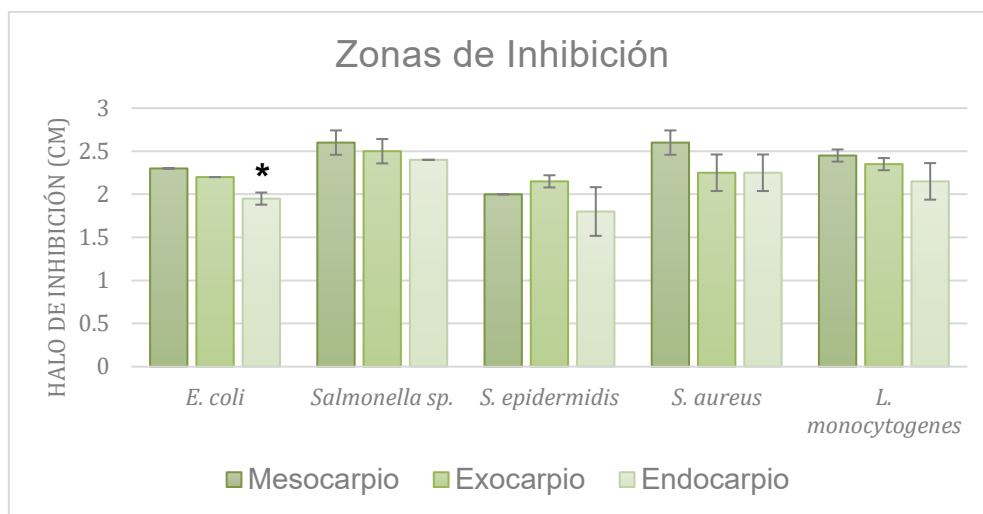
La CMB fue determinada de acuerdo con la metodología reportada por Gullon y colaboradores [3]. Se seleccionaron las muestras que parecían tener poco o ningún crecimiento bacteriano de la prueba de CMI y fueron inoculados alícuotas de 50 µL, utilizando la técnica de extensión en placa en agar Mueller Hinton e incubadas a 37 °C durante 24 h, realizando las pruebas por triplicado. La concentración del extracto que causó la ausencia de colonias en la placa de agar fue considerada como la CMB.

### Análisis estadístico

El estudio estadístico para los datos arrojados en la prueba de diferenciación inhibitoria entre las distintas capas de la cáscara de granada consistió en un análisis de varianza mediante la prueba de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) empleando el paquete estadístico MINITAB18<sup>®</sup>,

### Resultados y discusión.

En el análisis estadístico realizado a los datos en la prueba de inhibición entre las distintas capas de la cáscara de granada se obtuvo diferencia significativa únicamente para la cepa de *E. coli*, en donde el endocarpio mostró estadísticamente menor actividad a mesocarpio y exocarpio (Figura 1), las pruebas de inhibición con las otras cepas resultaron no tener diferencia estadísticamente significativa, en la mayoría de los casos la inhibición fue superior a 2 cm, por lo que se decidió trabajar con la mezcla de los extractos de las tres capas de la cáscara de granada. En vista de que no hay diferencia entre la actividad inhibitoria de las diferentes secciones de las cascara, es posible pesar que la actividad no está relaciona con los pigmentos presentes en el exterior de la cáscara, sino con los taninos que se encuentran también en las secciones blancas de la cáscara y que ahn mostrado en otros estudios actividad antimicrobiana y antifúngica.



**Figura 1.** Zonas de inhibición en diferentes cepas bacterianas. \* indica diferencia significativa entre endocarpio, mesocarpio y exocarpio para cada cepa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB) se muestran en términos de positivo (+) y negativo (-), en donde (+) muestra un crecimiento de la bacteria y (-) no muestra crecimiento. Los valores de la CMI con el extracto de granada fueron variables para cada cepa bacteriana, desde 50  $\mu\text{g/mL}$  para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  para *Listeria monocytogenes* (tabla 1); se procedió a evaluar la CMB de las mismas cepas bacterianas con una concentración de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ .

La CMB no se pudo determinar en *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella sp.*, puesto que se mostró crecimiento inclusive con una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ ; en *E. coli* se observó la CMB a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$ . En otros estudios relacionados con extractos conteniendo taninos se han encontrado actividad

inhibitoria solo a concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , por lo que es necesario evaluar concentraciones mayores de estos extractos [5].

**Tabla 1.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de extracto de cáscara de granada en bacterias Gram positivas y Gram Negativas.

<b>Concentración Mínima Inhibitoria CMI</b>				
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>
100	-	-	-	-
50	+	-	-	-
25	+	+	+	+
12.5	+	+	+	+
6.2	+	+	+	+

<b>Concentración Mínima Bactericida CMB</b>				
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>
100	+	+	-	+
50	+	+	-	+
25	+	+	+	+

## Conclusiones

El extracto de la cáscara de granado variedad “wonderful” presentó actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. Se mostró que no existe diferencia significativa entre las distintas capas de dicha cáscara, exceptuando al endocarpio para la cepa bacteriana *E. coli*. Es posible que la actividad antimicrobiana puede deberse a la presencia de taninos, sin embargo, es necesario la realización de la identificación y cuantificación de estos compuestos en la cáscara.

La concentración mínima inhibitoria del extracto de la mezcla de las tres capas de la cáscara fue variada en cada cepa bacteriana evaluada, desde 50  $\mu\text{g/mL}$  para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* y 100  $\mu\text{g/mL}$  para *Listeria monocytogenes*. No se obtuvieron resultados satisfactorios para CMB, sin embargo, se sugiere hacer un estudio más profundo sobre los factores que puedan influir en la mejora de la actividad antimicrobiana, ya sea evaluar metodologías como ultrasonidos para la obtención de extractos de la cáscara con mayor concentración de compuestos bioactivos, modificar otros factores como lo son la temperatura, aumentar las concentraciones a evaluar y hasta valorar la encapsulación de estos compuestos para su inmovilización.

La cáscara representa alrededor del 50% del peso de la granada, por lo que el aprovechamiento para la obtención de compuestos antimicrobianos naturales representa una alternativa a partir de lo que es considerado un desecho sin valor comercial.

## 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] Alexandre, E., Silva, S., Santos, S., Silvestre, A., Duarte, M., Saraiva, J. & Pintado, M. (2018). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International*, **115**: 167-176.
- [3] Gullon, B., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, **59**: 94-98.
- [4] Manandhar, S., Luitel, S. & Raj Kumar D. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019: 1-5.
- [5] Maisetta, G., Batoni, G., Caboni, P., Esin, S., Rinaldi, A. C., & Zucca, P. (2019). Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. *BMC complementary and alternative medicine*, **19**(1), 82.