



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS:

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE
CÁSCARA DE GRANADA (*Punica granatum*) PARA EVALUAR SU
ACTIVIDAD BACTERICIDA Y ANTIOXIDANTE**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IBQ. Jesús Alberto Coronado Reyes

Directora de Tesis:

D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos

Co-Directo: D.C. Juan Carlos González Hernández

Morelia, Michoacán; Julio 2019

Resumen

En la granada (*Punica granatum*) se han determinado compuestos que son el resultado del metabolismo secundario con actividad antioxidantes y bactericida en prácticamente todo la planta, sin embargo, su aprovechamiento se ha centrado en la parte comestible del fruto sin dar utilidad a la cáscara; además que no se ha profundizado en variedades de los principales estados productores de México dando así un valor agregado al fruto. En el presente trabajo se analizaron 3 variedades de granada madura de los estados de Hidalgo y Guanajuato siendo; Wonderful (VW), Apaseo (VA) y Tecozautla (VT), donde con el análisis estadístico de Tukey HSD ($P > 0.05$) se tiene: I) VW: tonalidad rojiza, firmeza (47.91 ± 3.83 N), pH (1.17 ± 0.23), sólidos solubles totales (16.84 ± 0.14 °Brix), ácido cítrico (0.191 ± 0.052 mg/ml), II) VA: tonalidad verde, firmeza (65.06 ± 7.87 N), pH (1.37 ± 0.08), sólidos solubles totales (14.93 ± 0.57 °Brix), ácido cítrico (0.04 ± 0.002 mg/ml) y III) VT: tonalidad roja, firmeza (39.45 ± 11.35 N), pH (3.67 ± 0.06), sólidos solubles totales (14.84 ± 0.33 °Brix), ácido cítrico (0.312 ± 0.05 mg/ml). Posterior a la caracterización se realizó el secado de cáscara aplicando diseño de superficie de respuesta para triturarla y extraer por maceración a temperatura ambiente los compuestos polifenólicos determinando su contenido por el método Folin-Ciocalteu y su actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS+ así como la actividad bactericida de los extractos por el método de sensibilidad en disco contra *Staphylococcus aureus*, donde las mayores concentraciones de compuestos de interés se tuvieron en las extracciones de la variedad Wonderful con etanol como solvente (Fenoles: 0.88 EAG mg/ml) y halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* de hasta 20.4 mm. Finalmente se llevó a cabo extracción de compuestos polifenólicos de las cáscaras secas por el método Soxhlet y lixiviación evaluando actividad antioxidante y bactericida con las mismas variables de respuesta pero adicionando en la actividad antioxidante la inhibición del radical de DPPH y en la actividad bactericida el efecto frente a *E. coli* concluyendo que la cáscara de granada de estas variedades contienen cantidades significativas de polifenoles con actividad antioxidante y efecto bactericida en ambas cepas.

Palabras clave: Superficie de respuesta, Soxhlet, lixiviación.

Abstract

In the pomegranate (*Punica granatum*) have been found secondary metabolism with antioxidant and bactericidal activity in whole the plant, however, its use has focused on the edible part of the fruit without giving utility to the peel; In addition, the varieties of the main producing states of Mexico have not been studied in depth, thus giving an added value to the fruit. In the present work, 3 varieties of ripe pomegranate from the states of Hidalgo and Guanajuato were analyzed; Wonderful (VW), Apaseo (VA) and Tecozautla (VT), where the statistical analysis of Tukey HSD ($P > 0.05$) is found: I) VW: reddish hue, firmness (47.91 ± 3.83 N), pH (1.17 ± 0.23), total soluble solids (16.84 ± 0.14 ° Brix), citric acid (0.191 ± 0.052 mg / ml), II) VA: green tonality, firmness (65.06 ± 7.87 N), pH (1.37 ± 0.08), soluble solids (14.93 ± 0.57 ° Brix), citric acid (0.04 ± 0.002 mg / ml) and III) VT: red tonality, firmness (39.45 ± 11.35 N), pH (3.67 ± 0.06), total soluble solids (14.84 ± 0.33 ° Brix)), citric acid (0.312 ± 0.05 mg / ml). After the characterization was carried out the drying of the peel applying the design of the surface of the response to crush and extract the maceration at room temperature the polyphenolic compounds determine its content by the Folin-Ciocalteu method and its antioxidant activity by inhibiting the radical ABTS+ as well as the bactericide activity of the extracts by the method of sensitivity in the disc against *Staphylococcus aureus*, where the highest concentrations of compounds of interest were in the extractions of the Wonderful variety with ethanol as solvent (Phenols: 0.88 EAG mg / ml) and inhibition halos for *Staphylococcus aureus* of up to 20.4 mm. Finally, polyphenolic compounds were extracted from the dry peel by the Soxhlet method and leaching, evaluating antioxidant and bactericidal activity with the same response variables but adding the inhibition of the DPPH radical in the antioxidant activity and the effect on the bactericide activity again *E. coli* concluding that the pomegranate peel of these varieties contains significant amounts of polyphenols with antioxidant activity and bactericidal effect in both strains.

CONTENIDO

RESUMEN Y ABSTRACT

Capítulo 1. Introducción.....	12
Capítulo 2. Estado del arte.....	13
2.1. La granada	13
2.1.1. Composición química	14
2.2. Metabolitos secundarios	15
2.2.1. Actividad antioxidante	19
<i>Método del radical ABTS⁺</i>	20
<i>Método del radical DPPH</i>	20
<i>Método de Folin-Ciocalteu</i>	21
<i>Método del tricloruro de aluminio</i>	21
2.2.2. Actividad bactericida	21
2.2.3. Extracción de metabolitos secundarios	22
2.3. Justificación.....	24
2.4. Hipótesis.....	26
2.5. Objetivos	26
2.5.1. Objetivo general	26
2.8.2. Objetivos específicos	26
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	27
3.1. Caracterización física del fruto.....	27
3.1.1. Tamaño	27
3.1.2. Color	27
3.1.3. Firmeza	27
3.2. Caracterización química del fruto.....	28
3.3. Secado de la cáscara	28
3.4. Extracción de polifenoles	28
3.5. Evaluación de la actividad bactericida	30
3.6. Evaluación de la actividad antioxidante	30
3.6.1. Método del radical ABTS⁺⁺	30
3.6.2. Método del radical DPPH	30
3.6.3. Determinación de fenoles totales	30
3.6.4. Determinación de flavonoides totales	31
3.7. Análisis estadístico	32
Capítulo 4. Resultados y discusión.....	33
4.1. Caracterización fisicoquímica del fruto.....	33
4.1.1. Parámetros físicos	33

4.1.2. Parámetros químicos	39
4.2. Secado de la cáscara	42
4.4. Extracción de polifenoles por método Soxhlet	45
4.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante: radical ABTS⁺	46
4.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante: radical DPPH	54
4.4.2. Determinación de fenoles totales	57
4.4.5. Evaluación de la actividad bactericida	70
4.5. Extracción de polifenoles por método lixiviación	80
Capítulo 5. Conclusiones	94
Bibliografía general	
Capítulo 6. Anexos	

Índice de tablas

Tabla 1. Peso de diferentes variedades mexicanas de granada (<i>Punica granatum</i>).....	33
Tabla 2. Grosor de cáscara de diferentes variedades mexicanas de granada (<i>Punica granatum</i>)..	33
Tabla 3. Fisiología del fruto de granada mexicana (<i>Punica granatum</i>).....	34
Tabla 4.- Caracterización fisiológica de cultivares de granada (<i>Punica granatum</i> L.) de Irán (Tomada y modificada de Akbarpouret. al., 2009)	35
Tabla 5. Determinación de color en cáscaras de granada (<i>Punica granatum</i>)	36
Tabla 42. Comparativa entre firmezas analizadas en granadas cosechadas en el año 2017 y 2018.	38
Tabla 8.- Determinación de la firmeza en granadas de la variedad Mollar Elche sometida a diferentes tratamientos durante el almacenamiento.....	38
Tabla 9.- Caracterización fisicoquímica a cuatro variedades del fruto de granada (<i>Punica granatum</i>).....	39
Tabla 10.- Determinación de pH a diferentes variedades y cultivares de granada. Igual indicación, quitar punto finales, recuerda que no llevan!!!	40
Tabla 11.- Determinación de los sólidos solubles totales (SST) en diferentes variedades de granada (Tabla tomada y modificada de Alcaraz et al., 2014, Mercado et al., 2011 y Raga et al., 2015). Quitar puntos finales!!.....	41
Tabla 12.- Matriz de datos usados para el secado de la cascara con un diseño de superficie de respuesta	42
Tabla 13.- Determinación de fenoles totales en extractos de cáscara de granada.	44
Tabla 14.- Matriz de datos usada para la generación de gráficos de superficie de respuesta en la extracción de aceite esencial las cuales cambiaban dependiendo del solvente y dellote pero siempre trabajándose bajo los mismos parámetros.....	45
Tabla 18.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de los diferentes lotes con la metodología de superficie de respuesta la actividad antioxidante expresado en miliequivalentes de Trolox.	51
Tabla 46. Análisis de ANOVA entre los extractos cetónicos y etanólicos obtenidos de cáscara de granada por método del radical ABTS++.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 47. Análisis de ANOVA entre los extractos cetónicos y etanólicos obtenidos de cáscara de granada por método del radical DPPH.	54
Tabla 48. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante a través de métodos distintos.	55
Tabla 19.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de los diferentes lotes con la metodología de superficie de respuesta usando como respuesta la concentración de fenoles expresada en EAG mg/ml.....	61

Tabla 49. Análisis de ANOVA entre los extractos cetónicos y etanólicos obtenidos de cáscara de granada para cuantificación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.	62
Tabla 50. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante por método ABTS++ y concentración de fenoles totales.	64
Tabla 51. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante por método DPPH y concentración de fenoles totales.	64
Tabla 52. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad bactericida en bacterias grampositivas y concentración de fenoles totales.	65
Tabla 53. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad bactericida en bacterias negativas y concentración de fenoles totales.	66
Tabla 17.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de los diferentes lotes con la metodología de superficie de respuesta teniendo como respuesta el diámetro de los halos de inhibición (mm) formados frente a la bacteria grampositiva <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Tabla 44. Análisis de ANOVA de la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>).	75
Tabla 45. Actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa de extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>).	78
Tabla 35. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.	81
Tabla 36. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.	82
Tabla 37. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.	82
Tabla 38. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.	84
Tabla 39. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.	85
Tabla 40. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.	85
Tabla 41. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS++ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.	87
Tabla 42. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS++ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.	87

Tabla 43. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS++ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.	87
Tabla 44. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.	89
Tabla 45. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.....	90
Tabla 46. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.	90
Tabla 47. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.	92
Tabla 48. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.....	92
Tabla 49. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.	92

Índice de figuras

Figura 1.- Determinación de color a las variedades de granada analizados. n=12,	36
Figura 2.- Gráfico de superficie de respuesta estimada para el secado de cáscara de granada.	43
Figura 3.- Gráfico del contorno de la superficie de respuesta estimada para el secado de cáscara de granada.....	43
Figura 4.- Gráfico del análisis de ANOVA para la evaluación de actividad bactericida por el método de sensibilidad en discos con halos de inhibición para el lote 1 variedad Wonderful utilizando los dos solventes.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 1 variedad Wonderful con una concentración de extractos de 50 mg/ml	70
Figura 6.- Gráfico del análisis de ANOVA para la evaluación de actividad bactericida por el método de sensibilidad en discos con halos de inhibición para el lote 2 variedad Apaseo utilizando los dos solventes.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 2 variedad Apaseo con una concentración de extractos de 50 mg/ml.-	71
Figura 8.- Gráfico del análisis de ANOVA para la evaluación de actividad bactericida por el método de sensibilidad en discos con halos de inhibición para el lote 3 variedad Tecozautla utilizando los dos solventes.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 3 variedad Tecozautla con una concentración de extractos de 50 mg/ml.-	72
Figura 10.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria.....	73
Figura 11.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria.....	73
Figura 12. Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS ⁺⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 1 usando acetona como solvente.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13.- Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS ⁺⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 1 usando etanol como solvente.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14.- Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS ⁺⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 2 usando acetona como solvente.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15.- Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS ⁺⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 2 usando etanol como solvente.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 16.- Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS ⁺⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 3 usando acetona como solvente.	¡Error! Marcador no definido.

Figura 17.- Evaluación de la actividad antioxidante con el radical de ABTS⁺ expresados en miliequivalentes de Trolox en el lote 3 usando etanol como solvente. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS⁺ obtenido del lote 2 con etanol como solvente... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS⁺ obtenido del lote 2 con etanol como solvente..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 1 usando acetona como solvente y expresados en EAG mg/ml..... 57

Figura 21.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 1 usando etanol como solvente y expresados en EAG mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 22.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 2 usando acetona como solvente y expresados en EAG mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 23.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 2 usando etanol como solvente y expresados en EAG mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 24.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 3 usando acetona como solvente y expresados en EAG mg/ml..... 58

Figura 25.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 3 usando etanol como solvente y expresados en EAG mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 26.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente. 59

Figura 27.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente. 60

Figura 28.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 1 usando acetona como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 29.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 1 usando etanol como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 30.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 2 usando acetona como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 31.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 2 usando etanol como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 32.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 3 usando acetona como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 33.- Cuantificación de los flavonoides en extractos obtenidos del lote 3 usando etanol como solvente y expresados en EQ mg/ml..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 34.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 35.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 36. Sensibilidad en disco en medio sólido de extractos de cáscara de granada frente a bacteria grampositiva..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 37. Sensibilidad en disco con medio sólido de extractos de cáscara de granada frente a bacteria gramnegativa.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 38. Estabilización de radicales libres sintéticos utilizando extractos cetonicos y etanolicos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>).....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 39. Estabilización de radicales libres sintéticos utilizando extractos cetonicos y etanolicos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>).....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 40. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical ABTS ⁺⁺ y DPPH.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 41. Cuantificación de fenoles totales en extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) método de Folin-Ciocalteu.	62
Figura 42. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical ABTS ⁺⁺ y determinación de fenoles totales.....	63
Figura 43. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical DPPH y determinación de fenoles totales.	64
Figura 44. Correlación de Pearson entre la actividad bactericida en bacterias grampositivas y concentración de fenoles totales.	65
Figura 45. Correlación de Pearson entre la actividad bactericida en bacterias gramnegativas y concentración de fenoles totales.	66
Figura 46. Actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) mexicana.	81
Figura 47. Actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) mexicana.	84
Figura 48. Actividad antioxidante evaluada por método del radical ABTS ⁺⁺ en extractos acuosos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) mexicana.	86
Figura 49. Actividad antioxidante evaluada por método del radical DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) mexicana.	89
Figura 50. Fenoles totales cuantificados por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) mexicana.	91
Figura 51.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Figura 52.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Figura 53.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS ⁺⁺ obtenido del lote 1 con acetona como solvente.....	5
Figura 54.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS ⁺⁺ obtenido del lote 1 con acetona como solvente.....	6
Figura 55.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.	6
Figura 56.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.	6
Figura 57.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.	7
Figura 58.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.	7

Figura 59.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	7
Figura 60.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	8
Figura 61.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 1 con etanol como solvente.	8
Figura 62.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 1 con etanol como solvente.	8
Figura 63.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.	9
Figura 64.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.	9
Figura 65.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.	9
Figura 66.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.	10
Figura 67.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	10
Figura 68.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	10
Figura 69.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con acetona como solvente.	11
Figura 70.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con acetona como solvente.	11
Figura 71.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.	11
Figura 72.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.	12
Figura 73.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.	12
Figura 74.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.	12
Figura 75.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	13
Figura 76.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .	13

Figura 77.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con etanol como solvente.....	13
Figura 78.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con etanol como solvente.....	14
Figura 79.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente.....	14
Figura 80.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente.....	14
Figura 81.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente..	15
Figura 82.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente.....	15
Figura 83.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 84.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con acetona como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 85.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con acetona como solvente.....	16
Figura 86.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con acetona como solvente.....	16
Figura 87.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.....	17
Figura 88.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.....	17
Figura 89.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.	17
Figura 90.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.....	18
Figura 91.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 92.- Gráfica de contornos superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con etanol como solvente con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 93.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con etanol como solvente.....	19
Figura 94.- Gráfica de contornos superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con etanol como solvente.....	19

Figura 95.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.	19
Figura 96.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.	20
Figura 97.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente. ...	20
Figura 98.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.	20

Capítulo 1. Introducción

La granada (*Punica granatum*) es originaria de Irán y fue llevada a diversos países de Asia y la zona mediterránea. La vida productiva del árbol de granada es de 20 a 25 años, comenzando a los 3 años y llegando a su máxima producción después de los 5 años, donde, hasta ese tiempo se puede hacer uso de los frutos. Actualmente la granada es cultivada en México y Estados Unidos, generándose tan solo en México, en el año 2017, un total de 6,816.22 toneladas en 18 estados productores de la república; entre los cuales se encuentra Michoacán. El cultivo de la granada ha ido en aumento en los últimos años ya que del año 2004 al 2017 se tuvo un incremento del 68 %, atribuible a que es un árbol resistente, con rendimientos altos en la producción de frutos lo cual resulta retribuirle a quien practique su cultivo; además de que ha crecido el interés por el consumo del fruto, debido a los hallazgos de compuestos químicos con un alto valor nutricional en el jugo, arilos y semilla, así como algunas propiedades benéficas para la salud de quienes la consumen. El consumo de granada se hace en fresco, así como los arilos del fruto son utilizados para la elaboración de jugos y otros productos a nivel industrial; sin embargo, la cáscara de granada no es aprovechada, desechándose grandes cantidades sin dar una utilidad. Lo que respeta a la fracción comestible de la planta se han reportado el contenido de compuestos químicos que actúan como agente antioxidante así como se han caracterizados compuestos con actividad antioxidante de otras partes de la planta que no son consideradas como comestibles, como; el tallo, las hojas, las raíces, las flores e incluso la cáscara de las granadas; sin embargo, el jugo, los arilos y las semillas son los tejidos vegetales con mayor exploración en cuanto a caracterización y aplicación de los compuestos, por lo que, un análisis profundo a la fracción no comestible y que sea considerada desecho, como la cáscara, daría un valor agregado al cultivo y consumo. Además de la actividad antioxidante, se ha reportado que es posible la obtención de extractos de granada con compuestos químicos que tienen actividad antibacteriana contra algunas enterobacterias así como frente a algunas especies de hongos mediante extracciones líquido-líquido o sólido-líquido con ayuda de solventes que sirvan como agente extractante, obteniendo como producto final fracciones de mezclas líquidas con compuestos polares o no polares, dependiendo del solvente empleado, a los cuales se les pueda dar una aplicación biotecnológica.

Capítulo 2. Estado del arte

2.1. La granada

La granada o granado (*Punica granatum*) pertenece a la familia *Punicaceae* y es una planta nativa de Irán (Sarkhosh *et al.*, 2006). El granado es considerado un arbusto, que posee follaje abundante, de tronco delgado, ramas torcidas y levemente espinosas alcanzando una altura alrededor de los 5 m, que generalmente se adapta a climas del tipo mediterráneo. Las hojas son de color verde, alargadas, con superficie lisa y brillante, levemente onduladas. La flor es acampanada y está conformada regularmente de 5 a 8 pétalos color naranja brillante (Morton, 1987). En cuanto al fruto, es conocido como granada y surge del crecimiento del ovario inferior tras la fecundación de la flor, generándose una baya grande, de piel brillante, gruesa, correosa y globulosa de 10 a 15 centímetros de diámetro, de color amarillento a rojizo y que en su interior contienen numerosas semillas envueltas en una pulpa rosada comestible; los granos colorados son muy jugosos y se desprenden con facilidad. Por otro lado, las raíces del granado necesitan cantidades considerables de agua para poder generar numerosos frutos de buena calidad; sin embargo, el granado es resistente a las sequías (López, 2010).

En el granado existe una amplia gama de compuestos químicos que caracterizan cada una de sus partes estructurales, los cuales son distintos dependiendo de la variedad de granada, así como de la zona geográfica donde se desarrolle la planta, ya que los factores bióticos y abióticos tienen efecto directo sobre su síntesis y metabolismo y que, al tratarse de una planta que puede crecer en diversos climas, existe una variación importante.

2.1.1. Composición química

La granada está constituida de compuestos químicos resultantes de su metabolismo, ya sea primario o secundario, recibiendo el nombre de metabolitos. Un metabolito primario es aquel que una planta sintetiza y utiliza para desarrollarse, crecer y reproducirse; cuyo peso molecular es alto (Díaz, 2009). Dentro de los metabolitos primarios se encuentran: los carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas y polímeros estructurales; como la celulosa. Por otro lado, un metabolito secundario suele tener bajo peso molecular y participa en el proceso de adaptación de la planta, así como en la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores para la dispersión de semillas y frutos (Sepúlveda-Jiménez, 2003). Los metabolitos secundarios son considerados como compuestos de defensa y entre ellos se pueden mencionar los polifenoles, terpenos, alcaloides, látex, gomas y ceras (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011); sin embargo, debido a que los análisis químicos en los alimentos suelen estar centrados con base a los metabolitos primarios, por su alto valor nutricional, los metabolitos secundarios de la granada serán analizados en un apartado posterior.

Los análisis químicos del fruto de la granada han sido reportados dividiéndolos en tres fracciones, caracterizándose los compuestos presentes en la cáscara, semilla y arilos. Del peso total del fruto de granada, alrededor del 40% del peso corresponde a los arilos, los cuales contiene 85% de agua, 10% de azúcares totales como: glucosa, fructosa y sacarosa principalmente, 1.5% del peso corresponde a las pectinas, de 0.2 a 1% son compuestos polifenólicos, y el resto una mezcla de ácidos orgánicos, minerales como: calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, y cobalto, y otros productos del metabolismo secundario de la planta. Las semillas contenidas en los arilos representan un 10% del peso total del fruto, donde, de un 12 a 20% está constituido por aceites, de los cuales, el 80% corresponde a ácidos grasos conjugados con alto contenidos en configuración cis 9, trans 11 y cis 13, como el ácido púnico y el ácido linoleico. Los ácidos grasos de las semillas constituyen el 95% del aceite, de ellos, el 99% son triacilglicérols, el resto que conforman el aceite son: esteroides, esteroides, tocoferoles y algunos cerebrosidos. Los otros compuestos que conforman el peso total de la semilla son ligninas, proteína, fibra cruda, azúcares, algunas vitaminas, minerales, pectinas, fitoestrógenos como el comestrol y algunos polifenoles y terpenos (Sai & Prakash, 2011). Finalmente, la cáscara de la granada representa el 50% del peso total del fruto y en ella se pueden encontrar algunos compuestos polifenólicos como: elagitaninos, proantocianinas, así como compuestos alcaloides y glicósidos (Viuda-Martos, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010).

El valor nutricional de la granada, con base a su composición química, tiene un aporte de 72 kcal por cada 100 g de arilos ingeridos, los cuales tendrán un aporte de 1 g de proteína, 16.6 g de

carbohidratos, 1 mg de sodio, 379 mg de potasio, 13 mg de calcio, 12 mg de magnesio, 0.7 mg de hierro, 0.17 mg de cobre, 0.3 mg de niacina y 7 mg de vitamina C principalmente, por lo que su consumo es considerado como nutritivo (Teixeira, y otros, 2013).

En cuanto a la composición química de la fracción no comestible de la planta, en las raíces y troncos se han identificado compuestos alcaloides, así como algunos esteroides. Las hojas son ricas en ácidos grasos, entre los cuales se pueden mencionar: el ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido linoleico y linolénico (Ercisli, Agar, Orhan, Yaldirim, & Hizarci, 2007). Lo que respecta a las flores, los componentes mayoritarios son metabolitos secundarios polifenólicos seguidos de terpenos y finalmente algunos esteroides, (Bekir, Mars, Vicendo, Ftterich, & Bouajila, 2013), es por ellos que a medida que se profundiza en la caracterización química de los metabolitos primarios de la granada y en ello, son identificados compuestos resultantes del metabolismo secundario, es necesario su análisis minucioso para alguna posible utilidad.

2.2. Metabolitos secundarios

En las plantas, es común encontrar compuestos con valor nutricional que sean aprovechados para la elaboración de productos alimenticios, como lo son los metabolitos primarios; sin embargo, es difícil que solo se tenga presencia de ellos ya que durante el desarrollo de la planta se sintetizan los metabolitos secundarios, que como ya se había mencionado, le permitirán a la planta su adaptación y preservación. Los metabolitos secundarios difieren entre especies vegetales y reflejan su evolución. Son metabolitos secundarios ya que no todas las plantas son capaces de sintetizarlos, o al menos no del mismo tipo o en las mismas concentraciones a diferencia de los metabolitos primarios; que se encuentran en todos los reinos y en las especies existentes en ellos (García, 2004).

Los metabolitos secundarios, han sido clasificados a lo largo de la historia de diversas maneras: por los grupos funcionales que contienen, así como por la posición del grupo funcional, por el efecto negativo que tienen en el aprovechamiento de algunos nutrientes, por la cadena carbonada que los conforma o por su configuración molecular (García, 2004); sin embargo, se pueden identificar 6 grupos principales que son: los alcaloides, los polifenoles, los terpenos, el látex, las gomas y las ceras (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011).

LOS ALCALOIDES

Se trata de una familia con más de 15,000 compuestos químicos cuya característica principal es que: son solubles en agua, tienen actividad biológica y deben contener en su estructura química al menos un átomo de nitrógeno. Los alcaloides pueden ser moléculas cíclicas o alifáticas. La síntesis de los alcaloides es a partir de los aminoácidos: lisina, tirosina y triptófano (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Los alcaloides suelen ser tóxicos para quien llega a ingerirlos. Algunos de los ejemplos de alcaloides son los alcaloides: esteroidales, glicósidos, cianogénicos y aminas (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011).

En la granada, los alcaloides se encuentran en la corteza de los troncos, en las raíces y en el jugo de los arilos; encontrándose dos tipos de alcaloides en las raíces y troncos, como lo son: piperidinas y pirrolidinas, sintetizándose las primeras en mayor proporción. Las piperidinas son

biosintetizadas a partir de la lisina. De manera específica los alcaloides que se encuentran en las cortezas de la granada son peleterinas y las punicorteinas (García-Viguera & Pérez, 2004). Lo que respecta a los alcaloides presentes en el jugo de los arilos destacan la serotonina, triptamina y melatonina (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010).

TERPENOS

Conocidos también como terpenoides o isoprenoides, son moléculas que resultan de la unión de estructuras carbonadas con 5 átomos de carbono llamados isopreno, clasificándose con base a la cantidad de unidades de isopreno que conformen el metabolito (Sepúlveda, Porta, & Rocha, 2003). Por tanto, los terpenos se pueden clasificar en: hemiterpenos (5 Carbonos), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) y politerpenos que en su estructura contiene 35 o más carbonos (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011). Los terpenos son extraídos del material vegetal utilizando solventes orgánicos, ya que son moléculas no polaridad, y son extraídos en forma de aceite esencial conteniendo solo terpenos del tipo monoterpenos e incluso sesquiterpenos. Por otro lado, los terpenos de peso molecular mayor son extraídos del material vegetal en forma de resinas (Sepúlveda, Porta, & Rocha, 2003).

Los terpenos en la granada tienen presencia significativa en las semillas ya que han sido aislados triterpenos como: el ácido ursólico, el ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido punicanólico y ácido betulínico (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010).

LATEX

La composición química del látex es compleja ya que está constituido por terpenos, isoprenoides, grasas y carbohidratos. Las principales plantas que lo sintetizan son los angiospermas tropicales por lo que en la granada no hay presencia de este metabolito (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011).

GOMAS

Las gomas son carbohidratos complejos, de alto peso molecular, que pueden tener ramificaciones o no presentarlas y que son solubles en agua (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011). La granada no tiene presencia de gomas.

CERAS

Son mezclas complejas de cadenas carbonadas que poseen de 20 a 60 carbonos. Son compuestos insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos. Generalmente las ceras son sintetizadas por plantas de la familia de las *Euphorbiaceae* y *Palmae* (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011), por lo que en la granada no son compuestos que sean sintetizados en grandes cantidades.

POLIFENOLES

Los polifenoles, al igual que los terpenos, son de los compuestos químicos con mayor abundancia en la naturaleza. Se trata de compuestos con una gran diversidad estructural; sin embargo, presentan anillos aromáticos hidroxilados en común. La clasificación de los polifenoles

se basa en: el número de grupos hidroxilo en la estructura, donde el fenoles es la molécula más sencilla y puede estar sustituido con más de un radical hidroxilo, la siguiente forma de clasificación es con base a su composición química; es decir, con base al número de fenoles sencillos unidos en una moléculas, existiendo por tanto, mono, di, oligo y polifenoles. Finalmente, la tercera clasificación es aquella en donde se toma en cuenta el sustituyente unido a la cadena base carbonada (Kabera, Semana, Mussa, & He, 2014). Por ellos, los grupos en los cuales se pueden clasificar a los compuestos polifenólicos, con base en su estudio y utilidad, son: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, taninos, chalconas, cumarinas (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011).

Ácidos fenólicos: están conformados por dos grupos: ácido hidroxibenzoico y derivados de ácidos hidroxicinámicos. Entre los ácidos hidroxibenzoicos se encuentra el ácido gálico, el ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanillico y siringico (Angelo & Neuza, 2007). El ácido gálico es el principal ácido fenólico caracterizado en: las hojas, flores, jugo de los arilos y cáscara de la granada

Flavonoides: se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, contenidos en las hojas, flores, partes leñosas, así como en las cortezas de los frutos. Las plantas que son expuestas a las radiaciones solares tienen una mayor concentración de estos compuestos que aquellas plantas que crecen a la sombra (Durán & Borja, 1993). Los flavonoides son pigmentos solubles en agua, de bajo peso molecular, que se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y son responsables de las coloraciones amarillas, rojas y azules en los pétalos de las flores o en algunos frutos (Kabera, Semana, Mussa, & He, 2014). Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los flavonoides se clasifican, con base a los sustituyentes que contenga la estructura base o a la posición y número de grupos hidroxilo en: flavanos, flavonoles, flavonas, isoflavonas y antocianidinas, las cuales se encuentran en forma de glicósidos constituidos por una fracción fenólica o aglicona y un carbohidrato.

En el granado se han identificado algunos flavonoides en las diferentes partes estructurales de la planta como: en el tronco hay presencia de un tipo de quercetina con el nombre de Quercetin-3,4-dimeteiler-7-*O*- α -L-arabinofuranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido así como el Naringenin-4'-metileter-7-*O*- α -L-arabinofuranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010). En cuanto a las flores, se ha caracterizado una flavona en específico que es la punicaflavona que no se encuentra en otro tipo de tejido en la planta (Ali & Sharma, 2006). En el jugo de la granada se han identificado compuestos como: la catequina, epicatequina, epigallocatequina, el catecol, rutina (quercetin-3-rutinósido) y antocianidinas, donde las agliconas son: delfinidina, cianidina y pelargonidina. Los compuestos en específico de las antocianinas son: cianidin-3-*O*-glucosido, cianidin-3,5-di-*O*-glucosido, delfinidin-3-*O*-glucosido, delfinidin-3,5-di-*O*-glucosido, pelargonidin-3-*O*-glucosido, pelargonidin-3,5-di-*O*-glucosido (Hernández, Melgarejo, & Tomás-Barberán, 1990). Lo que respecta a las hojas, hay evidencia de presencia de apigenina (apigenin-4'-*O*-glucopiranosido), luteolinas como: luteolin-7-*O*-glucosido, luteolin-4'-*O*-glucopiranosido, luteolin-3'-*O*-glucopiranosido y luteolin-3'-*O*-xilopiranosido (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010). Finalmente, en la cáscara de la granada se han aislado flavonoides del tipo flavonas, flavonoles y antocianidinas; compuestos como catequina, epicatequina, epicalocatequin-3-galato, quercetina, rutina, flavan-3-ol, kaempferoles (kaempferol-3-*O*-glucosido

y kaempferol-3-*O*-ramnoglicosido), luteolina (luteolin-7-*O*-glucosido), narangina, pelargonidina. Los colores brillantes de la cáscara y del jugo son atribuibles a las antocianidinas, donde las agliconas son: delphinidina, cianidina y pelargonidina (García-Viguera & Pérez, 2004).

Taninos: son compuestos de alto peso molecular que en su estructura poseen al menos un grupo hidroxilo en uno o más anillos fenólicos que los constituyen. Son sintetizados a partir del ácido shikimico, son solubles en agua a excepción de aquellos que tienen un peso molecular elevado y se dividen en dos grupos: los taninos hidrolizables y los condensados (Kabera, Semana, Mussa, & He, 2014). Los taninos hidrolizables están conformados por ésteres de ácido gálico o ácido elágico unidos a un carbohidrato; los taninos hidrolizables pueden ser hidrolizados fácilmente en presencia de un ácido fuerte. Dentro de los taninos hidrolizables se encuentra una subclasificación que incluye: galotaninos y los elagitaninos. Los galotaninos son considerados los taninos hidrolizables más simples, están formados por ácido gálico y el ácido digálico unidos por un enlace éster que, a su vez, se encuentran unidos a glucosa. Los elagitaninos se forman a partir del ácido hexahidroxidifénico que al hidrolizarse forma el ácido elágico. Los elagitaninos así como los galotaninos tienen la actividad de polimerizarse, formando moléculas complejas. En cuanto a los taninos condensados, resultan de la polimerización de unidades de flavanoles; como lo es la catequina, la epicatequina o leucocianidina, sin presencia de algún carbohidrato (Olivas-Aguirre, y otros, 2015).

Dentro de los taninos que se han reportado en la granda se pueden mencionar: en el tallo punicalaginas, punicalinas, puniacorteinas y punigluconinas (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010). En las flores se encuentran; ácido elágico y ácido gálico. En el jugo, hay concentraciones significativas de ácido gálico y elágico (Huang, y otros, 2005). Las hojas son características por la presencia de pedunculaginas, punicalinas, punicalaginas y punicafolinas (Tanaka, Nonaka, & Nishioka, 1985). En cuanto a la cáscara, se han aislado compuestos como: corilaginas, ácido elágico, galagildilactona, ácido gálico, metilgalatos, granatina A y B, pedunculaginas, punicalaginas y punicalinas (Wang, Ding, Liu, Xiang, & Du, 2010).

La síntesis de los metabolitos secundarios está restringida a la etapa de desarrollo de la planta, así como por factores como la concentración de carbohidratos, disponibilidad de agua, exposición a luz, y temperatura ambiental principalmente (García, 2004). Los metabolitos secundarios cumplen con las siguientes funciones en las plantas, las cuales son:

1. **Mecanismo de defensa:** las gomas son exudadas cuando la planta sufre algún corte de tal manera que ayude a la regeneración del tejido. Los flavonoides y cumarinas sirven como herbicidas y pesticidas naturales que protegen a las plantas de depredadores (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011). En cuanto a los terpenos, los monoterpenos, como el mentol, citronelal y piretrinas son antimicrobianos, repelente de insectos y veneno que

ataca el sistema nervioso de los insectos, respectivamente (Sepúlveda, Porta, & Rocha, 2003).

2. **Mecanismo de atracción de polinizadores:** los compuestos terpenicos, como los monoterpenos y sesquiterpenos, generan olores que resultan agradables para algunos insectos permitiendo que el polen de las flores sea dispersado al tener interacción del tipo planta-insecto. Las antocianinas y los carotenoides generan colores llamativos para los polinizadores sirviendo como señalización (Dobson & Bergström, 2000)
3. **Protección contra la radiación ultravioleta:** para este sistema de protección, los polifenoles son los que cobran gran importancia ya que es sabido que compuestos como los flavonoides, cumarinas, ligninas y los taninos actúan como filtros para la luz UV, de tal manera que las plantas que estén expuestas mayoritariamente al sol, tienen una mayor síntesis de compuestos polifenólicos (Vilela, González-Paleo, & Ravetta, 2011).
4. **Alelopatía:** se define como la inhibición del crecimiento de alguna especie de planta ajena por parte de otra que pueda interferir con su crecimiento. Los compuestos que generan este fenómeno actúan sobre la etapa de germinación, reduciendo: la actividad mitótica en las raíces, consumo de iones, fotosíntesis, permeabilidad de las membranas celulares, actividad enzimática (Céspedes, Marín, Domínguez, Ávila, & Serrato, 2006)

Con la caracterización de los metabolitos secundarios y el análisis sobre la funcionalidad que cumplen en las plantas, surgió el interés por el ser humano de extraer los compuestos, purificarlos y evaluar su aplicación biotecnológica, donde se ha concluido hasta el momento que los metabolitos secundarios tienen algunas propiedades como: favorecedor de la salud cardiaca, actividad antiinflamatoria, actividad antitumoral, control de la diabetes y como agentes antioxidantes y bactericidas.

2.2.1. Actividad antioxidante

Un antioxidante es aquella sustancia que presenta bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable que retarda o previene su oxidación. Los antioxidantes estabilizan a los radicales libres y tienen la actividad de inhibir la oxidación causada por ellos actuando a nivel intracelular y otros en la membrana celular. A nivel de la biotecnología alimentaria, los antioxidantes son compuestos que al retardar o inhibir la degradación de las moléculas orgánicas ayudan a prevenir la formación de colores y olores desagradables (Vázquez, *et al.*, 2007).

Tipos de antioxidantes:

- ∞ **Endógenos:** son enzimas producidas en el organismo y algunas de ellas necesitan algún cofactor para poder actuar y proteger a la célula.
- ∞ **Exógenos:** son sustancias introducidas al organismo mediante la alimentación. Como ejemplos de estas antioxidantes tenemos a la Vitamina E, C y el caroteno (Zamora, 2007).

Por otro lado, los radicales libres son compuestos químicos producidos normalmente durante el metabolismo celular que se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, por las diversas reacciones redox, realizadas por enzimas como: la NADHP oxidasa, lipoxigenasas, cicloxigenasas y peroxidasas. Existen otras fuentes endógenas de radicales libres como las

oxidaciones microsomales, los fagosomas, la autooxidación de sustratos y los neutrófilos. Los radicales libres son utilizados en diferentes procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos; sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas capaces de causar daño celular (Delgado *et al.*, 2010). El exceso de radicales libres es producido por contaminantes externos que entran a nuestro cuerpo; la contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos, así como el oxígeno. El oxígeno molecular (O_2) al usarse por los organismos aerobios contribuye a la formación de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs o ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species) que son considerados radicales por carecer de electrones, tomándolos por lo tanto de otras moléculas. Al reducirse el O_2 por los electrones que escapan de la cadena respiratoria se genera el anión súper oxido (O_2^-), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre producen el radical hidroxil (OH), mediante la reacción de Fenton; considerado el más dañino en sistemas biológicos (Venereo, 2002).

Estudios realizados por Tezcan *et al.*, 2009, para evaluar los compuestos antioxidantes y su actividad en jugos comerciales de granada indicaron una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en seis marcas analizadas. Otros hallazgos importantes han mostrado que los antioxidantes fenólicos del jugo de la granada son agentes quimiopreventivos y anticancerígenos probado en sistemas *in vivo* e *in vitro*, donde se determinó que estos componentes contribuyen a la reducción del estrés oxidativo y aterogénesis (Syed *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Las características ideales que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y elevado rendimiento de análisis.

Método del radical ABTS⁺

Este método se basa en la transferencia de electrones donde se involucra una reacción redox con el oxidante como indicador del punto final de la reacción usando el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico. Este tipo de pruebas miden la capacidad para atrapar radicales libres en lugar de medir la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang *et al.*, 2005).

La técnica para la generación del radical catión $ABTS^+$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^+$ verde-azul a través de la reacción entre $ABTS^+$ y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a $ABTS^+$. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^+$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Wootton-Beard *et al.*, 2011).

Método del radical DPPH

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, solo puede disolverse en medio orgánico, se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. La concentración de DPPH• en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de muestra peso fresco) (Kuskoski *et al.*, 2005).

Método de Folin-Ciocalteu

Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez, 2008).

Método del tricloruro de aluminio

La cuantificación de flavonoides en productos naturales por análisis colorimétrico permite cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiados en las determinaciones de rutina, aunque presenten limitaciones en la sensibilidad y especificidad. Las flavonas y flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el tricloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Los flavonoides, como ya se había mencionado anteriormente y desde el punto de vista estructural, corresponden a un sistema de 3 anillos fusionados en una secuencia de carbonos que presenta un heterociclo central en una estructura $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$, que ha sido discutida ampliamente por su estabilidad y reactividad (Amiá *et al.*, 2003). Estos compuestos suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos, condición que facilita su clasificación y reactividad frente respecto del tricloruro de aluminio donde se genera un complejo estable con un máximo de absorción a 415 nm, que es sensible frente a apigenina, crisina y luteonina, así como en los flavonoles rutina, morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercitina y galangina (Salamanca *et al.*, 2007).

2.2.2. Actividad bactericida

Dentro de las aplicaciones que se han encontrado de los metabolitos secundarios en el granado, se encuentra la actividad microbicida, siendo en específico la evaluación como bactericida e incluso antiviral. En el año 2006, Alanís, llevó a cabo el trabajo titulado “Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum L.* (granado)”, en el cual, se realizó la evaluación de la actividad antibacteriana de 56 extractos metanólicos derivados de 26 plantas medicinales para tratamiento de diarrea y disentería. Una vez evaluada la actividad antibacteriana de los extractos

se realizó un estudio fitoquímico al pericarpio de la granada ya que esta fue la que mejores resultados tuvo en comparación con las otras plantas. Finalmente se hizo un estudio de la relación estructura química y actividad antibacteriana de 14 ácidos fenólicos del fruto. Por otro lado, en el año 2009, Haidari *et al.*, comprobaron que los extractos con alto contenido de polifenoles, obtenidos de la cáscara de granada, inhiben la replicación del virus de la influenza humana A/Hong Kong (H3N2). Para el año 2010, Sabbar, *et al.*, llevaron a cabo el trabajo titulado “Estudios de la actividad antifúngica y antibacteriana de la granada (*Punica granatum L.*)” donde se hizo una descripción de la actividad antifúngica y antibacteriana en extractos de semilla, jugo y cáscara, en el cual, para la evaluación de la actividad antifúngica se usaron cepas de *Aspergillus niger* y para la actividad bactericida se usaron cepas de *Staphylococcus aureus* y. En ese mismo año, López *et al.*, en el año 2010, llevaron a cabo el trabajo titulado “Granada (*Punica granatum L.*): una fuente de antioxidantes de interés actual” realizando una caracterización de la granada y análisis de la cantidad de fenoles en la pulpa del fruto, así como su evaluación para impulsar su producción. Para el año 2011 Taberner, elaboró el trabajo titulado “Aplicación de extractos de granada para el control de podredumbre en poscosecha de frutos cítricos” evaluando el efecto de la aplicación de distintos extractos de cáscara de granada sobre el control de la podredumbre verde y azul en poscosecha de cítricos, inoculando las frutas con los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium Italicum* para posteriormente realizar baños a las frutas inoculadas. Los resultados indicaron una inhibición en el crecimiento de los hongos por lo que los compuestos contenidos en los extractos tenían actividad fungicida.

2.2.2.1 Método para evaluar la actividad bactericida

Una de las técnicas más comunes para la evaluación de la actividad bactericidas es la formación de halos de inhibición sobre una placa solida en donde se encuentra inoculada una bacterias. El método consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores y se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida (Martínez *et al.*, 1997).

Para poder hacer uso de los metabolitos secundarios deben ser extraídos de la matriz vegetal en la que se encuentren y posteriormente ser purificados, de tal manera que no existan compuestos químicos no deseados que puedan interferir con su actividad.

2.2.3. Extracción de metabolitos secundarios

Existen métodos convencionales y no convencionales a nivel laboratorio con los cuales es posible la extracción de metabolitos secundarios en las planta. Los métodos convencionales se caracterizan por; utilizar solventes que interaccionen con los compuestos de interés y puedan ser separados del tejido vegetal, así como por la aplicación de diversas temperaturas. Dentro de los métodos convencionales se encuentran; la extracción Soxhlet, maceración, hidrodestilación y lixiviación; sin embargo, aun que resultan técnicas de bajo costo, los tiempos de extracción son prolongados, los metabolitos son extraídos con una pureza baja y existe degradación térmica de los compuestos termolábiles. Por otro lado, los métodos no convencionales son técnicas novedosas que tienen la finalidad de disminuir la problemática que existe al momento de realizar extracciones convencionales como lo es el tiempo y la pureza; sin embargo, los equipos o reactivos necesarios las convierten en técnicas costosas. Algunas de las técnicas de extracción no convencionales son: asistida por ultrasonido, asistida por enzimas, asistida por microondas, asistida por campos pulso-eléctricos, con fluidos supercríticos y con líquidos a presiones elevadas (Azmir, y otros, 2013).

El método Soxhlet es de las técnicas más usadas a lo largo de la historia en la separación de compuestos activos por su sencillez ya que no requiere un especialista para operarlo y es barato. En el quipo Soxhlet la muestra es colocada en un dedal de celulosa que va dentro de un sifón. El sifón es conectado en la parte inferior a un matraz de fondo plano en el cual se coloca el solvente que servirá de agente acarreador, el solvente es calentado a ebullición de tal manera que pueda ascender en forma de gas por un tubo de vidrio que reconecta el matraz de fondo plano con el sifón para entrar en contacto con el material vegetal. En la parte superior del sifón se coloca un refrigerante que se encarga de condensar el solvente en estado gaseoso; cuando el líquido del solvente entra en contacto con la muestra vegetal se forma una mezcla con los metabolitos secundarios, conforme avanza la extracción el volumen de la mezcla alcanza un nivel de exceso en el sifón y es aspirado, descargándolo en el matraz de fondo plano para continuar con el calentamiento de la mezcla, evaporar el solvente y que entre en contacto nuevamente con el material vegetal; a este proceso se le conocen como lavado o ciclo de extracción en el equipo (Luque & García-Ayuso, 1998). Comparado el método Soxhlet con otras técnicas como; la extracción asistida por ultrasonido, maceración e hidrodestilación, se ha observado que el Soxhlet tiene una mayor eficiencia, ya que, el usar temperaturas elevadas, aunque puede ser perjudiciales para los metabolitos secundarios, favorece su liberación de la matriz vegetal donde están contenidos cuantificándose cantidades significativas en las mezclas resultantes (Muñoz, y otros, 2015). En la granada se han llevado a cabo extracción de metabolitos secundarios como los polifenoles contenidos en el aceite de las semillas del fruto por el método Soxhlet, maceración con agitación, extracción asistida por microondas y asistida por ultrasonido con solventes orgánicos, así como extracción usando CO₂ como fluido supercrítico. Los resultados de la comparativa fueron una concentración de polifenoles en el aceite de 8.4 mg/g para la maceración con agitación, 8.1 mg/g en la extracción asistida por ultrasonido, 8 mg/g y 8.5 mg/g con la extracción asistida por microondas a dos diferentes voltajes (200 W y 800 W) y 8.9 mg/g en la extracción por método Soxhlet. En cuanto a las extracciones con fluidos supercríticos se tuvo una concentración máxima de 72.1 mg/g de compuestos polifenólicos, por lo que, de contar con los equipos y los solventes necesarios la extracción con fluidos supercríticos resulta

conveniente para polifenoles en semilla de granada, pero de no contar con ellos, la extracción Soxhlet es una opción viable (Abbasi, Razael, Emamdjomeh, & Ebrahimzadeh, 2008).

La lixiviación o decocción es un método en el cual se utiliza agua como solvente que entra en contacto con el material vegetal para remover metabolitos secundarios de carácter polar como los polifenoles. Es un método de extracción que a diferencia de los demás no convencionales, involucran tiempos de extracción moderados. Dentro de las extracciones de metabolitos secundarios por el método de lixiviación, se han reportado la presencia de polifenoles glicosilados del tipo flavonoide, así como ausencia de compuestos alcaloides o terpénicos, siendo un método que sirva para extracción de polifenoles (Zhang, Lin, & Ye, 2018). En la cáscara de la granada se han realizado trabajos de extracción de metabolitos por este método, donde se evalúa la actividad como antimicrobiano, encontrando que es posible la extracción de polifenoles como los taninos de la cáscara teniendo un efecto positivo en la inhibición de bacterias como: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* (Oliveira, y otros, 2014). Por otro lado, la hidrodestilación es una técnica que de igual manera utiliza como solvente agua pero en estado gaseoso, por lo que la muestra vegetal solo entra en contacto con el vapor de agua saturado para extraer los metabolitos secundarios; que en este caso serán extraídos en forma de aceite esencial. Una vez generada la mezcla de vapor de agua con el aceite esencial, la mezcla es condenada a lo largo de un refrigerante que conecta a una separados, donde, ocurre una separación automática del agua y el aceite esencial por su diferencia de polaridades. Dentro de las limitaciones de la técnica se encuentran que: los tiempos de extracción son prolongados, la temperatura es elevada ya que se trabaja con vapor de agua lo que puede afectar significativamente la actividad de los metabolitos secundarios, los rendimientos de aceite esencia son bajos en comparación con las cantidades de material vegetal que se necesitan para el proceso (Azmir, y otros, 2013)

2.3. Justificación

El cultivo de la granda a nivel mundial es liderado por India, con una superficie de 100 mil hectáreas destinadas para la práctica. España es el país líder en producción en la Unión Europea con una superficie de 2,325 hectáreas y una producción de 27,389 toneladas. En América el país con mayor producción es Estados Unidos, seguido de Chile y ocupando el tercer lugar Perú y México (López *et al.*, 2010). En México, la superficie destinada a los plantios de granado es minima y su consumo no es compun en comparación con otros frutos. En el año 2013, la produccion de granada fue de alrededor de 4400 toneladas obtenidas de 630 hectareas aproximadamente, siendo los estados de Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato los principales productores, los cuales aportaron el 77% de la produccion nacional. Para el año 2014 se tuvo una producción de 4,773.98 toneladas, lo que sirnificó un incremento del 8.5%. Para el año 2017, se regritó una producción de 6,816.22 toneladas incrementándose la producción un 43%; liderando ahora el ranking de principales productores los estados de Morelos, Oaxaca e Hidalgo. Michoacán no figura dentro de los primeros lugares en producción de granada, pero si es un fruto

que se genera en la entidad; por lo que conocer más información sobre la granada y su cultivo puede aumentar la producción anual como ha ocurrido en otros estado (SAGARPA, 2017).

La importancia actual de la granada consiste, particularmente, en las propiedades que se han reportado a lo largo de los años por su consumo, debido a la presencia de compuestos antioxidantes en el tallo, hoja, flores, cáscara, jugo y semilla. Estos compuestos son los polifenoles como: flavonoides y taninos, los cuales son los antioxidantes más abundantes (Vidal *et al.*, 2003). Estudios realizados en el año 2002 demostraron la eficiencia de la actividad antioxidante de la granada sobre radicales peróxido y en la oxidación de lipoproteínas humanas de baja densidad. Estas pruebas fueron realizadas de forma *in vitro* con extractos purificados usando como solvente: metanol, agua y acetato de etilo a partir de semilla y cáscara, por maceración (Singh *et al.*, 2002). Al ser antioxidantes protegen las células de la oxidación retardando el proceso de envejecimiento o evitando el desarrollo de alguna enfermedad degenerativa.

Los compuestos polifenólicos que posee la granada pueden ser extraídos y aprovechados a través de los aceites esenciales o generando extractos líquidos en los que existen los polifenoles en mezcla con el solventes que haya servido como agente acarreador del compuesto. En el caso de los aceites esenciales, la cantidad de polifenoles es mínima, ya que en su composición química los terpenos son los compuestos mayoritarios. Por otro lado, en los extractos líquidos, es posible extraer una mayor cantidad de polifenoles ya que el solvente que se utiliza propicia una extracción selectiva de compuestos, de tal manera que, al utilizar solventes polares se extraerán los compuestos con polaridad química similar, como los polifenoles, y no se extraerán otros metabolitos secundarios como los terpenos ya que la naturaleza química de los terpenos es apolar. Para el método de extracción de los polifenoles el método Soxhlet resulta conveniente al igual que la extracción por lixiviación ya que con el primero, se han observado extracciones significativas de polifenoles en la granada a la vez que resulta una técnica de bajo costo que puede ser fácilmente reproducible. En cuanto al segundo método de extracciones, el utilizar como solvente agua, facilita la extracción de compuesto polares del material vegetal, así como resulta sencillo y los tiempos empleados en las extracciones son cortos.

Con base en los metabolitos identificados en otras variedades de granada de otros países, los beneficios que brinda su consumo, el crecimiento en su producción a nivel nacional, la falta de exploración en la actividad de metabolitos secundarios en las variedades mexicanas de los principales productores y sobre todo, el que no se le da una utilidad a la cáscara de granada a nivel biotecnológico genera la oportunidad de trabajar con esta fracción vegetal de la planta para realizar propuestas de aplicación de los metabolitos identificados y dar un valor agregado al fruto.

2.4. Hipótesis

La cáscara del fruto de *Punica granatum* contiene elevadas cantidades de polifenoles presentando actividad como antioxidante y bactericida.

2.5. Objetivos

2.5.1. Objetivo general

Realizar la extracción de compuestos polifenólicos presentes en la cáscara de granada y realizar pruebas de laboratorio para evaluar su aprovechamiento.

2.8.2. Objetivos específicos

- ∞ Caracterizar en cuanto a parámetros físicos y químicos el estado de maduración de los lotes de granada.
- ∞ Aplicar un diseño experimental de superficie de respuesta de extracción de aceite esencial usando dos solventes (Solvente 1: acetona y Solvente 2: etanol) con método Soxhlet y otro diseño para extracción por lixiviación.
- ∞ Evaluar el efecto bactericida de los extractos obtenidos.
- ∞ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.
- ∞ Determinar la cantidad de fenoles totales en los extractos.
- ∞ Determinar la cantidad de flavonoides en los extractos.
- ∞ Identificar, con el diseño propuesto y los resultados de las determinaciones, cuáles son las condiciones a las cuales hay mayor presencia de compuestos de interés.
- ∞ Establecer el punto óptimo para la extracción de los compuestos de interés indicando con cual método, y con qué solvente resulta conveniente.

Capítulo 3. Materiales y métodos

Para el desarrollo del trabajo se limitó el estudio a tres variedades de granadas debido a que existe una amplia diversidad de granadas en México, así como se realizaron dos muestreos diferentes, de tal manera que las granadas fueron proporcionadas por los mismos productores y recolectores, pero en periodos distintos; cosecha Julio-Agosto 2017 y Julio-Agosto 2018. Las variedades trabajadas fueron: Wonderful y Apaseo fue proporcionada del estado de Guanajuato, en el municipio de Apaseo el Alto y la variedad Tecozautla fue proporcionada por los recolectores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Una vez adquiridas las muestras se llevó a cabo una selección de los frutos clasificándose como aceptables o no aceptables, según el daño que presentaron en su corteza o cáscara para continuar con un lavado y desinfección de los frutos con hipoclorito a una concentración del 5% para continuar con la caracterización fisicoquímica de los frutos seleccionados.

3.1. Caracterización física del fruto

3.1.1. Tamaño

Pesaje de frutos representativos de cada una de las variedades expresando el resultado en gramos. Posteriormente, fueron medidos los diámetros ecuatoriales y longitudinales expresados en centímetros. El diámetro longitudinal fue medido en su totalidad y de forma parcial, donde, el diámetro total incluyó la corona o cáliz del fruto y el diámetro longitudinal parcial no lo incluyó. Finalmente se midió el grosor en la cáscara expresándose en milímetros con ayuda de un Vernier.

3.1.2. Color

Este parámetro fue medido con la ayuda de un colorímetro de la marca ColorFlex para obtener las coordenadas del sistema de color CIE (por las siglas en inglés de la Comisión Internationale

de l'Éclairage), calculándose las coordenadas $L^*a^*b^*$ y representando la luminosidad con la coordenada L^* , tonos de colores del verde para valores negativos con la coordenada a^* y tonos de colores amarillos con valores positivos con la coordenada b^* .

3.1.3. Firmeza

Este parámetro se midió con un texturómetro de la marca TA-XT2i donde se hizo una deformación de 3 mm al fruto, siguiendo el manual interno para determinación de firmeza de guayaba verde y rayada del Laboratorio de Biotecnología de la facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La firmeza es un parámetro importante ya que, a mayor fuerza aplicada al fruto, refleja un menor grado de madurez en comparación con los que la fuerza aplicada es menor (frutos blandos), cuyo proceso de maduración es más avanzado. Los resultados fueron expresados como fuerza aplicada al fruto en Newtons.

3.2. Caracterización química del fruto

El pH se midió con un potenciómetro, los sólidos solubles totales fueron medidos al jugo extraído de cada fruto con un refractómetro ABB expresándose en °Brix, la acidez titulable fue medida al jugo; titulándose con NaOH al (1N) y expresándose los resultados como concentración de ácido cítrico (mg/ml) y siguiendo la norma mexicana (NMX-F-102-S-1978) y el porcentaje de cenizas fue determinado a la cáscara siguiendo la norma NMX-F-066-1978.

3.3. Secado de la cáscara

Para el secado de la cáscara se llevó a cabo un diseño de superficie de respuesta de compuesto central: 2^2 con puntos estrellas estudiando los efectos de 2 factores (temperatura y tiempo) en 11 corridas para analizar y concluir si había un efecto con respecto de la actividad antioxidante como variable de respuesta, ya que los compuestos de interés son sensibles a la exposición a temperaturas elevadas; sin embargo, como se ocupa conservar las muestras de tejido vegetal con este método se podrá concluir la mejor condición de secado sin la afectación de los metabolitos en la cáscara. El diseño experimental solo se aplicó en la variedad Wonderful de la cosecha del periodo Julio-Agosto 2017.

3.4. Extracción de polifenoles

Para la obtención de los extractos líquidos con polifenoles de la cáscara de granada primeramente se realizó la extracción de los metabolitos en la cosecha del periodo Julio-Agosto 2017 mediante método Soxhlet aplicando un diseño de superficie de respuesta de compuesto central: 2^2 con puntos estrellas donde se estudió el efecto de 2 factores, el primer factor fue la concentración de solvente y en la cual se trabajó con dos solventes; el solvente 1 fue acetona (S1) y solvente 2 etanol (S2), para lo cual como límite inferior de la concentración para ambos solventes en el diseño se usó una concentración en la solución con base al porcentaje v/v del solvente en aguade siendo de 70%, como punto central 80%, límite superior 90% y además puntos axiales para encontrar el punto óptimo de extracción usando 66% como punto axial

inferior y de 94% como punto axial superior. Lo que respecta al tiempo de extracción para todas las corridas experimentales se tomó como límite inferior 1 h, punto central de 2 h y límite superior 3; los puntos axiales fueron de 50 min y 3 h con 40 min. El total de corridas experimentales fueron 11 por solvente dando un total de 22 corridas experimentales por variedad. Como variables de respuesta se tomó en cuenta la actividad antioxidante con base a la inhibición del radical ABTS⁺⁺, cantidad de fenoles totales, flavonoides totales y actividad bactericida midiendo los halos de inhibición formados durante el crecimiento de la bacteria grampositiva *S. aureus*.

Para el almacenamiento y eliminación del solvente en los extractos obtenidos se usó un equipo de rotavapor donde, para los extractos con acetona se utilizó una temperatura de 60 °C, con un tiempo de extracción de 20 min a 60 rpm. Para los extractos de etanol se trabajó con una temperatura de 80 °C, con un tiempo de extracción de 20 min y a 60 rpm. Es importante mencionar que todos los extractos fueron trabajados bajo las mismas condiciones ya que de lo contrario esto podría ser un factor de ruido al momento del análisis de los datos.

Una vez que se analizó el efecto de los dos factores considerados en el diseño de superficie de respuesta y se calcularon las condiciones óptimas de extracción tomando como variable de respuesta la actividad antioxidante por el método del radical ABTS⁺, se llevó a cabo la extracción de polifenoles con el método Soxhlet en las variedades del periodo Julio-Agosto 2018 con base a los puntos óptimos calculados de tal manera que se pudiera analizar la reproducibilidad y si era posible lograr las concentraciones estimadas en la optimización del diseño de superficie de respuesta. La extracción de las variedades del periodo Julio-Agosto 2018 se realizó por triplicado. Como variables de respuesta se consideraron la actividad antioxidante con base a la inhibición del radical ABTS⁺⁺ y DPPH, cantidad de fenoles totales y actividad bactericida midiendo los halos de inhibición formados durante el crecimiento de la bacteria grampositiva *S. aureus* y la bacteria gramnegativa *E. coli*.

Para la extracción de compuestos polifenólicos por el método de lixiviación se aplicó un diseño de superficie respuesta de compuesto central: 2² con puntos estrellas para analizar el efecto de los mismo factores considerados en el Soxhlet (tiempo de extracción y temperatura) de tal manera que se pudiera hacer una comparación con los resultados que se obtuvieron con la extracción en el método Soxhlet. Como variables de respuesta se evaluarán las mismas analizadas en la extracción Soxhlet (la inhibición del radical ABTS⁺⁺ y DPPH, cantidad de fenoles totales y actividad bactericida midiendo los halos de inhibición formados durante el crecimiento de la bacteria grampositiva *S. aureus* y la bacteria gramnegativa *E. coli*). El diseño experimental para la lixiviación solo fue aplicado a las variedades del periodo Julio-Agosto 2018.

3.5. Evaluación de la actividad bactericida

La técnica realizó mediante el cultivo de bacterias grampositivas de la especie *S. aureus* y de bacterias gramnegativas de la especie *E. coli* sobre medio Mueller-Hinton en cajas Petri. Para evaluar el efecto de los extractos polifenólicos sobre el crecimiento de ambas bacterias fueron colocados en las cajas Petri 10 μ L de extracto a una concentración de 50 mg/ml sobre discos de papel filtro Whatman de 5 mm, como control positivo se utilizó un volumen de 10 μ L de Eritromicina a una concentración de 300 mg/ml y como control negativo se usó un volumen de 10 μ L de solvente usado en la extracción y 10 μ L de agua. Las cajas fueron incubadas a 37 °C y se observó el crecimiento de la bacteria a las 24 h y a las 48 h (González, 2017).

3.6. Evaluación de la actividad antioxidante

3.6.1. Método del radical ABTS⁺⁺

Se preparó una solución con el radical ABTS⁺⁺ acuoso (7 mM), solución acuosa de persulfato de amonio (2.5 mM) y un stock Trolox (80 μ M/ml), posteriormente se realizó una curva de calibración en μ M de Trolox equivalentes calibrando el espectrofotómetro a 734 nm con etanol. Una vez construida la curva de calibración y con la ecuación de la recta calculada en la regresión lineal de los datos se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺⁺ al estar en contacto con la solución de Trolox y posteriormente se calculó la concentración en equivalentes Trolox. Para la determinación en los extractos polifenólicos se utilizó un volumen de 10 μ L de muestra diluida con 990 μ L de solución ajustada de ABTS⁺⁺ y se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en mM de equivalentes Trolox (González, 2017).

3.6.2. Método del radical DPPH

Se preparó una solución con el radical ABTS⁺⁺ acuoso (7 mM), solución acuosa de persulfato de amonio (2.5 mM) y un stock Trolox (80 μ M/ml), posteriormente se realizó una curva de calibración en μ M de Trolox equivalentes calibrando el espectrofotómetro a 734 nm con etanol. Una vez construida la curva de calibración y con la ecuación de la recta calculada en la regresión lineal de los datos se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺⁺ al estar en contacto

con la solución de Trolox y posteriormente se calculó la concentración en equivalentes Trolox. Para la determinación en los extractos polifenólicos se utilizó un volumen de 10 μL de muestra diluida con 990 μL de solución ajustada de ABTS⁺ y se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en mM de equivalentes Trolox (González, 2017).

3.6.3. Determinación de fenoles totales

Se realizó una curva de calibración con solución estándar de ácido gálico a una concentración de 0.5 mg/ml, reactivo de *Folin-Ciocalteu* (1N) y NaCO_3 (20%). Para la curva de calibración se dejó reaccionar la solución de ácido gálico con el reactivo de *Folin-Ciocalteu* por 15 min a la oscuridad, transcurrido el tiempo, a la mezcla de los dos reactivos se les adiciono el NaCO_3 dejándolo reaccionar por 1 h; las lecturas de la mezcla fueron hechas posteriormente en un espectrofotómetro Perkin Elmer a una longitud de onda de 625 nm. En cuanto a la determinación del contenido de los fenoles totales en los extractos se hicieron diluciones con sus respectivos solventes, ya que las lecturas en el espectrofotómetro salieron de la curva de calibración; una vez hecho esto, se hicieron las lecturas y realizaron los cálculos correspondientes, expresándose los resultados en equivalentes de ácido gálico en mg/ml para las variedades del 2017 y en mg/g de extracto seco para las variedades del 2018 debido a que en las variedades del 2017 solo se evaluo el efecto de las condiciones de operación sobre las variables de respuesta sin poder estandarizar los extractos a peso seco. Para las variedades 2018, como ya se tenía el efecto de los factores y se calcularon los puntos óptimos, fue posible la estandarización de los extractos en base a su peso seco. En la expresión de ambos resultados se utilizan la abreviatura EAG (equivalentes de ácido gálico).

3.6.4. Determinación de flavonoides totales

Una vez realizada la curva de calibración con una solución estándar de quercitina a concentración de 0.27 mg/ml y utilizando AlCl_3 al 10% (tiempo de reacción 10 min) y acetato de sodio al 10 % (tiempo de reacción 10 min), se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer a una longitud de onda de 475 nm. Para la cuantificación de compuestos en los extractos se hicieron diferentes diluciones con los solventes correspondientes y dichos resultados fueron representados en equivalentes de quercetina en mg/ml utilizándose la siguiente abreviatura EQ mg/ml.

3.7. Análisis estadístico

Como se mencionó anteriormente se trabajaron varios diseños de superficie de respuesta, uno para el secado de la cáscara el cual fue uno de compuesto central: 2^2 con puntos estrellas estudiando los efectos de 2 factores, el primer factor fue la temperatura la cual como límite inferior se estableció de 40 °C, como punto medio 50 °C, como límite superior 60° y como puntos axiales fueron 35.8 °C y 64.1 °C. En cuanto al tiempo de secado se usó como límite inferior 24 h, punto central 48 h, límite superior 72 h y como puntos axiales 14.06 h y 81.9 h. En cuanto al diseño de superficie de respuesta para la extracción por método Soxhlet el diseño fue de compuesto central: 2^2 con puntos estrellas estudiando los efectos de 2 factores, el primer factor fue la concentración de solvente en la cual se trabajó con dos solventes siendo el solvente 1 acetona y solvente 2 etanol estableciendo como límite inferior de la concentración para ambos solventes 70%, como límite medio 80%, límite superior 90% y además puntos axiales para encontrar el punto óptimo de extracción usando 66% y otro de 94%, todas las mezclas fueron con agua. Lo que respecta al tiempo de extracción para todas las corridas experimentales se tomó como límite inferior 1 h, punto central de 2 h y límite superior 3 h, los puntos axiales fueron de 50 min y 3 h con 40 min. En cada uno de los diseños se trabajó con 11 corridas experimentales; sin embargo, para el de extracción fueron 11 corridas por solvente por lo que se tuvieron 22 corridas experimentales por variedad. Como se mencionó anteriormente, una vez calculados los puntos óptimos para la extracción Soxhlet en las variedades 2017 se realizaron las extracciones de las variedades 2018 bajo las condiciones óptimas por triplicado para cada una de las variedades y los dos solventes involucrados.

En la extracción por método de lixiviación se aplicó un diseño de superficie respuesta de compuesto central: 2^2 con puntos estrellas para analizar el efecto de los mismo factores considerados en el Soxhlet (tiempo de extracción y temperatura).

Con los resultados de las variables de respuesta para cada uno de los diseños se realizaron análisis de varianza y comparación de medias para la actividad bactericida y antioxidante, así como para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides, utilizando como valor de significancia de 0.005 y utilizando como prueba Post hoc la prueba de Tukey HSD, de tal manera que se pudiera concluir cual era la mejor condición de trabajo. Para el análisis de datos de la caracterización del fruto se hicieron de igual manera análisis de varianza y comparación de medias para saber si el hecho de tratarse de diferentes variedades estadísticamente eran diferentes o no y poder inferir en cómo estas características podrían o no estar relacionadas con

el análisis de los compuestos de interés. Los softwares utilizados para el diseño de superficie de respuesta fue StatgraphicsCenturion VXI y JMP.

Capítulo 4. Resultados y discusión

Las tres variedades analizadas en el trabajo fueron muestreadas en dos temporadas diferentes, periodo Julio-Agosto 2017 y 2018. Las variedades fueron obtenidas de los mismo productores y recolectores como se señaló anteriormente de tal manera que los variedades del año 2017 fueron útiles para la estimación de puntos óptimos operaciones para la extracción de compuestos polifenólicos en las cáscaras de la granada. Las variedades del año 2018 sirvieron para evaluar y corroborar las estimaciones de los puntos óptimos calculados, así como para la aplicación de un diseño de respuesta para extracción de polifenoles por el método de lixiviación permitiendo hacer una comparativa entre métodos de obtención de metabolitos secundarios. En cuanto a la caracterización fisicoquímica de los frutos utilizados se llevó a cabo la misma metodología a manera que poder comparar si había variaciones significativas entre cosechas.

4.1. Caracterización fisicoquímica del fruto

4.1.1. Parámetros físicos

Tamaño

Para una mayor comprensión de los resultados, se hace un concentrados de los parámetros medidos en las variedades cosechadas en el 2017 y 2018, donde en Con base a los resultados obtenidos se puede observar que hay una clara diferencia entre los lotes analizados, por lo que se puede esperar que haya una diferencia significativa en las determinaciones futuras. Los resultados fueron los siguientes (Tabla 1, 2 y 3):

Tabla 1. Peso de diferentes variedades mexicanas de granada (*Punica granatum*)

Variedad	Peso (g)	
	Cosecha 2017	Cosecha 2018
L1 (Wonderful)	405.36 ± 34.1 a	294.18 ± 55.40 a
L2 (Apaseo)	460.85 ± 50.49 a	317.99 ± 63.54 a
L3 (Tecoautla)	95.99 ± 5.17 b	286.01 ± 29.34 a

n=12, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Tabla 2. Grosor de cáscara de diferentes variedades mexicanas de granada (*Punica granatum*)

Variedad	Grosor (mm)			
	Cosecha 2017		Cosecha 2018	
L1 (Wonderful)	3.2 ± 0.3	b	2.01 ± 0.96	ab
L2 (Apaseo)	3.2 ± 0.2	b	1.77 ± 0.41	b
L3 (Tecozautila)	4.7 ± 0.3	a	2.71 ± 0.76	a

n=12, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Tabla 3. Fisiología del fruto de granada mexicana (*Punica granatum*)

Variedad	Diámetro ecuatorial (cm)		Diámetro longitudinal parcial (cm)		Diámetro longitudinal total (cm)							
	Cosecha 2017	Cosecha 2018	Cosecha 2017	Cosecha 2018	Cosecha 2017	Cosecha 2018						
L1 (Wonderful)	9.01 ± 0.2	a	8.31 ± 0.58	a	8.55 ± 0.16	a	7.63 ± 0.53	a	10.28 ± 0.48	a	8.7 ± 0.68	a
L2 (Apaseo)	9.51 ± 0.48	a	8.61 ± 0.59	a	8.53 ± 0.33	a	7.56 ± 0.56	a	10.53 ± 0.91	a	8.92 ± 0.67	a
L3 (Tecozautila)	7.95 ± 0.43	b	8.3 ± 0.43	a	6.91 ± 0.43	b	7.53 ± 0.43	a	8.77 ± 0.17	b	8.62 ± 0.45	a

n=12, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Como se puede observar las variedades del año 2017 Wonderful y Apaseo son diferentes con respecto a la variedad Tecozautila, al ser obtenidas de proveedores distintos, pero lo que hay que destacar es que, como lo que interesa es la cáscara de granada, se deben de trabajar con las variedades con dimensiones mayores para poder tener buenos rendimientos al obtener la materia prima (polvo de cáscara). Por otro lado, en cuanto al grosor de la cáscara se puede notar que la variedad Tecozautila es la que tiene el valor mayor resultando favorable para tener una mayor cantidad de muestra a trabajar; sin embargo, se pudo observar que el secado tomó más tiempo debido a que había una mayor área por la cual tenía que transferirse el agua, al igual que sí la cáscara contenía mesocarpio de los gajos estos podrían actuar como reservas de humedad reduciendo la pérdida de agua, por lo que se deben de retirar (Mercado *et al.*, 2011). La variedad Wonderful y Apaseo tuvieron un secado correcto estableciendo que lo recomendable es trabajar con grosor de cáscara aproximadas a ellas.

En cuanto los parámetros de las variedades 2018 se pudo realizar una mejor caracterización en su totalidad al fruto ya que se trabajaron con alrededor de 40 kg de fruto por lote y se analizaron un total de 10 ejemplares numerados y escogidos al azar para poder estandarizar las condiciones a las cuales se trabajarían las granadas. Lo que se pudo observar es que los lotes de la cosecha 2018 tienen menores dimensiones, lo que generó pesos menores del polvo de cáscara obtenido para la extracción de los polifenoles, la variedad Wonderful tuvo una disminución, al menos del peso total del fruto, del 27.43% y la variedad de Apaseo tuvo una disminución del 31%, por otro lado, la variedad de Tecozautila tuvo un aumento en sus dimensiones, ya que tan solo en el peso total del fruto se tuvo un incremento del 197.96 % lo que género que todos los atributos medidos tuvieran un incremento significativo. Estos cambios morfológicos en los lotes analizados, y en base a lo trabajado en la primera etapa del proyecto, permitió una estandarización más próxima entre las variedades, ya que como se puede observar, las granadas analizadas son estadísticamente similares entre ellas lo cual no genera una fuente importante de variabilidad al momento de hacer la extracción y caracterización de los polifenoles contenidos en las cáscaras,

lo cual, en caso de variabilidad se debería al tipo de composición fitoquímica que contenga el fruto solamente. Comparadas las observaciones anteriores tanto de la cosecha 2017 como de la 2018 con el trabajo realizado por **Zarei et al** en el año **2011** donde se monitorearon los cambios físicos que tiene el fruto de la granada durante su proceso de maduración una vez logrado el “set fruit” o el amarre del fruto se puede establecer que los frutos de la variedad Wonderful y Apaseo de la cosecha 2017 tienen una maduración mayor a los 140 días (4 meses y medio) después del amarre del fruto, sin embargo la variedad de Tecozautla tiene una maduración aproximada de 30 días razón por la cual esa variedad fue la más pequeña. Para los atributos de la cosecha 2018 se observó un desarrollo uniforme en las tres variedades, así como un tiempo similar de maduración, teniendo un desarrollo de 140 días después del amarre del fruto. Algo que es importante remarcar es el hecho de que el único parámetro en el que son estadísticamente diferentes las variedades es en el grosor de la cáscara, ya que la variedad de Tecozautla es la que tiene el mayor grosor siendo similar a lo observado en la cosecha 2017 donde esta misma variedad tuvo un grosor de 4.7 mm lo que reafirma que este atributo es característico de la variedad permitiendo tener una mayor cantidad de material vegetal de donde se pueden extraer polifenoles, esta disminución del grosor entre cosechas de la variedad Tecozautla puede ser explicado debido al poco desarrollo que tuvo el fruto impidiendo una correcta absorción de agua que permitiera aumentar el volumen de las semillas contenidas y que a su vez, avanzado el tiempo de maduración, ocurriera una mayor hidrólisis del almidón en la cáscara para que esta fuera adelgazada. Lo que respecta a las variedades Wonderful y Apaseo son parcialmente diferentes lo cual si bien fue diferente a la cosecha 2017 cuyo comportamiento fue similar, no hubo ninguna dificultad al momento del secado de las cáscaras ya que este adelgazamiento en la cosecha 2018 permitió una correcta transferencia del agua contenida en el material vegetal al ambiente de secado y se observó que el secado fue completamente uniforme en todas las muestras.

Para poder identificar con qué tipo de fruto se está trabajando (maduro o inmaduro) y que resultados se esperan obtener, en la siguiente tabla (TABLA 4) se muestra un recopilado sobre el peso de algunas variedades de granada cultivadas en Irán, así como el grosor de su cáscara permitiendo observar si a partir de la materia utilizada en este trabajo se puede tener un mayor rendimiento de los compuestos de interés al momento de extraerlos.

Tabla 4.- Caracterización fisiológica de cultivares de granada (*Punica granatum L.*) de Irán (Tomada y modificada de Akbarpouret. al., 2009)

Cultivar.	Peso del fruto (g).	Grosor de la cáscara (cm).	Cultivar.	Peso del fruto (g).	Grosor de la cáscara (cm).
Rabbab.	441.25	0.6	Tabrizi.	422.50	0.26
Malas-e-Yazd.	369.25	0.4	Syah-e-Saveh.	140	0.16
Malas-e-Saveh.	203.75	0.19	Syah-e-Badrood.	195.00	0.23
Shishe-Kap.	348.75	0.25	Lamsari-e-Behshahr.	103.38	0.17
Khazar-e-Bardaskan.	505.00	0.21	Alak.	168.50	0.26
Naderi.	281.25	0.29	Abdandan.	328.75	0.21

Si bien en estos datos obtenidos en cultivares de Irán se observa una gran diferencia entre cada uno de ellos y los parámetros medido, se puede notar que los lotes Wonderul y Apaseo de las variedades 2017 son frutos de considerables tamaños, ya que están por arriba de los pesos de la mayoría de los cultivares. Lo que respecta a la variedad Tecozautla del 2017, si bien no son frutos de grandes tamaños, se encuentran cercanos a los cultivares con los pesos menores, por lo que resulta interesante una vez hecha la extracción de los compuestos fitoquímicos comparar si, con base a la actividad antioxidante, pueden tener una mayor cantidad de compuestos químicos de interés en cantidades de tejido vegetal menores a las reportadas ya que en la tabla 5 se evaluó la actividad antioxidante. Por otro lado, el grosor de la cáscara de las variedades en ambas cosechas se encuentra dentro de las reportadas.

Color

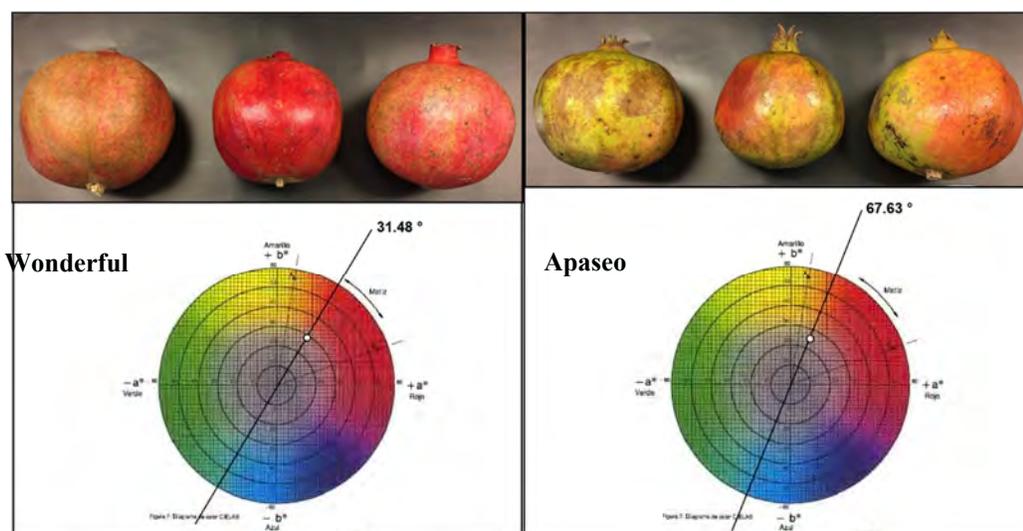
Es importante mencionar que la determinación de las variables L^* , a^* y b^* fueron hechas por triplicado en los sectores con tonalidades marcadas de las zonas ecuatoriales en el fruto, de tal manera que se pudiera tener un promedio de la tonalidad que presentaba. Los resultados se muestran en la **tabla 5**:

Tabla 5. Determinación de color en cáscaras de granada (*Punica granatum*)

Variedad	Tono croma (C^*)		Ángulo Hue (h°)	
	Cosecha 2017	Cosecha 2018	Cosecha 2017	Cosecha 2018
L1 (Wonderful)	29.11 ± 3.45 a	26.93 ± 4.03 a	31.48 ± 8.7 b	26.11 ± 10.54 c
L2 (Apaseo)	26.44 ± 1.89 b	28.25 ± 2.06 a	67.63 ± 10.22 a	76.62 ± 16.32 a
L3 (Tecozautla)	34.51 ± 2.35 a	29.05 ± 1.25 a	24.02 ± 5.9 b	59.6 ± 7.5 b

n=12, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

A continuación, se muestran los frutos analizados de cada lote y en que parte del croma aparece cada lote analizado.



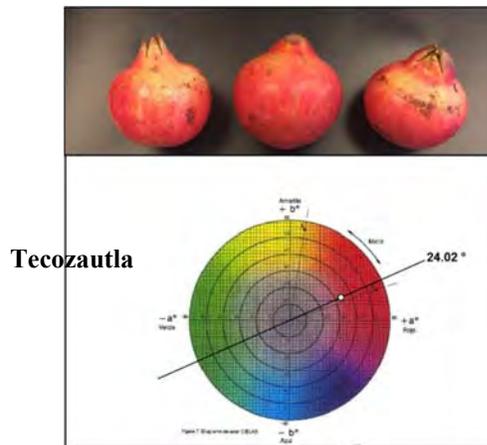


Figura 1.- Determinación de color a las variedades de granada analizados. n=12.

Se puede apreciar que hay diferencias importantes entre cada variedad por lo que resultaría conveniente hacer una caracterización sobre qué compuestos están presentes en cada una y si hay una correlación con los datos que se obtengan de la actividad antioxidante y bactericida, dichas variaciones se pueden deber a la presencia de antocianinas tomándose como estándar de referencia, ya que al ser compuestos inestables y susceptibles a degradación al someterse a ciertas temperaturas o a prolongados almacenamientos se generan pigmentaciones marrones (Turfan *et al.*, 2011); así como según la acilación o glicosilación que tengan, el pH del fruto, la presencia de ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno e incluso la luz. Con este parámetro se logró estandarizar cada variedad y será útil para trabajo con futuros lotes.

En las variedades del 2018 se puede observar que los tres tipos de granada son similares en cuanto a la saturación de color, sin embargo, son muy diferentes entre ellas lo cual tendrá importancia en la cantidad de polifenoles extraíbles en el trabajo, esto no quiere decir que se pueda definir que tonalidad tendrá una mayor cantidad de polifenoles, más bien representará un parámetro importante para poder distinguir cuál de estos colores y variedades puede tener mezclas más complejas de ellos. Los colores a los que corresponden en esta ocasión las variedades son las tonalidades rojizas para Wonderful, Verdes para Apaseo y amarillos-rojizos para Tecozautla, este comportamiento fue diferente a lo observado en la cosecha 2017 ya que al menos la variedad Tecozautla tuvo tonalidades similares a la Wonderful (rojizos). El color como parámetro experimental, como se mencionó anteriormente, es importante para el control de calidad de frutos y sobre todo como un parámetro de estado de maduración del fruto ya que al tratarse de frutos que adquieren tonalidades rojizas dependiendo del desarrollo de su maduración y exposición al sol es fácil para los productores saber cuándo es necesario realizar el corte de los frutos. Lo anterior es sostenido con lo observado en la morfología de la cosecha anterior y sus colores (2017) ya que en aquella ocasión la variedad Wonderful tuvo un color rojizo ubicado en el cromatograma a 31.48°, lo cual fue mayor a lo observado en esta ocasión indicando mayor estado de maduración del fruto, esta misma observación se corrobora con el periodo aproximado de maduración al cual fue retirado el fruto del árbol siendo mayor en el año 2017. Para la variedad Apaseo ocurrió algo similar ya que en el año 2017 se tuvo una ubicación en el cromatograma de 67.63° el cual fue más próximo a las tonalidades amarillas-rojizas indicando una maduración importante, sin embargo, en el año 2018 la coloración fue predominante en la tonalidad de los verdes lo cual indica que tuvo un periodo menor de maduración. Finalmente lo observado en la variedad de Tecozautla fue completamente distinto, como se mencionó en el

apartado del tamaño, se pudo notar que la maduración en el fruto en el árbol fue alrededor de 30 días, pero en esa ocasión se mostraron colores rojizos y en el año 2018 se tienen coloraciones amarillas-rojizas, esta variación se puede deber al estrés al que estuvo sometido el fruto durante su desarrollo independientemente del tiempo de maduración, ya que estas tonalidades sí aparecen de manera prematura a los tamaños que se debe de conseguir se pueden deber a una excesiva exposición del fruto a los rayos del sol principalmente. Para la cosecha del 2018 se tuvo un mayor cuidado con la adquisición de las variedades.

Firmeza

Este parámetro fue medido con la finalidad que en conjunto con el color se pueda hacer una estandarización de las muestras a trabajar y que estén dentro de esta firmeza o cercana de tal manera que no haya la menor variación y se pueden utilizar estas medidas, ya que al compararse con otra caracterización de granada de la variedad Mollar de Elche los resultados fueron cercanos a pesar de que estas granadas estuvieron sometidas a tratamientos diferentes en el almacenamiento.

Tabla 6. Comparativa entre firmezas analizadas en granadas cosechadas en el año 2017 y 2018.

Variedad	Firmeza (N)			
	Cosecha 2017		Cosecha 2018	
L1 (Wonderful)	47.91 ± 3.83	b	34.61 ± 9.07	b
L2 (Apaseo)	65.06 ± 65	a	61.94 ± 13.83	a
L3 (Tecoautla)	39.45 ± 11.35	b	43.22 ± 7.7	b

n=3 para cosecha 2017 y n=10 para cosecha 2018, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Tabla 7.- Determinación de la firmeza en granadas de la variedad Mollar Elche sometida a diferentes tratamientos durante el almacenamiento.

Variedad.	Tratamiento.					
	12 semanas a 5°C y 95% de humedad relativa + 8 días a 20 °C			21 semanas a 5°C y 95% de humedad relativa + 8 días a 20 °C		
	Aire.	5/10	20/15	Aire	5/10	20/15
Mollar de Elche	42.5	37.5	42.9	48.43	43.7	48.7

Se puede observar que hay una disminución al hacer comparativos entre VTM y VTI por lo que se establece que las frutas maduras tendrán que estar en un rango de los 40 N a los 50 N dependiendo de la variedad, dicha variación y pérdida de la firmeza se debe al proceso de

modificaciones en la estructura de la pared celular tanto químicas como enzimáticas (Brummellet *al.*, 2004).

En general el ablandamiento del fruto es un proceso de modificaciones en la estructura de la pared celular donde se presenta despolimerización de glicanos y solubilización de pectina, y donde intervienen enzimas como poligalacturonasa (PG), pectinmetilesterasa (PME), endo-1,4- β -glucanasa, α -arabinosidasa y β -galactosidasa entre otras. La actividad de estas enzimas durante la maduración está relacionada con un cambio en los polisacáridos de la pared celular; el tiempo y momento de actividad varía entre las enzimas (Brummell et al., 2004). Del mismo modo, se ha observado que la acción de la pectinmetilesterasa cataliza la deesterificación del grupo carboxilo del ácidopoligalacturónico e incrementa la susceptibilidad de las pectinas a la poligalacturonasa (Zarra, 1996).

Como se puede observar el comportamiento de la firmeza fue similar a lo observado en el año 2017 ya que la variedad Apaseo fue la que tuvo la mayor resistencia a la deformación y las variedades Wonderful y Tecozautla fueron similares, todo esto debido a la complejidad estructural de la corteza del fruto y al estado de maduración, incluso las mediciones entre las diferentes cosechas son próximas, lo cual sería un parámetro que se puede ir estableciendo para trabajos posteriores ya que esta firmeza sería característica dependiendo de la variedad trabajada. Al compararse los resultados con los reportados y consultado en el año 2017 de la variedad Mueller Elcher, la firmeza oscila entre los 40 N y 50 N de dicha variedad por lo que la variedad Tecozautla puede ser trabajada bajo este parámetro, sin embargo para la variedad Wonderful se puede trabajar en un rango más amplio siendo de 35 N a 50 N debido a que esta variedad se encuentra de manera abundante en el país y finalmente para la variedad Apaseo se puede establecer una firmeza de los 60 N a los 70 N. Para validar lo dicho anteriormente se presenta la siguiente tabla de ANOVA en donde se comparan las firmezas calculadas a las variedades de ambas cosechas de tal manera que se vea si hubo o no similitud entre ellas y así establecer los rangos.

Es importante señalar que lo anterior se establece en base a lo observado durante el desarrollo del trabajo y en específico a estas tres variedades ya que México cuenta con una amplia gama de variedades de granada haciendo difícil establecer un parámetro general al trabajarse con tan solo 3 variedades.

4.1.2. Parámetros químicos

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 8.- Caracterización fisicoquímica a cuatro variedades del fruto de granada (*Punica granatum*).

Variedad	pH	Sólidos solubles totales (°Brix)	Ácido cítrico (mg/ml)
L1 (Wonderful)	1.17 ± 0.23 b	16.84 ± 0.14 a	0.19 ± 0.05 a
L2 (Apaseo)	1.37 ± 0.08 b	14.93 ± 0.57 b	0.04 ± 0.002 a
L3 (Tecoautla)	3.37 ± 0.06 a	14.84 ± 0.33 a	0.31 ± 0.05 a

n=12, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Lo que respecta a la acidez iónica la variedad Wonderful y Apaseo, resultan las más ácidas, dicho parámetro importante medirlo ya que en investigaciones semejantes se reporta junto con la actividad antioxidante, observando si hay un efecto sobre la presencia de compuestos de interés, ya que es parámetro relacionado con la madurez. Esta diferencia entre la acidez iónica y sobre todo en las que se ve una disminución del pH se puede deber al aumento de los ácidos orgánicos libres en el fruto (Laguado *et al.*, 1999), lo cual cobra sentido ya que para dar soporte a esta conclusión se midió la acidez titulable y en efecto las variedades que tuvieron un menor pH en el zumo obtenido (variedad Wonderful) fueron aquellos en los que hubo una mayor presencia de ácido cítrico. Por otro lado, cuando hay un aumento en el pH lo que ocurre es que durante el llenado de frutos gran parte de la actividad de acumulación se da por simporte, en donde los iones H^+ desempeñan un papel importante; estos hacen parte de la formación de sustratos como la sacarosa y la glucosa, y hacen que su concentración a nivel vacuolar disminuya durante las últimas fases de la maduración, por lo que el pH se ve ligeramente aumentado (Álvarez *et al.*, 2009).

El comportamiento que se observó en la caracterización química de las granadas tuvo un comportamiento similar a la cosecha 2017, esto en cuanto a que las variedades más ácidas fueron la variedad Wonderful y la variedad Apaseo al igual que el comportamiento de los sólidos solubles totales en donde en la cosecha 2017 la mayor presencia de azúcares fueron en las variedades Wonderful y la Tecoautla, como ocurrió en la cosecha 2018. Comparando en esta ocasión la variedad Apaseo con el trabajo de Mercado *et al* en el año 2011 se puede observar que la presencia de azúcares es menor, ya que se reportan en dicho trabajo un rango que se encuentra de los 14 °Brix a los 16 °Brix, esto se puede deber a que las variedades trabajadas tienen un tiempo de maduración más corto que el tiempo utilizado en la cosecha 2017. En el caso de la concentración de los sólidos solubles totales de las variedades Wonderful y Apaseo, se puede notar que hay un aumento, sin embargo, esto se puede explicar ya que al tratarse de frutos con dimensiones menores los sólidos solubles se encuentran mayormente concentrados. Lo que respecta al pH se puede observar que las variedades se encuentran en un rango de pH de 3 a 4 en la mayoría de las variedades analizadas en estado maduro lo cual se asegura el estado maduro ya que de tratarse de frutos en estado verde el pH sería más ácido.

Para poder hacer una comparativa de las especies mexicanas a trabajar con algunas otras del extranjero, a continuación se presenta la siguiente tabla (Tabla 9) donde se puede observar la similitud de algunas variedades analizadas en el trabajo en comparación con otras reportadas de Turquía.

Tabla 9.- Determinación de pH a diferentes variedades y cultivares de granada. **Igual indicación, quitar punto finales, recuerda que no llevan!!!**

Cultivar.	pH.	Cultivar.	pH.
Rabbab.	3.09	Tabrizi.	3.96
Malas-e-Yazd.	3.33	Syah-e-Saveh.	3.79
Malas-e-Saveh.	3.42	Syah-e-Badrood.	4.00
Shishe-Kap.	3.42	Lamsari-e-Behshahr.	2.75
Khazar-e-Bardaskan.	3.49		
<Naderi.	3.50		
Alak.	3.70		
Abdandan.	4.14		
		Variedad.	pH.
		Endémica del Edo. Zulia en Venezuela	3,54±1,12

Como se puede observar los resultados son parecidos a los reportados permitiendo hacer comparativas futuras.

La presencia de sólidos solubles totales en el jugo del fruto aumenta conforme se desarrolla el fruto, lo cual se comprueba, ya que la variedad Tecozautla fue analizada preliminarmente en estado verde y fue la que tuvo la menor cantidad debido a que en las variedades maduras hay una hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, también hay una desaparición de los taninos y otros productos causantes del sabor astringente por la disminución de la acidez debido a la degradación de los ácidos orgánicos. Por tanto, la variación de los sólidos solubles por la conversión del almidón en azúcares es atribuido a un aumento en la actividad de las enzimas hidrolasas del almidón (Álvarez *et al.*, 2009). En comparación con otros trabajos se observa que las muestras trabajadas están dentro de lo reportado por Mercado *et al.*, en el 2011 donde se habían realizado caracterizaciones a variedades de Apaseo.

Tabla 10.- Determinación de los sólidos solubles totales (SST) en diferentes variedades de granada (Tabla tomada y modificada de Alcaraz *et al.*, 2014, Mercado *et al.*, 2011 y Raga *et al.*, 2015). Quitar puntos finales!!

Región.	Variedad.	°Brix.	Región.	Variedad.	°Brix.
	BA1	17.1		VA1	15.9
	BBE1	17.13	España.	VA11	17.67
	ME12	17.07		VA6	15.34
España.	ME14	17.17	Venezuela	Edo. Zulia	13.3±0.75
	MO5	16.63	México.	Apaseo	14-16
	PTO10	16.9			

En cuanto a la acidez titulable la variedad Wonderful es la fruta con mayor grado de madurez, pero, aunque los datos son muy bajos no resulta alarmante ya que, al hacerse las comparaciones con la caracterización realizada por Mercado *et al.*, en el año 2011 los resultados expresados de la misma manera fueron cercanos a estas. La disminución en la acidez titulable es debido a la

actividad de las deshidrogenasas y a que los ácidos orgánicos son utilizados como **sustratos de la respiración para la síntesis de nuevos componentes** durante la maduración, este descenso coincide con el inicio de la maduración y la acumulación de azúcares. Con este parámetro se clasifica para el fruto como muy dulces, ya que para ser dulces debe tener una concentración de 0.317 g por 100 g hasta 2.725 g por 100 g para los agrios (Mercado *et al.*, 2011). Finalmente, el porcentaje de cenizas en la cáscara de granada no mostró diferencias significativas en la mayoría de las variedades, pero con lo publicado por López *et al.*, en el 2010 se conoce que la cantidad de minerales presente en la parte comestible del fruto es de 0.53 % lo que indica que la cáscara de estas variedades es buena fuente de minerales. Partiendo de la comparación entre el contenido de cenizas de la variedad Wonderful y Apaseo, los cuales tenían características morfológicas parecidas, se puede observar que Apaseo tiene una mayor concentración (este es de menor tamaño con respecto a Wonderful), lo cual se puede explicar ya que las variaciones de los nutrientes en casi todos los frutos se debe a un fenómeno conocido como efecto de dilución por causa del incremento de los elementos constituyentes de la materia vegetal, entonces a medida que el fruto madura y crece, el contenido de minerales decrece, este comportamiento también se observa al hacer a comparativa con la variedad de Tecozautla (Rendile *et al.*, 2004). Como el parámetro de contenido de minerales no resulta significativo para un efecto de la cantidad de compuestos con actividades bactericida o antioxidantes, para futuras cosechas no se llevará a cabo la medición.

4.2. Secado de la cáscara

Para poder conservar el material vegetal en forma de polvo por algunos meses, se llevó a cabo el secado de la cáscara en horno eléctrico; sin embargo, se tenían que encontrar las condiciones óptimas para que los compuestos de interés no fueran afectados y, como la actividad antioxidante es uno de los objetivos de este trabajo de tesis, se tomó como el porcentaje de inhibición del ABTS⁺, para lo cual, en la tabla 12 se muestra la matriz de datos utilizada que fue la siguiente, donde se incluyen los resultados obtenidos en la variable de respuesta.

Tabla 11.- Matriz de datos usados para el secado de la cascara con un diseño de superficie de respuesta

Niveles estudiados en el diseño para el secado.			
Variabes.	Nivel bajo.	Nivel alto.	
Temperatura (°C).	40	60	
Tiempo (Hrs).	24	72	
Matriz experimental.			
No. de corrida.	Temperatura (°C).	Tiempo (Hrs).	Capacidad antioxidante (% de inhibición)
1	50	48	98.58
2	50	48	98.21
3	35.86	48	99.54
4	60	72	98.08
5	40	24	98.49
6	64.14	48	98.67
7	50	81.94	96.66
8	50	14.06	98.03
9	40	72	96.29
10	60	24	98.97
11	50	48	98.08

Para la comprensión, comportamiento y estimación del porcentaje de inhibición del radical de ABTS⁺ se estudiaron los gráficos de superficie de respuesta, así como los de contornos de respuesta, en donde con el primero, se muestra la tendencia de la actividad antioxidante con base a las condiciones trabajadas y el efecto sobre ella. Para el grafico de contornos de respuesta, se muestran la inhibición que se logró durante la experimentación y como se puede lograr el comportamiento a lo largo del exploraciones sobre la línea de contorno a diferentes condiciones operacionales.

El grafico de superficie de respuesta fue el siguiente:

Para corroborar si había un efecto importante de manera directa con los fenoles extraídos de la cáscara de granada en la tabla 13 se muestran los resultados de la cuantificación de los compuestos obteniéndose en cada una de las corridas experimentales en las que hubo inhibición del radical de ABTS⁺.

Tabla 12.- Determinación de fenoles totales en extractos de cáscara de granada.

No. de corrida	Concentración de fenoles totales (mg/ml de ácido gálico)	
1	81.29 ± 0.024	ab
2	81.26 ± 0.008	ab
3	81.34 ± 0.078	ab
4	81.3 ± 0.004	ab
5	81.34 ± 0.007	ab
6	81.25 ± 0.012	ab
7	81.26 ± 0.012	b
8	81.39 ± 0.14	a
9	81.22 ± 0.017	b
10	81.27 ± 0.02	ab
11	81.30 ± 0.081	ab

n=33, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Lo que se puede observar es que el comportamiento es similar con respecto del porcentaje de inhibición corroborando los resultados, al igual que se puede notar que los extractos con mayor contenido de fenoles totales son los obtenidos de extractos cuya cáscara fue secada al menor tiempo (corrida 8) y la que tuvo la menor concentración fueron las de tiempos prolongados de secado (72 h y 81.94 h).

4.4. Extracción de polifenoles por método Soxhlet

Para comenzar con la presentación y discusión de los resultados obtenidos para las extracciones de los polifenoles con el método Soxhlet, se hizo una división; primero se presentan los resultados obtenidos en la inhibición del radical ABTS⁺ como variable de respuesta utilizada para la estimación de los puntos óptimos operaciones en la extracción de los metabolitos ya que al tener como objetivos específicos la valoración de la actividad antioxidante y bactericida, se tuvo que elegir una de ellas. Fue utilizada la actividad antioxidante como la variables de respuesta base para la estimación ya que se llevó a cabo la medición de otros parámetros como el contenido de fenoles y flavonoides totales que, de igual manera sirven para estimar presencia de compuestos químicos con actividad antioxidante, lo que el optimizar la inhibición del radical ABTS⁺ permitió hacer un análisis más completos del método de extracción, así como de los compuestos presentes en los extractos obtenidos. La estimación de los puntos óptimos se trabajó solo con las variedades del periodo Julio-Agosto 2017. Como segunda presentación de los resultados se muestra la inhibición del radical ABTS⁺ validando los puntos óptimos estimados para comprobara la reproducibilidad de ellos. La validación de los puntos óptimos se trabajó con las variedades Julio-Agosto 2018.

La estimación de los puntos óptimos tuvo un total de 11 corridas experimentales como se muestra en la tabla 14 apreciando las diferentes condiciones a las cuales fue sometida la muestra, en ella se puede observar que se midió la actividad antioxidante, así como, para un análisis detallado, se complementó el análisis de los extractos obtenidos con la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales, así como la actividad bactericida.

Tabla 13.- Matriz de datos usada para la generación de gráficos de superficie de respuesta en la extracción de aceite esencial las cuales cambiaban dependiendo del solvente y dellote pero siempre trabajándose bajo los mismos parámetros.

Niveles estudiados en el diseño para extracción por método Soxhlet			
Variables.	Nivel bajo.	Nivel alto.	
Concentración de solvente (%).	70	90	
Tiempo (Hrs).	1	3	
Matriz experimental.			
No. de corrida.	Temperatura (°C).	Tiempo (Hrs).	Variables de respuesta
1	80	2	Actividad bactericida, actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides
2	80	2	
3	80	3.4	
4	94.14	2	
5	70	1	
6	80	0.5	
7	70	3	
8	90	3	
9	80	2	
10	90	1	
11	65.85	2	

4.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante: radical ABTS⁺

Estimación de puntos óptimos operacionales

Se ha reportado que las evaluaciones de actividad antioxidante y cuantificación de fenoles y flavonoides totales tienen una estrecha correlación, como se ha mencionado en la revisión de la bibliografía, por lo que hizo el supuesto de que los gráficos de superficie de respuesta tendrían un comportamiento similar entre los tratamientos, los cuales fueron iguales en cada una de las variedades. Los resultados de la inhibición del radical $ABTS^+$ se presentan en la figura 4, 5 y 6.

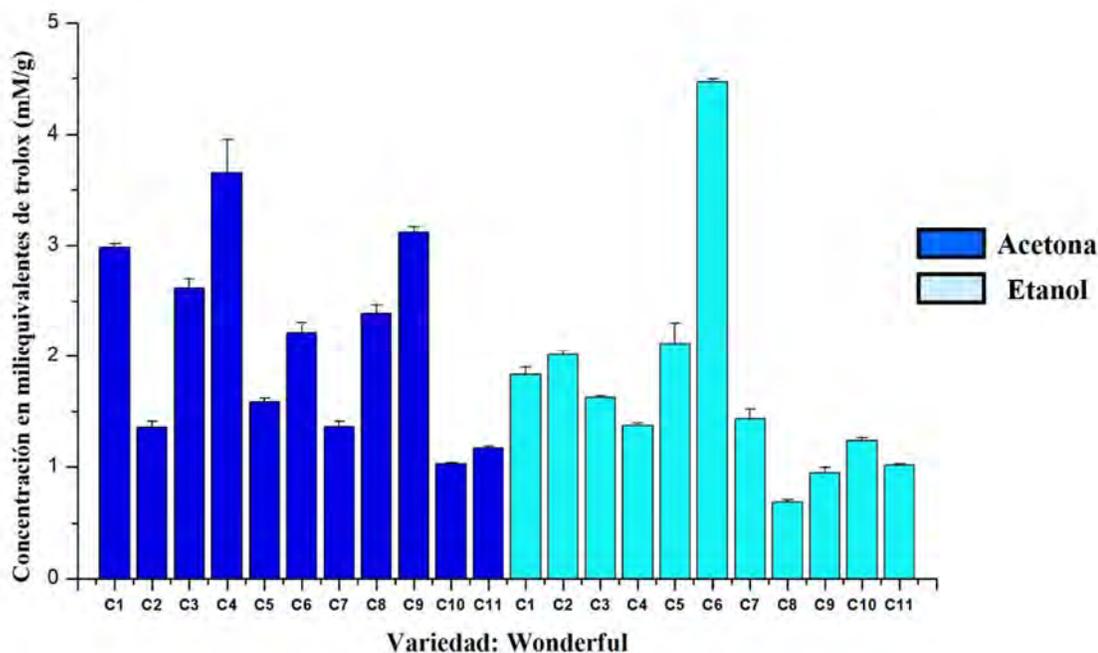


Figura 4. Actividad antioxidante en extractos polifenólicos de cáscara de granada de la variedad Wonderful por método del radical $ABTS^+$

Para la variedad Wonderful se observó que la mayor actividad se tuvo bajo la condición de la corrida experimental 6 usando etanol como solvente, con una concentración en equivalentes de Trolox de 4.47 mM/ml, donde los resultados fueron expresado de esa manera ya que solo se valoró el efecto de los factores sobre la variable de respuesta. No fue posible expresar la concentración sobre gramo de extracto de peso seco ya que la estandarización de la concentración involucraba la eliminación completa del solvente en los extractos a diferentes condiciones, ya que, algunos extractos contenían una mayor presencia del solvente como factor en el diseño y resultaba sencillo la evaporación del solvente, los que tenía una menos concentración del solvente se observó que el punto de ebullición aumentó, por tanto, la medición de la inhibición del radical se midió de manera directa al extracto reflejando el efecto de las condiciones de extracción y no el ocasionado por las diferentes condiciones en la estandarización.

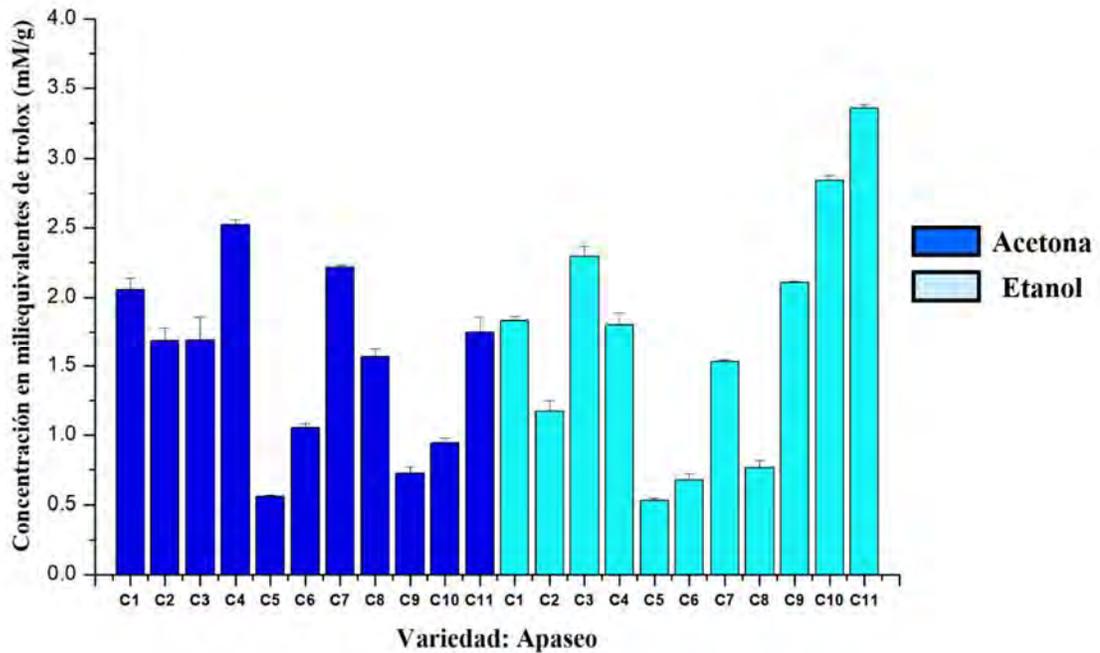


Figura 5. Actividad antioxidante en extractos polifenólicos de cáscara de granada de la variedad Apaseo por método del radical ABTS+

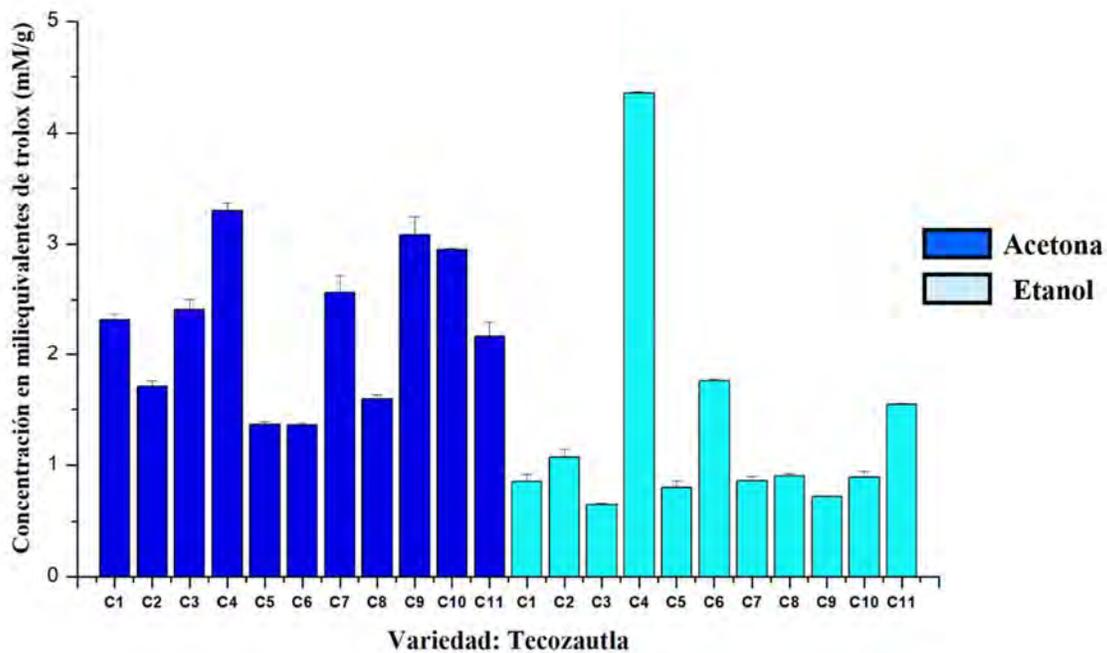


Figura 6. Actividad antioxidante en extractos polifenólicos de cáscara de granada de la variedad Tecozautla por método del radical ABTS+

La variedad Apaseo y Tecozautla mostraron de igual manera una mayor concentración de equivalentes Trolox en los extractos de etanol que en los extractos donde se utilizó acetona. Para

la variedad Apaseo, en la figura 5, se tuvo una concentración de 3.36 mM/ml y una concentración de 3.3 mM/ml.

La diferencia entre las variedades se puede explicar debido a que la variedad Wonderful fue la que presentó un color de la cáscara intenso colocándose en la gama de los tonos rojizos a diferencia de la variedad Apaseo, y si bien la variedad Tecozautla también fue perteneciente a mismas tonalidades que la variedad Wonderful, la granada de Tecozautla tuvo dimensiones más pequeñas. Por otro lado, en la variedad Tecozautla se observaron tonalidades verdes haciéndola diferente a las otras dos variedades, y por tanto, se puede decir que esto tuvo un impacto directo en la presencia de compuestos antioxidantes.

En cuanto al comportamiento de los gráficos de superficie de respuesta se presenta en la figura 7 el comportamiento de la inhibición del radical de $ABTS^+$ de la variedad Apaseo con etanol como solvente ya que fue en la que se observó una cresta en la curva que permitió observar ascenso y descenso de la actividad en la experimentación. El resto de los gráficos de superficie de respuesta se muestran en el apartado de Anexos ya que se generó un gráfico para cada una de las variedades y para cada uno de los solventes utilizados. Es importante mencionar que el comportamiento fue similar en la mayoría de las variedades y que se pudo encontrar el mejor tratamiento de las corridas y puntos óptimos de extracción para cada uno.

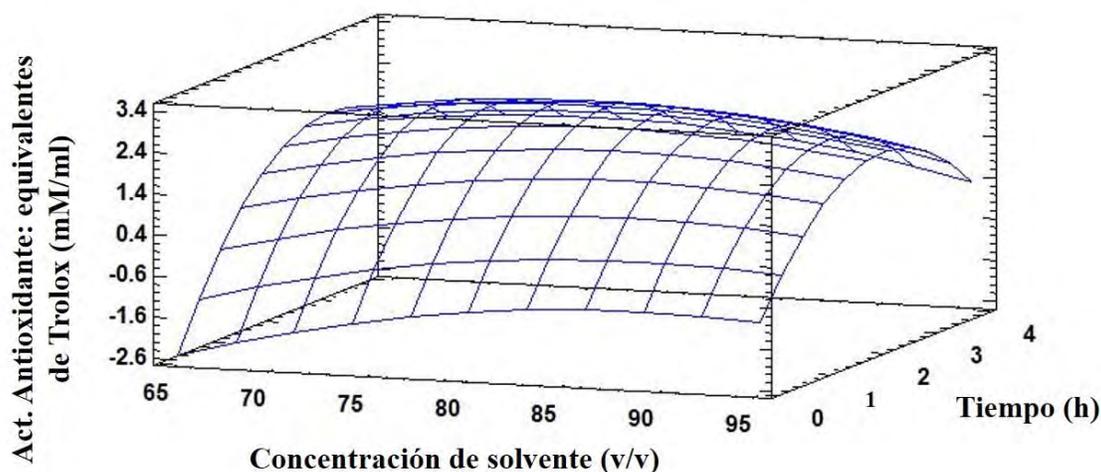


Figura 7.- Curvatura de superficie de respuesta para extracción Soxhlet de cáscara de granada de la variedad Apaseo. Se utilizó etanol como solvente.

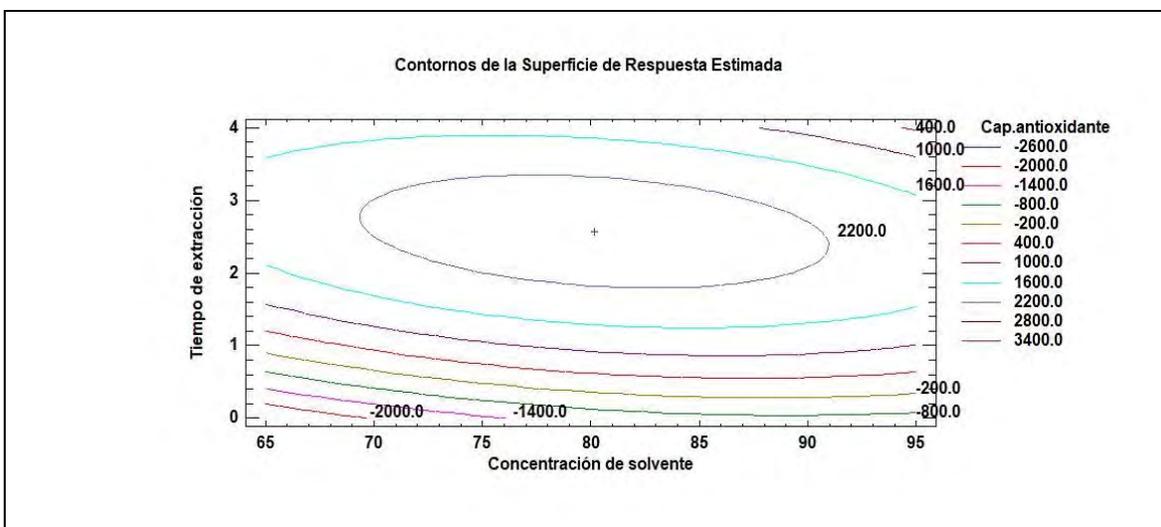


Figura 8.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS⁺ obtenido del lote 2 con etanol como solvente.

En el análisis de ANOVA de la figura 7, donde se trabajó con granada de la variedad Apaseo usando etanol como solvente se pudo encontrar un punto óptimo para la extracción. El análisis de ANOVA indica una r^2 de 64.63 en donde se estima que el punto óptimo operacional para la variedad Apaseo se puede conseguir utilizando una concentración v/v de etanol de 80.3 % en un tiempo de extracción de 2.5 h estimándose una concentración en el extracto de equivalente de Trolox de 2.5 mM/ml; sin embargo, debido a que la varianza explicada es inferior al 75%, la extracción realizada no puede ser ajustada a un modelo matemático del segundo orden; es decir, a la predicción de un resultado bajo una ecuación matemática confiable.

Para la evaluación de los efectos que pueden existir por parte de los factores trabajados se pudo observar con el análisis de ANOVA que, de manera individual, los factores no tuvieron un efecto significativo que afectara la actividad antioxidante ya que el valor de p para la concentración del solvente fue de 0.6561 y para el tiempo de extracción fue de 0.06. Lo mismo ocurrió con la interacción de los factores, al no observarse un efecto significativo ya que los valores de p fueron superiores al valor de significancia establecido el cual fue de 0.05. Para complementar los datos estadísticos estimados se muestra en la figura 9 el diagrama de Pareto de efectos principales, donde es claro que no hay efecto positivo, así como no hay efectos negativos para la extracción de los metabolitos bajo las condiciones trabajadas.

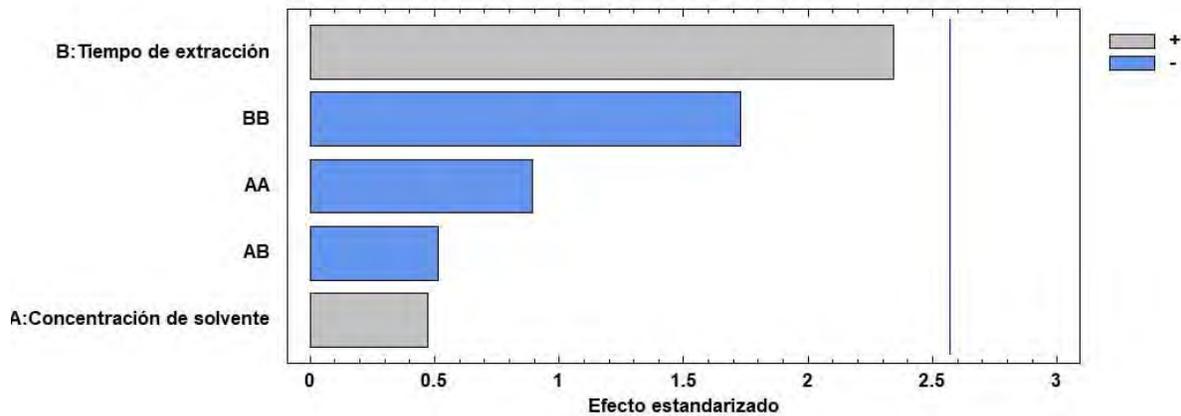


Figura 9. Diagrama de Pareto para la extracción Soxhlet de cáscara de granada de la variedad Apaseo

Es importante señalar que se presentaron los gráficos anteriores ya que fue la condición que se pudo ajustar al cálculo de un punto óptimo operaciones. El resto de las condiciones, así como de variedades trabajadas no mostraron una curvatura en forma de cresta en los gráficos de superficie de respuesta, reflejaron un ascenso en las respuesta, lo que quiere decir que es posible continuar con la exploración de aumentando los intervalos en los factores evaluados lo que se puede atribuir a que al contener las variedades Wonderful y Tecozautla un mayor grado de coloración que está relacionado con la concentración de compuestos polifenólicos, durante la extracción, no fueron degradados significativamente los compuestos fitoquímicos pudiendo continuar con la extracción, por lo que hay que plantear un nuevo intervalo de tiempo e incluso concentración de solvente distintas para extraer al máximo los compuestos para futuras investigaciones, por el momento se pudo concluir que el método Soxhlet resulta adecuado para tener actividad antioxidante de compuestos. La comparativa con otros trabajos donde se extraen compuestos con actividad antioxidante se presenta en el apartado de validación de los puntos óptimos y presentando a continuación, en la tabla 18, los puntos óptimos obtenidos para cada una de las corridas experimentales del resto de las variedades.

Tabla 14.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de las diferentes variedades con la metodología de superficie de respuesta. La actividad antioxidante fue expresada en equivalentes de Trolox

Lote 1 Wonderful solvente 1 acetona (L1S1)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	3288.50
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.41
Lote 1 Wonderful solvente 2 etanol (L1S2)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	3345.43
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	2.27768
Lote 2 Apaseo solvente 1 acetona (L2S1)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	1816.92
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	1.03
Lote 2 Apaseo solvente 2 etanol (L2S2)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	2511.91
Concentración de solvente (%)	80.1556
Tiempos de extracción (hrs)	2.57
Lote 3 Tecamatlán solvente 1 acetona (L3S1)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	3790.71
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.4142
Lote 3 Tecamatlán solvente 2 etanol (L3S2)	
Parámetro	Valores estimados
Cap. antioxidante (Miliequivalentes de Trolox mg/ml)	5353.2
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.41421

Validación de puntos óptimos operacionales

Una vez realizadas las pruebas de actividad bactericida, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante donde los resultados tuvieron el siguiente comportamiento:

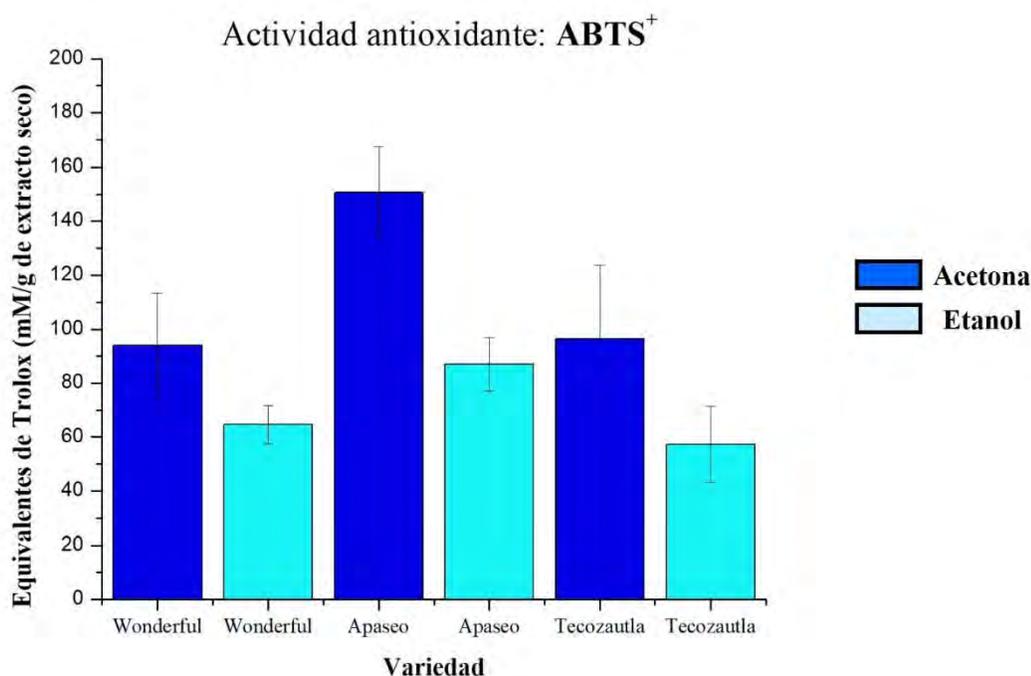


Figura 10. Actividad antioxidante bajo puntos óptimos operacionales de extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (*Punica granatum*)

En la figura 10 se puede observar que acetona como solvente resultó conveniente para una mayor extracción de compuestos polifenólicos, lo cual es atribuido tanto a la polaridad del solvente utilizado, así como a que los extractos cetónicos estuvieron expuestos en menor grado a temperaturas altas durante la extracción en el Soxhlet. En cuanto a la importancia del solvente utilizado se menciona que este dependiendo de su estructura química tendrá una mayor o menor interacción con los metabolitos de interés convirtiéndose en una extracción selectiva, es sabido que en cuanto a polaridades, el agua resulta el solvente universal con una polaridad importante y que es mayor a la polaridad que posee el etanol, y que este a su vez tiene una polaridad mayor que la que presenta la acetona, por lo que los extractos etanólicos y cetónicos serán diferentes en la composición química de los polifenoles que resulten extraídos. La extracción de polifenoles utilizando diferentes solventes de polaridades diversas ha sido ampliamente analizado, en el año 2007 **Yasoubi et al.** determinaron el contenido de polifenoles y a su vez evaluaron la actividad antioxidante en extractos de cáscara de granada iraní. El método de extracción de los polifenoles fue utilizando solventes por método por maceración y por extracción con ultrasonido y donde se observó que el rendimiento de extracción de polifenoles fue mayor en donde se utilizó acetona como solvente en ambos métodos, posteriormente el mayor rendimiento se logró con metanol, etanol, agua y al final acetato de etilo, siendo similares lo observado en el presente trabajo. Por otro lado, se puede observar que las figuras de la actividad antioxidante por el método de ABTS⁺ son similares a las actividades bactericidas tanto frente a *S. aureus* como de *E. coli* por lo que se puede decir que los fenoles tienen tanto actividad antioxidante como bactericida, la hipótesis anterior será sostenida al momento de la determinación y análisis del contenido de polifenoles totales.

La aplicación de la cáscara de granada mexicana a través de métodos donde se utilizan temperaturas elevadas busca principalmente que esta fuente vegetal sirva de sustituto de metabolitos secundarios con propiedades como antioxidantes y bactericida, es por eso que para hacer un análisis completo los resultados obtenidos han sido comparados con diferentes trabajos en donde se han extraído polifenoles del mismo fruto. En el año 2009 **Türkyilmaz et al. (kim2009)** evaluaron el efecto que tiene el tratamiento del jugo de la granada bajo diferentes presiones para poder ser conservado midiendo el contenido de fenoles y la actividad antioxidante por método del radical ABTS⁺ de variedades de granadas de Turquía y se observó que bajo condiciones de presiones de 1.2 bar a 4.8 bar cuyos resultados se encontraban en un rango de los 32 mM/ml a los 47 mM/ml de jugo en equivalentes de Trolox aproximadamente, si se comparan con los datos obtenidos expresados en estas mismas unidades, se logró una concentración inferior en los extractos; para acetona de 4.73 mM/ml, 6.83 mM/ml y 4.38 mM/ml y para etanol una concentración de 12.92 mM/ml, 17.42 mM/ml y 12.03 mM/ml para las variedades Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente; sin embargo, los resultados no se alejaron en grandes cantidades de los reportados por lo que los extractos de cáscaras mexicanas pueden concentrarse y utilizarse por su actividad.

Cuando se trata de extracción de compuestos antioxidantes lo que se busca es que estos sean dañados (oxidados) en lo menor de lo posible, por tanto, es común que los procesos de extracción impliquen temperaturas por debajo de los 40 °C y presiones bajas, por lo que se evaluó el efecto que hubo en la actividad antioxidante de los compuestos de las cáscaras de granada al compararlos con extracciones donde fueron menores las temperaturas de extracción. En el año 2012 **Zaouay et al.** compararon la actividad antioxidante en 13 variedades de Turquía donde se realizó la caracterización al jugo del fruto con pesos similares a los trabajados (101 g a 300 g, e incluso variedades de hasta poco más de los 500 g) y colores alrededor de los rojizos (de los 20 °h a los 54 °h aproximadamente) se contenían desde los 0.011 mMol/m en equivalentes de Trolox hasta los 0.022 mMol/L en equivalentes de Trolox observándose una concentración menor a los obtenidos en los extractos de cáscara de granada mexicana con características físicas similares. Se puede observar que las condiciones de cultivo de las variedades mexicanas favorecen la síntesis de compuestos con actividad antioxidante ya que mayor concentración en los equivalentes de Trolox

Uno de los principales frutos con una destacada actividad antioxidante es la guayaba, por lo que en el año 2013 **Zapata et al.** caracterizaron la guayaba agria (*Psidium araca*) en Colombia reportando una concentración de 6.68 mMol/g de fruta fresca en equivalentes de Trolox y se puede observar que el contenido en las cáscaras de las variedades mexicanas son mayores en los extractos cetónicos con una concentración de 93.88 mM/g de extracto seco en equivalentes de Trolox para la variedad Wonderful, 150.78 mM/g de extracto seco para la variedad Apaseo y 96.32 mM/g de extracto seco por lo cual como fuente exógena de compuestos antioxidantes resulta conveniente. Otro de los frutos con los cuales se puede comparar los resultados obtenidos, por solo mencionar algunos, es con la zarzamora, donde en el año 2017 **García-Dávila et al.** determinaron la actividad antioxidante con la finalidad de evaluar si el consumo de esta baya disminuía el daño muscular en atletas de elite.

Como se mencionó en el marco teórico, los polifenoles son los principales compuestos químicos con actividad antioxidante y dentro de los polifenoles se encuentran los flavonoides los cuales

pueden ser incluidos en la determinación de los fenoles totales por lo cual su relación con la actividad antioxidante se explica más adelante.

4.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante: radical DPPH

En la primera etapa del proyecto solo se pudo hacer la evaluación de la actividad antioxidante utilizando el método del radical ABTS⁺, sin embargo, para corroborarla se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad del radical de DPPH el cual es estabilizado de manera más específica por los compuestos de naturaleza lipofílica, generándose los siguientes resultados:

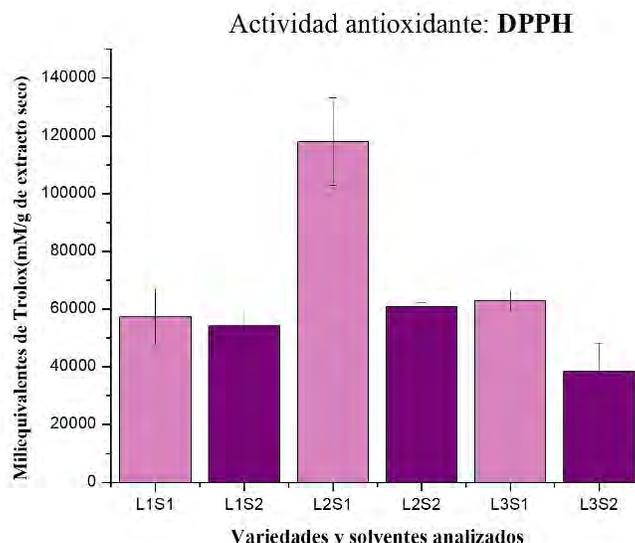


Figura 11. Estabilización de radicales libres sintéticos utilizando extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (*Punica granatum*). L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecozautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Tabla 15. Análisis de ANOVA entre los extractos cetónicos y etanólicos obtenidos de cáscara de granada por método del radical DPPH.

Corrida experimental	Concentración Miliequivalentes Trolox (mM/g extracto seco)	
L1S1	57184 ± 9676.6	bc
L1S2	54047 ± 5543.5	c
L2S1	117936 ± 15081.4	a
L2S2	60832 ± 1459	bc
L3S1	62914 ± 3570.4	b
L3S2	38384 ± 9852	d

n=9, $\alpha=0.05$, a, b y c semejanza entre medias analizadas. L1= Wonderful, L2= Apaseo, L3= Tecozautla, S1= acetona y S2= etanol.

Como se puede observar, hay una tendencia similar tanto en la actividad antioxidante evaluada con el método del radical de ABTS⁺, así como con la actividad antioxidante con el radical DPPH donde en ambos las mayor actividad se logró en los extractos cetónicos de todas las variedades y entre los extractos cetónicos la mayor actividad se tuvo en los extractos obtenidos de la variedad Apaseo. Para corroborar la similitud del comportamiento en las actividades con

ambos métodos se presenta a continuación el análisis por correlación de Pearson de tal manera que se demuestre estadísticamente.

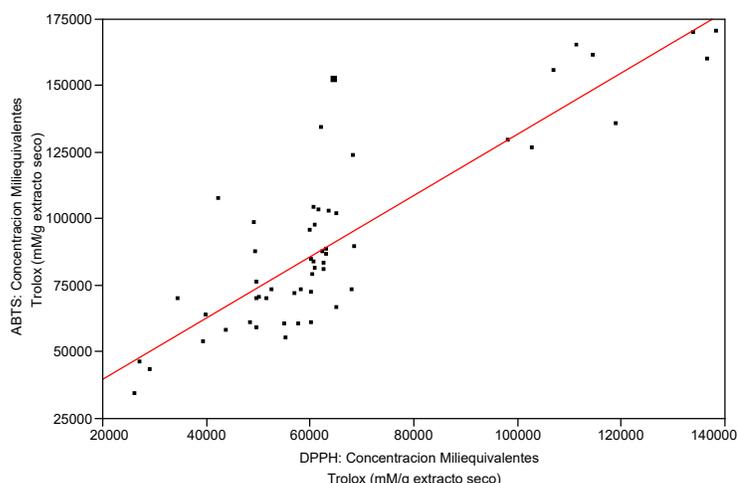


Figura 12. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical ABTS⁺⁺ y DPPH.

Tabla 16. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante a través de métodos distintos.

Correlación ABTS⁺ y DPPH	
RSquare	0.74672
Rsquare Adj	0.74185
Root Mean Square Error	17899.4
Mean of Response	91882.7
Observations	54

n= 9, $\alpha=0.05$.

Se puede observar que hay una correlación significativa entre los resultados ya que se tuvo una r^2 de 0.74672 y la correlación ajustada es próxima, siendo de 0.74185 lo que se indica que hay una relación significativa en las proporciones de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos con actividad antioxidante en la cáscara de granada ya que como se ha mencionado anteriormente el método con el radical de ABTS⁺⁺ cuantifica compuestos con carácter hidrofílico así como lipofílico, por otro lado el radical DPPH es específico para reaccionar con compuestos con carácter lipofílico disuelto en el medio de reacción.

Se han realizado diversas investigaciones donde se ha medido la actividad antioxidante mediante equivalentes de Trolox a través del método del DPPH, como en el realizado en el año 2006 por **Thaipong et al.** donde se compararon actividades antioxidantes de extractos de frutos de guayaba obtenidos por maceración con metanol y donde fueron aplicadas las técnicas del ABTS⁺, DPPH, FRAP y ORAC teniéndose como resultados una concentración de 0.031 mM/g de muestra fresca, 0.0252 mM/g de muestra fresca, 0.0261 mM/g de muestra fresca y 0.0213 mM/g de muestra fresca respectivamente, es claro que hay una mayor presencia de equivalentes

de Trolox en el método de ABTS+ ya que se cuantifican los compuestos antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos a comparación de los cuantificados DPPH donde solo se cuantifican los de naturaleza lipídica, por otro lado se puede notar que la cáscara de granada representa una fuente importante de estos compuestos con dicha actividad ya que las concentraciones en equivalentes de Trolox son superiores, En cuanto a la prueba de correlación de Pearson se tuvo una r^2 de 0.85 la cual fue mayor a la obtenida en el trabajo, lo cual se puede explicar ya que al utilizarse el método de extracción con temperaturas resulta difícil controlar en su totalidad la misma temperatura para todos los Soxhlet en el proceso experimental, generando un aumento en la variabilidad, sin embargo esto no quiere decir que no permita la reproducibilidad en las extracciones, quedando la sugerencia de para futuras investigaciones tratar de controlar este factor lo mas preciso posible. Con los resultados de ambas correlaciones se puede establecer como hay una clara relación entre métodos ya que en la mayoría de las extracciones las relaciones de las actividades tienen el mismo comportamiento y sirven de validación para sostener las propiedades de compuestos fitoquímicos.

Por otro lado, en el año 2015 **Moo-Huchin et al.** evaluaron actividad antioxidante de frutos tropicales de Yucatán, México los cuales fueron la manzana estrella purpura (*Chrysophyllum cainito* L.) y el marañón amarillo y rojo (*Anacardium occidentale*) donde los extractos se obtuvieron de las cáscaras de los frutos teniéndose una concentración de alrededor de los 3.05 mM/g de muestra seca y de 3.322 mM/g de muestra seca respectivamente, por lo que resulta una concentración menor a lo obtenido, algo que resultó interesante es el hecho de que en este trabajo se realizó una caracterización de compuestos fenólicos en las cáscaras las cuales tienen una similitud en color a los que se tienen en la granada, detectándose la presencia de fenoles como lo son: ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido gálico y elágico, por lo que a continuación se hará una análisis de los fenoles totales contenidos en los extractos cetónicos y si hay una correlación con la actividad antioxidante e incluso con la actividad bactericida.

4.4.2. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu se emplearon diferentes diluciones, ya que como se mencionó, las lecturas en el espectro salían de la absorbancia a la cual se tenía la curva de calibración. Dentro de las diluciones con las que se trabajó fueron 1:10, 1:30, 1:50, 1:100 y 1:200 siendo la última dilución donde se logró cuantificar los fenoles con etanol como solvente debido a que, como ya se había explicado, este solvente permitió concentrar más fácilmente a los extractos, por tanto los resultados obtenidos fueron los siguientes:

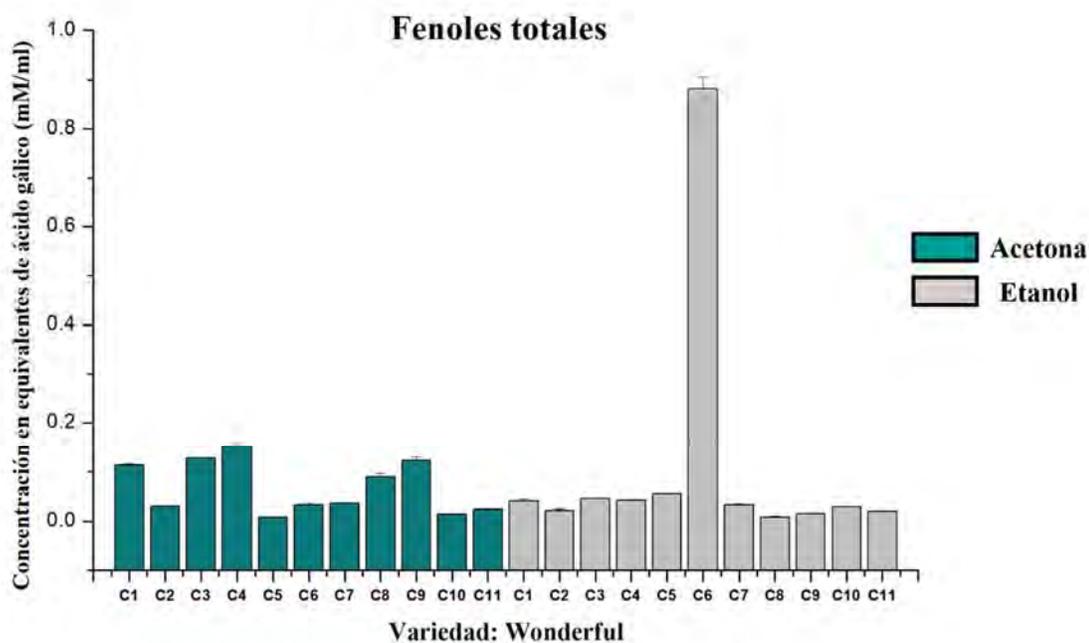


Figura 13.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 1 usando acetona como solvente y expresados en EAG mg/ml.

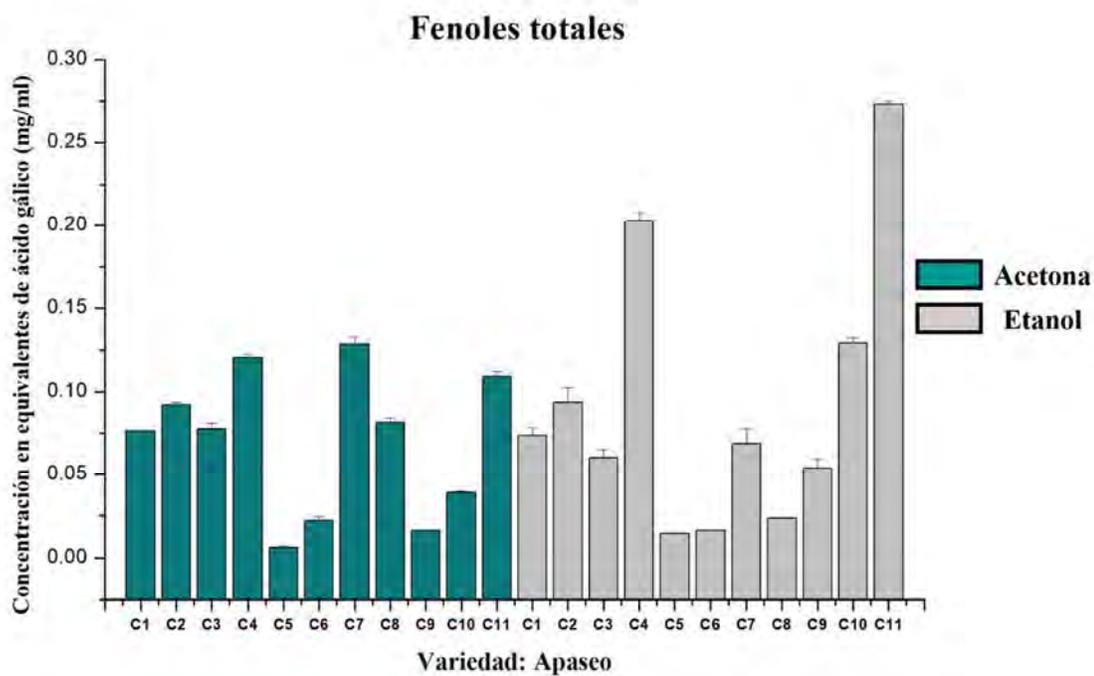
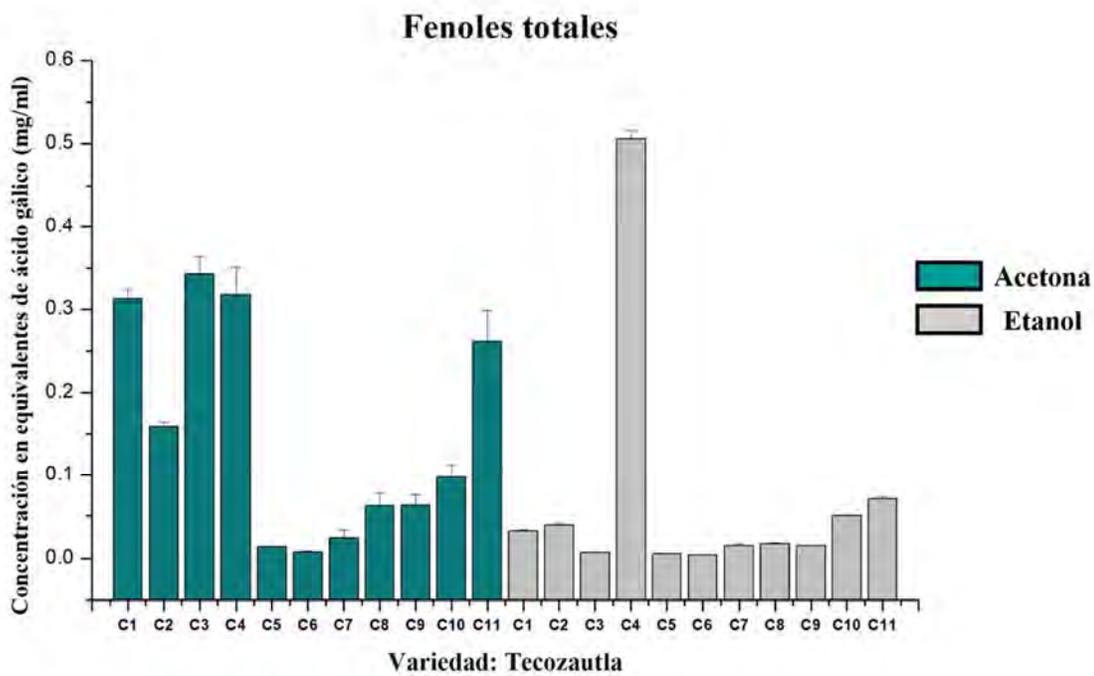


Figura 14.- Cuantificación de los fenoles totales en extractos obtenidos del lote 3 usando acetona como solvente y expresados en EAG mg/ml.



Como se puede notar el comportamiento de las gráficas es similar al comportamiento en la actividad antioxidante debido a que los compuestos fenólicos tienen esta característica al tener grupos OH en su estructura que ayudan a estabilizar radicales libres tanto naturales como sintético (como es el caso del radical de ABTS⁺).

El solvente que tuvo una mayor remoción de estos compuestos fue el etanol en la extracción ya que la máxima concentración para los lotes 1, 2 y 3 fueron 0.88120745 EAG mg/ml, 0.273246667 EAG mg/ml y 0.505764796 EAG mg/ml respectivamente a comparación con los obtenidos al usar acetona los cuales la máxima concentración para los lotes en el mismo orden fue de 0.151347608 EAG mg/ml, 0.120459368 EAG mg/ml y 0.342548077 EAG mg/ml respectivamente.

Las gráficas de superficie de respuesta quedaron de la siguiente manera mostrándose solo las del lote 3 usando acetona como solvente.

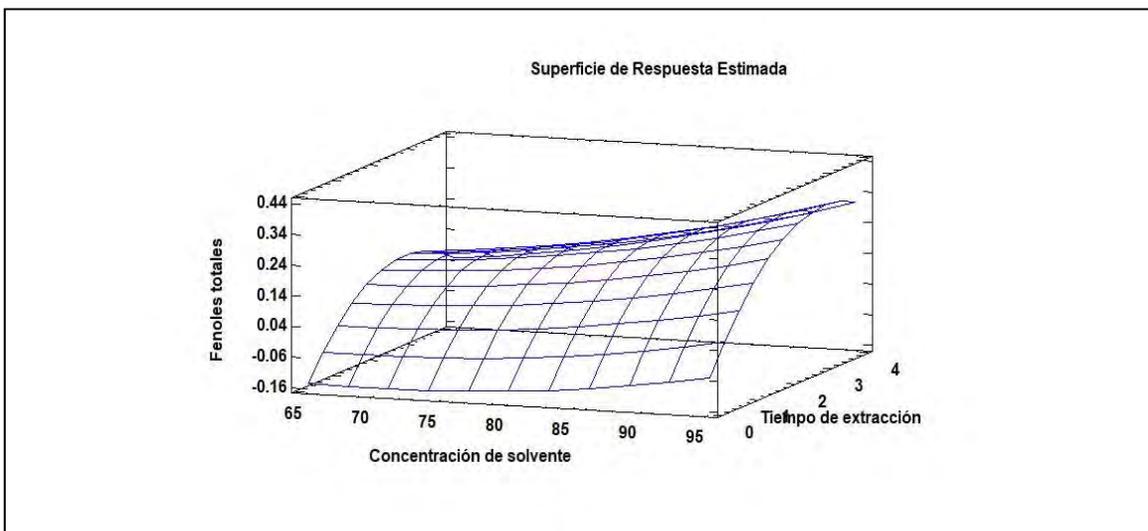


Figura 15.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.

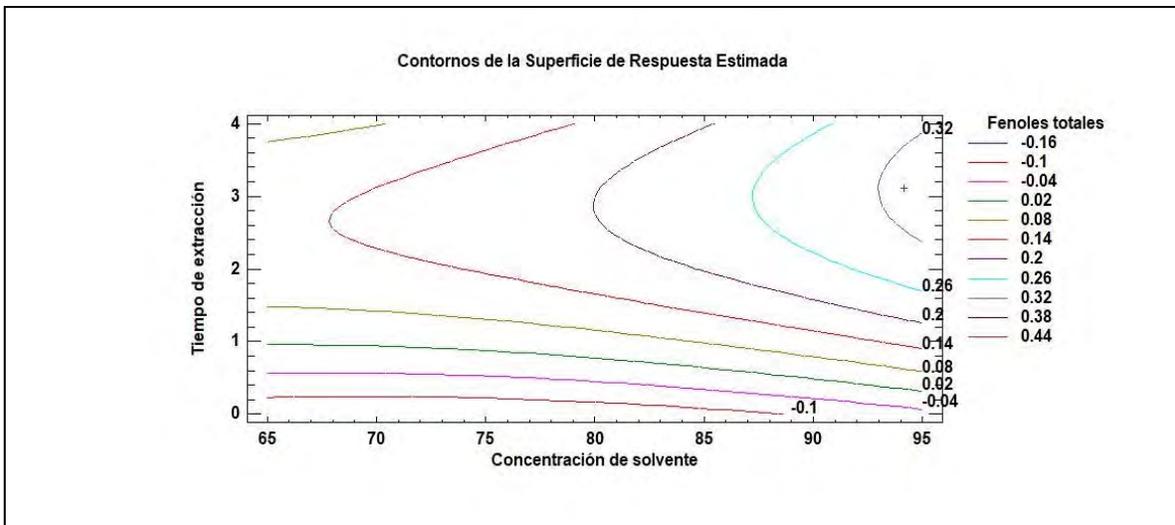


Figura 16.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.

Lo que indican las graficas anteriores al igual que en la determinación de actividad antioxidante es que para encontrar el punto optimo de extracción para la variedad de Tecomatlán se recomienda explorar en un rango mayor de concentración de solvente y un rango mayor de tiempo de extracción ya que el recomendado hasta ahora es de 94.1421 % de etanol en mezcal con agua en un tiempo de extracción de 3.41421 h. El resto de los puntos óptimos encontrados son los siguientes:

Tabla 17.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de los diferentes lotes con la metodología de superficie de respuesta usando como respuesta la concentración de fenoles expresada en EAG mg/ml.

Lote 1 Wonderful solvente 1 acetona (L1S1)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.1397
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.41421
Lote 1 Wonderful solvente 2 etanol (L1S2)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.573
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	1.98
Lote 2 Apaseo solvente 1 acetona (L2S1)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.1304
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	0.5857
Lote 2 Apaseo solvente 2 etanol (L2S2)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.1877
Concentración de solvente (%)	78.2923
Tiempos de extracción (hrs)	2.2230
Lote 3 Tecamatlán solvente 1 acetona (L3S1)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.3335
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.1105
Lote 3 Tecamatlán solvente 2 etanol (L3S2)	
Parámetro	Valores estimados
Fenoles totales (Equivalentes de ácido gálico mg/ml)	0.5614
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.4142

Validación de puntos óptimos operacionales

Con la determinación de los fenoles se busca evaluar si hay una relación y efecto directo sobre la actividad antioxidante e incluso con la actividad bactericida, por lo que, de haberla, debería de existir una similitud con los gráficos obtenidos. El comportamiento del contenido de fenoles en las muestras son los siguientes:

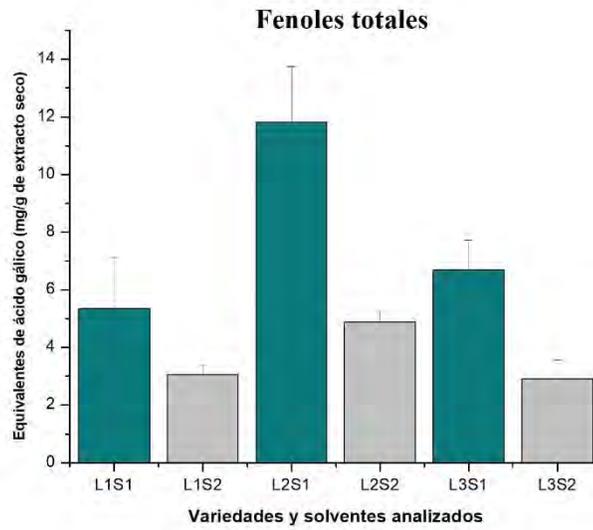


Figura 17. Cuantificación de fenoles totales en extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (*Punica granatum*) a través del método de Folin-Ciocalteu. L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecoautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Tabla 18. Análisis de ANOVA entre los extractos cetónicos y etanólicos obtenidos de cáscara de granada para cuantificación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.

Corrida experimental	Concentración equivalentes de ácido gálico (mg/g de extracto seco)	
L1S1	5.3503 ± 1.777	c
L1S2	3.0486 ± 0.3514	d
L2S1	11.8176 ± 1.9213	a
L2S2	4.8664 ± 0.4355	c
L3S1	6.6939 ± 1.0272	b
L3S2	2.9047 ± 0.644	d

n=9, $\alpha=0.05$, a, b y c semejanza entre medias analizadas. L1= Wonderful, L2= Apaseo, L3= Tecoautla, S1= acetona y S2= etanol.

Lo que se logra apreciar en primer instancia es la similitud con todos los gráficos presentados en la cosecha 2018, por lo que se puede comenzar a concluir que la presencia de polifenoles si tiene una estrecha relación con la actividad antioxidante, así como bactericida por lo que sería conveniente en un futuro realizar pruebas estadísticas de correlación entre dichas actividades con

la concentración de los polifenoles evaluándose quizá en diferentes estados de maduración de tal manera que se pueda establecer en que tiempo de cultivo se puede tener la máxima concentración de los compuestos fitoquímicos.

Con los puntos óptimos calculados en la cosecha 2017 se hace una predicción para los extracto cetónicos una concentración de 0.1397 EAG mg/ml, 0.1304 EAG mg/ml y 0.3335 EAG mg/ml para la variedad Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente, una vez aplicadas las condiciones optimas de tiempo de extracción y concentración de solventes para cada uno, los resultados expresados de la misma manera fueron los siguientes: 0.2675 EAG mg/ml, 0.5122 EAG mg/ml y 0.3347 EAG mg/ml para Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente por lo que se puede observar que las condiciones de trabajo propuestas fueron favorables al trabajarse con los extractos a una concentración de 0.05 g/ml en los extractos. Para los extractos etanólicos los predichos estimados fueron de: 0.573 EAG mg/ml, 0.1877 EAG mg/ml y 0.5614 EAG mg/ml para las variedades Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente, aplicando de igua manera las mismas condiciones de extracción de la cosecha 2017 los resultados fueron 0.1524 EAG mg/ml, 0.2481 EAG mg/ml y 0.1452 EAG mg/ml respectivamente observando una disminución en los predichos lo cual tiene explicación ya que en la cosecha 2018 los extractos mno fueron estandarizados a 0.05 g/ml para poder evaluar el efecto de los factores sobre las muestras, lo que si se logro fue analizar que de las 3 variedades, la variedad Apaseo fue la que tuvo la mayor respuesta similarmente a lo ocurrido con la acetona, por lo que esta variedad en particular tiene una carga mayor estos compuestos fitoquímicos.

Para que la correlación entre la actividad antioxidante y bactericida tenga una valides estadística se presentan a continuación los siguientes gráficos con la correlación de Pearson y así poder concluir si la presencia de compuestos fenólicos confiere a la cáscara de granada propiedades antioxidantes y bactericida.

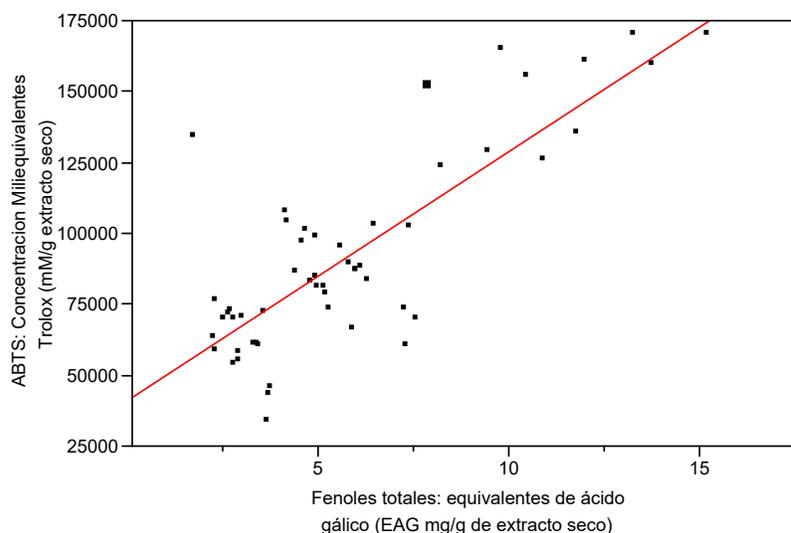


Figura 18. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical ABTS⁺⁺ y determinación de fenoles totales.

Tabla 19. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante por método ABTS⁺⁺ y concentración de fenoles totales.

Correlación Pearson: Fenoles y ABTS⁺	
RSquare	0.6485
Rsquare Adj	0.6417
Root Mean Square Error	21086.51
Mean of Response	91882.66
Observations	54

n= 9, $\alpha=0.05$.

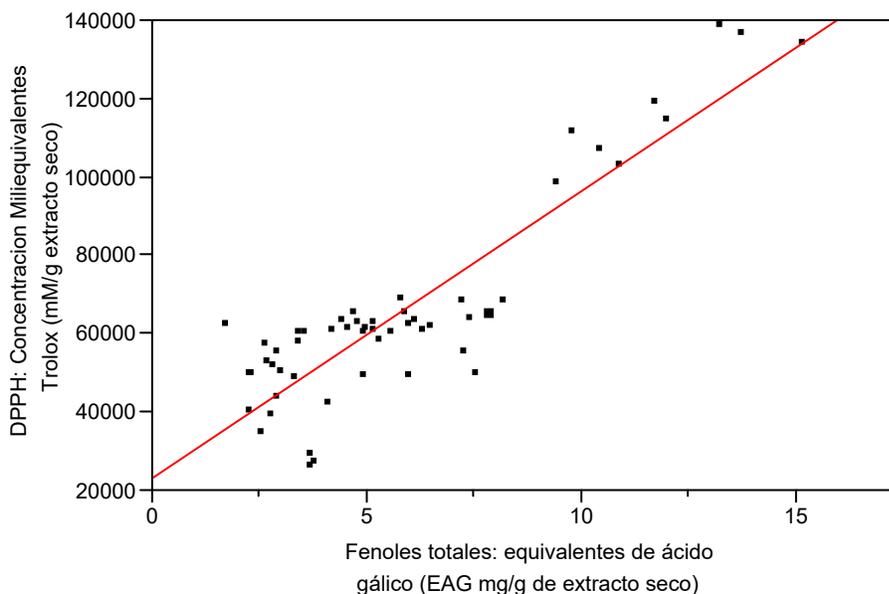


Figura 19. Correlación de Pearson entre la actividad antioxidante evaluada con el método del radical DPPH y determinación de fenoles totales.

Tabla 20. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad antioxidante por método DPPH y concentración de fenoles totales.

Correlación Pearson: Fenoles y DPPH	
RSquare	0.8015
Rsquare Adj	0.7977
Root Mean Square Error	11904.75
Mean of Response	65216.24
Observations	54

n= 9, $\alpha=0.05$.

Se puede apreciar que en ambas determinaciones de la actividad antioxidante hay una r^2 significativa, que si bien no es próxima a 1, al tratarse de material biológico dentro de los análisis

estadísticos, una r^2 que sea próxima a 0.75 o mayor tienen una variabilidad explicativa significativa con la cual se pueden proponer modelos a ecuaciones que sirvan para hacer predicciones de concentraciones de algún analito además de que con esto se puede observar que la presencia de los polifenoles en la cáscara de la granada si tienen un peso importante para otorgar propiedades antioxidantes al consumirse dichos metabolitos o al buscar aplicaciones a nivel industrial o farmacéutico.

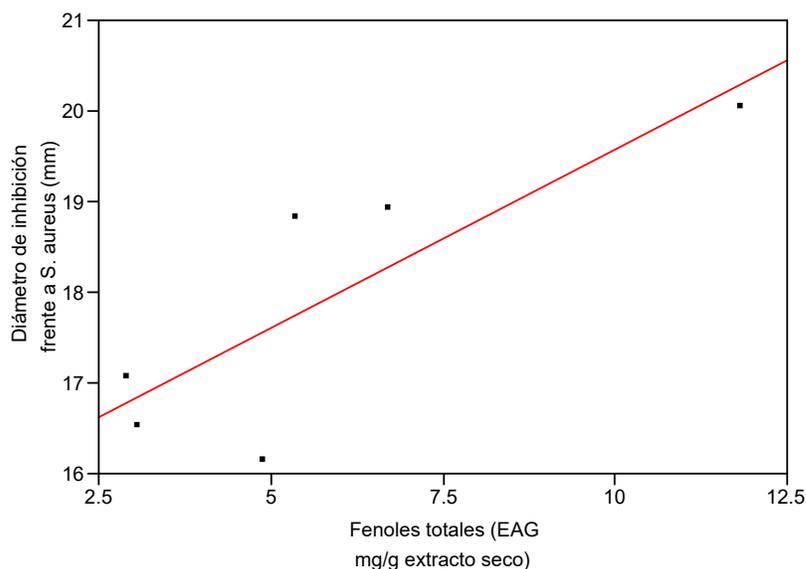


Figura 20. Correlación de Pearson entre la actividad bactericida en bacterias grampositivas y concentración de fenoles totales.

Tabla 21. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad bactericida en bacterias grampositivas y concentración de fenoles totales.

Correlación Pearson: Fenoles frente a <i>S. aureus</i>	
RSquare	0.6845
Rsquare Adj	0.6058
Root Mean Square Error	0.9788
Mean of Response	17.9139
Observations	6

n= 6, $\alpha=0.05$.

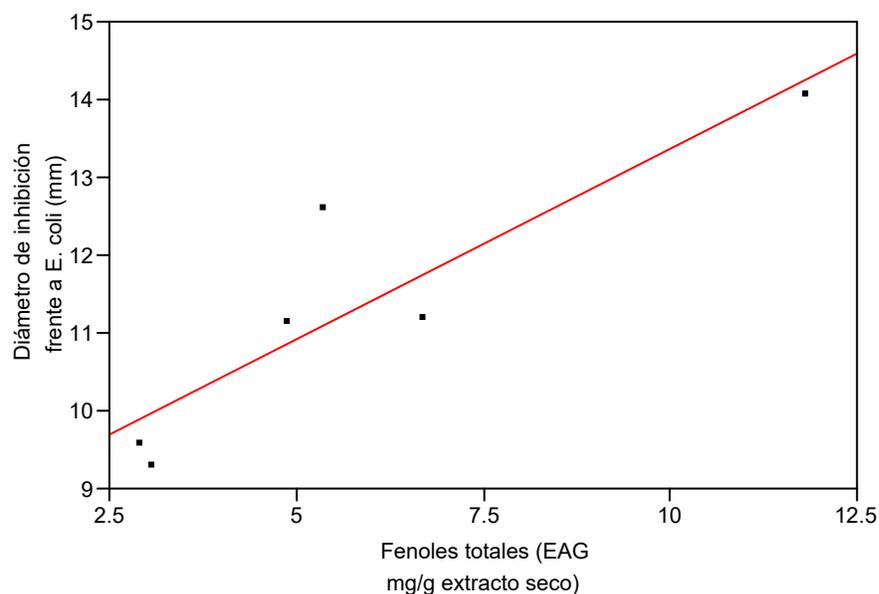


Figura 21. Correlación de Pearson entre la actividad bactericida en bacterias gramnegativas y concentración de fenoles totales.

Tabla 22. Ajuste lineal de la correlación de Pearson de actividad bactericida en bacterias negativas y concentración de fenoles totales.

Correlación Pearson: Fenoles frente a <i>E. coli</i>	
RSquare	0.8012
Rsquare Adj	0.7514
Root Mean Square Error	0.901
Mean of Response	11.29
Observations	6

n= 6, $\alpha=0.05$.

Para el caso de la actividad bactericida, se puede observar que hay un claro efecto entre la presencia de polifenoles con la inhibición en el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas en donde hubo una mayor correlación con respecto a *E. coli* que con *S. aureus*.

Dentro de los trabajos que se han realizado en cuanto a la cuantificación de compuestos fenólicos se puede mencionar el elaborado por **Gutiérrez et al.** en el año 2008 donde además de la concentración de fenoles se evaluó la actividad antioxidante en malezas usadas como alimento para ganado, fueron un total de 14 especies vegetales trabajadas dentro de las cuales se pueden mencionar *D. molliculum*, *C. bipinnatus*, *P. hysterophorus*, *S. amplexicaulis*, *A. hybridus*, *B. rapa* y *I. purpurea*, entre otros, teniendo una concentración alrededor de los 21.88 mg EAG/g de muestra seca hasta los 69 mg EAG/g de muestra seca, sin embargo la especie con mayor concentración fue *D. molliculum* con 125.82 mg EAG/g de muestra seca observando una clara relación entre el contenido de fenoles con la actividad antioxidante y que si bien puede haber diferencias entre especies o variedades como lo experimentado con las tres variedades de

granada trabajadas se puede deber al efecto combinado de diversos factores como otro tipo de metabolitos con actividad antioxidante como los terpenos sintetizados por las diferentes condiciones de crecimiento del material vegetal, o bien, a una actividad pro-oxidativa que se contraponga al potencial antioxidante de los compuestos. Dentro de los compuestos que pueden estar presentes en las diferentes variedades de granada, y en base a lo analizado y caracterizado por parte de **Chebaibi et al. en el año 2013** se encuentran compuestos fenólicos con presencia significativa, así como también se tuvo presencia positiva de taninos, flavonoides, mucilagos, saponinas, terpenos y glicósidos, sin embargo, al hacer la determinación de alcaloides la respuesta fue negativa por lo que sería importante realizar posteriormente una caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos acéticos y etanólicos de las cáscaras de granadas mexicanas para saber cuáles de ellos se encuentran en mayor proporción y son los responsables directos de la actividad antioxidante o bactericida, por lo pronto en base a las correlaciones de Pearson hay un claro efecto de los fenoles sobre dichas actividades.

Por otro lado, en el año 2011 **Zarei et al.** evaluaron los cambios fisicoquímicos de la granada variedad “Rabbab-e-Fars” durante su proceso de maduración observando una concentración después de 20, 80 y 140 días del amarre del fruto (*fruit set*) de 1938.12 mg EAG/100 g de jugo, 1298.19 mg EAG/100 g de jugo y 786.20 mg EAG/100 g de jugo respectivamente observándose una disminución en la concentración por la activación de la enzima polifenoloxidasas conforme aumenta la maduración del fruto por lo que este parámetro permite conocer y estandarizar el tiempo de maduración de los frutos. Los resultados obtenidos y expresados en las mismas unidades con las variedades trabajadas con acetona como solvente fueron de 5350.3 mg EAG/100 g de extracto seco, 11817.6 mg EAG/100 g de extracto seco y 6693.9 mg EAG/100 g de extracto seco para las variedades Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente lo cual indica que las condiciones de crecimiento que brinda México para la granada resultan favorables para generar una mayor concentración de polifenoles resultando las cáscaras de granada una fuente importante en comparación con el jugo de esta variedad analizada. Por otro lado los extractos etanólicos tuvieron una concentración de 3048.6 mg EAG/100 g de extracto seco, 4866.4 mg EAG/100 g de extracto seco y 2904.7 mg EAG/100 g de extracto seco para las variedades Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente por lo que, de trabajarse con este solvente, permitiría obtener de igual forma cantidades significativas de polifenoles extraíbles.

Para el año 2014 **Fredes et al.** compararon el contenido total de fenoles y antocianinas, así como su actividad antioxidante en frutos chiles dentro de los cuales se trabajó con la granada de la variedad Wonderful así como algunos frutos de interés en México como la fresa y algunas zarzamoras. Los resultados de las concentraciones para la granada Wonderful fueron en un rango de los 3.8 mg EAG/g de muestra fresca a los 4 mg EAG/g de muestra fresca donde es claro que los resultados obtenidos para la variedad Wonderful mexicana fueron superiores al utilizar acetona como solventes ya que basándose en los sólidos solubles totales se tiene un parámetro similar el cual fue de los 15 °Brix a los 15.3 °Brix. El método de extracción utilizado en el trabajo de **Fredes** consistió en la maceración del material vegetal utilizando metanol acidificado al 0.1% con HCl como solvente por un tiempo de 1 h, por lo que se puede mencionar que el método Soxhlet utilizado resultó favorable para aumentar el contenido fenólico en los extractos y que el carácter químico de la acetona resultó conveniente para que se tuviera un mayor rendimiento de la misma extracción comparados con el alcohol trabajado en esta investigación así como el evaluado por parte de **Fredes et al.** Para el contenido de fenoles totales en las fresas chilenas se reporta una concentración de 6.3 mg EAG/g de muestra fresca a los 8.5 mg EAG/g de

muestra fresca siendo superiores los obtenidos en las extracciones de las cáscaras de las granadas mexicanas, en cuanto a las zarzamoras se reporta una concentración de los 5.8 mg EAG/g de muestra fresca a los 7.4 mg EAG/g de muestra fresca por lo que como fuente sustituta de polifenoles la cáscara de granada puede ser aprovechada y dar el valor agregado que se busca al fruto.

Finalmente, y una vez hecho la comparativa de los resultados obtenidos con los reportados para otros frutos, es importante evaluar el efecto que existe al trabajar con extracciones que involucran temperaturas por arriba de la temperatura ambiental, es por eso que recientemente en el año 2015 **Muñoz *et al.*** realizaron la extracción de compuestos fenólicos a partir de Champa en Cuba y además elaboraron un análisis comparativo con otros frutos. La extracción de los compuestos fitoquímicos se llevo a cabo por método sólido-líquido a través de la lixiviación teniendo como factor la temperatura (20 °C, 50 °C y 70 °C), y diferentes mezclas de solvente los cuales fueron: agua destilada, etanol/agua (70:30) y etanol/agua (96:4) por un tiempo de 4 h. El mayor resultado obtenido en las corridas experimentales fueron los trabajados bajo el solvente etanol/agua (70:30) a una temperatura de 70 °C con una concentración de 5.272 mg EAG/g de pulpa liofilizada siendo mayor la presencia en los extractos cetónicos. El comportamiento observado en la extracción de los polifenoles en base al solvente si como al efecto de la temperatura tanto en la investigación de Muñoz *et al.* así como en el elaborado para la cáscara de la granada puede explicarse ya que los polifenoles son solubles en solventes polares o ligeramente polares señalando que la solubilidad en agua y en algunos alcoholes es mayor para compuestos difenólicos y polifenólicos cuya presencia será mayor en los extractos etanólicos que en los cetónicos, sin embargo con la acetona se tiene una mayor extracción de fenoles simples o incluso fenoles ácidos como el ácido gálico y eláxico responsables de la actividad antioxidante y bactericida mayoritariamente debido a que como antioxidante hay una menor impedimento estérico para estabilizar radicales libres, y como bactericida hay una mayor facilidad de absorción por parte de los microorganismos evaluados. Por otro lado, se debe de tener en todo momento cuidado con las temperatura utilizadas en la extracción ya que los polifenoles son sensibles a ella, pero se ha observado que este factor puede resultar benéfico para aumentar el rendimiento de extracción debido a que el incremento de la temperatura favorece las reacciones de división y rompimiento de las paredes celulares en el tejido vegetal debido a que la energía térmica aumenta la vibración molecular y por tanto la separación de los compuestos que se desean extraer, además se ha observado que el aumento en las temperaturas activa enzimas responsables de la descomposición o hidrólisis de compuestos complejos que crean puentes de hidrógeno como los compuestos fenólicos facilitando de igual manera la extracción, por lo que en el análisis de los puntos óptimos obtenidos en la cosecha 2017 se sugieren condiciones de operación con tiempos de extracción prolongados y teniendo respuestas significativas tanto para las temperaturas de extracción de la acetona (60 °C) así como para etanol (80 °C). Dentro de los frutos y tubérculos en donde se encuentra una menor presencia de fenoles en comparación con los obtenidos en las cáscaras de granada mexicana con el trabajo de Muñoz *et al.* se encuentra la naranja, papa, mango, guayaba, papaya y ciruela con una concentración en base húmeda de 1.511 mg EAG/g, 1.441 mg EAG/g, 0.971 mg EAG/g, 1.920 mg EAG/g, 0.977 mg EAG/g y 1.7 mg EAG/g respectivamente, por lo que el uso la extracción con método Soxhlet a las condiciones evaluadas con la cosecha 2017 resultan conveniente para aumentar presencia de polifenoles en el extracto.

Lo que respecta al uso de los extractos obtenidos puede ser tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica principalmente para lo cual se sabe que las dosis normales de ingesta de flavonoides en específico pueden ser de 20-26 mg/día contenidos en frutas y verduras (manzanas, naranjas, guayabas, uvas). Sin embargo, hay que alertar sobre el consumo excesivo que pueden representar fórmulas comerciales de antioxidantes y mezclas herbales que se producen en gramos y no miligramos (como lo recomendado) y conducirían a problemas de toxicidad por lo que de consumirse estos compuestos sería importante evaluar primero el efecto que habría y bajo qué condiciones ya que las moléculas fenólicas tienen amplia afinidad por las proteínas por lo que su capacidad antioxidante puede disminuirse *in vivo*, y se alerta sobre la ingestión de los frutos rojos (fresa, arándano) en combinación con leche, lo cual podría alterar la efectividad antioxidante de los mismos. Otro aspecto es la biodisponibilidad, que implica la cantidad de nutrimentos que se digieren, absorben y se metabolizan, por ello el contenido total de antioxidantes de un alimento es importante, pero más su biodisponibilidad, en tanto no los más abundantes son los más activos en el organismo, sea por absorción intestinal baja, por un mayor proceso metabólico, o excreción rápida (Coronado *et al.*, 2015).

4.4.5. Evaluación de la actividad bactericida

Para poder establecer cuál resulta ser el solvente favorable para la extracción de los compuestos con actividad bactericida se presentan las siguientes gráficas:

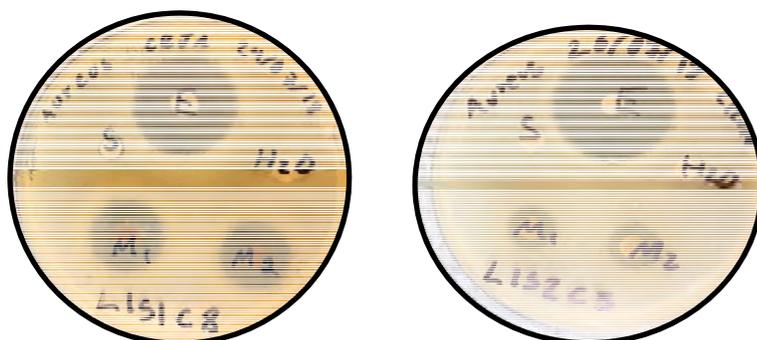
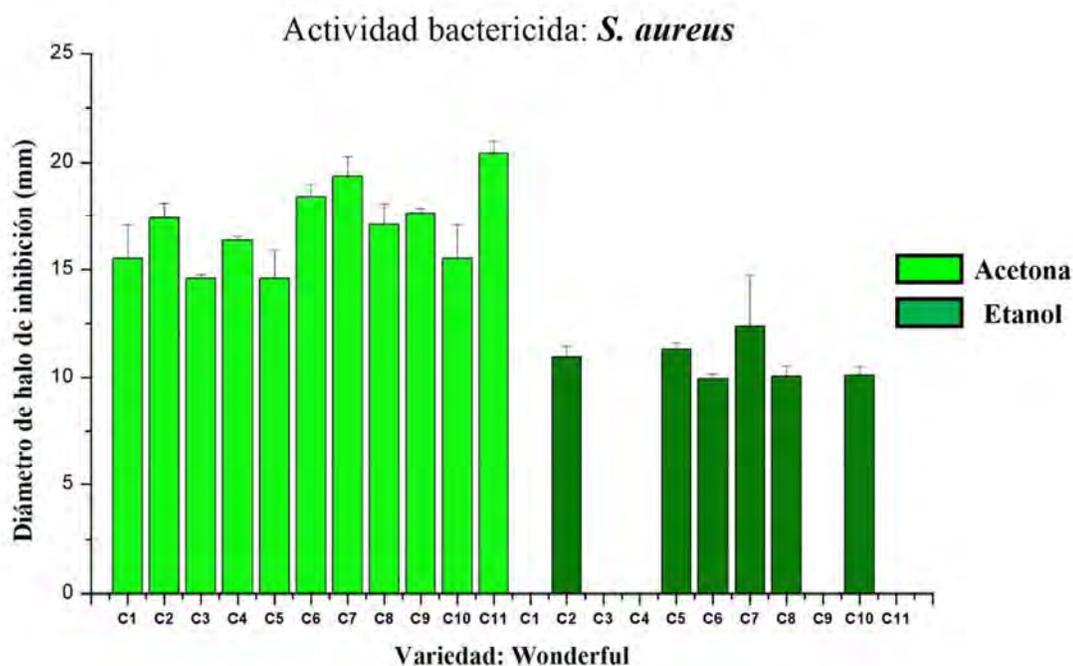


Figura 22.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 1 variedad Wonderful con una concentración de extractos de 50 mg/ml. La caja de lado izquierdo es con acetona como solvente y la de lado derecho con etanol como solvente. No está indicada en el texto.

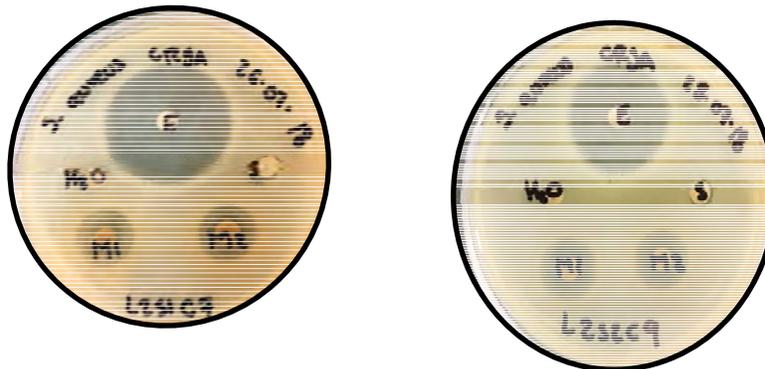
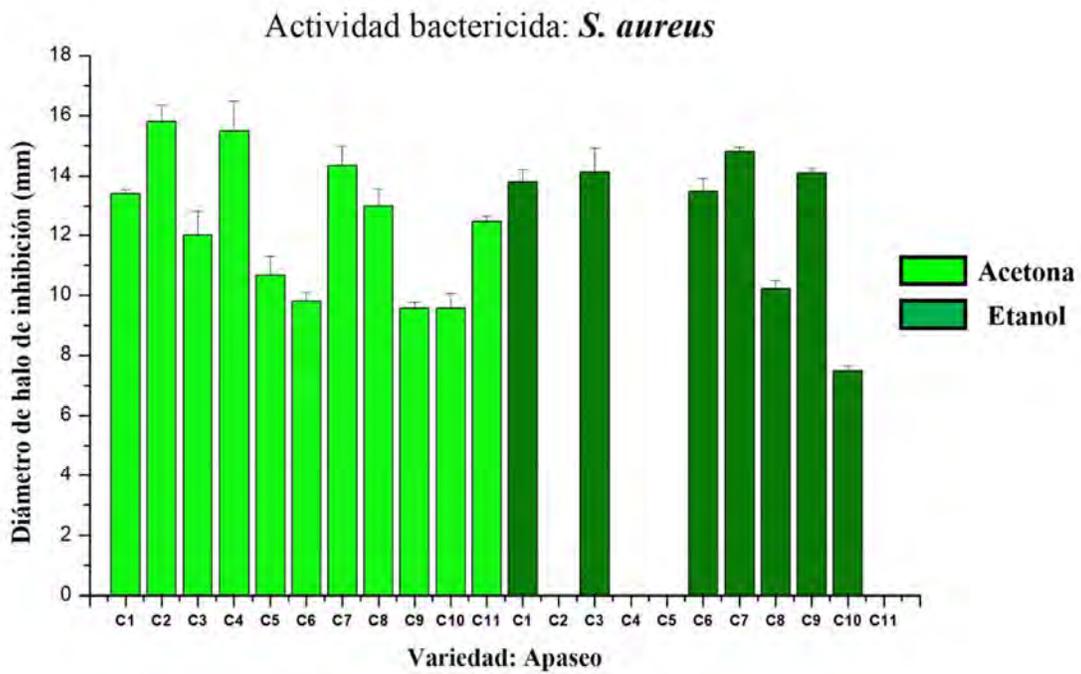


Figura 23.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 2 variedad Apaseo con una concentración de extractos de 50 mg/ml. La caja de lado izquierdo es con acetona como solvente y la de lado derecho con etanol como solvente. **Indicar en el texto!**

Lote 3: Actividad bactericida por método de sensibilidad en discos.

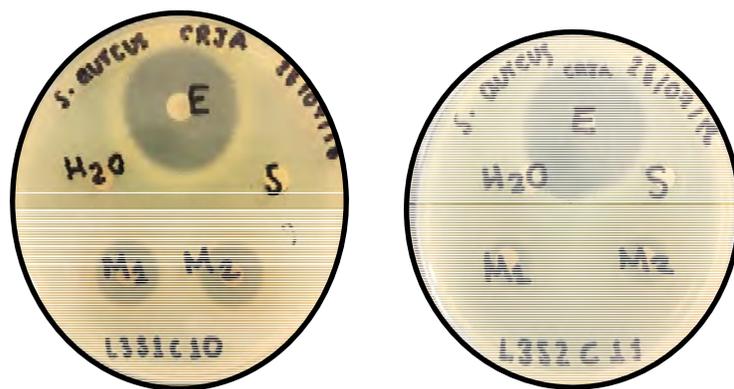
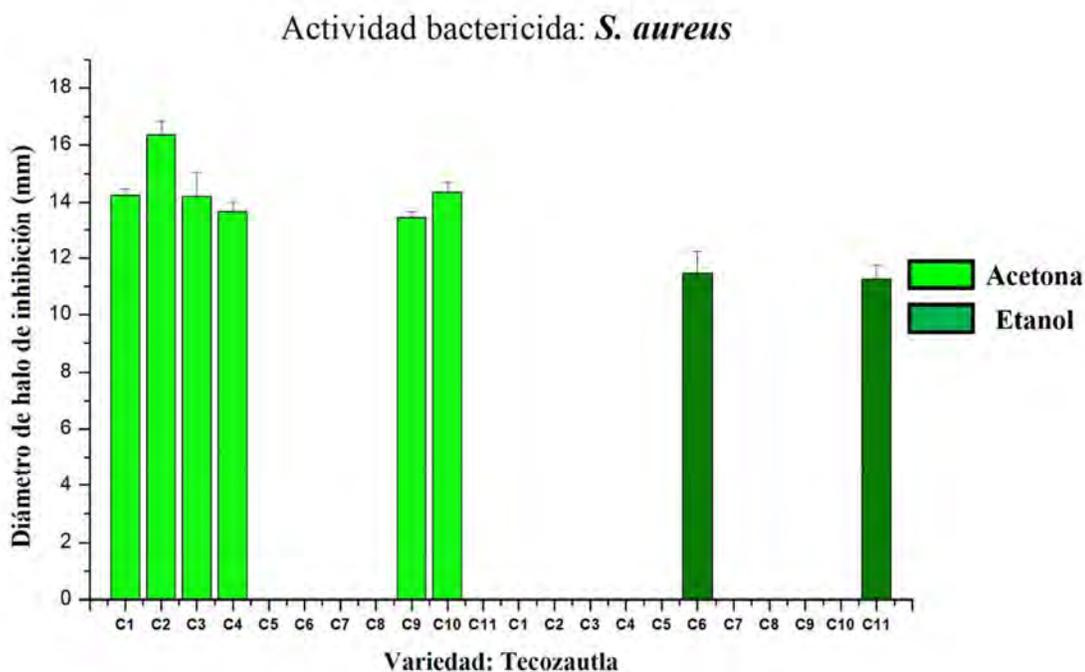


Figura 24.- Halos de inhibición generados con extractos del lote 3 variedad Tecozautla con una concentración de extractos de 50 mg/ml. La caja de lado izquierdo es con acetona como solvente y la de lado derecho con etanol como solvente.

Como se puede observar, los tratamientos realizados con acetona como solvente fueron los que presentaron mayor número de halos de inhibición y además fueron los que tuvieron diámetros mayores, esto se puede atribuir a que los tratamientos con acetona implicaron temperaturas de ebullición del solvente menores a los aplicados en etanol, por lo que para la extracción de compuestos con método Soxhlet se usará acetona como solvente.

Por otro lado, y para ver de manera más clara el efecto de evaluado en la superficie de respuesta se presentan sólo algunas gráficas para establecer los puntos óptimos para cada lote y solvente

usado, los cuales van a variar ya que se trata de cultivares diferentes permitiendo que al trabajarse con nuevos lotes de estos mismos proveedores se tengan condiciones estandarizadas para caracterizar profundamente los extractos. El resto de las gráficas se anexan en capítulos 6 con todas las tablas del diseño de superficie de respuesta.

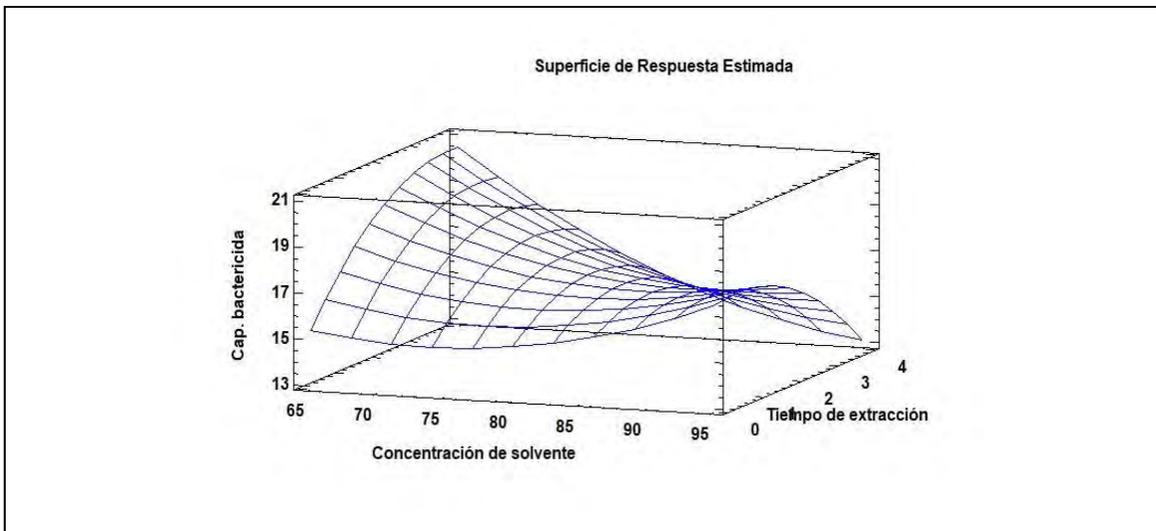


Figura 25.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria.

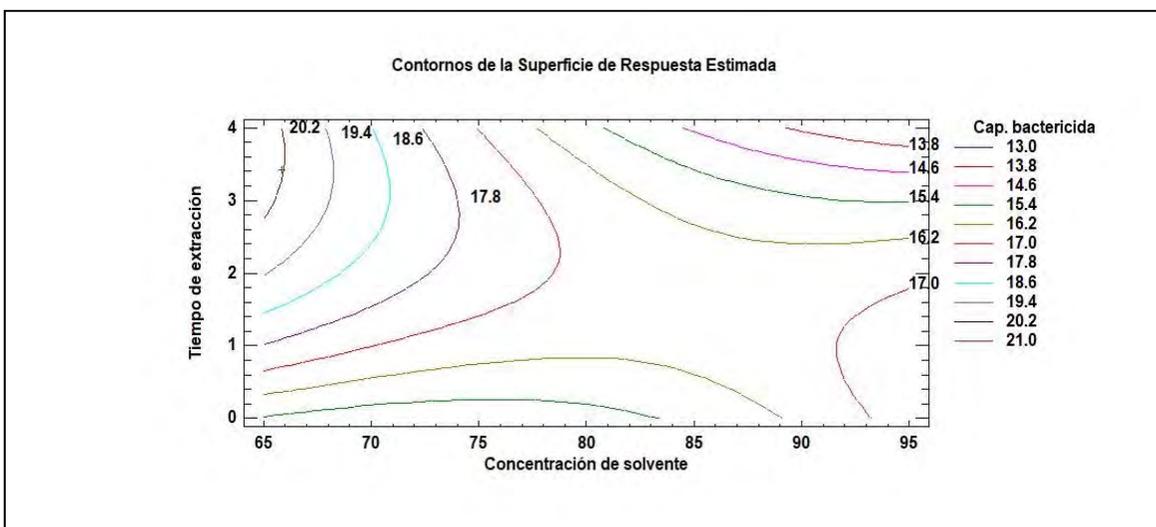


Figura 26.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria.

Tabla 23.- Puntos óptimos calculados para los tratamientos de los diferentes lotes con la metodología de superficie de respuesta teniendo como respuesta el diámetro de los halos de inhibición (mm) formados frente a la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus*.

Lote 1 Wonderful solvente 1 acetona (L1S1)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	20.2237
Concentración de solvente (%)	65.8579
Tiempos de extracción (hrs)	3.41421
Lote 1 Wonderful solvente 2 etanol (L1S2)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	11.4053
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	2.27768
Lote 2 Apaseo solvente 1 acetona (L2S1)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	15.8467
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	0.5857
Lote 2 Apaseo solvente 2 etanol (L2S2)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	21.0402
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.41421
Lote 3 Tecamatlán solvente 1 acetona (L3S1)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	16.3748
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	2.82
Lote 3 Tecamatlán solvente 2 etanol (L3S2)	
Parámetro	Valores estimados
Diámetro de halo de inhibición (mm)	11.3499
Concentración de solvente (%)	94.1421
Tiempos de extracción (hrs)	3.4142

Es impórtate mencionar que en algunas corridas experimentales no se encontró el punto óptimo, ya que las gráficas de respuesta tienen una orientación hacia la derecha, es decir, el tiempo de extracción en las variedades cuya coloración era en la gama de los rojos, lo cual cobra importancia ya que serían las variedades en donde habría una mayor presencia de metabolitos secundarios con actividad antioxidante y bactericida significativa, por lo que se puede proponer aumentar los límites superiores evaluados de tal manera que se pueda encontrar un punto óptimo de operación y hacer un análisis estadístico de segundo orden donde los resultados puedan ajustarse a un comportamiento linealizado, que permita predecir la actividad bactericida o antioxidante en base a los factores (tiempo de extracción y concentración de solvente) utilizados. Lo anterior no quiere decir que la metodología no haya permitido encontrar la corrida experimental donde se puede tener el mayor efecto bactericida frente a *S. aureus* para en lotes posteriores validar el método de extracción.

Validación de los puntos óptimos operacionales

Se trabajaron dos bacterias La primer prueba realizada fue la actividad bactericida de los extractos cetónicos y etanólicos frente a *S. aureus* ya que anteriormente se observaron resultados significativos donde hubo una notable sensibilidad del microorganismos frente a los extractos con acetona y en menor proporción los extractos etanólicos. Los resultados de la actividad bactericida se muestran a continuación:

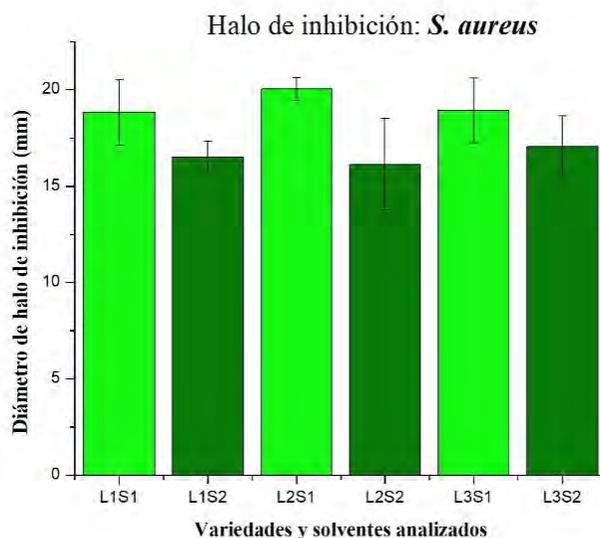


Figura 27. Sensibilidad en disco en medio sólido de extractos de cáscara de granada frente a bacteria grampositiva. L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecozautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Tabla 24. Análisis de ANOVA de la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (*Punica granatum*).

Corrida experimental	Diámetro de halo de inhibición (mm)	
L1S1	18.8167 ± 1.68928	abc
L1S2	16.5167 ± 0.81833	bc
L2S1	20.0333 ± 0.59889	a
L2S2	16.1333 ± 2.37459	c
L3S1	18.9167 ± 1.67501	ab
L3S2	17.0667 ± 1.5629	bc

n=6, $\alpha=0.05$, las letras indican semejanza entre medias analizadas. L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecozautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Como se puede observar los extractos en donde hubo una mayor sensibilidad en todas las variedades fueron los extractos cetónicos cuya concentración de ambos fue de 50 mg/ml, sin embargo, en los extractos etanólicos hubo una sensibilidad importante. Algo que es importante

señalar es que el punto óptimo estimado en la primera parte experimental del trabajo se tuvo una predicción para la variedad Wonderful de 20.22 mm de diámetro de inhibición bajo una condición de extracción de 65.86% de acetona en agua y con un tiempo de extracción de 3.4 h y el resultado obtenido fue menor lo cual tiene explicación debido a que la condición de extracción basada en la actividad antioxidante fue de 94% de acetona en mezcla con agua por un tiempo de extracción de 3.4 h generándose que la diferencia en la relación del solvente con agua tuviera un efecto sobre en la concentración de compuestos fitoquímicos con actividad bactericida, por lo que sería importante para futuros trabajos evaluar con más profundidad la relación de solvente con agua que logre la mayor actividad. Para el caso de la variedad Wonderful con etanol como solvente se logró un aumento en la sensibilidad observada anteriormente ya que el diámetro estimado en el punto óptimo era de 11.41 mm bajo una condición de extracción de 94.14% de solvente en agua con tiempo de extracción de 2.28 h donde para ello si se siguió esta condición ya que fue la condición en donde se obtuvieron altos rendimientos de compuestos con actividad antioxidante y claramente se puede observar que los resultados obtenidos en la validación fueron mayores, esto a qué se puede deber principalmente, al efecto del tiempo de extracción de los compuestos ya que estos son menormente degradados por una exposición menor a altas temperaturas por lo que son mayormente activos, dicho efecto de la temperatura es importante pero para la metodología aplicada se lograron resultados favorables en ambos solventes, donde la acetona resulta la de mayor actividad por manejar temperaturas menores de ebullición del solvente y realizar los reflujos en la extracción ya que al menos para la acetona se trabajaron con temperaturas alrededor de los 70°C y para el etanol alrededor de los 85°C. Además de lo anteriormente señalado se debe de mencionar que el aumento en la actividad bactericida observada tiene relación directa al menos con la presencia de polifenoles, como posteriormente se podrá observar, ya que en esta ocasión se trabajaron granada cuyo grado de maduración era menor lo cual brinda una mayor concentración de compuestos polifenólicos tanto en la corteza, como en el interior del fruto ya que a mayor grado de madures del fruto se ha observado una oxidación enzimática de los compuestos por parte de la enzima llamada polifenol oxidasa donde **Shwartz_2009 y Alvarado_2009**.

Para el caso de la variedad Apaseo fue estimada una respuesta de diámetro de halo de inhibición de 15.85 mm bajo una condición de extracción con acetona de 94.14% en mezcla con agua y un tiempo de extracción de 0.59 h aproximadamente, en cuanto al etanol se predice una respuesta de 21.04 mm de diámetro de halo de inhibición bajo una condición de 94.12% de etanol en mezcla con agua por un tiempo de extracción de 3.41 h donde las condiciones reales de extracción fueron de 94% de acetona por un tiempo de 1 h y en etanol fue de 80% en mezcla con agua por 2.5 h observándose en la primera situación un diámetro de inhibición de 20.03 mm siendo mayor y favorable la extracción en la variedad por lo que el punto óptimo estimado y probado resulto positivo. Para la segunda situación de tuvo un resultado de 16.13 mm esto ya que en dicha variedad los resultados con tendencia hacia los extremos del diseño de superficie de respuesta indican que aún pueden ser explorados, ya que al menos lo observado, esta variedad tiene compuestos fitoquímicos en abundancia que pueden ser extraídos por más tiempo y con polaridades diferentes de solventes para ser retirados en su mayoría del material vegetal, es por eso que al bajar las condiciones, los resultados obtenidos fueron mayores, concluyendo la variedad de Apaseo es la que mayoritariamente contiene compuestos fitoquímicos extraíbles bajo tiempos de extracción mayores a los evaluados en el trabajo.

Finalmente, en la variedad Tecozautla se proponía una condición de operación para la acetona de 94.14% con tiempo de extracción de 2.8 h cuya respuesta estimada sería de 16.37 mm, por otro lado, la situación propuesta para etanol fue de 94.14% de concentración con un tiempo de extracción de 3.41 h para así lograr una respuesta de 11.35 mm de diámetro de halo de inhibición, sin embargo las operaciones reales para acetona fueron de 94.% de concentración por 3.41 h y para etanol de 94% en mezcla con agua bajo un tiempo de 3.41 h obteniendo como respuesta 18.92 mm y 17.07mm de diámetro de halo de inhibición respectivamente, que se observa con ello, que ambas situaciones están orientadas de igual forma como en el caso de las variedades anteriores hacia los extremos superiores del diseño de superficie de respuesta, es por ello que aumentando el tiempo de extracción en acetona se consiguieron resultados mayores y aun que la condición optima propuesta y la real para etanol como solvente fue la misma se puede notar que es reproducible y se tuvieron resultados mayormente positivos por lo que se recomienda ampliar los rangos de evaluación en los tiempos de extracción para un aprovechamiento total de los compuestos y conseguir respuestas aún mayores.

En el año 2007 **Naz et al.** llevaron un trabajo en donde se evaluó la actividad antibacteriana de compuestos aislados del jugo de granada en Pakistán y se observaron inhibiciones frente a diferentes bacterias grampositivas como: *Bacillus subtilis*, diferentes tipos de *Corynebacterium*, *Micrococcus lisodieticus*, cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* así como frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 18 mm a 20.4 mm, indicándose la sensibilidad de las bacterias ante compuestos fitoquímicos como los polifenoles, y se hace específica esta afirmación ya que en el trabajo publicado se aislaron y purificación estos compuestos (polifenoles) como fueron pelargonidina-3-galactosa, quercetina, cianidina-3-glucosa y ácido gálico y en *S. aureus* se reportan halos de inhibición de 18.7 ± 0.1 mm, 18.4 ± 0.58 mm, 18.8 ± 0.58 mm, 22.6 ± 0.58 mm respectivamente, siendo muy próximos a los obtenidos en la experimentación, remarcando que esto sería tan solo en la cáscara de los frutos analizados por lo que el potencia como bactericida frente a bacterias grampositivas es significativo, por otro lado, se puede mencionar que la actividad observada se debe a la presencia de estos compuestos en particular en las cáscaras de la granada mexicana.

En la aplicación del diseño de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles con el método Soxhlet solo se evaluó el efecto de los compuestos frente a una bacteria del tipo grampositiva, sin embargo, es sabido que los polifenoles tienen un efecto bactericida sobre algunas bacterias del tipo gramnegativas, por lo que para esta etapa final se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad frente a la bacteria *E. coli* cuyos resultados fueron los siguientes:

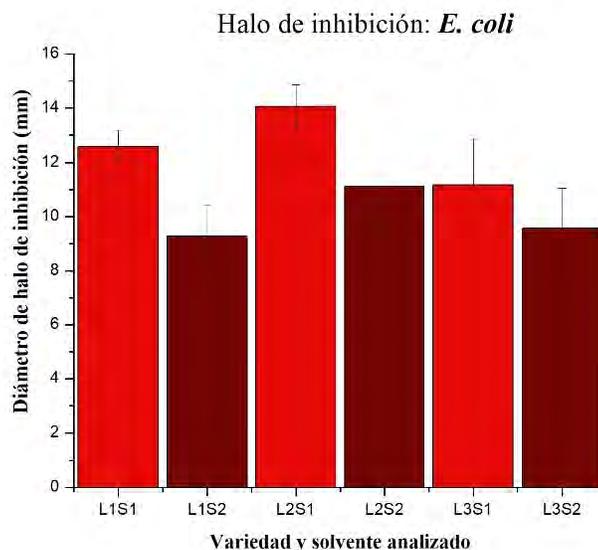


Figura 28. Sensibilidad en disco con medio sólido de extractos de cáscara de granada frente a bacteria gramnegativa. L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecozautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Tabla 25. Actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa de extractos cetónicos y etanólicos de cáscara de granada (*Punica granatum*).

Corrida experimental	Diámetro de halo de inhibición (mm)
L1S1	12.5833 ± 0.59133 b
L1S2	9.2833 ± 1.16003 d
L2S1	14.05 ± 0.81179 a
L2S2	11.1167 ± 0.54191 c
L3S1	11.1667 ± 1.70724 c
L3S2	9.5667 ± 1.47739 d

n=6, $\alpha=0.05$, las letras indican semejanza entre medias analizadas. L1=Wonderful, L2=Apaseo, L3=Tecozautla, S1=Acetona y S2=Etanol.

Se puede observar que hay sensibilidad a los extractos tanto cetónicos como etanólicos en la bacteria y cuyo comportamiento fue similar a lo observado frente a *S. aureus* sin embargo es sabido que hay una mayor sensibilidad en las bacterias grampositivas que en las bacterias gramnegativas, esto debido a la estructura celular que poseen cada una de ellas, y en específico a la comparación de sus paredes y membranas celulares.

Comparándose los resultados con trabajo elaborado por Naz *et al* mencionado anteriormente, se puede observar hay una similitud con lo reportado para *E. coli* WT, *E. coli* BU40 y *E. coli* FPL5014 ya que se tuvieron resultados de 12.2 mm, 12.6 mm y 11.3 mm respectivamente, encontrándose similares, y en algunos casos como en la variedad Apaseo, superiores, corroborando la sensibilidad mayoritaria de los extractos en las bacterias grampositivas que en las gramnegativas.

Recientemente, en el año 2018, Kharchoufi *et al.* evaluaron la actividad bactericida y antioxidante de extractos de cáscara de granada de la variedad “Gabsi” cuyos extractos fueron

obtenidos al estar en contacto con diferentes solventes los cuales fueron metano y agua a diferentes relaciones de volumen de solvente y peso del polvo de cáscara de granada cuyos rangos se ubicaban de los 15 a 30 v/w y en donde lo remarcable es que se usaron diferentes temperaturas de extracción las cuales fueron 25 °C, 40 °C, 55 °C y 75 °C, una vez obtenidos los extractos se estandarizaron bajo concentraciones de los 61 mg/ml a los 360 mg/ml y se evaluó el efecto de la sensibilidad frente a microorganismos como *Sacharomices cerevisiae*, *Pseudomona putida* y *Penicillum digitatum* obteniendo halos de inhibición de para *S. cerevisiae* de los 0.0 mm a los 12.5 mm, para *P. putida* de los 8.5 a los 30.4 mm y para *P. digitatum* de los 2 mm a los 24.5 mm, donde el mayor efecto se tuvo en los extractos donde se usó metanol como solvente, y en algunos caso como en el de *S. cerevisiae* y *P. digitatum* no hubo inhibición de los extractos donde se utilizó agua como solvente, por lo que este antecedente deja la posibilidad para evaluar el efecto de los extractos obtenidos en este trabajo frente a diferentes hongos y determinar si la composición de las variedades mexicanas resulta favorable para la inhibición de su crecimiento.

Como se mencionó en la cosecha 2017, es claro el efecto que existe entre las diferentes bacterias analizadas, ay que la bacteria que tuvo la menos inhibición fue *E. coli* por lo que se corrobora lo señalado por Tufar *et al.*, en el año 2008 lo que respecta a que este tipo de bacterias cuenta con sistemas de defensa mas complejos, así como se corrobora lo analizado que la granada de variedades mexicanas tienen metabolitos secundarios que son tóxicos en mayor medida con *S. aureus*.

Dumanet *al.* en el año 2009 reportan que la granada (*Punica granatum*) contiene compuestos fitoquímicos con actividad bactericida significativa señalándose que dichos compuestos fueron extraíbles con elevados rendimientos utilizando métodos de extracción con solvente y para los cuales, el utilizar metano, etanol agua y acetona resulto favorable en el estudio, en la investigación se pudo observar sensibilidad frente a *S. aureus*, así como a bacterias gramnegativas como *E. coli*, por lo que para futuras experimentaciones se contempla la evaluación del efecto bactericida frente a esta misma bacteria. Con este mismo trabajo se logra poner de manifiesto que la cantidad de pigmentos en las cortezas de las cáscaras no tiene una correlación con la actividad bactericida ya que no se encontró un factor de correlación importante entre el parámetro de color con el porcentaje de inhibición de crecimiento de las distintas bacterias analizadas por lo que con esto se puede concluir que la coloración de las variedades mexicanas no influye de manera directa con el efecto bactericida sobre diferente tipo de bacterias.

Se ha observado que la actividad bactericida de algunos extractos tiene efecto directo con la concentración de compuestos fenólicos simple, como lo puede ser el ácido gálico o el ácido elágico así como los complejos (Taninos), sin embargo también existe un efecto significativo con la cantidad de taninos que puede ser extraídos al usarse técnicas de extracción solido-liquido con solventes como alcoholes, acetona o agua, e incluso se ha observado un mayor rendimiento de extracción con mezclas de estos solventes y en menor medida cuando se utilizan puros. El efecto que tienen en general los fenoles sobre los microorganismo son los siguientes: (I) Acomplejamiento de enzimas encargadas de síntesis de pared celular o membranas lipídicas, así como son capaces de acomplejar sustratos importantes para el crecimiento (II) Los taninos

resultan tóxicos para las membranas bacterianas desestabilizándolas y haciendo que pierdan su carácter selectivo, (III) Acomplejamiento de iones metálicos (Akiyama *et al.*, 2001).

Como se observará en apartados posteriores, los extractos cetónicos y etanólicos tienen cantidades importantes de polifenoles totales, así como de flavonoides (tipo de compuestos fenólicos) cuya presencia tiene efecto bactericida ya que se sabe que los fenoles simples en base a los lugares y números de grupos hidroxilo en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad ya que ocurre una inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados ya que al ser los polifenoles compuestos antioxidantes, si un microorganismo es expuesto a elevadas concentraciones de estos, se convierten en moléculas prooxidantes y así, los compuestos oxidados del microorganismo pueden reaccionar con grupos sulfhídrico con las proteínas o causar alguna interacción no específica que altere el funcionamiento en las membranas, paredes o alguna ruta metabólica (Domingo & López-Brea, 2003).

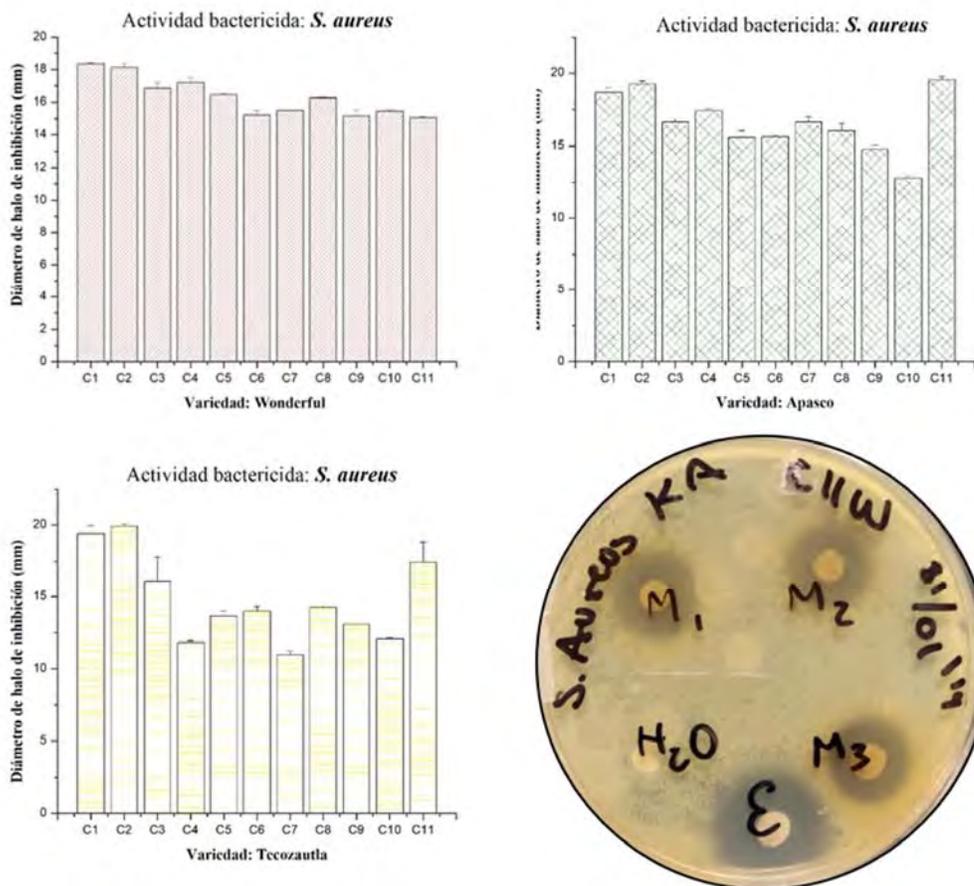
Por otro lado se ha observado que los compuestos fenólicos tienen un mayor efecto bactericida frente a bacterias grampositivas que con las gramnegativas, debido a que las bacterias gramnegativas tienen sistemas de defensa complejos frente a los antibióticos o a compuestos químicos dentro de los cuales se pueden mencionar: (I) modificación enzimática, (II) Bombas de expulsión, (III) Cambios en la permeabilidad de las membranas externas, y (IV) alteración del sitio de acción (Tafur *et al.*, 2008) por lo que se espera que la inhibición en las cosechas futuras sea menor en *E. coli* con respecto de *S. aureus*.

4.5. Extracción de polifenoles por método lixiviación

Para la extracción de polifenoles se realizó un análisis estadístico por el método de superficie de respuesta de tal manera que se pudiera evaluar la efectividad de la extracción usando como solvente agua y otro método de extracción que resultara comparable con el método Soxhlet evaluando dos factores los cuales fueron: tiempo de extracción y temperatura. Para ellos se realizaron anteriormente un análisis, donde, además de estos factores se evaluó la relación entre la cantidad de material vegetal y el solvente, estableciéndose como mejor condición de extracción 25 g de cáscara de granada seca. Por otro lado, como variables de respuesta se evaluarán las mismas analizadas en la extracción Soxhlet (actividad bactericida frente a *S. aureus* y *E. coli*, así como la actividad antioxidante con el método del radical ABTS⁺⁺ y DPPH para finalmente determinar la concentración de fenoles totales).

Evaluación de la actividad bactericida: frente a *Staphylococcus aureus*

Figura 29. Actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuos



cáscara de granada (*Punica granatum*) mexicana.

os de

Tabla 26. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Díámetro de halos de inhibición (mm)	
Wonderful	1	18.35 ± 0.071	a
	2	18.1 ± 0.283	a
	3	16.85 ± 0.354	bc
	4	17.2 ± 0.283	b
	5	16.45 ± 0.071	cd
	6	15.2 ± 0.283	e
	7	15.5 ± 0.023	e
	8	16.25 ± 0.071	d
	9	15.15 ± 0.354	e
	10	15.45 ± 0.08	e
	11	15.05 ± 0.65	e

n= 3, α=0.05. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 27. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Diámetro de halos de inhibición (mm)	
Apaseo	1	18.65 ± 0.354	b
	2	19.25 ± 0.212	ab
	3	16.65 ± 0.212	d
	4	17.4 ± 0.141	c
	5	15.55 ± 0.495	e
	6	15.6 ± 0.141	e
	7	16.65 ± 0.353	d
	8	16.05 ± 0.495	de
	9	14.75 ± 0.354	f
	10	12.75 ± 0.212	g
	11	19.55 ± 0.223	a

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 28. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria grampositiva en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Diámetro de halos de inhibición (mm)	
Tecozautla	1	19.4 ± 0.566	a
	2	19.9 ± 0.13	a
	3	16.1 ± 1.697	b
	4	11.8 ± 0.141	de
	5	13.65 ± 0.354	c
	6	13.95 ± 0.354	c
	7	11 ± 0.14	e
	8	14.2 ± 0.141	c
	9	13.05 ± 0.212	cd
	10	12.05 ± 0.071	de
	11	17.45 ± 1.344	b

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

La media muestral obtenida en la variedad Wonderful fue de 16.37 mm de halo de inhibición, 16.63 mm para la Variedad Apaseo y 14.53 mm para la variedad Tecozautla, donde al aplicar la prueba Post Hoc de Tukey HDS indica que no hay diferencias significativas ya que el análisis se hace comparando todos los pares de medias obtenidos en el análisis por corrida por lo que con este método se tendrían diferencias significativas si, y solo si, los resultados obtenidos en cada variedad fueran muy diferentes entre ellos y no hubiera datos parecidos, lo cual es difícil ya que, debido a que se variaron tiempo de extracción y temperatura en el método lo cual ocasiona una variabilidad importante. En base a esto se llevo a cabo la prueba de T de Student donde solo se comparan pares de medias a la vez donde se puede observar que la variedad Apaseo es la que tiene el resultado mayor de inhibición y la variedad Tecozautla es la que tiene el menor efecto bactericida sobre la bacteria, lo que respecta a la variedad Wonderful, el resultado obtenido indica una similitud de las inhibiciones tanto con la variedad Apaseo como con la variedad Tecozautla.

Comparando los resultados con las inhibiciones con el método Soxhlet, se puede observar que el comportamiento es similar ya que la variedad en donde se tuvo un mayor efecto fue en la variedad Apaseo donde se tuvo una inhibición de 20.03 mm con acetona como solvente, sin embargo con etanol como solvente los resultados fueron muy próximos en la misma variedad, pero fueron menores los obtenidos con el método de lixiviación para la variedad Tecozautla, ya que si se hace una comparativa entre los 3 solventes a través de los dos métodos se puede observar la importancia de la polaridad empleada con cada uno de ellos y que el comportamiento es similar a lo observado por **Yasoubiet al**, ya que la granada contienen compuestos fenólicos extraíbles a través de método Soxhlet y lixiviación con propiedades bactericidas, donde la mayor concentración se logra utilizando acetona como solvente, seguida de etanol a través del método Soxhlet y finalmente el efecto de se logró con agua como solvente a través del método de lixiviación.

Evaluación de la actividad bactericida: frente a *Escherichia coli*

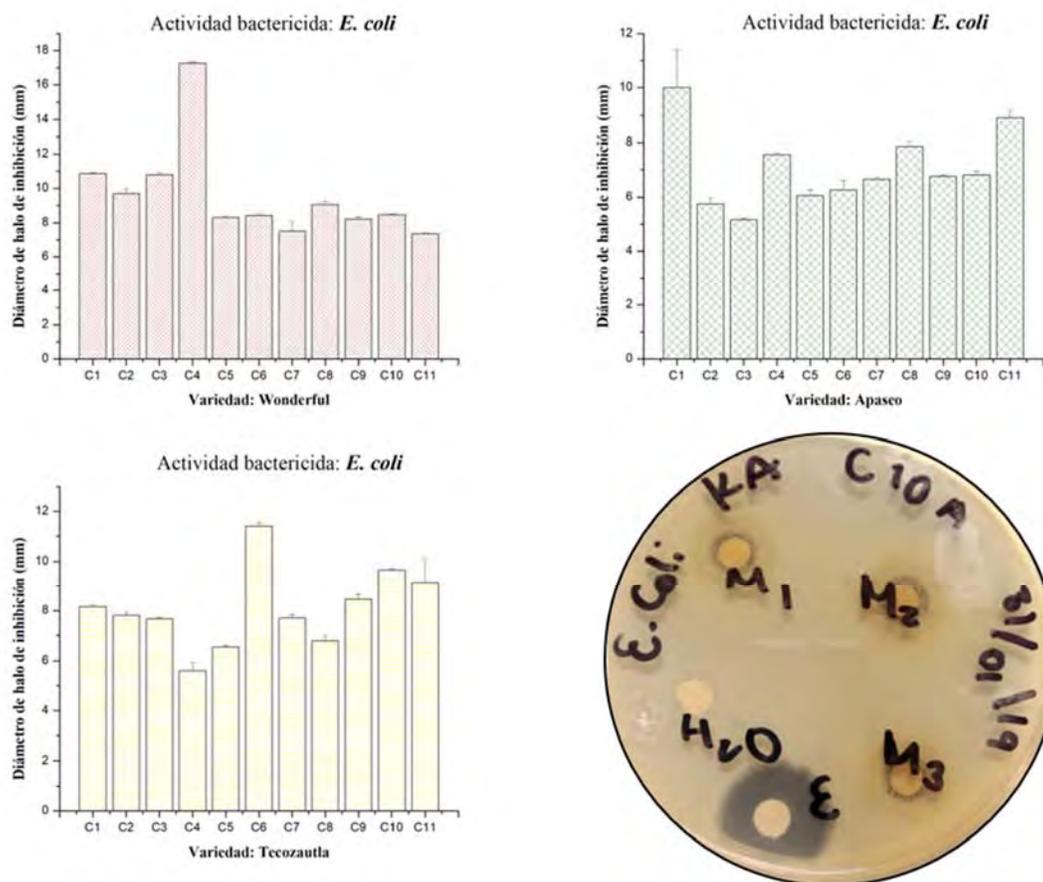


Figura 30. Actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada (*Punica granatum*) mexicana.

Tabla 29. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Diámetro de halos de inhibición (mm)	
Wonderful	1	10.85 ± 0.08	b
	2	9.7 ± 0.22	c
	3	10.8 ± 0.141	b
	4	17.25 ± 0.06	a
	5	8.3 ± 0.05	e
	6	8.4 ± 0.141	e
	7	7.5 ± 0.56	f
	8	9.05 ± 0.212	d
	9	8.2 ± 0.101	e
	10	8.45 ± 0.07	e
	11	7.35 ± 0.068	f

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 30. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Diámetro de halos de inhibición (mm)	
Apaseo	1	10 ± 1.414	a
	2	5.75 ± 0.21	fg
	3	5.15 ± 0.08	g
	4	7.55 ± 0.073	cd
	5	6.05 ± 0.215	efg
	6	6.25 ± 0.357	ef
	7	6.65 ± 0.065	def
	8	7.85 ± 0.212	cd
	9	6.75 ± 0.0691	def
	10	6.8 ± 0.141	de
	11	8.9 ± 0.283	b

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 31. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad bactericida frente a bacteria gramnegativa en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Diámetro de halos de inhibición (mm)	
Tecozautla	1	8.15 ± 0.07	cd
	2	7.8 ± 0.141	cd
	3	7.65 ± 0.068	d
	4	5.6 ± 0.33	f
	5	6.55 ± 0.070	e
	6	11.4 ± 0.141	a
	7	7.7 ± 0.15	d
	8	6.8 ± 0.17	e
	9	8.45 ± 0.212	cd
	10	9.65 ± 0.065	b
	11	9.15 ± 0.919	b

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

La media muestras frente a *E. coli* fue de 9.62 mm de halo de inhibición para los extractos de la variedad Wonderful, 6.92 mm de halo de inhibición para la variedad Apaseo y 8.06 mm para la variedad Tecozautla siendo el mismo comportamiento que el reportado frente a *S. aureus*. Con el método Soxhlet se lograron diámetros de halo de inhibición de hasta 14 mm en los extractos cetónicos de la variedad Apaseo y de 11.11 mm en los extractos etanólicos de la misma variedad por lo que resulta conveniente acetona como solvente para extraer compuestos que impidan el crecimiento de *E. coli* seguido de etanol y finalmente agua bajo la condición de lixiviación en este ultimo.

Evaluación de la actividad antioxidante: método ABTS⁺⁺

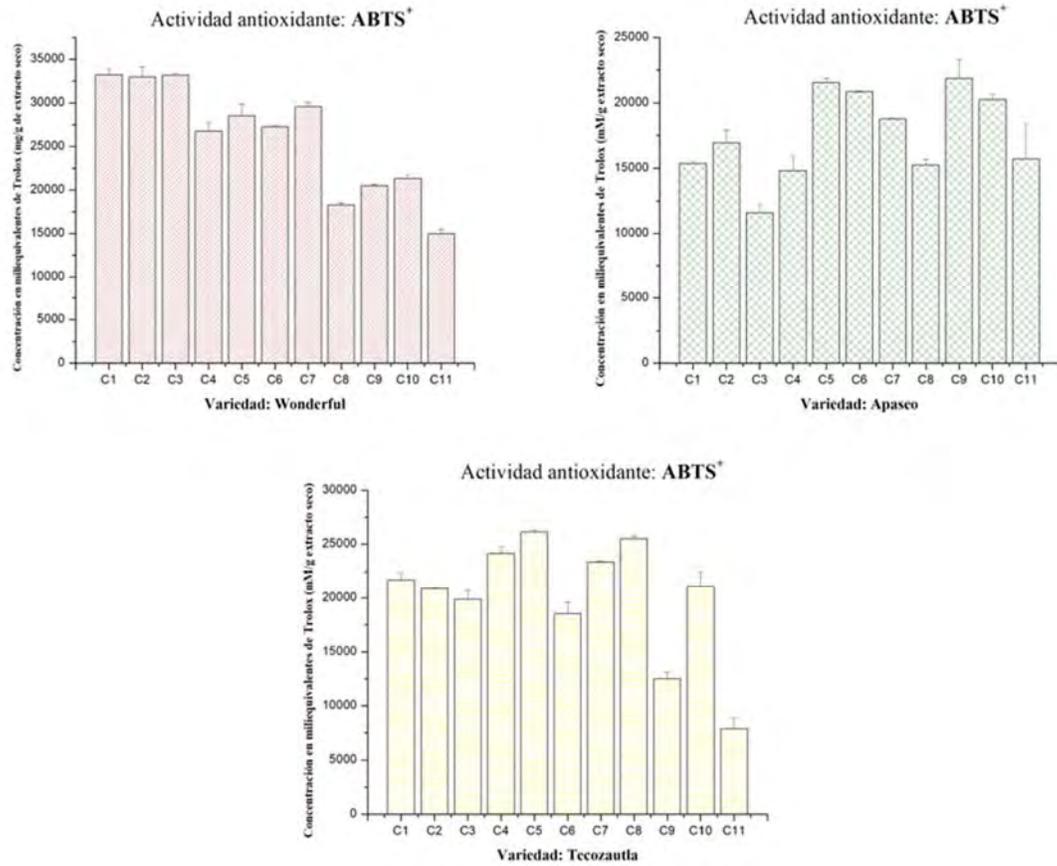


Figura 31. Actividad antioxidante evaluada por método del radical ABTS⁺⁺ en extractos acuosos de cáscara de granada (*Punica granatum*) mexicana.

Tabla 32. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS⁺ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Wonderful	1	33191.7 ± 634.52	a
	2	32915.7 ± 1220.18	a
	3	33157.2 ± 210.2	a
	4	26738 ± 976.13	d
	5	28532.6 ± 1366.59	bc
	6	27255.7 ± 146.44	cd
	7	29568 ± 488.08	b
	8	18282.7 ± 244.02	f
	9	20491.4 ± 146.44	e
	10	21319.7 ± 439.29	e
	11	14969.5 ± 536.91	g

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 33. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS⁺ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Apaseo	1	15349.2 ± 195.23	d
	2	16936.7 ± 976.13	cd
	3	11587.4 ± 634.49	e
	4	14797 ± 1073.74	d
	5	21526.8 ± 341.67	a
	6	20802 ± 97.62	ab
	7	18765.8 ± 48.79	bc
	8	15243.4 ± 442.44	d
	9	21837.4 ± 1464.21	a
	10	20249.8 ± 390.46	ab
	11	15694.3 ± 2733.18	d

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 34. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de ABTS⁺ en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Tecozautla	1	21699.3 ± 683.28	d
	2	20836.5 ± 146.44	de
	3	19870.2 ± 829.72	ef
	4	24149.7 ± 634.49	bc
	5	26116.8 ± 195.23	a
	6	18524.2 ± 1073.78	f
	7	23355.9 ± 97.62	c
	8	25495.6 ± 292.81	ab
	9	12484.7 ± 634.49	g
	10	21078.1 ± 1366.59	de
	11	7860.1 ± 1024.92	h

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

El comportamiento observado al momento de evaluar la actividad antioxidante indica una media muestral de 26038.38 EAG mg/g de extracto seco para la variedad Wonderful, 17526.35 EAG mg/g de extracto seco para la variedad Apaseo y una concentración de 20133.74 EAG mg/g de extracto seco para la variedad Tecozautla. Aplicando la prueba de T de Student se puede observar que la única variedad que es diferente entre las tres trabajadas es la variedad Wonderful, este mismo comportamiento se observó con la prueba Post Hoc de Tukey HSD por lo que en esta condición experimental trabajada le logró la mayor actividad antioxidante de compuestos extraíbles en la variedad Wonderful.

Lo que respecta a la comparación de solventes y métodos de extracción utilizando el método Soxhlet fue con el que se reportaron las mayores concentraciones tanto con acetona como solvente, así como con etanol, sin embargo, como se había mencionado antes, la acetona resulto el solvente con el que se registró la mayor actividad del radical ABTS⁺, y dentro de las tres variedades trabajadas con acetona, la variedad Apaseo fue la que tuvo una mayor extracción de compuestos, este mismo comportamiento se registró en los extractos etanólicos posteriormente la actividad significativa se registró con los extractos acuosos con este método de lixiviación siendo por tanto los siguientes en equivalentes de Trolos: extracto cetónico variedad Apaseo de 152505 mM/g de extracto seco, extracto etanólicos variedad Apaseo 87078 mM/g de extracto seco y de 26038.38 mM/g de extracto seco en los extractos acuosos. Por lo tanto el comportamiento puede explicarse ya que con el método Soxhlet los tiempos de extracción, los cuales fueron superiores a los aplicados en lixiviación, resultan favorables para extraer una mayor cantidad de compuestos con propiedades antioxidantes sin ser estos afectados significativamente, por otro lado, aunque los compuestos fitoquímicos resultan afectados al exponerse a altas temperaturas, se puede observar que las temperaturas usadas en el método Soxhlet resultan favorables para liberarlos ya que con acetona, las concentraciones de los extractos acuosos son 6 veces menores.

Evaluación de la actividad antioxidante: método DPPH

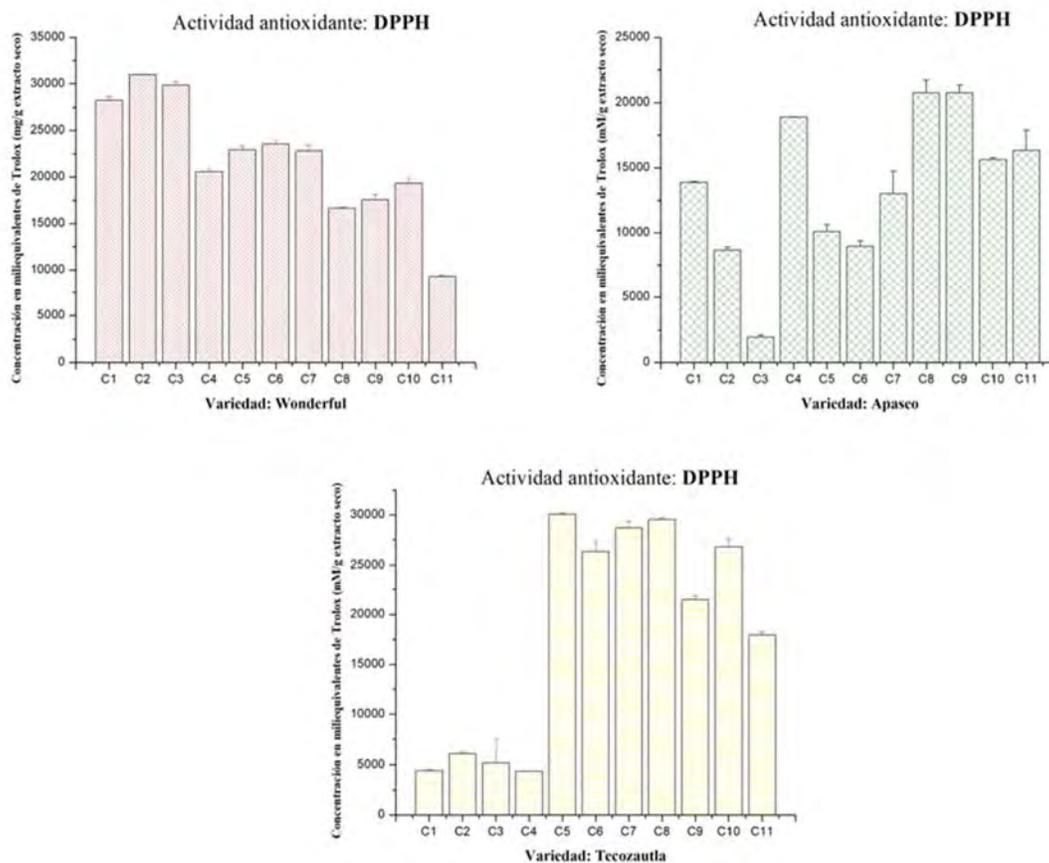


Figura 32. Actividad antioxidante evaluada por método del radical DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada (*Punica granatum*) mexicana.

Tabla 35. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.

Variiedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Wonderful	1	28244.3 ± 393.576	c
	2	30984.5 ± 30.264	a
	3	29807 ± 423.84	b
	4	20580.3 ± 272.448	e
	5	22935.1 ± 393.576	d
	6	23555.9 ± 423.875	d
	7	22849.5 ± 635.795	d
	8	16619.8 ± 121.127	h
	9	17561.8 ± 544.967	g
	10	19317.2 ± 605.496	f
	11	9298.3 ± 121.092	i

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 36. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Apaseo	1	13879.6 ± 60.53	de
	2	8656.1 ± 242.18	f
	3	1955.5 ± 151.39	g
	4	18867.6 ± 30.3	b
	5	10111.8 ± 484.4	f
	6	8955.8 ± 423.84	f
	7	13001.9 ± 1725.69	e
	8	20730.1 ± 968.81	a
	9	20730.1 ± 605.5	a
	10	15613.7 ± 151.39	cd
	11	16341.5 ± 1544.04	c

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 37. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por método de DPPH en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración miliequivalentes de Trolox (mM/g de extracto seco)	
Tecozautla	1	4417.4 ± 60.56	e
	2	6108.6 ± 151.36	e
	3	5188.1 ± 2300.93	e
	4	4353.2 ± 30.26	e
	5	30063.9 ± 60.53	a
	6	26381.8 ± 968.81	b
	7	28672.4 ± 696.32	a
	8	29550.1 ± 181.66	a
	9	21479.4 ± 393.58	c
	10	26809.9 ± 847.71	b
	11	17947.1 ± 302.75	d

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Los extractos acuosos fueron caracterización, al igual que los extractos cetónicos y etanólicos, con el método de inhibición del radical DPPH donde en las pruebas Post Hoc de T de Student se aprecia una diferencia significativa entre variedades, siendo completamente distintas las variedades Wonderful con respecto de la variedad Apaseo, lo que respecta a la variedad Tecozautla, resultado la variedad con semejanzas parciales con respecto de la variedad Wonderful y Apaseo, sin embargo, realizando la comparación de todos los pares de medias con la prueba de Tukey HSD y al tratarse de una cantidad importante de corridas experimentales (11) todas las variedades son semejantes entre ellas. Al igual que en la prueba del radical ABTS⁺ la variedad Wonderful fue la que tuvo la mayor concentración de miliequivalentes de Trolox siendo de 21977.61 mM/g de extracto seco, por otro lado al compararse con el método Soxhlet resultan concentraciones menores ya que el máximo en concentración con Soxhlet se registraron de igual forma en los extractos cetónicos de la variedad Apaseo siendo de 117936 mM/g de extracto seco y de 60832 mM/g de extracto seco en los extractos etanólicos de la misma variedad por lo que

ambas actividades antioxidantes reportadas a lo largo del trabajo de investigación muestran correlación entre los métodos de inhibición y las variedades utilizadas en cada uno de ellos.

Determinación de Fenoles totales

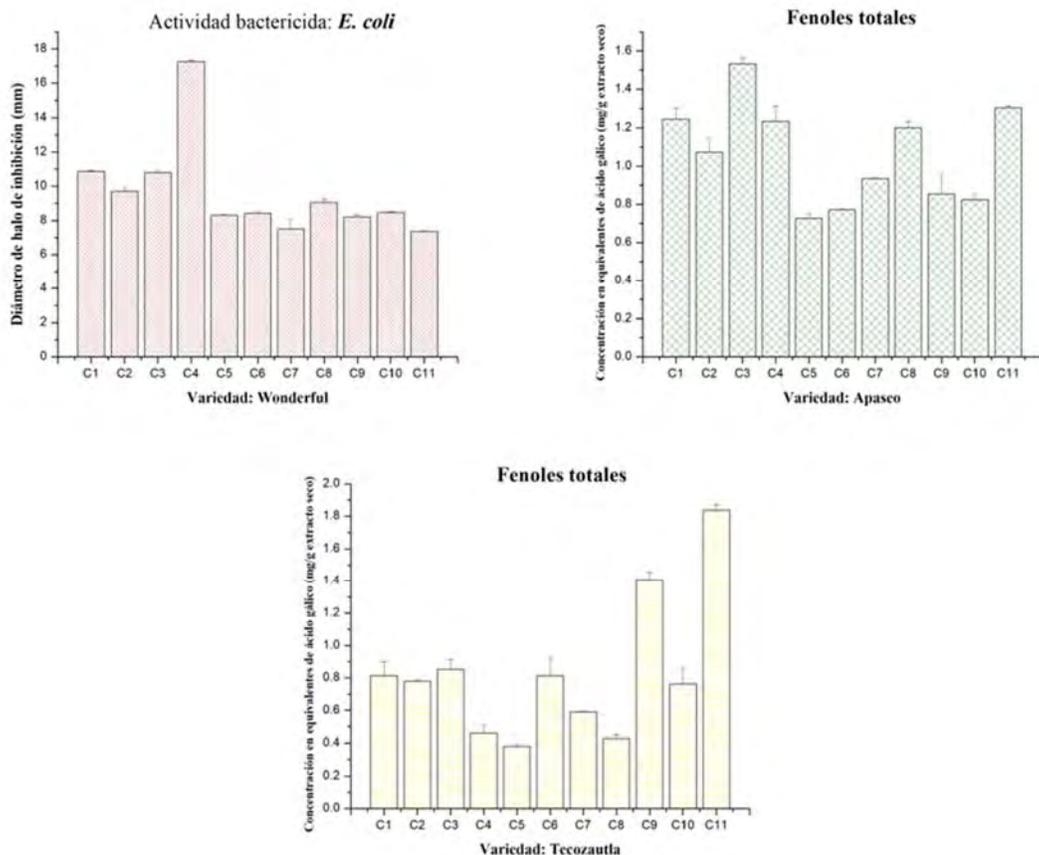


Figura 33. Fenoles totales cuantificados por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada (*Punica granatum*) mexicana.

Tabla 38. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Wonderful obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración equivalentes de ácido gálico (mg/g de extracto seco)	
Wonderful	1	0.644 ± 0.025	ef
	2	0.6645 ± 0.055	de
	3	1.1895 ± 0.004	a
	4	0.84375 ± 0.007	bc
	5	0.784 ± 0.003	bcde
	6	0.7345 ± 0.007	cde
	7	0.784 ± 0.004	bcde
	8	0.5085 ± 0.055	f
	9	0.81 ± 0.055	bcd
	10	0.89825 ± 0.062	b
	11	0.64625 ± 0.051	ef

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 39. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Apaseo obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración equivalentes de ácido gálico (mg/g de extracto seco)	
Apaseo	1	1.244 ± 0.059	b
	2	1.0725 ± 0.074	c
	3	1.53225 ± 0.032	a
	4	1.23375 ± 0.081	b
	5	0.72675 ± 0.026	f
	6	0.77075 ± 0.007	ef
	7	0.93475 ± 0.004	d
	8	1.19975 ± 0.033	b
	9	0.85425 ± 0.103	de
	10	0.82275 ± 0.029	def
	11	1.30375 ± 0.011	d

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Tabla 40. Análisis de ANOVA en el diseño de superficie de respuesta para la cantidad de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu en extractos acuosos de cáscara de granada mexicana variedad Tecozautla obtenidos por método de lixiviación.

Variedad	No. de corrida experimental	Concentración equivalentes de ácido gálico (mg/g de extracto seco)	
Tecozautla	1	0.8125 ± 0.088	c
	2	0.77875 ± 0.011	c
	3	0.8515 ± 0.062	c
	4	0.459 ± 0.052	de
	5	0.381 ± 0.015	e
	6	0.8125 ± 0.117	c
	7	0.589 ± 0.007	d
	8	0.42775 ± 0.023	e
	9	1.40775 ± 0.048	b
	10	0.76075 ± 0.103	c
	11	1.8365 ± 0.037	a

n= 3, $\alpha=0.05$. Las letras representan diferencias significativas entre corridas experimentales.

Finalmente con la prueba de fenoles totales se puede denotar que en ambos métodos se logra la extracción de compuestos con actividad antioxidante y bactericida cuyo comportamiento se puede reafirmar que se debe a la presencia de los polifenoles, en este caso las medias muestrales de cada una de las variedades fueron de 0.773 mg/g de extracto seco, 1.063 mg/g de extracto seco y 0.829 mg/g de extracto seco para la variedad Wonderful, Apaseo y Tecozautla respectivamente, y es entonces donde se propone un análisis más exhaustivo en cuanto a la optimización y extracción de polifenoles con actividad antioxidante ya que hasta el momento no se logró encontrar una correlación directa con la presencia de polifenoles como en el caso de los extractos obtenidos por el método Soxhlet lo cual se puede deber a que bajo las condiciones de lixiviación se vea favorecida para extracción de otros compuestos con las actividades buscadas en este proyecto.

Capítulo 5. Conclusiones

Las pruebas realizadas en la caracterización si permiten la estandarización del estado de maduración al cual se está trabajando ya que hay una relación entre las características del fruto con su desarrollo. Por otro lado, se concluye que el secado de cáscara con el que se trabajó anterior a la aplicación del diseño exploratorio no afectó los compuestos fitoquímicos de interés a extraer ya que los extractos obtenidos a diferentes temperaturas y tiempos de secado no tuvieron variación y mostraron % de inhibición del radical ABTS⁺ altos, además de que se pudo observar que con rangos probados fuera de los establecidos el mayor daño se veía influenciado por el tiempo debido a que la inhibición del radical fue menor en corridas donde se trabajó con extractos con los tiempos de secado mayores (corrida 7 y 9), esta observación fue reforzada con la prueba de fenoles totales cuyo comportamiento fue similar y permitió observar a la vez que en la corrida con el menor tiempo de secado (punto estrella) hubo una mayor concentración de fenoles totales, sin embargo, la muestra bajo estas condiciones no quedaba completamente seca y hay mayor riesgo de que durante su almacenamiento pueda desarrollar crecimiento de algún hongo. En cuanto a la extracción y evaluación de las actividades bactericida y antioxidante se puede concluir que la cáscara de granada contiene cantidades considerables de compuestos polifenólicos con dichas propiedades ya que sí hubo una correlación significativa entre la presencia de estos y las variables de respuesta medibles, tanto en los halos de inhibición así como en las inhibiciones de los radicales artificiales usados, donde además se puede concluir que los métodos de extracción, ya sea Soxhlet o lixiviación, no resultan métodos agresivos para los compuestos a las condiciones operadas. De igual manera se puede concluir que las variedades Wonderful y Tecozautla pueden ser expuestas a tiempos mayores de extracción para encontrar el punto óptimo, como lo logrado en el lote de la variedad de Apaseo, ya que se observó una disminución de compuestos polifenólicos al momento de extender los tiempos de extracción lo que tuvo efecto sobre la actividad bactericida y antioxidante debido a que al agotarse la extracción comenzó una degradación de los compuestos, esto logró corroborarse en la validación de los puntos óptimos calculados en la cosecha 2017 ya que la variedad Apaseo fue la que tuvo la mayor actividad antioxidante y bactericida en la cosecha 2018 al ser la única que se trabajó sobre un punto óptimo (establecido con el diseño de superficie de respuesta en la cosecha 2017) por lo que se propone seguir explorando las extracciones en mayor tiempo en las variedades Wonderful y Tecozautla. Con la comparativa de los métodos de extracción se puede finalmente concluir que el Soxhlet tiene un mayor rendimiento de compuestos polifenólicos extraíbles que el método de extracción por lixiviación y que en cuanto a los solventes utilizados, la acetona resulta un solvente favorable para los compuestos con efectos significativos en ambas propiedades, este mismo análisis permite concluir que el etanol resulta menos favorable que la acetona por las temperaturas involucradas en la extracción y en última instancia se tiene el agua como solvente cuya polaridad no extrajo compuestos la misma actividad bactericida y antioxidante significativa. Es por eso por lo que se puede concluir de manera general que la granada contiene cantidades significativas de polifenoles con actividad antioxidante y bactericida extraíbles por método Soxhlet y lixiviación en comparación con otros frutos que permiten dar un valor agregado al consumo y producción del fruto, ya que la cáscara puede ser aprovechada y no solo ser desechada.

Bibliografía general

- Aherne, S., and O'Brien, N. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutritional Science*. 18: 75- 81.
- Akbarpour, V., Hemmati, K., and Sharifani, M. (2009). Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit in Maturation Stage. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 6(4): 411- 416.
- Alanís, A. (2006). Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum L.* (Granado). Escuela superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Distrito federal. México.
- Alcaraz, F., Martínez, J., and Hernández, F. (2014). Propiedades físicas y químicas de los arilos y semillas de nueve variedades de granado. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. 1: 1-4.
- Álvarez, J., Galvis, J., and Balaguera, H. (2009). Determinación de cambios físicos y químicos durante la maduración de frutos de champa (*Campomanesia lineatifolia R. & P.*). *Agronomía Colombiana*. 27(2): 253-259.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., and Fernández, G. (2001). Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la facultad de medicina*. 62(2): 156- 161.
- Ames, B., Shigenaga, M., and Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the national academy of sciences*. 90: 7915- 7922.
- Brummell, D., V. DalCin, C. Crisosto, J., and Labavitch. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55(405): 2029-2039.
- Cardona, E., Ríos, L., and Restrepo, G. (2006). Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicon esculentum*). *Revista de la facultad de química farmacéutica*. 13(2): 44- 53.
- Cartaya, O., and Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. 22(2): 5- 14.
- Cerón, I., and Cardona, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. *Ingeniería y ciencia*. 7(13): 65- 86.
- Cerón, I., Higuera, J., and Cardona, C. (2011). Actividad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*. 5: 17- 26.
- Cortes, C. (2016). Manual de Técnicas del laboratorio. Laboratorio de Biotecnología alimentaria. Facultad de químico farmacobiología. Michoacán, México.

Croteau, R., Kutchan, T., and Lewis, N. (2000). Natural products (Secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants. *American society of plant physiologists*. 24: 1250-1318.

Delgado, L., Betanzos, G., and Sumaya, M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*. 1(50): 10- 15.

García, A., and Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie fisiología vegetal*. 2(3): 119- 145.

Geleijnse, J., Launer, L., Van der Kuip, D., Hofman, A., and Witteman, J. (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *The American journal of clinical nutrition*. 75: 880- 886.

González, J. (2017). Manuel de Técnicas del laboratorio de Bioquímica. Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Morelia. Michoacán, México.

Gracia, M. (2011). Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en extractos Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

Haidari, M., Ali, M., Ward, S., and Madjid, M. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*. 16:1127-1136.

Hernández, T., Canales, M., Caballero, J., Durán A., and Lira, R. (2005). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotlán de las Salinas, México. *Interciencia*. 30(9):529- 535.

Hertog, M., Hollman, P., and Katan, M. (1992). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:2379- 2383.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53:1841- 1856.

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos*. 25(4):726- 732.

Laguado, N., Pérez, E., Alvarado, C., and Marín, M. 1999. Características fisicoquímicas y fisiológicas de frutales de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*. 16:382-397.

Liu, B., and Zhu, Y. (2007). Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. *Journal of food engineering*. 78:584- 587.

López, A. and Palou, E. (2010). Granada (*Punica granatum L.*): una fuente de antioxidantes de interés actual. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 4(1):64- 73.

López, V., and Artés, F. (2007). Evaluación de la calidad de granadas tratadas con UV-C y almacenadas en atmósferas controladas. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología de Postcosecha y Agroexportaciones*. 1:137- 145.

Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A., and Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron.* 20: 502-512.

Martínez, M., Molina, N., and Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava L.* (guayaba). *Revista cubana de plantas medicinales*. 2(1):12- 14.

Martínez, S., González, J., Culebras, J., and Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 6:271- 278.

Mercado, E., Candelario, J., Rocha, L., and Álvarez, B. (2011). Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(3):449-459.

Morton, J. (1987). Pomegranate. *Fruitsofwarmlimates*. 352- 355.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., and Packer, L. (2002). Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50:166-171.

Osuna, T., Tapia, M., and Aguilar, C. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Universidad de Barcelona: 173.

Özgülven, A., Yılmaz, M., and Yılmaz, C. (2009). The situation of pomegranate and minor mediterranean fruits in Turkey. *International symposium on pomegranate and minor mediterranean fruits*.

Plazas, E. (2011). Curso de aceites esenciales: química y proceso de producción. Jardín Botánico de Bogotá. Centro de Investigación y Desarrollo Científico. Bogotá, Colombia.

Raga, J., Mármol, Z., Pérez, E., Paéz, G., and Araujo, K. (2015). Evaluación fisicoquímica y fitoquímica de granada (*Punica granatum L.*). *Revista Tecnocientífica URU*. (8):47- 55.

Rendiles, E., Marín, M., Rincón, C., and Ferrer, O. 2004. Variación en la concentración de minerales en frutos de guayabo (*Psidium guajava L.*) del tipo criolla roja durante su desarrollo. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*. 21(1):306-313.

Sabbar, S., Naiman, M., Tabassum, H., and Mazharuddin, K. (2010). Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *Journal of agriculture and environmental sciences*. 9(3):273- 281.

Salamanca, G., Correa, I., and Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índice de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*. 25(2):95- 102.

Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., and Ebadi, A. (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes. *Scientia Horticulturae*. 111:24- 29.

Saskia, A., Van Den Berg, D., Tromp, M., Griffioen, D., Van Bennekom, W., Van Der Vijgh, W., and Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Radical biology & medicine*. 20(3):331- 342.

Sepúlveda, G., Porta, H., and Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*. 21(3):355- 363.

Singh, R., Chidambara, K., and Jayaprakasha, G. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50: 81- 86.

Skrede, G., Wrolstad, R., and Durst, R. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*). *Journal of Food Science*. 65(2):357–364.

Somers, T., and Evans, M. (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, 25:31–39.

Syed, D., Farrukh, A., and Mukhtar, H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention (separar letras). *Seminars in cancer biology*. 17:377- 385.

Taberner, V. (2011). Aplicación de extractos de granada para el control de podredumbre en poscosecha de frutos cítricos. Centro de Tecnología Poscosecha. Universidad Politécnica de Valencia. España.

Tezcan, F., Gültekin, M., Diken, T., Özcelik, B., and Erim, B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic organic acid and sugar content in commercial pomegranate juice. *Journal of food chemistry (Separar palabras)*. 115: 873- 877.

Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS+ de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Escuela de tecnología química. Facultad de tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

Turfan, Ö., Türkyilmaz, M., Yemis, O., and Özkan, M. (2011). Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*. 129:1644-1651.

USDA. 2009. National nutrient database for (Separar letras) standard, United States Department of Agriculture (Separar letras). <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Accesada 20/10/2016.

Vázquez, A., Cala, M., Tafurt, G., Martínez, J., and Stashenko, E. (2007). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidensreptons* y *Montanoaovalifolia*. *Scientia et Technica*. 13(33):205- 207.

Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista cubana de medicina militar*. 31(2):126- 133.

Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B., Medina, M., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., and Vuorela, P. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum L.* (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *Journal of ethnopharmacology (Separar palabras)*. 89: 295- 300.

Wootton-Beard, P., Moran, A., and Ryan, L. (2010). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS+ and Folin-Ciocalteu methods. *Food research international*. 44:217-224.

Yang K, Lamprecht, S., and Liu, Y. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. 21:1655-1660.

Zamora, J. 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182007000100002>

Zarei, M., Azizi, M., and Bashir-Sadr, Z. (2011). Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit during ripening. *Fruits*. 66(2):121-129.

Capítulo 6. Anexos

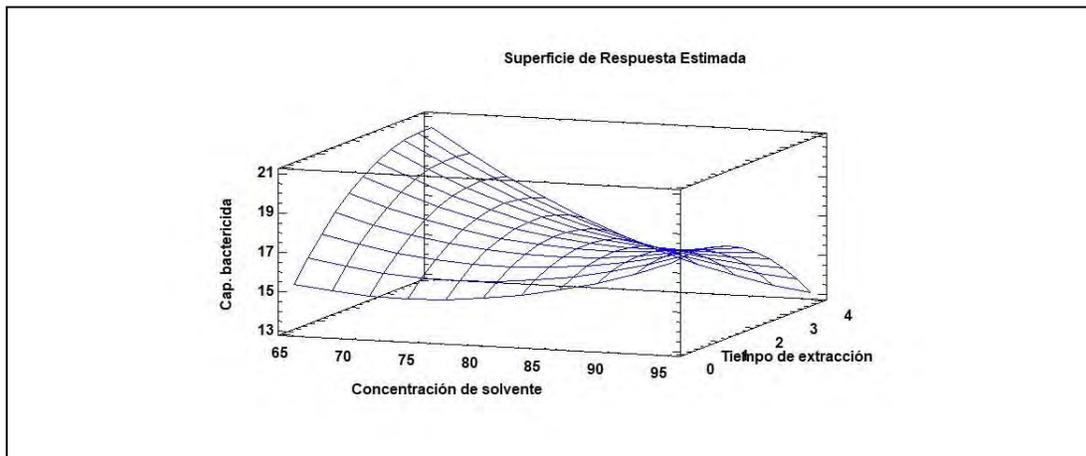


Figura 34.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

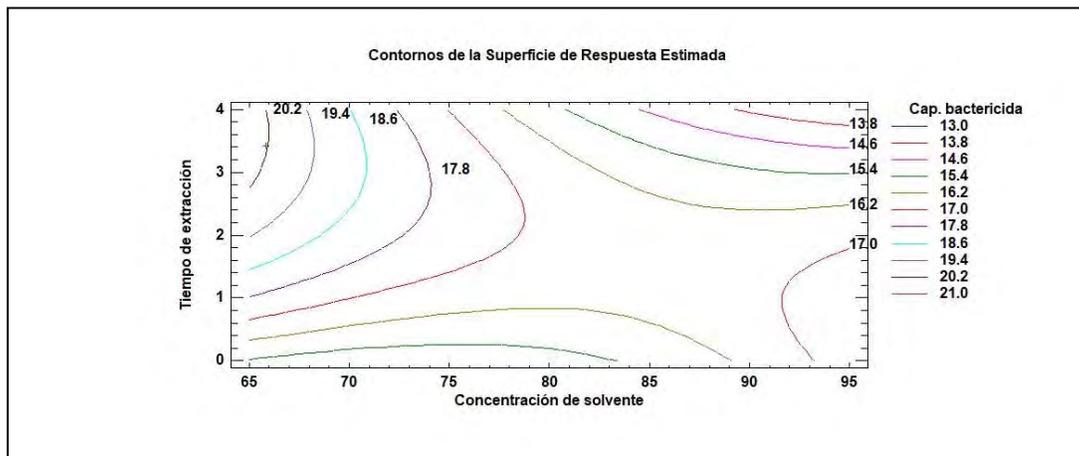


Figura 35.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

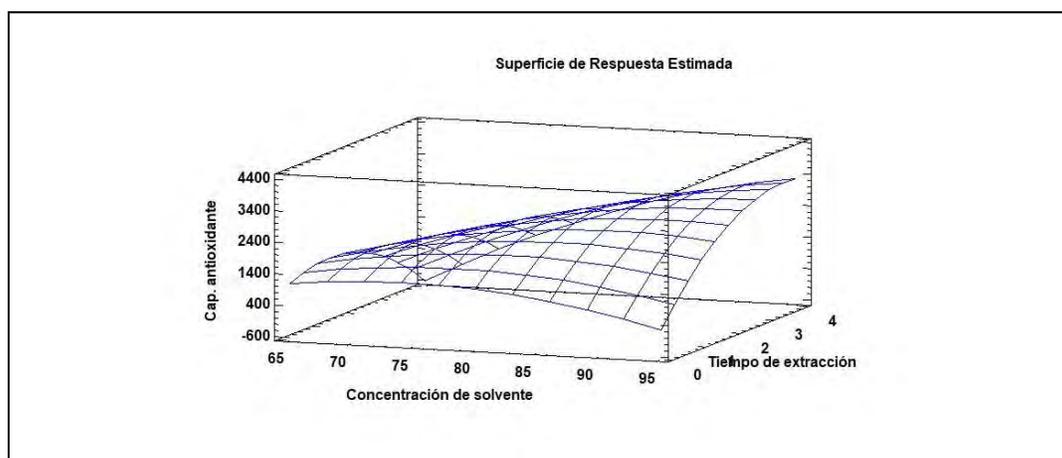


Figura 36.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS⁺⁺ obtenido del lote 1 con acetona como solvente.

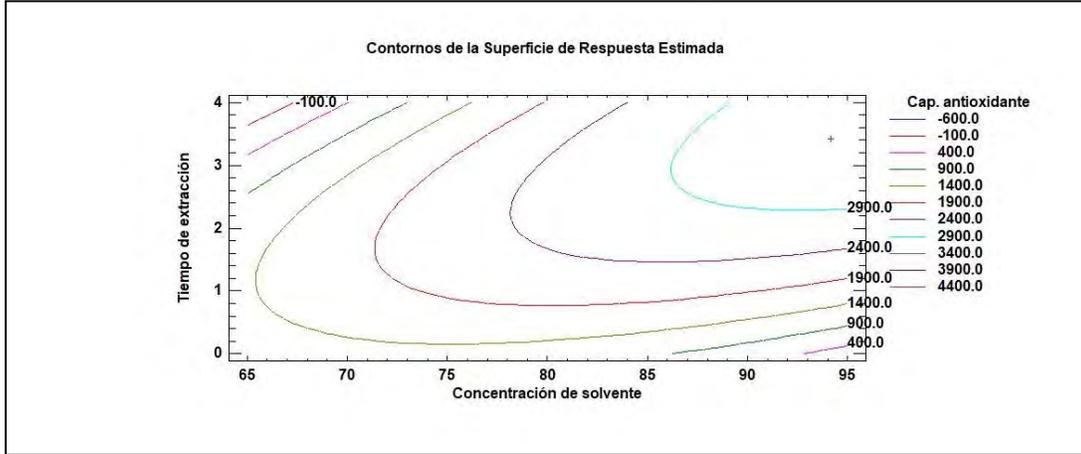


Figura 37.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 1 con acetona como solvente.

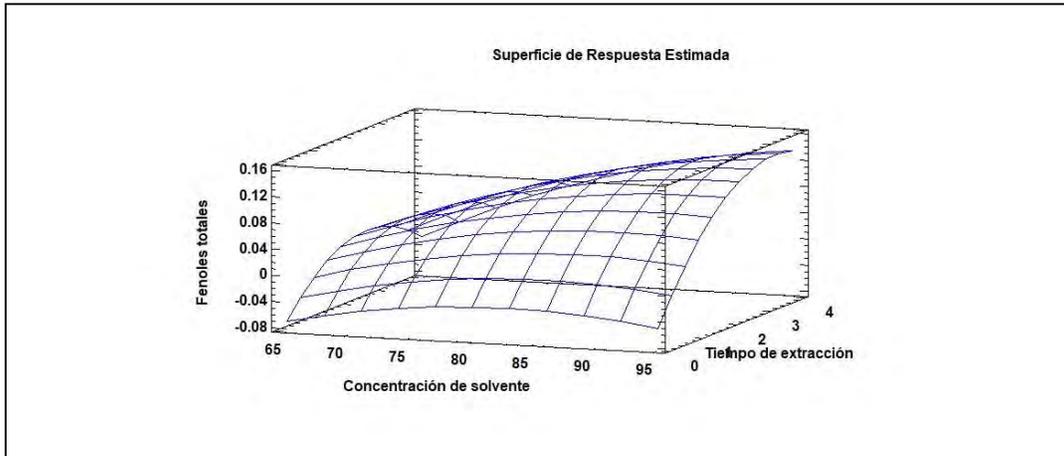


Figura 38.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.

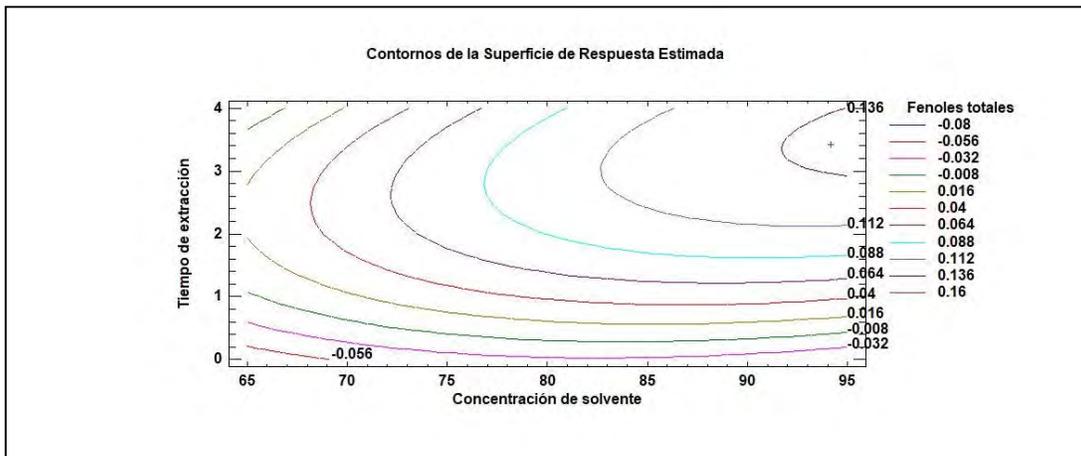


Figura 39.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.

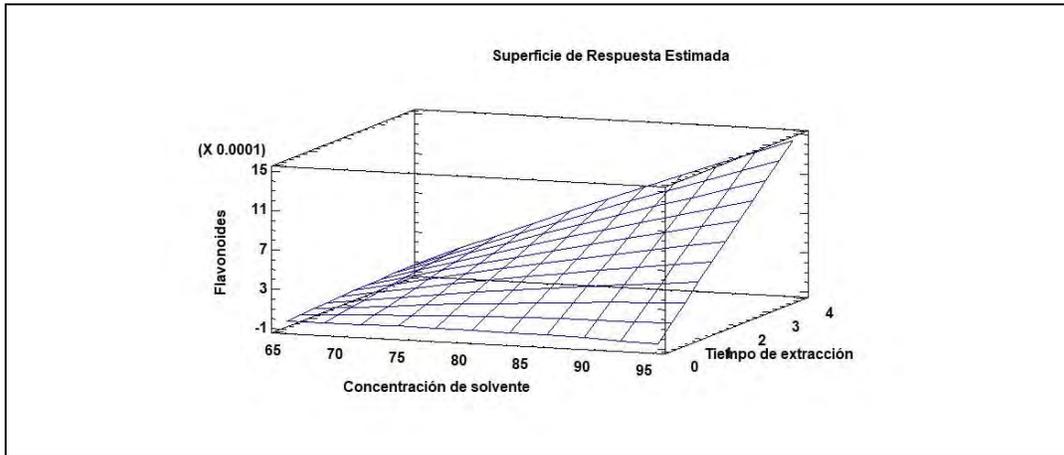


Figura 40.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.

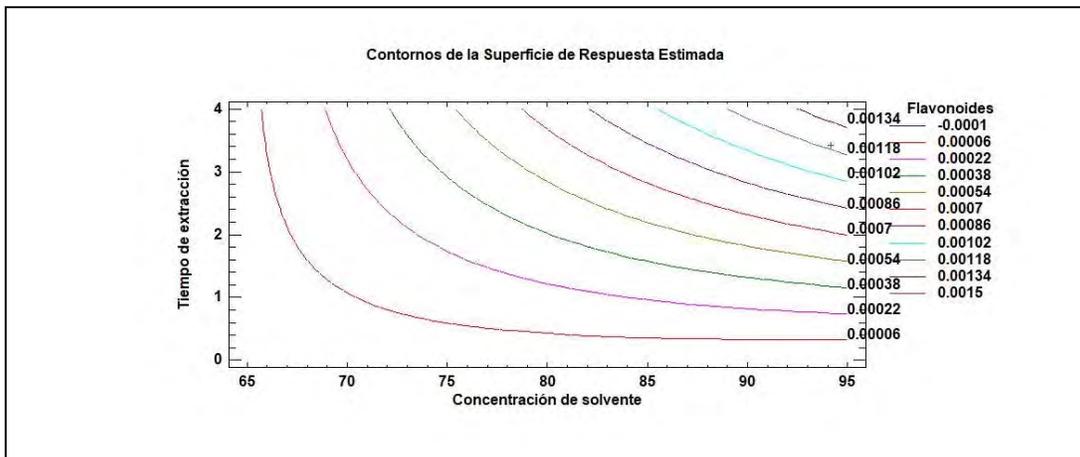


Figura 41.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con acetona como solvente.

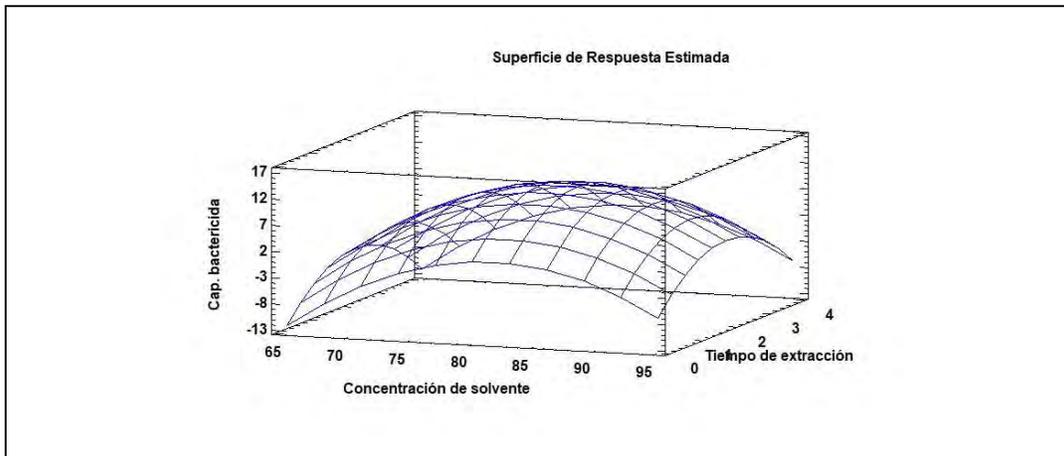


Figura 42.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con etanol como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

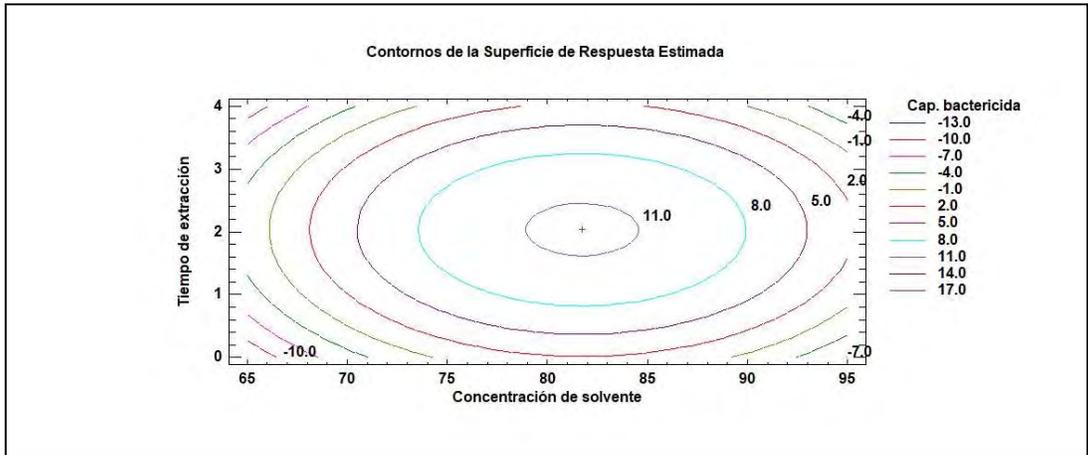


Figura 43.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 1 con etanol como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

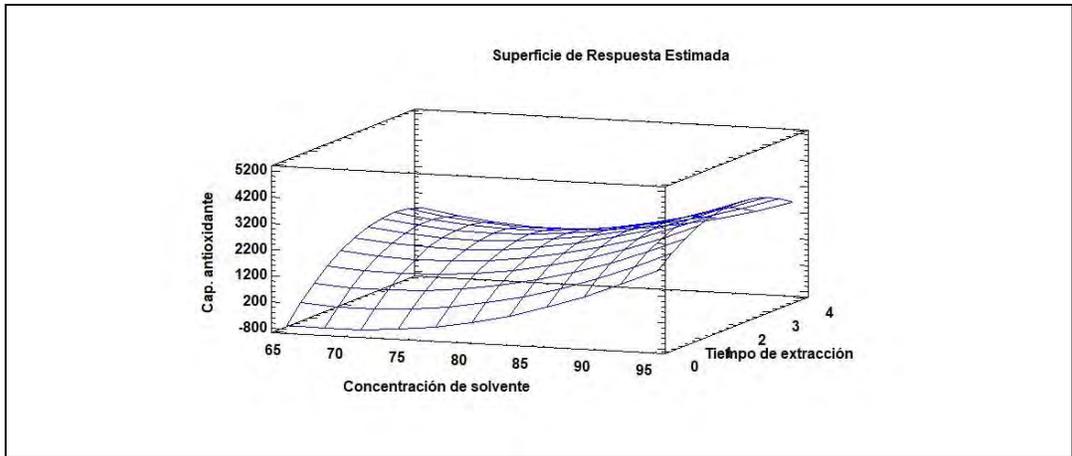


Figura 44.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 1 con etanol como solvente.

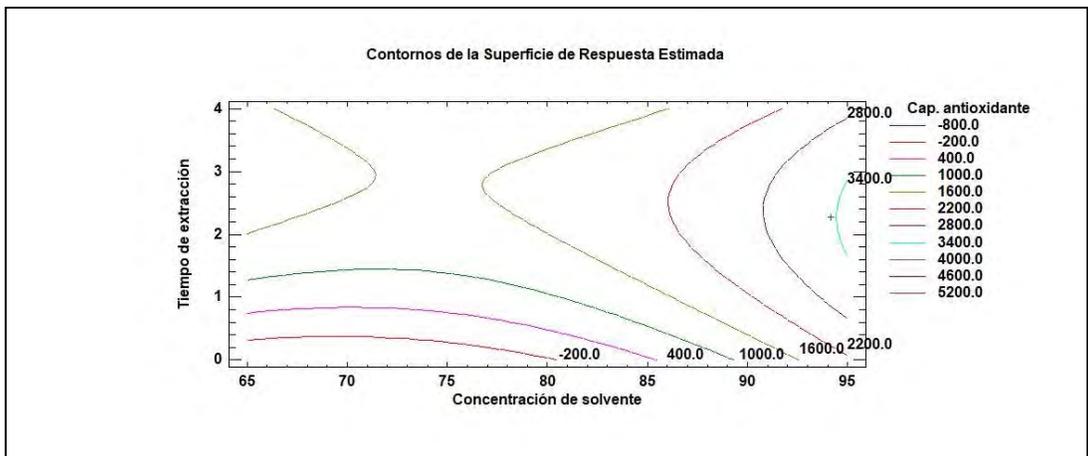


Figura 45.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 1 con etanol como solvente.

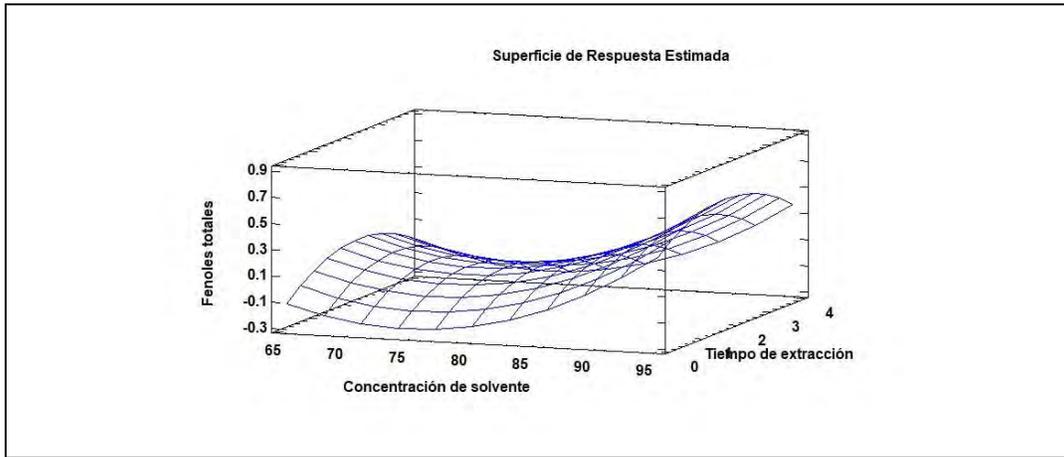


Figura 46.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.

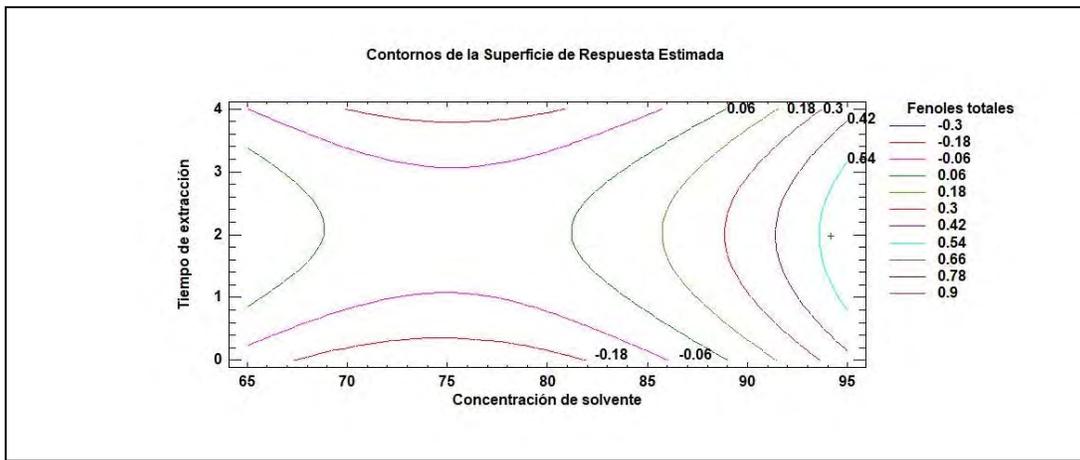


Figura 47.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.

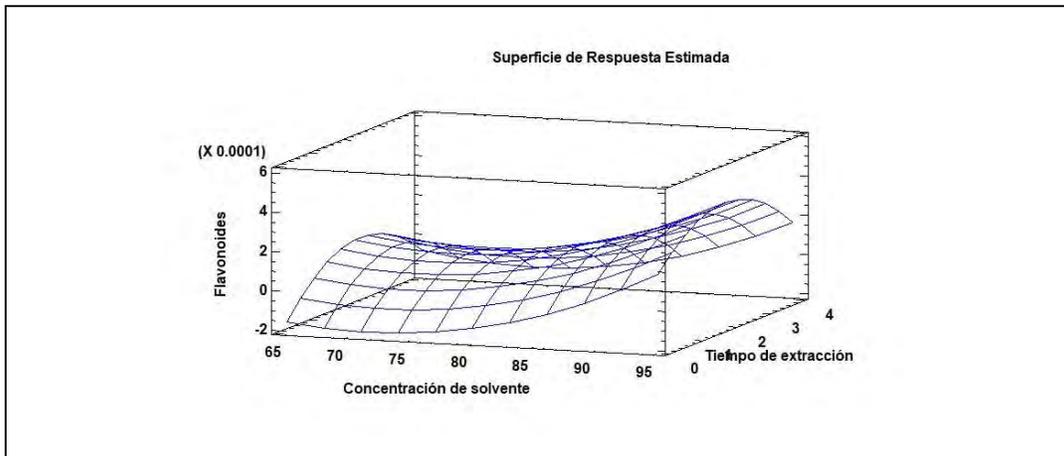


Figura 48.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.

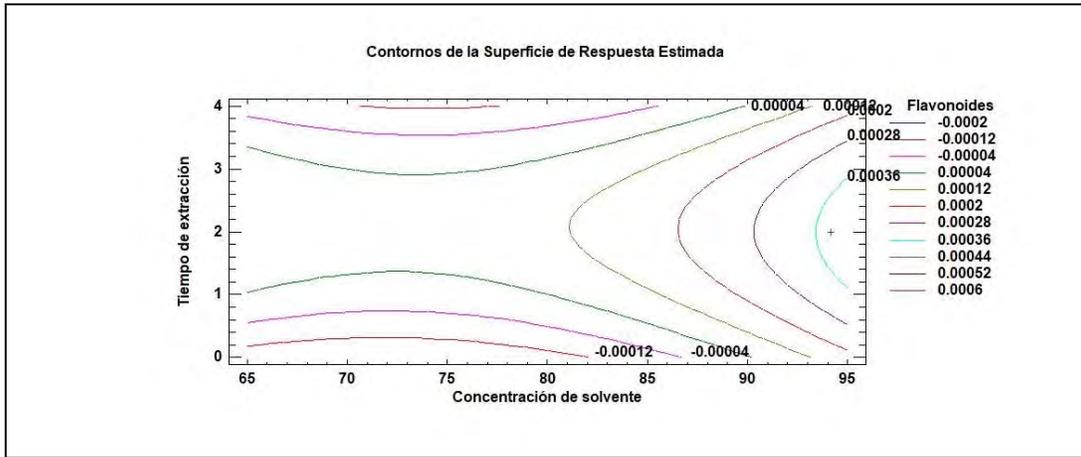


Figura 49.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 1 con etanol como solvente.

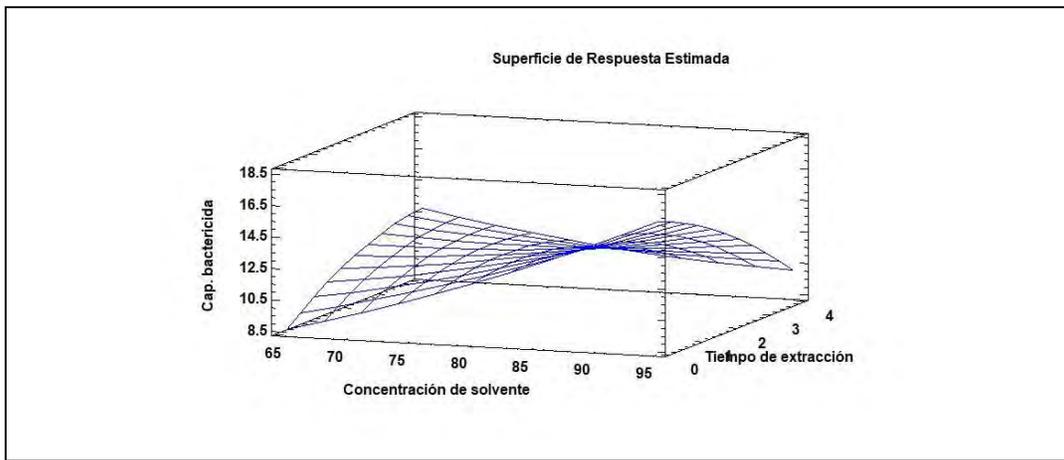


Figura 50.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

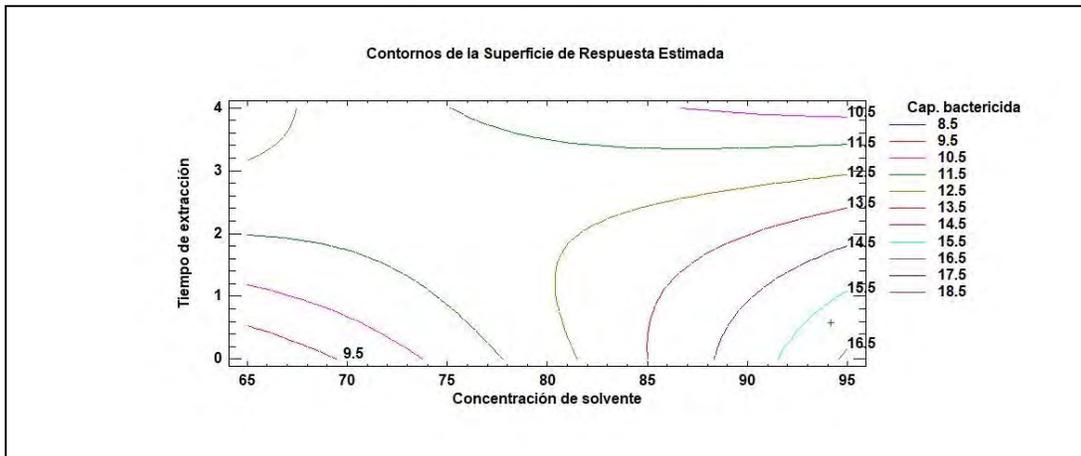


Figura 51.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

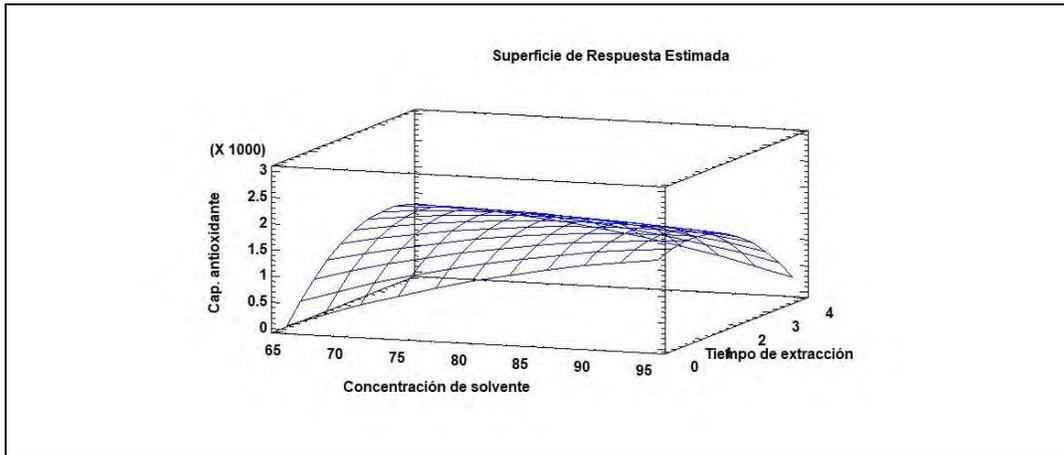


Figura 52.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con acetona como solvente.

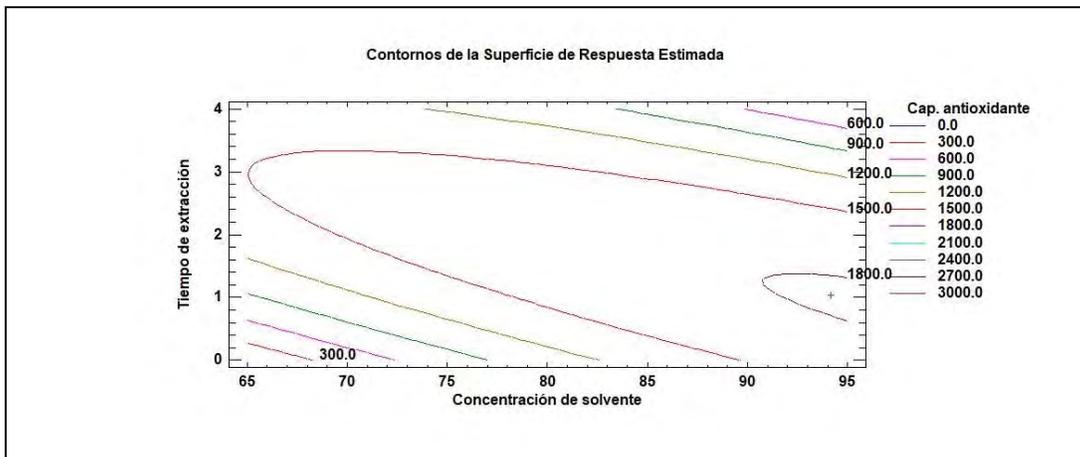


Figura 53.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 2 con acetona como solvente.

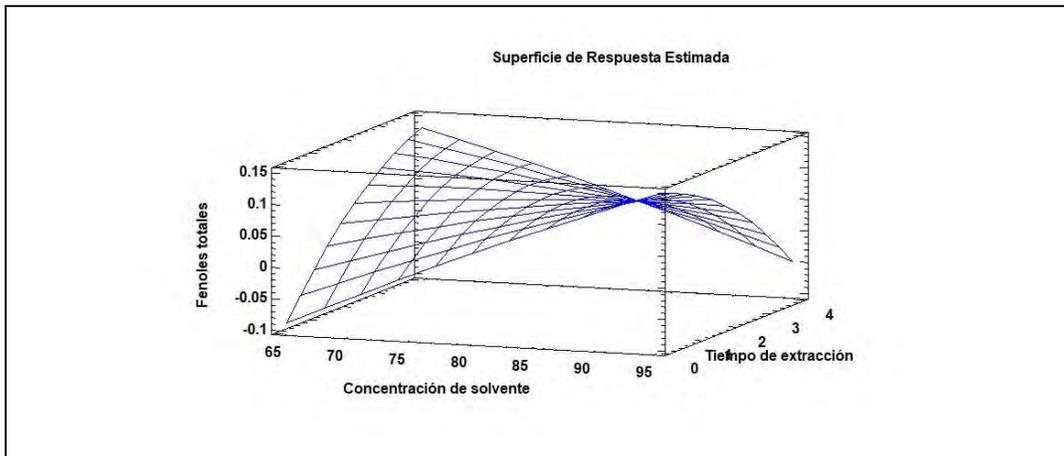


Figura 54.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.

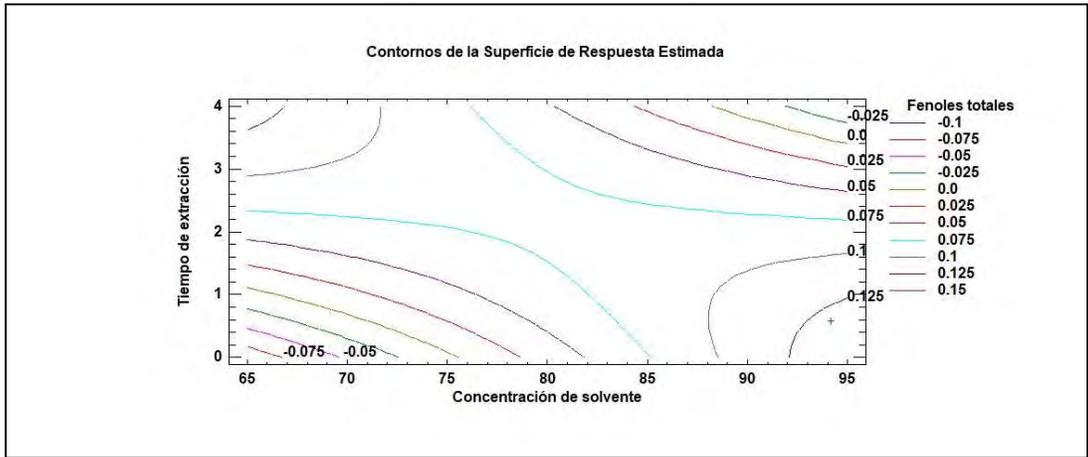


Figura 55.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.

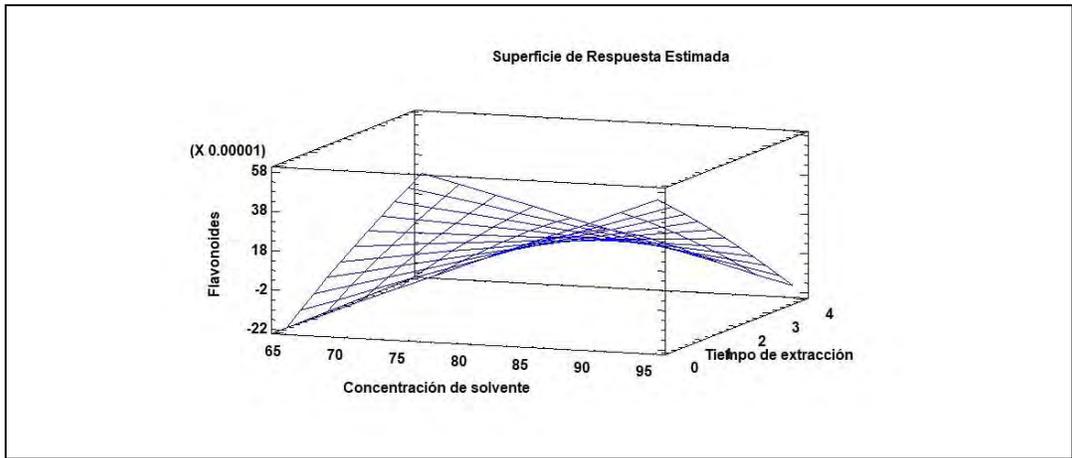


Figura 56.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.

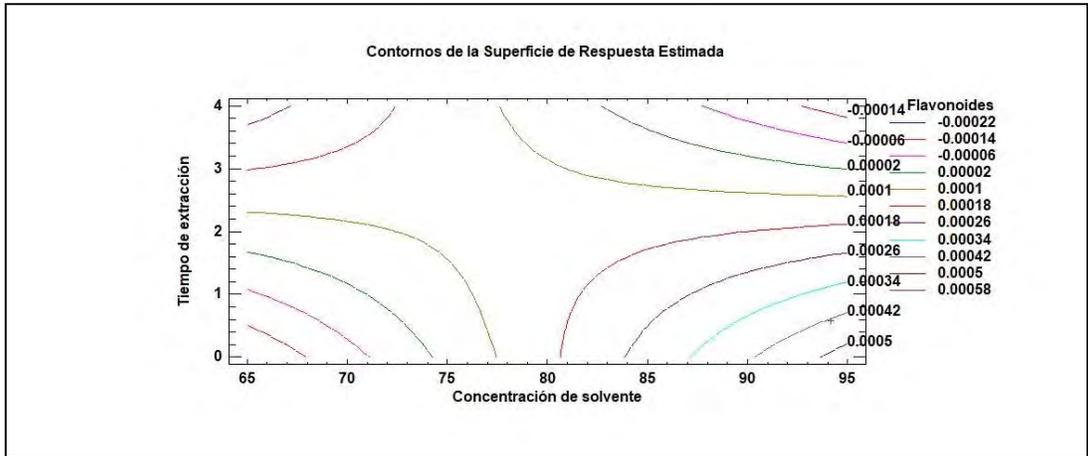


Figura 57.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con acetona como solvente.

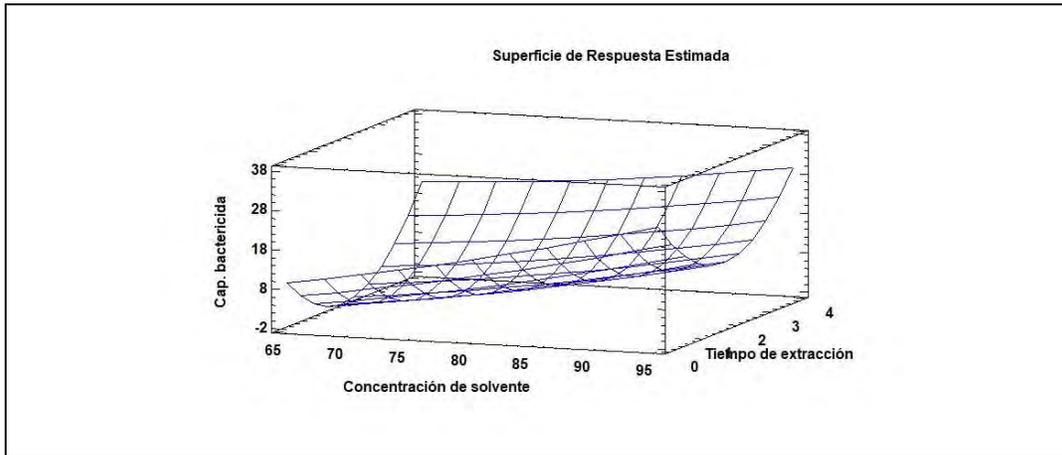


Figura 58.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con etanol como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

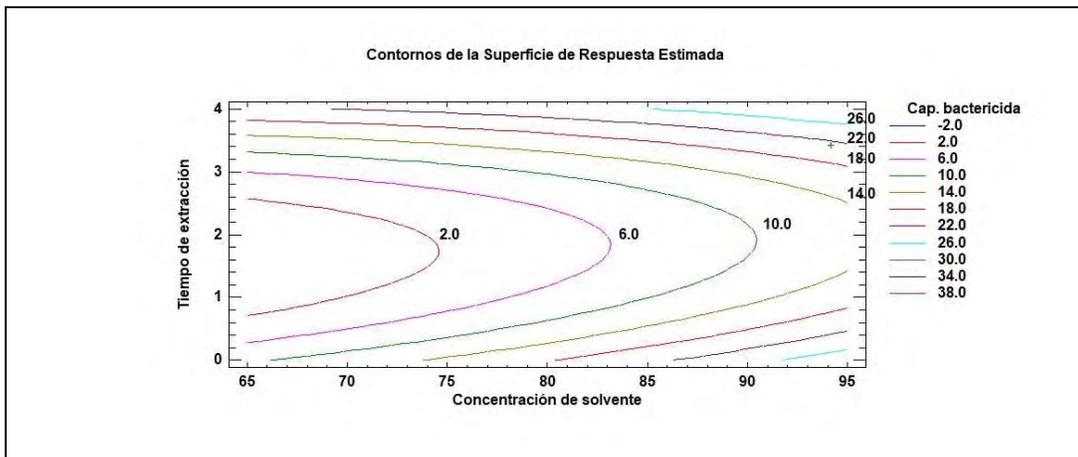


Figura 59.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 2 con etanol como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

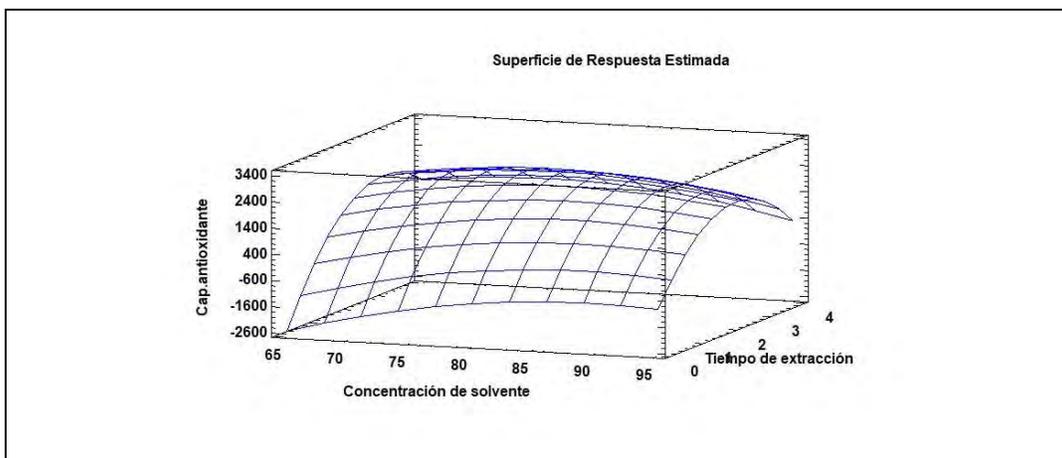


Figura 60.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS⁺⁺ obtenido del lote 2 con etanol como solvente.

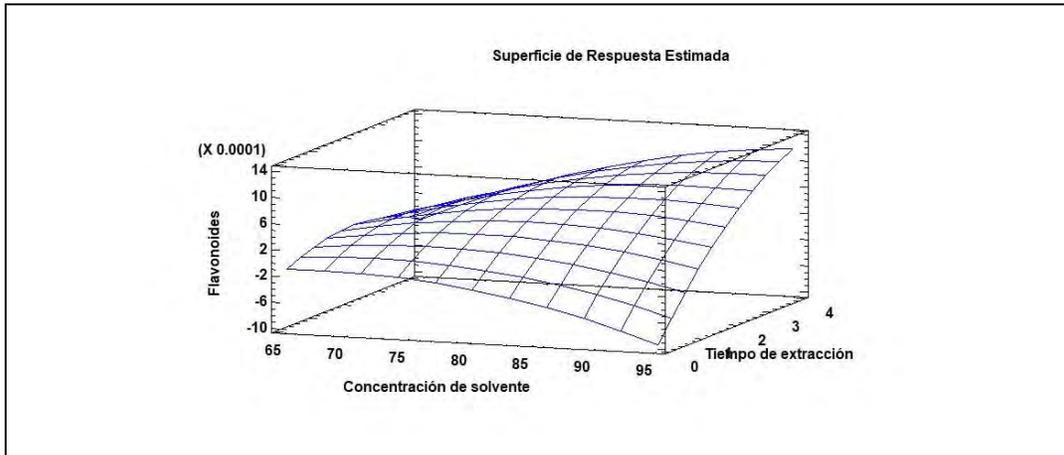


Figura 64.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente.

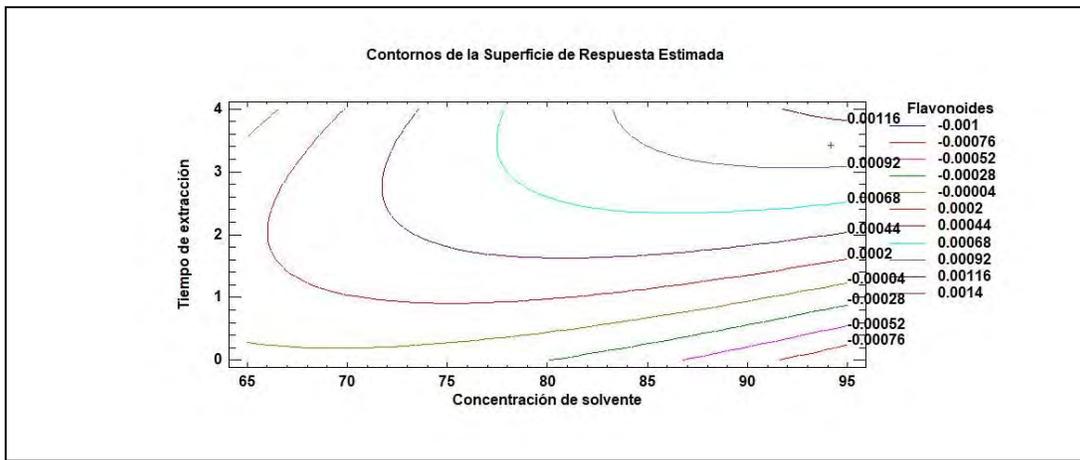


Figura 65.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 2 con etanol como solvente.

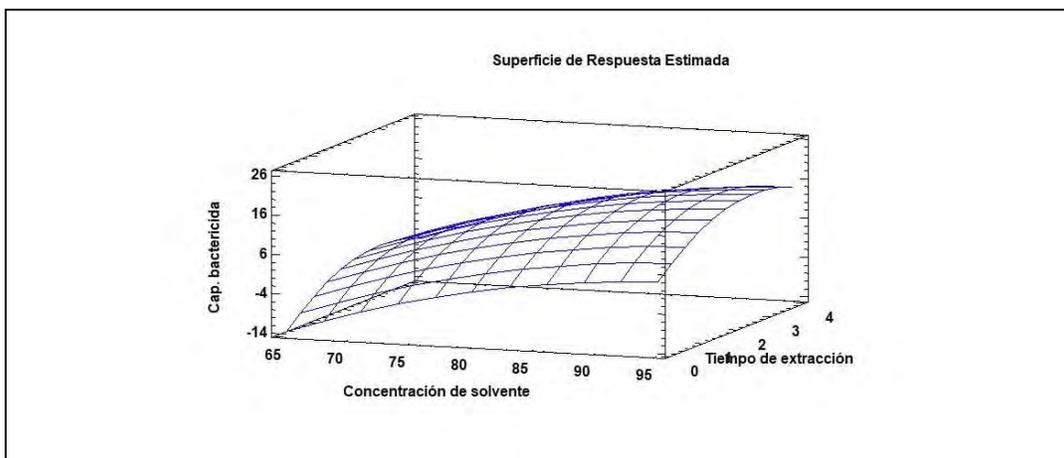


Figura 66.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

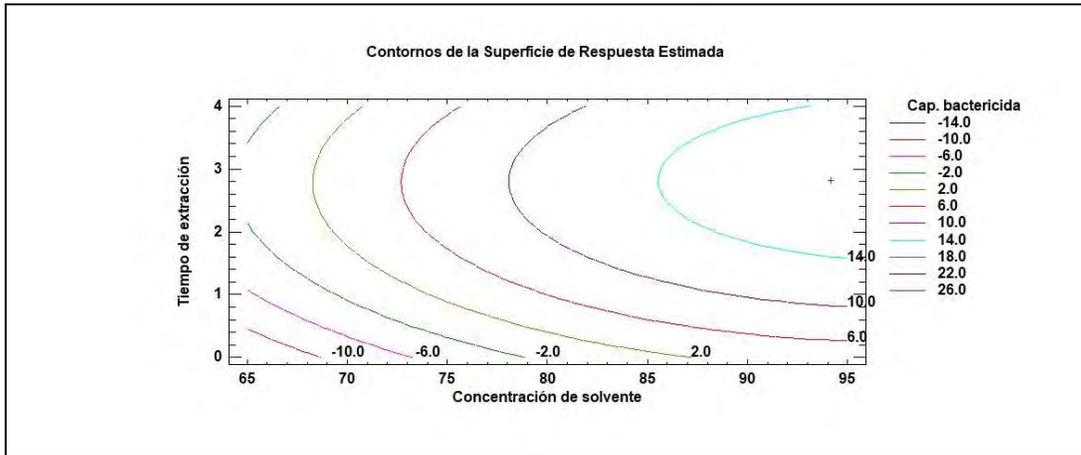


Figura 67.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta el diámetro del halo de inhibición formado al estar en contacto el extracto obtenido del lote 3 con acetona como solvente con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

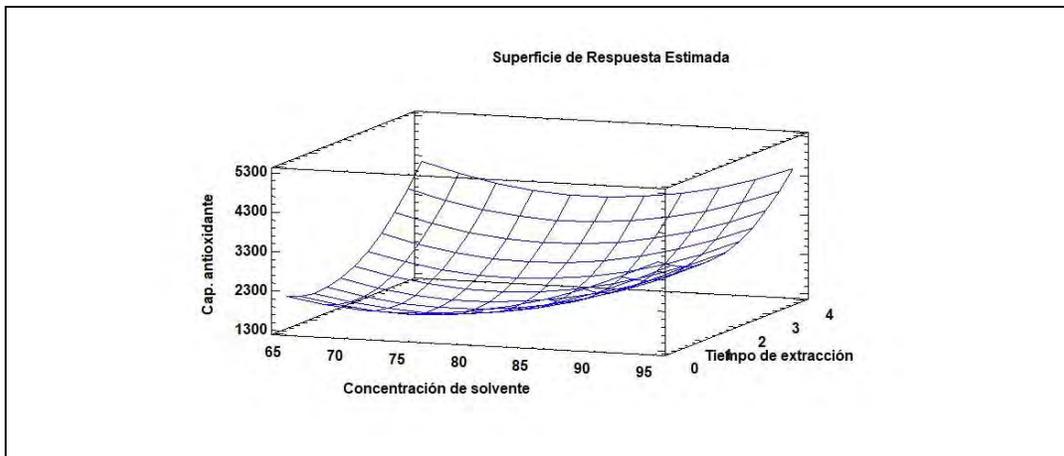


Figura 68.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con acetona como solvente.

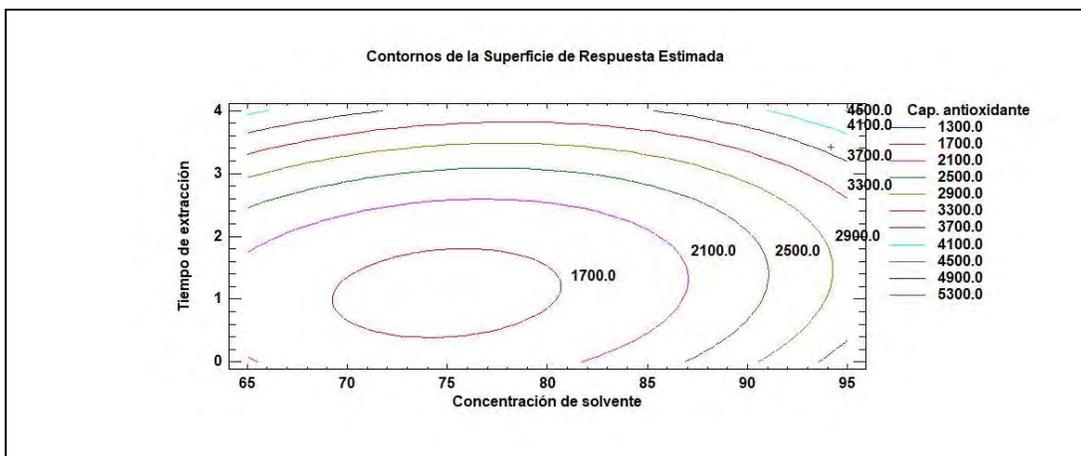


Figura 69.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con acetona como solvente.

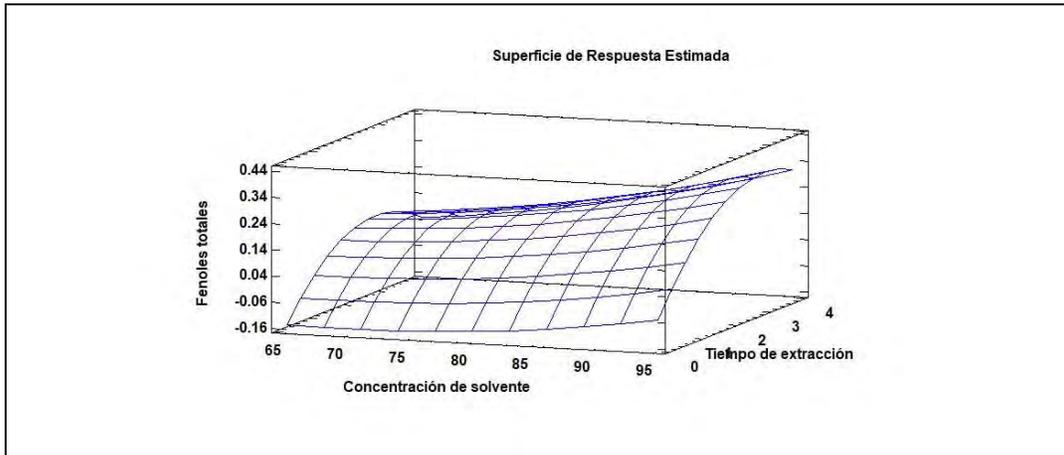


Figura 70.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.

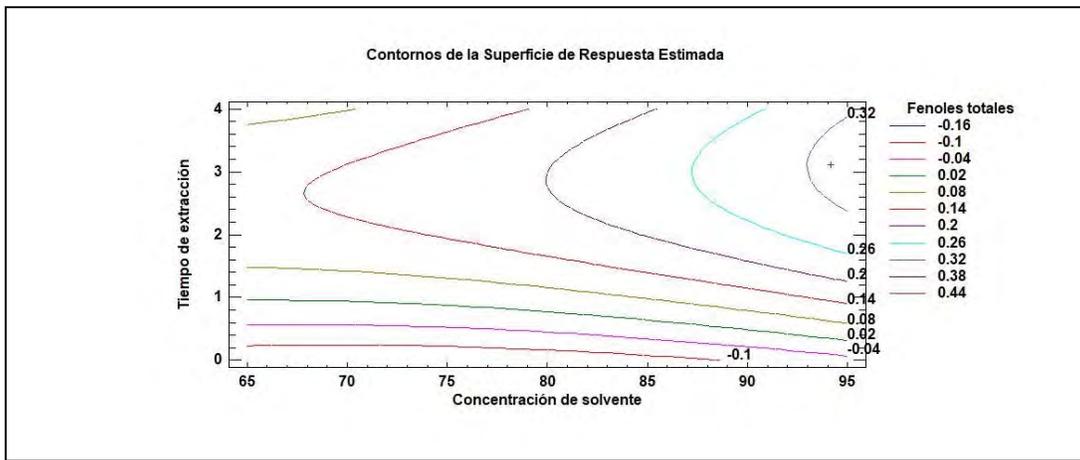


Figura 71.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.

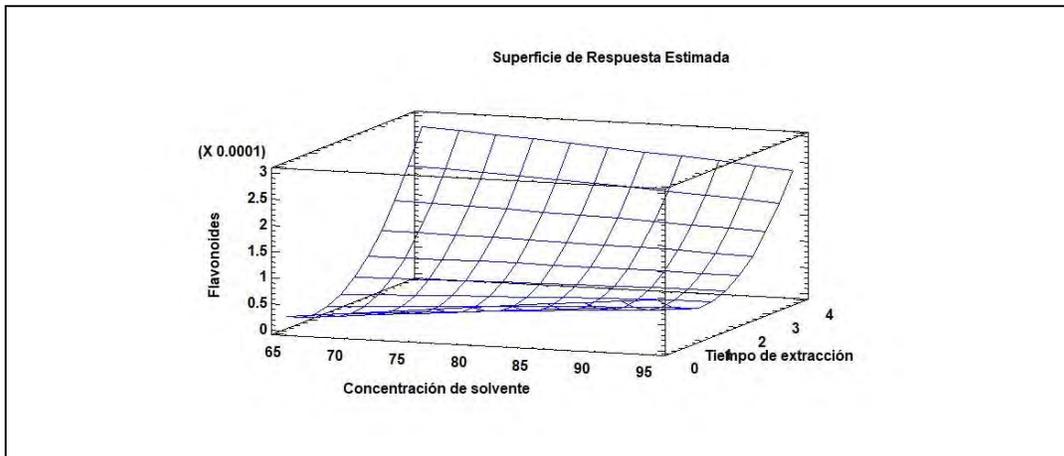


Figura 72.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con acetona como solvente.

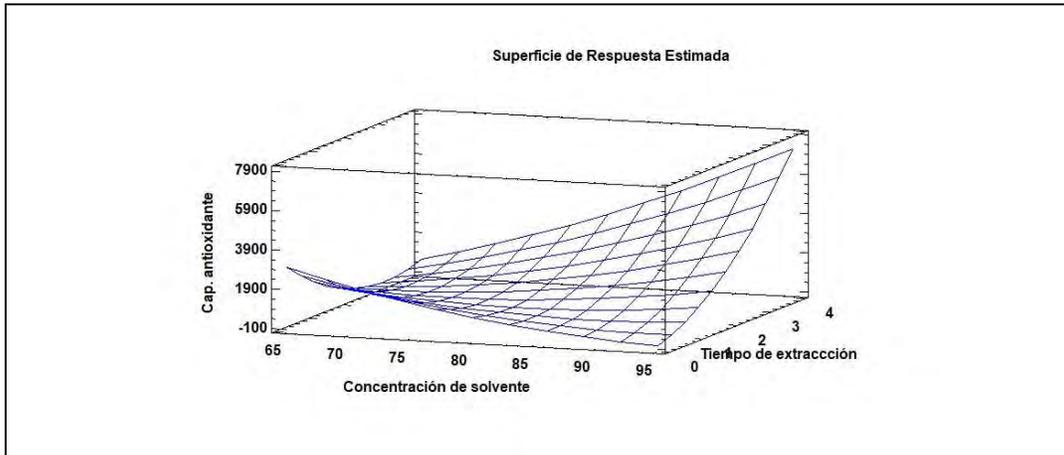


Figura 76.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con etanol como solvente.

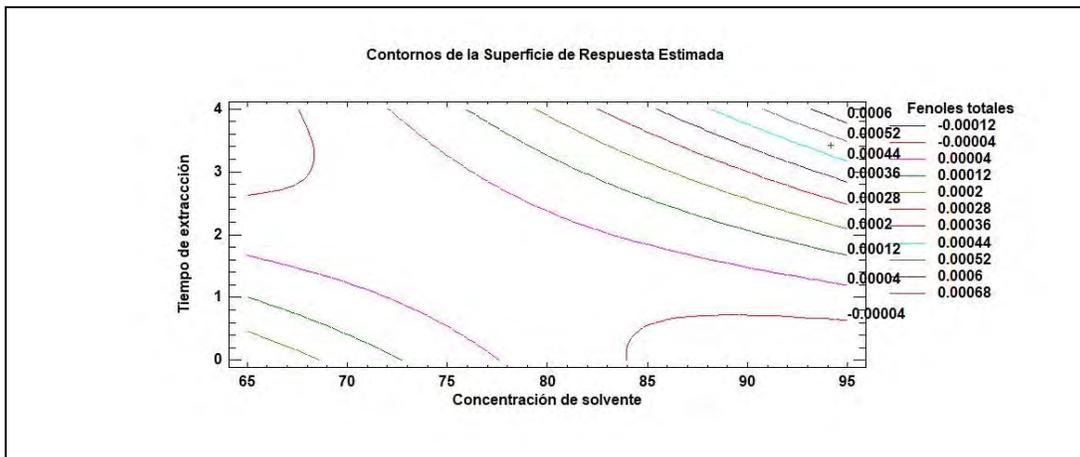


Figura 77.- Gráfica de contornos superficie de respuesta tomando como respuesta la inhibición del radical de ABTS++ obtenido del lote 3 con etanol como solvente.

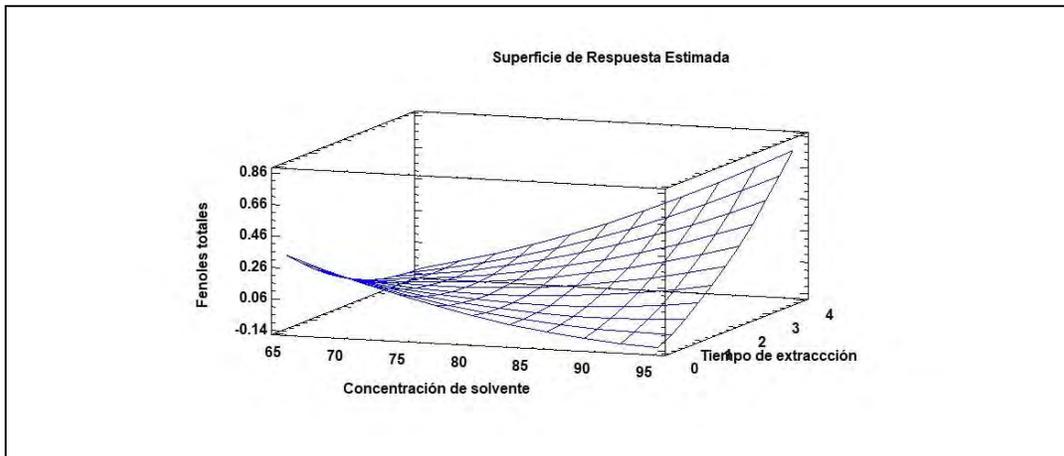


Figura 78.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.

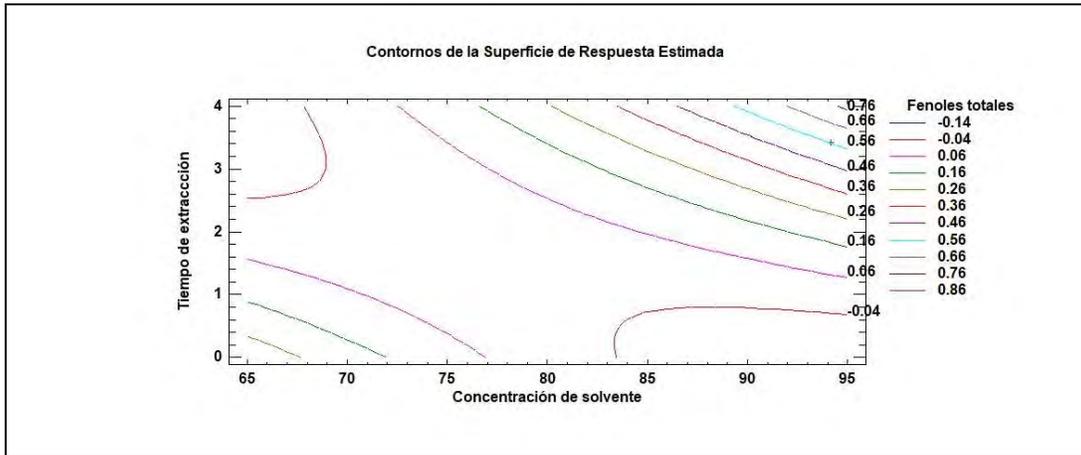


Figura 79.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de Fenoles totales expresados como EAG mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.

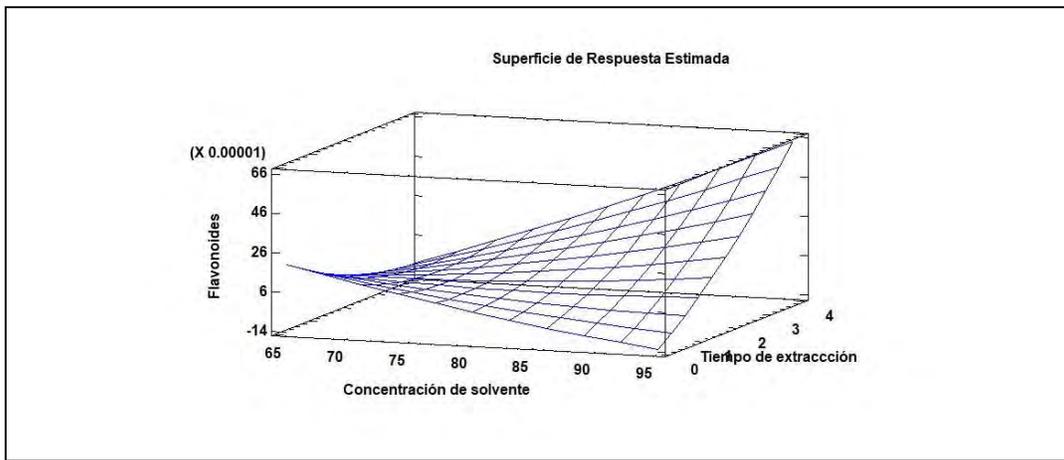


Figura 80.- Gráfica de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.

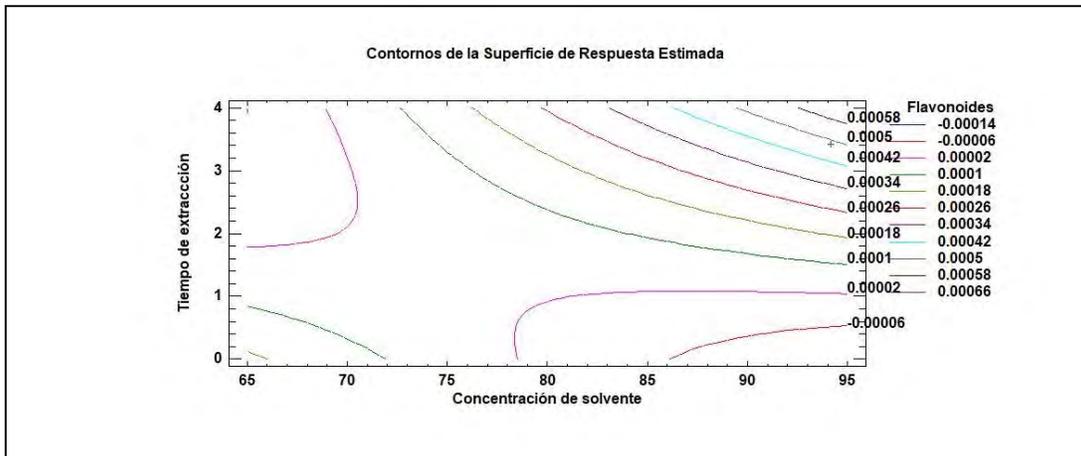


Figura 81.- Gráfica de contornos de superficie de respuesta tomando como respuesta la concentración de flavonoides expresados como EQ mg/ml obtenidos del lote 3 con etanol como solvente.