

Actividad antibacteriana de la corteza

del fruto de *Punica granatum* “GRANADA” frente a *Staphylococcus aureus* productores de biopelículas

Antibacterial activity of Punica granatum “pomegranate” rind against Staphylococcus aureus biofilm producers

 Noemí Zuta Arriola, Doctora¹.  María Elena Salazar-Salvatierra, Doctora².

¹Universidad Nacional del Callao. Lima, Perú.

²Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Autor de correspondencia: Noemí Zuta Arriola. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Callao. Lima, Perú. E-mail: nzutaa@unac.edu.pe

Financiamiento: Investigación financiada con fondos del FEDU_UNAC

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés relacionado al presente estudio.

Received/Recibido: 11/28/2021 Accepted/Aceptado: 03/15/2022 Published/Publicado 04/30/2022 DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.6625048>

Resumen

Objetivo: Determinar la actividad del extracto etanólico de la corteza del fruto de *Punica granatum* frente a *Staphylococcus aureus* formadores de biopelículas. **Materiales y métodos:** Reacciones de coloración y precipitación: para determinar metabolitos secundarios. Estudio microbiológico: con 30 cepas aisladas de catéteres y como cepa control *S. aureus* ATCC® 25923 formador de biopelículas. Agar rojo de Congo: para identificar las cepas productoras de biopelículas. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): mediante microdilución colorimétrica con diluciones del extracto (2000- 3.9 µg/mL). **Resultados:** Se identificaron azúcares reductores, flavonoides y compuestos fenólicos. Se determinó que 67% de las cepas presentaron capacidad de formar biopelículas. Las CMI del extracto evidenciaron actividad débil, moderada y buena actividad frente a 40, 45 y 15 % de las cepas. **Conclusión:** el extracto etanólico de la corteza de *Punica granatum* presentó actividad frente a cepas de *S. aureus* productoras de biopelículas.

Palabras claves: *S. aureus*, biopelículas, *Punica granatum*

Abstract

Objective: To determine the activity of the ethanolic extract of *Punica granatum* rind against biofilm formers *Staphylococcus aureus*. **Materials and methods:** Coloration and precipitation reactions: To determine secondary metabolites. Microbiological study: With 30 strains isolated from catheters and *S. aureus* ATCC® 25923 biofilm former as control strain. Congo red agar: To identify biofilm producers strains. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC): By the colorimetric microdilution with extract dilutions (2000- 3.9 µg/mL). **Results:** Reducing sugars, flavonoids and phenolic compounds were identified. It was determined that 67% of the strains had the ability to form biofilms. The MICs of the extract showed weak, moderate and good activity against 40, 45 and 15% of the strains. **Conclusion:** The ethanolic extract of the *Punica granatum* rind showed activity against strains of *S. aureus* biofilms producers.

Key words: *S. aureus*, biofilms, *Punica granatum*

Introduction

El aumento de infecciones asociadas a la atención de la salud se ha relacionado ampliamente al uso de dispositivos médicos (DM), principalmente a los que son implantados en el paciente como el catéter endovenoso central (CVC). Esto se debe a diversos factores como la presencia de los microorganismos de la piel o contaminantes ambientales que inician su colonización en dichos DM durante su inserción en el paciente. Una de las especies que más se reporta como asociada a la colonización de CVC es *Staphylococcus aureus*, cuyos factores de virulencia cumplen un rol importante en la patogénesis de estas infecciones¹, así, su capacidad de formar biopelículas hace que se adhiera fácilmente a distintas superficies como las de los DM, pero

también se considera un posible mecanismo de resistencia frente a antibióticos; por lo que se dispuso a nivel nacional la vigilancia de los patrones de resistencia de esta bacteria².

El Perú es un país megadiverso que posee una amplia cultura ancestral respecto al uso de plantas medicinales. A nivel mundial, más de cuatro mil millones de personas utilizan las plantas como principal remedio medicinal, práctica que se realiza empíricamente debido a la falta de estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que sustenten científicamente los efectos fisiológicos de los principios activos presentes. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las especies vegetales son la mejor fuente de fármacos para

la humanidad³. Las plantas superiores se caracterizan por su habilidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con posible aplicación terapéutica y que pueden constituir modelos para el desarrollo de fármacos de gran interés. Dichos fitoquímicos o principios activos son considerados como la fuente natural de protección frente a enfermedades. Sin embargo, aún continúa la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para diversas enfermedades infecciosas para las cuales no existe un tratamiento adecuado y efectivo, como sucede con aquellas causadas por bacterias que han desarrollado mecanismos de resistencia como respuesta al uso indiscriminado de antibióticos. Este problema se acrecienta con la resistencia fenotípica asociada a la formación de biopelículas. Las infecciones asociadas a bacterias que forman biopelículas suponen un grave problema sanitario representando entre 65 y 80% de todas las infecciones, debido a que se forman sobre los DM como catéteres, implantes, sondas urinarias, etc.⁴. En esta perspectiva, el reino vegetal ofrece la posibilidad de que, en los extractos de diferentes partes de las plantas, puedan descubrirse compuestos bioactivos comparables o superiores a los agentes antimicrobianos existentes.

La granada (*Punica granatum* L.), pertenece a la familia de la Punicáceas; el fruto está disponible todo el año, aunque puede ser estacional según la ubicación. Es una fuente rica en antioxidantes y vitaminas y proporciona alivio para dolencias cardíacas, diabetes y cáncer⁵. En la medicina tradicional, se ha utilizado *Punica granatum* (granada) como suplemento alimenticio o medicina por su amplia y diversa actividad farmacológica para la salud oral y la piel, antioxidante y antibacteriana, asociándose a la presencia de polifenoles y taninos^{5,6,7}. La presente investigación se desarrolló con el propósito de evaluar la actividad del extracto alcohólico de la corteza de *Punica granatum* "granada" frente a *Staphylococcus aureus* con capacidad de formar biopelículas.

Materiales y métodos

El presente estudio fue de tipo observacional, longitudinal y prospectivo. Los frutos de *Punica granatum* se adquirieron de los mercados de Lima Metropolitana en el mes de mayo de 2019. Se trabajaron treinta cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes hospitalizados entre junio y agosto del 2019 en un hospital nacional de la región Callao. Los ensayos microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional del Callao. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Preparación del extracto etanólico: Se retiró la cáscara de 5 Kg de fruto fresco, se pesó y secó al sol durante tres horas. Luego, se continuó con el secado en estufa a 45°C durante tres días. Se procedió a la molienda y, para la extracción, se consideró la proporción 1:20 (peso seco: etanol 70°) dejándolo a temperatura ambiente por tres días y protegido de la luz. Luego, se filtró y se obtuvo el extracto alcohólico

de la cáscara y se almacenó en frasco ámbar hasta los análisis respectivos.

Marcha fitoquímica preliminar: Para la detección de la presencia de metabolitos secundarios, se realizaron reacciones de coloración y precipitación⁸.

Capacidad de formación de biopelículas: Método propuesto por Freeman *et al.*⁹, que utiliza la siembra en agar rojo de Congo compuesto por agar BHI 37 g/L, sacarosa 50 g/L y colorante rojo Congo 0,8 g/L. Se sembraron las cepas de *S. aureus* aisladas y se dejó incubar de 24 – 48h a 37°C. Se consideró como resultado positivo a las colonias de color negro y como negativo a las colonias rosadas a rojo. La cepa control positiva para la formación de biopelícula fue *S. aureus* ATCC® 25923.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de *Punica granatum* frente a cepas *Staphylococcus aureus* productoras de biopelículas: Se realizó según el método de Sarker *et al.*¹⁰. Se preparó una solución stock (200 mg/mL) del extracto utilizando como diluyente el dimetil sulfóxido (DMSO). Se filtró con membrana de 0,2 µm y se almacenó protegido de la luz a 4°C. También se preparó 5 mL de una solución stock de resazurina (20 mg/mL) en agua destilada estéril. Se filtró (0,22 µm) y se almacenó protegido de la luz a 4°C.

La preparación del inóculo de cada cepa se realizó suspendiendo, en solución salina estéril, colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro y 24 h de crecimiento en agar tripticasa de soya (TSA) hasta obtener una turbidez equivalente a la escala 0,5 de Mc Farland (1,5x10⁸ UFC/mL). Se confirmó con un nefelómetro.

La solución stock del extracto se diluyó, sucesivamente, hasta obtener concentraciones en el rango de 2000 - 3,91 µg/mL. Se incluyeron micropozos de control de crecimiento y de esterilidad del medio. Las pruebas se realizaron por triplicado. Las microplacas se colocaron en incubadora a 37°C por 24 h. Después de la incubación, se procedió a la lectura considerando los valores de CMI descritos por Paredes *et al.*¹¹ y Holetz *et al.*¹², que clasifican la actividad antimicrobiana de la siguiente manera: CMI 500 a 1000 µg/mL como actividad débil, CMI 100 a < 500 µg/mL como actividad moderada y CMI < 100 µg/mL como buena actividad. Para confirmar los valores de CMI, se sembraron en TSA los contenidos de los micropozos.

Se aplicaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias significativas, con un nivel de significancia de p<0,05.

Resultados

De 5 kg de fruto, se obtuvieron 1130 g de cáscara húmeda, lo que constituye aproximadamente 22,6%. La humedad determinada en la cáscara fue 64,85 % (peso promedio final 397,2 g).

Al realizar el tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto de corteza de *Punica granatum* "granada", se encontraron flavonoides, azúcares reductores y compuestos fenólicos (Tabla 1).

Tabla 1. Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de Punica granatum

IDENTIFICACIÓN	REACTIVO	RESULTADOS
Azúcares reductores	Fehling	+++
	Benedict	+++
Fenoles	Cloruro Férrico	+++
Flavonoides	Borntrager	++
	Shinoda	++
Alcaloides	Dragendorff	-
	Wagner	-
Saponinas	Agua destilada	-

El crecimiento de colonias negras en agar rojo de Congo evidenció 27% (20/30) de cepas positivas para la formación de biopelículas.

Por el método de microdilución colométrica, se determinó la CMI del extracto etanólico de la corteza de *Punica granatum* "granada" y se encontró actividad débil frente al 40 % (8/20) de las cepas, actividad moderada frente al 45 % (9/20) (Figura 1) y con buena actividad frente al 15 % (3/20) restante de las cepas de *S. aureus* formadoras de biopelículas (Tabla 2). La CMI frente a la cepa ATCC fue buena con un valor de 7,81 μ g/mL (Figura 2).

Tabla 2. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y actividad del extracto por cepa

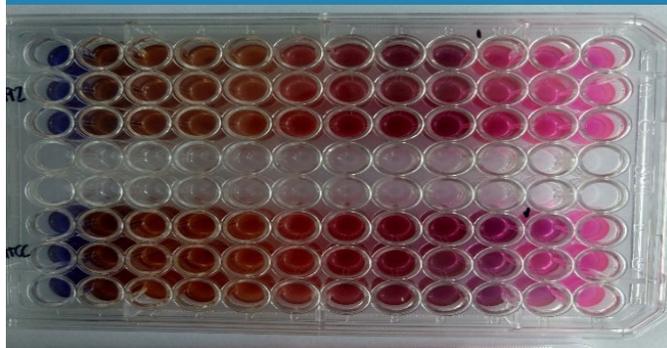
Cepas formadoras de biopelícula	CMI (μ g/mL)	Actividad
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,81	Buena
12, 651, 892	15,63	Buena
181, 413, 812	125	Moderada
37, 58, 123, 366, 421, 1041	250	Moderada
6, 208, 325	500	Débil
108, 215, 416, 481, 511	1000	Débil

Con respecto al tratamiento estadístico, se procesó con la prueba de Kruskal Wallis con seis grupos incluido el control. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos y con respecto al control ($p=0,001$).

Figura 1. Se muestra la actividad moderada (CMI 125 g/mL) del extracto etanólico frente a dos cepas (812 y 1041).



Figura 2. Se muestra la actividad buena frente a la cepa 892 (CMI 15,63 g/mL) y frente a la *S. aureus* ATCC (CMI 7,81 g/mL).



Discusión

La proporción de cáscara obtenida del fruto fue mucho menor de lo encontrado en las revisiones realizadas por Ko *et al.*¹³, quienes mencionan 43%. También fue menor que lo encontrado por Akhtar S. *et al.* (14) y Viuda Martos *et al.*¹⁵, quienes indican que constituye alrededor del 50 % del peso del fruto. Estas diferencias podrían deberse al lugar de procedencia del fruto así como a factores climáticos, tierra de cultivos, entre otros. Sin embargo, la humedad de la cáscara fue muy cercana al rango (67,26 – 73,23 %) encontrado por Ko *et al.*¹³.

El extracto alcohólico de la corteza de *Punica granatum* evidenció presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales podrían ser responsables de las actividades que se han reportado¹³. Además, Viuda-Martos *et al.*¹⁵ reportan, en la cáscara de granada, elagitaninos y proantocianidinas como componentes principales. También, se ha reportado presencia de compuestos fenólicos de alto peso molecular, polisacáridos complejos, y microelementos. La presencia de todos estos compuestos bioactivos contribuye a la actividad anti-mutagénica, antioxidante, y antimicrobiana¹⁴.

En los últimos años, se ha descrito un aumento de infecciones de *S.aureus* asociado a dispositivos invasivos como catéteres. Estas infecciones son difíciles de erradicar,

probablemente, porque dichas bacterias forman biopelículas que les permiten una fuerte adherencia a la superficie¹. Asimismo, el exopolisacárido que rodea a la biopelícula ofrece un obstáculo al paso de los antibióticos, lo cual es considerado como un mecanismo de resistencia bacteriana.

La presencia de 67% de cepas productoras de biopelículas, de acuerdo con el ensayo fenotípico por siembra en agar rojo de congo (ARC) en el presente estudio, indica que hay adherencia de *S. aureus* a los catéteres de los cuales fueron aislados, lo cual es un resultado menor a lo reportado por Salazar *et al.*, quienes encontraron 81% de cepas formadoras de biopelículas en *S. aureus* provenientes de CVC¹⁶. Shrestha *et al.*, en el 2017, reportaron, por el contrario, menor porcentaje a lo hallado en el presente estudio en cepas clínicas provenientes de diferentes muestras¹⁷. Estas diferencias podrían deberse a que la formación de biopelículas bacterianas depende de muchos factores como el ambiente, el tipo de dispositivo médico, la disponibilidad de nutrientes, las características intrínsecas de cada cepa, entre otros. También, se debe considerar que el método de ARC puede ser interpretado de forma diferente. Además, presenta sensibilidad baja, pero tiene 97,4 % de especificidad para la detección de biopelículas, como lo mencionan Abdel R *et al.*¹⁸, especialmente para el género *Staphylococcus*.

La colonización de los dispositivos intravasculares por *S. aureus* productores de biopelículas representa un grave problema de salud pública porque puede agravarse el pronóstico con una consecuente bacteriemia o septicemia que pueden comprometer la vida del paciente. Las cepas productoras de biopelículas son difícil de eliminar¹⁹ por su gran resistencia a la acción de los antimicrobianos y porque, aparentemente, existe relación entre la fuerte adherencia en cepas formadoras de biopelículas y el grado de patogenicidad²⁰. Por lo tanto, es importante la búsqueda permanente de un tratamiento eficiente para las infecciones causadas por bacterias que forman biopelículas.

Por el método de microdilución colométrica, se determinó la CMI del extracto etanólico de la corteza de *Punica granatum* "granada" frente a las 20 cepas de *S. aureus* aisladas de punta de catéter que dieron positivo a la producción de biopelícula por el método de rojo de Congo, y se detectó actividad sobre un alto porcentaje de dichas cepas, lo que coincide con otros estudios^{21, 22}. La actividad antimicrobiana del extracto de cáscara de *Punica granatum* es muy importante, ya que las cepas ensayadas presentan un mecanismo que les podría dotar de resistencia a múltiples fármacos. Esto se debe a que, cuando crecen como una biopelícula, tienen la posibilidad de residir dentro de una capa protectora compuesta de sustancias poliméricas extracelulares, lo que disminuye la permeabilidad a los fármacos²³.

Si comparamos los promedios de las CMI del extracto de corteza de *Punica granatum* para las cepas analizadas, se puede evidenciar que para *S. aureus* ATCC 25923 y 3/20 de cepas clínicas fueron menores a 100 µg/mL; es decir, la actividad antimicrobiana del extracto fue buena. Asimismo,

las CMI para 9/20 de las cepas clínicas se encontraron entre 100 y menos de 500 µg/mL, considerándose la actividad antibacteriana moderada. Finalmente, para 8/20 de cepas, la CMI estuvo entre 500 a 1000 µg/mL, es decir presentó actividad débil. Por lo tanto, se puede inferir que el extracto alcohólico de corteza de *Punica granatum*, al inhibir el crecimiento microbiano de cepas de *S. aureus* productoras de biopelículas, también tendría actividad antibiopelícula. Al aplicar la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis de muestras independientes se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre la actividad antibacteriana a los diferentes CMI del extracto de *Punica granatum* frente a las 20 cepas ensayadas de *S. aureus* productoras de biopelícula. Así también se puede deducir que los compuestos fenólicos presentes en la corteza de *Punica granatum* serían los responsables de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.

Entre las limitaciones del presente estudio, se puede considerar que no se ha realizado la cuantificación de la formación de biopelículas, debido a que el método del ARC es un método fenotípico cualitativo. No obstante, se puede inferir, de forma indirecta, la actividad antibiopelículas del extracto, debido a que, a determinadas CMI, el extracto alcohólico de la cáscara de *Punica granatum* inhibió el desarrollo bacteriano inicial, que es una etapa crítica para el establecimiento inicial de una biopelícula.

Financiamiento:

Investigación financiada con fondos del FEDU_UNAC

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad del Callao por facilitar el acceso a laboratorios, recursos para la investigación.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado.

Referencias

1. Antunes ALS, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CCF, Perez LRR, Macedo AJ, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS*. 2010; 118(11):873-7. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02681.x.
2. MINSAL. R.M. N°523-2020-MINSAL. Norma Técnica de Salud para la Vigilancia de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. Perú.
3. WHO | WHO traditional medicine strategy: 2014-2023 [Internet]. WHO. [Citado 2 de marzo de 2019]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/
4. Macià MD, del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones

relacionadas con la formación de biopelículas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018; 36(6):375-81.

5. Jacob J, Gopalan R, Lakshmanaperumalsamy P, Illuri R, Bhosle D, Sangli GK, et al. Evaluation of Antipsoriatic Potential of the Fruit Rind of *Punica granatum* L. *Pharmacog J*. 2019; 11 (3): 466-468.
6. Tandokazi P, Nokwanda P, Olaniyi A, Umezuruike L. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel waste: a review. *Molecules*. 2020; 25: -34. doi: 10.3390/molecules25204690.
7. Madugula P, Reddy S, Koneru J, Srinivasa A, Sruthi R, Teja D. "Rhetoric to Reality"-Efficacy of *Punica Granatum* peel extract on oral candidiasis: an in vitro study. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(1): Z114-7. doi: 10.7860/JCDR/2017/22810.9304.
8. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos en estudios de productos naturales. Segunda edición. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 1994.
9. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989; 42: 872-4.
10. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42 (4): 321-4. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.006
11. Machado P, Vasconcelos FR, Terceiro R, Mendes M, De Moraes SM, Machado S, et al. Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; 1-9. doi: 10.1155/2016/7930563
12. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-31. doi: 10.1590/S0074-02762002000700017
13. Ko K, Dadmohammadi Y, Abbaspourrad A. Nutritional and bioactive components of Pomegranate waste used in food and cosmetic applications: a review. *Foods*. 2021; 10, 657. doi: 10.3390/foods10030657
14. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. 2015. *Food Chemistry* 174: 417-425. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.035
15. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 9: 635-654. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x
16. Salazar M, Crispín V. Biopelículas y gene icaA e icaD en estafilococos coagulasa negativos aislados de catéter endovenoso central en Unidad de Cuidados Intensivos de un Hospital de Nivel III en Lima, Perú. *Horizonte Médico*2018; 18(3):19-24.
17. Shrestha L, Bhattarai NR, Khanal B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of Eastern Nepal. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*.2017; 89:1-7. doi: 10.1186/s13756-017-0251-7
18. Abdel R, Kassem N, Mahmoud B. Detection of biofilm producing Staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2018; 6(8): 1335-1341. doi: 10.3889/oamjms.2018.246
19. Mishra SK, Basukala P, Basukala O, Parajuli K, Pokhrel BM, Rijal BP. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices. *Curr Microbiol*. 2015; 70(1): 128-134.
20. Neopane P, Prasad H, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from wounds of hospital admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International Journal of General Medicine* 2018; 11:25-32.
21. Kisla D, Karabiyikli S. Antimicrobial effect of sour pomegranate sauce on Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. *J Food Sci*. 2013; 78(5): M715-8. Doi: 10.1111/1750-3841.12099.
22. Khan JA, Hane S. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011; 2: 23-27.
23. Pramadita J, Widyarman AS. In vitro antibiofilm activity of Pomegranate (*Punica granatum*) juice on oral pathogens. *Journal of Indonesian Dental Association*. 2019; 2(1): 15-20. doi: 10.32793/jida.v2i1.353