



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Evaluación de la actividad antibacteriana de un microencapsulado de
jugo de granada roja (*Punica granatum L.*)

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A

Pedro Álvarez Cervantes

Director

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Codirector

Dr. Santiago Ricardo Tomás Filardo Kerstupp



Pachuca, Hgo., 28 de noviembre de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

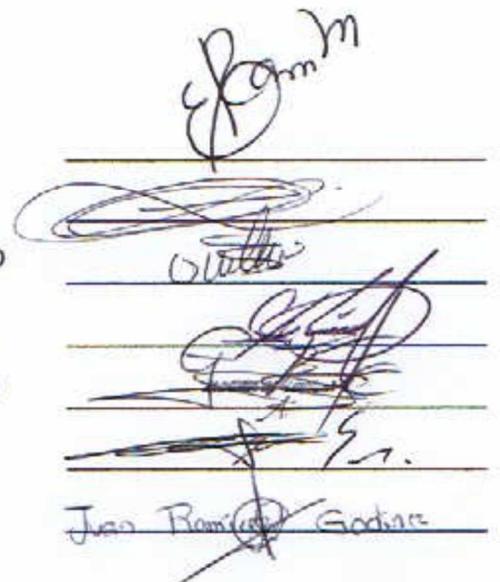
"Evaluación de la Actividad Antibacteriana de un Microencapsulado de Jugo de Granada Roja (*Punica granatum* L.)."

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta el Pasante

C. Pedro Álvarez Cervantes.

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 28 de Noviembre del 2013
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE	DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
SECRETARIO	L.N. MARINA IDALIA ROJO LÓPEZ
PRIMER VOCAL	M. EN B. SILVIA GUILLÉN VELASCO
SEGUNDO VOCAL	BIOL. GABRIEL MUÑOZ ROA
TERCER VOCAL	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
PRIMER SUPLENTE	DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA
SEGUNDO SUPLENTE	Q.A. JUAN RAMÍREZ GODINEZ



Se muestran las firmas manuscritas de los miembros del jurado, cada una sobre una línea horizontal. Las firmas corresponden a: Esther Ramírez Moreno, Marina Idalia Rojo López, Silvia Guillén Velasco, Gabriel Muñoz Roa, Gabriel Betanzos Cabrera, Ernesto Alanís García y Juan Ramírez Godínez.

Dedicatorias y Agradecimientos

A Dios, por darme la fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

Con mucho cariño a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias a mi mamá Petra, por darme la confianza, por sus consejos, por creer en mí, por enseñarme el valor de la vida, por sus cuidados cada día, por brindarme sus experiencias y sobre todo el amor que me ha dado y por su apoyo incondicional. A mi papá Jorge, por su apoyo, por enseñarme a ser un hombre de bien y darme la oportunidad de culminar esta etapa profesional, y gracias por ser mi papá. Los Quiero Mucho y este trabajo es para ustedes, por dejarme una gran herencia, una carrera profesional para mi futuro.

A mis hermanos Isidro y Jorge, por estar conmigo, por compartir momentos buenos y malos, por su cariño y por su apoyo siempre. Gracias a mi hermano Jorge, por sus consejos, por apoyarme y ayudarme en mi trabajo y sin tu admiración no existiría hoy esta tesis. A mi cuñada Edna, por su apoyo, amistad y cariño.

Especial agradecimiento a mi director de tesis, al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera, por su paciencia, por ser la guía, por haberme transmitido sus conocimientos, por sus consejos, por su amistad y por su experiencia he aprendido mucho.

A mi codirector de tesis, Dr. Santiago Ricardo Tomás Filardo Kerstupp, por su valiosa aportación y atinados consejos hicieron posible esta tesis.

A mis sinodales, gracias por sus comentarios, apoyo y tiempo que me han dedicado para leer este trabajo.

Finalmente, gracias a todas las personas que me ayudaron directa e indirectamente en la realización de esta investigación.

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Granada (<i>Punica granatum L.</i>).....	3
3.1.1 Importancia económica.....	3
3.1.1.1 Producción de granada	3
3.1.1.1.1 Producción de granada en México	4
3.1.1.1.1.1 Producción de granada en Hidalgo.....	5
3.1.2 Características Generales	6
3.1.3 Condiciones climáticas para el desarrollo de la granada.....	8
3.1.3.1 Recolección del fruto.....	8
3.1.3.2 Almacenamiento de la granada.....	8
3.1.3.3 Cambios post-recolección	9
3.1.4 Composición nutricional de la granada.....	10
3.1.5 Compuestos bioquímicos y bioactivos de la granada	10
3.1.6 Propiedades de la granada.....	12
3.1.6.1 Propiedades antibacterianas.....	13
3.2 Microencapsulación.....	15
3.2.1 Métodos de microencapsulación	18
3.2.1.1 Microencapsulación mediante secado por aspersion.....	19
3.2.1.1.1 Microencapsulación de jugos mediante secado por aspersion.....	20
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	21
5. JUSTIFICACIÓN	22
6. OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo General	23
6.2 Objetivos Específicos	23

7. HIPÓTESIS	23
8. MATERIAL Y MÉTODOS	24
8.1 Tipo de estudio	24
8.2 Obtención del fruto	25
8.3 Elaboración de microencapsulado de jugo de granada roja.....	25
8.4 Determinación de tamaño y morfología de microcápsulas de jugo de granada roja mediante microscopio electrónico de barrido	26
8.5 Cepas bacterianas empleadas	26
8.5.1 Propagación y conservación de cepas bacterianas	26
8.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria e inhibición del crecimiento bacteriano.....	27
8.6.1 Preparación del inóculo	27
8.6.2 Preparación de soluciones de microencapsulado de jugo de granada roja y microencapsulado sin jugo de granada roja	27
8.6.2.1 Evaluación de la actividad antibacteriana de MJGR	28
8.6.2.1.1 Medición de la inhibición del crecimiento bacteriano por turbidez ...	29
9. RESULTADOS.....	31
9.1 Microencapsulado de jugo de granada roja.....	31
9.2 Tamaño y morfología de microcápsulas de jugo de granada roja.....	31
9.3 Concentración mínima inhibitoria de microencapsulado de jugo de granada roja.....	31
9.4 Inhibición de crecimiento sobre las cepas en prueba.....	34
10. DISCUSIÓN	39
11. CONCLUSIONES	48
12. PERSPECTIVAS.....	49
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Componentes de la Granada.....	7
Figura 2. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas.....	16
Figura 3. Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación, así como los métodos de cada proceso.....	18
Figura 4. Esquema general del proceso metodológico.....	24
Figura 5. Polvo fino obtenido mediante secado por aspersion: MJGR.....	31
Figura 6. Microfotografías de microcápsulas de jugo de granada roja a, b, c y d en orden creciente de aumento: x500, x1000, x5000 y x10000, respectivamente, mediante secado por aspersion	32
Figura 7. Concentración mínima inhibitoria (250 mg/mL) de MJGR sobre <i>M. luteus</i> en tubo.....	34
Figura 8. Inhibición de crecimiento de: a) <i>P. aeruginosa</i> , b) <i>S. flexneri</i> , d) <i>E. coli</i> con una CMI de 300 mg/mL de MJGR y c) <i>M. luteus</i> con una CMI de 250 mg/mL de MJGR.....	36
Figura 9. Inhibición de crecimiento de: a) <i>K. pneumoniae</i> , b) <i>S. typhi</i> , c) <i>E. faecalis</i> y d) <i>P. vulgaris</i> correspondiente a una CMI de 300 mg/mL de MJGR..	37
Figura 10. Inhibición de crecimiento de: a) <i>S. aureus</i> y b) <i>E. sakazakii</i> correspondiente a una CMI de 300 mg/mL de MJGR..	38

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Producción Nacional de granada en el 2010, 2011 y 2012.....	5
Tabla 2. Producción de granada en Hidalgo en el 2010, 2011 y 2012.....	6
Tabla 3. Características y condiciones recomendadas para el almacenamiento.....	9
Tabla 4. Composición media de los arilos de la granada.....	11
Tabla 5. Componentes de la granada y sus constituyentes característicos.....	12
Tabla 6. Tipos de agentes encapsulantes utilizados en microencapsulación	18
Tabla 7. Concentraciones de MJGR y controles correspondientes	28
Tabla 8. Controles y muestras utilizados en experimentación	29
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de MJGR contra diferentes cepas bacterianas.....	33

ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grados centígrados
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetro
CLSI	instituto de estándares clínicos y de laboratorio
cm	centímetros
CMH	caldo Mueller-Hilton
CMI	concentración mínima inhibitoria
CMIs	concentraciones mínimas inhibitorias
CT	control
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
EGCG	epigallocatequin galato
g	gramos
ha	hectáreas
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kcal	kilocalorías
m	metros
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mA	miliamperes
MEB	microscopio electrónico de barrido
mg	miligramos
mg/mL	miligramos por mililitro
MJGR	microencapsulado de jugo de granada roja
mL	mililitros
MSJGR	microencapsulado sin jugo de granada roja

nm	nanómetros
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
rpm	revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
SIAP	sistema de información agroalimentaria y pesquera
Ton	toneladas
torr	milímetro de mercurio
TX	tratamiento
UFC	unidades formadoras de colonia

1. RESUMEN

La granada (*Punica granatum L.*), es un fruto con una fuente importante de compuestos polifenólicos, que le confieren propiedades antibacterianas. Sin embargo, la granada es un fruto de temporada, es por ello que resulta necesario extender su vida útil mediante la conservación de alimentos con la condición que preserven sus propiedades en la mayor medida posible. La microencapsulación, es un método que se ha aplicado para conservar compuestos presentes en los alimentos. Por lo que el objetivo del presente estudio, fue evaluar la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos. La microencapsulación se realizó por un método de secado por aspersión bajo una patente en registro. El polvo obtenido se observó por microscopio electrónico de barrido para verificar la encapsulación. La actividad antibacteriana se llevó a cabo por el método de microdilución en caldo, y una vez encontrada la concentración mínima inhibitoria, se evaluó la actividad bacteriostática y bactericida a través de la medición de la inhibición del crecimiento bacteriano. Se obtuvo un microencapsulado de jugo de granada roja en forma de polvo fino observándose microcápsulas esféricas e irregulares entre 1 a 30 μm en promedio. Comparado con los controles correspondientes incluyendo un control que sólo tuvo compuestos para hacer el microencapsulado, se encontró una concentración mínima inhibitoria de 250 mg/mL contra *M. luteus* con actividad bactericida, y una concentración mínima inhibitoria de 300 mg/mL para *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus* con efecto bacteriostático. Los componentes del microencapsulado inhibió por sí solo a *P. aeruginosa*, mientras que la inhibición sobre *E. sakazakii* no fue significativa. En general, los resultados demostraron que el microencapsulado de jugo de granada roja tuvo actividad antibacteriana por lo que podría emplearse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas.

Palabras clave: Granada, actividad antibacteriana, microencapsulado de jugo de granada roja, concentración mínima inhibitoria, bactericida, bacteriostático.

2. ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum L.*), is a fruit with an important source of bioactive compounds mainly polyphenolic compounds, which confer antibacterial properties. However, the pomegranate is a fruit of season, therefore it is necessary to extend its storage life by means foods conservation methods the conservation of foods in order to preserve their properties as much as possible. The microencapsulation is a method that has been applying to conserve bioactive compounds present in foods. The aim of this work was to evaluate the antibacterial activity of a microencapsulated of red pomegranate juice against bacterial strains of medical importance and in foods. The microencapsulation was done by a method of spray drying under a patent in register. Retrieved powder was observed by scanning electron microscope to verify the encapsulation. The antibacterial activity was conducted by the broth microdilution method, and once found the minimal inhibitory concentration, bacteriostatic and bactericidal activities were evaluated by the inhibition of growth bacterial. A microencapsulated of red pomegranate juice as fine powder was obtained and irregular and spherical microcapsules from 1 to 30 μm on average were observed. Compared with the appropriate controls such as those that had only components to make the microencapsulated, he found a minimal inhibitory concentration of 250 mg/mL against *M. luteus* with bactericidal activity, and a minimal inhibitory concentration of 300 mg/mL for *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus* with bacteriostatic effect. Microencapsulated components alone inhibited the *P. aeruginosa* growth and the inhibition on *E. sakazakii* strain was no significant. Overall, the results showed that the microencapsulated of red pomegranate juice had antibacterial activity with most of the strains studied, thus, it could be used as a nutraceutical product in the prevention and treatment of infectious bacterial.

Keywords: Pomegranate, antibacterial activity, microencapsulated of red pomegranate juice, minimal inhibitory concentration, bacteriostatic, bactericidal.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Granada (*Punica granatum L.*)

Es el fruto de un árbol llamado granado, que pertenece a la familia de *Punicaceae*, es un árbol caducifolio distribuido alrededor del mundo (Dipak *et al.*, 2012). Es uno de los frutos hortícolas importantes y comerciales, que generalmente se adapta al clima mediterráneo (Akbarpour *et al.*, 2009), y se presume que se originó en el continente asiático (Bell y Hawthorne, 2008), principalmente en el suroeste de Irán y el norte de Turquía (Ercisli *et al.*, 2011). Históricamente, el uso de granada fue elogiado por el antiguo testamento de la biblia, la torah judía y el talmud de babilonia como una fruta sagrada que confiere poderes de la fertilidad, abundancia y buena suerte (Jurenka, 2008; Miguel *et al.*, 2010). El nombre del género *Punica*, surgió por el nombre Romano Cartago, donde las mejores granadas eran conocidas por su gran crecimiento (Jurenka, 2008).

En México este cultivo fue introducido por españoles después de la conquista junto con el durazno, la manzana, la higuera y la vid. Su cultivo fue promovido en huertas familiares por los frailes que evangelizaron a los grupos indígenas. Estas huertas proveían de fruta fresca para el consumo doméstico y el mercado local. Este tipo de explotación persiste hasta nuestros días en todos los estados de la región centro de México (Mondragón y Juárez, 2008).

3.1.1 Importancia económica

3.1.1.1 Producción de granada

En los últimos años, la producción mundial y el consumo de la granada se han incrementado considerablemente. Actualmente dentro de los países líderes en el cultivo se encuentran: India, Afganistán, Irak, España, Israel y los Estados Unidos de Norteamérica (Basu y Penugonda, 2009). España es uno de los principales productores del mundo y el mayor exportador europeo (Mackness *et al.*, 1999; Mertens *et al.*, 2006). La producción mundial de granada en el 2010 fue de 2,150 000

toneladas (ton), la exportación de 125,000 ton y la superficie sembradas de 166,500 hectáreas (ha) (Castañeda-Saucedo *et al.*, 2012).

La granada es de importancia económica en muchos países ya que a partir de este fruto se pueden obtener y comercializar: jugos, mermeladas, gelatinas, confituras, preparados de granada en cuarta gama, helados, cremas, geles, medicamentos, comprimidos nutracéuticos y saborizantes/colorantes en bebidas (Prakash y Prakash, 2011; Castañeda-Saucedo *et al.*, 2012). En la actualidad, el principal uso de la granada es su consumo en fresco (Prakash y Prakash, 2011). Aunque en los últimos años se ha aumentado constantemente la industrialización para la obtención de jugos y extractos de sus diferentes partes. (Castañeda-Saucedo *et al.*, 2012).

3.1.1.1.1 Producción de granada en México

México no figura dentro de los grandes productores a nivel mundial de granada, a pesar de que tiene diversas regiones en su territorio con las condiciones climáticas óptimas para su cultivo. Los estados con mayor producción de cultivo de granada en ton en los años de 2010, 2011 y 2012 fueron: Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato, respectivamente (Tabla 1) (SIAP, 2013).

A pesar de sus propiedades funcionales del fruto, la granada no ha impactado en el mercado y probablemente esto sea debido a que ésta es consumida en forma esporádica y estacional, usualmente como fruta fresca y como guarnición de platillos y ensaladas de fiestas patrias, así mismo incluye dificultades en su consumo como fruto fresco; el cual es relativamente difícil de pelar y en algunas variedades se liberan soluciones que tiñen la ropa y las manos del consumidor (Mondragón y Juárez, 2008; Mercado *et al.*, 2011; Castañeda-Saucedo *et al.*, 2012), además de que es un fruto que se encuentra disponible en un periodo corto; por lo que después de su maduración es difícil su conservación y manejo, produciéndose una serie de alteraciones que afectan la atención del consumidor (Mirdehghan *et al.*, 2007).

Tabla 1. Producción Nacional de granada en el 2010, 2011 y 2012

Estado	Producción	Producción	Producción
	2010	2011	2012
	Toneladas	Toneladas	Toneladas
Aguascalientes	24.00	8.00	---
Baja california	21.00	22.40	36.00
Coahuila	125.00	110.00	70.00
Colima	140.75	130.10	114.00
Guanajuato	676.00	524.00	1,076.50
Hidalgo	1,092.50	983.00	911.80
Jalisco	63.00	57.84	55.50
Estado de México	164.00	231.50	37.50
Michoacán	40.80	48.00	40.00
Morelos	0.00	0.00	90.00
Oaxaca	1,200.67	1,362.88	1,224.04
Puebla	40.50	138.00	134.80
Querétaro	12.00	10.75	11.00
San Luis Potosí	55.08	54.00	46.35
Sonora	704.00	360.00	586.92
Zacatecas	12.07	11.40	10.50
Total	4,371.37	4,051.87	4,444.91

Fuente: SIAP, 2013.

Se espera un incremento futuro en el consumo en base a las propiedades terapéuticas del jugo de este fruto, información que ha influido en el crecimiento significativo que actualmente en Norteamérica, Europa y los países árabes, contrasta con la falta de información e indiferencia del consumidor mexicano (Mondragón y Juárez, 2008).

3.1.1.1.1 Producción de granada en Hidalgo

Durante el 2013, el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó datos que muestran que el estado de Hidalgo estuvo dentro de los tres primeros lugares a nivel nacional en producción de granada en ton en los años de 2010, 2011, y 2012 (Tabla 2). Los municipios del estado de Hidalgo con mayor

producción de granada en los años de 2010, 2011 y 2012 son los pertenecientes a la región del Valle del Mezquital, en donde Tasquillo, Chilcuautla y Metztlán encabezan la producción estatal total (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de granada en Hidalgo en el 2010, 2011 y 2012

Municipio	Producción	Producción	Producción
	2010	2011	2012
	Toneladas	Toneladas	Toneladas
Chilcuautla	280.00	240.00	200.00
Metzquitlán	60.00	66.00	66.60
Metztlán	67.50	75.00	60.00
Tasquillo	625.00	546.00	529.20
Tecozautla	35.00	32.00	36.00
Zimapán	25.00	24.00	20.00
Total	1,092.50	983.00	911.80

Fuente: SIAP, 2013.

A pesar de que el estado de Hidalgo se ubica dentro de los primeros productores de granada a nivel nacional, la producción de la misma es limitada en comparación con otros frutos de temporada y esto se debe a que es un fruto perecedero o por la falta de cultura en cuanto a su consumo (SIAP, 2013).

3.1.2 Características Generales

Árbol

Es un árbol pequeño caducifolio arbustivo, típicamente crece de 3 a 5 m de altura, con el tronco torcido, madera dura y corteza escamosa de color grisáceo, algunas de las ramas son espinosas, tiene ramilla angulosa, copa extendida y con mucho ramaje. La granada prefiere los suelos profundos, arcillosos, bien drenados y adaptables (FAO, 2006, Jurenka, 2008, Dipak *et al.*, 2012).

Flores

Se producen en verano donde la lluvia es mínima (Dipak *et al.*, 2012), son solitarias o reunidas en grupos de 2 a 5 al final de las ramas nuevas, grandes, color rojo, lustrosas, acampanadas, sustentadas, con 5-8 pétalos y sépalos con un tamaño de 3

cm (FAO, 2006; Dipak *et al.*, 2012) y el cáliz tubular que eventualmente se convierte en el fruto (Figura 1A) (Jurenka, 2008).

Hojas

Tienen un tamaño de 3-7 cm de largo y 2 cm de ancho (Dipak *et al.*, 2012), simples, opuestas, generalmente fasciculadas (FAO, 2006), coriáceas brillantes, en forma de lanza y color verde oscuro (Figura 1B) (Dipak *et al.*, 2012).

Fruto

El fruto es una baya grande, piel brillante, gruesa coriácea y globulosa de 10-15 cm de diámetro (Figura 1C) (FAO, 2006). La parte comestible del fruto se llama arilo (Figura 1D) forma prismática y constituye el 52% del total de la granada, del cual el 78% corresponde al jugo (Figura 1F) y el 22% a las semillas, estos arilos están cubiertos por una membrana blanca que los separa y protege llamada pericarpio (Figura 1E) (Jurenka, 2008).

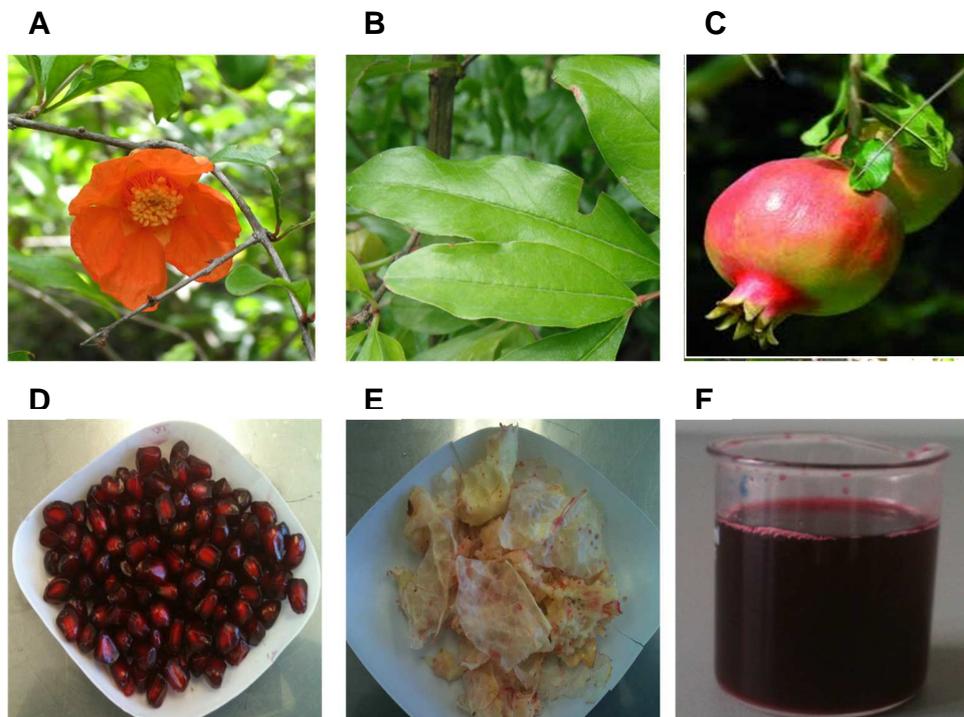


Figura 1. Componentes de la Granada. A. Flor; B. Hojas; C. Fruto; D. Arilos; E. Pericarpio y mesocarpio; F. Jugo.

3.1.3 Condiciones climáticas para el desarrollo de la granada

El cultivo de granada tiene a favor una amplia tolerancia térmica (-12° C a 40° C) en fase vegetativa, es sensible a las heladas antes de latencia invernal y en floración, y tiene un escaso requerimiento de frío. Se cultiva en regiones áridas, subtropicales y tropicales. El fruto tolera la sequía, no resiste bien la lluvia en épocas de madurez y se adapta a una amplia variedad de suelos (incluso tolera la salinidad) aunque prefiere los suelos profundos. Además, exige mucha agua y frescura para sus raíces y solamente en estas condiciones es cuando da muchos frutos de buena calidad (FAO, 2006).

Entre las regiones áridas de cultivo se encuentra el sureste de Asia e Indias orientales, y como áreas tropicales están el continente Africano. También se cultiva en las regiones secas de norte, centro y sur de América (Jurenka, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2011).

En México habita en climas subtropical, tropical seco o semiárido con verano lluvioso (Mondragón y Juárez, 2008; Cienciacierta, 2009). En tales condiciones, el fruto puede llegar a su tamaño óptimo, color y acumulación de azúcar, sin el peligro de partición de la cáscara (Fabela, 2012).

3.1.3.1 Recolección del fruto

La recolección normalmente empieza en el mes de julio hasta septiembre y dependiendo la temporada, se pueden encontrar incluso en el mes de octubre. La cosecha se realiza manualmente y se recomienda usar tijeras de podar teniendo un manejo adecuado, ya que los frutos son sensibles a los golpes (Mondragón y Juárez, 2008).

3.1.3.2 Almacenamiento de la granada

La temperatura óptima de almacenamiento de la granada es de 5–7 °C por un máximo de 3 meses, para un almacenamiento más prolongado, se recomienda usar

una temperatura de 10°C para evitar daños por frío. La humedad relativa óptima es de 90-95% (Tabla 3) (FAO, 2006).

Tabla 3. Características y condiciones recomendadas para el almacenamiento

Temperatura máxima de Almacenamiento	Humedad Relativa	Temperatura máxima de congelación	Vida de almacenamiento aproximada
5–7 °C	90–95 %	-3 °C	2–3 Meses

Fuente: FAO, 2006.

3.1.3.3 Cambios post-recolección

La granada está catalogada como una fruta no climatérica, y a pesar de tener una baja tasa de respiración es un producto altamente perecedero (Mirdehghan *et al.*, 2007). Esto se debe a que después de su recolección la granada continua con su actividad metabólica, produciéndose una serie de alteraciones que determinan su pérdida de calidad en un período relativamente corto (Mirdehghan *et al.*, 2007; Serrano, 2011).

Entre estas alteraciones destacan: deshidratación, aumento de la respiración, daños por frío y sobre-maduración (que incluye pérdida de compuestos bioactivos) que pueden asociarse también por los daños mecánicos que pueda sufrir el fruto durante la recolección y manipulación posterior, ya que aunque la piel de la granada es bastante gruesa y parece resistente, la realidad es que se daña fácilmente con pequeños golpes o abrasiones, que ocasionan micro-roturas y fisuras en sus tejidos lo que provoca aumento de la deshidratación y pardeamiento, y supone un foco de entrada para los microorganismos (Mirdehghan *et al.*, 2007; Serrano, 2011). Además, otra causa importante de deterioro y pérdida de calidad del fruto, es la aparición de podredumbres, causada principalmente por hongos, tanto en el interior como en el exterior del fruto (Serrano, 2011), a pesar de que el jugo de granada tiene un pH ácido que oscila entre 2.9 y 3.7 (Sepúlveda *et al.*, 2010), provoca alteración fúngica como pudrición en los granos y de las membranas del fruto (Serrano, 2011).

Estos factores hacen que después de su madurez, el fruto sea difícil su conservación y manejo, ocasionando problemas de apariencia hacia el consumidor. Una alternativa es procesar la parte comestible sin alterar su calidad para el mercado, por lo tanto es interesante los arilos de granada como materia prima para la elaboración de jugo de granada, igualmente se puede utilizar mezclándola con otros productos para desarrollar sabor o para ampliar sus cualidades saludables.

3.1.4 Composición nutricional de la granada

La granada es un fruto nutricionalmente rico como se muestra en la Tabla 4, está compuesto por agua y azúcares y bajo en grasas y proteínas, lo que le confiere un bajo contenido calórico (63-78 kcal/100 g). Presenta también una pequeña proporción de fibra alimentaria, localizada fundamentalmente en el piñón (0.3-0.9 g/100 g), es rica en potasio y aporta cantidades considerables de calcio, magnesio, fósforo, hierro y sodio. Además contiene, vitaminas del grupo B, C y niacina (FAO/WHO, 2009). Dentro de los ácidos orgánicos se componen de ácido málico y cítrico (García y Pérez, 2004). Los fenoles totales se encuentran en una elevada concentración de 250 mg/100 mL de jugo, comparable a la del vino tinto (valores medios de 203 mg/100 mL) y muy superior a la del té verde (103 mg/100 mL) (Gil *et al.*, 2000; García y Pérez, 2004).

3.1.5 Compuestos bioquímicos y bioactivos de la granada

En la última década, se han generado avances significativos en la dilucidación de los mecanismos farmacológicos de la granada y los componentes individuales responsables de ellos. Los extractos de todas las partes de la fruta como son: la cáscara, raíces y hojas del árbol, además del fruto parecen tener propiedades terapéuticas (Jurenka, 2008).

Investigaciones actuales, apuntan a que los beneficios terapéuticos de la granada son debido a sus compuestos polifenólicos (Arun y Singh, 2012). Entre los que se encuentran son: ácido elágico, ácido galico, elagitaninos (punicalina y punicalagina),

Tabla 4. Composición media de los arilos de la granada

Constituyente	Concentración
Energía(kcal)	63-78
Agua (g)	82,5
Fibra (g)	0.3 – 0.9
Proteínas (g)	0,7
Lípidos (g)	0,6
Hidratos de carbono (g)	16,7
Glucosa	7,2
Fructosa	7,9
Sacarosa	1,0
Cenizas (g)	0.5
Minerales (mg)	
Sodio	7,0
Potasio	290,0
Calcio	8,0
Magnesio	0.15
Manganeso	3.0
Fósforo	17,0
Hierro	0,5
Selenio	0.6
Zinc	0.12
cobre	0.07
Vitaminas (mg)	
Tiamina (Vitamina B1)	0,05
Riboflavina (Vitamina B2)	0,02
Ácido ascórbico (Vitamina C)	7,0
Nicotinamida	0,3
Ácido pantoténico	0.596
Ácidos orgánicos (g)	0,77
Ácido málico	0,1
Ácido cítrico	0,5

Contenido en 100g de porción comestible (arilo). kcal: kilocalorías, g: gramos, mg: miligramos.

Fuente: García y Pérez, 2004; FAO/WHO, 2009.

flavonoides, antocianidinas (derivados 3-glucósidos y 3,5 diglucósidos de delphinidina, cianidina y pelargonidina), antocianos, flavonoles, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, catequinas y lignanos (Gil *et al.*, 2000; García y Pérez, 2004; Bell y Hawthorne, 2008; Nishigaki *et al.*, 2008; Gonera *et al.*, 2010; Miguel *et al.*, 2010; Mena *et al.*, 2011; Karasu *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013. Los fenoles totales se encuentran en una elevada concentración de 250 mg/100 mL de jugo,

comparable a la del vino tinto (valores medios de 203 mg/100 mL) y muy superior a la del té verde (103 mg/100 mL) (Gil *et al.*, 2000; García y Pérez, 2004). En la Tabla 5 se muestra los componentes y sus constituyentes característicos.

Tabla 5. Componentes de la granada y sus constituyentes característicos

Componentes de la planta	Constituyentes principales
Pericarpio (piel + arilos)	Punicalaginas, compuestos fenólicos, ácido gálico y otros ácidos grasos, catequizas, EGCG (epigallocatequina galato), quercetina, rutina, flaconas, flavanonas y antocianidinas
Aceite de semillas	95 % ácido púnicico, ácido elágico, ácidos grasos, esteroides
Jugo de granada	Antocianos, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, catequinas, EGCG, quercetina, rutina, minerales, aminoácidos
Extracto de las hojas	Taninos (punicalina y punicafolina), glicósidos de flavonas, incluido la luteolina y apigenina
Extracto de las flores	Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, ácido asiático, ácido maslínico y otros constituyentes sin identificar
Extracto de las raíces y corteza	Taninos (punicalina y punicalagina) y numerosos alcaloides

Fuente: Jurenka, 2008; Sabbar *et al.*, 2010.

La clase y la estructura química específica de cada fenólico ha demostrado contribuir significativamente las propiedades biológicas únicas de la granada y dependen de factores tales como especie, variedad, índice de madurez, las condiciones ambientales y agronómicas (García y Pérez, 2004; Miguel *et al.*, 2010).

3.1.6 Propiedades de la granada

Existen diversos estudios relacionados con las propiedades que presentan los componentes de la granada. Por su contenido polifenólico, Bell y Hawthorne (2008), Jurenka (2008) y Miguel *et al.*, (2010) han demostrado que el fruto de la granada tienen entre 2 y 3 veces más capacidad antioxidante que el vino tinto o el té verde. Como anticancerígeno, se ha demostrado que inhibe potencialmente la invasión de células cancerígenas prostáticas, induce a la apoptosis, causa ruptura en el ciclo celular e inhibe el crecimiento tumoral (Bell y Hawthorne, 2008; Jurenka, 2008; Gonera *et al.*, 2010). Como antiinflamatorio, inhibe las enzimas lipo-oxigenasa y

ciclo-oxigenasa, que son mediadores proinflamatorios (Jurenka, 2008; Gonera *et al.*, 2010; Arun y Singh, 2012). También se ha asociado en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares; disminuyendo la absorción de colesterol en sangre, lo que reduce significativamente colesterol total y colesterol HDL (Bell y Hawthorne, 2008; Jurenka, 2008; Miguel *et al.*, 2010; Arun y Singh, 2012).

Otras propiedades asociadas con el consumo del fruto de la granada son sus propiedades hipoglucemiantes en pacientes con diabetes tipo 2 (Jurenka, 2008; Gonera *et al.*, 2010; Arun y Singh, 2012). También tiene propiedades antihipertensivas, disminuyendo la presión sistólica en pacientes con hipertensión, inhibiendo la enzima que convierte angiotensina en suero (Jurenka, 2008). Además como remedio en casos de heridas, bronquitis, diarrea e infecciones dérmicas (Dipak *et al.*, 2012), actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana (Jurenka, 2008; Bell y Hawthorne, 2008; Miguel *et al.*, 2010; Arun y Singh, 2012; Dipak *et al.*, 2012).

3.1.6.1 Propiedades antibacterianas

En las últimas décadas, el interés en la evaluación de los efectos terapéuticos de las plantas ha incrementado, ya que el 80% de las personas confían que es una medicina complementaria y alternativa para tratamiento médico (Abdollahzadeh *et al.*, 2011). Las plantas han demostrado ser buenas opciones sobre agentes químicos sintéticos como los antibióticos y antimicrobianos, debido a los efectos secundarios que manifiestan y a la resistencia a los antimicrobianos y la aparición de infecciones previamente infrecuentes que se presentan por el uso y aumento inadecuado de productos farmacéuticos (Höfling *et al.*, 2010). Por esta razón, las plantas podrían jugar un papel importante en el desarrollo de potentes agentes terapéuticos (Arun y Singh, 2012; Dipak *et al.*, 2012), ya que son fuente importante de compuestos antimicrobianos naturales, como: alcaloides, flavonoides, esteroides, fenoles, terpenos, aceites volátiles etc. (Growther *et al.*, 2012). La granada ha demostrado tener propiedades antimicrobianas (Jurenka, 2008; Bell y Hawthorne, 2008; Miguel *et al.*, 2010; Mena *et al.*, 2011; Arun y Singh, 2012; Dipak *et al.*, 2012).

Gran parte de la actividad antibacteriana de la granada se ha reportado a base de diversos extractos del fruto, presentando la capacidad de prevenir y tratar infecciones bacterianas (Miguel *et al.*, 2010). En numerosos ensayos *in vitro* se ha demostrado actividad antimicrobiana contra diferentes cepas de microorganismos incluyendo: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium patulum*, *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus ochraceus* y *Candida albicans*, mostrando actividad antibacteriana y antifúngica (Jurenka, 2008; Duman *et al.*, 2009; Sadeghian *et al.*, 2011; Parseh *et al.*, 2012).

De igual forma extractos orgánicos como el metanólico de cáscara han inhibido *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Yersenia enterocolitica* utilizando tanto *in vitro* (difusión en agar) y métodos *in situ* (alimentos). Los autores atribuyen esta actividad al alto contenido de polifenoles en la cáscara (Miguel *et al.*, 2010).

Por otro lado, Viuda-Martos *et al.*, (2010) reportaron que el extracto metanólico de cáscara de granada tuvo efecto contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi*. Asimismo, los autores dieron a conocer que extractos acuosos, etanólicos y butanólicos tuvieron actividad antimicrobiana cuando se probaron contra *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*. Mientras que extractos de acetona, metanol, etanol y acuoso de granada revelaron que fueron activos y eficaces contra microorganismos probados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera* y *Shigella flexneri*). En tanto que el extracto de pericarpio tuvo actividad contra *Salmonella typhi*. Además, se han

probado extractos acuosos y etanólicos contra cepas de *Escherichia coli* (Arun y Singh, 2012).

3.2 Microencapsulación

La encapsulación se puede definir como una técnica en la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo sustancias bioactivas (Parra, 2010), como: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, polifenoles, fibras, enzimas, olores y sabores (Yáñez *et al.*, 2002; Fernández, 2011; Lupo *et al.*, 2012).

Esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con polímeros para crear un entrecruzamiento con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación ocasionados por la luz o el oxígeno (Fuchs *et al.*, 2006; Yáñez *et al.*, 2006; Fernández, 2011).

En términos generales, la encapsulación constituye un medio para envasar, separar y almacenar materiales para su posterior liberación gradual bajo condiciones controladas. Se utiliza de igual manera el término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se emplean indistintamente y lo que los diferencia es el tamaño de la cápsula (Yáñez *et al.*, 2002; Yáñez *et al.*, 2006; Filardo *et al.*, 2010; Parra, 2010).

Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o absorbidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación. En el caso de la industria alimentaria el término utilizado es la microcápsula, que aplica

para partículas que tienen tamaños que van desde 1 a 5000 μm de diámetro, y nanocápsulas aquellas que son inferiores a 1 μm de diámetro (Pedroza *et al.*, 2002).

Lozada (2009) reporta que dependiendo la estructura de las microcápsulas, éstas se pueden clasificar en:

- 1) En el **sistema reservorio o capsular**: el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se haya envuelto por una fina película del material de recubrimiento. En la Figura 2a se puede observar el caso de una partícula con el interior lleno, o bien con el interior parcialmente vacío creando una microcápsula hueca (Figura 2b).
- 2) Para el caso del **sistema matricial**: el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Se puede tener una estructura en forma de espuma en donde el material activo se encuentre repartido en toda la microcápsula y la cubierta permanece intacta (Figura 2c) o bien en una estructura abierta en forma de red (Figura 2e).

La forma de la microcápsula puede ser esférica o bien presentar una forma irregular (Figura 2g).

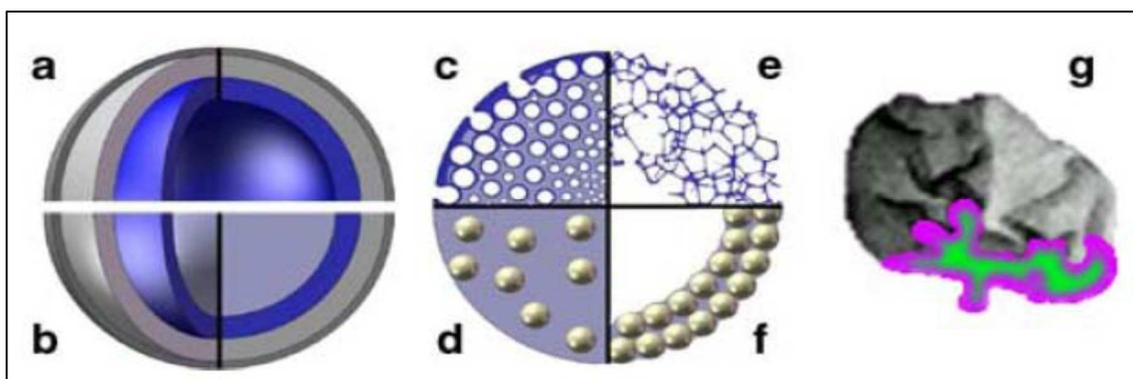


Figura 2. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. a) microcápsula con interior lleno, b) microcápsula con interior parcialmente vacío, c) y d) microcápsulas intactas, e) y f) microcápsulas con estructuras en formas de red y g) microcápsula con estructura en forma irregular.

Fuente: Lozada, 2009.

Las variaciones de las microcápsulas con varios núcleos, sucede debido a las propiedades fisicoquímicas del núcleo, la composición del material encapsulante y a la técnica de microencapsulación (Parra, 2010)

Hoy en día, la industria alimentaria ha utilizado la microencapsulación en una variedad de sustancias alimentarias, o materiales como: lípidos (aceites esenciales), sabores volátiles, bacterias probióticas, lactosuero, nutracéuticos, semillas de frutas como uva, guayaba, papaya, manzana, mora entre otras además de: enzimas, pigmentos vegetales, antioxidantes, componentes de aromas, vitaminas, minerales, leche entre otros alimentos (Parra, 2010).

Derivado a lo anterior, la aplicación de la microencapsulación es empleada por varias razones (Beristáin, 2001):

- a) La encapsulación puede proteger al material de la degradación al reducir su reactividad con el ambiente externo (calor, humedad, aire y luz).
- b) Reducción o retardo de su velocidad de evaporación o transferencia del material al ambiente externo.
- c) Las características físicas del material original pueden modificarse haciéndolo manejable.
- d) El producto se puede diseñar para la liberación lenta a lo largo del tiempo o liberarse en un determinado instante (hasta el estímulo correcto).

En el proceso de encapsulación y microencapsulación se utilizan diversos agentes encapsulantes (Tabla 6) que son de gran importancia para la producción del encapsulado, sus principales características son (Aguilar, 2007):

- a) Formar una película.
- b) Poseer enlaces moleculares que no permitan rotación.
- c) Conservar una estructura y conformación tales que permitan la formación de redes que tengan baja porosidad.
- d) Tener un grado de integridad alto al ser eliminada el agua.

Tabla 6. Tipos de agentes encapsulantes utilizados en microencapsulación

Tipo de cobertura	Cobertura específica
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas
Proteínas	Gluten, caseína, gnetina, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

Fuente: Yáñez *et al.*, 2002.

3.2.1 Métodos de microencapsulación

Existen diversos métodos para la producción de microencapsulado. En general, estos métodos se pueden dividir en: químicos y mecánicos. En la Figura 3 se observan los principales métodos de encapsulamiento de sustancias.

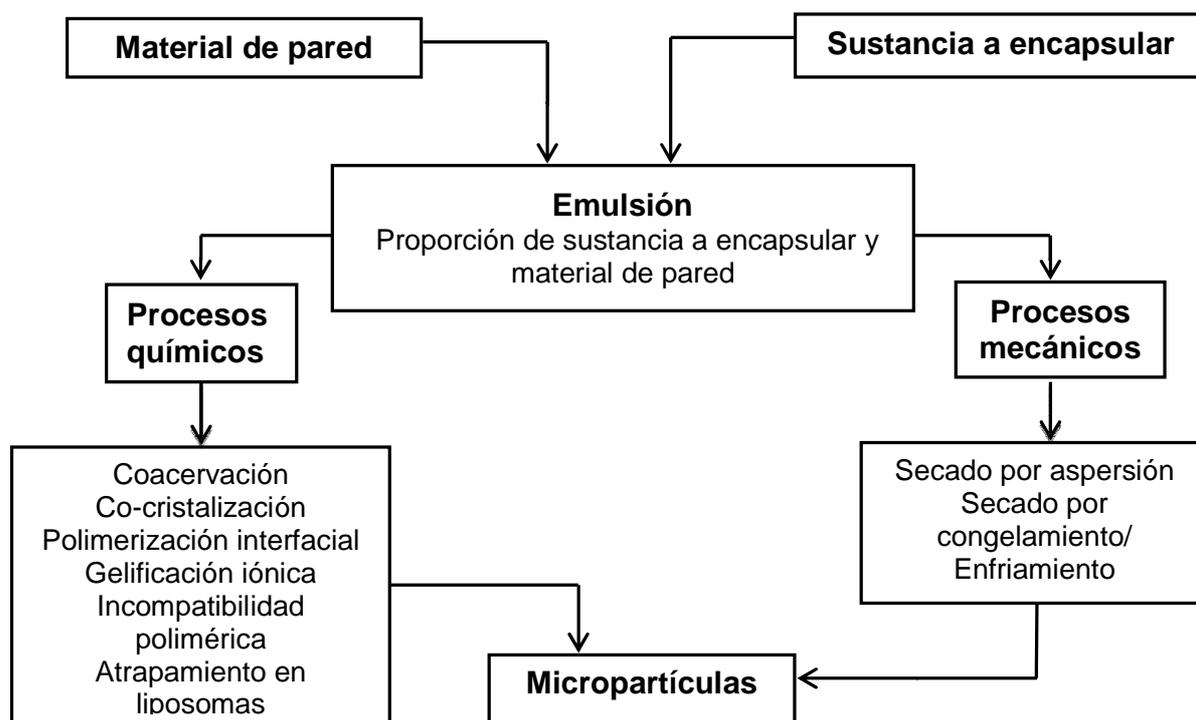


Figura 3. Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación, así como los métodos de cada proceso.

Fuente: Parra, 2010.

La selección del método dependerá del tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Yáñez *et al.*, 2002).

En el caso de sabores y aromas, varios métodos han sido desarrollados para encapsularlos y utilizarlos en la industria de alimentos; siendo el secado por aspersión uno de los empleados (Finotelli y Rocha, 2005).

3.2.1.1 Microencapsulación mediante secado por aspersión

El secado por aspersión es el método más común de encapsulación de ingredientes alimentarios, tales como: vitaminas (C y E), ácido fólico, aromas, orégano, aceite de cardamomo, bacterias probióticas, lípidos, ácido linoléico, aceites vegetales, minerales como hierro, pigmentos de antocianina, leche entre otros alimentos (Parra, 2010). El secado por aspersión es usado en la industria alimentaria por una amplia gama de productos en seco formando partículas en polvo además de ser un método económico y efectivo en la protección de materiales, conservación de nutrimentos, bajo costo de procesamiento y buena estabilidad del producto final (Yáñez *et al.*, 2002; Parra, 2010; Sagar y Kumar, 2010; Yousefi *et al.*, 2011).

El método se basa en atomizar la solución que va a ser secada en forma de gotas muy finas, en el seno de una corriente de gas caliente que generalmente es aire (Ángeles, 2009), donde se forman partículas de geometría esférica, con aspecto de esferillas huecas con un diámetro que oscila entre los 20 y hasta los 200 μm . El aire caliente introducido alcanza una temperatura entre 100 y 200 $^{\circ}\text{C}$. A pesar de la temperatura relativamente alta del aire, las gotas del líquido atomizado se calientan sólo hasta 40 $^{\circ}\text{C}$ debido a la corta duración del secado (fracciones de segundo), lo que evita la degradación del producto, ya que a pesar del aporte de aire caliente, éste sustrae calor por la vaporización del agua (López, 2010).

Dentro de los parámetros más importantes a controlar durante el secado por aspersión se encuentran: las temperaturas de entrada y salida del aire de secado, el flujo de alimentación del producto a secar, tiempo de residencia y acondicionamiento de la materia prima (Parra, 2010).

Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para alimentos sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición entre la gota y el aire caliente a temperaturas elevadas es muy corto entre 5 a 30 segundos, para la formación de la microcápsulas (Parize *et al.*, 2010).

3.2.1.1.1 Microencapsulación de jugos mediante secado por aspersión

El secado por aspersión en los jugos es una operación de un solo paso que transforma el líquido en un producto en polvo; lo que facilita el transporte al reducir el peso y también preserva el producto de la degradación bacteriana al disminuir drásticamente la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad (menor al 10%) logrando así aumentar su vida útil (García-Gutiérrez *et al.*, 2004; Lozada, 2009).

Con respecto a alimentos como frutas y hortalizas frescas que presentan un contenido de humedad superior al 80% es necesario hacer uso de un método de conservación como el secado para mejorar su estabilidad, reducir el peso de transporte y sobre todo mantener su valor nutricional (Sagar y Kumar, 2010).

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la actualidad existe un gran interés en la evaluación y uso de plantas naturales así como de sus derivados, como medicina complementaria y alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos. Hoy en día, una gama amplia de fuentes naturales han sido investigadas por su propiedad antimicrobiana, una de ellas es el fruto de granada, que ha demostrado tener propiedad antimicrobiana contra una gran diversidad de microorganismos y que tal actividad se le atribuye a su alto contenido y calidad de compuestos polifenólicos destacando principalmente elagitaninos y antocianinas. Por otro lado, la granada es consumida en forma esporádica y estacional, usualmente como fruta fresca y como guarnición de platillos y ensaladas de fiestas mexicanas. La falta de producción posiblemente esté asociada a una baja demanda, debido a las dificultades involucradas en su consumo como fruto fresco, además de que es un fruto que se dispone durante determinado periodo de tiempo; por lo que después de su maduración es difícil su conservación y manejo, produciéndose una serie de alteraciones metabólicas que afectan la atención del consumidor. Estos hechos hacen que el fruto no pueda consumirse en todo el año, a menos que sea industrializado, tal y como sucede en la elaboración de bebidas a base del jugo. Una forma actual de conservación es la microencapsulación; la cual, mediante el encapsulamiento se protege a compuestos bioactivos.

Principalmente, la evaluación de la actividad antimicrobiana de la granada se ha estudiado a base de extractos orgánicos no sólo del fruto sino de varias partes de la granada más no así de un microencapsulado de jugo de granada roja donde no existe reporte alguno. Por otra parte, resultó de interés en determinar si la actividad antibacteriana se conserva después de microencapsular jugo de granada roja y así ser una alternativa como un producto nutracéutico contra infecciones bacterianas, por ende, la pregunta de investigación que surge es: ¿Cuál es la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja contra cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos?

5. JUSTIFICACIÓN

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades constituye en la actualidad un desafío en la biotecnología. Si bien se ha demostrado que la granada tiene numerosos efectos terapéuticos a la salud como: antioxidante, antiaterogénico, antihipertensivo, antiinflamatorio, antimicrobiano entre otros. No es un fruto que consuma habitualmente la población mexicana y una de las razones, en parte, es quizá porque se dispone durante un periodo corto; por lo que después de su maduración es difícil su conservación y manejo, y que afectan su atención para consumirlo. Igualmente, el consumo en fresco involucra dificultades para pelar el fruto y conlleva la ingesta esporádica y temporal en guarnición de platillos mexicanos. Sin embargo, la microencapsulación es un método adecuado por el cual los compuestos bioactivos son encapsulados evitando su degradación debido a la luz o al oxígeno y así conservar y/o proteger los compuestos presentes en el alimento. Por lo que el presente trabajo evaluó la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos, y demostrar que es efectivo de conservar sin afectar la actividad biológica y poseer actividad antibacteriana debido a los compuestos bioactivos presentes en el jugo de granada roja, y de esa forma utilizarse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas. Cabe mencionar que la actividad antibacteriana del fruto se ha evaluado principalmente por extractos orgánicos obtenidos de diferentes partes del fruto y, no así de un microencapsulado de jugo de granada roja. Además hay que hacer hincapié que la obtención de la granada roja para realizar esta investigación fue adquirida del municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo, que forma parte de la región del Valle del Mezquital, dado que ocupa un lugar importante en la producción de granada a nivel estatal, a pesar de ello, la producción es ilimitada en comparación con otros frutos de temporada y quizá por los motivos ya mencionados en líneas anteriores, es por ello que con esta investigación se dará a conocer las propiedades antibacterianas de un microencapsulado de jugo de granada roja, representando una alternativa como un producto en la dieta habitual de la población.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos.

6.2 Objetivos Específicos

- 1) Obtención de un microencapsulado a base de jugo de granada roja mediante secado por aspersión bajo la Patente Nacional con expediente MX_a_2012_001392.
- 2) Determinar tamaño y morfología de microcápsulas de jugo de granada roja mediante microscopio electrónico de barrido.
- 3) Determinar la concentración mínima inhibitoria bajo los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio por el método de microdilución en caldo contra 10 cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos.
- 4) Evaluar la actividad bacteriostática o bactericida del microencapsulado de jugo de granada roja mediante la medición indirecta de la inhibición del crecimiento bacteriano por el método turbidimétrico.

7. HIPÓTESIS

La microencapsulación es un método para concentrar y conservar los compuestos de jugo de granada roja con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de 10 cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo experimental. En la figura 4 se presenta el procedimiento experimental general del presente estudio, iniciando con la adquisición de arilos de granada roja y extracción de jugo. Después, obtención del microencapsulado de jugo de granada roja (MJGR) mediante secado por aspersion a partir de la Patente Nacional en registro, a la postre, observación de microcápsulas de jugo de granada roja. Posteriormente, determinación de la actividad antibacteriana de MJGR sobre 10 cepas bacterianas a través de la concentración mínima inhibitoria y finalmente, medición de la inhibición del crecimiento bacteriano para la determinación del efecto bacteriostático o bactericida del MJGR.

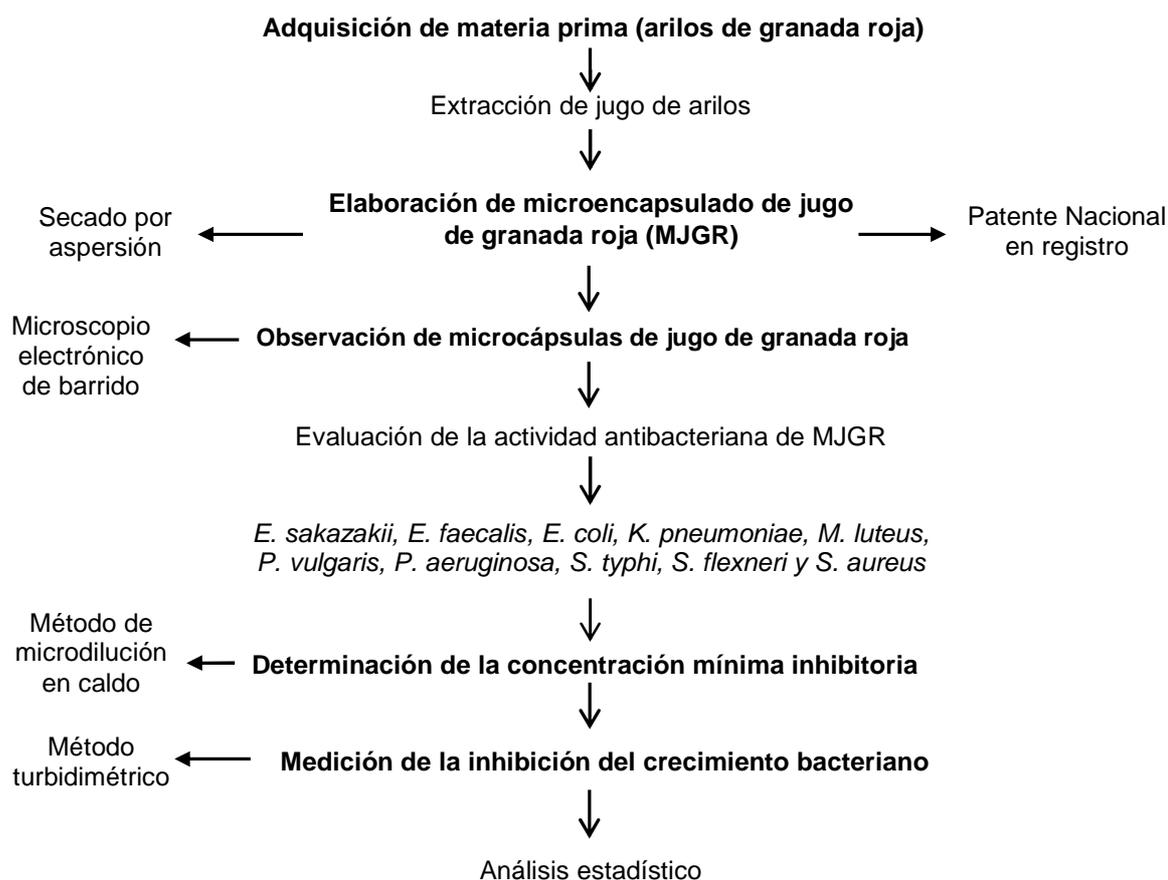


Figura 4. Esquema general del proceso metodológico.

8.2 Obtención del fruto

Se utilizó granada roja madura de temporada agosto de 2012, fue adquirida en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo (latitud norte 20° 28' 55", longitud oeste 99° 13' 5", altitud 2, 660 m). El fruto se lavó y se peló para obtener los arilos. Una vez obtenidos los arilos, se continuó con el proceso de microencapsulación.

8.3 Elaboración de microencapsulado de jugo de granada roja

El procedimiento de microencapsulado de jugo de granada roja (MJGR) fue realizado por el Dr. Santiago R. T. Filardo Kerstupp, en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos 1, en el Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). El proceso, así como las cantidades empleadas de cada reactivo están ampliamente descritos en la Patente Nacional con expediente MX_a_2012_001392, titulada: Encapsulamiento de sabores sintéticos y extractos naturales de frutas, granos y fármacos con goma extraída de *Opuntia spp.* y *Cylindropuntia imbricata* mediante secado por aspersion para su utilización como materia prima en la industria alimentaria y farmacéutica (Filardo, 2012), a continuación se describe el proceso general (Fernández, 2011):

1. Se pesó la materia prima (arilos de granada roja).
2. Se hizo una extracción del jugo de los arilos de granada.
3. Se homogeneizó la extracción del jugo con la ayuda de un extractor de jugos doméstico (Marca Moulinex).
4. Se eliminaron partículas grandes que pudieran obstaculizar el proceso de encapsulamiento con ayuda de un colador.
5. Se colocó el jugo de granada homogeneizado junto con el agente encapsulante en un secador por aspersion (BUCHI Mini Spray Dryer, modelo B-191).
6. El polvo con microcápsulas se almacenó en frascos individuales y se rotularon con la fecha de elaboración y peso de polvo.
7. Los frascos se almacenaron en un lugar seco, a temperatura ambiente, alejados de cualquier fuente de luz y calor.

8.4 Determinación de tamaño y morfología de microcápsulas de jugo de granada roja mediante microscopio electrónico de barrido

La microscopía de microcápsulas de jugo de granada roja mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) se realizó en el laboratorio de MEB, en el Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales de la UAEH, por el M. en C. Juan Hernández Ávila. El procedimiento general fue el siguiente: la muestra de MJGR se montó en una cinta de grafito y se cubrió con oro en una Máquina ionizadora (Denton Vacuum), se manejó una presión de 20mL/torr y una corriente de 20 mA durante 4 minutos hasta llegar al punto de sublimación del oro. Después se colocaron las muestras en el MEB (Joel, modelo JSM-6300) y se observaron con un aumento de x500, x1000, x5000 y x10000 (Fernández, 2011).

8.5 Cepas bacterianas empleadas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron donadas por el Dr. Oscar Rodas Suárez del Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas estudiadas fueron: *Enterobacter sakazakii* (ATCC 29004) (*E. sakazakii*), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (*E. faecalis*), *Escherichia coli* (ATCC 10536) (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhi* (ATCC 6539) (*S. typhi*), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) (*S. flexneri*) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (*S. aureus*).

8.5.1 Propagación y conservación de cepas bacterianas

Para la propagación de cepas bacterianas se sembraron en 5 mL de Caldo Soya Tripticaseina (Bioxon) estéril y se incubaron a 37°C por 24 horas. Para la conservación, se utilizó un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, se mezclaron 500 µL de cada cepa del crecimiento bacteriano con 500 µL de glicerol estéril, se homogeneizaron en vórtex e inmediatamente se congelaron a -70°C hasta su uso.

8.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria e inhibición del crecimiento bacteriano

La evaluación de la actividad antibacteriana de MJGR se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución en caldo contra las 10 cepas bacterianas en prueba, y una vez encontrada la CMI, se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano por el método turbidimétrico con el fin de evaluar el efecto bacteriostático y bactericida del MJGR sobre las cepas en prueba. La CMI y la inhibición del crecimiento bacteriano se llevaron a cabo de acuerdo con el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2011).

8.6.1 Preparación del inóculo

Se inocularon las cepas en tubos de ensayo cada una con 3 mL de Caldo Mueller-Hinton (CMH) (Bioxon) en condiciones estériles y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se tomaron 100 µL del medio de cultivo de cada bacteria en prueba y se inocularon en un tubo de ensayo con 2.9 mL de CMH y se colocaron en una incubadora con agitación de 6 a 8 horas hasta alcanzar 0.5 U del nefelómetro de Mc Farland (~10⁸ UFC/mL). Finalmente, 20 µL de crecimiento fueron empleadas para la determinación de la CMI, evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano y realización de controles positivos para cada una de las pruebas.

8.6.2 Preparación de soluciones de microencapsulado de jugo de granada roja y microencapsulado sin jugo de granada roja

Se prepararon soluciones de 600 mg/mL utilizando agua desionizada de MJGR y MSJGR (Microencapsulado sin jugo de granada roja) como control. Las soluciones fueron agitadas en vórtex hasta su homogeneización y rompimiento de microcápsulas de jugo de granada roja. Posteriormente, las soluciones fueron prefiltradas con una membrana de 1.22 µm (Millex-GV), seguido con una de 0.45 µm con la finalidad de eliminar partículas grandes. Finalmente, las soluciones fueron esterilizadas por una membrana de 0.22 µm.

8.6.2.1 Evaluación de la actividad antibacteriana de MJGR

A partir de las soluciones anteriores se prepararon en, duplicado, tubos Eppendorf de 1.5 mL con un volumen final de 200 μ L como se muestra en la Tabla 7. Los tubos se incubaron a 37°C a 200 rpm en una incubadora de agitación y se realizaron lecturas visuales a las 24 y 48 horas de incubación. En la Tabla 8 se muestran cómo se nombran en el documento los controles correspondientes y muestras de microencapsulado de jugo de granada roja y sin jugo de granada roja utilizados en la experimentación.

Tabla 7. Concentraciones de MJGR y controles correspondientes

Soluciones/ muestras	Concentraciones (mg/mL)								Controles			
	9.375	37.5	75	150	200	230	250	300	CT1	CT2 ^a	CT3 ^b	CT4 ^c
MJGR (μL)	3.1	12.5	25	50	66.7	76.6	83.3	100	--	--	--	100
MSJGR(μL)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	100	--	--
*Antibiótico (μL)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
Bacteria (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	--
CMH (μL)	176.9	167.5	155	130	113.3	103.4	96.7	80	180	80	170	100

CMH: Caldo Mueller-Hinton. CT: Control. *Antibiótico: Ciprofloxacina. MJGR: Microencapsulado de jugo de granada roja. MSJGR: Microencapsulado sin jugo de granada roja. CT1: Crecimiento bacteriano. CT2^a: 300 mg/mL de MSJGR. CT3^b: 5 μ g/mL de Ciprofloxacina. CT4^c: 300 mg/mL de MJGR.

La interpretación de la CMI de MJGR se determinó como la mínima concentración (mg/mL) donde no hubiera turbidez en los tubos comparado con los controles: CT (control) 1 o control con inóculo de bacteria y CT 4 o control con MJGR (sin crecimiento bacteriano), además se adicionaron distintos controles que de la misma forma fueron comparados, los cuales fueron: CT 2, control con MSJGR (crecimiento bacteriano sin presencia de jugo de granada roja) y CT 3, control con antibiótico (inhibición de crecimiento bacteriano por Ciprofloxacina). La verificación del efecto de la actividad antibacteriana o inhibición de crecimiento fuese por el MJGR y no del MSJGR (Microencapsulado sin jugo de granada roja), CT 2 fue usado como control.

Así mismo, CT 3 se sometió a comprobación contra la bacteria en prueba, para contrastar la inhibición bacteriana por el MJGR sobre la cepa ensayada.

Tabla 8. Controles y muestras utilizados en experimentación

Control y/o muestra	Abreviatura	Significado
Microencapsulado de jugo de granada roja	MJGR	
Microencapsulado sin jugo de granada roja	MSJGR	
Caldo Mueller-Hinton	CMH	
Control 1	CT 1	Control con inóculo de bacteria (CMH + Bacteria)
Control 2	CT 2	Control con MSJGR (CMH + MSJGR + Bacteria)
Control 3	CT 3	Control con antibiótico (CMH + Ciprofloxacina + Bacteria)
Control 4	CT 4	Control con MJGR (CMH + MJGR)
Tratamiento	TX	Cepa en presencia de MJGR

8.6.2.1.1 Medición de la inhibición del crecimiento bacteriano por turbidez

Una vez encontrada la CMI para cada una de las cepas de estudio, se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano por el método turbidimétrico para evaluar si el tratamiento (CMI final de MJGR contra la cepas estudiadas) tiene actividad bacteriostática y bactericida, para ello los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos y se hicieron lavados con 1 mL de CMH. Los precipitados (pellet) fueron resuspendidos en 1 mL de CMH. Posteriormente, se hicieron muestras en blanco o sin inóculo de bacteria para los CT 1, CT 2 y CT 3, en cambio, CT 4 se usó directamente como muestra blanco. Después, se colocaron por duplicado 200 μ L en una microplaca de 96 pozos colocando las muestras en blanco, CMI final y controles e inmediatamente se tomaron lecturas a una absorbancia de 540 nm en un

espectrofotómetro. Finalmente, los valores de las absorbancias se analizaron estadísticamente comparando los controles (CT 1, CT 2 y CT 3) y tratamiento entre las 24 y 48 horas, y por último, las muestras se graficaron expresando el porcentaje (%) de inhibición de crecimiento, a excepción de CT 1 que no se graficó, debido a que el % de inhibición fue cero en los dos tiempos de incubación. El % de inhibición de crecimiento se calculó de la siguiente forma:

$$B \text{ ó } C \text{ ó } D (100) / A = \% \text{ de crecimiento bacteriano}$$

$$\% \text{ de inhibición de crecimiento: } 100 - \% \text{ de crecimiento bacteriano}$$

Dónde:

A: absorbancia de CT 1

B: absorbancia de CT 2.

C: absorbancia de CT 3.

D: absorbancia de TX.

100: 100% de crecimiento bacteriano

8.7 Análisis estadístico.

Los resultados de % de inhibición de crecimiento bacteriano se expresaron como la Media \pm SD., se realizaron pruebas de Test de Student por ensayo pareado empleando GraphPad software, 2007, versión 5.0, La Jolla, CA. InStat, U.S.A. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

9. RESULTADOS

9.1 Microencapsulado de jugo de granada roja

En la Figura 5, se observa el polvo fino obtenido por el secado por aspersión producto del MJGR. Se obtuvo un rendimiento de 170 gramos de MJGR a partir de 5 kilos de arilos de granada roja.



Figura 5. Polvo fino obtenido mediante secado por aspersión: MJGR (Obtenido el 25 de octubre de 2012, 20 gramos).

9.2 Tamaño y morfología de microcápsulas de jugo de granada roja

En la Figura 6, se muestran microfotografías obtenidas por MEB. Las partículas microencapsuladas no muestran visualmente fracturas, grietas o poros. Las microcápsulas pequeñas se presentan principalmente en forma esférica (Figura 6a y 6b) y las microcápsulas grandes muestran diferentes formas esféricas, ovaladas e irregulares (Figura 6c y 6d). El tamaño de las microcápsulas conteniendo jugo de granada roja osciló entre 1 a 30 μm de diámetro en promedio.

9.3 Concentración mínima inhibitoria de microencapsulado de jugo de granada roja

El MJGR presentó actividad antibacteriana contra todas las cepas evaluadas en el presente estudio (Tabla 9). Se encontró una CMI de 250 mg/mL de MJGR para *M. luteus*, en tanto para *E. sakazakii*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus* de 300 mg/mL de MJGR.

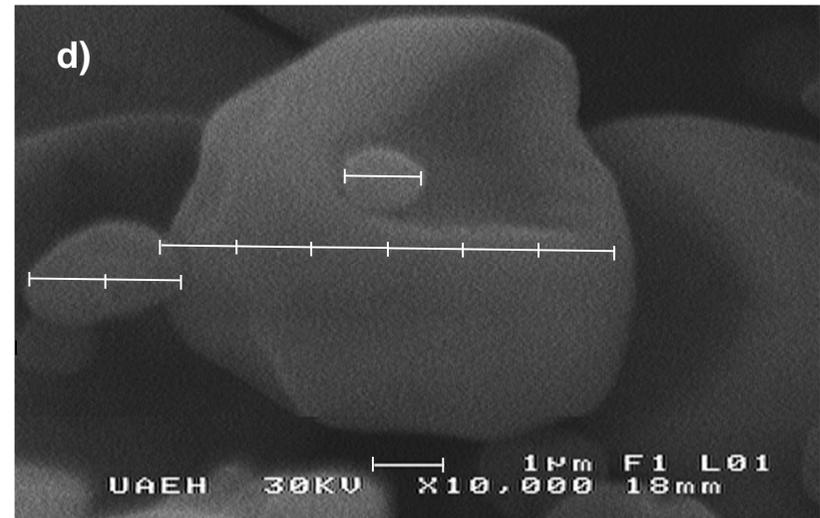
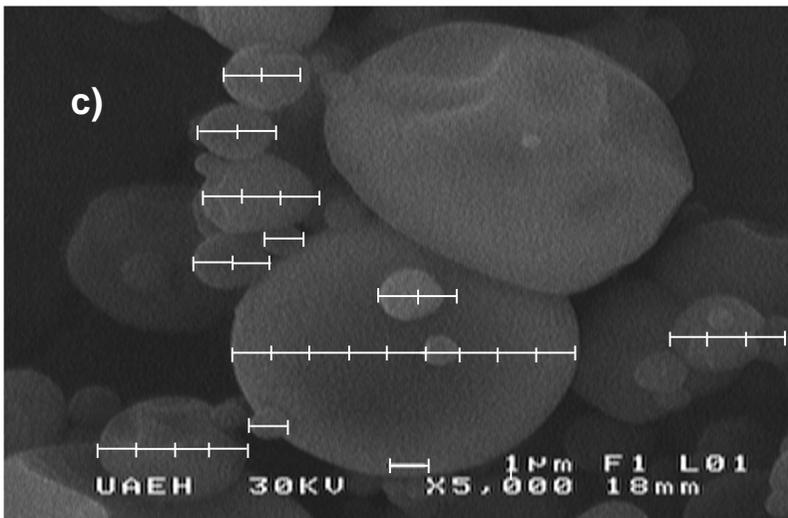
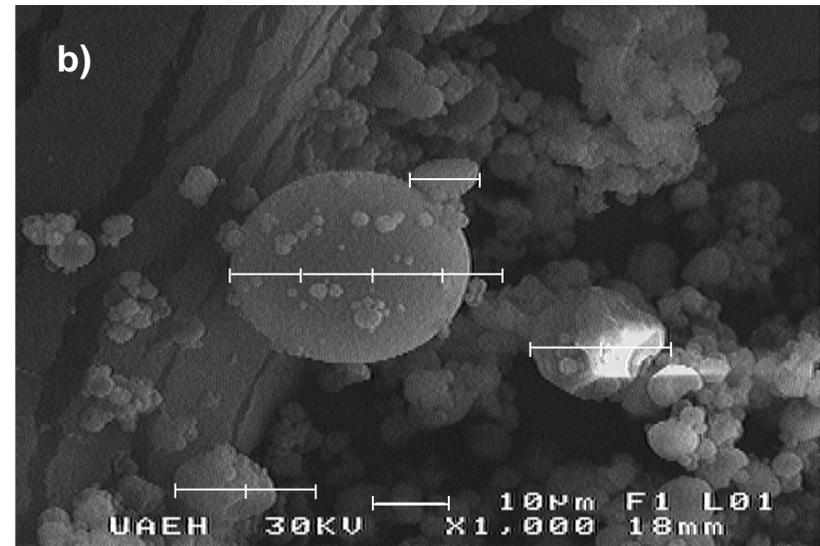
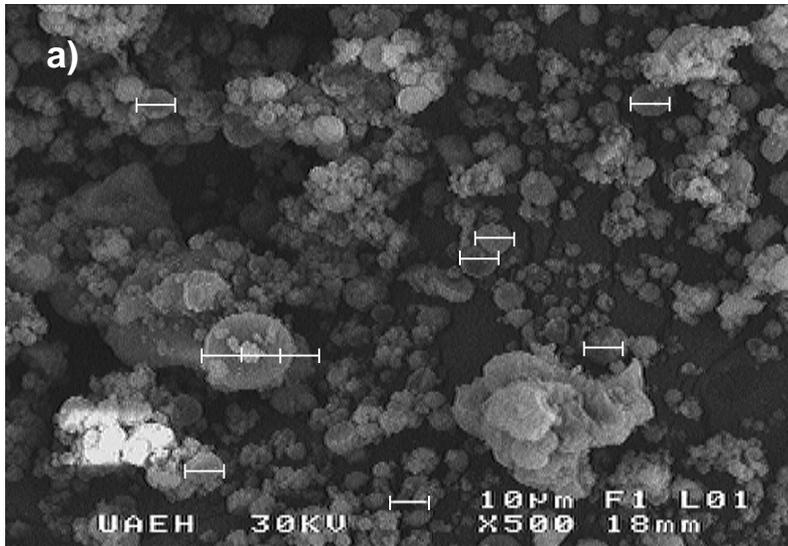


Figura 6. Microfotografías de microcápsulas de jugo de granada roja a, b, c y d en orden creciente de aumento: x500, x1000, x5000 y x10000, respectivamente, mediante secado por aspersión.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de MJGR contra diferentes cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Concentración mínima inhibitoria, (CMI; mg/mL)				
	300	250	230	200	150
<i>M. luteus</i>	-	-	+	+	+
<i>E. sakazakii</i>	-	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	-	+	+	+	+
<i>S. flexneri</i>	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+
Control 2	+	+	+	+	+
Control 3	-	-	-	-	-

Observaciones visuales, después de las condiciones de incubación (24 y 48 horas), (-): Inhibición de crecimiento, (+): Crecimiento bacteriano, ensayo por duplicado. CMI: Concentración mínima inhibitoria. MJGR: Microencapsulado de jugo de granada roja. Control 2: CMH (Caldo Mueller-Hinton) + MSJGR (Microencapsulado sin jugo de granada roja) + Bacteria y control 3: CMH + Antibiótico (Ciprofloxacina, 5 µg/mL) + Bacteria.

Además se incluyó como control el microencapsulado sin jugo de granada roja (MSJGR), el cual no inhibió el crecimiento bacteriano. Por lo que se deduce que la actividad antibacteriana es por los compuestos microencapsulados. En contraste, al utilizar Ciprofloxacina, el antibiótico inhibió el crecimiento.

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de la interpretación visual de inhibición crecimiento bacteriano. Se observa que una CMI de 250 mg/mL de MJGR sobre *M. luteus* no hay presencia de turbidez y por tanto inhibición de crecimiento bacteriano que contrastado con los controles directos: CT 1 y CT 4, este último en ausencia de inóculo bacteriano, en cambio, CT 1 presenta turbidez o crecimiento bacteriano.

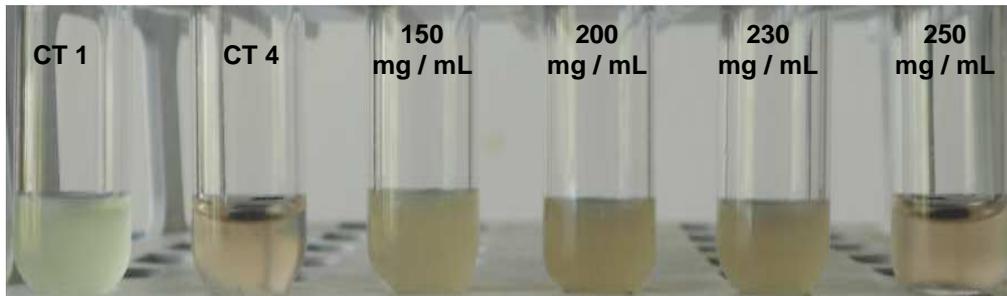


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria (250 mg/mL) de MJGR sobre *M. luteus* en tubo. CT (Control) 1: CMH (Caldo Mueller-Hinton) + Bacteria; CT 4: CMH + MJGR (Microencapsulado de jugo de granada roja); y diferentes concentraciones de MJGR: 150 mg, 200 mg, 230 mg y 250 mg/mL.

9.4 Inhibición de crecimiento sobre las cepas en prueba

La inhibición de crecimiento bacteriano se expresó como el porcentaje de inhibición de crecimiento para cada cepa durante las 24 y 48 horas de incubación, tales resultados se muestran en las Figuras 8, 9 y 10.

Para *P. aeruginosa* y *S. flexneri* el microencapsulado sin jugo de granada roja (MSJGR) causó inhibición tanto a las 24 como a las 48 horas, incluso para *P. aeruginosa* el % de inhibición fue mayor a las 48 horas, esto se corroboró al hacer el análisis estadístico en donde no se encontró diferencia significativa con los valores del microencapsulado de jugo de granada (MJGR) y si la hubo al compararse con cepas sin tratamiento (CT 1). Lo que significa que los componentes del microencapsulado por sí solos fueron tóxicos para estas bacterias. Sin embargo, para *S. flexneri*, cuando se compara en presencia de MJGR, el % de inhibición aumenta con diferencia significativa.

Para el caso de *M. luteus* se encontró una inhibición de crecimiento prácticamente de 100% a las 24 y 48 horas con una CMI de 250 mg/mL de MJGR, dicha inhibición fue similar a la ejercida por el control con antibiótico (CT 3) sin diferencias significativas, lo que sugiere que el MJGR tuvo una acción similar que el antibiótico. Cuando se comparó con MSJGR, también se encontraron diferencias significativas.

Para el resto de las cepas, se encontró una CMI 300 mg/mL de MJGR, ésta inhibición fue mayor a las 24 horas que a las 48 horas, estadísticamente significativas, lo que sugiere que se pierde la potencia del MJGR. En el caso de *E. faecalis*, el MSJGR muestra inhibición de crecimiento a las 24 horas pero con diferencia significativa con el TX, además de presentar mayor inhibición en presencia de MJGR que el de las 48 horas, a pesar de que en este tiempo, el MSJGR no causó inhibición por lo que fue únicamente por el MJGR. Al contrario de: *P. vulgaris* y *S. aureus*, el % de inhibición de crecimiento por parte del MSJGR fue a las 48 horas incluso para *S. aureus*, el MSJGR presenta significancia con el MJGR, mientras que a las 24 horas para *P. vulgaris*, el TX causa mayor inhibición de crecimiento sin haber inhibición por el control de MSJGR y que este último comparado con el TX tuvo diferencia significativa, en tanto para *S. aureus*, el % de inhibición fue muy similar entre las 24 y 48 horas, y fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con el control de MSJGR. Inversamente, *S. flexneri*, el MSJGR igualmente mostró inhibición de crecimiento tanto a las 24 como a las 48 horas, pero en presencia de MJGR la inhibición fue mayor cuando se comparó con el control de MSJGR con diferencias significativas. Finalmente, *E. sakazakii* tuvo inhibición de crecimiento a las 24 horas pero el TX no mostró una diferencia significativa importante.

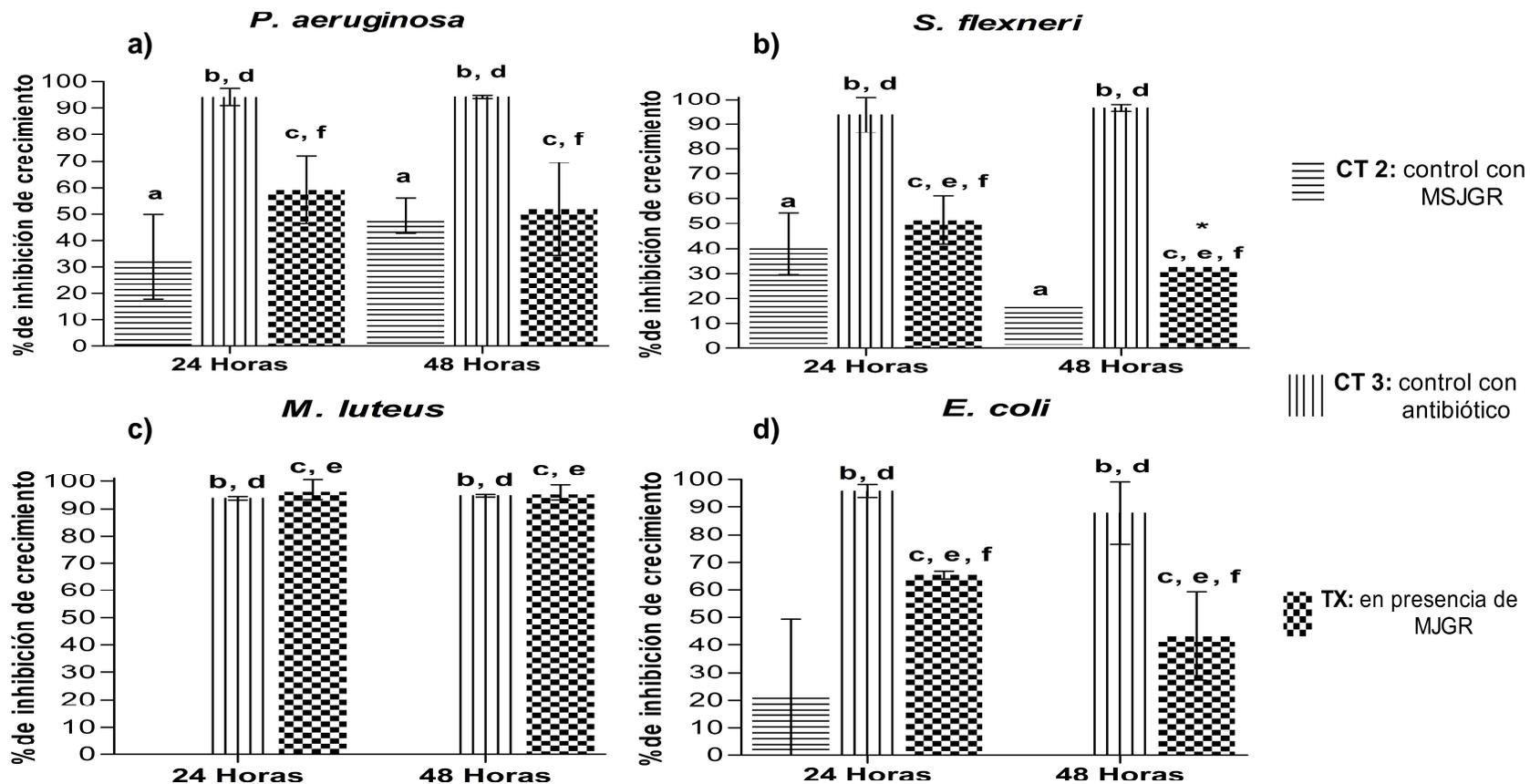


Figura 8. Inhibición de crecimiento de: a) *P. aeruginosa*, b) *S. flexneri*, d) *E. coli* con una CMI de 300 mg/mL de MJGR y c) *M. luteus* con una CMI de 250 mg/mL de MJGR. CT: Control. CMH: Caldo Mueller-Hinton. MJGR: Microencapsulado de jugo de granada roja. MSJGR: Microencapsulado sin jugo de granada roja. TX: Tratamiento; CMI final de MJGR sobre la cepa en estudio. CT 1: CMH + Bacteria (no se graficó, debido a que el % de inhibición fue igual a cero en los tiempos de incubación), CT 2: CMH + MSJGR + Bacteria, CT 3: CMH + Antibiótico (Ciprofloxacina, 5µg/mL) + Bacteria y TX: CMH + MJGR + Bacteria. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el CT 1 y CT 2; b= comparación entre el CT 1 y CT 3; c= comparación entre el CT 1 y TX; d= comparación entre el CT 2 y CT 3; e= comparación entre el CT 2 y TX; f= comparación entre el CT 3 y TX y * comparación entre el TX 24 horas y TX 48 horas.

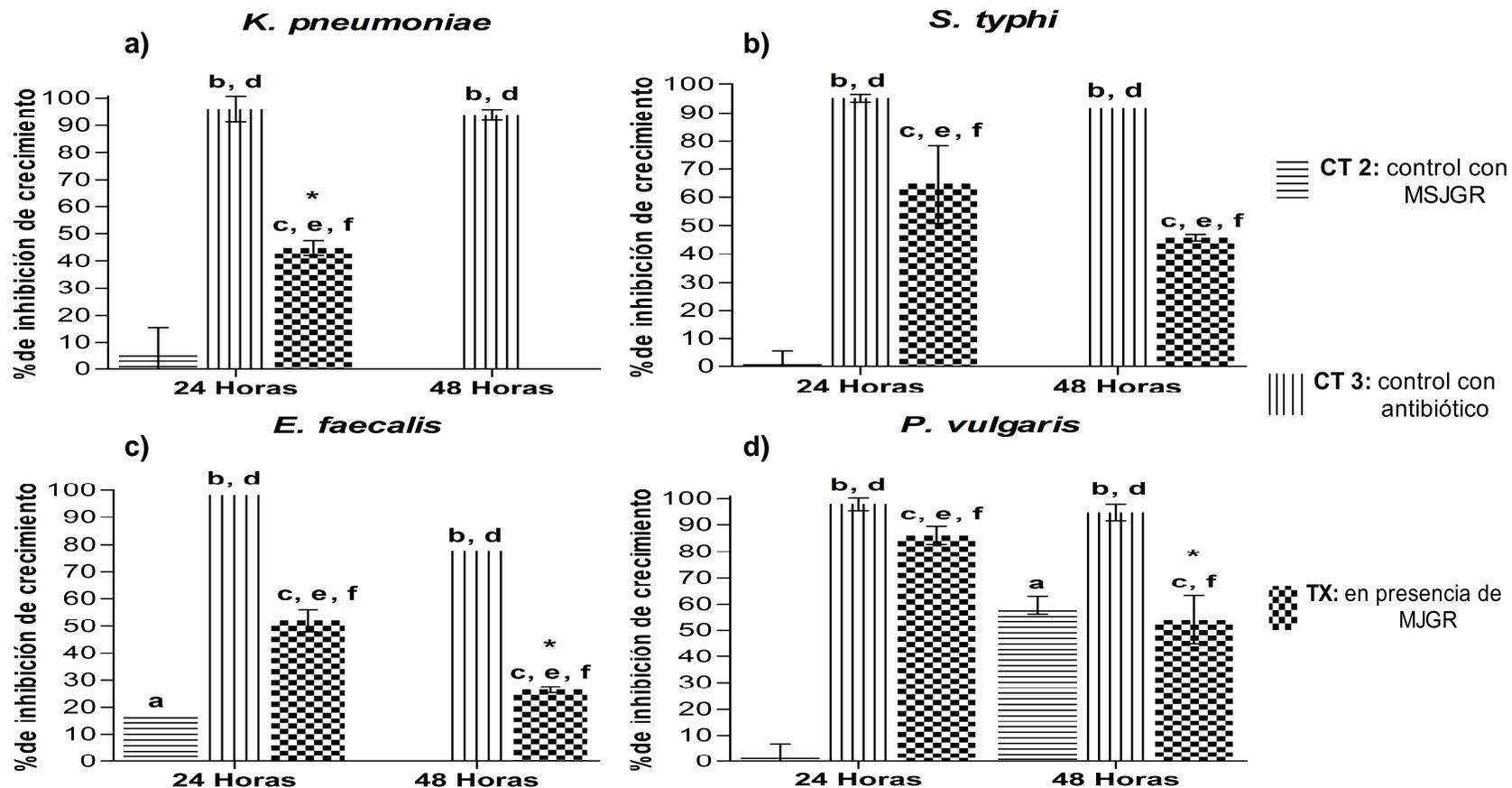


Figura 9. Inhibición de crecimiento de: a) *K. pneumoniae*, b) *S. typhi*, c) *E. faecalis* y d) *P. vulgaris* correspondiente a una CMI de 300 mg/mL de MJGR. CT: Control. CMH: Caldo Mueller-Hinton. MJGR: Microencapsulado de jugo de granada roja. MSJGR: Microencapsulado sin jugo de granada roja. TX: Tratamiento; CMI final de MJGR sobre la cepa en estudio. CT 1: CMH + Bacteria (no se graficó, debido a que el % de inhibición fue igual a cero en los tiempos de incubación), CT 2: CMH + MSJGR + Bacteria, CT 3: CMH + Antibiótico (Ciprofloxacina, 5µg/mL) + Bacteria y TX: CMH + MJGR + Bacteria. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el CT 1 y CT 2; b= comparación entre el CT 1 y CT 3; c= comparación entre el CT 1 y TX; d= comparación entre el CT 2 y CT 3; e= comparación entre el CT 2 y TX; f= comparación entre el CT 3 y TX y * comparación entre el TX 24 horas y TX 48 horas.

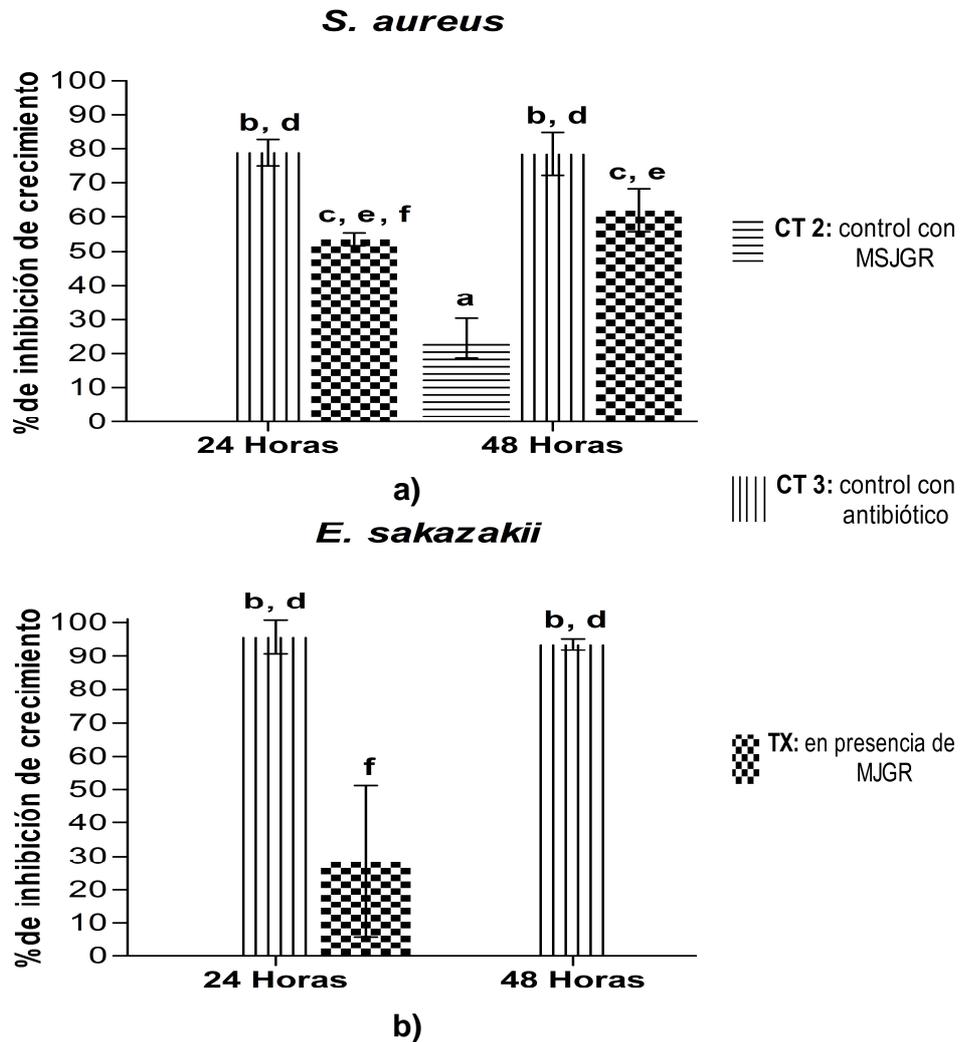


Figura 10. Inhibición de crecimiento de: a) *S. aureus* y b) *E. sakazakii* correspondiente a una CMI de 300 mg/mL de MJGR. CT: Control. CMH: Caldo Mueller-Hinton. MJGR: Microencapsulado de jugo de granada roja. MSJGR: Microencapsulado sin jugo de granada roja. TX: Tratamiento; CMI final de MJGR sobre la cepa en estudio. CT 1: CMH + Bacteria (no se graficó, debido a que el % de inhibición fue igual a cero en los tiempos de estudio), CT 2: CMH + MSJGR + Bacteria, CT 3: CMH + Antibiótico (Ciprofloxacina, 5µg/mL) + Bacteria y TX: CMH + MJGR + Bacteria. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el CT 1 y CT 2; b= comparación entre el CT 1 y CT 3; c= comparación entre el CT 1 y TX; d= comparación entre el CT 2 y CT 3; e= comparación entre el CT 2 y TX; f= comparación entre el CT 3 y TX y * comparación entre el TX 24 horas y TX 48 horas.

10. DISCUSIÓN

Los antibióticos proporcionan un tratamiento para la mayoría de las infecciones, pero la resistencia a ellos sigue en aumento (Machado *et al.*, 2002; Pradeep *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2011; Sadeghian *et al.*, 2011; Howell y D'Souza, 2013). Por lo tanto, la búsqueda de agentes antimicrobianos naturales, productos nutracéuticos y alimentos funcionales están adquiriendo interés en la prevención y tratamiento de infecciones por microorganismos (Sadeghian *et al.*, 2011). En la actualidad existe un gran interés en la evaluación y uso de fuentes naturales así como de sus derivados, como medicamento complementario y alternativo sobre los antibióticos (Machado *et al.*, 2002; Pradeep *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2011). Una fuente de estos compuestos es la granada. Este fruto se conoce desde la antigüedad por sus múltiples efectos terapéuticos en la salud debido principalmente a los compuestos polifenólicos (Qnais *et al.*, 2007; Pradeep *et al.*, 2008; Sabbar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Altuner, 2011; Hegde *et al.*, 2012). Diversos estudios han evaluado la actividad antibacteriana de diferentes extractos de la granada y sus constituyentes (jugo, hojas, flores, arilos, semillas, cáscara y pericarpio) sobre una variedad de bacterias, destacando extractos orgánicos utilizando: metanol, etanol, acetato de etilo, cloroformo, butanol y acuoso, etc. Sin embargo, en esta investigación se pretende destacar las propiedades antibacterianas de jugo de granada roja como microencapsulado, debido a que no existe en la literatura un microencapsulado a partir de la extracción de jugo de esta fruta. De igual forma, cabe señalar que la microencapsulación por secado por aspersión se puede utilizar como un método adecuado para preservar y/o proteger los compuestos bioactivos o fitoquímicos presentes en los alimentos sin cambiar su propiedad biológica aumentando el tiempo de vida de anaquel del producto lo cual garantiza su consumo por un tiempo más prolongado. Por otra parte, los jugos por naturaleza presentan un elevado contenido de azúcares como glucosa, fructosa y ácidos orgánicos como ácido cítrico, málico y tartárico, lo que les confiere una característica diferente a la hora de conseguir que un jugo se transforme en una presentación en polvo. Estos compuestos tienen temperaturas de transición vítrea bajas y ya sea con los secadores por aspersión

utilizados en la industria alimentaria para transformar disoluciones, emulsiones o dispersiones de un producto (estado líquido) en productos en polvo, o bien por el uso de liofilizadores, nos encontramos con los problemas de pegajosidad (“stickiness”) y de elevada higroscopicidad con los productos obtenidos. El término “stickiness” hace referencia a los fenómenos de cohesión partícula-partícula y de adhesión partícula-pared que presentan los polvos obtenidos, que dificulta su presentación en estado de polvo y mancha las paredes de los contenedores de pulverización (Lozada, 2009; Rivas, 2010). Este problema de pegajosidad del MJGR se presentó en esta investigación, debido a que en un inicio se realizaron ensayos de difusión en agar o método de Kirby-Bauer, un método cualitativo para la evaluación de la susceptibilidad de un microorganismo frente a agentes antimicrobianos a través de la CMI por medio del tamaño del aro de inhibición de crecimiento bacteriano sobre placas de agar Mueller-Hinton. No obstante, no se pudieron efectuar estos ensayos, ya que para ello, es necesario que el o los compuestos puedan difundir libremente sobre el agar y esto no sucedió en la investigación.

En este trabajo, se obtuvo un MJGR en forma de polvo fino y efectivo de conservación por largo tiempo, ya que éste fue obtenido un año antes de haber evaluado la actividad antibacteriana. A través de la microscopía se logró observar microcápsulas en forma esférica e irregular de 1 a 30 μm de diámetro en promedio. Este tamaño concuerdan con las reportadas por Fernández (2011), quien realizó microencapsulación mediante secado por aspersion de extractos etanólicos de frutas con alto contenido polifenólico, las cuales fueron: arándano, fresa, uva y zarzamora, con el fin de utilizarse como materia prima en la formulación de alimentos. Cabe mencionar que Fernández, utilizó la misma patente mencionada en el actual escrito para la obtención de MJGR. De igual manera, reportó la obtención de un polvo fino para ser utilizado como materia prima en la preparación de alimentos y confirmó que el agente encapsulante a partir de gomas de *Cylindropuntia imbricata* tuvo la capacidad para formar una capa o matriz que protege a los compuestos bioactivos presentes en las frutas y así impidan reacciones de oxidación debido a la luz y al

oxígeno. Además, el mismo trabajo permitió observar microcápsulas de 40 μm de diámetro en al menos 4 diferentes frutas (arándano, fresa, uva y zarzamora). Por otra parte, Pedroza *et al.*, (2002) y Guarda *et al.*, (2011) mencionaron que el término microcápsula utilizado en la industria alimentaria aplica para partículas que tienen tamaños entre 0.2 a 5000 μm de diámetro. De este modo, el tamaño de microcápsulas de MJGR obtenidas en el presente escrito (1 a 30 μm de diámetro) se encuentra en el intervalo mencionado.

El principal objetivo de este estudio fue la evaluación de la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja contra 10 cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos. El MJGR demostró actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas estudiadas. Se encontró una CMI de 250 mg/mL de MJGR contra *M. luteus* con actividad bactericida, ya que a las 24 como a las 48 horas el porcentaje de inhibición de crecimiento fue cercano al 100%, mientras una CMI de 300 mg/mL de MJGR para *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus* con efecto bacteriostático. Esta inhibición fue mayor a las 24 que a las 48 horas de estudio. No obstante, para *E. sakazakii*, la inhibición no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, el MSJGR inhibió por sí solo a *P. aeruginosa*.

Duman *et al.*, (2009) evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos de los arilos provenientes de 6 tipos de variedades de granada contra 7 bacterias (*Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y 3 hongos (*Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula rubra* y *Candida albicans*), los extractos mostraron efecto antimicrobiano sobre los microorganismos probados, con una CMI entre 30 y >90 $\mu\text{g/mL}$. Un estudio similar fue realizado por Nuamsetii *et al.*, (2012), en este caso los extractos fueron acuoso, etanólico y acetónico de pericarpio y arilos (con semillas) de granada probadas contra 4 bacterias relacionadas con alimentos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*).

Las CMI fueron las siguientes: *Bacillus subtilis* de <104 a 444 mg/mL, *Staphylococcus aureus* de <104 a 888 mg/mL, *Escherichia coli* de 207 a 3500 mg/mL y *Salmonella typhimurium* de <104 a 778 mg/mL. En otro estudio, Sabbar *et al.*, (2010) reportaron que extractos metanólicos y acuosos de pericarpio, semillas, jugo y de todo el fruto de la granada fueron activas e inhibieron a todas las cepas estudiadas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*). Además reportaron que el extracto de jugo de granada fue el segundo extracto en mostrar mayor actividad antibacteriana después del pericarpio. Por otro lado, Ibrahim (2010), investigó el uso natural del extracto de pericarpio de la granada como inhibidor antimicrobiano en alimentos, encontró que el extracto de pericarpio fue efectivo al inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, y concluyó que el extracto de pericarpio de granada puede ser usado como inhibidor de microorganismos en alimentos. Por otra parte, Fabela (2012), evaluó la actividad antimicrobiana de jugo fresco de granada en 60 cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de infecciones oculares con multirresistencia a diversos antibióticos así como a otros compuestos. En este caso, el jugo fresco de granada tuvo una CMI_{100%} al 20% en todas las 60 cepas de *Staphylococcus epidermidis* estudiadas, y sugirió que el jugo fresco de granada podría emplearse como un agente antimicrobiano natural. Por su parte, Howell y D'Souza (2013), dieron a conocer que la granada tiene efectos inhibitorios contra bacterias entéricas presentes en muchos alimentos causantes de infecciones gastrointestinales, y además de exhibir conservación de alimentos mediante la inhibición de bacterias patógenas que causan intoxicación alimentaria. Ellos reportaron que extractos etanólicos y acuosos de la granada tienen inhibición bacteriana contra *Escherichia coli enterohemorrágica* (*E. coli*) 0157:H7 que originan infecciones que pueden ser mortales para los niños y ancianos. En tales estudios incluyeron 3 cepas de *E. coli* 0157:H7, determinando que los dos extractos de granada exhibieron actividades bacteriostáticas y bactericidas, sugiriendo que puede ser un eficaz tratamiento contra infecciones de *E. coli* 0157:H7. Además estos mismos autores, reportaron que la

granada tuvo actividad antibacteriana contra bacterias patógenas presentes en alimentos o agua contaminada contra cepas de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado, existen reportes de actividad antimicrobiana de microencapsulados principalmente sobre aceites esenciales puros de especies o condimentos naturales como una alternativa de agentes antimicrobianos (Wang *et al.*, 2009; Arana-Sánchez *et al.*, 2010; Guarda *et al.*, 2011). Wang *et al.*, (2009), desarrollaron un microencapsulado de carvacol (un aceite esencial puro antibacteriano de mayor presencia en el orégano) y estudiaron la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* K88. Los autores demostraron que el microencapsulado de carvacol conservó la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano e inhibió a la cepa evaluada. Estudios similares fueron encontrados por Arana-Sánchez *et al.*, (2010), quienes microencapsularon por secado por aspersion 3 tipos de aceites esenciales de orégano (Carvacol, timol y p-cimeno) con actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La microencapsulación fue efectiva manteniendo los compuestos de los 3 aceites obtenidos de orégano, mejorando la actividad antioxidante y conservando la actividad antibacteriana, aumentando la calidad de los aceites. Asimismo, Guarda *et al.*, (2011) determinaron las propiedades antimicrobianas de películas de plástico flexibles con una capa de microcápsulas que contienen carvacol y timol como agentes antimicrobianos probadas contra *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*, se encontró que los agentes antimicrobianos estudiados son inhibidores fuertes del crecimiento contra los microorganismos estudiados. Además, confirmaron la idoneidad de utilizar microencapsulado de timol y carvacol incorporados en las películas de polímero para envasado de alimentos. Con estas investigaciones se demuestra que la microencapsulación por secado por aspersion se ha venido utilizando para encapsular sustancias naturales y evaluar la actividad antimicrobiana, además de

demostrar que la microencapsulación protege a los compuestos, mejorando la actividad antimicrobiana y conformando la capacidad de utilizarse en la industria alimentaria como una alternativa de agentes antimicrobianos. Además de eso, Endo *et al.*, (2012) realizaron microcápsulas de extractos etanólicos de pericarpio de granada por secado por aspersión y examinaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Tales autores encontraron efecto antifúngico de las microcápsulas de pericarpio de granada contra el hongo evaluado. Las microcápsulas de pericarpio de granada fueron de forma esférica y un tamaño entre 2.45 y 2.80 μm de diámetro, mientras que en el presente trabajo, las microcápsulas tuvieron un promedio entre 1 a 30 μm de diámetro.

En nuestro caso se encontró que la inhibición del crecimiento fue bacteriostático con excepción de *M. luteus* por lo que se asume que los componentes fueron lo suficientemente efectivos para cesar las actividades metabólicas de las bacterias que son importantes para su crecimiento (Khan y Haneer, 2011; Parseh *et al.*, 2012). No obstante, este efecto se mostró mayor a las 24 que a las 48 horas de incubación para *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus*. Estos datos sugieren que los compuestos bioactivos del jugo de granada roja no tuvieron la concentración tal que mantuvieran el efecto bacteriostático o que dichos componentes perdieron potencia a lo largo de la incubación. Por lo contrario, para *M. luteus* se encontró una acción bactericida, ya que tanto a las 24 y 48 horas, el % de inhibición fue cercano al 100% por lo que estos resultados sugieren que la concentración de los compuestos bioactivos de jugo de granada roja indicó a la muerte bacteriana prácticamente, tal y como lo ejerció también la Ciprofloxacina, un antibiótico conocido por tener fuerte acción bactericida contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. La actividad antibacteriana de la granada con efectos bacteriostáticos y bactericidas se ha documentado por su alto contenido de compuestos polifenólicos (anillos fenólicos con múltiples grupos hidroxilo) (Sabbar *et al.*, 2010; Fawole *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2013), incluyendo taninos hidrolizables (elagitaninos principalmente punicalagina) (Machado *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*,

2006; Sadeghian *et al.*, 2011) y ácido eláxico (Duman *et al.*, 2009; Abdollahzadeh *et al.*, 2011; Khann y Hanee, 2011; Hegde *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2013). Los polifenoles de la granada incluyen flavonoides (flavonoles, flavanoles y antocianinas), taninos condensados (proantocinidinas) y taninos hidrolizables (galotaninos o elagitaninos) (Sabbar *et al.*, 2010; Fawole *et al.*, 2012). Los taninos hidrolizables son encontrados en la cáscara, pericarpio y arilos del fruto. Además, los taninos hidrolizables, en su mayoría se encuentran en el jugo de la granada y con cantidades que representan el 92% de la actividad antioxidante (Sabbar *et al.*, 2010). La acción de los componentes polifenólicos como los taninos frente a las bacterias puede estar establecida por una relación entre su estructura molecular y su toxicidad, propiedades astringentes o puede involucrar múltiples modos de acción (Vasconcelos *et al.*, 2006; Abdollahzadeh *et al.*, 2011). Por ejemplo: degrada la pared celular, interactúa con la composición e interrumpe la función de la membrana plasmática (Fawole *et al.*, 2012; Parseh *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2013), precipita proteínas de la membrana (Fawole *et al.*, 2012; Hegde *et al.*, 2012; Parseh *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2013), desnaturaliza enzimas, atrapan a sustratos como vitaminas, minerales y carbohidratos, haciéndolos indisponibles para las bacterias (Parseh *et al.*, 2012), cambio de ácidos grasos y constituyentes polifenólicos, perjudica mecanismos enzimáticos para la producción de energía y metabolismo, altera la captación de nutrientes y el transporte de electrones, influye en la síntesis de ADN y RNA, y destruye la translocación y la función de la mitocondria (Hassan *et al.*, 2013).

Como se sabe, en general las bacterias Gram positivas son más sensibles a la acción de sustancias que las Gram negativas. Este fenómeno es debido a que las Gram negativas poseen una membrana externa, la cual le da más protección (Abdollahzadeh *et al.*, 2011; Parseh *et al.*, 2012). En este trabajo se probaron 3 bacterias Gram positivas (*E. faecalis*, *M. luteus* y *S. aureus*) y 7 bacterias Gram negativas (*E. sakazakii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. flexneri*), los resultados demostraron que las Gram positivas fueron inhibidas por la

acción del MJGR, en donde *M. luteus* fue la más sensible al MJGR. Para el caso de las Gram negativas, *K. pneumoniae* no fue especialmente inhibida a las 48 horas esto se puede deber a que esta bacteria tiene cápsula, lo que representa una barrera extra contra la acción de compuestos. Es de llamar la atención que, *P. aeruginosa*, fue sensible al MSJGR por sí solo, ya que inhibió a la bacteria sobre todo a las 48 horas e incluso la inhibición fue igual en presencia de MJGR, pese a que estas bacterias son naturalmente resistente a antibióticos por fenómenos de selección natural a través de mutaciones y por la producción de biopelícula, la bacteria fue inhibida por los compuestos encapsulantes, por lo que posteriores estudios tendrán que llevarse a cabo para establecer la vía en que estos compuestos son tóxicos para esta bacteria, además, este mismo efecto lo manifestó sobre *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *S. flexneri* y *S. aureus* en uno de los dos tiempos de estudio, a excepción de *S. flexneri* que lo mantuvo en los dos, pero cuando se comparó en presencia de MJGR (TX), el % inhibición fue mayor mostrando diferencias significativas, estos resultados se pueden explicar debido a la presencia de compuestos de jugo de granada roja, la inhibición de crecimiento aumenta aún más que el control de MSJGR. De ahí las siguientes bacterias que fueron menos sensibles fueron: *E. coli* y *S. typhi* mientras que *E. sakazakii* la inhibición no fue significativa. Estos resultados coinciden con los encontrados por: Jurenka (2008), Viuda-Martos *et al.*, (2010), Wang *et al.*, (2010), Abdollahzadeh *et al.*, (2011), Sadeghian *et al.*, (2011) y Parseh *et al.*, (2012).

Finalmente, en este trabajo se demostró la actividad antibacteriana del MJGR frente a cepas bacterianas de importancia médica y en alimentos, pero es necesario señalar, que los ensayos que se realizaron en este trabajo fueron *in vitro* y los resultados pueden cambiar en un modelo *in vivo*, por lo que futuras investigaciones deberán dirigirse a buscar el efecto y biodisponibilidad de MJGR que permitan evaluar la cinética de liberación de polifenoles, para determinar así la dosis óptima de ingesta *in vivo* que garanticen su funcionalidad. Es de mencionar también, que se encapsularon todos los compuestos del jugo de granada, por lo que en futuros trabajos se deberá investigar los compuestos antimicrobianos del MJGR. Igualmente

sería importante evaluar las características fisicoquímicas que presenta el MJGR y finalmente probar si el MJGR conserva las mismas propiedades como lo es el jugo fresco (antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipertensivas, hipoglucemiantes y antiaterogénicas, etc.).

11. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un microencapsulado de jugo de granada roja en forma de polvo fino y estable.
2. Se observaron microcápsulas de jugo de granada roja entre 1 a 30 μm de diámetro en promedio con una geometría esférica e irregular.
3. El microencapsulado de jugo de granada roja tuvo actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas evaluadas, encontrando una concentración mínima inhibitoria de 250 mg/mL contra *M. luteus* con acción bactericida a 24 horas, y con una concentración mínima inhibitoria de 300 mg/mL con efecto bacteriostático a 24 horas para *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. aureus*. Mientras que para *E. sakazakii* la inhibición no fue significativa.
4. El microencapsulado sin jugo de granada roja inhibió por sí solo a *P. aeruginosa*.
5. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron relativamente altas debido a que se evaluó la actividad del jugo de granada roja y el agente encapsulante.
6. Se demostró que la microencapsulación por secado por aspersion encapsuló los compuestos bioactivos de jugo de granada roja conservando y protegiendo propiedades antibacterianas, por lo que el microencapsulado de jugo de granada roja podría emplearse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas.

12. PERSPECTIVAS

La microencapsulación ha sido eficiente para otros frutos como el arándano, fresa, uva y zarzamora, quizá con granada esto puede cambiar, por lo que será conveniente evaluar ciertas características del MJGR como: rendimiento de producción, eficacia de encapsulación, densidad de masa, humedad, solubilidad, transición vitria, higroscopicidad, etc., asimismo evaluar la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de jugo de granada roja antes y después de la microencapsulación.

No obstante, los resultados que se dieron a conocer en este estudio se formalizaron *in vitro*, por tanto, sería interesante realizar pruebas de biodisponibilidad de los polifenoles mediante diseños experimentales *in vivo* que permitan evaluar la cinética de liberación de polifenoles, para determinar la dosis óptima de ingesta en humanos que garanticen su funcionalidad.

También sería interesante saber cuál será la actividad antibacteriana del MJGR frente a microorganismos que se encuentran en la flora intestinal, ya sea de forma beneficiosa o bien desfavorable, ya que en este estudio se probó únicamente contra bacterias potencialmente patógenas.

Además, resulta necesario caracterizar los compuestos bioactivos no solo de jugo de granada sino de todas las partes del fruto que sustentan propiedades terapéuticas hacia la salud y a partir de ello, elaborar microencapsulados de cada compuesto polifenólico. De tal forma que el microencapsulado de granada roja sea probado sobre otras propiedades demostradas y que tiene el jugo como son: propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipertensivas, hipoglucemiantes y antiaterogénicas, etc.

Finalmente, una vez realizados estudios previos, sería de interés la elaboración de un producto alimenticio adicionado de MJGR o un MJGR listo para usarse

como materia prima en la formulación de alimentos, y a partir de lo anterior dar a conocer las propiedades no sólo de la actividad antibacteriana sino de las propiedades ya señaladas para utilizarse como una alternativa de un producto farmacéutico, y con ello fomentar y promover su consumo en la dieta habitual de la población tanto en el estado de Hidalgo como la región del Valle del Mezquital, una de las regiones principales que encabezan la producción estatal total de granada, sin esperar la temporada del fruto, manteniendo un producto con un tiempo de vida de anaquel que permite su uso y consumo por más tiempo.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, S. H., Mashouf, R. Y., Mortazavi, H., Moghaddam, M. H., Roozbahani, N., y Vahedi, M. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of *Punica granatum* Peel Extracts Against Oral Pathogens. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*. 8(1): 1-6.
- Aguilar, C. C. 2007. *Optimización del proceso de modificación del almidón de maíz ceroso por extrusión y el uso de mezclas de almidones modificados con mucílago de nopal para la encapsulación de aceite esencial de naranja empleando el secado por aspersion*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- Akbarpour, V., Hemmati, K., y Sharifani, M. 2009. Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit in Maturation Stage. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science*. 6(4): 411-416.
- Altuner, M. E. 2011. Investigation of antimicrobial activity of *Punica granatum* L. fruit peel ash used for protection against skin infections as folk remedies especially after male circumcision. *African Journal of Microbiology Research*. 5(20): 3339-3342.
- Ángeles, M. L. 2009. *Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersion de nivel piloto*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., México.
- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., y Lugo-Cervantes, E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*. 50(6): 585-590.
- Arun, N., y Singh, D. P. 2012. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3(5): 1240-1245.

- Basu, A., y Penugonda, K. 2009. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*. 67(1): 49-56.
- Bell, C., y Hawthorne, S. 2008. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer a mini review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 60(2): 139-144.
- Beristáin, G. C. 2001. Microencapsulación: el empaquetado en miniatura. *La Ciencia y el Hombre*. 14(1): 39-42
- Castañeda-Saucedo, M. C., Anaya, V. A., Tapia, C. E., Macías, M. A., Alzaga, V. E., Álvarez, G. A., Beltrán-Miranda, C. P., y Pita-López, M. L. 2012. Caracterización de genotipos de granada destinadas al consumo en fresco, y procesado en el sur de Jalisco. *Revista Mexicana de Investigación Psicológica*. 4(número monográfico): 135-147.
- Cienciacierta. *La granada: fuente de potentes agentes bioactivos*. Disponible, en: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC25/10granada.htm>. Actualización: 2009. Fecha de acceso: 11/12/12.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 21st Informational Supplement. M100 S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, 31: M100-S21.
- Colombo, E., Sangiovanni, E., y Dell'Agli, M. 2013, 20 de febrero. A Review on the Anti-Inflammatory Activity of Pomegranate in the Gastrointestinal Tract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, Article ID 247145, 11 pages. Recuperado el: 25/04/13, de: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/247145/>.
- Dipak, G., Axay, P., y Manodeep, C. 2012. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(2): 65-68.
- Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoylu, K. S., Erbil, N., y Durgac, C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to

- some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*. 14(5): 1808-1817.
- Endo, E. H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., y Filho, B. P. D. 2012. Activity of Spray-dried Microparticles Containing Pomegranate Peel Extract against *Candida albicans*. *Molecules*. 17(9): 10094-10107.
- Ercisli, S., Kafkas, E., Orhan, E., Kafkas, S., Dogan, Y., y Esitken, A. 2011. Genetic characterization of pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes by AFLP markers. *Biological Research*. 44(4): 345-350.
- Fabela, I. H. E. 2012. *Estudio antimicrobiano del jugo natural y bebidas comerciales a base de granada sobre cepas de Staphylococcus epidermis aisladas de infecciones oculares*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura). *Fichas técnicas productos frescos y procesados*. Disponible, en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/GRANADA.HTM#a1. Actualización: 2006. Fecha de acceso: 30/09/12.
- FAO/WHO. *Joint FAO/WHO food standards programme FAO/WHO coordinating committee for the near east fifth Session Tunis, Tunisia, 26 - 29 January 2009*. Disponible, en: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCNEA/ccnea5/ne05_17e.pdf. Actualización: 2009. Fecha de acceso: 18/11/12.
- Fawole, O. A., Makunga, N. P., y Opara, U. L. 2012. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC complementary and alternative medicine*. 12(1): 1-11.
- Fernández, Z. K. 2011. *Elaboración de microcápsulas de frutos ricos en antioxidantes mediante secado por aspersion para su adición en galletas*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- Filardo, K. S. 2012. *Encapsulamiento de sabores sintéticos y extractos naturales de frutas, granos y fármacos con goma extraída de Opuntia spp y Cylindropuntia*

imbricata mediante secado por aspersion para su utilizaci3n como materia prima en la industria alimentaria y farmac3utica. Patente Nacional MX_a_2012_001392. M3xico: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

- Filardo, K. S., Garc3a, E. G., S3nchez, 3. V. J., Sheinvar, L., y Garc3a, P. 3. 2010. Validaci3n de una mermelada horneable de xoconostle (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber), aplicaci3n y uso en tartas. *Industria Alimenticia*. 32(6): 28-32.
- Finotelli, P. V., y Rocha, L. M. H. 2005. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and Capsul using Spray-Drying. En 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process System Engineering. 1-11.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat, M. M. N., y Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*. 75(1): 27-35.
- Garc3a, V. C., y P3rez, V. A. 2004. La granada Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calor3as. *Alimentaci3n, Nutrici3n y Salud*. 11(4): 113-120.
- Garc3a-Guti3rrez, C., Gonz3lez-Maldonado, M. B., Ochoa-Mart3nez, L. A., y Medrano-Rold3n, H. 2004. Microencapsulaci3n de jugo de cebada verde mediante secado por aspersion. *Ciencia y Tecnolog3a Alimentaria*. 4(4): 262-266.
- Gil, M. I., Tom3s, B. F. A., Hess, P. B., Holcroft, D. M., y Kader, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(15): 4581-4589.
- Gonera, T., Sepulveda, E., y S3enz, C. 2010. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos de granado (*Punica granatum L.*). *La Alimentaci3n Latinoam3rica*. 41(285): 48-52.

- Growther, L., Sukirtha, K., Savitha, N., y Andrew, S. N. 2012. Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extracts against shiga toxin producing *E. coli*. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 1(4): 164-172.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., y Galotto, M. J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*. 146(2): 144-150.
- Hassan, N. A., El-Feky, G. S., y Elegami, H. M. 2013. Antibacterial Activity of Thirty Two Pomegranate (*Punica granatum L.*) Accessions Growing in Egypt Fruit Peels. *World Applied Sciences Journal*. 21(7): 960-967.
- Hegde, C. R., Madhuri, M., Nishitha, S. T., Arijit, D., Sourav, B., y Rohit, K. C. 2012. Evaluation of Antimicrobial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of Leaf Extracts of *Punica granatum L.* *Journal of Biological Sciences*. 1(2): 32-37.
- Höfling, J. F., Anibal, P. C., Obando, P. G. A., Peixoto, I. A. T., Furletti, V. F., Foglio, M. A., y Gonçalves, R. B. 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida species*. *Brazilian Journal of Biology*. 70(4): 1065-1068.
- Howell, A. B., y D'Souza, D. H. 2013, 20 de mayo. The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health. *Evidence-Based Complementary and Aternative Medicine*. 2013, Article ID 606212, 11 pages, 2013. Recuperado el: 14/07/13, de:
<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/606212/>.
- Ibrahium, M. I. 2010. Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *World Journal of Agricultural Sciences*. 6(4): 338-344.
- Infoagro. *El cultivo del granado*. Disponible, en:
http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/granado.htm. Actualización: (s.f.). Fecha de acceso: 10/03/13.

- Jurenka, M. T. J. 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*. 13(2): 128-144.
- Karasu, C., Cumaoglu, A., Gurpinar, A. R., Kartal, M., Kovacicova, L., Milackova, I., y Stefek, M. 2012. Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. *Interdisciplinary Oxidology*. 5(1): 15-20.
- Khan, J. A., y Hanee, S. 2011. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2(3): 23-27.
- López, H. O. D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*. 44(3): 381-389.
- Lozada, B. M. 2009. *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de Opuntia stricta mediante secado por atomización*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Cartagena. Murcia, España.
- Lupo, P. B., González, A. C., y Maestro, G. A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3(1): 130-151.
- Machado, T. D. B., Leal, I. C., Amaral, A. C. F., Santos, K., Silva, M. G. D., y Kuster, R. M. 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 13(5): 606-610.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Mackness, M. I. 1999. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *The Lancet*. 353(9151): 468-469.
- Mena, P., Gironés, V. A., Moreno, M. D. A., y García, V. C. 2011. Pomegranate Fruit for Health Promotion: Myths and Realities. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 5(2): 33-42.
- Mercado, S. E., Mondragón, J. C., Rocha, P. I., y Álvarez, M. B. 2011. Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(3): 449-459.

- Miguel, M. G., Neves, M. A., y Antunes, M. D. 2010. Pomegranate (*Punica granatum L.*): a medicinal plant with myriad biological properties a short review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(25): 2836-2847.
- Mirdehghan, S. H., Rahemi, M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Serrano, M., y Valero, D. 2007. Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. *Postharvest Biology and Technology*. 44(1): 26-33.
- Mondragón, J. C., y Juárez, C. S. 2008. *La granada roja: guía para su producción en Guanajuato*. Disponible, en:
<http://www.intranetfgp.com/SIAC/2007/26003/Publicaciones%20Generadas/Folleto%20para%20productores.pdf>. Actualización: 2008. Fecha de acceso: 26/11/12.
- Nishigaki, I., Rajendran, P., Venugopal, R., Ekambaram, G., Sakthisekaran, D., y Nishigaki, Y. 2008. Effect of extract of pomegranate (*Punica granatum L.*) on glycated protein-iron chelate-induced toxicity: an in vitro study on human umbilical-vein endothelial cells. *Journal of Health Science*. 54(4): 441-449.
- Nuamsetti, T., Dechayuenyong, P., y Tantipaibulvut, S. 2012. Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *Science Asia*. 38(3): 319-22.
- Parize, A. L., de Souza, T. C. R., Brighente, I. M. C., de Fávère, V. T., Laranjeira, M. C., Spinelli, A., y Longo, E. 2010. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African Journal of Biotechnology*. 7(17): 3107-31114.
- Parra, H. R. A. 2010. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 63(2): 5669-5684.
- Parseh, H., Hassanpour, S., Eman-djme, Z., y Shahab, L. A. *Antimicrobial properties of Pomegranate (Punica granatum L.) as a Tannin rich Fruit: a review*. Disponible, en:

<http://www.khuisf.ac.ir/DorsaPax/userfiles/file/pazhohesh/crowa91/34.pdf.m>.

Actualización: 2012. Fecha de acceso: 14/06/13.

- Pedroza, I. R., Macías, B. S., y Vernon, C. E. J. 2002. Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 1(1): 34-37.
- Pradeep, B. V., Manojbabu, M. K., y Palaniswamy, M. 2008. Antibacterial Activity of *Punica granatum L.* against Gastro Intestinal Tract Infection Causing Organisms. *Ethnobotanical Leaflets*. 12(1): 1085-1089.
- Prakash, C. V. S., y Prakash, I. 2011. Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel: a review. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 1(1): 1-18.
- Qnais, Y. E., Elokda, S. A., Abu Ghalyun, Y. Y., y Abdulla, A. F. 2007. Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*. 45(9): 715-720.
- Rivas, R. C. 2010. *Microencapsulación y estabilización enzimática del jugo de chirimoya (Annona cherimola Mill)*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Sabbar, D. S., Naiman, A. M., Tabassum, H., y Khan, M. 2010. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 9(3): 273-281.
- Sadeghian, A., Ghorbani, A., Mohamadi, N. A., y Rakhshandeh, H. 2011. Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 1(2): 67-73.
- Sagar, V. R., y Kumar, P. S. 2010. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 47(1): 15-26.

- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Peña, A., Robert P., Bartolomé, B., Gómez, C. 2010. Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of chilean pomegranate (*Punica granatum L.*) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 70(1): 50-57.
- Serrano, M. 2011. La granada: maduración y post-recolección. En P. M. Melgarejo, F. G. Hernández, y Legua P. M. (Eds.), *I Jornadas nacionales sobre el granado*. Universidad Miguel Hernández de El che, Alicante, España: Escuela Politécnica Superior de Orihuela.
- SIAP (Sistema de información agroalimentaria y pesquera Agricultura). *Producción anual*. Disponible, en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=9&Itemid=14. Actualización: 2013. Fecha de acceso: 28/08/13.
- Vasconcelos, L. C. S., Sampaio, F. C., Sampaio, M. C. C., Pereira, M. D. S. V., Higino, J. S., y Peixoto, M. H. P. 2006. Minimum Inhibitory Concentration of adherence of *Punica granatum Linn* (Pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*. 17(3): 223-227.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., y Pérez-Álvarez, J. A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(6): 635-654.
- Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H., y Xue, F. 2009. In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. *Journal of Applied Microbiology*. 107(6): 1781-1788.
- Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., y Du, L. 2010. Pomegranate: Constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 4(2): 77-87.
- Yáñez, F. J., Salazar, M. J. A., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M., y Ramos, R. E. G. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Industria Alimenticia*. 28(1): 10-12.

- Yáñez, F. J., Salazar, M. J .A., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M., y Ramos, R. E. G. 2006. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Industria Alimenticia*. 21(28): 10-16.
- Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., y Mousavi, S. M. 2011. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica granatum L.*). *Journal of Food Science and Technology*. 48(6): 677-684.