

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Extracción y Cuantificación de Aceite Esencial de Cáscara de Granada (*Punica granatum* L.) y Determinar su Efecto Antifúngico Sobre *Penicillium* sp.

Por:

TERESA CASTILLO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Abril del 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Extracción y Cuantificación de Aceite Esencial de Cáscara de Granada (*Punica granatum* L.) y Determinar su Efecto Antifúngico Sobre *Penicillium* sp.

Presentada Por:

TERESA CASTILLO SÁNCHEZ

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada



Dr. Antonio F. Aguilera Carbó

Presidente



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

Sinodal



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Sinodal
Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



Ing. José Rodolfo Peña Oranday

Coordinador de la División de Ciencia Animal



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; Abril del 2010.

El presente trabajo de tesis fue realizado dentro del marco de actividades del proyecto de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con clave de proyecto 020304052237, titulado “Extracción de compuestos nutracéuticos de cáscara de granada y otros residuos agroindustriales”.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo, ser mi luz en el camino y darme fortaleza en los momentos más difíciles.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por ser mi casa de estudios y haberme dado la oportunidad de formarme como profesional.

Al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó por la planeación, asesoría y observaciones para la ejecución y culminación de este proyecto; además por su valiosa amistad.

A la Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, por su apoyo y observaciones realizadas al trabajo de investigación, asimismo por brindarme su amistad.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez por la atención prestada para la culminación de este proyecto.

A los maestros de la carrera de ICTA y los maestros de apoyo, por contribuir en mi formación profesional.

T.A. Carlos A. Arévalo Sanmiguel encargado del laboratorio del Departamento de Nutrición Animal, por su gran apoyo en el trabajo de laboratorio, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A muchos amigos que fueron como mi familia durante mi estancia en Saltillo: Javier Lombard Romero, Luis Alberto Echeverría Herrera (Guary), Daniel Soto Molina (el Rock), Miguel Ángel Grageda García (Mike), José Luis S. Loyo Loyo, Genaro

Demuner, Daniel Reyes, Arturo Córdova, Eduardo Calderón, Antonio Flores Naveda, Elvis Alejandro Guzmán Morales, Luis Fernando Barbosa Abundis (Don Fer), I. Alejandrina Guerrero Rosales, Cecilia Peña González, Verónica González Mata.

A mis compañeros y amigos de la Generación CVI de Alimentos, en especial a Aglael Castro Gatica y Juan José Hernández Centeno por su apoyo y amistad incondicional.

A mis amigos del Instituto Tecnológico Superior de Huatusco; Isaura Tablas González, Diego Armando López Pale, Delia García Hernández, Isabel Castro, Ing. Adán Cabal Prieto, Carlos Beristaín Mexicano, Rubén Flores, Eder Moreno, Yahir Hernández y C.P. Antonieta Becerra Ferniza.

A mis cuñados Eleuterio Alfonso Gómez y Juan Espinosa González.

A mis amigas Guadalupe Vera Torales y Rosaura López Hernández.

A todas las personas que en su momento me brindaron su apoyo en esta etapa de mi vida, GRACIAS.

DEDICATORIAS

A mis padres Teresa Sánchez Sánchez y Jorge Castillo Hernández, por hacer de mí una mujer con principios y valores, por su amor y sus consejos, por todo su trabajo y esfuerzo; Gracias por todo, este logro es por y para ustedes.

A mis hermanas María Esther Castillo Sánchez y Lidia Castillo Sánchez, por apoyarme y alentarme en el camino.

A mis sobrinos Antonio Abad Alfonso Castillo, Jorge Alfonso Castillo, Sara Aidé Espinosa Castillo y Monserrat Alfonso Castillo. Los quiero mucho.

A mi tía Silvia Sánchez Sánchez por sus consejos e impulsarme siempre a ser mejor.

*A mis abuelos, por haberme dejado grandes enseñanzas
Ignacia Hernández de los Santos † y Jerónimo Castillo Castro †
Guadalupe Sánchez Castro † y José Sánchez Heredia †.*

A Jorge Alejandro Torres González por todo lo que me has enseñado y tu apoyo incondicional. Gracias mi amor.

ÍNDICE

	Página
Índice	VII
Índice de cuadros	XI
Índice de figuras	XII
Resumen	XIII
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Justificación	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 Hipótesis	5
Capítulo II. Revisión de Literatura	6
2.1 La granada (<i>Punica granatum</i> L.)	6
2.1.1 Generalidades del cultivo.....	6
2.1.2 Producción a nivel mundial.....	7
2.1.3 Producción a nivel nacional.....	7
2.1.4 Producción a nivel estatal.....	8
2.1.5 Producción de cáscara de granada.....	11
2.1.6 Aplicaciones de la cáscara de granada.....	11
2.2 El aceite esencial como uno de los componentes de la cáscara de granada	13
2.2.1 Las grasas y los aceites.....	13
2.2.2 Aceites esenciales.....	13

2.2.2.1	Definiciones.....	13
2.2.2.2	Distribución y estado natural.....	14
2.2.2.3	Clasificación de los aceites esenciales.....	15
2.2.3	Técnicas de extracción de aceites esenciales.....	16
2.2.3.1	Arrastre con vapor.....	16
2.2.3.2	Solventes.....	17
2.2.3.3	Prensado o expresión.....	18
2.2.3.4	Fluidos supercríticos.....	19
2.2.3.5	Radiación de microondas.....	20
2.2.4	Los ácidos grasos.....	21
2.2.4.1	Importancia del análisis de los ácidos grasos.....	22
2.2.5	Cromatografía de gases.....	22
2.2.5.1	Aplicaciones.....	24
2.3	Los aceites esenciales y su actividad antimicrobiana.....	25
2.3.1	<i>Penicillium</i>	26
2.3.1.1	Clasificación taxonómica.....	29
2.3.1.2	Condiciones para su crecimiento <i>in vitro</i>	29
2.3.1.3	Características microscópicas.....	29
2.3.1.4	Características macroscópicas.....	30
Capítulo III.	Metodología Experimental.....	31
3.1	Etapas I. Obtención y caracterización de la cáscara de granada...	31
3.1.1	Localización.....	31
3.1.2	Obtención de la cáscara de granada.....	31
3.1.3	Procesamiento de la cáscara de granada.....	32
3.1.4	Determinación de materia seca total.....	32
3.1.5	Humedad.....	33
3.1.6	Cenizas.....	33

3.1.7 Extracto etéreo (lípidos).....	33
3.1.8 Proteína cruda.....	34
3.1.9 Fibra cruda.....	35
3.1.10 Azúcares totales.....	35
3.1.11 Fenoles hidrolizables totales (FHT).....	36
3.1.12 Pectina.....	36
3.2 Etapa II. Evaluación de tres sistemas de obtención de aceite esencial.....	38
3.2.1 Método Soxleth.....	38
3.2.2 Método sólido-líquido.....	39
3.2.3 Método por arrastre de vapor.....	40
3.3 Etapa III. Cuantificación e identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite esencial de cáscara de granada.....	41
3.3.1 Extracción de los triglicéridos del aceite esencial de la cáscara de granada.....	41
3.3.2 Hidrólisis de triglicéridos hasta ácido graso y esterificación del ácido graso en ésteres metílicos.....	42
3.3.3 Cuantificación de los ácidos grasos de la cáscara de granada mediante cromatografía de gases.....	43
3.4 Etapa IV. Capacidad de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Penicillum sp.</i>.....	45
3.4.1 Microorganismo.....	45
3.4.2 Preparación del medio de cultivo e inoculación.....	45
3.4.3 Evaluación del crecimiento radial e inhibición.....	45
3.4.4 Diseño de experimento.....	46
Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	47
4.1 Etapa I. Obtención y caracterización de la cáscara de granada.....	47

4.2 Etapa II. Evaluación de tres sistemas de obtención de aceite esencial.....	49
4.3 Etapa III. Cuantificación e identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite esencial de cáscara de granada.....	51
4.4 Etapa IV. Capacidad de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Penicillum</i> sp.....	54
Capítulo V. Conclusiones.....	58
Capítulo VI. Recomendaciones.....	59
Capítulo VII. Literatura Citada.....	60
Capítulo VIII. Anexos.....	68

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Producción de granada roja en México en el año 2003.....	8
Cuadro 2. Producción agrícola en Coahuila de Zaragoza en el 2008.....	10
Cuadro 3. Componentes del estándar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.....	44
Cuadro 4. Caracterización físico-química de la cáscara de granada.....	48
Cuadro 5. Ácidos grasos identificados en cada método con un porcentaje \geq a 0.1%.....	53

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Flor y fruto del árbol de granado.....	6
Figura 2. Los diez primeros estados de México en producción de granada roja en el año 2004.....	9
Figura 3. Cromatógrafo de gases, modelo Perkin Elmer Autosistem XL.	24
Figura 4 Extracción de aceite por método Soxleth.....	39
Figura 5. Extracción de aceite por arrastre de vapor.....	40
Figura 6. Separación de las fases con acetato de etilo.....	41
Figura 7. Rendimiento del aceite esencial de cáscara de granada.....	50
Figura 8. Cromatograma del estándar empleado como referencia.....	51
Figura 9. Cromatograma de los ácidos grasos identificados de una muestra extraída por arrastre de vapor.....	53
Figura 10. Ácidos grasos identificados en el aceite esencial de cáscara de granada, en las muestras extraídas por sólido-líquido (S-L), Soxleth (SX) y arrastre por vapor (AV).....	54
Figura 11. Comportamiento de <i>Penicillium</i> sp en las diferentes concentraciones de aceite.....	55
Figura 12. Comportamiento de <i>Penicillium</i> sp; concentración 1) 0 (Control); 2) 100 µL; 3) 300 µL; 4) 500 µL; 5) 1500 µL.....	57

RESUMEN

La gran producción de desechos orgánicos nos ha dado la tarea de crear alternativas para su utilización, por lo tanto el presente trabajo tuvo el objetivo de extraer y cuantificar el aceite esencial de cáscara de granada así como determinar el efecto antifúngico sobre *Penicillium sp in vitro*; para lo cual se implementaron tres diferentes métodos de extracción de aceite, Soxleth (M1), sólido-líquido (M2) y arrastre de vapor (M3); se hicieron extracciones por triplicado para cada método y así obtener un ANOVA donde se mostraron mejores resultados por el método de arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento de 8.7 %; posteriormente se realizó la esterificación del aceite, donde se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos, que se analizaron por cromatografía de gases. Fueron identificados el ácido butírico (C4:0); el ácido linolelaídico (C18:2n6-t); linoleico (C18:2n6-c) (ω -6); araquídico (C20:0) y docosahexaenoico (DHA) (C22:6n-3) (ω -6), de acuerdo al estándar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (Supelco™ 37 Component FAME Mix), algunos de ellos se encontraron hasta en un 0.9 % en peso de la muestra, siendo estos de gran importancia para la industria alimentaria. Se evaluó el efecto antifúngico sobre *Penicillium sp*, aplicando diferentes concentraciones del aceite esencial de cáscara de granada 100, 300, 500, 1500 μ l y control (0), obteniendo como resultado un efecto negativo, ya que el microorganismo fue capaz de crecer incluso con un área mayor que el control.

Palabras clave: cáscara de granada, ácidos grasos, aceite esencial, *Penicillium sp*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha surgido un gran interés por las plantas medicinales que rodean nuestro entorno, la importancia en el estudio de las plantas medicinales y ahora de estos residuos orgánicos, es evaluar la eficacia de su uso como remedios caseros tradicionales haciendo una contribución a su validez científica y legislativa.

La granada (*Punica granatum* L.), es una planta con múltiples propiedades terapéuticas de arraigado uso en la medicina tradicional desde tiempos ancestrales, actualmente se emplea en diferentes países y existe un gran interés por el estudio de esta especie vegetal (Ventura-Sobrevilla, *et al.*, 2006; Sánchez, *et al.*, 2005).

En gran parte del mundo desde hace algunos años se ha venido exigiendo mejor calidad de alimentos, tratando de usar menor cantidad de químicos y emplear mayor cantidad de productos biológicos lo que se ha logrado con la agricultura orgánica. Por lo anterior, la demanda de productos biológicos y/o extractos de vegetales es cada vez mayor (Sandoval, 2005).

Así pues, se han obtenido diversos extractos de la granada utilizando el jugo, semillas, cáscara y fruto completo; en cuanto al árbol de granado se han empleado

hojas, flores y raíces. Estos extractos exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmínticas, antibacteriales, antitumorales, antivirales y astringentes. También se han empleado para el control de diabetes *mellitus*, hiperlipidemia, hipertensión, arterosclerosis, problemas bucales, infertilidad femenina, disfunción eréctil, obesidad, Alzheimer, diarrea y úlceras (Ventura-Sobrevilla, *et al.*, 2006).

Todo esto pone de manifiesto las múltiples propiedades de la granada por lo que es necesario realizar estudios en este sentido para encontrar nuevas alternativas.

De esta manera el presente estudio a partir del empleo de residuos orgánicos, como el de la cáscara de granada, busca extraer el aceite esencial y cuantificar sus ácidos grasos, además de probarlo como inhibidor de algunos microorganismos como *Penicillium* y evidenciar sus efectos.

La tarea no es nada fácil puesto que antes se debe hacer frente a retos como el puramente tecnológico, ya que dar salida a estos desechos requiere un tratamiento específico y conocer con exactitud las aplicaciones que pueden tener.

1.1 Justificación

La industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos orgánicos los cuales no son tratados de manera adecuada, por lo que se convierten en un problema de contaminación importante, sobre todo de aguas y suelo. Las tendencias en la generación de tecnologías verdes y tecnologías limpias en pro del cuidado y protección del medio ambiente, han iniciado con integración en la cadena productiva, de tal forma que a dichos residuos se les dé un tratamiento y a la vez un valor agregado.

En la Unión Europea se producen al año millones de toneladas de desechos orgánicos procedentes del procesado al que se someten productos como vegetales y frutas. La dificultad que entraña deshacerse de ellos, unida a que ocupan mucho espacio y a que generan olores y gases durante su descomposición, ha llevado a una parte del sector dedicado a la tecnología alimentaria a buscar salida a estos restos. Una de ellas apunta al aprovechamiento de estos coproductos mediante la extracción de distintos ingredientes que puedan aplicarse en la industria alimentaria. Así, frutas y vegetales son algunos de los productos cuyos restos contienen sustancias, como ácidos orgánicos o aceites esenciales, de interés en la producción alimentaria (Chavarrías, 2009).

Las investigaciones en relación a la cáscara de granada aún están en desarrollo, así como las aplicaciones que esta pueda tener, por lo tanto la presente investigación pretende extraer el aceite esencial de la cáscara de granada y darle un valor agregado, como aumentar la vida de anaquel de los frutos, conservar

alimentos, de tal forma que se pueda contribuir de manera efectiva a la industria alimentaria, o incluso que pueda ser empleado en otro tipo de industrias como la farmacéutica, cosmética, aromaterapia, entre otras.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Extraer y cuantificar el aceite esencial de cáscara de granada (*Punica granatum* L.) y determinar su efecto antifúngico sobre *Penicillium* sp.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la cáscara de granada.
- Evaluar tres sistemas de extracción de aceite esencial de cáscara de granada en base al rendimiento.
- Cuantificar los ácidos grasos del aceite esencial de la cáscara de granada.
- Definir si las señales de los ácidos grasos encontrados son las mismas en los tres métodos de extracción aplicados.
- Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de granada aplicando diferentes concentraciones sobre *Penicillium* sp *in vitro*.

1.3 Hipótesis

Es posible extraer el aceite esencial de cáscara de granada, conocer algunos de sus componentes y estos a su vez podrán tener la capacidad de inhibir microorganismos alterantes de algunos frutos.

2.1 La granada (*Punica granatum* L.)

2.1.1 Generalidades del cultivo

El Granado (*Punica granatum* Linnaeus), es el nombre común de un arbusto espinoso de la familia de las Punicáceas, que también es conocido como Balaustia, Magrano, Pomogranado (Peris, *et al.*, 1996), el cual alcanza entre 2 y 6 m de altura y produce un fruto llamado granada (figura 1). Aunque es originaria de Persia su cultivo se ha extendido desde el Mediterráneo (China e India) hasta el continente Americano, desde California, hasta Argentina, Chile y México (Robledo-Olivo, 2006; Peris, *et al.*, 1996; Tous, *et al.*, 1996; Ventura-Sobrevilla, *et al.*, 2006).



Figura 1. Flor y fruto del árbol de granado.

La granada es un frutal que puede sobrevivir y ser productivo bajo condiciones adversas; además, no exige manejos especiales para poder prosperar y el producto

tiene gran aceptación y alcanza precios de venta altos. En México este producto se ha destinado principalmente para el autoconsumo, sin embargo, en los últimos años ha cobrado mayor interés en su plantación ya que puede captar mejores ingresos por la venta de su fruta que otros frutales (Andrés, *et al.*, 1997).

2.1.2 Producción a nivel mundial

Según una publicación en el diario de Tehrán, Irán en el 2004 (Web 1), el más grande productor y exportador de granada a nivel mundial es Irán, con una producción anual de 670,000 toneladas, ya que la granada es producida en casi todas las partes de Irán. Cobelo (2007), menciona que el gran productor mundial sigue siendo Irán con un 76 % del total de la producción mundial, siguiendo la India con el 10 %, España con 8 %, Afganistán 5 %, Túnez 1 % e Israel con el 0.4 %.

2.1.3 Producción a nivel nacional

El Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON) en el 2003, reporta en México los ingresos por producción de granada, mayores a los 8 millones de pesos (cuadro 1) (Web 3). Se cultiva en las casas y está asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia y perennifolia; matorral xerófilo y bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino y pino. Hay variedades enanas que no producen fruto y son usadas principalmente como ornamentales por la flor (Robledo-Olivo, 2006).

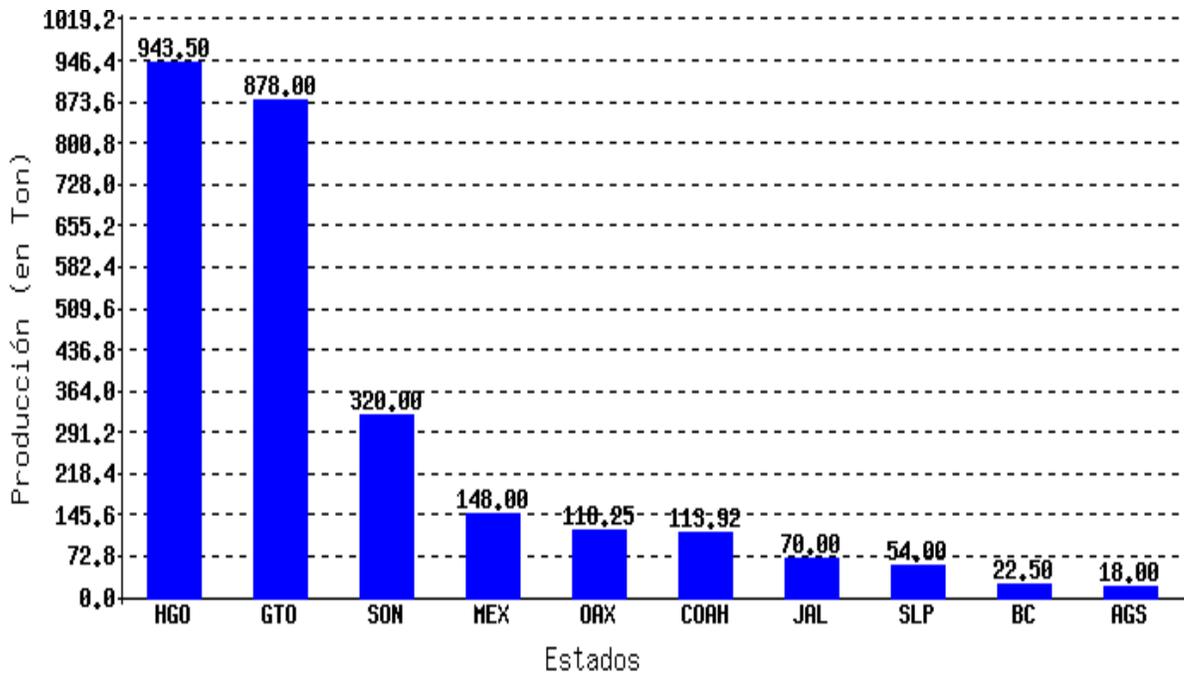
Cuadro 1. Producción de granada roja en México en el año 2003.

Estado	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor Producción (Pesos)	Producción (%)	Lugar de producción
AGUASCALIENTES	16.00	5.333	64,000.00	0.58	9°
BAJA CALIFORNIA	12.60	4.200	28,980.00	0.45	10°
COAHUILA	115.50	14.438	1,501,500.00	4.15	5°
COLIMA	2.50	5.000	15,000.00	0.09	12°
GUANAJUATO	994.20	13.619	2,495,100.00	35.74	2°
HIDALGO	1,093.00	10.930	2,833,500.00	39.30	1°
JALISCO	33.60	3.360	127,560.00	1.21	8°
MÉXICO	148.00	3.700	614,000.00	5.32	4°
OAXACA	69.00	4.059	370,500.00	2.48	6°
SAN LUIS POTOSÍ	45.00	5.000	56,250.00	1.62	7°
SONORA	240.00	12.000	684,000.00	8.63	3°
ZACATECAS	12.00	4.000	120,000.00	0.43	11°
TOTAL	2,781.40	9.708	8,910,390.00	100	

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

2.1.4 Producción a nivel estatal

En Coahuila, el árbol de granado es sembrado y cosechado desde 1980 a la fecha, en amplias localidades de la región, este producto reditúa ganancias de más de 1.5 millones de pesos para el estado, y es uno de los 5 principales productores de granada roja en México (figura 2) (Web 3).



Fuente: SIACON

Figura 2. Los diez primeros estados de México en producción de granada roja en el año 2004.

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en la estadística para la perspectiva 2008, muestra la producción agrícola de varios de sus cultivos, presentando a la granada como uno de los principales productos, con una producción de 104 toneladas en el año agrícola, representando el 2.8 % del total de la producción nacional y ocupando el 8° lugar de 15 estados productores, así se puede apreciar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Producción agrícola en Coahuila de Zaragoza en el 2008.

PRINCIPALES PRODUCTOS a/	TONELADAS	% EN EL TOTAL NACIONAL	LUGAR NACIONAL
Cíclicos			
Sorgo forrajero verde	1,075,522	20.6	1° de 26
Maíz forrajero	599,987	4.7	8° de 23
Avena forrajera	542,561	4.9	5° de 24
Melón	104,507	18.1	2° de 27
Algodón hueso	56,033	15.3	3° de 6
Tomate rojo (jitomate)	44,954	2.0	13° de 32
Papa	26,709	1.6	13° de 23
Maíz grano	23,305	0.1	29° de 31
Trigo grano	18,118	0.4	14° de 23
Sorgo escobero	13,636	60.3	1° de 9
Perennes			
Alfalfa verde	1,742,150	5.9	7° de 26
Pastos	906,397	2.0	14° de 28
Manzana	34,800	6.8	3° de 23
Nopal forrajero	14,671	9.9	3° de 7
Nuez	8,777	11.0	2° de 19
Uva	2,100	0.8	6° de 13
Granada	104	2.8	8° de 15

NOTA: Año agrícola.

a/ Seleccionados de acuerdo al valor de su producción.

Se consideran aquí los cultivos genéricos, es decir, información agrupada en un solo producto sin distinguir sus variedades.

Fuente: INEGI

2.1.5 Producción de cáscara de granada

Teniendo como referencia los datos anteriores de la producción del fruto se estima que la producción de cáscara de granada es de 44.86 toneladas, tan solo en nuestro país.

En la Unión Europea se producen alrededor de un millón de toneladas de desechos orgánicos procedentes de frutas y vegetales, y cerca de 3.4 millones de toneladas provenientes del sector cervecero (Chavarrías, 2009).

2.1.6 Aplicaciones de la cáscara de granada

La cáscara de granada no tiene un aprovechamiento de valor agregado, se emplea solo como remedio tradicional usando la cáscara seca, sin embargo, parte de los beneficios que se le atribuyen, vienen dados por su gran concentración en antioxidantes naturales; siendo los polifenoles uno de los grupos más estudiados en la actualidad (Andreu-Sevilla, *et al.*, 2008).

Lansky y colaboradores (2005), utilizaron los polifenoles del pericarpio de la granada, semillas y jugo. Mencionan que la piel o cáscara tiene un alto contenido de polifenoles sin embargo en la semilla y jugo se encuentran en mayor cantidad.

Nascimento y colaboradores (2000) emplearon diferentes extractos de plantas con actividad antimicrobiana entre ellos el de pericarpio de granada, reconociendo en su constitución química a los alcaloides y elagitaninos, siendo estos los que le proporcionan el efecto antimicrobiano. Los extractos se probaron en 14 bacterias,

entre las cuales *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* fueron susceptibles al extracto de pericarpio de granada.

Una investigación Israelí sobre la aplicación de la cáscara de granada para la alimentación de ganado vacuno reporta que se incrementan los niveles de alfa-tocoferol que es precursor de la vitamina E, el cual ayuda a retener nutrientes de la dieta, logrando que los becerros ganaran peso con respecto a los no tratados con este alimento (Shabtay, *et al.*, 2008).

Recientemente en la Universidad de California, Seeram y Heber (2005), patentizaron un método para la obtención de elagitaninos de cáscara de granada, el cual consiste en macerar los residuos en cinco porciones de agua a temperatura ambiente, después de 5 horas se filtra, se purifica en columnas cromatográficas y obtienen elagitaninos, que son compuestos con diversa actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana, antimutagénico por mencionar algunos.

Otra de las aplicaciones aun en vías experimentales es para la producción de ácido elágico por métodos biotecnológicos, usando la cáscara de granada en polvo como sustrato de la fermentación (Robledo-Olivo, 2006; Aguilera-Carbó, *et al.*, 2008), se emplean hongos filamentosos generalmente como *Aspergillus niger*, se cultiva y se obtiene el ácido elágico de los extractos. También se han hecho reportes sobre la producción de la enzima elagitanasa, la cual degrada los elagitaninos y produce ácido elágico por vía enzimática (Aguilera, 2009).

El efecto de consumir productos y subproductos (suplementos alimenticios de extractos de zumo de granada y cáscara de granada) fue reportado por Bialonska y

su grupo de trabajo (2009), menciona que los compuestos presentes tales como elagitaninos principalmente punicalagina y punicalina tienen un efecto benéfico en el intestino, la suplementación con un producto comercial POMx incremento significativamente el crecimiento de *Bifidobacterium breve* y *B. infantis*.

2.2 El aceite esencial como uno de los componentes de la cáscara de granada

2.2.1 Las grasas y los aceites

Las grasas son compuestos orgánicos que se producen de forma natural; químicamente, son ésteres de tres moléculas de ácido graso con glicerina; se conocen con el nombre de triglicéridos (Web 2).

Un aceite fijo se considera también como una grasa o aceite graso. Los aceites volátiles, llamados también aceites etéreos, aceites esenciales o esencias, cuando se combinan con una solución de alcohol, difieren en su composición y propiedades de los ácidos grasos o fijos, que se componen de glicerina, y de los aceites minerales, formados por hidrocarburos (Barba, 1997).

2.2.2 Aceites esenciales

2.2.2.1 Definiciones

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas y que son empleadas en perfumería, en la industria alimenticia o como fuentes de materias primas (Guenther, 1952; Domínguez, 1985).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas (Barba, 1997; Rangel, 2007).

2.2.2.2 Distribución y estado natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas y Umbelíferas. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (como ajeno, albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, pachulí, romero, salvia, por mencionar algunas), en las raíces (angélica, cúrcuma, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, entre otras), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja), en las semillas (anís, cardamomo, hinojo, comino, entre otras), en el tallo (como la canela), en las flores (como lavanda, manzanilla, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (nuez moscada, pimienta, entre otros) (Domínguez, 1985; Web 4; Web 6).

Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentran en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (Web 4; Web 6).

2.2.2.3 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Web 4).

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, entre otros. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, entre otras) (Web 4).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como

aromatizantes y saborizantes (por ej. esencias de vainilla, limón, frutilla, entre otros) (Web 4).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios. Por lo anterior, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ej. hierbabuena, albahaca, salvia). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, entre otros) (Web 4).

Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos; sin embargo, existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos (Web, 4).

2.2.3 Técnicas de extracción de aceites esenciales

2.2.3.1 Arrastre con vapor

El más antiguo y sencillo método para obtener aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor, a partir del material vegetal, lo más fresco posible (Guenther, 1952; Quintero, *et al.*, 2004; Domínguez, 1985), ésta es una operación que se utiliza para separar sustancias insolubles en agua y de elevado punto de ebullición, este método permite destilar tales sustancias a menor temperatura evitando su descomposición. Los vapores del producto volátil son arrastrados por

vapor de agua sobrecalentado, procedimiento que permite extraer los compuestos volátiles orgánicos de los vegetales que los producen, separándolos y purificándolos de otros compuestos sin que lleguen a modificarse (Barba, 1997).

Esta técnica es particularmente útil cuando la sustancia en cuestión hierve por encima de los 100 °C a presión atmosférica y se descompone a la temperatura de ebullición o por debajo de ésta. El líquido hierve a una menor temperatura de su punto de ebullición, ya que la presión de sus vapores junto con la del vapor de agua, sumadas vencen a la presión atmosférica y dan lugar a la destilación (Barba, 1997).

Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Web 4).

2.2.3.2 Solventes

La extracción con solventes es el método más eficiente para obtener aceite y con menos impurezas que el obtenido mediante el empleo de la presión mecánica. Además, en la extracción con disolventes el calentamiento es mínimo y así el aceite producido es de mejor calidad. Este proceso ahorra energía comparado con la extracción mecánica (González, 2008).

En las operaciones a gran escala es común mezclar el aceite procedente de las partes trituradas con un disolvente a baja temperatura que no sea tóxico, por ejemplo el hexano. La extracción con disolventes da mejores rendimientos. Mientras las tortas prensadas mecánicamente todavía contienen de 4 a 5 % de aceite el

contenido de aceite en el residuo después de la extracción con disolventes es menor de 1 % pudiendo descender hasta 0.5 %. Los procesos combinados emplean primero la extracción mediante presión y después con disolventes para recuperar el aceite residual (González, 2008).

El proceso puede ejecutarse por batch (por lotes ó cochadas) ó en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo Soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Sánchez, 2006).

El hexano es el solvente más ampliamente utilizado debido a su elevado carácter volátil ya que después de la extracción del aceite queda un residuo de hexano mínimo de 0.01 % o nulo (González, 2008).

2.2.3.3 Prensado o expresión

La extracción de aceite por prensado está creciendo a nivel mundial. Este proceso es aplicado en la extracción de aceites esenciales, aceites orgánicos, y para producción de biocombustibles con la finalidad de incrementar el valor de los mismos (González, 2008).

En la expresión el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado (Web 4), bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa (Sánchez, 2006).

Para los cítricos antiguamente se empleó el método manual de la esponja, especialmente en Italia, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite, se exprime entonces la esponja y se libera el aceite esencial (Sánchez, 2006).

2.2.3.4 Fluidos supercríticos

Este procedimiento presenta múltiples ventajas, entre las cuales sobresalen su alto rendimiento, reciclaje del solvente y ausencia de contaminación ambiental (Quintero, *et al.*, 2004).

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperatura críticas, se encuentra en su estado “supercrítico”. En este estado, la línea de separación de fases líquido–gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene propiedades intermedias, de un líquido y de un gas: así pues, mientras se mantiene una gran difusividad (propia de los gases), se consigue una alta densidad (cercana a la de los líquidos) (Sánchez, 2006).

La sustancia mas empleada es el CO₂, que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños (Sánchez, 2006).

2.2.3.5 Radiación de microondas

La técnica de extracción asistida por radiación de microondas es promisoría en la química de productos naturales (Quintero, *et al.*, 2004).

Existe una patente europea para la extracción por microondas de aceites volátiles y un aparato para la misma; esta invención utiliza la energía de las microondas para generar un incremento repentino de la temperatura en los sistemas glandulares y a veces vasculares de la materia biológica que se encuentra en contacto con una cantidad apropiada de un solvente orgánico no acuoso. El proceso es un "proceso frío" en el cual el medio solvente no se calienta como resultado de la absorción por el solvente de la energía de las microondas; y substancialmente toda la energía de las microondas que se usa es aplicada al material que se está tratando (Paré, 1996).

Una comparación realizada por Golmakani y Rezaei (2008), de un método convencional de hidrodestilación, con hidrodestilación asistida con microondas para la extracción de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), dio como resultado un ahorro de energía y tiempo de extracción; 75 minutos con hidrodestilación asistida por microondas, comparada a 4 horas con hidrodestilación normal. Además el extracto de aceite esencial de tomillo al ser analizado por cromatografía de gases con espectrometría de masas indicó que la radiación de microondas no influye negativamente en la composición del aceite.

2.2.4 Los ácidos grasos

Aunque los ácidos grasos (AG) se encuentran en células y tejidos en cantidades muy grandes como componentes fundamentales de los lípidos complejos, en estado libre aparecen solamente en trazas. Se han aislado unas 100 clases diferentes de ácidos grasos procedentes de diversos lípidos de animales, vegetales y microorganismos. Todos ellos poseen una cadena hidro-carbonada larga con un grupo carboxilo terminal, y difieren entre sí por: a) la longitud de la cadena de carbono, b) presencia o no de dobles enlaces, y c) configuración de los dobles enlaces; los AG más abundantes son aquellos que contienen de 16-18 carbonos en cadena (Valdez, 2005).

Se consideran ácidos grasos esenciales a los que se precisan en la dieta de mamíferos. El ácido graso esencial más abundante en los mamíferos es el ácido

linoleico, que integra del 10 al 20 % de los ácidos grasos totales de sus triacilglicéridos y fosfoglicéridos. Los ácidos grasos esenciales insaturados incluyen los mono-insaturados, una doble ligadura en la cadena de carbonos, y los poli-insaturados, que tienen dos o más dobles ligaduras en alguna parte de la cadena de carbonos. De los mono-insaturados el más importante es el ácido oleico. Dentro de los ácidos grasos poli-insaturados están los omega 6 y los omega 3, que son esenciales y deben ser aportados por la dieta. El ácido linoleico es el precursor de los ácidos grasos omega 6 y el ácido α -linolénico lo es de los ácidos grasos omega 3 (Valdez, 2005).

2.2.4.1 Importancia del análisis de los ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos es de gran interés para la industria de alimentos por las implicaciones tecnológicas, nutricionales y sensoriales que se derivan de su composición (García y Díaz, 2006).

La tendencia a modificar la composición de los ácidos grasos a través de la dieta ha motivado la necesidad de métodos de análisis más precisos y exactos para poder determinar la concentración de ácidos grasos, como por ejemplo algunos del tipo n-3: linolénico, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA); y otros que han adquirido importancia tanto por sus propiedades en producción animal como por su efecto sobre la salud humana son los ácidos grasos trans, ya que se han asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se ha promovido su reducción (García y Díaz, 2006).

2.2.5 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es uno de los métodos físicos de separación más eficaces que se conocen; cada componente de una muestra suministra tres unidades de información: posición, altura y anchura de los picos en el cromatograma. La posición, expresado como dato de retención, suministra la información cualitativa y los otros proporcionan la información cuantitativa (Olguín y Rodríguez, 2004).

Los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración. La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos (Olguín y Rodríguez, 2004).

La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando un líquido como fase estacionaria; recibe entonces el nombre de cromatografía gas-líquido (CGL). También se utilizan absorbentes, dando lugar a la cromatografía gas-sólido (CGS), pero en mucho menor proporción (Olguín y Rodríguez, 2004). Uno de los modelos más recientes de cromatógrafo de gases se observa en la figura 3.



Figura 3. Cromatógrafo de gases, modelo Perkin Elmer Autosistem XL.

2.2.5.1 Aplicaciones

Según la descripción de Olgúin y Rodríguez (2004), una forma de clasificar las aplicaciones en la cromatografía de gases es dividirlo por áreas de interés, asignadas en cuatro grandes categorías:

- a) Comida, saborizantes y fragancias. Productos naturales y las feromonas, análisis de pesticidas; separación de enantiómeros.
- b) Petróleo y químicos. Ácidos grasos; combustibles sintéticos, carbón y aceites; separación de enantiómeros.
- c) Ambientales. Contaminantes de agua, aire y tierra; halometanos en el agua hasta las dioxinas en la tierra; análisis de pesticidas; separación de enantiómeros.
- d) Médicas y biológicas. Ácidos grasos; niveles de alcohol y drogas en la sangre; análisis de pesticidas; separación de enantiómeros.

La cromatografía de gases es ampliamente utilizada en el análisis de aceites esenciales, donde la complejidad de la muestra puede ser en verdad un gran reto. Muchos de estos productos son frágiles e importantes comercialmente y se utiliza la cromatografía de gases para cuantificar componentes específicos que podrían ser indicativos de calidad del aceite y para detectar adición de compuestos clandestinos como antioxidantes así como componentes utilizados como diluyentes (Olguín y Rodríguez, 2004).

2.3 Los aceites esenciales y su actividad antimicrobiana

Algunas de las moléculas de los aceites esenciales se han caracterizado por su efecto potente contra microorganismos tanto bacterias, levaduras, hongos (mohos) y virus, en el presente trabajo se pretende evidenciar si los aceites esenciales de la cáscara de granada poseen esta actividad biológica.

Montes y colaboradores (2000), mencionan que evaluaron los extractos de 206 especies de plantas contra 28 especies de hongos fitopatógenos, midiendo germinación de esporas, desarrollo micelial y esporulación, en pruebas de invernadero y campo. De estos estudios, se señala que la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta su total inhibición.

El aceite esencial de *Origanum. majorana*, fue estudiado para determinar, su actividad antibacterial y antifúngica, en 25 bacterias contaminantes de alimentos y cinco hongos patógenos de plantas, los resultados muestran un buen efecto

antibacterial, sobre *Staphylococcus aureus*, y contra el hongo *Aspergillus niger* (Deans y Svoboda, 1990).

Los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare*) fueron evaluados para determinar su actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, ambos presentaron una actividad fungicida *in vitro* contra este moho, el aceite esencial de orégano a partir de 1000 ppm y el de canela de 2000 ppm, presentando un efecto fungistático en 100 ppm (García-Camarillo, *et al.*, 2006).

Sartoratto y colaboradores (2004), emplearon los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *M. spicata*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *O. applii*, *Aloysia triphylla*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, evaluando su actividad antimicrobiana en 11 bacterias; la mayoría de los aceites fue efectivo contra *Enterococcus faecium* y *Salmonella cholerasuis*; *Aloysia triphylla* y *O. basilicum* presentaron moderada inhibición contra *Staphylococcus aureus*.

Estos son algunas de muchas investigaciones realizadas que ponen en evidencia la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. A continuación se describe un microorganismo causante de daños en frutas y hortalizas, ocasionando grandes pérdidas de postcosecha.

2.3.1 *Penicillium*

Las distintas especies de este género causan las “pudriciones por los mohos azules y las “pudriciones por los mohos verdes” a las cuales se les denomina

también pudriciones por *Penicillium*. Son las más comunes y a menudo las más destructivas de todas las enfermedades de postcosecha, ya que afectan a todo tipo de cítricos, manzanas, peras, membrillos, uvas, cebollas, melones, higos, camotes y muchos otros frutos y hortalizas. En algunos frutos, por ejemplo en los cítricos, la infección puede producirse en el campo pero los mohos azules y verdes son, en esencia, patógenos de postcosecha y con frecuencia a ellos se debe más del 90% de la descomposición de los frutos durante su transporte, almacenamiento y en el mercado (Sandoval, 2005; Agrios, 2008).

Penicillium penetra en los tejidos de su hospedante a través de aberturas en la cáscara o corteza e incluso a través de lenticelas. Sin embargo, puede propagarse desde los frutos infectados a los sanos, cuando la cáscara intacta de estos últimos entra en contacto con la cáscara infectada de los primeros. Las pudriciones causadas por *Penicillium* al principio tienen el aspecto de manchas blandas, aguanosas, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden aparecer en cualquier parte del fruto. Estas manchas son superficiales al principio, pero se hunden con rapidez y, a la temperatura ambiente, gran parte del fruto o todo él se descompone en tan sólo unos cuantos días. Poco después de que se desarrolla la pudrición, un moho blanco comienza a crecer sobre la superficie de la cáscara o corteza del fruto, cerca de la parte central de la mancha. Posteriormente, el hongo prosigue su desarrollo y produce esporas. El área esporulante tiene un color azul, verde azulado, o verde olivo y a menudo se encuentra rodeado por una banda estrecha o amplia de micelio blanco delante del cual hay una banda de tejido aguanoso. El desarrollo superficial del hongo se produce sobre manchas de

cualquier tamaño, siempre y cuando la atmósfera sea húmeda y cálida. Cuando el aire es seco y frío, el moho superficial es raro, aunque los frutos estén totalmente descompuestos. Bajo condiciones de almacenamiento, pequeños cojinetes de micelio productores de esporas aparecen sobre la superficie de las manchas. Los frutos en proceso de descomposición huelen a humedad y, en condiciones secas, pueden contraerse y transformarse en una momia mientras que en condiciones húmedas cuando los hongos y levaduras secundarias entran también en ellos, se reduce a una masa blanda y húmeda (Agrios, 2008).

Aun cuando la mayoría de los daños ocasionados por las pudriciones de los mohos azules y verdes aparecen en el almacenamiento y en el mercado, la ocurrencia de estos mohos es mayor cuando los frutos son cosechados y manipulados durante tiempo húmedo que en tiempo seco y frío; cuando los frutos tardan en almacenarse; cuando son enfriados lentamente durante su almacenamiento. Sin embargo, el factor más importante que favorece estas pudriciones, especialmente a principios de temporada de almacenamiento, son los daños mecánicos que sufre la superficie de los frutos. Aunque ambos grupos de mohos son favorecidos por temperaturas relativamente altas durante el almacenamiento, continúan mostrando una actividad aún a temperaturas cercana al punto de congelación (Sandoval 2005; Agrios, 2008).

Algunas especies de *Penicillium* producen etileno, el cual se difunde en los recipientes o almacenes e incrementa la tasa respiratoria de los frutos, afecta su coloración y se acelera su maduración y senescencia, reduciendo así también el tiempo de almacenamiento de frutos sanos (Agrios, 2008).

2.3.1.1 Clasificación taxonómica

Torrenegra, *et al.*, (2005), Baquero, *et al.*, (2005) y Agrios, (2008), clasifican a *Penicillium* de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Subdivisión: Deuteromycetes

Clase: Hyphomycetidae

Orden: Hyphales (Moniliales)

Familia: Moniliaceae

Género: *Penicillium*

2.3.1.2 Condiciones para su crecimiento *in vitro*

Es un hongo filamentoso, heterótrofo, aerobio facultativo, la temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 30° C, crecen en un pH de 2.0 a 9.0 teniendo un óptimo de 5.6, degradan: celulosa, quitina, almidón, azúcares y lignina (Torrenegra, *et al.*, 2005).

2.3.1.3 Características microscópicas

Presenta conidióforo hialino, tabicado libremente, ramificado y da lugar a fiálides ramificadas con cadenas de esporas (Torrenegra, *et al.*, 2005; Baquero, *et al.*, 2005).

2.3.1.4 Características macroscópicas

- Inicialmente son blancas y vellosas.
- Las esporas son pigmentadas de color verde, azul verdoso, amarillas.
- La superficie de la colonia puede ser algodonosa, aterciopelada o pulverulenta.
- Presenta exudados en la superficie.
- Presenta pigmentación en el reverso (Baquero, *et al.*, 2005).

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en cuatro etapas la primera de ellas fue la obtención y caracterización de la cáscara de granada, la segunda se enfocó a la evaluación de tres sistemas de obtención de aceite esencial, en la tercera se realizó la cuantificación e identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite esencial de cáscara de granada y la etapa final fue evidenciar la capacidad de inhibición *in vitro* de *Penicillium* sp.

3.1 Etapa I. Obtención y caracterización de la cáscara de granada

3.1.1 Localización

La experimentación se realizó en los laboratorios de Nutrición Animal, Parasitología, Fitoquímica y Tecnología de Semillas, de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (UAAAN), ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

3.1.2 Obtención de la cáscara de granada

La granada se recolectó en la zona sureste del estado de Coahuila en los municipios de Parras, Arteaga y Saltillo, en el mes de septiembre del 2008, los frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % en agua, se enjuagaron con agua destilada, escurridos y secados con toallas absorbentes, a las frutas se les clasificó de acuerdo a su estado, las enfermas se desecharon y el material sano se

sometió a procesamiento el cuál consistió en obtener dos fracciones, semillas y cáscara, siendo esta última la fracción de interés.

3.1.3 Procesamiento de la cáscara de granada

Las cáscaras de granada se deshidrataron en una estufa de secado (Robertshaw), facilitada por la empresa Coyote Foods and Biopolymers, a una temperatura de 60 °C, por 48 horas. El material seco, se sometió a molienda en un molino (Thomas Wiley modelo 4), con una criba de 1 mm, donde se obtuvo la muestra en polvo.

La muestra molida se almacenó en bolsas de polietileno con cierre hermético en un lugar oscuro y seco hasta el momento de su evaluación.

3.1.4 Determinación de materia seca total

En la determinación de materia seca total, se pesó 1 g de muestra húmeda en un crisol de porcelana (el cual previamente se colocó en una estufa a una temperatura de 100 °C hasta obtener un peso constante), posteriormente, se incubó a 80 °C por 24 horas, se dejó enfriar en un desecador y se registró su peso (AOAC, 1996).

La materia seca total obtenida fue calculada mediante la fórmula:

$$\% \text{ Materia seca total} = \frac{\text{crisol con muestra seca} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.1.5 Humedad

La humedad se determinó a partir de los resultados obtenidos en el análisis de materia seca total.

3.1.6 Cenizas

En la determinación de cenizas se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana previamente sometido a peso constante, en una estufa a 100 °C por 24 horas, La muestra se carbonizó a flama de mechero en una campana y posteriormente se introdujo en una mufla (Barnstead/Thermolyne 47900) a una temperatura de 500 °C por 4 h (AOAC, 1996). El porcentaje de cenizas en la muestra se calculó mediante la expresión:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.1.7 Extracto etéreo (lípidos)

Para la determinación del contenido de grasa se pesaron 5 g de muestra colocados en un dedal de celulosa e introducido a un sifón y unidos a un matraz bola fondo plano (previamente sometido a peso constante) adicionado con 200 mL de éter etílico. Enseguida se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se reflujo por 6 horas a una temperatura de 80 °C. Después de este tiempo, se recuperó el éter etílico contenido en el matraz, enseguida se introdujo en una estufa

a temperatura de 60 °C por 24 h, se enfrió en un desecador y se registró el peso (AOAC, 1996). El por ciento de grasa obtenido fue calculado mediante la expresión:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{peso matraz con grasa} - \text{peso matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.1.8 Proteína cruda

La determinación de proteína se realizó por el método Kjeldhal en el cual se colocó 1 gramo de muestra en polvo en un matraz Kjeldhal, 4 perlas de vidrio, 3 g de catalizador selenio y 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estos reactivos fueron adicionados en otro matraz excepto la muestra de cáscara de granada, esto para determinación del blanco. Los matraces se colocaron en el digestor Kjeldhal a una temperatura de 100 °C hasta obtener una mezcla color verde cristalino e incolora en el matraz sin muestra. Una vez frías las mezclas, se adicionaron 300 mL de agua destilada, 110 mL de hidróxido de sodio al 45 % y 6 granallas de zinc. En matraces Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 50 mL de ácido bórico al 4 % y 6 gotas de indicador mixto. Posteriormente se llevaron a destilación hasta obtener 250 mL de destilado que se titularon con ácido sulfúrico 0.117 Normal (N).

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL } H_2SO_4 \text{ gastados} - \text{mL } H_2SO_4 \text{ blanco}) (N H_2SO_4) (0.014)}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Finalmente, el por ciento de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25 indicado por la AOAC (1996).

3.1.9 Fibra cruda

El análisis de fibra cruda consistió en 2 fases: en la primera fase, se colocaron 2 g de muestra desgrasada en un vaso de Berzelius y 100 mL de ácido sulfúrico 0.255 N. Éste se sometió a ebullición por 30 minutos y después se lavó con 100 mL de agua destilada caliente. En la segunda fase, se midieron 100 mL de NaOH 0.313 N y se colocaron en el mismo vaso, enseguida, se calentó a ebullición por 30 minutos y nuevamente se lavó con 100 mL de agua destilada caliente. La fibra obtenida se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una estufa a una temperatura de 105 °C por 24 horas. Después de este tiempo se registró el peso del crisol y finalmente la muestra se calcinó a 500 °C por 4 horas en una mufla (Thermolyne 200) (AOAC, 1996).

El por ciento de fibra se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{\text{peso crisol muestra seca} - \text{peso crisol con cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.1.10 Azúcares totales

Los azúcares totales se evaluaron por el método conocido como fenol-sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956). Se colocó 1 g de muestra en polvo de cáscara de granada en un vaso de precipitado de 100 mL, se le añadieron 40 mL de agua

destilada, con la ayuda de un magneto se agitó por 20 minutos, posteriormente fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 41, obtenida la muestra se procedió a realizar la técnica.

Del filtrado se realizó una dilución 1:10 (v/v) en agua destilada, de esta se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensaye dentro de un baño con hielo, se dejó reposar por 5 minutos y se le adicionaron 2 mL de fenol-sulfúrico, posteriormente se pasó a un baño caliente y se dejó por 5 minutos a ebullición, transcurrido el tiempo se sacó del baño de calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se registró la lectura de absorbancia a 480 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro (Thermo-Spectronic, modelo Biomate3). Se preparó una curva patrón de sacarosa para azúcares totales.

3.1.11 Fenoles hidrolizables totales (FHT)

Se evaluaron por la técnica de Makkar, *et al.*, (1993), para esto se colocaron 800 μ L de la muestra en tubo de ensayo (16 x 150), al mismo tubo se le adicionaron 800 μ L del reactivo comercial Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos, después se adicionaron 800 μ L de carbonato de sodio 0.01 M, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 4 mL de agua destilada. Se registró la absorbancia obtenida a 725 nm en un espectrofotómetro. La curva de calibración se efectuó con ácido gálico.

3.1.12. Pectina

Se pesaron 10 g de la muestra en polvo y se colocaron en un vaso de precipitados de 500 mL, se agregaron 100 mL de agua destilada caliente y se

sometió a ebullición por dos minutos; transcurrido el tiempo se desechó el agua, en la cual se disolvieron las sales, se repitió el lavado.

Después del tercer lavado se adicionaron 100 mL de agua destilada caliente y se adicionó gota a gota HCl 6 N, se agitó y controló el pH hasta que se alcanzó un pH 2, se registró el volumen final. El vaso de precipitados se tapó con un reloj de vidrio y se colocó a ebullición por 15 minutos, el líquido evaporado se repuso con agua destilada caliente al nivel inicial y se sometió a ebullición por 3 minutos más.

Se filtró en papel Whatman No. 41 y se recogió el filtrado en un vaso de precipitados de 250 mL, se lavó el residuo con 200 mL de agua acidulada a pH 2, esto se repitió 5 veces. Se redujo el volumen al 50 % por evaporación y después se agregó una cantidad de etanol al 70 % cuyo volumen fue 1.5 veces del volumen filtrado y reducido, se agitó con una varilla de vidrio para precipitar la pectina. Previamente se taró un papel filtro en un vidrio de reloj, el papel filtro se transfirió a un embudo de porcelana y se filtro la pectina bajo condiciones de vacío, se lavó con 2 porciones de 5 mL de etanol-amoniaco para neutralizar el ácido que quedó en la pectina. El filtro se traslado nuevamente al vidrio de reloj y se secó en la estufa a 60 °C, por 24 h, transcurrido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó en una balanza analítica (AOAC, 1996). El porcentaje de pectina se calculó con la fórmula:

% Pectina =

$$\frac{w \text{ papel filtro, vidrio reloj, muestra seca} - w \text{ del papel filtro, vidrio reloj}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.2 Etapa II. Evaluación de tres sistemas de obtención de aceite esencial

Se evaluaron tres métodos de extracción de aceites esenciales reportados en la literatura, la prueba se hizo por triplicado para cada método y así determinar con cuál de ellos se obtienen mejores rendimientos, a continuación se describen las metodologías empleadas.

3.2.1 Método Soxleth

Para desarrollar este método se pesaron 5 g de cáscara de granada en polvo en un papel filtro Whatman No.41, que se colocó dentro de un dedal de celulosa; en un matraz bola fondo plano, previamente pesado; se añadieron 200 mL de hexano. El matraz se calentó a una temperatura de 55 °C a 60 °C. El proceso de extracción se efectuó durante 12 horas continuas a temperatura constante (figura 4). Al término de este tiempo se extrajo el dedal y se recuperó el hexano contenido en el matraz; posteriormente el matraz con el aceite se sometió a temperatura constante por 2 horas en una estufa de secado (Blue M) a una temperatura de 40 °C, al cabo de este tiempo se peso y se calculó el por ciento de aceite como extracto etéreo con la siguiente fórmula:

$$ET = \frac{(W \text{ matraz} + ET) - (W \text{ matraz})}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Donde:

ET = Extracto etéreo

W = peso



Figura 4. Extracción de aceite por método Soxleth.

3.2.2 Método Sólido-Líquido

En la aplicación de esta técnica se pesaron 5 g de cáscara de granada molida, se colocaron en un matraz Erlenmeyer, se agregó una solución cloroformo-metanol 2:1 (v/v), esto fue 20 mL y 10 mL respectivamente, se lavó la muestra con dicha solución y se hizo pasar por un papel filtro Whatman del No.1 a un embudo de separación. Se agregaron 30 mL de una solución salina de KOH al 5 % y se agitó intensamente, se esperó a que se separaran las fases. Enseguida se recuperó la fase orgánica (fase inferior) en un matraz redondo fondo plano previamente pesado (Folch, *et al.*, 1957).

Posteriormente se pasó a rota-vapor para eliminar el cloroformo; el matraz con el aceite se mantuvo a peso constante por 2 horas en una estufa de secado (Blue M) a una temperatura de 40 °C, al cabo de este tiempo se peso y se calculó el por ciento de aceite con la fórmula del método anterior.

3.2.3 Método por arrastre de vapor

Para implementar este método se instaló un equipo como el que se muestra en la figura 5.



Figura 5. Extracción de aceite por arrastre de vapor.

Se colocaron 300 mL de agua destilada en el primer matraz Erlenmeyer, el cual era el generador de vapor y a este se agregaron cuerpos porosos. En el segundo matraz se colocaron 5 g de cáscara de granada molida la cual se humedeció con agua destilada.

El primer matraz se calentó hasta ebullición con el fin de generar el vapor que pasaba al segundo matraz que contenía la muestra, extrayéndose de esa manera el aceite esencial de cáscara de granada; el cual fue arrastrado por el vapor de agua en un proceso de co-distilación.

El calentamiento se suspendió cuando el volumen del destilado era de 100 a 150 mL aproximadamente; de ese co-distilado, se extrajo totalmente el aceite esencial, mediante una extracción con 30 mL acetato de etilo (figura 6), donde las

fases acuosas se desecharon y los extractos orgánicos se colectaron en un matraz Erlenmeyer, se agregó entonces sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente, y se decantó el extracto en un matraz redondo fondo plano previamente pesado para posteriormente mantener a peso constante en una estufa (Blue M) a 40 °C por 2 horas, al cabo de este tiempo se peso y se calculó el porcentaje de aceite con la fórmula del método Soxhlet.



Figura 6. Separación de las fases con acetato de etilo.

3.3 Etapa III. Cuantificación e identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite esencial de cáscara de granada

3.3.1 Extracción de los triglicéridos del aceite esencial de la cáscara de granada

Se suspendieron 195 mg de aceite en 10 mL de agua destilada y 30 mL de la mezcla extractora de cloroformo-metanol (2:1) (v/v). La mezcla se agitó intensamente durante 60 segundos en un embudo de separación y se dejó reposar hasta la

separación de las dos fases. La fase inferior (orgánica) que contenía los lípidos del aceite, y la fase superior (acuosa) la cual contenía proteínas, sales minerales, hidratos de carbono y otras sustancias no lipídicas las cuales se desecharon. Este proceso se aplicó para cada uno de los métodos de extracción anteriores.

3.3.2 Hidrólisis de triglicéridos hasta ácido graso y esterificación del ácido graso en ésteres metílicos

Se realizó en el producto obtenido de la fase orgánica extraída del paso anterior. Para esto, el extracto se colocó en el rota-vapor a una temperatura de 40 a 50 °C, con vacío moderado, retirando de este modo el cloroformo ahí retenido. Al residuo se le añadieron 10 mL de NaOH 0.5 N en metanol, la mezcla se calentó en baño maría a 65 °C durante 20 min con rotación lenta del rota-vapor, posteriormente se le adicionaron 15 mL del reactivo de Folcha (14 % $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{-OH}$) el calentamiento se continuó a la misma temperatura durante 5 minutos más. A la solución obtenida en caliente se le añadieron 30 mL de agua destilada. La solución se dejó enfriar y se le adicionaron 50 mL de hexano (se agitó intensamente). Después de esta segunda extracción se vuelven a separar las fases: fase superior (orgánica) que contenía los ésteres metílicos de ácidos grasos (componentes volátiles para la cromatografía de gases) mientras que el resto contenía los productos de la hidrólisis. El hexano se destiló a una temperatura entre 55 a 60 °C el residuo obtenido se diluyó en 5 mL de hexano para su recuperación. Posteriormente, esta muestra se utilizó en el análisis por cromatografía de gases.

3.3.3 Cuantificación de los ácidos grasos de la cáscara de granada mediante cromatografía de gases

Se realizó en un equipo Perkin Elmer Autosistem XL, con una columna capilar EC-1000 (30m x 0.32mm x 0.25µm) de alta polaridad empacada de polietilenglicol con modificación ácida. Se empleó una rampa de temperatura programada iniciando en 100 °C y mantenida por 3 min, primera rampa incrementando de 100 a 120 °C y una segunda rampa de 120 °C a 240 °C en 15 minutos y se mantuvo hasta 35 minutos a esta última temperatura, por corrida, se utilizó un detector de ionización de flama (FID) a una temperatura de 260 °C y un puerto de inyección a 250 °C. Las señales que se obtuvieron en el cromatograma se identificaron por el tiempo de retención de acuerdo a los componentes del estándar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (Supelco™ 37 Component FAME Mix), que se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes del estándar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

No.	Componente
1	Ácido Butírico (C4:0)
2	Ácido Caproico (C6:0)
3	Ácido Caprílico (C8:0)
4	Ácido Caprico (C10:0)
5	Ácido Undecanoico (C11:0)
6	Ácido Láurico (C12:0)
7	Ácido Tridecanoico (C13:0)
8	Ácido Mirístico (C14:0)
9	Ácido Miristoleico (C14:1)
10	Ácido Pentadecanoico (C15:0)
11	Ácido cis-10-Pentadecenoico (C15:1)
12	Ácido Palmítico (C16:0)
13	Ácido Palmitoleico (C16:1)
14	Ácido Heptadecanoico (C17:0)
15	Ácido cis-10-Heptadecenoico (C17:1)
16	Ácido Estearico (C18:0)
17	Ácido Elaídico (C18:1n9t)
18	Ácido Oleico (C18:1n9c)
19	Ácido Linolelaídico (C18:2n6t)
20	Ácido Linoleico (C18:2n6c)
21	Ácido Araquídico (C20:0)
22	Ácido γ -Linolénico (C18:3n6)
23	Ácido cis-11-Eicosenoico (C20:1)
24	Ácido Linolénico (C18:3n3)
25	Ácido Heneicosanoico (C21:0)
26	Ácido cis-11,14-Eicosadienoico (C20:2)
27	Ácido Behenico (C22:0)
28	Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienoico (C20:3n6)
29	Ácido Erucico (C22:1n9)
30	Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienoico (C20:3n3)
31	Ácido Araquidónico (C20:4n6)
32	Ácido Tricosanoico (C23:0)
33	Ácido cis-13,16-Docosadienoico (C22:2)
34	Ácido Lignocerico (C24:0)
35	Ácido cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (C20:5n3)
36	Ácido Nervonico (C24:1)
37	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico (C22:6n3)

3.4 Etapa IV. Capacidad de inhibición *in vitro* de *Penicillium* sp.

3.4.1 Microorganismo

Se empleó una cepa del hongo *Penicillium* sp, proporcionada por el laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología de la UAAAN. El microorganismo fue aislado de manzanas de la región de Arteaga, Coahuila.

3.4.2 Preparación del medio de cultivo e inoculación

Se prepararon 5 matraces Erlenmeyer con 100 mL de agua destilada, incorporando a cada uno de estos 3.9 g de agar papa dextrosa (PDA), se agitan vigorosamente y se cubren con algodón para posteriormente llevar a esterilizar (121 °C por 15 minutos). Al término de este proceso, se controla cuando la temperatura este disminuyendo (entre 40 y 50 °C) para poder incorporar el aceite de cáscara de granada *P. granatum* L. en las concentraciones de: 0 (control), 100, 300, 500 y 1500 µL a cada matraz correspondiente, la mezcla se vertió sobre placas de Petri. Una vez solidificado el agar se inocularon con una suspensión de esporas de *Penicillium* sp, por punción central de 1 mm de diámetro. Las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C.

3.4.3 Evaluación del crecimiento radial e inhibición

Las placas se examinaron cada 24 h por 7 días y fueron medidas con un vernier, se midió el diámetro de la colonia del hongo, se calculó el área y se graficó el crecimiento en función del tiempo. El porcentaje de inhibición se calculó determinando el inverso del crecimiento respecto al control (Tequida-Meneses, *et al.*, 2002).

3.4.4 *Diseño de experimento*

Se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ ($p < = 0.05$) y un análisis de medias por la prueba de Tukey.

En el presente capítulo se plasman los resultados de la investigación en el mismo orden que fueron descritos en la metodología experimental.

4.1 Etapa I. Obtención y caracterización de la cáscara de granada

La caracterización físico-química del polvo de cáscara de granada muestra que es un residuo con buenas características para ser empleado de manera integral, para la obtención de diferentes subproductos, lo que concuerda con Robledo-Olivo, (2006) que menciona que tiene buenas características para ser empleado como soporte para fermentación en medio sólido, también, Aguilera (2009), menciona que es una fuente para la extracción de polifenoles del tipo elagitaninos.

En cuanto a los componentes de la cáscara se observa que los carbohidratos son el componente principal; representando los azúcares totales el 23 %, fibra cruda el 14 % y la pectina el 11 % (ver cuadro 4). La cáscara de granada después de la extracción de aceites puede ser usada para obtener otros subproductos; recientemente la necesidad de emplear residuos para la generación de combustibles a través de procesos biotecnológicos, perfilan a éste residuo como fuente de biocombustible. En lo que respecta a la concentración de polifenoles fue de 8.7 % (cuadro 4), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aguilera y

colaboradores (2007), quien encontró un rendimiento para los polifenoles totales de alrededor de 9 %.

El contenido de taninos del jugo de granada alcanza un valor medio de 103.4 mg/100mL de jugo, en cuanto a los taninos de la cáscara reportan 19.47 %, dos veces más a los obtenidos en la presente investigación (Sharma y Sharma, 1990).

Los resultados de lípidos (extracto etéreo) fue de 3.4 % aproximadamente, por lo que se consideró que puede ser una fuente para la extracción de aceites esenciales, en cuanto a la denotación sobre los componentes en general, no se puede hacer una discusión completa ya que existen pocos reportes en la literatura sobre la caracterización de cáscara de granada.

Cuadro 4. Caracterización físico-química de cáscara de granada (100 g de cáscara en polvo).

Componente	%
Humedad	9.4 ± 1.82
Materia seca	90.75 ± 2.25
Ceniza	3.42 ± 0.97
Lípidos	3.44 ± 1.09
Proteína total	4.26 ± 0.23
Fibra cruda	14.30 ± 2.61
Pectina	11.12 ± 2.04
Azúcares totales	23.65 ± 0.62
Polifenoles totales	8.7 ± .022

4.2 Etapa II. Evaluación de tres sistemas de obtención de aceite esencial

Durante la segunda etapa se aplicaron tres métodos de extracción reportados en la literatura el primer método fue Soxhlet (M1) el método dos sólido-líquido (M2) y el tercero arrastre por vapor (M3) logrando los siguientes resultados.

Como se observa en la figura 7 las diferencias entre los métodos es muy marcada, ya que el método uno (M1) fue un sistema de reflujo y el método dos (M2) un sistema sólido líquido, en ambos se obtuvieron rendimientos bajos, pero aún comparables con la literatura por Robledo-Olivo (2006), de 3.57 %, y con los valores obtenidos en la etapa 1 de 3.44 % para el extracto etéreo. En el caso del sistema de reflujo (M1) se empleó hexano como solvente, la evaluación de otros solventes probablemente incremente los resultados. En el caso del segundo método (M2), se puede deber posiblemente a la relación masa/volumen empleada, sería necesario realizar un experimento singular para determinar la cantidad de polvo de granada a emplear y la cantidad de solvente para obtener un mejor rendimiento.

El mejor método fue el de arrastre de vapor (M3), esto puede ser debido a que todos los componentes volátiles son recuperados con este método, lo que incrementa el rendimiento, además, este proceso se emplea a nivel industrial para la obtención de aceites esenciales (Web 4) (anexo 1). Según la literatura (Web 5), para obtener 100 g de aceite esencial de cada uno de los que se mencionan, se requieren 1000 Kg de hojas de Melisa, 400 Kg de pétalos de Rosa, 15 Kg de flores de Lavanda, 3 a 10 Kg de hojas de Eucalipto, 7 Kg de semillas de Clavo. Comparado con lo anterior para obtener 100 g de aceite esencial de cáscara de granada serían

necesarios 1.2 Kg, siendo una diferencia muy marcada comparado con estas esencias comerciales; los rendimientos son altos y por lo tanto el precio no sería elevado, sin embargo, tomando en cuenta que es un residuo o subproducto el valor agregado es ganancia sustancial.

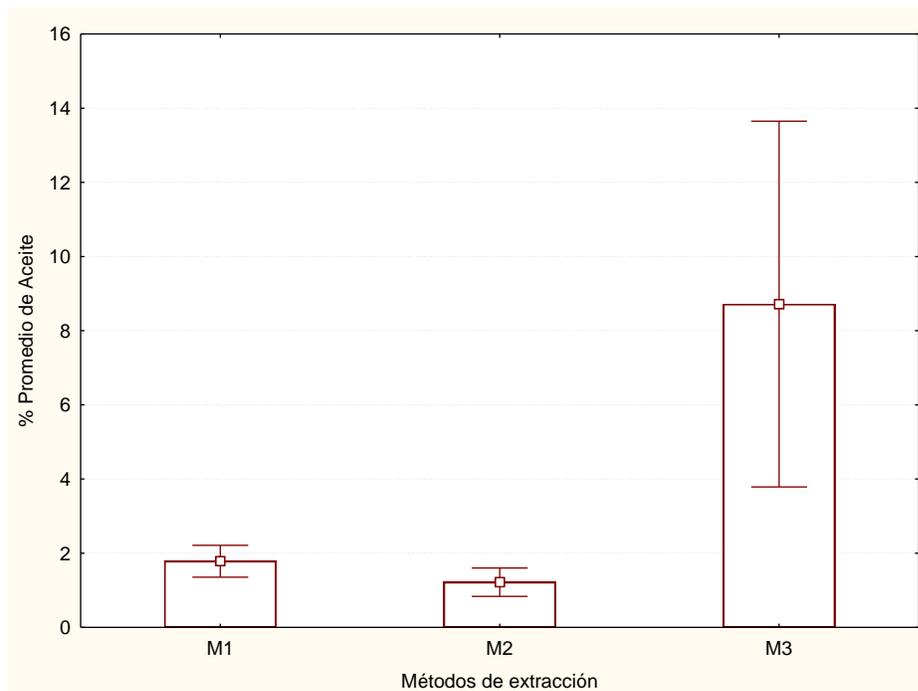


Figura 7. Rendimiento del aceite esencial de cáscara de granada, donde, M1 es el método Soxleth; M2 método sólido-líquido y M3 método de arrastre por vapor.

4.3 Etapa III. Cuantificación e identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite esencial de cáscara de granada

Los resultados de la identificación de ácidos grasos en el aceite esencial de cáscara de granada se realizaron a las muestras obtenidas por los tres métodos evaluados para recuperación de dicho aceite.

En esta etapa se identificaron 37 ácidos grasos de la cáscara de granada (ver cuadro 3 y figura 8) de acuerdo al estándar empleado como referencia y tiempos de retención determinados.

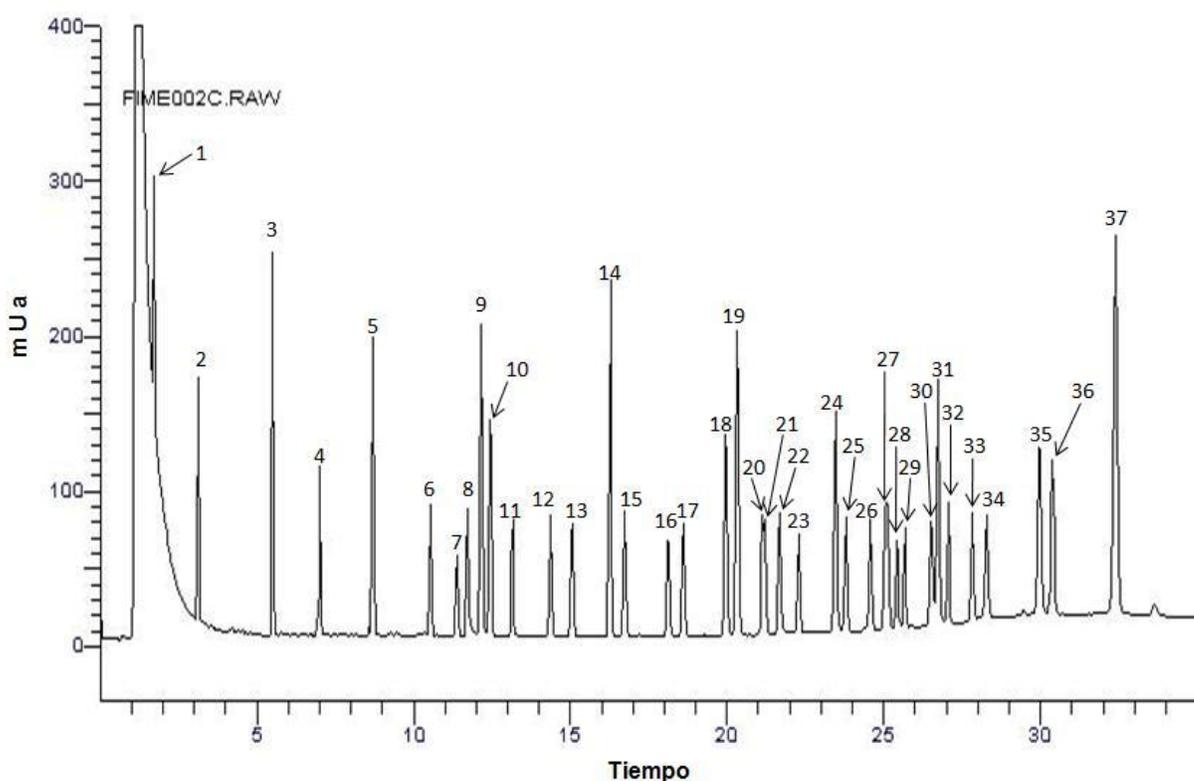


Figura 8. Cromatograma del estándar empleado como referencia.

De los aceites esenciales encontrados en las muestras, varios de ellos son de gran importancia para la nutrición humana como se menciona en la literatura, así también se puede apreciar en la figura 10 los que se encuentran presentes en base a cada uno de los métodos de extracción empleados en la etapa II; se observa que varios de ellos se encuentran en cantidades hasta de 0.9 % en peso de la muestra como el ácido Butírico C4:0; también el ácido Linolelaídico C18:2(n6-t) (ω -6); Linoleico C18:2(n6-c) (ω -6); Araquídico C20:0; Tricosanoico (C23:0) y Docosahexaenoico (DHA) C22:6(n-3) (ω -3) fueron los de mayor porcentaje encontrados y que son de gran interés para la industria alimentaria (cuadro 5).

Además este es el primer reporte sobre la composición química de estos compuestos en un residuo agroindustrial, que puede potenciar el valor agregado de este subproducto.

En el caso de los ácidos grasos linoleico C18:2(n6-c) (ω -6) y linolelaídico C18:2(n6-t) (ω -6) de la serie omega 6 y docosahexaenoico (DHA) C22:6(n-3) (ω -3) de la serie omega 3, son altamente apreciados por sus efectos benéficos para la salud y nutrición humana, son obtenidos principalmente de productos marinos, como sardinas, atún y otras especies marinas (Castro, *et al.*, 2001). Inclusive estos aceites esenciales podrían ser mezclados con los piensos para la alimentación de peces de granja.

En la figura 9 se muestra el cromatograma de una muestra analizada donde se identifican algunos de los ácidos grasos de acuerdo al tiempo de retención.

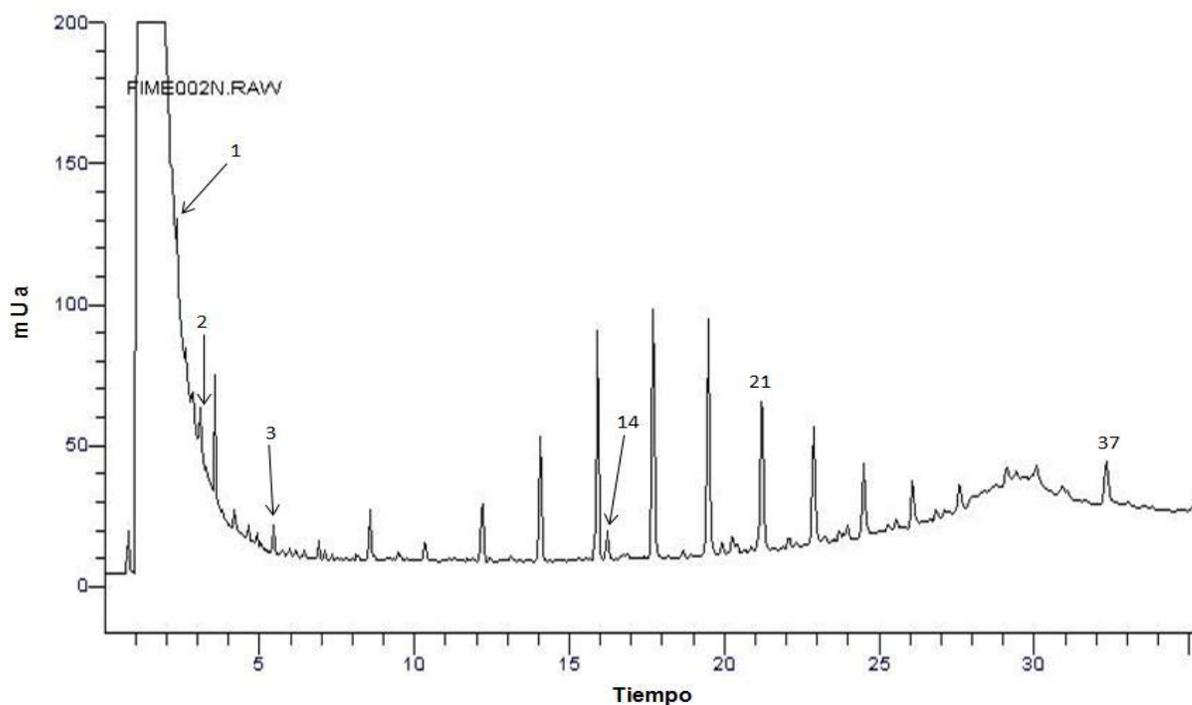


Figura 9. Cromatograma de los ácidos grasos identificados de una muestra extraída por arrastre de vapor.

Cuadro 5. Ácidos grasos identificados en cada método con un porcentaje \geq a 0.1%.

No.	Ácido Graso	S-L	SX	AV
1	Butírico (C4:0)	X	X	X
19	Linolelaídico (C18:2n6t)	X	X	
20	Linoleico (C18:2n6c)	X	X	
21	Araquídico (C20:0)			X
26	cis-11,14-Eicosadienoico (C20:2)	X		
32	Tricosanoico (C23:0)	X	X	
37	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico (C22:6n3)	X	X	X

Nota: Los valores exactos del porcentaje promedio obtenido se muestran en el anexo 2.

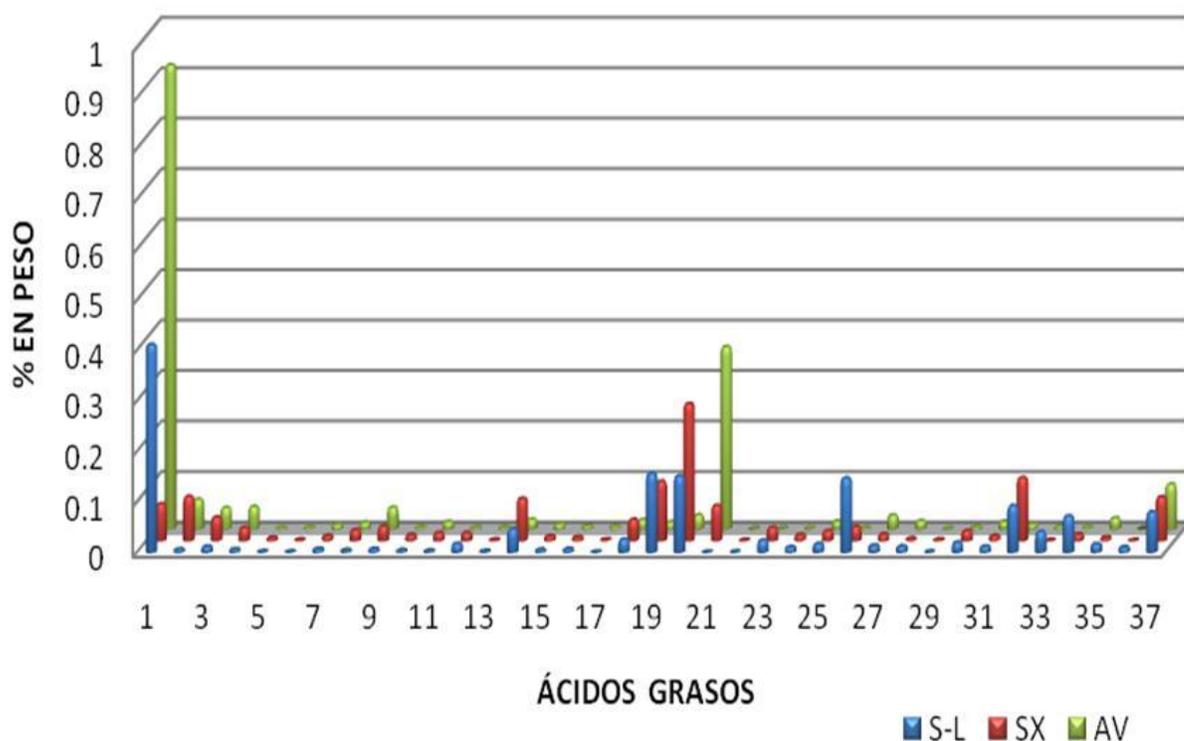


Figura 10. Ácidos grasos identificados en el aceite esencial de cáscara de granada, en las muestras extraídas por sólido-líquido (S-L), Soxleth (SX) y arrastre por vapor (AV).

4.4 Etapa IV. Capacidad de inhibición *in vitro* de *Penicillium sp.*

Cabe mencionar que en esta etapa únicamente fue empleado el aceite esencial extraído por el método de arrastre con vapor, ya que fue el de mayor rendimiento.

Los resultados obtenidos en esta etapa no fueron concordantes con lo esperado, ya que en todas las concentraciones de aceite empleadas el microorganismo fue capaz de crecer aún más que el control (ver figura 11) (anexo 3), teniendo una nula inhibición sobre el microorganismo, esto puede ser debido a que el

microorganismo aprovecho de manera efectiva los ácidos grasos de cadena corta presentes en el aceite y otros compuestos como azúcares, degradándolos para su beneficio.

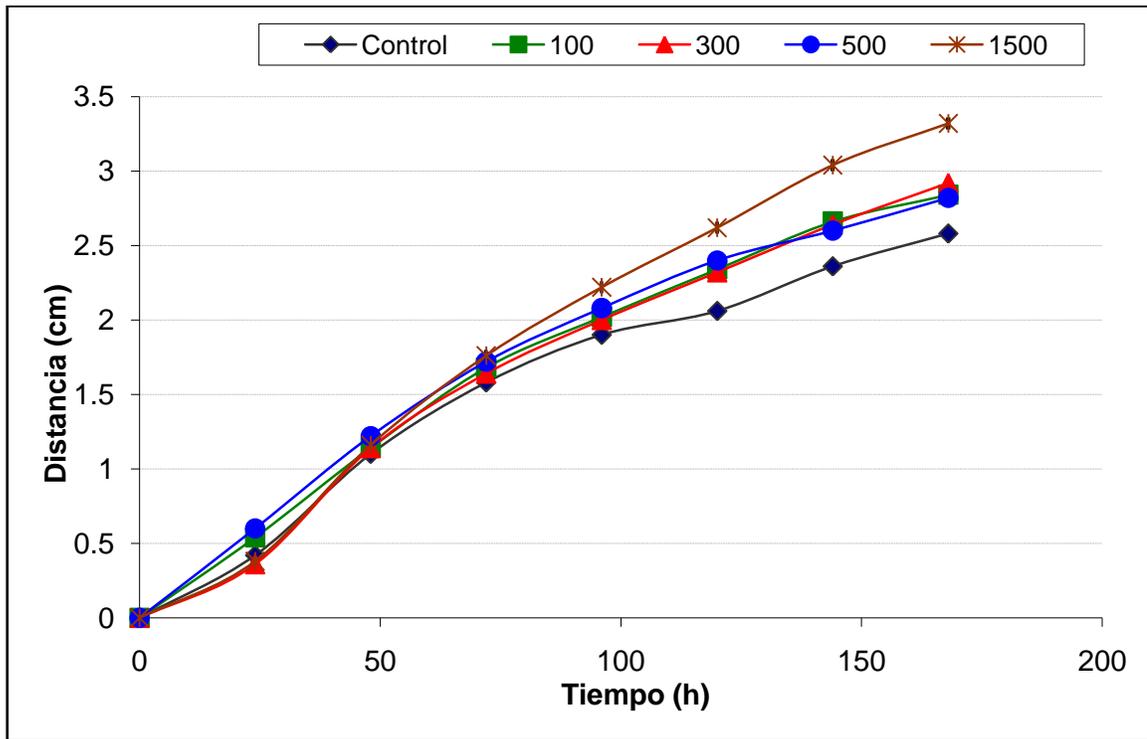


Figura 11. Comportamiento de *Penicillium* sp en las diferentes concentraciones de aceite.

Por lo anterior el aceite esencial de granada no es capaz de inhibir este microorganismo alterante de las frutas, sin embargo, para evidenciar su efecto se tendrán que realizar pruebas con otros microorganismos.

Se ha reportado en la literatura el poder antimicrobiano de la cáscara de granada (Aguilera-Carbó, *et al.*, 2005), sin embargo, ésta actividad biológica se debe principalmente a la concentración de polifenoles del tipo de los elagitaninos. También

en la literatura se menciona que algunos hongos filamentosos son capaces de crecer sobre fuentes ricas en taninos (Ventura, 2007), sin embargo, no es el caso del aceite de cáscara de granada.

Para la presente investigación se esperaba que compuestos del tipo terpenoide fueran arrastrados en el aceite esencial y potenciar la actividad antifúngica, sin embargo, no se mostró así y por lo tanto se requieren más estudios.

En la figura 12 se puede apreciar el comportamiento de *Penicillium* sp a los 7 días (168 h) de incubación, en las diferentes concentraciones aplicadas de aceite.

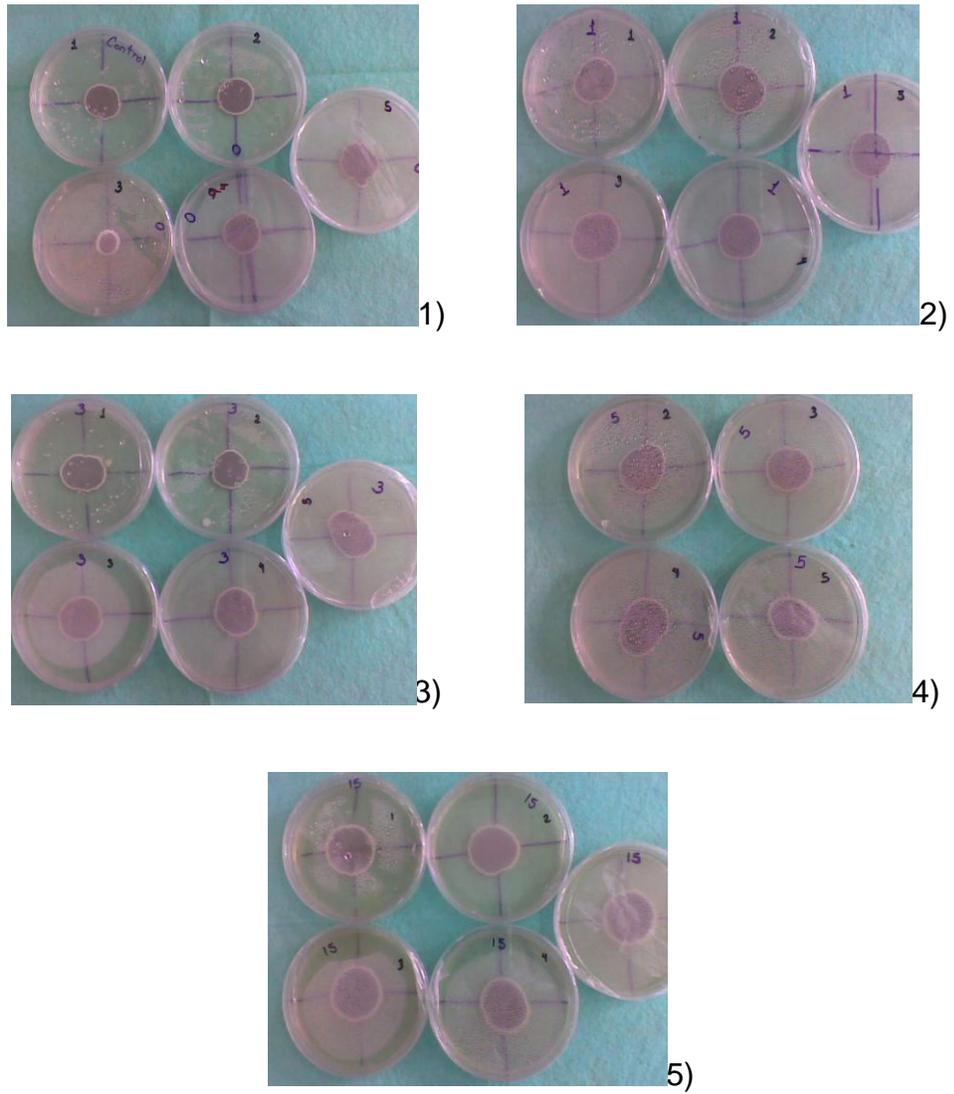


Figura 12. Comportamiento de *Penicillium* sp; concentración **1)** 0 (Control); **2)** 100 μ L; **3)** 300 μ L; **4)** 500 μ L; **5)** 1500 μ L.

Después de realizar la etapa experimental y obtener los resultados se puede concluir que:

- Fue posible extraer y cuantificar el aceite esencial de cáscara de granada (*Punica granatum* L.).
- Se caracterizó físico-químicamente la cáscara de granada coincidiendo con la literatura.
- El mejor método para la extracción del aceite esencial fue por arrastre de vapor obteniendo hasta un 8.7 % de rendimiento.
- Se cuantificaron los ácidos grasos del aceite esencial de la cáscara de granada, obteniéndose tres de gran importancia en la industria alimentaria. linolelaídico (C18:2 n6t); linoleico (C18:2 n6c) y DHA (C22:6 n3).
- El aceite esencial de cáscara de granada no tuvo efecto antifúngico sobre *Penicillium* sp *in vitro*.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto inhibitorio sobre microorganismos del aceite esencial extraído por los métodos Soxhlet y Sólido Líquido.
- Evaluar el efecto inhibitorio del aceite esencial obtenido por el método de arrastre con vapor, con otro tipo de microorganismos como bacterias.
- Llevar a cabo una caracterización de otros componentes presentes en la cáscara de granada.
- Caracterizar particularmente los ácidos grasos linoleico y DHA mediante otros métodos como infrarrojo (IR) o espectrometría de masas (EM) separar y purificar este tipo de ácidos ya que son de gran interés en la industria alimentaria.
- Aplicar resonancia magnética nuclear (RMN) para obtener información adicional de la caracterización del aceite esencial.
- Realizar estudios científicos de la granada promoviendo su enorme potencial sobre todo de este residuo orgánico.

CAPÍTULO VII

LITERATURA CITADA

Agrios, G.N. (2008). Fitopatología. 2ª ed. Ed. Limusa. México, D.F. pp. 856.

Aguilera, C.A.F. (2009). Producción de ácido eláxico: Estudios enzimáticos. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

Aguilera-Carbó, A.F; García-Agustince, C.A; Belmares, R.E. y Aguilar, C.N. (2005). Efecto Inhibitorio del ácido eláxico obtenido de cáscara de granada (*Punica granatum*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre diferentes microorganismos patógenos. Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria. Biblioteca Magna Universitaria, Raúl Rangel Frías. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 12 al 14 de Octubre.

Aguilera-Carbó, A.F; Robledo-Olivo, A; Augur, C; Prado-Barragán, L.A; Favela-Torres, E. and Aguilar, C.N. (2007). Method for ellagic acid quantification in novel sources of this natural antioxidant. Proceedings of the 5th International Congress on Food Technology, Thessaloniki, Greece.

Aguilera-Carbó, A; Augur C; Prado-Barragán L; Favela-Torres E; Aguilar C.N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (2): 189-199.

Andrés, A.J; Almaguer, V.G; Santos, A.B. (1997). El cultivo de la granada china (*Passiflora ligularis* Juss.). Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Méx.

Andreu-Sevilla, A.J; Signes-Pastor, A.J; Carbonell-Barrachina, A.A. (2008). La granada: Producción, Composición y Propiedades Beneficiosas para la Salud. Grupo de Calidad y Seguridad Alimentaria. Universidad Miguel Hernández. Orihuela, Alicante.

AOAC. (1996). Official Methods of Analysis. Ed. William Horwitz. México.

Baquero, J.E; Torrenegra R.D; Bayona, M. (2005). Un metabolito secundario antibacteriano de *Penicillium verrucosum*. Proyecto Colciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Cod. 1203-12-10404.

Barba, J. M. (1997). Introducción al análisis de los productos naturales. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

Bialonska, D; Kasimsetty S.G; Schrader K.K; Ferreira D. (2009). The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric. And Food Chem.* 57(18), pp 8344–8349.

Castro, G.M.I; Montaña, B.S. y Pérez-Gil, R.F. (2001). Ácidos grasos en sardina en salsa de tomate de diferentes zonas pesqueras del Pacífico mexicano. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 51, No. 4.

Castro, G.M.I; Montaña, B.S. y Pérez-Gil, R.F. (2001). Ácidos grasos del atún de diferentes zonas pesqueras del Pacífico mexicano, en aceite y agua. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 51, No. 5.

Chavarrías, M. (2009). Alimentos procedentes de residuos orgánicos. *Consumer Eroski*. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2009/06/17/185999.php>

Cobelo, L. (2007). La granada salta a la cancha. Fruticultura intensiva: alianza estratégica para la producción y comercialización.

<http://www.clarin.com/suplementos/rural/2007/03/31/r-01390698.htm>

Consultado el 17 de agosto del 2009.

Deans S.G. y Svoboda, K.P. (1990). The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) *Flavour Fragrance Journal*. 5(3): 187-190.

Domínguez, X.A. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México, D.F. pp.284.

Dubois, M; Guilles, K.A; Halminton, J.K; Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:530.

Folch, J; Lees, M; Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

García-Camarillo, E.A; Quezada-Viay, M.Y; Moreno-Lara, J; Sánchez-Hernández, G; Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M.C.J. (2006). Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 24, No. 001, pp. 8-12. ISSN (Versión impresa): 0185-3309.

García, J.A. y Díaz, I. (2006). Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. IRTA. Centro de Tecnología de la Carne. Unidad de Química Alimentaria.

Golmakani, M.T. y Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. 109: 925–930.

González, P.B. (2008). Extracción de aceite de la semilla de calabacilla loca (Cucúrbita foetidissima) mediante biolixiviación y prensado. Tesis. Grado de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.

Guenther, E. (1952). The Essential Oils. Van Nostrand Co. Nueva York, Vol. I-V.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2009). Perspectiva estadística de Coahuila de Zaragoza. Disponible en:

<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/perspectivas/perspectiva-coa.pdf>

Lansky, E.P; Harrison G; Froom P. and Jiang W.G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across MatrigelTM. *Investigational New Drugs* 23: 121-122.

Makkar, H.P.S; Blümmel M; Borowy N.K; Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric*, 61:161-165.

Montes, B.R; Cruz, C; Martínez, V; Sandoval, G;García, G; Zilch, L.R; Bravo, D.S; Bermúdez, T.L. y Flores, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de Investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*.18(2): 125-131.

Nascimento, G.G.F; Locatelli, J; Freitas, P.C; Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:247-256.ISSN: 1517-8382.

Olguín, P.L.P. y Rodríguez, M.H.M. (2004). Cromatografía de gases. Métodos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Paré, J. (1996). Extracción por microondas de aceites volátiles y aparato para la misma. Oficina Española de Patentes y Marcas, (Traducción de Patente Europea). No. De Publicación: ES 2 082 822.

Peris, J.B; Stübing, G; Figuerola, R. (1996). Guía de las Plantas Medicinales de la Comunidad Valenciana. Valencia: Las Provincias. p. 257.

Quintero, Ch.A; González, C.N. y Staschenko E. (2004). Aceite Esencial de las Hojas de *Hyptis umbrosa* Salzm Extraído por Diferentes Técnicas. *Acta Científica Venezolana*. 55: 181-187.

Rangel, O.S. (2007). Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) como antimicrobiano contra patógenos anaerobios alimentarios. Tesis. Grado de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.

Robledo-Olivo, A. (2006). Obtención de ácido elágico mediante la biodegradación fúngica de elagitaninos en cultivo en medio sólido. *Tesis*. Maestría en Ciencias. UA de C. Saltillo, Coahuila, México.

Sánchez, C.F.J. (2006). Extracción de Aceites Esenciales. Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Bogotá, D.C. 19 al 21 de Octubre.

Sánchez, L.A; Cozzi, R; Cundari, E; Fiore, M; Ricordy, R; Gensabella, G; Degrassi, F. y De Salvia, R. (2005). Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. *Rev Cubana Plant Med.*, 10(2).

Sandoval, L.V. (2005). Actividad Antifúngica de Extractos de Hojasén (*Flourensia cernua* DC) Sobre *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y Saccardo, *Penicillium digitatum* Saccardo. *Tesis*. Grado de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.

Sartoratto, A; Machado, A.L; Delarmelina, C; Figueira, G.M; Duarte, M.C.T; Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:275-280.

Seeram, N.P. and Heber D. (2005). International Patent of Purification of Ellagitannins. University Of California. Number Publication: WO2005097106.

Shabtay, A; Eitam, H; Tadmor, Y; Orlov, A; Meir, A; Weinberg, P; Weinberg, A.G; Chen Y; Brosh A; Izhaki I. and Kerem Z. (2008). Nutritive and antioxidant potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *J. Agric and Food Chem*. 56(21): 10063-10070.

Sharma, S.D. and Sharma V.K. (1990). Variation for chemical characters in some promising strains of wild pomegranate (*Punica granatum* L). *Euphytica*. 49:131-133.

Tequida-Meneses, M; Cortez-Rocha, M; Rosas-Burgos, E.C; López-Sandoval, S y Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam. Micol.*19: 84-88.

Torrenegra, G.R.D; Baquero, J; Calderón, J. (2005). Actividad antibacteriana y asignación completa de RMN 1H y 13C del ácido micofenólico aislado de *Penicillium verrucosum*. *Revista Latinoamericana de Química*. 33(2):76-81. ISSN: 0370-5943.

Tous, J. and Ferguson L. (1996). Mediterranean fruits. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. p. 416-430.

Valdez, L.E.L. (2005). Ganancia en calidad nutrimental del grano como respuesta asociada a la selección para poliembrionía en maíz. *Tesis*. Maestría en Ciencias. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.

Ventura-Sobrevilla, J.M; Alarcón, A.F.J; Román R.R; Aguilar C.N. (2006) *Punica granatum* L. (Granada): Aspectos terapéuticos, fitoquímicos y toxicológicos. *Publicaciones UA de C*.

Ventura, S.J.M. (2007). Caracterización, Biodegradación y Estudio de la Actividad Biológica de Extractos Tánicos de Plantas del Semidesierto Mexicano. *Tesis* Maestría en Ciencias. UA de C. Saltillo, Coahuila, México.

Web 1: <http://www.iran-daily.com/1383/2131/html/economy.htm>

Pomegranate Production Tops Global Figure, (2004).

Web 2: <http://apoyofq.tripod.com/cuerpo/grasas.html>

Consultada el 17 de Agosto 2009.

Web 3:

http://www.nay.sagarpa.gob.mx/seder/entidades_archivos/siacon/analizaagri.php

Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON), (2003).

Web 4: <http://www.quimica.fq.edu.uy>

Aceites esenciales. Consultada 12 de Octubre 2009.

Web 5: <http://www.florame.com.es/cms.php?id cms=33>

Consultada 20 de Marzo 2010.

Web 6: <http://www.elergonomista.com/fitoterapia/aceitesesenciales.htm>

Consultada 23 de Febrero 2009.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

Anexo 1. Rendimiento del aceite de cáscara de granada.

MÉTODO SOXLETH (M1)		MÉTODO SÓLIDO-LÍQUIDO (M2)		MÉTODO DE ARRASTRE (M3)	
	% DE ACEITE		% DE ACEITE		% DE ACEITE
	1.420		0.814		13.965
	2.260		1.266		4.177
	1.675		1.576		8.013
Promedio	1.785	Promedio	1.218	Promedio	8.719
SD	0.431	SD	0.383	SD	4.932

M SX	1.784
M S-L	1.218
M AV	8.718
SD	4.176

Anexo 2. Porcentaje promedio en peso de la muestra de los ácidos grasos en cada uno de los métodos de extracción.

NO. DE ÁCIDO			
GRASO	% PROMEDIO DE S-L	% PROMEDIO DE SX	% PROMEDIO DE AV
1	0.4120	0.0728	0.9194
2	0.0061	0.0876	0.0585
3	0.0121	0.0466	0.0421
4	0.0061	0.0256	0.0440
5	0.0018	0.0062	0.0022
6	0.0014	0.0017	0.0033
7	0.0073	0.0102	0.0091
8	0.0046	0.0213	0.0129
9	0.0071	0.0287	0.0427
10	0.0046	0.0120	0.0034
11	0.0037	0.0159	0.0144
12	0.0175	0.0159	0.0027
13	0.0022	0.0018	0.0031
14	0.0461	0.0836	0.0191
15	0.0054	0.0092	0.0100
16	0.0070	0.0073	0.0059
17	0.0003	0.0021	0.0050
18	0.0257	0.0419	0.0182
19	0.1560	0.1175	0.0137
20	0.1511	0.2710	0.0275
21	0.0000	0.0694	0.3607
22	0.0006	0.0010	0.0008
23	0.0242	0.0260	0.0008
24	0.0109	0.0121	0.0010
25	0.0176	0.0197	0.0156
26	0.1469	0.0278	0.0017
27	0.0140	0.0128	0.0270
28	0.0123	0.0039	0.0164
29	0.0007	0.0023	0.0009
30	0.0197	0.0198	0.0041
31	0.0121	0.0098	0.0150
32	0.0925	0.1245	0.0101
33	0.0414	0.0004	0.0053
34	0.0719	0.0130	0.0033
35	0.0168	0.0065	0.0212
36	0.0106	0.0001	0.0004
37	0.0801	0.0864	0.0888

Anexo 3. Crecimiento promedio en centímetros de *Penicillium* sp en las diferentes concentraciones.

Tiempo (h)	CONTROL	100	300	500	1500
0	0	0	0	0	0
24	0.42	0.54	0.36	0.60	0.38
48	1.10	1.14	1.14	1.22	1.16
72	1.58	1.68	1.64	1.72	1.76
96	1.90	2.02	2.00	2.08	2.22
120	2.06	2.34	2.32	2.40	2.62
144	2.36	2.66	2.64	2.60	3.04
168	2.58	2.84	2.92	2.82	3.32