



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN
SOXHLET A PARTIR DE CÁSCARA DE GRANADA (*Punica
granatum*) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y MICROBICIDA**

TESIS presentada por:

FERNANDO AYALA FLORES

**A la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química como
requisito parcial para obtener el
grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Directora de Tesis: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga

Co-Director: Dr. Juan Carlos González Hernández

Morelia, Mich.

Febrero 2022

Carta de aceptación

Resumen

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SOXHLET A PARTIR DE CÁSCARA DE GRANADA (*Punica granatum*) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y MICROBICIDA

Por: Fernando Ayala Flores

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga

Co-Dirigida por: Dr. Juan Carlos González Hernández

Se ha encontrado en estudios recientes la alta concentración de compuestos polifenólicos en el fruto dado por el granado (cáscara, arilos, semillas y membrana capilar) dentro de los cuales se encuentran los pigmentos naturales denominados antocianinas los cuales son apreciados por sus efectos benéficos en la salud del ser humano, la cáscara se considera un desperdicio en la dieta del ser humano y es casi el 50% del fruto por lo que ahí es donde reside la importancia de su uso. Es por ello que en este trabajo se consideró el uso de un diseño de experimentos 2^2 con 4 puntos centrales para establecer las mejores condiciones para la extracción de compuestos polifenólicos presentes en cáscara de granada variedad *Wonderful* y *Valenciana* (5 g) utilizando como método de extracción la denominada “extracción Soxhlet” con 2 variables de estudio (tiempo de extracción y concentración de etanol) así como una cinética de degradación térmica en antocianinas presentes en la granada, en donde se encontró mayor tendencia a la cuantificación de compuestos fitoquímicos utilizando mayor concentración de etanol y tiempos de extracción menores (30 minutos), actividad antioxidante entre 77% y 90% inhibición, inhibición microbiana en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y velocidades de degradación de antocianinas menores en la cinética a temperatura ambiente con una vida media de 63.59 horas, una constante cinética de 0.0109 h^{-1} para una reacción de primer orden y un valor D (el tiempo requerido para la degradación del 90% de antocianina) de 91.74 h. La investigación realizada determinó que la variación en la concentración de etanol y el tiempo de reposo no tienen influencia significativa estadísticamente sobre la composición de fenoles y flavonoides extraídos.

Palabras clave: Polifenoles, flavonoides, antocianinas, solvente, bacterias.

Abstract

DETERMINATION OF SOXHLET EXTRACTION CONDITIONS FROM POMEGRANATE PEEL (*Punica granatum*) AND EVALUATION OF ITS ANTIOXIDANT AND MICROBICIDAL ACTIVITY

By: Fernando Ayala Flores

Master of Science in Chemical Engineering

Directed by: Dr. Ma. del Carmen Chávez Parga

Co-Directed by: Dr. Juan Carlos González Hernández

Recent studies have found the high concentration of polyphenolic compounds in the fruit produced by the pomegranate (peel, arils, seeds and capillary membrane) within which are the natural pigments called anthocyanins which are appreciated for their beneficial effects on the human health, the peel is considered a waste in the human diet and is almost 50% of the fruit, so therein lies the importance of its use. That is why in this work the use of a design of experiments 2^2 with 4 central points was expected to establish the best conditions for the extraction of polyphenolic compounds present in pomegranate peel of the *Wonderful* and *Valenciana* variety (5 g) using as extraction method the so-called "Soxhlet extraction" with 2 study variables (extraction time and ethanol concentration) as well as thermal degradation kinetics in anthocyanins present in pomegranate, where a greater tendency to quantify phytochemical compounds was found using higher concentration of ethanol and shorter extraction times (30 minutes), antioxidant activity between 77% and 90% inhibition, microbial inhibition in strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and anthocyanin degradation rates lower in kinetics at room temperature with a half-life of 63.59 hours, a rate constant of 0.0109 h^{-1} for a first-order reaction, and a value D (required time for the degradation of 90% of anthocyanin) of 91.74 h. The research carried out allowed that the variation in the ethanol concentration and the resting time did not have a statistically significant influence on the composition of extracted phenols and flavonoids.

Contenido

Carta de aceptación.....	ii
Resumen	iii
Abstract.....	iv
Contenido	v
Índice de figuras	viii
Índice de tablas.....	xiii
Agradecimientos	xvi
Nomenclatura	xvii
Glosario	xviii
1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Justificación	2
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo general	3
1.4.2 Objetivos específicos	4
2. Marco teórico	5
2.1 Polifenoles	5
2.2 Estructura y síntesis de compuestos fenólicos	5
2.3 Antocianinas	8
2.4 Extracción de metabolitos secundarios	9
2.5 Antecedentes.....	10
3. Metodología	13
3.1 Obtención de Granada (<i>Punica granatum</i>)	13

3.2	Determinación de dureza.....	14
3.3	Método del colorímetro	14
3.4	Secado de cáscara	15
3.5	Diseño de experimentos.....	15
3.6	Procedimiento para la obtención de extractos.....	16
3.7	Evaluación del contenido de fenoles totales.....	17
3.8	Cuantificación de flavonoides totales	17
3.9	Determinación de actividad antioxidante	18
3.9.1	Actividad antioxidante por método ABTS ⁺	18
3.9.2	Actividad antioxidante por método DPPH [*]	18
3.10	Halo de inhibición	19
3.11	Cinética de degradación térmica	21
4.	Resultados.....	23
4.1	Dureza.....	23
4.2	Color.....	26
4.3	Análisis de resultados del Diseño de Experimentos	30
4.4	Fenoles totales	32
4.5	Flavonoides totales.....	39
4.6	Actividad antioxidante.....	46
4.6.1	ABTS ^{**}	46
4.6.2	DPPH [*]	53
4.7	Halo de inhibición	60
4.7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	60
4.7.2	<i>Escherichia coli</i>	67
4.8	Cinética de degradación.....	74

5. Conclusiones	79
6. Recomendaciones	80
7. Bibliografía.....	81
8. Anexos.....	92
8.1 Método de halo de inhibición	92
8.1 Halos de inhibición	96
8.3 Método ABTS ⁺	100
8.4 Método DPPH ⁺	103
8.5 Cuantificación de fenoles totales	105
8.7 Flavonoides totales.....	107
8.7 Cinética de degradación	110
8.8 Datos experimentales	113
8.9 Constancias de participación en congresos	119

Índice de figuras

Figura 1. Granada (Tomado y modificado de Mondragón & Juárez, 2008)	1
Figura 2. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles. (Tomado y modificado de Quiñonez <i>et al.</i> , 2012)	7
Figura 3. Ubicación geográfica de Apaseo el Alto Guanajuato.....	13
Figura 4. Ubicación geográfica de Tarímbaro Michoacán.....	14
Figura 5. Prueba de resistencia a penetración del fruto en granada variedad <i>Wonderful</i> y <i>Valenciana</i>	24
Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	34
Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	35
Figura 8. Gráfico de efecto principales para fenoles en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	36
Figura 9. Gráfico de interacciones para fenoles totales en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	36
Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	37
Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	38
Figura 12. Diagrama de Pareto estandarizado para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	41
Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	41
Figura 14. Gráfico de efecto principales para flavonoides totales en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	42
Figura 15. Gráfico de interacciones para flavonoides totales en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	43

Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	44
Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	44
Figura 18. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	48
Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	48
Figura 20. Gráfico de efecto principales para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	50
Figura 21. Gráfico de interacciones para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	50
Figura 22. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	51
Figura 23. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	52
Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método DPPH [•] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	55
Figura 25. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método DPPH [•] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	55
Figura 26. Gráfico de efecto principales para actividad antioxidante por el método DPPH [•] en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	57
Figura 27. Gráfico de interacciones para actividad antioxidante por el método DPPH [•] en cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	57
Figura 28. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método DPPH [•] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	58
Figura 29. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método DPPH [•] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	59

Figura 30. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en <i>S. aureus</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	62
Figura 31. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en <i>S. aureus</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	62
Figura 32. Gráfico de efecto principales para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> .	63
Figura 33. Gráfico de interacciones para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i> en <i>S. aureus</i>	63
Figura 34. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos porextractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i> en <i>S. aureus</i>	64
Figura 35. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> en <i>S. aureus</i>	65
Figura 36. Halo de inhibición formados por extractos de cáscara de granada a concentración de 500mg/ml variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i> en <i>Sthaphylococcus aureus</i> .	66
Figura 37. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en <i>E. coli</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	69
Figura 38. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en <i>E. coli</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	69
Figura 39. Gráfico de efecto principales para halo de inhibición sobre <i>E. coli</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i> . .	70
Figura 40. Gráfico de interacciones para halo de inhibición sobre <i>E. coli</i> inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i>	70
Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i> en <i>E. coli</i>	71
Figura 42. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> en <i>E. coli</i>	72

Figura 43. Halo de inhibición formados por extractos de cáscara de granada a concentración de 500mg/ml variedad a) <i>Wonderful</i> b) <i>Valenciana</i> en <i>E. coli</i>	73
Figura 44. Gráfico de degradación de antocianinas monoméricas en jugo de granada variedad <i>Valenciana</i> expresado en mg/ml a diferentes temperaturas durante 92 horas.	75
Figura 45. Metodología para la elaboración del medio de cultivo.	93
Figura 46. Estriado de hisopo	95
Figura 47. Halos de inhibición.....	95
Figura 48. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>S. aureus</i> corrida a) 1 y b) 2.....	96
Figura 49. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>S. aureus</i> corrida a) 3 y b) 4.....	96
Figura 50. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>S. aureus</i> corrida a) 5 y b) 6.....	97
Figura 51. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>S. aureus</i> corrida a) 7 y b) 8.....	97
Figura 52. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>E. coli</i> corrida a) 1 y b) 2.	98
Figura 53. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>E. coli</i> corrida a) 3 y b) 4.	98
Figura 54. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>E. coli</i> corrida a) 5 y b) 6.	99
Figura 55. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i> sobre <i>E. coli</i> corrida a) 7 y b) 8.	99
Figura 56. Curva de calibración para ABTS ^{•+}	102
Figura 57. Curva de calibración para DPPH [•]	104
Figura 58. Curva de calibración para flavonoides totales.	108

Figura 59. Gráfico $\ln(A)$ vs tiempo de las cinéticas para el cálculo de las constantes de velocidad. 111

Figura 60. Gráfico $\ln(K)$ vs $1/T$ de las cinéticas para el cálculo de la energía de activación. 112

Figura 61. Constancia de participación en el Coloquio Internacional de Ingeniería Química celebrado del 11 al 13 de agosto del 2021. 119

Figura 62. Constancia de participación en el XLII Encuentro Nacional del AMIDIQ celebrado del 8 al 11 de septiembre del 2021..... 120

Figura 63. Constancia de participación en el 16 Congreso Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación celebrado el 22 de septiembre del 2021..... 121

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química (Tomado y modificado de Vermerris y Nicholson, 2008).	6
Tabla 2. Matriz del modelo experimental para la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de granada.	16
Tabla 3. Tiempos y temperaturas de almacenamientos de la granada usadas para la cinética de degradación térmica.	21
Tabla 4. Estadístico de prueba de resistencia a penetración en granada variedad <i>Wonderful</i> y <i>Valenciana</i>	24
Tabla 5. Parámetros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad <i>Wonderful</i>	27
Tabla 6. Parámetros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad <i>Valenciana</i>	28
Tabla 7. Ángulos h^* calculados con parámetros CIELab.	29
Tabla 8. Resultados de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	30
Tabla 9. Resultados de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	31
Tabla 10. Resultados de rendimientos obtenidos en los extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i> y <i>Valenciana</i>	32
Tabla 11. Análisis de varianza para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	33
Tabla 12. Análisis de varianza para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	33
Tabla 13. Análisis de varianza para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	39
Tabla 14. Análisis de varianza para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	39

Tabla 15. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	46
Tabla 16. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método ABTS ⁺ en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	46
Tabla 17. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método DPPH [*] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	53
Tabla 18. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método DPPH [*] en extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	53
Tabla 19. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre <i>S. aureus</i> utilizando extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	60
Tabla 20. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre <i>S. aureus</i> utilizando extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	61
Tabla 21. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre <i>E. coli</i> utilizando extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	67
Tabla 22. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre <i>E. coli</i> utilizando extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	67
Tabla 23. Parámetros cinéticos para la degradación térmica de antocianinas de jugo de granada durante el almacenamiento a 25, 50 y 70 °C durante 96 horas.	77
Tabla 24. Materiales y reactivos necesarios para cuantificación de actividad antioxidante por ABTS ⁺	100
Tabla 25. Volúmenes empleados para elaboración de soluciones para curva de Trolox. 101	
Tabla 26. Materiales y reactivos necesarios para cuantificación de actividad antioxidante por DPPH.	103
Tabla 27. Volúmenes empleados para elaboración de soluciones para curva de Trolox 103	
Tabla 28. Volúmenes de ácido gálico utilizados para curva de calibración de fenoles totales.	106

Tabla 29. Preparación de diluciones para la cuantificación de fenoles.....	106
Tabla 30. Volúmenes de quercetina utilizados para curva de calibración de flavonoides totales.....	107
Tabla 31. Volumen de agua adicionado de las discusiones	108
Tabla 32. Diluciones para la cuantificación de flavonoides totales	109
Tabla 33. Datos experimentales de resistencia a penetración del fruto en granada variedad <i>Wonderful</i> y <i>Valenciana</i>	113
Tabla 34. Datos experimentales de los parametros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad <i>Wonderful</i>	114
Tabla 35. Datos experimentales de los parametros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad <i>Valenciana</i>	115
Tabla 36. Resultados experimentales de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i>	116
Tabla 37. Resultados experimentales de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad <i>Valenciana</i>	117
Tabla 38. Resultados de rendimientos obtenidos de las corridas experimentales en extractos de cáscara de granada variedad <i>Wonderful</i> y <i>Valenciana</i>	118

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a mi directora de Tesis Ma. del Carmen Chávez Parga y mi co-director de Tesis Juan Carlos González Hernández, los cuales siempre estuvieron dispuestos a brindarme su asesoría y ayudarme en todo lo que necesité, también agradecer a mis asesoradas y amigas Wendolyne Monroy y Mariana Rojas las cuales me ayudaron a desarrollar el proyecto y me apoyaron con gran parte de la experimentación.

A la mesa sinodal conformada por los doctores Jaime Espino, Horacio Gonzáles, José Apolinar Cortés, Ma. del Carmen Chávez y Juan Carlos González, con la cual se trabajó durante estos 2 años con revisiones semestrales del proyecto y con el cual gracias a sus valiosas aportaciones ayudaron a mejorar de manera significativa el trabajo.

Agradecer a mi familia, mi mamá Rosa Cristina Flores y mi hermana Daniela Ayala que siempre me apoyaron en todo lo que necesité, y me aguantaron cuando llegaba estresado o cansado, a mi padrino José Arturo Flores y mis abuelitos Guillermina Espinosa y José Luis Flores los cuales siempre me apoyaron y respaldaron en las decisiones que tomé, así como a mis amigos los cuales siempre me apoyaron y levantaron el ánimo cuando lo necesité.

A mis compañeros de maestría (Pablo, Tania, Ángel, Adilene, Sandra y Ana Karen) los cuales me apoyaron en las asignaturas y juntos creamos un gran equipo de trabajo el cual hizo muy divertida mi estancia en el posgrado, también al equipo de trabajo del laboratorio de Bioquímica el cual me apoyo en todo momento y de manera abierta a cualquier duda que pudiera tener.

A todo el personal del posgrado, a Mari la cual me apoyo en cualquier trámite que realizará, a los coordinadores de la maestría y doctorado y a mis profesores los cuales trabajaron de manera muy eficiente y siempre abiertos a cualquier duda que pudiéramos tener.

Por último, queda agradecer al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado, a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Instituto Tecnológico de Morelia sin los cuales no sería posible la obtención del grado académico.

Nomenclatura

A	Absorbencia
C	Concentración
k	Constante de velocidad
ϵ	Coefficiente de extinción molar
FD	Factor de dilución
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
h	Horas
ln	Logaritmo natural
λ	Longitud de onda
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Newtons
nm	Nanómetros
PM	Peso molecular
pH	Valor p de la concentración de H^+
$t_{1/2}$	Vida media
rpm	Revoluciones por minuto

Glosario

Polifenoles: Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en plantas y se caracterizan por tener más de un grupo fenol en su molécula.

Antioxidante: Es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Oxidación: Es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante.

Estrés oxidativo: Es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de neutralizar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

Microbicida: Cualquier sustancia o proceso que destruye gérmenes (bacterias, virus u otros microbios que pueden causar infecciones o enfermedades).

Radical libre: Es una especie química, caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados, es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo y de vida media muy corta.

Inhibición: Se refiere a la interrupción de alguna respuesta o secuencia de conductas, que anteriormente han sido automatizadas o aprendidas, para resolver alguna tarea o acción.

Metabolitos secundarios: Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo.

Fitoquímicos: Son compuestos químicos producidos por las plantas, estos generalmente juegan un papel en el crecimiento de la planta o en su defensa contra competidores, patógenos o depredadores.

Extracción: Es la técnica más empleada para separar un producto de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales.

1. Introducción

La granada, perteneciente a la familia *Punicaceae*, es un fruto proveniente de Irán, su nombre Persa es “Anar” (Sheets *et al.*, 2009; Mohseni, 2006). Actualmente el fruto es cultivado a lo largo del país de origen, las zonas áridas del sureste de Asia y la zona mediterránea de África. El fruto llegó a América por misioneros españoles durante la conquista, y logró adaptarse en algunas zonas principalmente cálidas y áridas del norte del continente americano.

La granada se caracteriza por ser un fruto con forma de globo de aproximadamente 6 a 12 cm de diámetro con un cáliz en forma de corona. Su corteza va del color amarillo rojizo a verde con zonas rojizas e inclusive al rojo escarlata; es delgada y correosa, cubre una gran cantidad de granos, ordenadamente distribuidos, jugosos y con un sabor que va del agridulce al dulce dependiendo de la variedad, los granos están separados por delgados tabiques membranosos de calidad astringente. Cada grano tiene como centro una semilla de color blanco con una estructura firme, cuya dureza depende de muchos factores entre los que se encuentran la variedad, la madurez y factores climáticos (López *et al.*, 2010).



Figura 1. Granada (Tomado y modificado de Mondragón & Juárez, 2008)

La granada posee gran cantidad de compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas capilares, arilos y semillas. Alrededor del 50% del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas capilares, que son una fuente importantísima de compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas y minerales principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio. Por lo que, los productos nutracéuticos y alimenticios elaborados a partir de extractos de cáscara y membranas capilares pueden

ser una fuente importante de dichos compuestos, si se han procesado de modo correcto (Plus, 2011).

Así mismo, la granada es rica en otros compuestos que le dan un valor nutricional. Mayoritariamente, está compuesta por agua y azúcares, siendo menor su contenido en grasas y proteínas, lo que le confiere un bajo valor calórico (aprox.75 kcal/100 g). Contiene también una pequeña proporción de fibra alimentaria, que se encuentra en la semilla principalmente (3,1 g/100 g), es rica en potasio y aporta cantidades considerables de calcio, magnesio, fósforo y hierro, siendo pobre en sodio. Contiene, además, vitaminas del grupo B, C y niacina, en concentraciones similares a otras frutas de alto consumo como ciruelas o manzanas (García & Pérez, 2014).

1.1 Planteamiento del problema

Se ha reportado en estudios recientes la alta concentración de compuestos polifenólicos (entre ellos las antocianinas) en el fruto dado por el granado principalmente en variedad *Wonderful* (cáscara, arilos, semillas y membrana capilar), la cáscara se considera un desperdicio en la dieta del ser humano y es casi el 50% del fruto ahí es donde reside la importancia de su uso. Algunos compuestos como las antocianinas son sensibles a la temperatura, cambios de pH y fotones de luz. Debido a lo anterior se considera el uso de un diseño experimental para obtener las mejores condiciones de extracción de compuestos con actividad antioxidante y microbicida en cáscara de granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

1.2 Justificación

En la última década, el consumo de granada se ha incrementado en el mundo, gracias a la tendencia del consumidor por productos frescos y saludables, además por ser un cultivo conocido por sus propiedades nutraceuticas. Actualmente la producción mundial de granada supera los 2,000 millones de toneladas por año. Desde 2013, India lidera la producción de granada en el mundo y es uno de los mayores exportadores de granadas frescas y procesadas, con un récord de producción de 745,000 toneladas en

ese año, esto trae consigo un aumento en los desechos generados debido al procesamiento de la granada teniendo como principal desecho la cáscara, provocando un daño ambiental si no se le da un uso correcto, por lo que resulta importante el proponer alternativas de aprovechamiento.

La importancia actual de la granada consiste, específicamente, 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.

Los compuestos polifenólicos que posee la granada pueden ser extraídos y aprovechados generando extractos líquidos en los que existen los polifenoles en mezcla con los solventes que haya servido como agente acarreador del compuesto, tales como lixiviación, método Soxhlet, microondas entre otros. Es por ello por lo que en esta investigación se propone la extracción Soxhlet de compuestos fitoquímicos en cáscara de granada para poder evaluar su actividad antioxidante y microbicida.

1.3 Hipótesis

La variación en la concentración de etanol y el tiempo de extracción influirá en la composición de polifenoles y flavonoides extraídos con lo que se espera que se incremente la actividad antioxidante y microbicida.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar las mejores condiciones de extracción Soxhlet para la obtención de extractos de cáscara de granada (*Punica granatum*) variedades *Wonderful* y *Valenciana* con alto poder antioxidante y microbicida.

1.4.2 Objetivos específicos

Obtener los parámetros físicos (color y dureza) de las variedades de granada (*Punica granatum*).

Determinar el contenido total de fenoles, flavonoides en los extractos obtenidos, así como su comparación.

Comparar la capacidad antioxidante y microbicida de los extractos obtenidos de las 2 variedades de cáscara de granada.

Determinar los parámetros cinéticos de degradación térmica de antocianinas presentes en granada.

Establecer las mejores condiciones de extracción de las variedades de granada.

2. Marco teórico

2.1 Polifenoles

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas dado que cumplen funciones no esenciales en la planta, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8,000 compuestos distintos. En la actualidad este grupo de compuestos fitoquímicos presenta un gran interés por sus efectos benéficos en la salud humana (Martínez *et al.*, 2000).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Su actividad antioxidante justifica muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñonez *et al.*, 2012).

2.2 Estructura y síntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Se trata de compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Los compuestos polifenólicos presentan en su estructura química uno o más anillos de benceno y uno o más grupos hidroxilados con algún elemento común, como los grupos funcionales de ésteres, glicósidos, entre otros. Se trata de moléculas muy reactivas que normalmente se encuentran combinadas con diferentes azúcares, como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramosa, xilosa o los ácidos glucorónicos y galacturónicos. También pueden unirse con ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos (García *et al.*, 2015).

Se pueden clasificar los polifenoles de diferentes maneras, dependiendo de su estructura química y enfoque que se le pueda dar, pueden agruparse en C_6 , C_6-C_n , $C_6-C_n-C_6$, siendo $n \leq 3$. La siguiente tabla muestra los diferentes grupos de polifenoles:

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química (Tomado y modificado de Vermerris y Nicholson, 2008).

Estructura química	Tipo
C_6	Fenoles simples
C_6-C_1	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables
C_6-C_2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Ácido hidroxicinámico y cumarinas
$(C_6-C_3)_2$	Lignanos
$C_6-C_1- C_6$	Benzofenonas y Xantonas
$C_6-C_2- C_6$	Estilbenos
$C_6-C_3- C_6$	Flavonoides
$(C_6-C_3- C_6)_n$	Proantocianinas

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos principales rutas: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Bravo, 1998).

La ruta del ácido siquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos que son típicos de la fotosíntesis, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Después de varias reacciones y modificaciones en su estructura, se obtiene el ácido siquímico, del que se obtienen algunos fenoles. La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, obteniendo así la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas.

La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido *p*-cumárico en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles (Quiñonez *et al.*, 2012).

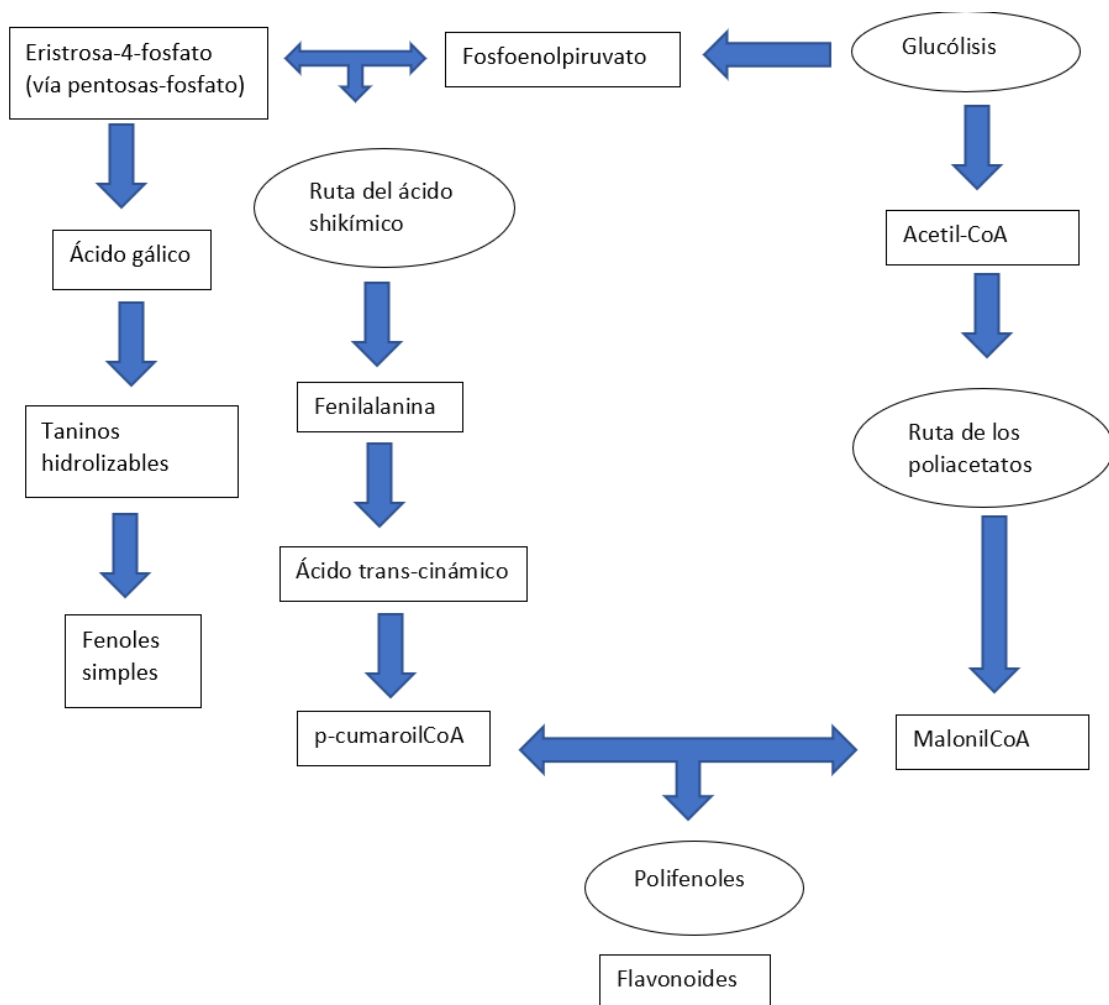


Figura 2. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles. (Tomado y modificado de Quiñonez *et al.*, 2012)

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran

variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se producen a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas bioactivas, denominadas flavonoides (Vite, 2015).

2.3 Antocianinas

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua visibles al ojo humano. Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo "B" de la molécula determina el tipo de antocianidina que se obtiene, que es la aglicona de la antocianina. Aunque se han descrito doce diferentes tipos de antocianidinas, las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina. La pelargonidina, cianidina, delfinidina son las más frecuentes en frutos, en tanto que las demás lo son en las flores. En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada; esto es, unidas a algún azúcar y en cuyo caso se denominan antocianinas. Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos, disacáridos o trisacáridos y de éstos depende su solubilidad (Aguilera *et al*, 2011).

Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (Brouillard, 1982). La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, como lo son las bayas y uvas rojas, cereales, principalmente maíz morado, vegetales y vino rojo entre las bebidas (Harbone, 2000; Escribano-Bailon *et al.*, 2004).

El interés en los pigmentos antociánicos ha cobrado interés recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (Astrid, 2008). Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa *et al.*, 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la vista y del comportamiento cognitivo.

2.4 Extracción de metabolitos secundarios

El proceso de extracción es un paso importante para el aislamiento e identificación de compuestos polifenólicos. La capacidad de extracción depende del disolvente, la naturaleza y preparación de soluto que se quiere extraer, la estructura química de los compuestos fenólicos, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido, método de extracción empleado y la posible presencia de sustancias de interferencia (Bucić-Kojić *et al.*, 2011).

Existen métodos convencionales y no convencionales a nivel laboratorio con los cuales es posible la extracción de compuestos fitoquímicos vegetales. 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 siendo técnicas de bajo costo, los tiempos de extracción en algunas ocasiones suelen ser prolongados, los metabolitos son extraídos con una pureza baja y existe degradación térmica de los compuestos termolábiles (Velazco *et al.*, 2007). 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 de los metabolitos; 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 *et al.*, 2013).

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continúa siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño años atrás, y en la actualidad, es el principal método de referencia con el que se comparan métodos de extracción novedosos. Además de que muchos organismos internacionales como la EPA (U.S. *Environmental Protection Agency*) y la FDA (*Food and Drugs Administration*) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos.

La técnica es la siguiente: La muestra sólida finamente pulverizada se coloca en un cartucho de material poroso usualmente de celulosa que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet. Se calienta el solvente extractante, situado en el matraz en la parte inferior, se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del solvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el solvente con los analitos disueltos asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el solvente (Cela *et al.*, 2002).

La MAE (*Microwave Assisted Extraction*) o Extracción Asistida por Microondas se utiliza para una amplia variedad de productos vegetales. Ofrece una rápida entrega de energía al volumen de disolvente y matriz vegetal, con un posterior calentamiento de ambos de manera eficiente y homogénea, debido a la rotación del dipolo del solvente. Dado que el agua dentro de la matriz vegetal absorbe la energía de microondas, se provoca la ruptura celular por sobrecalentamiento interno, lo que facilita la absorción de los productos químicos de la matriz, mejorando la recuperación de metabolitos secundarios (Guntero *et al.*, 2015).

2.5 Antecedentes

En la naturaleza existe una gran variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Y por lo tanto cumplen funciones no esenciales para las plantas. Como lo son funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) entre otras (Quiñonez *et al.*, 2012).

El consumo de dietas ricas en frutas y verduras ha demostrado, tanto en estudios epidemiológicos como de intervención, que reduce la morbi-mortalidad cardiovascular (Lorgeril *et al.*, 1999; Van de Berg *et al.*, 2001). El efecto beneficioso de estas dietas se ha atribuido, al menos en parte, a la presencia de polifenoles.

Los fenoles totales se encuentran en una elevada concentración en la granada (aprox. 83 mg/100 g de porción comestible o 250 mg/100 mL), comparable a la del vino tinto (valores medios de 203 mg/100 mL) y muy superior a la del té verde (aprox. 103 mg/100 mL) (Gil *et al.*, 2000), tan apreciado hoy en día por su capacidad antioxidante.

En el 2020 la granada en México alcanzó una producción de un poco más de 8000 toneladas de los 2 millones producidas en el mundo, lo que generó un aumento del 73% desde el 2009 donde se reportó una producción de 4,684 toneladas (SIAP, 2020).

El consumo de granada se hace en fresco, aunque los arilos del fruto y sus semillas son utilizados para la elaboración de jugos y otros productos alimenticios a nivel industrial; sin embargo, la cáscara de granada no es aprovechada, desechándose grandes cantidades sin dar una utilidad.

La cáscara de granada posee un alto contenido de polifenoles si se compara con su concentración en cualquier otra parte de la fruta, principalmente taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido gálico y elágico) y flavonoides (antocianinas, catequinas y otras sustancias complejas) (Akhtar, *et al.*, 2014).

La variedad de granada 'Negra' que se encuentra en Israel contiene niveles excepcionalmente altos de antocianinas en la cáscara de su fruta, que pueden alcanzar un contenido de hasta dos órdenes de magnitud mayor en comparación con las antocianinas de la cáscara de otras variedades de granada, en donde un estudio realizado por Trainin *et al.* en el 2021 demostró que el análisis de recombinación de 2 poblaciones redujo el rasgo "negro" a un área de 178,5 kb en el borrador de la secuencia del genoma de la granada variedad *Dabenzi*. Un gen putativo de antocianidina reductasa (ANR) se encuentra en esta área. Solo las variedades de granada que muestran el rasgo "negro" tienen una eliminación del par de bases hacia el final del gen, lo que provoca un cambio de marco que da como resultado una proteína más corta. Por lo que propusieron que esta mutación en el gen ANR es responsable de la diferente composición de antocianinas y los altos niveles de antocianinas del rasgo "negro" en la granada.

Los disolventes más utilizados para recuperar polifenoles son metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y mezclas entre estos (Muhlack *et al.*, 2019).

En los últimos años se han desarrollado metodologías que utilizan disolventes biodegradables y/o no tóxicos tales como el agua y el etanol, en consonancia con el concepto “Green Chemistry” (Dhobi *et al.*, 2009).

En el 2017 Valadez *et al.*, demostraron la alta cantidad de fenólicos totales que se pueden extraer haciendo uso de la técnica de microondas asistido por ultrasonido.

Se obtuvieron extractos de antocianinas en cáscara de granada variedad *Wonderful* (Vásquez, 2016).

En el 2015 Sandoval determinó parámetros cinéticos a partir de zumos pasteurizados de granada (*Punica granatum*) y arándano (*Vaccinium myrtillus*).

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continúa siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en años pasados, y en la actualidad, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción no convencionales (Caldas, 2012).

3. Metodología

3.1 Obtención de Granada (*Punica granatum*)

Se utilizó como materia prima 2 cosechas, la primera fue granada variedad *Wonderful* cosechada en junio del 2020 en Apaseo el Alto Guanajuato y la segunda fue granada variedad *Valenciana* cosechada en junio del 2021 en Tarímbaro Michoacán.

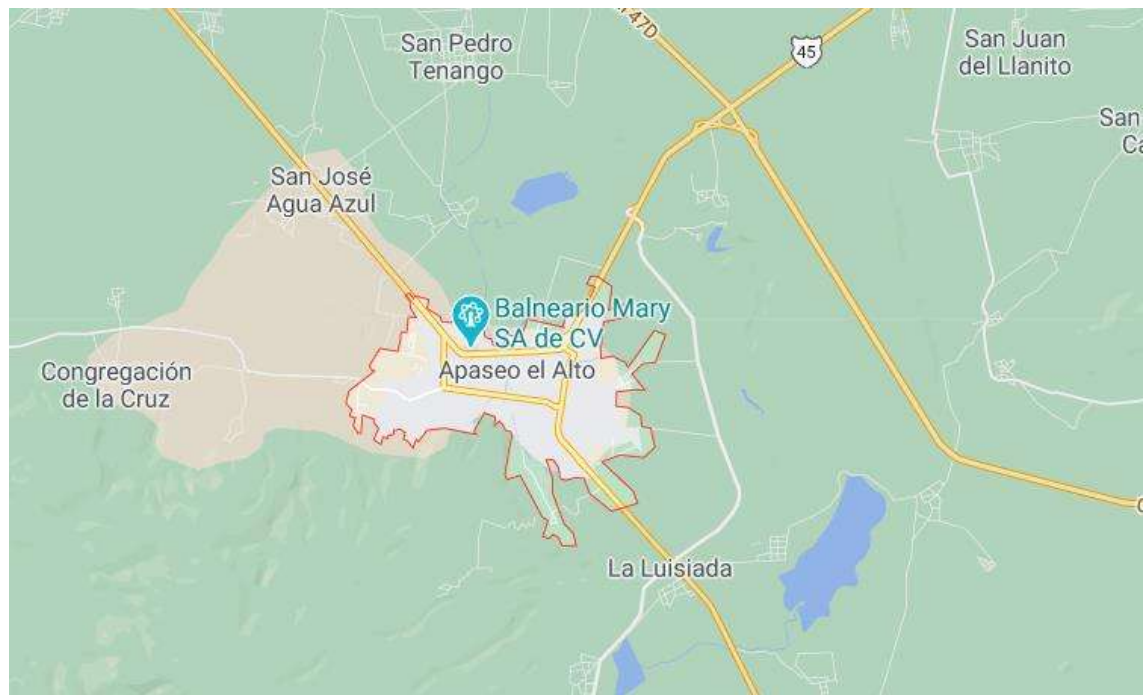


Figura 3. Ubicación geográfica de Apaseo el Alto Guanajuato.

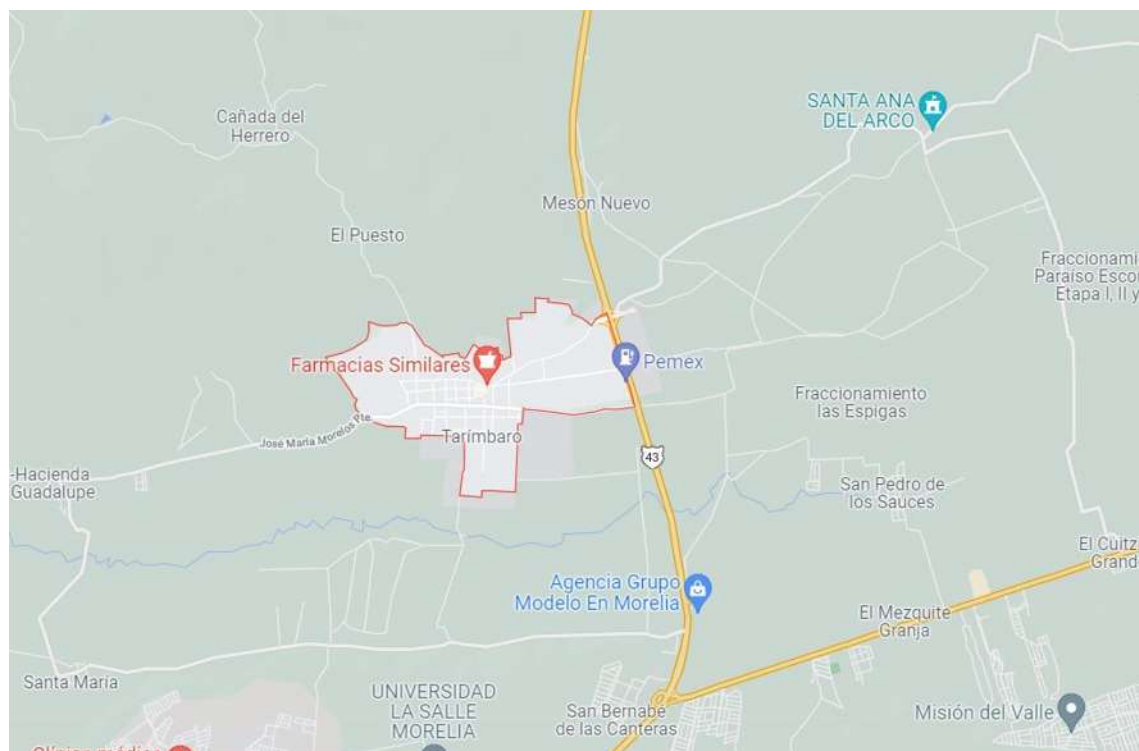


Figura 4. Ubicación geográfica de Tarímbaro Michoacán.

3.2 Determinación de dureza

Para realizar la prueba de dureza primero se realizó un muestreo representativo de cada lote (10 muestras) tomados al azar de diferentes puntos del lote, después se les hizo la prueba de dureza con un penetrómetro CNYST modelo GY-3 para frutas, y se realizaron con el cabezal de 11mm. de acuerdo con la dureza de nuestro fruto, para ello se sostuvo el fruto de manera firme sobre una superficie completamente plana y dura, se realizó presión con el cabezal sobre la superficie del fruto seleccionada para hacer la penetración, se retiró el cabezal y se registró la lectura obtenida por el penetrómetro (Brezmes, 2001).

3.3 Método del colorímetro

Para la medición del color se utilizó el colorímetro Colorflex de Hunterlab, para ello se tomaron 10 muestras de forma aleatoria de cada lote utilizado, y se colocaron sobre la superficie de cuarzo del colorímetro, se tapó con una manta para evitar el paso de la luz y se realizó la medición en 3 diferentes puntos para obtener el promedio del color total

de la granada dado a que no presentan un color uniforme en toda la cáscara, se obtuvo los parámetros L^*a^*b (Gilabert, 1992) y se promedió para obtener el color total.

3.4 Secado de cáscara

Para el secado de la cáscara de granada, primero se retiran los arilos y la membrana interna, una vez teniendo la cáscara aislada se fraccionó en cuadros de 1 centímetro por lado, posteriormente se llevó a un horno eléctrico por 36 horas a 55°C (Coronado, 2019).

3.5 Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos factorial 2^2 con 4 puntos centrales, tomando como variables de estudio la concentración de etanol y el tiempo de extracción, utilizando etanol a 96° marca Hycel, y utilizando como variables de respuestas el contenido total de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante por método DPPH[•] y ABTS^{•+} y halo de inhibición en *E. coli* y *S. aureus*, obteniendo como resultado la siguiente matriz experimental.

Tabla 2. Matriz del modelo experimental para la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de granada.

Variables de estudio		
Variables	Punto alto	Punto bajo
Tiempo de extracción (min)	120	30
Concentración (%)	96	72
Matriz experimental		
No. de corrida	Tiempo de extracción (min)	Concentración (%)
1	30	72
2	75	84
3	120	72
4	75	84
5	75	84
6	30	96
7	75	84
8	120	96
Variables de respuesta		
Variable	Unidades	
Fenoles totales	mg/ml Equivalentes de Ácido Gálico	
Flavonoides totales	mg/ml Equivalentes de Quercetina	
Actividad antioxidante por método DPPH*	%inhibición	
Actividad antioxidante por método ABTS**	%inhibición	
Halo de inhibición	mm de inhibición/mg extracto	

3.6 Procedimiento para la obtención de extractos

Los extractos se obtendrán por método Soxhlet utilizando las 2 variedades de granada.

Para la extracción Soxhlet se colocaron 5 gramos de cáscara de granada dentro de un cartucho de celulosa el cual se colocó dentro del sifón del equipo Soxhlet y se

colocó 150ml del solvente (etanol) dentro del matraz, se estructuró el equipo Soxhlet y se llevó a calentamiento a través de la parrilla de acuerdo con diseño experimental, después se usó el rotavapor para eliminar el solvente (etanol) colocando el extracto dentro del matraz y destilando por 20 minutos a 60rpm y 75°C (Nuñez, 2008). Se trabajó con las variedades *Wonderful* y *Valenciana*, respectivamente, utilizando las condiciones de extracción de acuerdo con el diseño de experimentos propuesto.

3.7 Evaluación del contenido de fenoles totales

Se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de ácido gálico (Meyer) a diferentes concentraciones con la lectura o medición de la absorbancia en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a una longitud de onda de 625 nm.

Para la cuantificación se siguió el método de Folin-Ciocalteu propuesto por García *et al.*, (2015) y modificado por Márquez *et al.*, (2020), se utilizó el extracto, el solvente utilizado agua, el reactivo de Folin (Hycel) y se dejó reaccionar por 15 minutos, posteriormente se detuvo la reacción utilizando carbonato de sodio (Meyer) al 20% p/p y se dejó reposar durante una hora para después leer en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a una longitud de onda de 625 nm.

3.8 Cuantificación de flavonoides totales

Se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de quercetina a diferentes concentraciones y midiendo en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a una longitud de onda de 475 nm.

El contenido de flavonoides se determinó mediante el ensayo de tricloruro de aluminio propuesto por Liu *et al.*, (2002) y modificado por Márquez *et al.*, (2020), se utilizó el extracto, cloruro de aluminio (Golden Bell), dejando reaccionar por 5 minutos, y se detuvo la reacción con acetato de sodio (J.T. Baker) y posteriormente se agregó el solvente utilizado y se midió en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a una longitud de onda de 475 nm.

3.9 Determinación de actividad antioxidante

3.9.1 Actividad antioxidante por método ABTS^{•+}

Siguiendo el método propuesto por Arnao *et al.*, (2001), se ajustó la absorbencia del reactivo ABTS^{•+} (Sigma Aldrich) con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 a una longitud de onda de 734 nm hasta obtener una absorbencia de 0.70±0.02 diluyendo con etanol, se realizó una curva de calibración utilizando 30 microlitros de un stock de trolox (Sigma Aldrich) a diferentes concentraciones y 2970 microlitros de la solución ajustada de ABTS^{•+} y midiendo la absorbencia en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 y por último se midieron las muestras en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, con 30 microlitros del extracto y 2970 microlitros de la solución ajustada de ABTS^{•+} a una longitud de onda de 734 nm.

El porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente formula:

$$\%inhibición = \frac{AR-AM}{AR} * 100 \quad (3.1)$$

donde AR es la absorbencia del reactivo (nm) y AM es la absorbencia de la muestra (nm).

3.9.2 Actividad antioxidante por método DPPH[•]

Siguiendo el método propuesto y desarrollado por Brand-Williams *et al.*, (1995), se ajustó la absorbencia del reactivo DPPH[•] (Sigma Aldrich) con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 a una longitud de onda de 515 nm hasta alcanzar una absorbencia entre .8 y 1, se realizó una curva de calibración utilizando 100 microlitros de un stock de Trolox (Sigma Aldrich) a diferentes concentraciones y 2.9 mililitros del reactivo DPPH[•] ajustado y reposando por 30 minutos para después leer en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, por último se midieron las muestras en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, utilizando 100 microlitros del extracto y 2.9 mililitros del reactivo ajustado y dejando reposar por 30 minutos a una longitud de onda de 515 nm.

El porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente formula:

$$\%inhibición = \frac{AR-AM}{AR} * 100 \quad (3.2)$$

3.10 Halo de inhibición

Para la prueba de halo de inhibición se debe esterilizar en autoclave el siguiente material: Puntas para Micropipeta de color azul, amarillo y blanco, sensidiscos, tubos falcón, 200 mL de solución salina al 4%p., pinzas, hisopos y 220 mL de medio de cultivo Agar MuellerHinton.

La esterilización en autoclave dura aproximadamente 1 hora por lo que 10 minutos antes de que se cumpla este plazo se deberán colocar en la campana de flujo laminar para la exposición directa de luz ultravioleta por alrededor de 20 minutos lámparas de alcohol y 12 cajas de Petri de plástico (Musmeci y Lezcano, 2015).

Se apaga la luz ultravioleta y se introduce a la campana de flujo laminar el medio, se enciende la lámpara de alcohol para asegurar la esterilidad de la campana y se colocan las cajas Petri para vaciar el medio en ellas. Vaciado el medio las cajas se mantienen semi abiertas hasta que el medio solidifique completamente. Solidificado el medio se toman 2 cajas Petri, en una de ellas se cultiva *E. coli* y en la otra *S. aureus* con la técnica de estría cruzada. Estas 2 cajas se pondrán en incubación por 24 horas a 37 °C.

El material que no se utilizó se reserva en un lugar limpio y fresco para asegurar la esterilidad de éste, las otras 10 cajas de Petri con el medio Agar MuellerHinton solidificado se sellan con parafilm y se conservan en refrigeración. Pasadas las 24 horas de incubación se debe observar el crecimiento de las colonias bacterianas en los medios.

Lo siguiente es poner a esterilizar en la campana de flujo laminar (luz ultravioleta) el siguiente material por 20 minutos: Puntas para micropipeta esterilizadas en la autoclave, sensidiscos, tubos falcón, 200 ml de solución salina al 4% p/p, pinzas, micropipeta: 1-5 mL, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 4 vasos de precipitado: uno con agua y los otros tres con solvente A, B y C, gradilla, celdas, lámpara de alcohol, encendedor e hisopos.

Para la preparación de la solución de bacterias se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1) El procedimiento debe realizarse en condiciones estériles, por lo que es necesario el uso de guantes de látex estériles y una lámpara de alcohol encendida.

2) Se toman dos tubos falcón, a cada uno se le agregan 15 mL de solución salina, con un asa bacteriológica se arrastra una cantidad media de bacterias de la caja de Petri donde están sembradas y se sumerge en la solución salina del tubo agitando hasta disolverla por completo. En un tubo se inoculará *E. coli* y en el otro *S. aureus*.

3) Se toman tres celdas en una gradilla, en la primera celda se coloca la solución salina sin inocular (blanco), en la segunda y tercera celda se coloca la solución de bacterias de *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

4) Por medio del uso de un espectrofotómetro de visible se miden lecturas de absorbencia a una longitud de 625nm. Las lecturas que se obtengan deben oscilar en un rango entre 0.08 y 0.1 nm, por lo que si las lecturas son menores a estos valores se deben agregar más bacterias a la solución; si por el contrario se superan estos valores es necesario diluir con solución salina.

Realizada la solución de bacterias es necesario marcar el lugar donde se colocará cada sensidisco en las cajas de Petri, así como el control que representan por medio de la siguiente nomenclatura:

A = antibiótico (control positivo).

H₂O = agua (control negativo).

M = Solvente A.

I, II, III y IV = corresponde al número de lote.

Concluida esta acción se procede con la técnica de halo de inhibición:

1) Se toma un tubo Falcón con la solución de bacterias que se preparó anteriormente y se sumerge un hisopo estéril en ella. Con el hisopo húmedo se toma la caja de Petri y se realiza un estriado por agotamiento en varias direcciones. Se siembra en 5 cajas de Petri *E. coli* y en los 5 restantes *S. aureus*.

2) Cada caja se deja semi abierta cerca de la lámpara de alcohol para mantener la esterilidad, hasta que se seque la solución de bacterias. Una vez seca se deben colocar los sensidiscos en los lugares marcados previamente.

3) Para el control positivo se debe colocar un sensidisco impregnado con antibiótico, en el caso de *E. coli* se utiliza un antibiótico para bacterias Gram negativas y para *S. aureus* se requiere un antibiótico para bacterias Gram positivas.

4) Se colocan el resto de los sensidiscos y a cada uno se le agrega 2 mL de extracto, agua o solvente según le corresponda por la nomenclatura ya mencionada.

5) Cuando las cajas estén terminadas y secas se tapan, se voltean y se sellan. Se deben incubar por 48 horas a una temperatura de 37 °C.

3.11 Cinética de degradación térmica

Se realizará una extracción de antocianinas en granada macerando la materia prima (arilos de granada), posteriormente pasará a filtración utilizando papel filtro con tamaño de poro de 8µm y se esteriliza utilizando luz ultravioleta por 10 minutos, una vez obtenido los extractos se someterá a las siguientes condiciones:

Tabla 3. Tiempos y temperaturas de almacenamientos de la granada usadas para la cinética de degradación térmica.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)
25	96
50	96
70	72

Y se cuantificarán las antocianinas totales usando el método de pH diferencial en diferentes intervalos de tiempo (12 horas).

El método de pH diferencial es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras).

Primero se preparan diluciones del extracto con solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio y con solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio.

Se mide la absorbencia de la muestra a la longitud de onda de máxima absorbencia ($\lambda_{max}=515$ nm) y a 700 nm. De la ecuación de Lambert-Beer se obtiene $C=A/\epsilon L$, C es la concentración molar, A es la absorbencia, ϵ corresponde a la absorbencia molar o coeficiente de extinción molar (constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda, se pueden utilizar los valores de absorbencia molar para pigmentos purificados tomados de la literatura), L es la longitud de recorrido en cm. La concentración en mg/L puede ser determinada multiplicando por el peso molecular (PM) del pigmento y por el factor de dilución (FD). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbencia molar del pigmento antociano presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina (PM 449.2 y ϵ 26900) (Villacorta *et al.*, 2016).

Por lo anterior la concentración de antocianinas monoméricas se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{(A) * (PM) * (FD) * (1000)}{(\epsilon) * (1)} \quad (3.3)$$

La absorbencia (A) se calcula de la forma siguiente:

$$A = (\lambda_{max} - \lambda_{700})_{pH=1.0} - (\lambda_{max} - \lambda_{700})_{pH=4.5} \quad (3.4)$$

La concentración de antocianinas totales se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(A') * (PM) * (FD) * (1000)}{(\epsilon) * (1)} \quad (3.5)$$

Además, valor de vida media $t_{1/2}$ del contenido total de antocianinas se calculó como $t_{1/2} = \ln 2/k$; y el valor D (el tiempo requerido para la degradación del 90% de antocianina) se calculó como $D = 1/k$.

4. Resultados

4.1 Dureza

La firmeza es uno de los parámetros fisicoquímicos que mejor se relaciona con el estado de maduración de la fruta.

En el caso de la granada la dureza no es parámetro para medir la madurez del fruto, dado que la dureza de la granada se debe a la expresión de diferentes proteínas, la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente estaban involucradas en modificación postraducciona y metabolismo de carbohidratos, la ruta de biosíntesis de la pared celular mostró correlaciones positivas con dureza de la semilla (Niu *et al.*, 2018), aunque la dureza si se pudiese ver afectado por la madurez del fruto.

Se realizó la prueba de resistencia a la penetración dado que en conjunto con la apariencia y el color de la granada son los principales atributos estéticos que inciden en la opinión del consumidor y que están relacionados con la cantidad de compuestos fitoquímicos presentes.

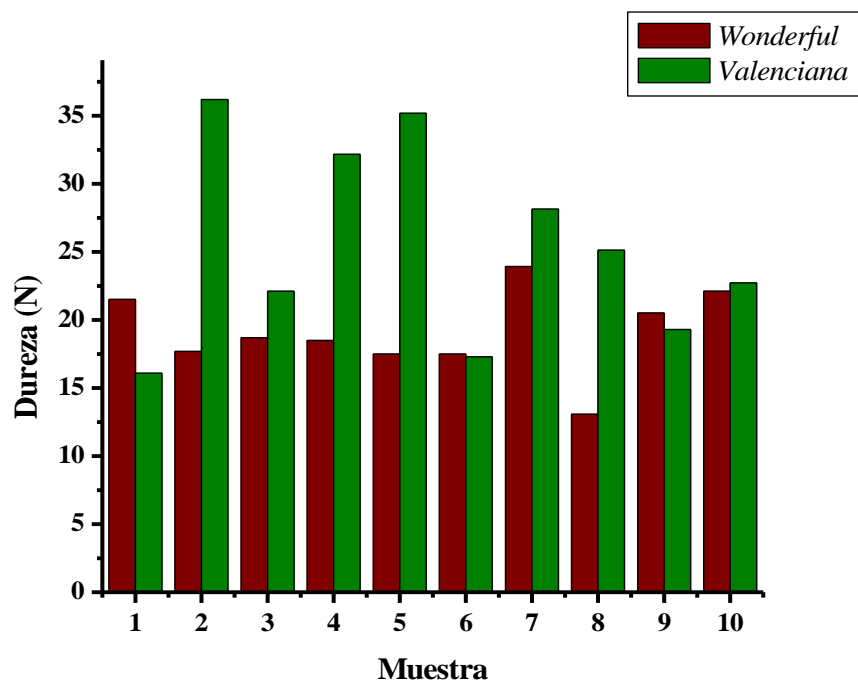


Figura 5. Prueba de resistencia a penetración del fruto en granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

Tabla 4. Estadístico de prueba de resistencia a penetración en granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

Variedad	Media	Desviación estándar	Varianza
<i>Wonderful</i>	18.85	2.973	8.836
<i>Valenciana</i>	25.15	7.364	54.225

Los resultados son el promedio de $n=10$. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Se observa que la dureza en la granada variedad *Valenciana* es mayor que en la granada variedad *Wonderful* llegando a tener una media de 25.15N mientras que en variedad *Wonderful* la mayor cantidad medida fue de 18.85N, datos que toman que concuerdan con la investigación realizada por Szychowski *et al.* en el 2015, en donde obtuvieron mediciones de dureza entre los 3 y 20 N en diferentes variedades de granada.

El estudio publicado por Zerai *et al.* en el 2013 demostró que existe diferencia significativa entre la dureza de granada de distintas variedades, dado que variedades de

granada “suaves” requirieron una fuerza de 29.48N para romper la semilla mientras que variedades de granada “dura” requirieron hasta 624.3N para romper su semilla. Aunado a esto el estudio mostró relación entre la dureza y la etapa del crecimiento del fruto, por lo cual la dureza del fruto podría dar indicios de la madurez del fruto y por lo tanto de la cantidad de compuestos fitoquímicos disponibles.

El ablandamiento de los frutos consiste en eventos genéticamente programados, caracterizados por procesos bioquímicos y fisiológicos que afectan su firmeza, color, sabor y textura (Nishiyama *et al.*, 2007). Es por ello la variación entre variedades y la variación entre un fruto a otro además de la influencia de los factores agronómicos.

La expresión de las proteínas se debe a muchos factores entre ellos la variedad, factores climáticos y muchos otros factores externos.

De acuerdo con el estudio publicado por Luo *et al.* en el 2018, en donde realizó un análisis de mi-ARN (Un micro-ARN o mi-ARN es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia) reguladores clave asociados con el desarrollo de la dureza de la semilla en la granada, donde encontró que estos mi-ARN suprimieron objetivos vitales, que incluían genes que codifican factores de transcripción y enzimas involucradas en las etapas tempranas del desarrollo de la semilla, así como proteínas involucradas en la síntesis y transporte de compuestos de almacenamiento en las semillas maduras. Los objetivos del mi-ARN incluían transcritos que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de brasinoesteroides, elongación y división celular, biosíntesis de lignina, biosíntesis de celulosa, biosíntesis y degradación de la pared celular y otras vías de señalización metabólica. A partir de estos resultados, concluyeron que el mi-ARN tiene como objetivo regular la dureza de la semilla al alterar la estructura de la pared celular en la granada. Estos hallazgos indican que la dureza de la semilla implica un proceso biológico complejo regulado por redes de micro ARN y ARN mensajero en la granada. Por lo que la dureza encontrada en cada variedad depende de estas moléculas y su diferente expresión lo cual también da indicio al tipo de compuestos presentes en la granada.

4.2 Color

La CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) ha desarrollado los sistemas más importantes y utilizados en la actualidad para la descripción y medición del color, los cuales se basan en la utilización de fuentes de iluminación y observadores estándares (Giese, 1995).

Para interpretar los resultados del colorímetro Colorfelx de Hunterlab se utilizarán las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, se utilizó el equipo ubicado en la Facultad de Químico Farmacobiología por lo cual se agradece a la D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos y al M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes, así como a la facultad por la facilitación del equipo.

La coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad y, puede tomar valores entre 0 y 100. Las coordenadas colorimétricas a^* y b^* forman un plano perpendicular a la coordenada L^* . La a^* define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad hacia el rojo si a^* es positiva, y hacia el verde si a^* es negativa. Análogamente la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo si b^* es positiva, y hacia el azul si b^* es negativa (Gilabert, 1992).

El conjunto $a^* b^*$ recibe el nombre de cromaticidad y junto con L^* definen el color del estímulo (en coordenadas cartesianas o rectangulares), y el ángulo h° indica si el color es rojo (0°), amarillo (90°), verde (180°) o azul (270°).

Tabla 5. Parámetros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad *Wonderful*.

Var. <i>Wonderful</i>				
Muestra	L	a*	b*	h°
1	35.98 ± 0.26	17.23 ± 0.24	10.73 ± 0.14	31.91 ± 0.69
2	35.75 ± 0.28	17.54 ± 0.21	11.43 ± 0.07	33.09 ± 0.61
3	38.06 ± 0.05	20.22 ± 0.05	12.24 ± 0.00	31.18 ± 0.41
4	39.35 ± 0.07	19.45 ± 0.02	13.29 ± 0.11	34.34 ± 0.73
5	45.94 ± 0.73	20.76 ± 0.10	16.79 ± 0.46	38.96 ± 1.19
6	37.97 ± 0.06	17.56 ± 0.21	12.12 ± 0.00	34.61 ± 0.76
7	41.86 ± 0.32	26.61 ± 0.69	12.14 ± 0.00	16.17 ± 1.08
8	37.33 ± 0.13	19.39 ± 0.03	10.46 ± 0.17	15.65 ± 1.13
9	36.55 ± 0.20	18.43 ± 0.12	10.94 ± 0.12	16.66 ± 1.03
10	37.69 ± 0.06	19.82 ± 0.02	11.77 ± 0.06	17.34 ± 1.05

Los resultados son el promedio de n=3 con ± el error estándar. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Tabla 6. Parámetros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad *Valenciana*.



Var. Valenciana				
Muestra	L	a*	b*	h°
1	40.35 ± 0.75	8.21 ± 0.08	18.04 ± 0.31	65.50 ± 3.02
2	49.49 ± 0.18	-0.84 ± 0.81	23.34 ± 0.21	87.93 ± 12.31
3	45.44 ± 0.21	7.68 ± 0.03	19.81 ± 0.13	68.80 ± 3.35
4	56.4 ± 0.87	4.13 ± 0.31	25.31 ± 0.41	80.72 ± 4.54
5	56.52 ± 0.89	-3.03 ± 1.03	25.82 ± 0.46	83.30 ± 11.85
6	46.60 ± 0.10	7.20 ± 0.01	19.86 ± 0.13	70.06 ± 3.48
7	46.06 ± 0.15	13.21 ± 0.58	18.98 ± 0.22	55.15 ± 1.99
8	50.73 ± 0.31	0.54 ± 0.67	23.24 ± 0.20	88.65 ± 5.34
9	45.46 ± 0.21	12.33 ± 0.50	20.39 ± 0.08	58.82 ± 2.35
10	39.02 ± 0.85	23.72 ± 1.64	17.24 ± 0.39	36.00 ± 0.07

Los resultados son el promedio de $n=3$ con \pm el error estándar. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Se puede observar que existe una diferencia importante entre las 2 variedades ya que la luminosidad y la intensidad de tonos amarillos es mayor en la variedad *Valenciana*, caso contrario en la intensidad de rojos y verdes en donde la variedad *Wonderful* muestra una clara tendencia hacia el rojo, sin embargo, no es tan notorio en la variedad *Valenciana* en donde 2 de las 10 muestras dieron resultados negativos que indican presencia de mayor coloración verde.

La baja luminosidad dentro de la granada puede deberse a un mayor contenido de Antocianinas en la granada. Que esta a su vez está asociada a diferentes mutaciones genéticas según lo reportado por Trainin *et al.* en el 2021.

Tabla 7. Ángulos h* calculados con parámetros CIELab.

Variedad	h*	Granadas
<i>Wonderful</i>	26.99 ± 2.94	
<i>Valenciana</i>	69.49 ± 5.25	

Los resultados son el promedio de n=10 con ± el error estándar. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Se puede observar a simple vista el cambio en la coloración de la granada según la variedad, la variedad *Wonderful* con su característico color rojizo y ángulos pequeños y la variedad *Valenciana* con ángulos h* cercanos a 90° y su color característico amarillento.

Este estudio es comparable con el estudio realizado por Zaouay *et al.* en el 2012 donde compararon diferentes cultivos de granada en Túnez, donde obtuvieron ángulos h* entre 17.1° y 68.8° rango similar al obtenido en este estudio. En este mismo estudio se realizó la correlación de actividad antioxidante y el color de las variedades de granada, el cual mostró que cultivares rojos ácidos demostraron tener jugos con alta capacidad antioxidante y gran cantidad de polifenoles que jugos de granada de cultivares con color menos rojo, el cual puede ser un indicio de la cantidad de fenoles y actividad antioxidante que puedan presentar ciertas variedades.

Coronado en el 2019, encontró ángulos entre 26.11° y 31.48° en granada variedad *Wonderful* rango dentro del cual se encuentra el presente estudio.

Dichas variaciones de color se podrían deber a la composición química del fruto, en especial al contenido de algunos flavonoides como las antocianinas. La coloración del fruto también podría verse afectado por los factores agronómicos, como lo demostró Nuncio *et al.* en el 2014 donde observo cambio en la coloración del fruto que creció en sombra y sol de hasta 28.93° utilizando la misma variedad.

4.3 Análisis de resultados del Diseño de Experimentos

Se llevó a cabo un diseño de experimentos factorial 2^2 con 4 puntos centrales utilizando como materia prima cáscara de granada variedad *Wonderful* cosechada en Apaseo del Alto, Guanajuato y variedad *Valenciana* cosechada en Tarímbaro, Michoacán, tomando como variables el tiempo de reposo y la concentración de etanol, este diseño se repetirá para ambas variedades de granada, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 8 y 9.

Tabla 8. Resultados de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Corrida	Fenoles totales (mg/ml EQ)	Flavonoides (mg/ml EAG)	ABTS (%inhibición)	DPPH (%inhibición)	<i>E. coli</i> (mm inhibición)	<i>S. Aureus</i> (mm inhibición)
1	1.1E-3	4.935E-5	87.359	84.780	14	15
2	6.1E-3	58.052E-5	89.527	83.385	15	17
3	2.8E-3	34.064E-5	89.855	85.445	17.5	16
4	2.3E-3	20.522E-5	87.377	85.061	13	15.5
5	4.8E-3	22.062E-5	78.034	77.967	22	18.5
6	4.8E-3	70.054E-5	77.119	80.891	23.5	20.5
7	8.3E-3	44.872E-5	79.768	77.575	24.5	20
8	1.8E-3	27.246E-5	77.119	81.033	32.5	19.5

Los resultados son el promedio de $n=3$ y $n=2$ para halo de inhibición. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Tabla 9. Resultados de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Corrida	Fenoles totales (mg/ml EQ)	Flavonoides (mg/ml EAG)	ABTS (%inhibición)	DPPH (%inhibición)	<i>E. coli</i> (mm inhibición)	<i>S. Aureus</i> (mm inhibición)
1	7.266E-3	43.954E-5	87.575	84.777	24.5	22
2	55.512E-3	265.857E-5	88.317	82.841	27	21.5
3	6.589E-3	48.084E-5	88.548	85.865	22	22
4	18.383E-3	81.781E-5	90.079	84.370	25	21
5	42.054E-3	206.855E-5	88.595	84.811	23	24
6	17.438E-3	95.259E-5	88.271	83.894	21	20.5
7	20.442E-3	85.778E-5	88.642	84.404	23	20.5
8	13.925E-3	82.441E-5	87.714	85.627	22	22

Los resultados son el promedio de $n=3$ y $n=2$ para halo de inhibición. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

Se puede observar que el contenido de fenoles y flavonoides totales es mayor en variedad *Valenciana* obteniendo datos de hasta 0.0551 mg/ml EQ y 0.0027 mg/ml EAG respectivamente mientras que en variedad *Wonderful* se obtuvo hasta 0.0083 mg/ml EQ y 0.0007 mg/ml EAG, de la misma manera se cuantifica mayor cantidad de actividad antioxidante y actividad microbicida en variedad *Valenciana* obteniendo hasta 90.08 por ciento de inhibición y hasta 27 mm de inhibición, respectivamente. De acuerdo al estudio publicado por Serrano *et al.* en el 2020, las granadas variedades *Valencianas* presentan mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante con respecto de variedades Mollares, agridulces y/o ácidas, lo cual es verificado en este estudio donde los extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* presentaron mayor contenido de fenoles, flavonoides y actividad microbicida que los extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* la cual es considerada una variedad de granada ácida.

En las siguientes secciones se analizará el diseño experimental para cada variable de respuesta.

Se puede observar que la actividad antioxidante presentada por los extractos de cáscara de granada en todos los extractos supera el 75% de inhibición de radicales libres (ABTS^{••} y DPPH[•]) en ambas variedades de granada (*Wonderful* y *Valenciana*), si se compara con los extractos de otras partes de la fruta resulta ser muy superior, tal como

se encontró en la investigación reportada por Juhaimi *et al.* en el 2017, en donde en extractos de semilla de granada de diferentes variedades encontró actividad antioxidante de 17 a 22% de inhibición de radicales libres.

Tabla 10. Resultados de rendimientos obtenidos en los extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

	Variedad	
	<i>Wonderful</i>	<i>Valenciana</i>
Rendimiento (%)	59.46 ± 2.87	16.50 ± 2.29

Los resultados son el promedio de n=8 con ± el error estándar. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 8.9.

En cuanto a los rendimientos de los extractos obtenidos en los diseños experimentales se puede observar una diferencia alta, esto se le atribuye a la concentración de metabolitos. Si bien el rendimiento fue mayor en variedad *Wonderful*, la cantidad de fenoles y flavonoides obtenidos fue menor por lo que se puede deducir que se obtuvieron extractos más diluidos. También puede deberse al tipo de compuestos presentes en los extractos y a la afinidad de dichos compuestos con alguno de los 2 solventes (etanol y agua).

La diferencia en los rendimientos es comparable a la obtenida por Gómez en el 2018, donde obtuvo rendimientos de 40 y 70% utilizando granada proveniente de Guanajuato y Oaxaca, México, respectivamente, esto se ve reflejado en un ahorro de energía dado que a las mismas condiciones se obtienen extractos más concentrados y con mayor cantidad de metabolitos secundarios.

4.4 Fenoles totales

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas utilizando como variable de respuesta la cantidad de fenoles totales expresados en mg/ml EAG (Equivalentes de Ácido Gálico), utilizando una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 11. Análisis de varianza para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Relación F</i>	<i>Valor P</i>
A: Tiempo de extracción	0.00000149789	1	0.00000149789	0.17	0.7008
B: Concentración	9.2455E-7	1	9.2455E-7	0.11	0.7618
AB	0.0000053824	1	0.0000053824	0.61	0.4774
Total error	0.0000351205	4	0.00000878012		
Total (corr.)	0.0000417995	7			

Tabla 12. Análisis de varianza para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Relación F</i>	<i>Valor P</i>
A: Tiempo de extracción	0.00000577809	1	0.00000577809	0.01	0.9204
B: Concentración	0.0000299137	1	0.0000299137	0.06	0.8206
AB	0.00000201001	1	0.00000201001	0.00	0.9530
Total error	0.0020411	4	0.000510274		
Total (corr.)	0.00207741	7			

Las tablas 11 y 12 muestran que el ANOVA particiona la variabilidad de Fenoles totales en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor *P* menor que 0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales (*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$F_t = -0.0102695 + 0.000151571 * A + 0.000172262 * B - 0.00000184127 * AB \quad (3.1)$$

Y para variedad *Valenciana*:

$$F_t = 0.000670179 + 0.0000734905 * A + 0.000278735 * B - 0.0000011252 * AB \quad (3.2)$$

Donde A = Tiempo de extracción y B = Concentración y Ft = fenoles totales. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

Salinas *et al.* en el 2019 realizaron extracciones de compuestos fenólicos en cáscara de granada, dichas granadas fueron obtenidas de la empresa Mashei en donde se determinó que existe una significancia estadística de la concentración, caso contrario al obtenido en esta investigación. Lo anterior puede deberse a los niveles del diseño experimental dado que Salinas *et al.* en el 2019 utilizaron un rango entre 0-100% y en esta investigación se utilizó un rango entre 72-96%, así como a los métodos de extracción dado que utilizaron Maceración y Extracción Asistida por Ultrasonido.

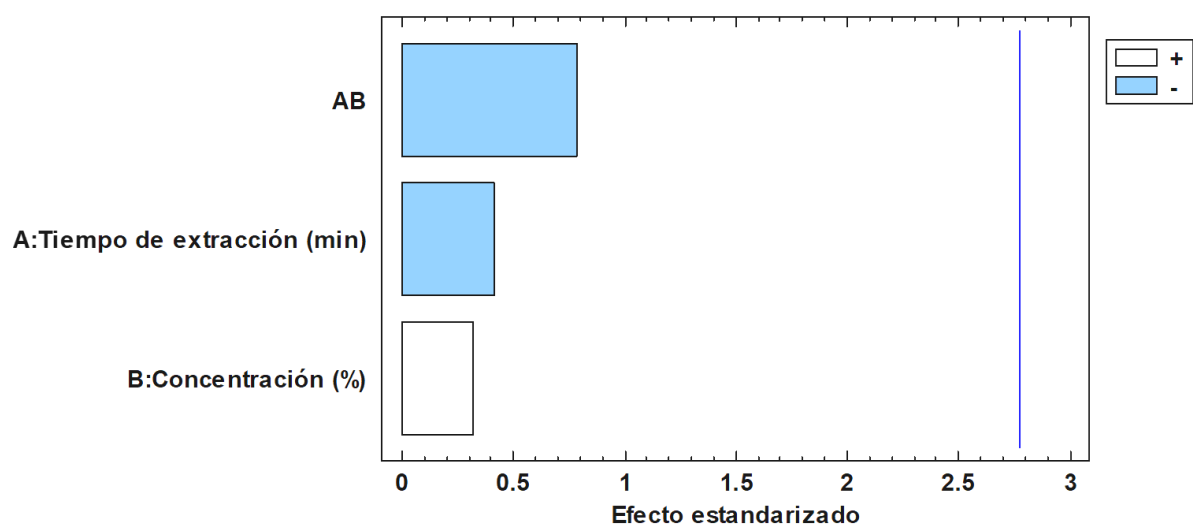


Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

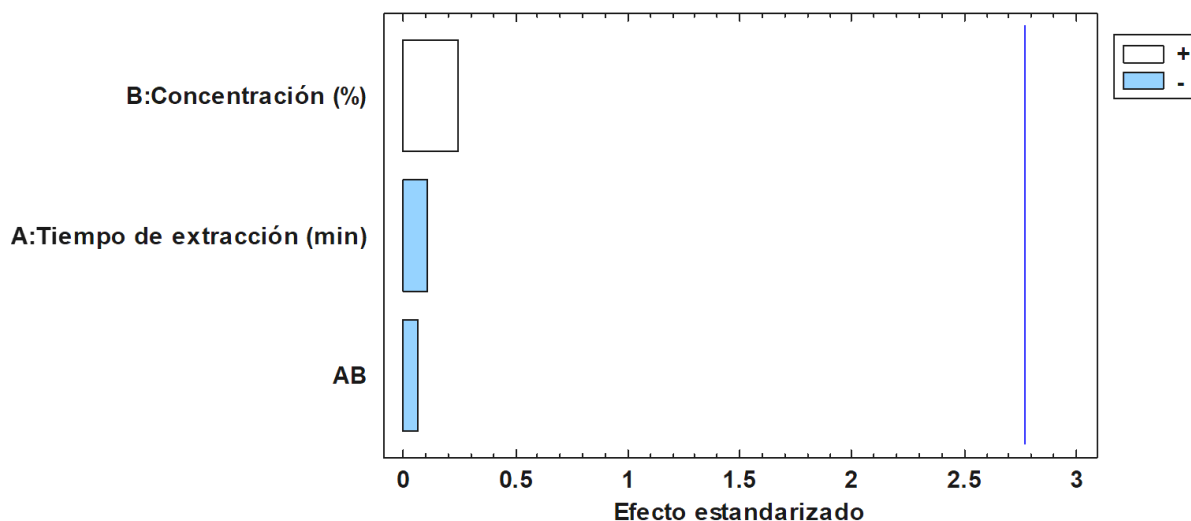


Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

Los gráficos de Pareto mostrados en la figura 6 y 7 indican de la misma manera que las tablas 11 Y 12 que ninguno de los efectos ni sus interacciones son estadísticamente significativas, sin embargo se observa que la interacción entre tiempo y concentración de etanol en cáscara de granada variedad *Wonderful* fue la que más influye teniendo un valor P de 0.4774 y la variable que más influye en cáscara de granada variedad *Valenciana* es la concentración de etanol con un valor P de 0.8206, cabe destacar que la concentración de etanol influye de mayor manera que el tiempo de extracción en ambos diseños experimentales.

Como se puede observar los extractos con concentración de etanol del 96% cuantificaron mayor contenido de fenoles totales que al utilizar mezcla de etanol-agua, caso contrario a lo obtenido por Malviya *et al.* en el 2013, en donde obtuvieron extractos

a partir de cáscara de granada Ganesh a con mejores rendimientos en la cuantificación de fenoles totales al utilizar mezclas de solventes (etanol al 50% y agua al 50%) y al utilizar agua como solvente. Esto se puede deber al tipo de compuestos presentes en cada variedad, así como la polaridad de estos y por lo tanto la afinidad con el solvente propuesto.

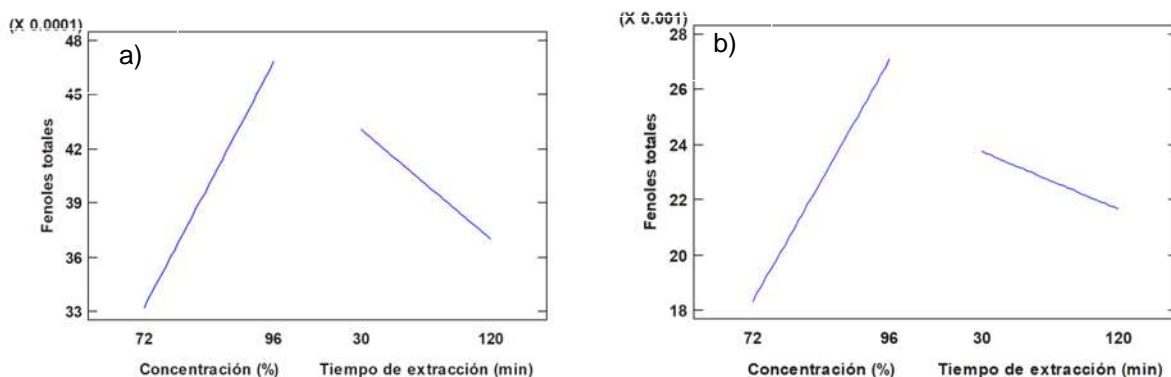


Figura 8. Gráfico de efecto principales para fenoles en cáscara de granada variedad a) Wonderful b) Valenciana.

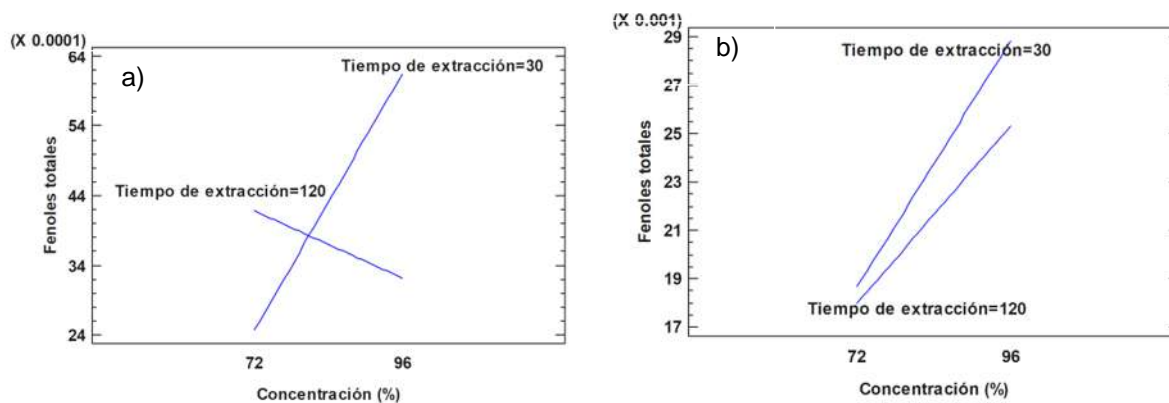


Figura 9. Gráfico de interacciones para fenoles totales en cáscara de granada variedad a) Wonderful b) Valenciana.

En la figura 8 se observa que la influencia de los efectos principales va en el mismo sentido para las 2 variedades de granada, la cantidad de fenoles totales aumenta conforme aumenta la concentración de etanol y disminuye el tiempo de extracción.

En la figura 9 se observa las interacciones entre los factores en donde se observa que las máximas concentraciones de fenoles totales se obtienen a una composición de etanol del 96% para ambas variedades de cáscara de granada, sin embargo, si se fija un tiempo de extracción de 120 minutos al utilizar cáscara de granada variedad *Wonderful* se obtiene mayor cantidad de fenoles con una composición de etanol menor (75%).

En estos gráficos se sigue observado que, aunque los factores no son estadísticamente significativos en el diseño propuesto tienen influencia en la cantidad de fenoles obtenidos, en investigaciones sobre métodos revolucionarios como Cloud Point Extraction (CPE) de igual manera se utiliza como variables de estudio el tiempo de extracción y la concentración de solvente para obtener las mejores condiciones de extracción (More & Arya, 2019).

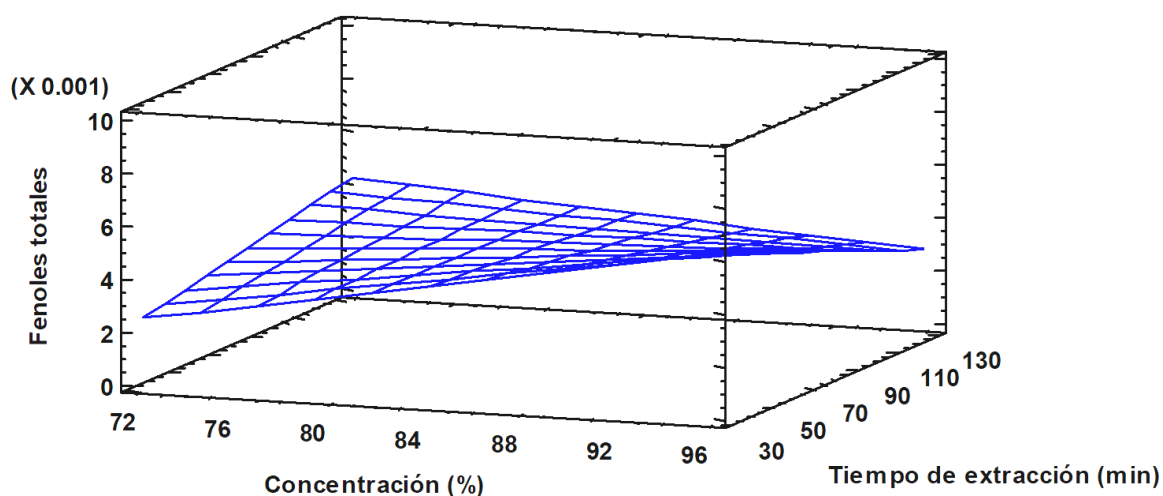


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

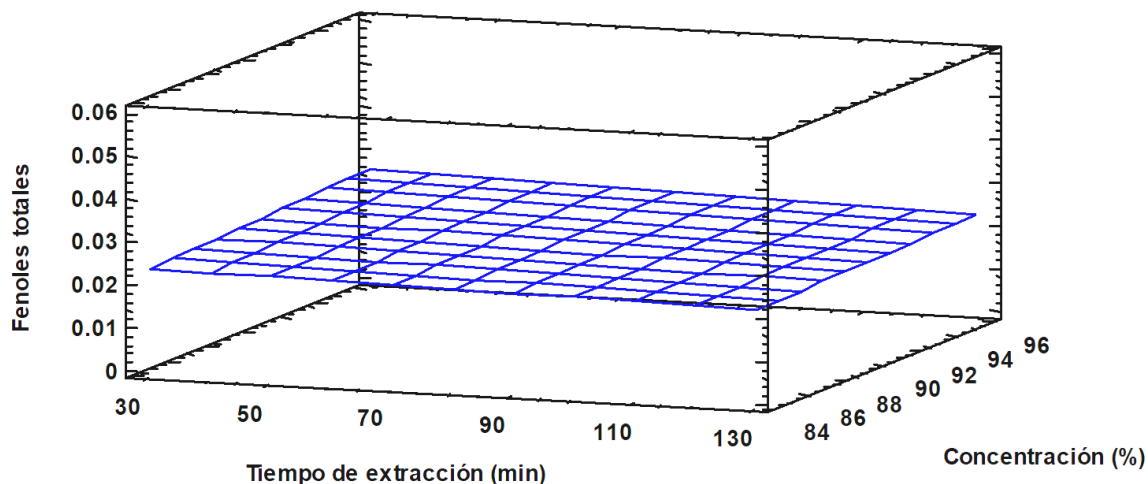


Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta para fenoles totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

En los gráficos de superficie de respuesta (figuras 10 y 11) se puede observar que la mayor cantidad de fenoles totales obtenida se da cuando se tiene el 96% en la concentración de etanol y en un tiempo de extracción de 30 minutos para ambas variedades (*Valenciana* y *Wonderful*). Se observa de manera más clara en el gráfico de superficie de respuesta de variedad *Wonderful* porque se ve una curva pronunciada en el extremo de concentración de etanol 96% y tiempo de extracción de 30 minutos. Esto se puede deber a los polifenoles presentes en las 2 diferentes variedades como lo demostró Legua *et al.* en el 2012 donde comparo el contenido de fenoles totales en diferentes variedades de granadas provenientes de Marruecos donde obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

Esto puede indicar que existen compuestos fenólicos solubles en etanol como lo pueden ser el ácido *p*-cumárico y sus derivados esteres, y que también tiene alto contenido de compuestos que son termosensibles como lo son las antocianinas, la cantidad de fenoles encontrados en los extractos es un poco menor si se compara con los extractos etanólicos cuantificados por Coronado en el 2018, en donde obtuvo rendimiento de fenoles totales de hasta 0.2481 mg/ml EAG.

Zarkosh *et al.* en el 2009 cuantificaron el total de fenoles totales de extractos de cáscara de granada de diferentes variedades "blandas" iraníes, en donde cuantifico desde

50 a 103 mg/100g de muestra, lo que concuerda con las diferencias mostradas en el contenido total de fenoles totales entre cáscara de granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

4.5 Flavonoides totales

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas en 2 variedades de cáscara de granada *Wonderful* y *Valenciana* utilizando como variable de respuesta la cantidad de flavonoides totales expresados en mg/ml EQ (Equivalentes de Quercetina), utilizando una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 13. Análisis de varianza para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Tiempo de extracción	2.70858E-8	1	2.70858E-8	1.05	0.3644
B: Concentración	8.22288E-8	1	8.22288E-8	3.17	0.1494
AB	1.29374E-7	1	1.29374E-7	4.99	0.0892
Total error	1.03633E-7	4	2.59083E-8		
Total (corr.)	3.19914E-7	7			

Tabla 14. Análisis de varianza para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Tiempo de extracción	4.23145E-9	1	4.23145E-9	0.00	0.9531
B: Concentración	8.67188E-8	1	8.67188E-8	0.08	0.7909
AB	7.18036E-9	1	7.18036E-9	0.01	0.9389
Total error	0.00000431574	4	0.00000107893		
Total (corr.)	0.00000441152	7			

Las tablas 13 y 14 muestran que el ANOVA particiona la variabilidad de flavonoides totales en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor *P* menor que 0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales

(*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$F_{vt} = - 0.00229809 + 0.00002379 * A + 0.0000315993 * B - 2.85465E - 7 * AB \quad (3.3)$$

Y para variedad *Valenciana*:

$$F_{vt} = - 0.000149491 + 0.00000530095 * A + 0.0000155078 * B - 6.72516E - 8 * AB \quad (3.4)$$

Donde A = Tiempo de extracción y B = Concentración y Ft = fenoles totales. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

En el 2017 Huang *et al.* realizaron una investigación donde cuantificaron el total de flavonoides en extractos de cáscara de granada proveniente de un mercado de Jiangsu, China utilizando el método de extracción asistida con microondas en donde de la misma manera que en esta investigación 2 de sus variables fueron la concentración de etanol y el tiempo de extracción. Se obtuvo el mismo resultado en cuanto el tiempo de extracción el cual resulto ser estadísticamente no significativo para cualquiera de los métodos y/o variedad de granada utilizada, caso contrario para la relación etanol-agua donde Huang *et al.* obtuvieron una relación *F* de 14.333, caso contrario a esta investigación donde el valor *F* mayor fue el de variedad *Wonderful* con un valor de 3.37 sin que este llegue a ser estadísticamente significativo. Estas diferencias se le pueden atribuir a diferentes factores como lo son: El tipo de extracción utilizado, el rango de concentración utilizado, la variedad de granada utilizada y las condiciones donde fue cosechada.

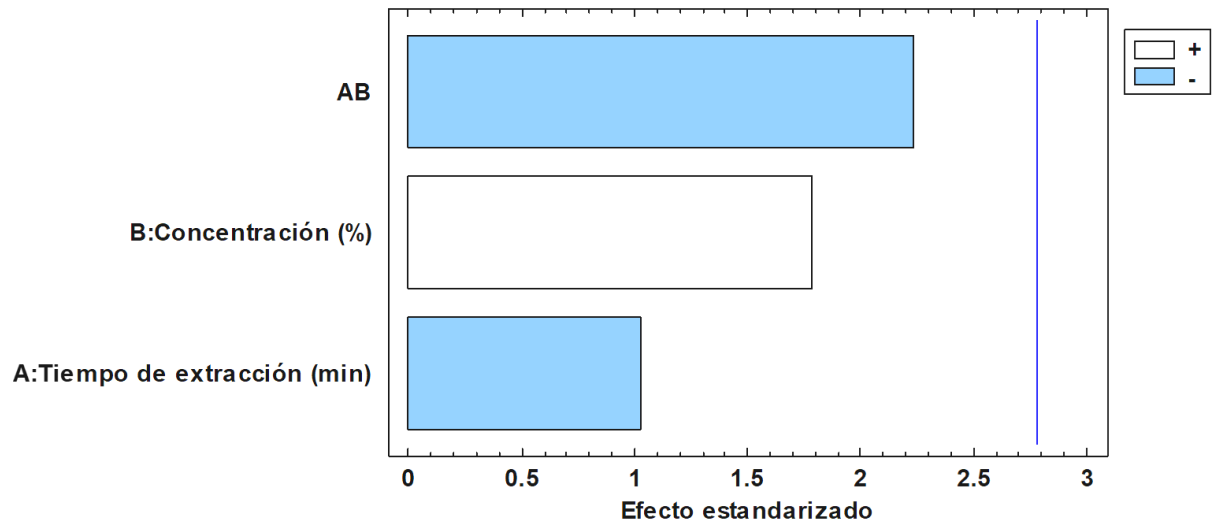


Figura 12. Diagrama de Pareto estandarizado para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

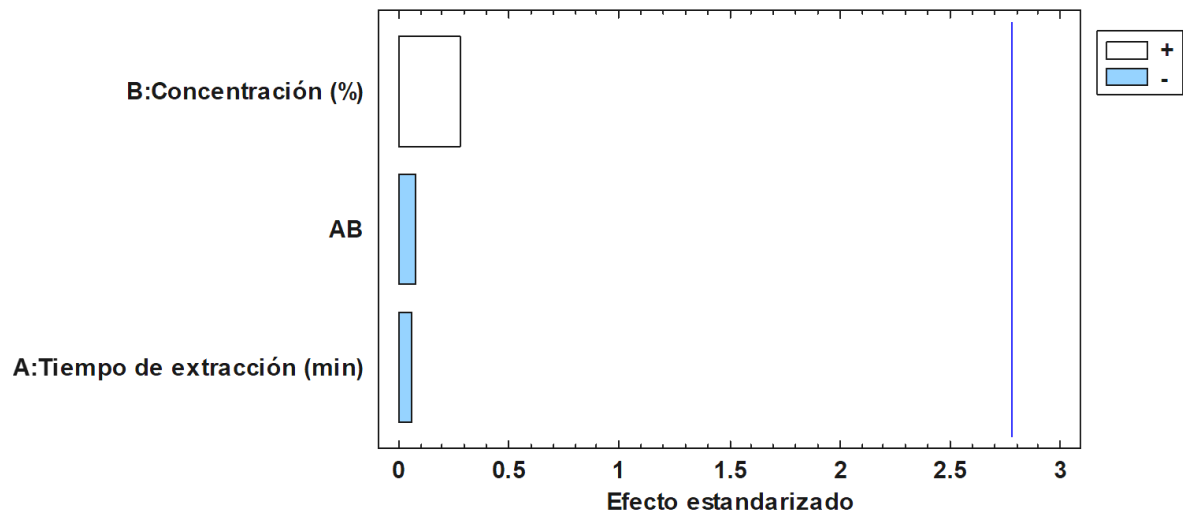


Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El

diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

Los gráficos de Pareto mostrados en la figura 12 y 13 indican de la misma manera que las tablas 13 Y 14 que ninguno de los efectos ni sus interacciones son estadísticamente significativas, sin embargo se observa que la interacción entre tiempo de extracción y concentración de etanol en cáscara de granada variedad *Wonderful* fue la que más influyen teniendo un valor P de 0.1403 estando cerca de convertirse en un factor estadísticamente significativo. Dicha interacción resulto ser de igual manera el factor que mas influyen en la cuantificación de fenoles totales, esto resulta lógico dado que como se describió en la Tabla 1, dentro de la clasificación estructural de los polifenoles se encuentra los flavonoides.

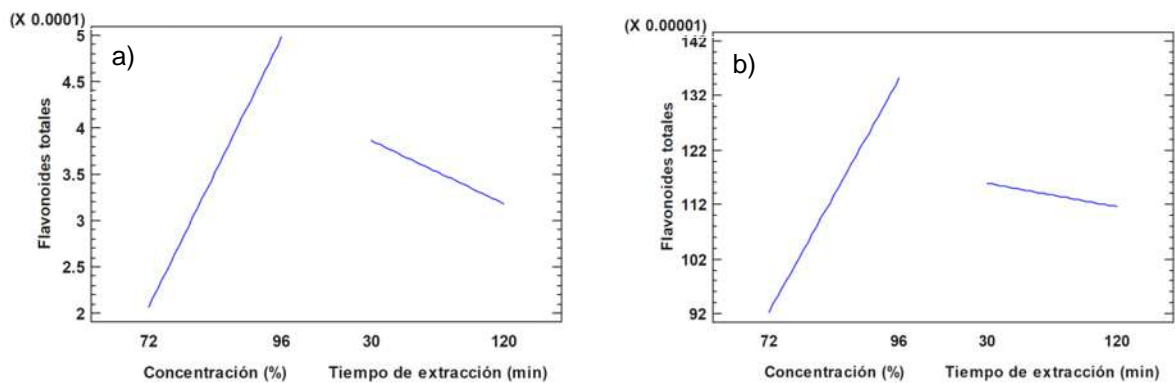


Figura 14. Gráfico de efecto principales para flavonoides totales en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

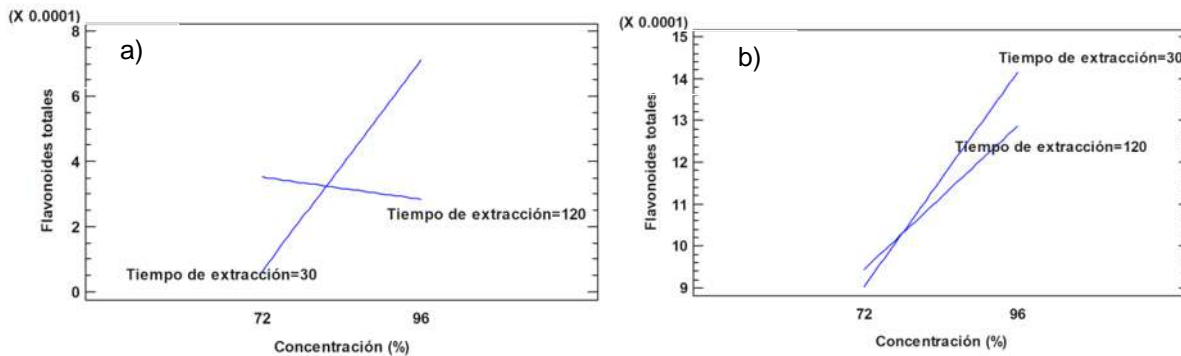


Figura 15. Gráfico de interacciones para flavonoides totales en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

En la figura 14 se observa que la influencia de los efectos principales es igual para las 2 variedades de cáscara de granada utilizada (*Wonderful* y *Valenciana*), en donde se obtiene mayor cantidad de flavonoides totales conforme aumenta la concentración de etanol y disminuye el tiempo de extracción, mismas condiciones en donde se cuantificaron mayor cantidad de fenoles totales.

Los gráficos de interacciones (figura 15) se observa que conforme aumenta la concentración de etanol aumenta la cantidad de flavonoides totales cuantificados, excepto cuando se tiene un tiempo de extracción de 120 minutos en donde no se nota la influencia de la concentración de etanol dado que la línea se mantiene casi horizontal, de la misma manera que en fenoles totales donde se cuantificaban mayor cantidad de estos en el punto bajo de la concentración de etanol (72%).

Kumar & Neeraj en el 2018 cuantificaron el total de flavonoides en extractos de cáscara de granada de 2 diferentes variedades (*Bhagwa* y *Ganesh*) en donde obtuvieron mayor cantidad de estos al utilizar etanol que otros solventes (hexano y metanol) para ambas variedades, mismo caso que en esta investigación en donde como ya se mencionó se cuantificaron mayor cantidad de flavonoides totales a una mayor concentración de etanol.

Mashkor y Muhson en el 2014 encontraron diferencia significativa entre extractos de cáscara de granada obtenidos con diferentes solventes a diferentes concentraciones, 2 de los solventes utilizados fueron etanol y agua en donde se encontró mayor cuantificación con etanol que con agua debido a la polaridad del solvente, mismo caso que esta investigación en donde al aumentar la concentración de etanol se obtiene mayor cantidad de flavonoides totales.

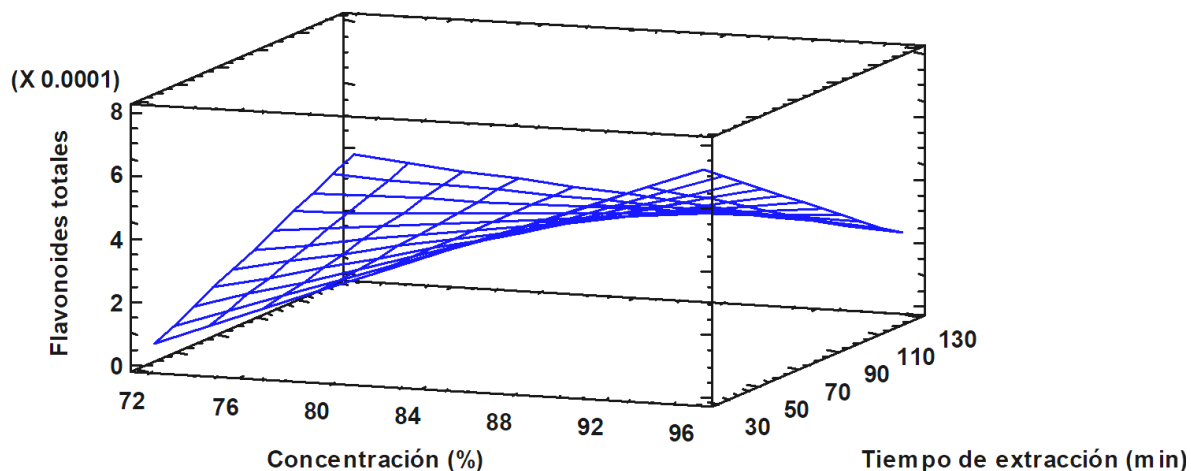


Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

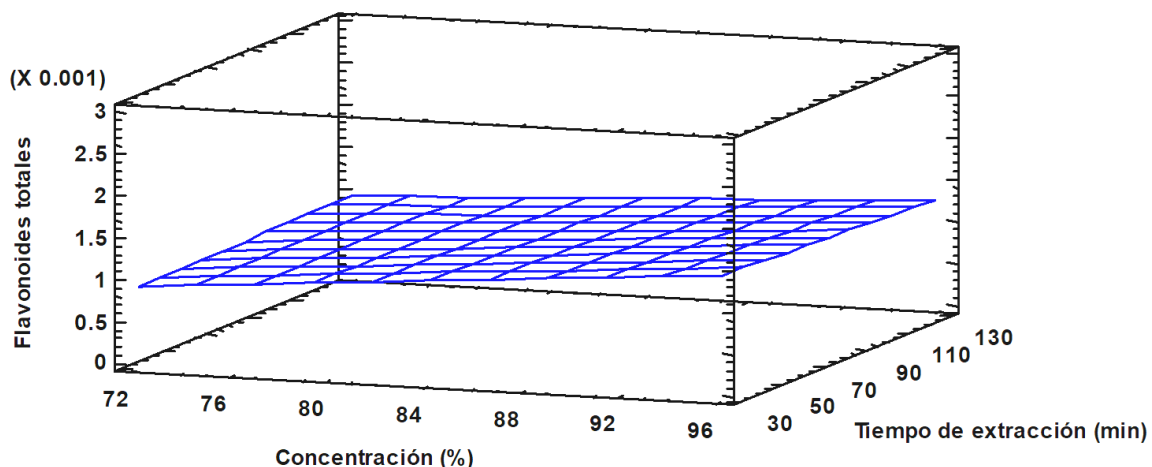


Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta para flavonoides totales en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

En los gráficos de superficie de respuesta figura 16 y 17 se observa que las mejores condiciones de extracción de flavonoides totales se tienen en una concentración de etanol de 96% y un tiempo de extracción de 30 minutos para ambas variedades de cáscara de granada, se puede observar de mejor manera en variedad *Wonderful* debido a que se observa una curva más pronunciada, caso contrario en variedad *Valenciana* donde se observa un gráfico más plano y pareciera que los factores no influyen de manera importante. La figura 17 confirma lo mostrado en el ANOVA, donde los valores *P* eran grandes por lo que no influyen en el proceso y por lo tanto no se tiene curvatura pronunciada en el gráfico de superficie de respuesta.

Soto en el 2014 obtuvo extractos etanólicos y acuosos a partir de cáscara de granada hidrolizando y liofilizando para la obtención de los extractos, donde no encontró diferencia significativa entre los 2 solventes caso contrario a Huang *et al.* en el 2017 donde utilizó el método MAE para obtener los extractos, con lo cual se deduce que la influencia del solvente utilizado y de la concentración de este depende del método de extracción utilizado.

Se puede observar el alto contenido de flavonoides totales encontrado a las mejores condiciones de extracción en donde alcanzo hasta 0.0011mg/ml EQ, similar a lo encontrado por Li *et al.* en el 2006 donde cuantifico hasta 59.1 mg de flavonoides por gramo de extracto de cáscara de granada, más de 3 veces mayor contenido a lo encontrado en la pulpa de la misma granada.

De acuerdo con las mejores condiciones de extracción se puede inferir que la mayor proporción de flavonoides presentes en los extractos debieran ser solubles en compuestos más polares como el etanol y termosensibles como las flavonas, isoflavonas, flavonoles, catequinas y antocianinas (Macías y Ayala, 2018), la concentración de flavonoides totales es acorde con la concentración de fenoles totales encontrada, teniendo un promedio de 9.31% de flavonoides totales dentro de la cantidad de fenoles totales que se obtuvieron en los extractos.

4.6 Actividad antioxidante

4.6.1 ABTS⁺

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas utilizando como variable de respuesta la actividad antioxidante por el método ABTS⁺ expresada en %inhibición en las 2 variedades de granada (*Wonderful* y *Valenciana*), utilizando una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 15. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método ABTS⁺ en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A:Tiempo de extracción	0.734672	1	0.734672	0.03	0.8690
B:Concentración	133.298	1	133.298	5.61	0.0769
AB	1.5575	1	1.5575	0.07	0.8106
Total error	95.0363	4	23.7591		
Total (corr.)	231.449	7			

Tabla 16. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método ABTS⁺ en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	4.836E-3	1	4.836E-3	0.01	0.9438
B:Tiempo de extracción	0.0435236	1	0.0435236	0.05	0.8330
AB	0.585151	1	0.585151	0.68	0.4558
Total error	3.44051	4	0.860128		
Total (corr.)	4.07402	7			

Las tablas 15 y 16 muestran que el ANOVA particiona la variabilidad de actividad antioxidante por el método ABTS⁺ en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor *P* menor que 0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales (*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente

diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$ABTS^{+} = 110.712 + 0.0990476 * A - 0.335964 * B - 0.000990476 * AB \quad (3.5)$$

Donde A = Tiempo de extracción y B = Concentración

Y para variedad *Valenciana*:

$$ABTS^{+} = 84.0751 + 0.0502236 * A + 0.0618144 * B - 0.000708287 * AB \quad (3.6)$$

Donde A = Concentración y B = Tiempo de extracción. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

Salinas *et al.* en el 2019 obtuvieron extractos a partir de cáscara de granada utilizando como variables en el diseño experimental de extracción temperatura, relación masa-volumen y concentración de etanol teniendo como variables respuesta la actividad antioxidante por el método ABTS⁺ donde la variable que más influye fue la concentración de etanol. Mismo caso que en el diseño aplicado a la cáscara de granada variedad *Wonderful*, donde se obtuvo un valor *P* de 0.0769, si bien no termina por ser estadísticamente significativo es una influencia bastante fuerte y es el factor que más influye de los 2 diseños experimentales aplicados.

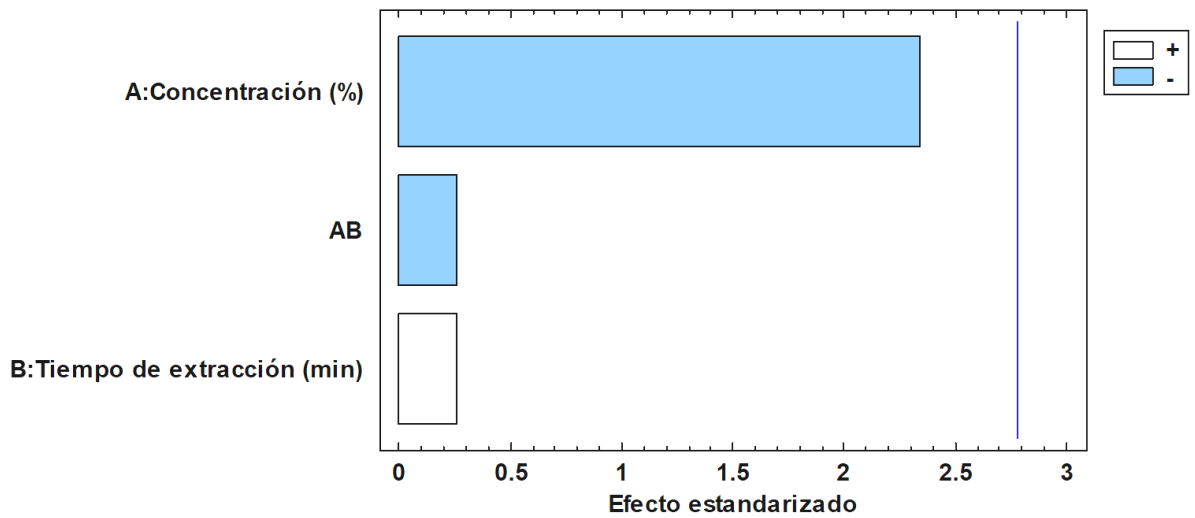


Figura 18. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método ABTS^{••} en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

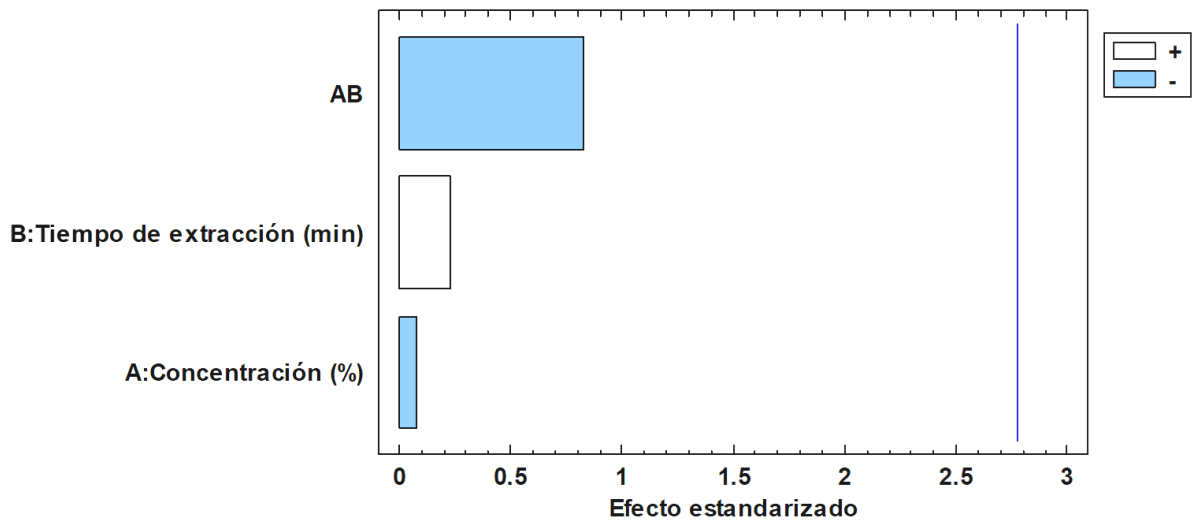


Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método ABTS^{••} en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El

diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

El diagrama de Pareto indica de la misma manera que la tabla ANOVA que ninguno de los factores ni sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la cuantificación de la actividad antioxidante por método ABTS⁺ para ninguna de las 2 variedades de cáscara de granada, siendo el factor “Concentración” el que influye de manera importante con un valor P de 0.0769 en el diseño de variedad *Wonderful* y siendo la interacción entre la concentración de etanol y el tiempo de extracción el factor que más influye en el diseño de cáscara de granada variedad *Valenciana* con un valor P de 0.4558. Casos contrarios a la cuantificación de fenoles y flavonoides totales donde los factores que más influyeron fueron la interacción para el diseño utilizando cáscara de granada variedad *Wonderful* y la concentración de etanol para el diseño con cáscara de granada variedad *Valenciana* lo que indica que además de fenoles totales existen otro tipo de compuestos que causan actividad antioxidante en los extractos obtenidos, este método tiene la capacidad de cuantificar la actividad antioxidante provocada tanto por compuestos hidrofílicos como lipofílicos.

Se puede observar que al igual que en fenoles y flavonoides totales la interacción entre el tiempo de extracción y la concentración de etanol son los factores que más influyen, por lo que los compuestos fenólicos contribuyen a la capacidad antioxidante de los extractos. Elfalleh *et al.* en el 2009 encontró correlación positiva en el ensayo de inhibición del radical ABTS⁺ con el contenido de fenoles y flavonoides totales en cáscara de granada e indica contribución de compuestos fenólicos en la capacidad antioxidante de los extractos.

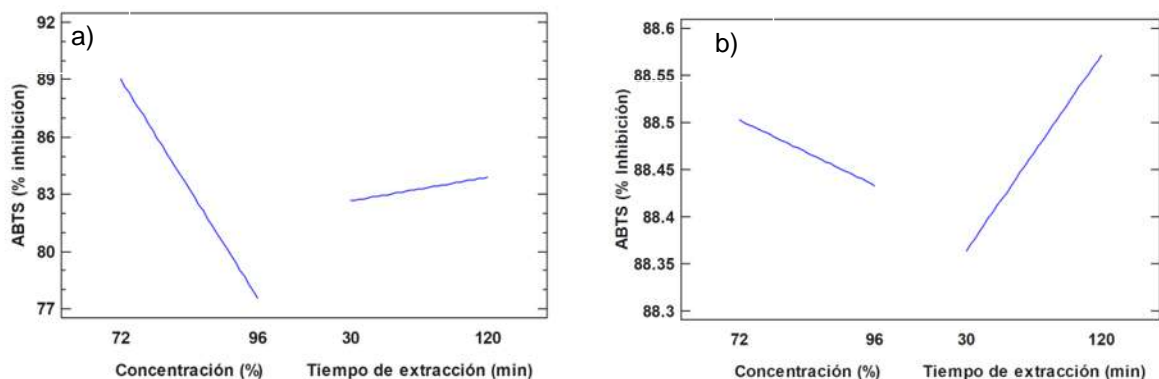


Figura 20. Gráfico de efecto principales para actividad antioxidante por el método ABTS⁺ en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

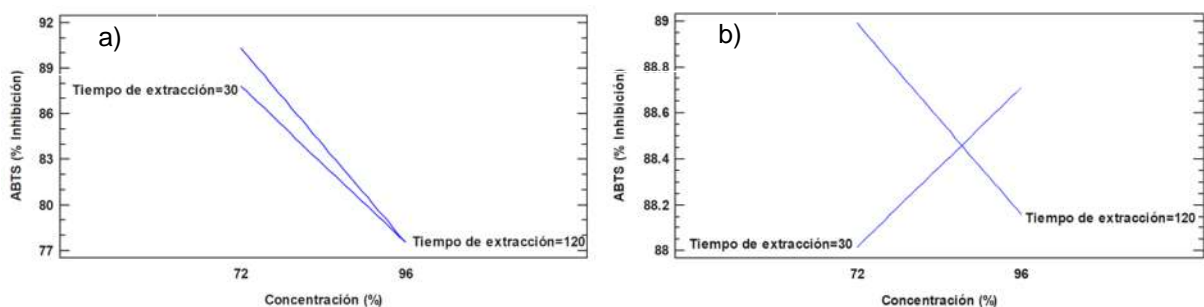


Figura 21. Gráfico de interacciones para actividad antioxidante por el método ABTS⁺ en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

En la figura 20 se observa que la influencia de los efectos principales es igual para las 2 variedades de cáscara de granada utilizada (*Wonderful* y *Valenciana*), en donde se obtiene mayor porcentaje de inhibición de radicales libres al momento de disminuir la concentración de etanol y aumentar el tiempo de extracción, esto indica que al utilizar mezclas de solventes se obtiene una mejor extracción para compuestos con actividad antioxidante en tiempos de extracción altos.

En los gráficos de interacciones (figura 21) se observa que al momento de utilizar etanol al 72% de concentración aumenta el porcentaje de inhibición de radical ABTS⁺. Solo cambia al momento de emplear el tiempo de 30 minutos en variedad *Valenciana*, donde se inhibe de mejor manera el radical libre mencionado al utilizar una concentración

de etanol del 96%, esto indica que los compuestos extraídos por etanol al 96% son termosensibles.

Mangan *et al.* en el 2021 probaron diferentes tratamientos de escaldado en cáscara de granada variedad *Wonderful*, en donde el tratamiento donde utilizaron un solvente al 70% de etanol fue el que obtuvo mejores condiciones al cuantificar su actividad antioxidante por el método ABTS⁺. Dicha investigación coincide en el uso de etanol en mezcla con agua como el solvente más efectivo para realizar extracciones con mayor actividad antioxidante, dado que en esta investigación al utilizar una concentración de etanol de 72% es donde se cuantificó mayor actividad antioxidante por método ABTS⁺ en ambas variedades de granada (*Valenciana* y *Wonderful*).

Marchi *et al.* en el 2015 realizaron extractos etanólicos y acuosos en cáscara de granada donde obtuvieron resultados de más de 20 $\mu\text{molTrolox/g}$, ellos realizaron los extractos etanólicos a una concentración del 80%, mismo caso que en esta investigación en donde se obtuvo mayor actividad antioxidante utilizando mezclas etanol-agua al 72%.

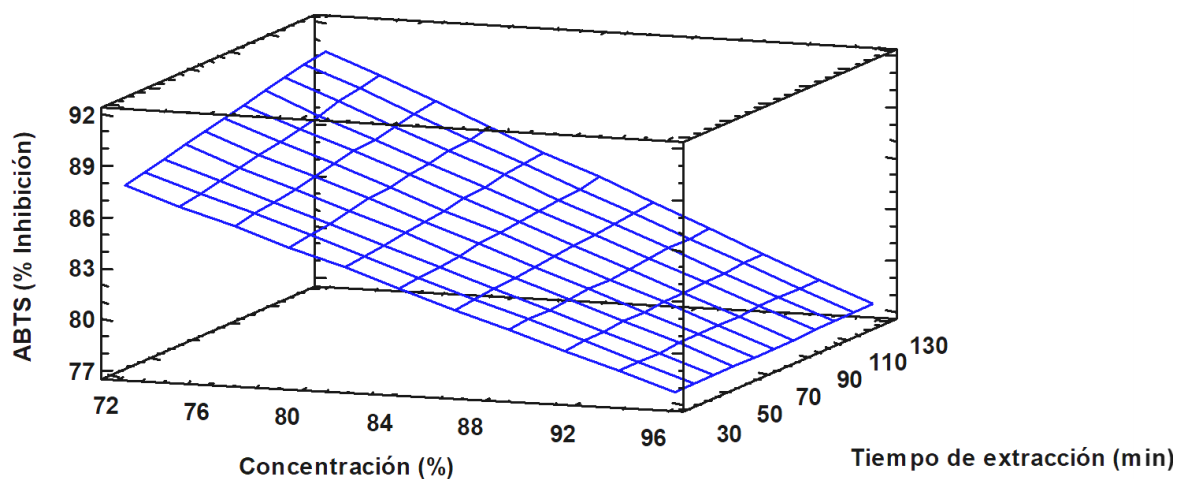


Figura 22. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método ABTS⁺ en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

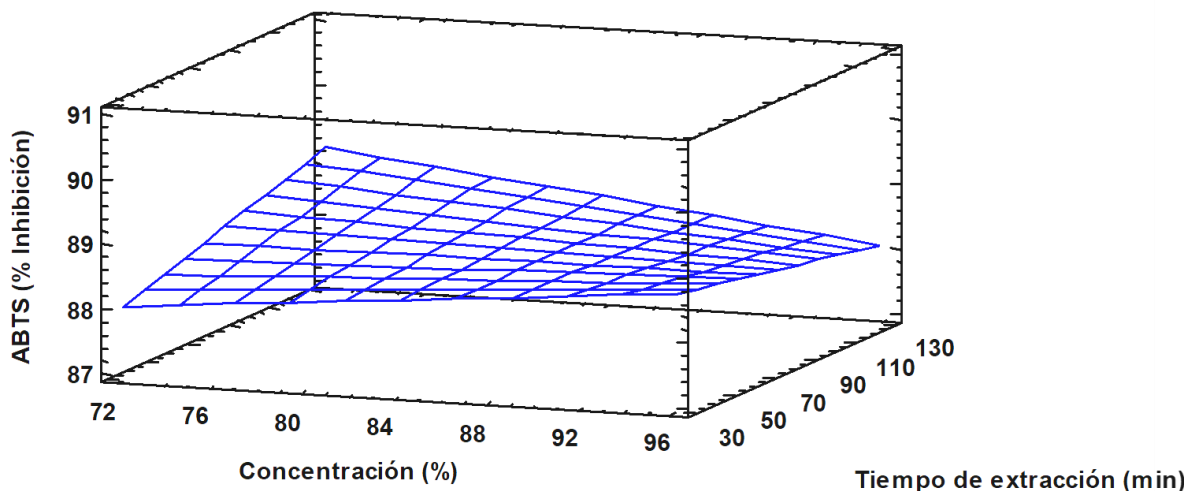


Figura 23. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método ABTS^{•+} en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

En los gráficos de superficie de respuesta (figura 22 y 23) se observa que las mejores condiciones de extracción son a un tiempo de extracción de 120 minutos y una concentración de etanol del 72% para ambas variedades de cáscara de granada, se puede observar de mejor manera en variedad *Wonderful* en donde el plano se ve de manera inclinada formando una recta para ambos sentidos llegando al punto máximo en 120 minutos y 72% de concentración de etanol.

De acuerdo con la investigación de Malviya *et al.* en el 2014 donde se comparó la extracción de compuestos con actividad antioxidante en donde obtuvieron mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} utilizando mezclas de solventes comparados con solventes puros, mismos resultados se obtuvieron en esta investigación dado que los gráficos de superficie de respuesta indican una mayor actividad antioxidante utilizando mezcla agua-etanol que utilizando etanol al 96%.

Estas condiciones de extracción presentan una aparente incongruencia con el contenido total de fenoles y flavonoides totales en donde se observó diferente comportamiento, por lo que se puede deducir que la actividad antioxidante en los

extractos de cáscara de granada se puede deber a compuestos no fenólicos como los diterpenos o los carotenoides.

El máximo porcentaje de inhibición máxima cuantificada fue de 90.08% inhibición presentada en variedad *Valenciana* y de 89.53% en variedad *Wonderful* un poco mayor a lo encontrado por Farfán *et al.* en el 2019 quienes reportan un 83.48% de inhibición en extractos hidroalcohólicos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

4.6.2 DPPH'

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas utilizando como variable de respuesta la actividad antioxidante mediante el método DPPH' expresada en %inhibición en 2 variedades de cáscara de granada (*Wonderful* y *Valenciana*), utilizando una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 17. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método DPPH' en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	17.2267	1	17.2267	1.34	0.3115
B:Tiempo de extracción	0.162812	1	0.162812	0.01	0.9158
AB	0.0683822	1	0.0683822	0.01	0.9454
Total error	51.4349	4	12.8587		
Total (corr.)	68.8927	7			

Tabla 18. Análisis de varianza para actividad antioxidante por el método DPPH' en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	0.314331	1	0.314331	0.31	0.6051
B:Tiempo de extracción	1.98845	1	1.98845	1.99	0.2315
AB	0.1042	1	0.1042	0.10	0.7631
Total error	4.00318	4	1.00079		
Total (corr.)	6.41016	7			

Las tablas 17 y 18 muestran que el ANOVA particiona la variabilidad de la actividad antioxidante por método DPPH' en piezas separadas para cada uno de los efectos,

entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor P menor que 0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales (*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$\text{DPPH} = 94.6822 - 0.154778 * A + 0.0248222 * B - 0.00024213 * AB \quad (3.7)$$

Y para variedad *Valenciana*:

$$\text{DPPH} = 87.2437 - 0.0457772 * A - 0.00943859 * B + 0.000298889 * AB \quad (3.8)$$

Donde A = Concentración y B = Tiempo de extracción. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

En la investigación reportada por Salinas *et al.* en el 2019 se obtuvieron extractos a partir de cáscara de granada utilizando como variables de extracción temperatura, relación masa-volumen y concentración de etanol teniendo como variables de respuesta la actividad antioxidante por el método DPPH donde una de las variables que más influyó fue la concentración de etanol siendo una variable estadísticamente significativa. Mismo caso que en el diseño aplicado a la cáscara de granada variedad *Wonderful*, donde se obtuvo un valor P de 0.3115, aunque en el caso de esta investigación no es estadísticamente significativo, caso contrario al diseño aplicado con cáscara de granada variedad *Valenciana* en donde el factor que más influyó es el tiempo de extracción con un valor P de 0.2315, sin llegar a ser estadísticamente significativo.

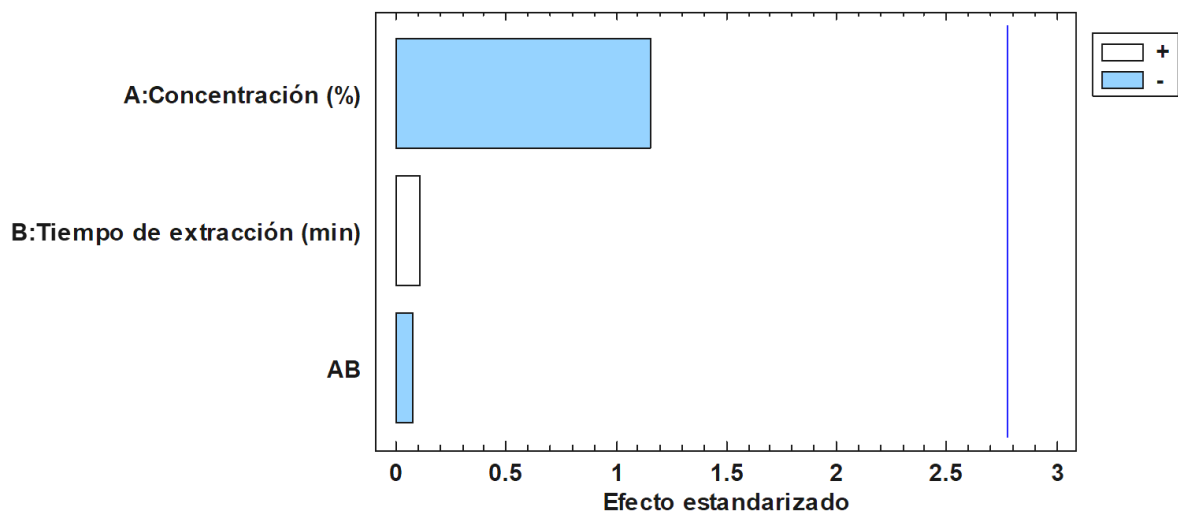


Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método DPPH en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

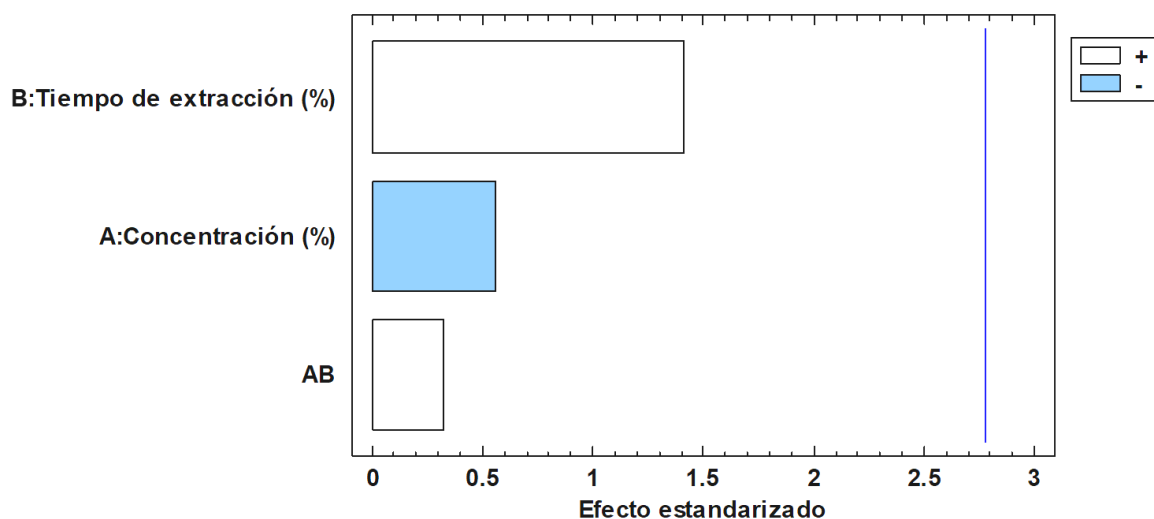


Figura 25. Diagrama de Pareto estandarizado para actividad antioxidante por el método DPPH en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El

diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

El diagrama de Pareto muestra al igual que la tabla ANOVA que ninguno de los factores, así como su interacción son estadísticamente significativos sobre la cuantificación de actividad antioxidante por el método DPPH* en ninguna de las 2 variedades de cáscara de granada. Si se comparan los resultados obtenidos por los 2 métodos de cuantificación de actividad antioxidante se puede observar que en el diseño para cáscara de granada variedad *Wonderful* los factores que más influyeron son, en el mismo orden (concentración de etanol <Tiempo de extracción<Interacción), para el diseño donde se utilizó cáscara de granada variedad *Valenciana* el factor que más influyen ya no es la interacción entre ambas factores, sin embargo sigue siendo el que más influyen en la extracción de compuestos con actividad antioxidante el tiempo de extracción.

Kharchoufi *et al.* en el 2018 obtuvieron extractos metanólicos y acuosos a partir de cáscara de granada variedad *Gabsi*, en donde obtuvieron actividad antioxidante similar para ambos extractos (Aproximadamente 4000 mmol Trolox/g) en donde al igual que en esta investigación el solvente del extracto no fue estadísticamente significativo. Cabe resaltar que en dicha investigación cuantificaron la punicalgina como el compuesto polifenólico mayoritario presente en los extractos, esto puede dar indicios del tipo de compuestos presentes en los extractos y a la atribución a la actividad antioxidante por parte de estos compuestos.

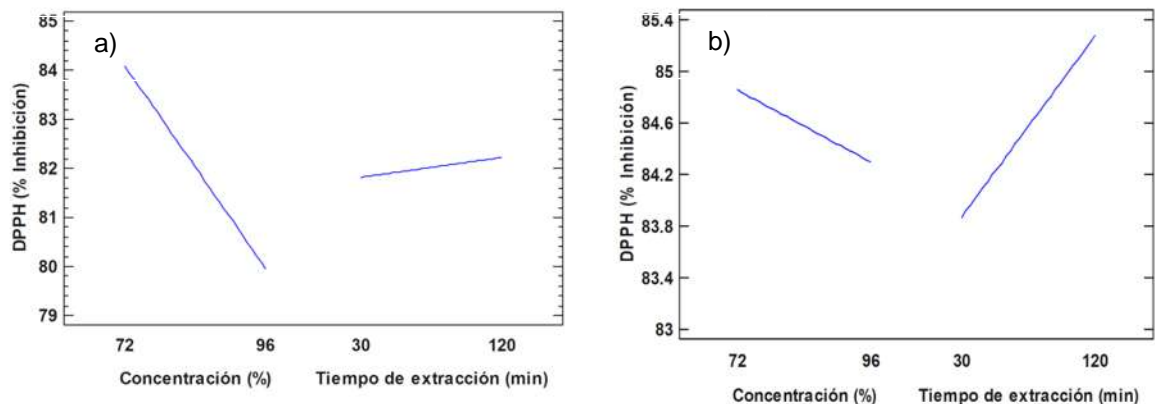


Figura 26. Gráfico de efecto principales para actividad antioxidante por el método DPPH^{*} en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

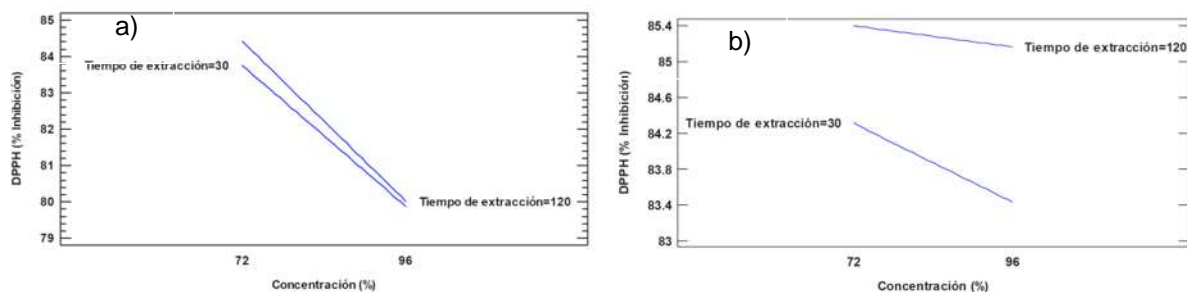


Figura 27. Gráfico de interacciones para actividad antioxidante por el método DPPH^{*} en cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

En la figura 26 se observa que la influencia de los efectos principales es igual para las 2 variedades de cáscara de granada utilizada (*Wonderful* y *Valenciana*), en donde se obtiene mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH^{*} al momento de disminuir la concentración de etanol y aumentar el tiempo de extracción. Como se puede observar son los mismos resultados que al momento de cuantificar con el método ABTS⁺, lo cual indica que independientemente del método de cuantificación de actividad antioxidante, esta es mayor al momento de utilizar mezclas de solventes de composición diluida en proporción (3:1 v/v).

En los gráficos de interacciones (figura 27) se observa que al momento de utilizar la mezcla de 2 solventes (etanol y agua) se obtiene mayor porcentaje de inhibición. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos con el método ABTS⁺. Como se mencionó en la sección anterior se han tenido mejores resultados utilizando mezclas de solventes en la cuantificación de actividad antioxidante que utilizando únicamente un solvente esto debido al grado de polaridad de los diferentes solventes utilizados y que se puede extraer mayor cantidad de compuestos con diferentes polaridades utilizando más de un solvente.

También se puede observar que el intervalo entre las 2 variedades de granada (*Wonderful* y *Valenciana*) no es muy diferente dado que ambas están alrededor del 85%, mismo resultado que obtuvieron Elfalleh *et al.* en el 2009 donde compararon diferentes ecotipos de granada provenientes de Túnez y realizaron extractos de estos donde cuantificaron su actividad antioxidante por ABTS⁺ y DPPH[•] y no encontraron diferencia estadísticamente significativa; por lo cual se puede inferir que la variedad de granada de donde se tome la cáscara no debería de influir en los resultados que se obtienen.

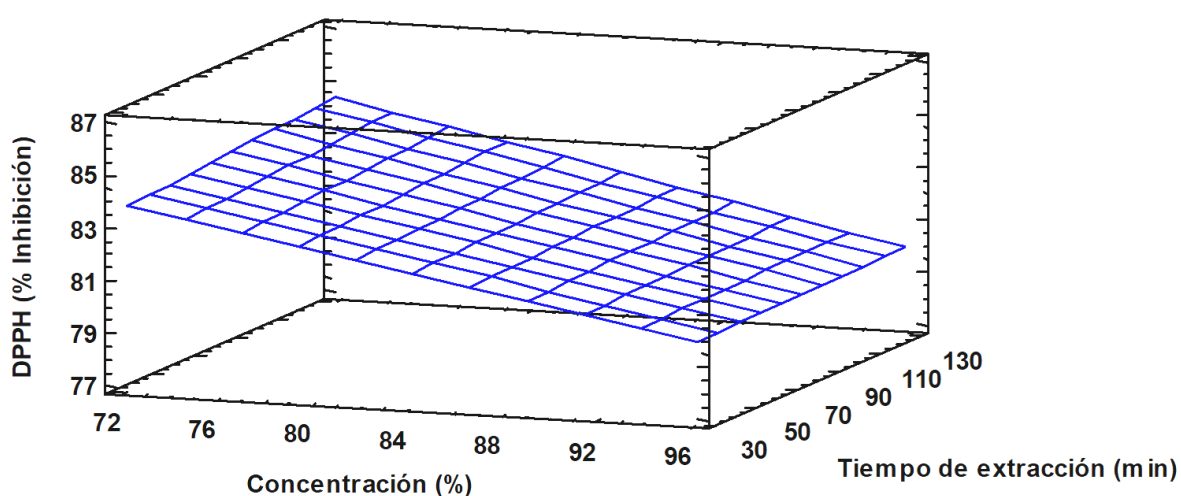


Figura 28. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método DPPH[•] en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

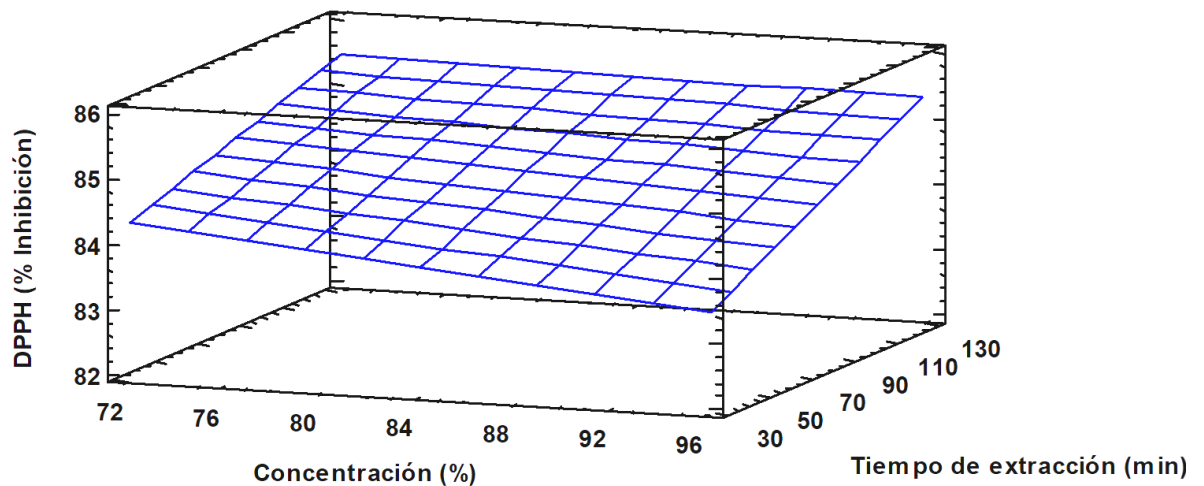


Figura 29. Gráfico de superficie de respuesta para actividad antioxidante por método DPPH' en extractos de cáscara de granada variedad Valenciana.

De acuerdo con los gráficos de superficie de respuesta (Figura 28 y 29) las mejores condiciones de extracción se encuentran a una concentración de etanol de 72% y un tiempo de extracción de 120 minutos. Mismas condiciones obtenidas para inhibir el radical ABTS^{•+}, en donde se observa una pendiente más pronunciada para el factor “Tiempo de extracción” para el diseño en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* y una pendiente más pronunciada para el factor “Concentración” para el diseño en extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*, gráfico que confirma los resultados obtenidos en los gráficos de Pareto (Figura 24 y 25).

Sood & Gupta en el 2015 obtuvieron extractos de cáscara de granada proveniente de un mercado local Himachal Pradesh, India, en donde utilizando etanol al 60% una de sus condiciones óptimas de extracción fue 45 minutos como tiempo de extracción, siendo este su punto medio, caso contrario al de esta investigación dado que se obtuvo una mejor condición de extracción a 120 minutos (nivel alto), esto se debe al tipo de compuestos presentes en la cáscara de granada y que tanto son afectados por altas temperaturas (75°C aproximadamente).

Se puede observar alta actividad antioxidante (alrededor del 85%) por método DPPH* donde gran parte de dicha actividad se ve afectada por el contenido de compuestos fenólicos en la cáscara de granada, Shadab *et al.* en el 2017 menciona que el contenido de fenoles totales es responsable de la actividad antioxidante por método DPPH* de suspensiones acuosas de cáscara de granada.

Se encuentra que las condiciones de extracción para actividad antioxidante para ambos métodos son idénticas, lo cual reafirma que dicha actividad se debe en mayor parte a compuestos no fenólicos.

El mayor porcentaje de inhibición fue de 85.86% que se dio en variedad *Valenciana* un poco menor a lo presentado por el método ABTS** pero sigue siendo mayor a lo reportado por Farfán *et al.* en el 2019, estas pequeñas diferencias se pueden deber a la estabilidad de los radicales libres, sin embargo, no marca una gran diferencia y pueden ser despreciadas dado que no afecta al momento de optimizar el proceso de extracción.

4.7 Halo de inhibición

4.7.1 *Staphylococcus aureus*

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas utilizando como variable de respuesta halo de inhibición expresado en mm de inhibición/mg de extracto en *S. aureus* utilizando extractos de 2 variedades de cáscara de granada (*Wonderful* y *Valenciana*), con una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 19. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre *S. aureus* utilizando extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	20.25	1	20.25	7.20	0.0550
B: Tiempo de extracción	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AB	1.0	1	1.0	0.36	0.5831
Total error	11.25	4	2.8125		
Total (corr.)	32.5	7			

Tabla 20. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre *S. aureus* utilizando extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	0.5625	1	0.5625	0.31	0.6079
B: Tiempo de extracción	0.5625	1	0.5625	0.31	0.6079
AB	0.5625	1	0.5625	0.31	0.6079
Total error	7.28125	4	1.82031		
Total (corr.)	8.96875	7			

Las tablas ANOVA (tabla 19 y 20) particionan la variabilidad de halo de inhibición sobre *S. aureus* en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor *P* menor que 0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales (*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$\text{Halo de inhibición } S. aureus = -3.83333 + 0.256944 * A + 0.0777778 * B - 0.000925926 * AB \quad (3.9)$$

Y para variedad *Valenciana*:

$$\text{Halo de inhibición } S. aureus = 28.0625 - 0.0833333 * A - 0.05 * B + 0.000694444 * AB \quad (3.10)$$

Donde A = Concentración y B = Tiempo de extracción. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

Sin embargo, se puede observar que en extractos de cáscara variedad *Wonderful* el factor "Concentración" tiene un valor *P* de 0.0550 muy cercano a llegar a la significancia estadística y por mucho el factor que más influye. Malviya *et al*, en el 2013 realizaron una comparación en la actividad inhibitoria de extractos de cáscara de granada variedad *Ganesh* sobre *S. aureus* utilizando 3 diferentes solventes (metanol, agua y etanol) y

diferentes mezclas etanol-agua en donde de la misma manera encontraron que la concentración de solvente no es estadísticamente significativa.

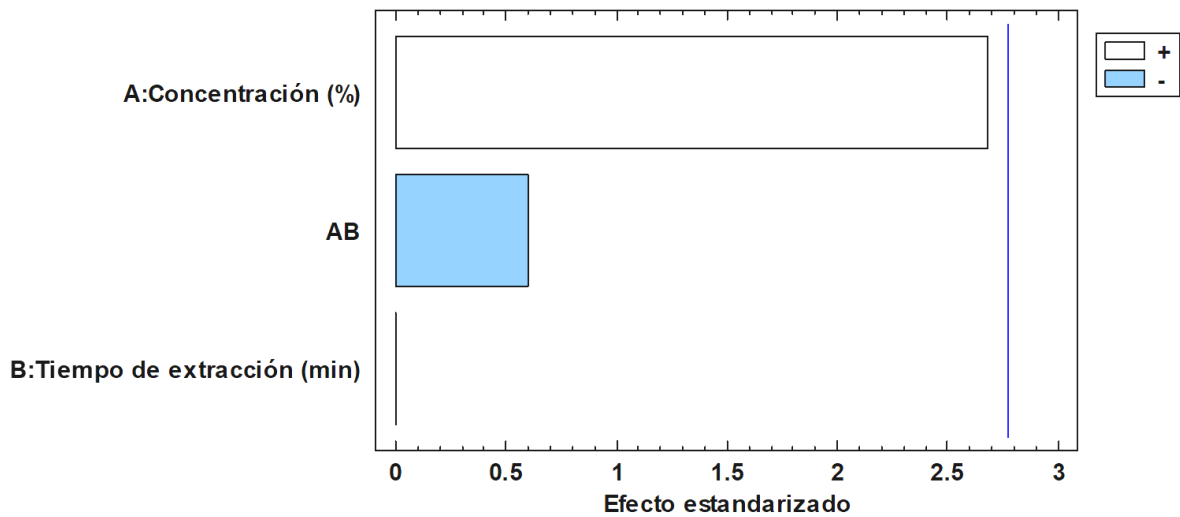


Figura 30. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en *S. aureus* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

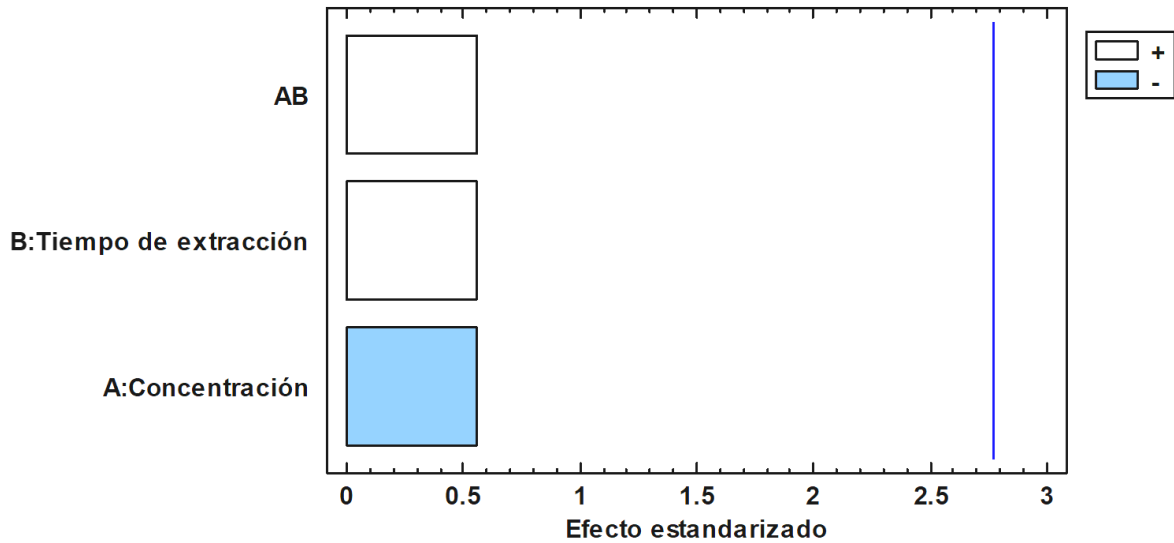


Figura 31. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en *S. aureus* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos

estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

El diagrama de Pareto para *S. aureus* muestra que ninguno de los factores, así como su interacción son estadísticamente significativas para ninguna de las 2 variedades de cáscara de granada. Sin embargo, en ambos el factor que muestra un mayor efecto en la actividad microbicida de los extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es la concentración de etanol con un valor P de 0.0550, mismo caso que en actividad antioxidante y fenoles totales donde la concentración de etanol es el factor que más influye para variedad *Wonderful*, en cáscara de granada variedad *Valenciana* no se aprecia influencia de ninguno de los factores.

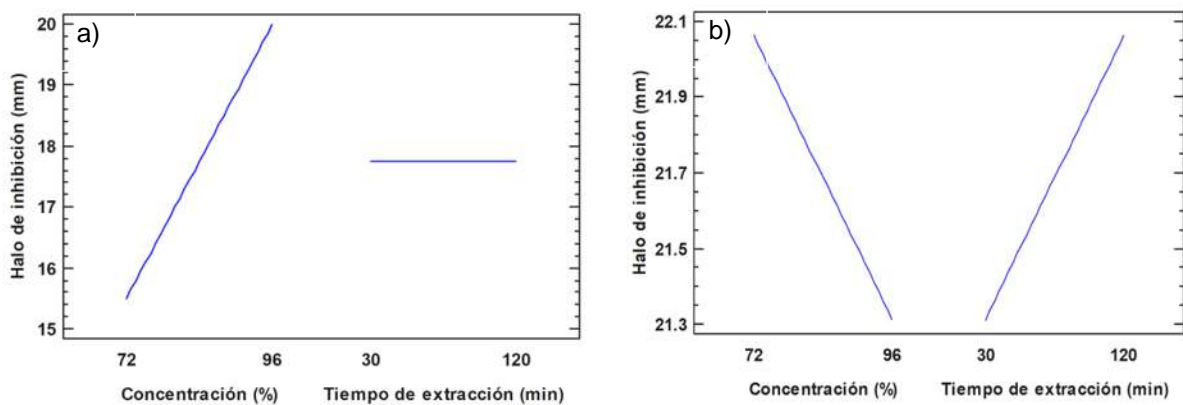


Figura 32. Gráfico de efecto principales para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana* en *Staphylococcus aureus*.

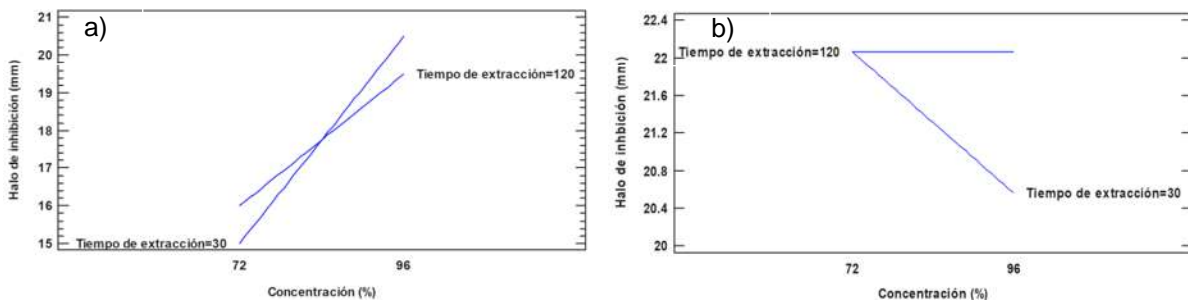


Figura 33. Gráfico de interacciones para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana* en *S. aureus*.

En el gráfico de efectos principales (figura 32) se observa que para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* existe una mayor actividad microbicida cuando se utiliza una concentración de etanol al 96%, caso contrario para variedad *Valenciana* en donde existe mayor actividad microbicida cuando se utiliza mezclas de solventes, esto se le atribuye al tipo de compuestos extraídos por cada solvente y la toxicidad ante la bacteria mencionada. En cuanto al gráfico de interacciones (figura 33) se observa que el tiempo de extracción no juega un papel importante en la extracción dado que con ambas variedades se obtienen mayores mm de inhibición al momento de utilizar mezclas (*Valenciana*) o concentración de etanol al 96% (*Wonderful*).

Se obtuvieron halos de inhibición de hasta 24mm y 21mm en extractos de cáscara de granada variedad *Valencia* y *Wonderful* respectivamente, observando mayor actividad microbicida en variedad *Valenciana*. Cabe mencionar que los halos fueron aplicados sobre *S. aureus* ATCC29213, si se compara con los resultados obtenidos por Nozohour *et al.* en el 2018 en donde obtuvo halos de inhibición de extractos de cáscara de granada sobre *S. aureus* (PTCC 1112) de 25.3 ± 0.3 muestra resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

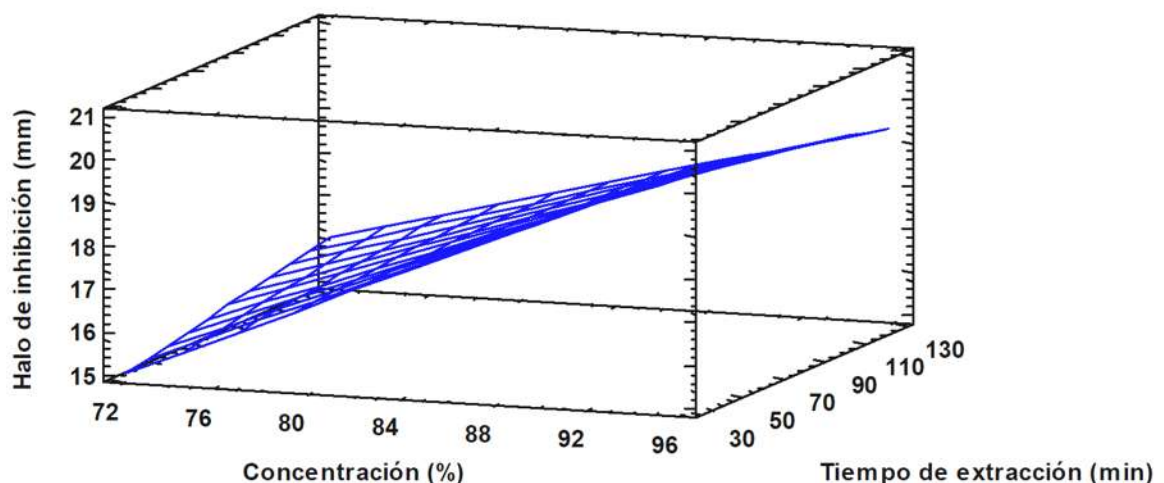


Figura 34. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* en *S. aureus*.

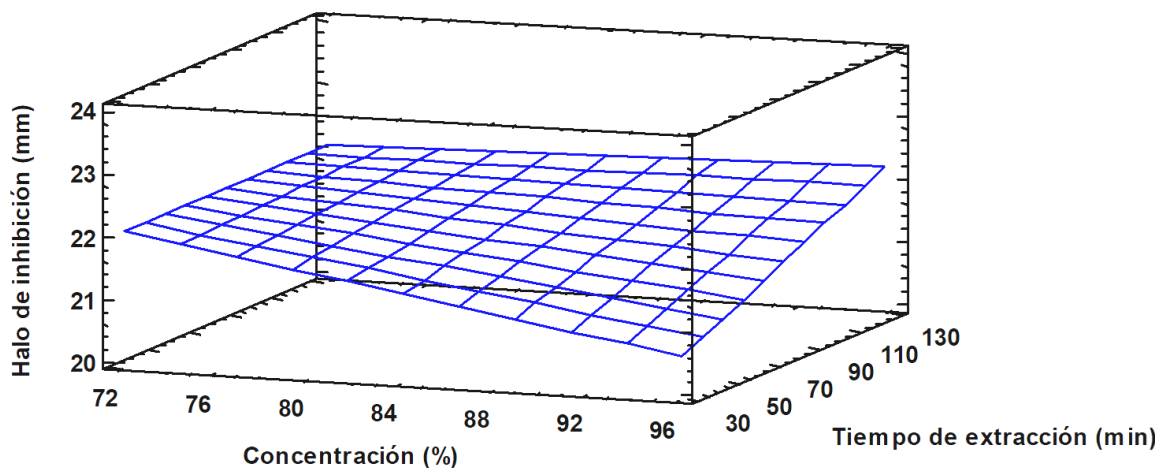


Figura 35. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* en *S. aureus*.

Los gráficos de superficie de respuesta (figura 34 y 35) muestran que las mejores condiciones de extracción para actividad microbiana en *S. aureus* son de 96% en concentración de etanol y 120 minutos en tiempo de extracción, esto indica que los compuestos causantes de la inhibición microbicida son polares y poco sensibles a la temperatura como el kaempferol, apigenin entre otros.

Ali *et al.* en el 2018 realizaron películas comestibles basadas en almidón enriquecidas con cáscara de granada provenientes de un mercado local de Guangzhou, China en donde compararon la actividad microbicida en cepas de *S. aureus* y *Salmonella*, donde para *S. aureus* encontraron diámetros de inhibición altos mayor a los halos de inhibición obtenidos en *Salmonella*, comparables con los obtenidos en esta investigación. Por lo que los extractos encontrados en esta investigación pueden ser utilizados a concentraciones adecuadas para la elaboración de películas comestibles y de esta manera darle valor agregado a los residuos de un alimento como la granada.

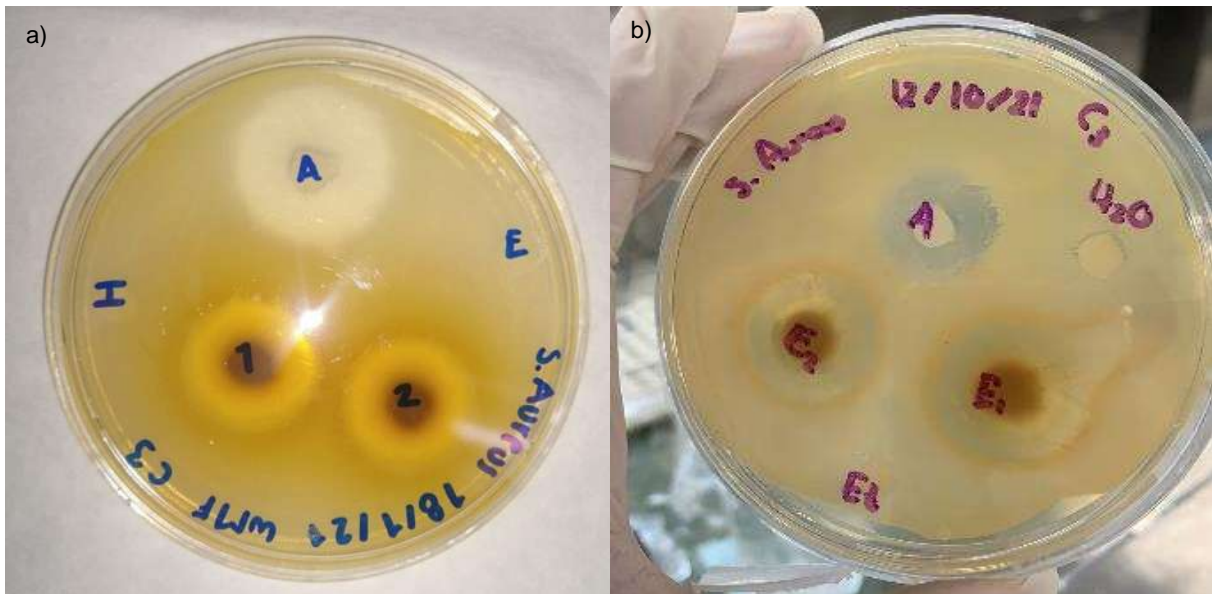


Figura 36. Halo de inhibición formados por extractos de cáscara de granada a concentración de 500mg/ml variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana* en *Staphylococcus aureus*.

Los halos de inhibición obtenidos por los extractos a una concentración de 500mg/ml fueron de entre 13 y 21 mm para variedad *Wonderful* y entre 20.5 y 24 mm para variedad *Valenciana* el cual es comparable con el antibiótico Eritromicina a una concentración de 15 mcg/ml donde debe de presentar halos de inhibición de 23 a 30 mm. para *S. aureus*. Esto comparable con lo reportado por Romero y Villegas en el 2017 donde obtuvieron halos de inhibición de 20.55 mm utilizando una concentración de extracto de 500mg/ml muy cercano a los resultados obtenidos en esta investigación, y donde disminuyó hasta obtener halos de 12.44 mm cuando decrece la concentración del extracto a 100 mg/ml, también está dentro del rango de los halos de inhibición obtenidos por Coronado en el 2019 donde encontró una media de 16.37 mm para cáscara de granada variedad *Wonderful*.

El contenido de polifenoles en los extractos obtenidos juega un importante papel por que inhiben el crecimiento de algunas bacterias patógenas, los polifenoles actúan como agentes antiinfecciosos formando complejos con las proteínas presentes en las paredes celulares bacterianas y a su vez provocando su lisis (Akhtar *et al.*, 2015). Interactúan con los grupos sulfhidrilos de proteínas microbianas solubles y extracelulares e inhiben sus actividades (Dey *et al.*, 2012). En términos de electrones, grupos hidroxilo

presentes en los polifenoles inducen su deslocalización y actúan como intercambiadores de protones, esto provoca la disminución del gradiente de pH alrededor de la membrana celular, seguido de la eliminación de ATP y finalmente muerte celular microbiana.

4.7.2 *Escherichia coli*

Se realizó el análisis del diseño experimental propuesto para las 8 corridas utilizando como variable de respuesta halo de inhibición expresado en mm de inhibición/mg de extracto en *E. coli* utilizando extractos de 2 variedades de cáscara de granada (*Wonderful* y *Valenciana*), con una significancia estadística del 95%.

La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Tabla 21. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre *E. coli* utilizando extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	150.063	1	15.063	5.37	0.0814
B: Tiempo de extracción	39.0625	1	39.0625	1.40	0.3026
AB	7.5625	1	7.5625	0.27	0.6304
Total error	111.813	4	27.9531		
Total (corr.)	308.5	7			

Tabla 22. Análisis de varianza para halo de inhibición sobre *E. coli* utilizando extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A: Concentración	3.0625	1	3.0625	0.61	0.4779
B: Tiempo de extracción	0.5625	1	0.5625	0.11	0.7544
AB	3.0625	1	3.0625	0.61	0.4779
Total error	20.0313	4	5.00781		
Total (corr.)	26.7188	7			

Las tablas ANOVA (tabla 21 y 22) particiona la variabilidad de halo de inhibición sobre *E. coli* en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor *P* menor que

0.05, ni su interacción entre ellos para ninguno de los dos diseños experimentales (*Wonderful* y *Valenciana*), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La ecuación del modelo ajustado para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es:

$$\text{Halo de inhibición } E. coli = -11.7917 + 0.319444 * A - 0.144444 * B + 0.0025463 * AB \quad (3.11)$$

Y para variedad *Valenciana*:

$$\text{Halo de inhibición } E. coli = 40.3958 - 0.194444 * A - 0.144444 * B + 0.00162037 * AB \quad (3.12)$$

Donde A = Concentración y B = Tiempo de extracción. Dichos ajustes permitirán realizar proyecciones para diferentes condiciones de extracción en ambas variedades de granada.

Se puede observar que el factor más cercano a ser estadísticamente significativo es la concentración de etanol en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* con un valor *P* de 0.0814. Resultado contrario a lo obtenido en extractos de cáscara de granada variedad *Valencia* donde los factores quedaron muy distantes de ser estadísticamente significativos, estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Rosas *et al.* en el 2016 donde utilizando diferentes variedades de cáscara de granada obtuvieron diferencia significativa en los halos de inhibición obtenidos sobre *E. coli* por lo que la variedad de cáscara de granada juega un papel importante.

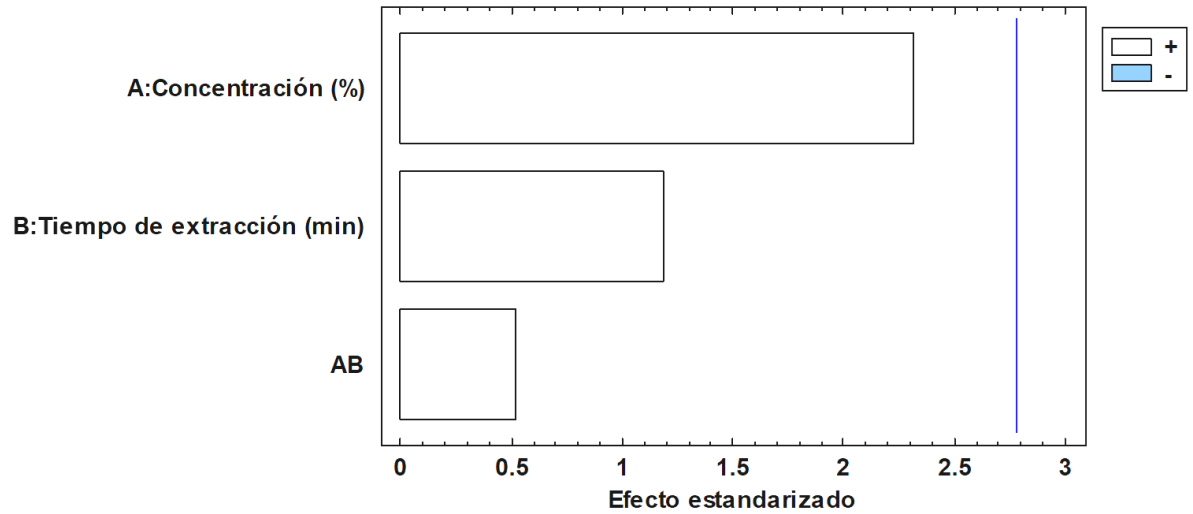


Figura 37. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en *E. coli* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

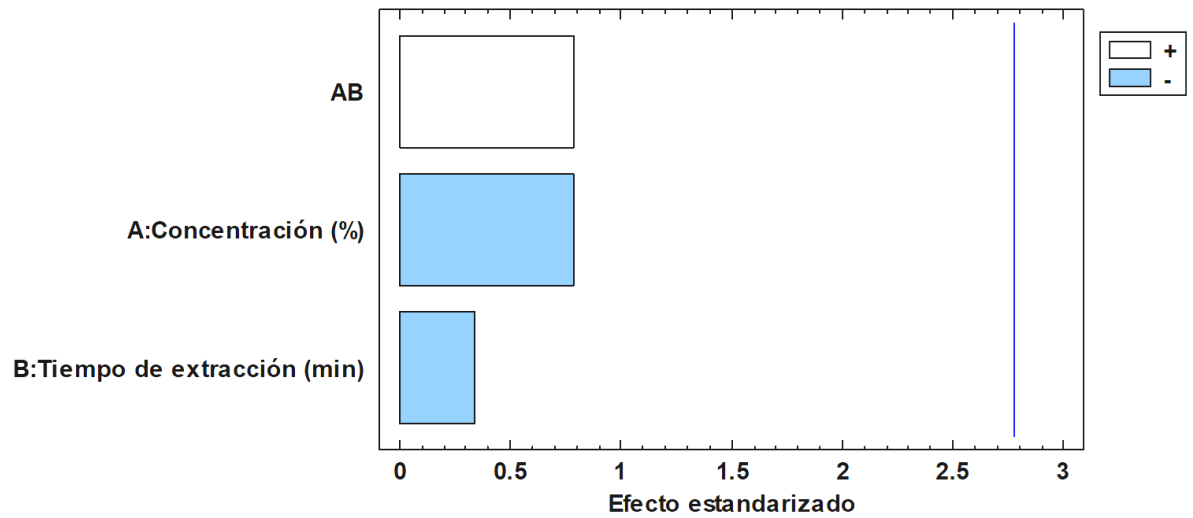


Figura 38. Diagrama de Pareto estandarizado para halo de inhibición en *E. coli* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El

diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%.

El diagrama de Pareto para *E. coli* muestra que ninguno de los factores, así como su interacción son estadísticamente significativas para ninguna de las 2 variedades de cáscara de granada. Sin embargo, en ambos el factor que muestra un mayor efecto en la actividad microbiciada de los extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* es la concentración de etanol con un valor *P* de 0.0814, en cáscara de granada variedad *Valenciana* no se nota influencia de ninguno de los factores. Mismos resultados se obtuvieron en halo de inhibición sobre *S. aureus*, por lo que podemos deducir que en ambos casos los mismos compuestos son encargados de la actividad microbiciada.

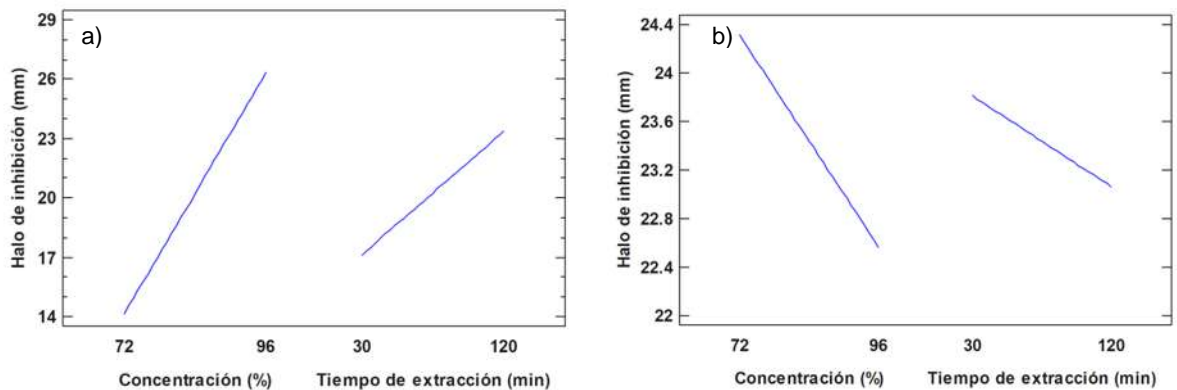


Figura 39. Gráfico de efecto principales para halo de inhibición sobre *E. coli* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*.

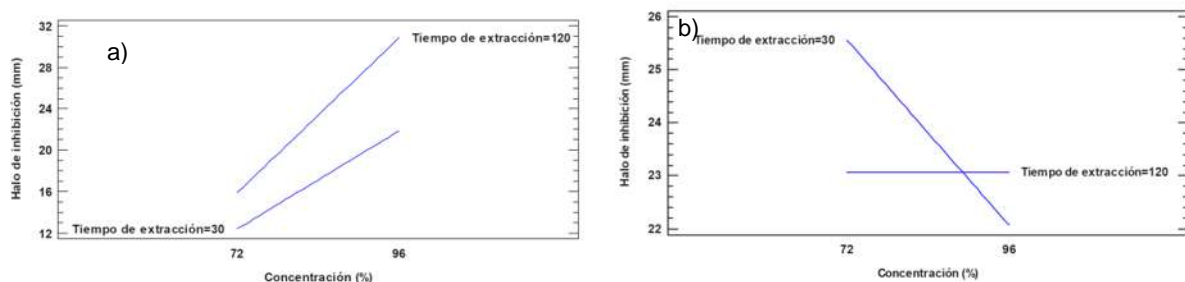


Figura 40. Gráfico de interacciones para halo de inhibición sobre *E. coli* inducidos por extractos de cáscara de granada variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana*

En el gráfico de efectos principales (figura 39) se observó que para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* existe una mayor actividad microbiciada cuando

se utiliza mayor concentración de etanol, caso contrario para variedad *Valenciana* en donde existe mayor actividad microbicida cuando se utiliza mezclas de solventes. En cuanto al tiempo de extracción existe una mayor eficiencia en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* con tiempos de extracción mayores, caso contrario a variedad *Valenciana*. Esto indica que los compuestos causantes de la actividad microbicida en extractos *E. coli* causados por extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* son compuestos polares afines a etanol como el kaempferol, apigenin entre otros. En cuanto al gráfico de interacciones (figura 40) se observa que una concentración de etanol de 96% de solvente da mejores resultados que al utilizar mezclas, solo cuando se utiliza un tiempo de extracción de 30 minutos para extractos de cáscara de variedad *Valenciana* es diferente donde a un tiempo de extracción de 120 minutos y una concentración de etanol del 72% los halos de inhibición ocasionados ascienden hasta los 26mm.

Ibrahium *et al.* en el 2010 obtuvieron extractos de cáscara de granada utilizando etanol al 100% y los evaluaron sobre cepas de *E. coli* utilizando una concentración de extracto de 600mg/ml donde obtuvieron halos de inhibición de 22.1 mm, menores halos a los obtenidos en esta investigación la cual presentó hasta 32 mm de inhibición utilizando una concentración menor de extracto (500mg/ml), lo cual indica la eficiencia de extracción del método Soxhlet.

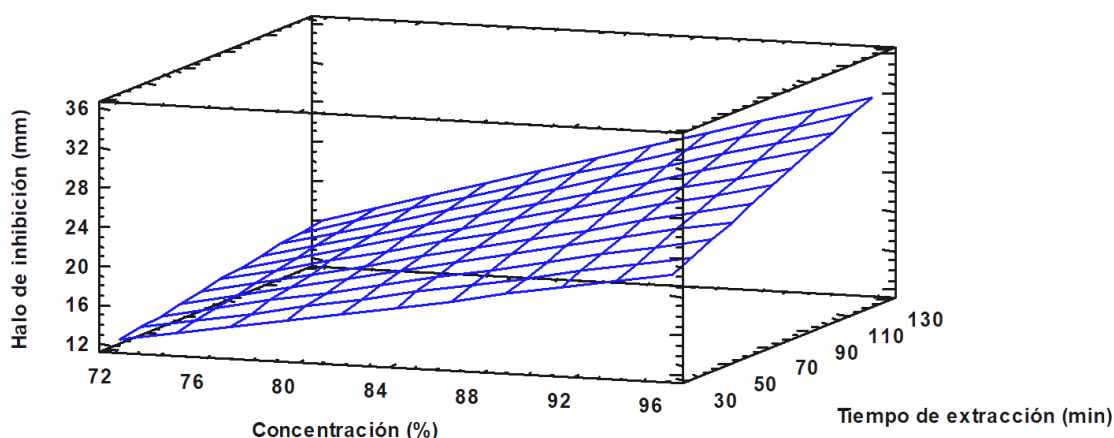


Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* en *E. coli*.

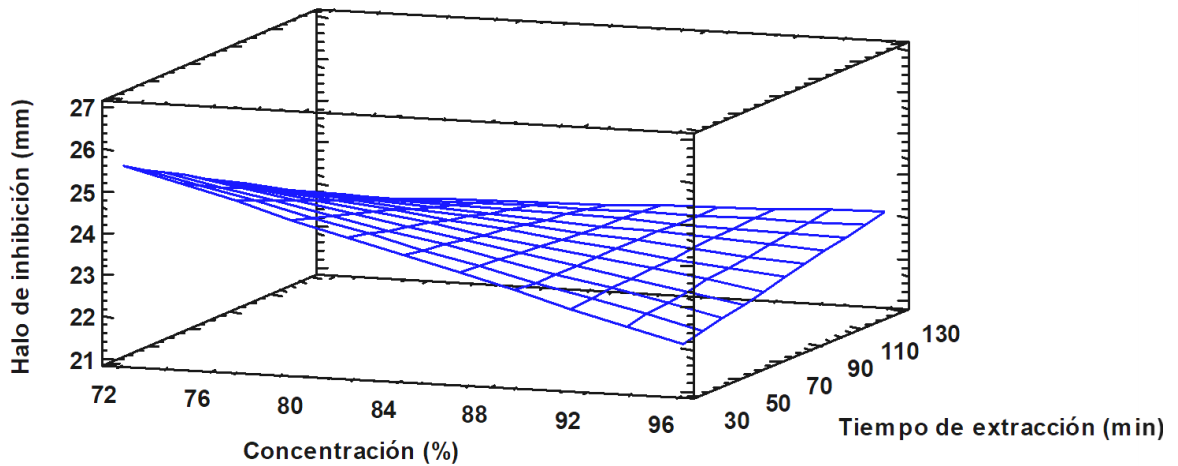


Figura 42. Gráfico de superficie de respuesta para halo de inhibición inducidos por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* en *E. coli*.

Los gráficos de superficie de respuesta (figura 41 y 42) indican que las mejores condiciones de extracción para actividad microbiana en *E. coli* son de 96% en concentración de etanol y 120 minutos en tiempo de extracción para variedad *Wonderful* y 72% en concentración de etanol y 30 minutos en tiempo de extracción para variedad *Valenciana*. Con esto se comprueba lo que mostró el gráfico de efectos principales (figura 39), y en caso de variedad *Wonderful* corroborando las mejores condiciones de extracción obtenidas en el análisis realizado para *S. aureus*.

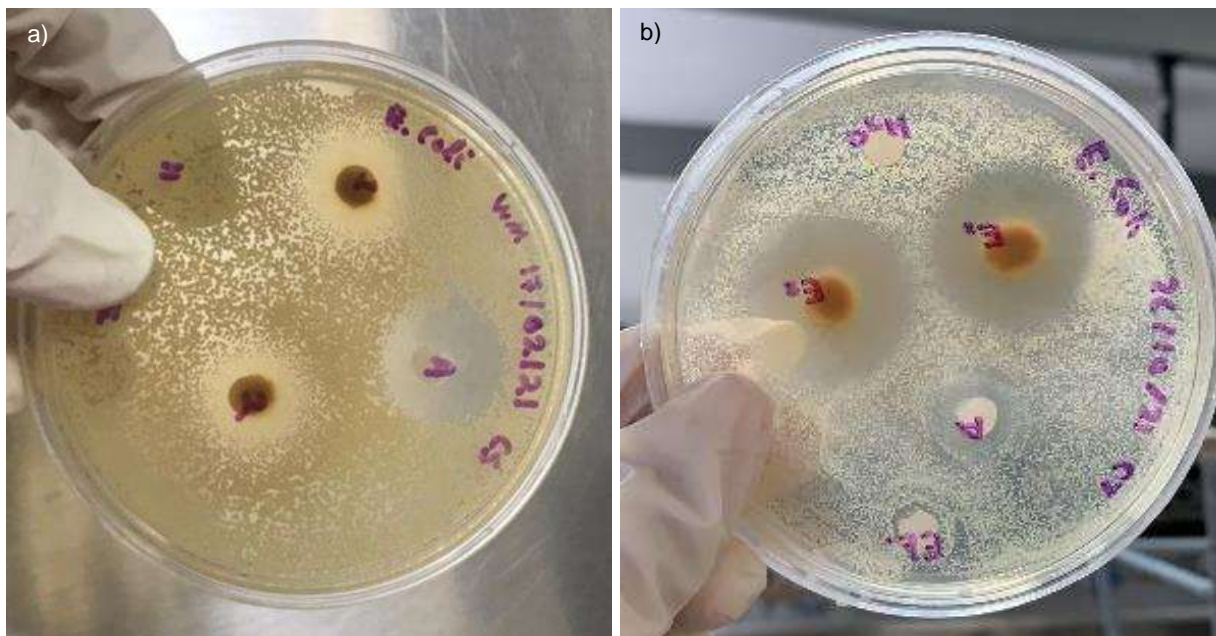


Figura 43. Halo de inhibición formados por extractos de cáscara de granada a concentración de 500mg/ml variedad a) *Wonderful* b) *Valenciana* en *E. coli*.

Los halos de inhibición obtenidos por los extractos a una concentración de 500mg/ml fueron de 13 a 32.5 mm para variedad *Wonderful* y de 22 a 27 mm para variedad *Valenciana* el cual es comparable con el antibiótico Eritromicina a una concentración de 15 mcg/ml donde debe de presentar halos de inhibición de 8 a 14 mm. Si se comparan por los halos producidos por los extractos de zumo de granada utilizando acetona como solvente, utilizados por Escobar en el 2017 que fueron de 16.5 mm a una concentración de 500 mg/ml, son mucho mayor los obtenidos en esta investigación lo que indica que se encuentra mayor actividad microbicida en cáscara de granada que en el arilo y/o semilla.

Vaquero & De Nadra (2008) informó que algunos flavonoles como la quercetina presente en cáscara de granada aumentó la permeabilidad de la membrana celular de *E. coli* y, a su vez, redujo su potencial (al no ser capaz de sintetizar ATP). Este efecto fue perjudicial únicamente sobre células de *E. coli*. De esta manera y analizando los halos de inhibición obtenidos se puede inferir que los extractos son ricos en flavonoides y que

gran parte de estos flavonoides pueden ser flavonoles, en mayor proporción en la variedad *Valenciana*.

Ahmed *et al.* en el 2013 obtuvieron extractos acuosos de cáscara de granada provenientes de mercados locales de Bagdad, Irak. Y dichos extractos los probaron contra diferentes cepas bacterianas patógenas, en donde encontraron que las unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus*, *Proteus vulgaricus*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* disminuyen conforme se agregan extractos de cáscara de granada a partir de concentraciones de 0.3 mg/ml, lo que comprueba la actividad microbicida resultante en esta investigación contra *S. aureus*. Con base en el conocimiento de estas propiedades, será posible utilizar extractos de cáscara de granada para formular nuevos productos para ser utilizados en la industria alimentaria como antioxidante natural, reemplazando de esta manera a los sintéticos antioxidantes, y también como conservadores naturales de alimentos no tóxicos y para estudios farmacológicos.

4.8 Cinética de degradación

Se realizó la cinética de degradación de antocianinas sobre jugo de granada variedad *Valenciana* con muestreo cada 12 horas utilizando el método de pH diferencial a 3 diferentes temperaturas (25°C, 50°C y 70°C) expresando los resultados en Antocianinas monoméricas (mg/ml).

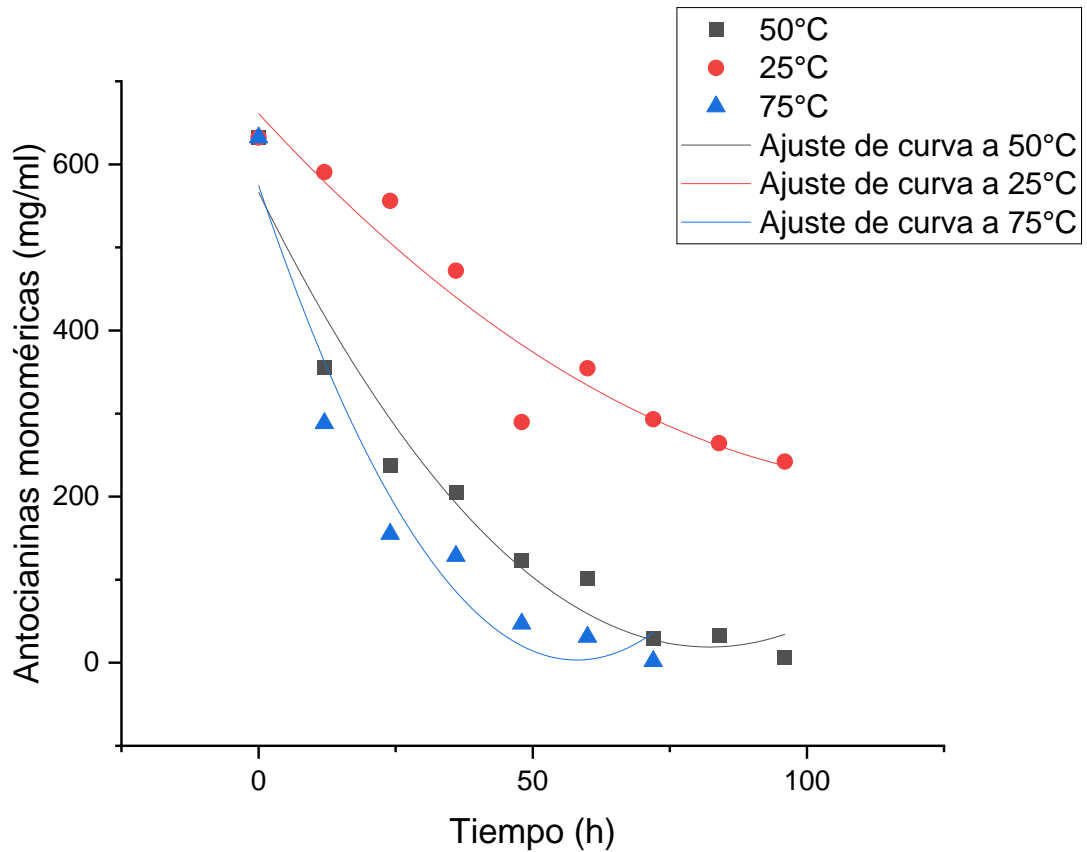


Figura 44. Gráfico de degradación de antocianinas monoméricas en jugo de granada variedad *Valenciana* expresado en mg/ml a diferentes temperaturas durante 92 horas.

La mayoría de las reacciones implicadas en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos siguen una cinética de reacción de primer orden, como, por ejemplo, la degradación de vitaminas, produciendo una disminución en el valor nutricional del alimento, o la degradación de antocianinas durante el almacenamiento de alimentos coloreados, produciendo una pérdida en la apariencia y valor de éste (Labuza, 1984).

Oliveira *et al.* en el 2022 realizaron cinéticas de degradación térmica de antocianinas y ácido ascórbico provenientes de los pétalos de la flor *Clitoria ternatea* en donde encontraron para ambos compuestos que el orden de la reacción es de 1, al igual que en esta investigación y como mencionó Labuza en 1984 que este tipo de reacción de degradación de compuestos alimenticios tenían orden de reacción 1. También se

encontró que la temperatura más baja (60°C) era donde las moléculas de antocianinas y ácido ascórbico eran más estables, mismo resultado obtenido en esta investigación donde a 25°C se mostró mayor estabilidad. Es por ello por lo que en futuros estudios se podría investigar la estabilidad de las antocianinas de cáscara de granada en diferentes condiciones de temperatura para confirmar su aplicabilidad como colorantes en la industria alimenticia.

Para comprobar que el orden de la reacción es 1 se graficó el logaritmo natural de la concentración vs tiempo (Anexo 8.8), en donde la ecuación presentaba una línea recta con pendiente igual k_1 , lo cual indica una reacción de primer orden. Al igual Alighourchi & Barzegar en el 2009 donde ajustaron su cinética de degradación de antocianinas en jugo de granada a una reacción de primer orden.

Según Casp y Abril, (2003) la influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de reacción se puede describir utilizando la ecuación desarrollada por Svante Arrhenius. El modelo de Arrhenius que relaciona la velocidad de una reacción química a los cambios de temperatura es el mejor ejemplo de modelo aceptado con validez comparada experimentalmente. Se trata de un modelo lineal que expresa el efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad (k) de diferentes reacciones en muchos sistemas alimentarios. Y al ser una reacción de primer orden seguiría la siguiente expresión:

$$k = k_0 \exp \left(\frac{Ea}{RT} \right) \quad (4.13)$$

El uso de la ecuación 4.13 se describe en el Anexo 8.8.

Tabla 23. Parámetros cinéticos para la degradación térmica de antocianinas de jugo de granada durante el almacenamiento a 25, 50 y 70 °C durante 96 horas.

Temperatura (°C)	Ecuación de ajuste	R ²	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Valor D (h)	EA (J/mol)
25	y=649.44exp(-0.011x)	0.9234	0.0109	63.5915	91.7431	35,304.039 7
50	y=746.99exp(-0.042x)	0.9807	0.0423	16.3865	23.6407	
70	y=846.68exp(-0.068x)	0.988	0.0683	10.1486	14.6413	

Como se observa en la tabla 23 las ecuaciones que describen la degradación térmica de antocianinas en jugo de granada variedad *Valenciana* son ecuaciones exponenciales, al igual que la investigación realizada por Alighourchi & Barzegar en el 2009 en donde utilizaron temperaturas de 4,20 y 37 °C, sus 3 ecuaciones resultaron ser exponenciales.

La energía de activación es la energía mínima necesaria para que se produzca la reacción de degradación de Antocianinas, y es necesaria calcularla para de esta manera proceder con el cálculo de la velocidad de la reacción.

Sandoval en el 2015 encontró constantes de velocidad de 0.002, 0.003, 0.008 y 0.011 h⁻¹ a temperaturas de 30, 40, 50 y 60°C respectivamente realizando cinéticas sobre zumo pasteurizado de jugo de granada, datos que son menores a los obtenidos en esta investigación, sin embargo en la cinéticas obtenidas por Sandoval tuvieron una concentración inicial de 55 mg/ml aproximadamente, contenido mucho menor que el obtenido en esta investigación por lo que en parte a eso se le puede atribuir las constantes de velocidad, y a que las antocianinas presentes en granada variedad *Valenciana* son más sensibles a la temperatura.

El mayor tiempo de vida media fue determinado al obtener un valor mucho mayor a una temperatura de 25°C (63.59 h), resultado que coincide por lo expresado por Sandoval (2015) donde determino un mejor tiempo de vida media a una temperatura de 30°C, también coincide con lo obtenido por Ozkan *et al.* en el 2002 donde recomienda

almacenar productos ricos en antocianinas a temperaturas de refrigeración para minimizar la degradación de los compuestos mencionados.

Karaslaan *et al.* en el 2013 realizó cinéticas de degradación térmicas de antocianinas presentes en los arilos, realizando un pretratamiento que consistía en introducir los arilos a baño de agua caliente a 80°C por minutos para realizar inmediatamente la cinética con aire caliente lo que aumentó en una hora el tiempo de vida media y el cual la temperatura de secado con la mayor vida media fue de 55°C, el cual fue la menor temperatura utilizada, la cual coincide con lo reportado en esta investigación.

Los valores D indican que almacenados a temperatura ambiente el 90% de antocianinas en jugo de granada variedad *Valenciana* son degradados en 91.74 horas, similar resultado obtenido por Alighourchi & Barzegar donde el valor D mayor lo encontraron a la menor temperatura utilizada (4°C).

5. Conclusiones

- La investigación permitió establecer que la variación en la concentración de etanol y el tiempo de extracción no tienen influencia significativa estadísticamente sobre la composición de fenoles y flavonoides extraídos.
- Se obtuvieron los parámetros físicos (dureza y color) de ambas variedades de granada (*Wonderful* y *Valenciana*).
- Los extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* obtenidos tuvieron un contenido de fenoles totales de 0.004mg/ml EAG y de 0.00035 mg/ml EQ de flavonoides totales, y los extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* presentaron un contenido de fenoles totales de 0.0227 mg/ml EAG y de 0.0011 mg/ml EQ de flavonoides totales.
- El análisis del diseño de experimentos en actividad antioxidante por métodos ABTS⁺ y DPPH[•] definió las mejores condiciones de extracción (96% concentración de etanol y 120 minutos en tiempo de extracción) para ambas variedades de cáscara de granada (*Wonderful* y *Valenciana*).
- Los extractos de cáscara de granada variedades *Wonderful* y *Valenciana* presentaron actividad microbicida sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli*.
- Se ajustó la cinética de degradación térmica de antocianinas presentes en granada variedad *Valenciana* al modelo de Arrhenius, determinándose así los parámetros cinéticos.
- El análisis estadístico permitió establecer las mejores condiciones de extracción (96% concentración de etanol y 30 minutos en tiempo de extracción) y los factores que más influyen (concentración de etanol) en la extracción de compuestos fenólicos.

6. Recomendaciones

Se recomienda realizar investigaciones con diferentes métodos de extracción a diferentes condiciones con cáscara de granada variedad Valenciana, de acuerdo con el contenido de metabolitos secundarios cuantificados y actividad microbica presentada.

Se recomienda monitorear las temperaturas de almacenamiento de las muestras, verificar que los termostatos de las incubadoras se encuentren correctamente programados y calibrados.

El jugo proveniente de la granada al ser un fruto nutritivo puede experimentar crecimiento de biomasa a temperatura ambiente por lo que se recomienda mantener material estéril en todo momento, así como esterilizar el jugo.

No se encontraron antocianinas en cáscara de granada para ninguna de las 2 variedades (*Wonderful* y *Valenciana*) por lo que se recomienda no hacer determinaciones de estos compuestos en cáscara de granada, debido a que únicamente se encontraron antocianinas en el jugo.

Se recomienda controlar correctamente los intervalos de tiempo para retirar las muestras de las incubadoras, identificarlas adecuadamente y medir lo más rápido posible el contenido de antocianinas.

Considerando la buena actividad microbica de los extractos de cáscara de granada (*Punica granatum*) frente a cepas patógenas (*E. coli* y *S. aureus*), se recomienda considerar un estudio *in vivo* de los extractos.

7. Bibliografía

Aguilera, M., del Carmen Reza, M., Chew, R. G., & Meza, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*. 13(2): 16-22. DOI: <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>.

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2014). Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry*. 174: 417-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>.

Ali, A., Chen, Y., Liu, H., Yu, L., Baloch, Z., Khalid, S., Zhu, J., & Chen, L. (2018). Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.06>.

Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*. 90(2): 179-185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.019>.

Arnao, M.B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73: 239–244. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).

Astrid, G. G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Acta Biológica Colombiana*. 13(3): 27-36. DOI: <https://doi.org/10.15446/abc>.

Ayala, F. & Macías, S. (2018). Determinación de elagitaninos a partir de frutillas Fresa (*Fragaria* sp.) y Zarzamora (*Rubus* sp.). (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Morelia.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A, Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering*. 117(4): 426–436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-333. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.

Brand, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28: 25–30. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

Brezmes Llecha, J. (2001) Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de la maduración de la fruta. (Tesis doctoral). UPC, Departament de Teoria del Senyal i Comunicacions. ISBN 8469972766.

Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. *Anthocyanins as Food Colors*. 1:1-38.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Srećko, T., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., & Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica L.*). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 61: 195-199. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0021-9>.

Caldas Avila, A. P. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido-líquido (Tesis de licenciatura). Cuenca.

Casp, A., & Abril, J. (2003). *Procesos de conservación de alimentos*. (No. 04). Editorial Madrid Mundi-Prensa.

Cela, R., Lorenzo, R. A., & del Carmen Casais, M. (2002). *Técnicas de separación en química analítica*. Editorial Síntesis.

Coronado, J. A. (2019). Obtención de extractos polifenólicos a partir de cáscara de granada (*Punica granatum*) para evaluar su actividad bactericida y antioxidante (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

Coronado, J. A., Tinoco, J., Guisa, M. L., Cortés, C. D. J., & González, J. C. (2020). Morphology about the varieties mexican pomegranate fruit (*Punica granatum*) and its

ripening stage. *Food Science and Technology*. 41(4): 993-999. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.28620>

De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: Final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 99(6): 779-785. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.6.779>.

Dey, D., Debnath, S., Hazra, S., Ghosh, S., Ray, R., & Hazra, B. (2012). Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum b-lactamase (ESBL) and metallo-b-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food and Chemical Toxicology*. 50(1): 4302–4309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.001>.

Dhobi, M., Mandal, V., & Hemalatha, S. (2009) Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan –silybinin. *Journal of Chemical Metrology*. 3(1): 13–23. Online ISSN:1307-6183.

Elfalleh, W., Nasri, N., Marzougui, N., Thabti, I., M'rabet, A., Yahya, Y., Lachiheb, B., Guasmi, F., & Ferchichi, A. (2009). Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60(2):197–210. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637480903067037>.

Escribano-Bailon, M.T., Beulga-Santos, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal Chromatography*. 1054:129-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.152>.

Escobar, B. J. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del Zumo de *Punica granatum* L. “granada”. (Tesis de licenciatura). Universidad Privada Norbert Wiener. Lima, Perú.

Farfán Yaranga, G., Morales Vásquez, E. & Villanueva Huamán, F. (2019). Cuantificación y determinación de la actividad antioxidante de los polifenoles del extracto hidroalcohólico de la cáscara, semilla y el zumo del fruto de *Punica granatum* var. *Wonderful*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Maria Auxiliadora, Lima, Perú.

García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I. & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Objetos de aprendizaje. Artículos docentes. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

García, C. & Pérez, A. (2004). La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. Alimentación, Nutrición y Salud. 113-120. ISSN 1136-4815.

Giese, J. (1995). Measuring physical properties of foods. Food Technology. 49(2): 53-63. ISSN: 0015-6639.

Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., & Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 4581-9. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>.

Gilabert, E. (1992). Medida del color. Servicio de publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

Gómez, J. (2018). Análisis comparativo del perfil polifenólico en cáscara de granada (*Punica granatum*) cultivada en Guanajuato y Oaxaca (Tesis de Maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca.

Guntero, V. A., Longo, M. B., Ciparicci, S., Martini, R. E. & Andreatta, A. E. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. CAIQ2015-VII Congreso Argentino de ingeniería química. 3ras. Jornadas Argentinas de seguridad de procesos.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55(6): 481-504. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1).

Huang, J., He, W., Yan, C., Du, X., & Shi, X. (2017). Microwave assisted extraction of flavonoids from pomegranate peel and its antioxidant activity. BIO Web of Conferences. 8: 03008. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170803008>.

Ibrahium, M. I. (2010). Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *World Journal of Agricultural Sciences*. 6(4): 338-344. ISSN: 1817-3047.

Juhaimi, F. A., Özcan, M. M., & Ghafoor, K. (2017). Characterization of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 119(10): 1700074. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700074>.

Karaaslan, M., Yilmaz, F. M., Cesur, Ö., Vardin, H., İkinci, A., & Dalgiç, A. C. (2013). Drying kinetics and thermal degradation of phenolic compounds and anthocyanins in pomegranate arils dried under vacuum conditions. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(2): 595–605. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12342>.

Labuza, T. P. (1984). Application of chemical kinetics to deterioration of foods. *Journal of Chemical Education*. 61(4): 348-358. DOI: <https://doi.org/10.1021/ed061p348>

Legua, P., Melgarejo, P., Abdelmajid, H., Martinez, J. J., Martinez, R., Ilham, H., Hafida, H., & Hernández, F. (2012). Total phenols and antioxidant capacity in 10 Moroccan pomegranate varieties. *Journal of Food Science*. 77(1): 115-120. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02516.x>.

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

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 96(2): 254–260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.03>.

Liu, Y., & Hu M. (2002). Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition*. 30: 370-377. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.30.4.370>.

Luo, X., Cao, D., Zhang, J., Chen, L., Xia, X., Li, H., Zhao, D., Zhang, F., Xue, H., Chen, L., Li, Y., & Cao, S. (2018). Integrated microRNA and mRNA expression profiling

reveals a complex network regulating pomegranate (*Punica granatum L.*) seed hardness. Scientific Reports. 8(1). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27664-y>.

Malviya, S., Jha, A., & Hettiarachchy, N. (2013). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. Journal of Food Science and Technology. 51(12): 4132-4137. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0956-4>.

Marchi, L. B., Monteiro, A. R. G., Mikcha, J.M.G., Santos, A.R., Chinelatto, M.M., Marques, D.R., Dacome, A.S., & Costa, S. C. (2015). Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of pomegranate peel extract (*Punica granatum*) Under different drying temperaturas. Chemical Engineering Transactions. 44(1): 121-126. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1544021>.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(1): 5-18. ISSN: 0004-0622.

Márquez, A., Ayala, F., Macías, S., Chávez, M.C., Valencia, D.C., Maya, R., & González, J.C. (2020). Extract of ellagitannins starting with strawberries (*Fragaria sp.*) and blackberries (*Rubus sp.*). Food Science and Technology. 40: 430-439. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.42918>.

Mashkor, I. M. A. A., & Muhson, A. A. (2014). Total phenol, total flavonoids and antioxidant activity of pomegranate peel. International Journal of ChemTech Research. 6(11): 4656-4661. ISSN: 0974-4290.

Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into tracts and humans. Journal Agricultural and Food Chemistry. 47: 1083-1091. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf9809582>.

Mohseni, A. (2006). The situation of pomegranate orchards in Iran. International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits. 818: 35-42. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.818.3>

Mondragón, J. C. & Juárez, C. S. (2008). La granada roja; guía para su producción en Guanajuato. Campo Experimental Bajío. INIFAP. Celaya, Guanajuato, México. Folleto técnico, (2).

More, P. R., & Arya, S. S. (2019). A novel, green cloud point extraction and separation of phenols and flavonoids from pomegranate peel: an optimization study using RCCD. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 7(5): 103306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103306>

Muhlack, R.A., Potumarthi, R., & Jeffery, D.W. (2018) Sustainable wineries through waste valorisation. Grape marc utilisation for valueadded products. *Waste Manag.* 72: 99–118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>.

Musmeci, R. & Lezcano, M. T. (2015). Acción antimicrobiana del gel de Aloe vera sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. *Revista sobre Estudios e Investigaciones del saber Académico*. 7: 23-27. ISSN: 2078-5577.

Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., Kato, K., Koichiro, U., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J. C., & Bennett, A. B. (2007). Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botanic*. 58(6):1281-1290. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl283>

Niu, J., Cao, D., Li, H., Xue, H., Chen, L., Liu, B., & Cao, S. (2018). Quantitative proteomics of pomegranate varieties with contrasting seed hardness during seed development stages. *Tree Genetics & Genomes*. 14(1): 14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1229-1>.

Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R., & Fartashvand, M. (2018). Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 5(1): 32-36. DOI: <https://doi.org/10.29252/jabr.01.01.06>

Nuncio, N., Calín, A., Carbonell, A., & Hernández, F. (2014). Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Scientia Horticulturae*. 165: 181–189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.021>.

Núñez C.E. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet. Argentina. Vol. 19.

Santos, R. O., Keller, L. M., Oliveira, V. S. D., Bucher, C. A., Barbosa Junior, J. L., Vicente, J., & Barbosa, M. I. M. J. (2021). Degradation kinetics and in vitro digestive stability of selected bioactive compounds from a beverage formulated with butterfly pea flowers. *Ciência Rural*. 52(5): 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210146>.

Ozkan, M., Yemenicioglu, A., Asefi, N., & Cemeroglu, B. (2002). Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate, and strawberry juices by hydrogen peroxide. *Journal of Food Science*. 67(2): 525–529. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10631.x>.

Plus, G. (2011). La fruta granada cultivada en España punicalagina Antioxidante del zumo de granada y el extracto de granada en la alimentación funcional del futuro: Granada Mollar Elche. 1: *Granatum Plus*.

Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1): 76-89. DOI: <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>.

Rodríguez, C.J.E. & López, A.M. (2014). Extracción por ultrasonido de los polifenoles de la fruta del *Punica granatum* (Granada). *Revista Cubana de Farmacia*. 48(3):469-476. ISSN: 1561-2988

Romero, J. E. & Villegas, E. S. V. M. (2017). Efecto inhibitorio in vitro de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

Rosas, E. C., Burgos, A., Noguera, L., Kačániová, M., Hernández, F., Cárdenas, J. L., & Carbonell, Á. A. (2016). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as

affected by cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(3): 802–810. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7799>.

Salinas, A., Guevara, A., Natividad, E. A., Baeza, R., & Buenrostro, J. J. (2019). Effect of the extraction conditions on the antioxidant capacity of phenolic compounds from pomegranate shell. *Mexican Journal of Biotechnology*. 4(2): 33-46. DOI: <https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.23>.

Sandoval A.A. (2015). Cinética de la degradación térmica de antocianinas en zumos pasteurizados de Granada (*Punica granatum*) y Arándano (*Vaccinium myrtillus*) (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”. Lambayeque, Perú.

Serrano, M., García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Guillén, F., Martínez-Romero, D. & Valero, D. (2020). Tratamientos con salicilatos durante el desarrollo de la granada en el árbol. *Horticultura*. Recuperado de <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/306275-Tratamientos-con-salicilatos-durante-el-desarrollo-de-la-granada-en-el-arbol.html>. Consultado el 17/05/2022.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Estadísticas de granada en México. Recuperado de: <https://blogagricultura.com/estadisticas-granada-mexico/>. Consultado el 8/05/2020.

Sheets, M. D., Du Bois, M. L. & Williamson, J. G. (2009). La granada en Florida. Departamento de Ciencias Hortícolas University of Florida (hS1044). IFAS Extensión.

Sood, A., & Gupta, M. (2015). Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*. 12(1): 100-106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.09.004>.

Soto, R. E. A. (2014). Extracto de cáscara de granada como antimicrobiano y potenciador antioxidante en germinados de alfalfa. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Szychowski, P. J., Frutos, M. J., Burló, F., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Hernández, F. (2015). Instrumental and sensory texture attributes of

pomegranate arils and seeds as affected by cultivar. *LWT - Food Science and Technology*. 60(2): 656–663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.053>.

Trainin, T., Harel-Beja, R., Bar-Ya'akov, I., Ben-Simhon, Z., Yahalomi, R., Borochoy, H., Ophir, R., Sherman, A., Doron, A., & Holland, D. (2021). Fine mapping of the “black” peel color in pomegranate (*Punica granatum L.*) strongly suggests that a mutation in the anthocyanidin reductase (ANR) gene is responsible for the trait. *Frontiers in Plant science*. 12: 265. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642019>.

Valadez, A., López, E., García, R. & Ruíz, F.L. (2017). Comparación de dos técnicas de extracción de fenólicos totales y capacidad antioxidante a partir de chipilín (*Crotalaria maypurensis* H.B.K.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2: 481-487. ISSN: 2448-7503.

Van den Berg, R., van Vliet, T., Broekmans, W. M., Cnubben, N. H., Vaes, W. H., Roza, L., & van den Berg, H. (2001). A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *The Journal of Nutrition*. 131(6): 1714-1722. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/131.6.1714>.

Vaquero, M.J.R., & De Nadra, M.C.M. (2008). Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 151(1): 342–352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8197-0>.

Vásquez Castillo, F. D. M. (2016). Condiciones óptimas de extracción de antocianinas de la cáscara de la granada (*Punica granatum L.*) variedad *Wonderful* (Tesis de licenciatura). Universidad Le Cordon Bleu. Lima, Perú.

Velasco, R. J., Villada, H. S. & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información Tecnológica*. 18(1): 53-66. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>.

Vermerris, W., & Nicholson R. (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic Compound Biochemistry*. 1: 1-34.

Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B., Medina, M., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., & Vuorela, P.M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum L.* (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 89(2-3): 295-300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.001>.

Villacorta, L. F. M., Infante, F. E. T. & Vásquez, C. C. P. (2016). Antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpas de frutas. *Pueblo Continente*. 18(2): 209-214. ISSN: 19915837.

Vite, D. M. (2015). Efecto del tiempo de exposición al ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y aceptabilidad general en fresas (*Fragaria vesca L.*) (Tesis de licenciatura) Universidad Privada Antenor Orrego.

Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., & Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars. *Industrial Crops and Products*. 40: 81–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.045>.

Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., & Sayyari, M. (2009). Antioxidant activity, total phenols, anthocyanin, ascorbic acid content and woody portion index (wpi) in Iranian soft-seed pomegranate fruits. *Food*. 3(1): 68-72.

Zarei, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Mousavi, A., & Salami, S. A. (2013). A mechanical method of determining seed-hardness in pomegranate. *Journal of Crop Improvement*. 27(4): 444–459. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2013.790867>.

8. Anexos

8.1 Método de halo de inhibición

Para la prueba de halo de inhibición se debe esterilizar en autoclave el siguiente material:

Materiales y reactivos requeridos

Puntas para Micropipeta de color azul, amarillo y blanco.

Sensidiscos

Tubos falcón.

200 ml de solución salina al 4 %.

Pinzas.

Hisopos.

220 ml de medio de cultivo Agar Mueller Hinton.

La esterilización en autoclave dura aproximadamente 1 hora por lo que 10 minutos antes de que se cumpla este plazo se deberán colocar en la campana de flujo laminar para la exposición directa de luz ultravioleta por alrededor de 20 minutos el siguiente material:

Lámpara de alcohol

12 cajas Petri de plástico

Se apaga la luz ultravioleta y se introduce a la campana de flujo laminar el medio, se enciende la lámpara de alcohol para asegurar la esterilidad de la campana y se colocan las cajas Petri para vaciar el medio en ellas. Vaciado el medio las cajas se mantienen semi abiertas hasta que el medio solidifique completamente. Solidificado el medio se toman 2 cajas Petri, en una de ellas se cultiva *E. coli* y en la otra *S. aureus* con la técnica de estría cruzada. Estas 2 cajas se pondrán en incubación por 24 horas a 37°C.

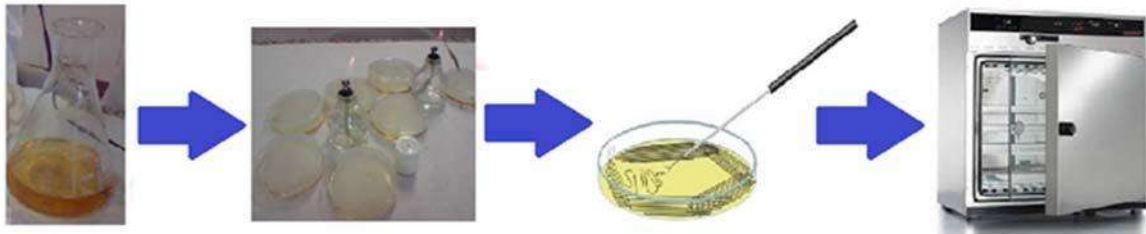


Figura 45. Metodología para la elaboración del medio de cultivo.

El material que no se utiliza se guarda en un lugar limpio y fresco para asegurar la esterilidad del mismo, las otras 10 cajas de Petri con el medio Agar Mueller Hinton solidificado se sellan con parafilm y se guardan en refrigeración. Pasadas las 24 horas de incubación se debe observar el crecimiento de las colonias bacterianas en los medios.

Lo siguiente es poner a esterilizar en la campana de flujo laminar (Luz ultravioleta) el siguiente material por 20 minutos:

Material estéril requerido:

Puntas para Micropipeta esterilizadas en la autoclave.

Sensidiscos.

Tubos falcón.

200 ml de solución salina al 4 %.

Pinzas.

Micropipeta: 1-5 ml, 0.5-10 μ l, 10-100 μ l.

2 vasos de precipitado: uno con agua y otro con el solvente A.

Gradilla.

Solvente A.

Celdas.

Lámpara de alcohol y encendedor.

Hisopos.

Preparación de la solución estándar de bacterias:

1. El procedimiento debe realizarse de forma estéril, por lo que es necesario el uso de guantes de látex estériles y una lámpara de alcohol encendida.
2. Se toman dos tubos falcón, a cada uno se le agregan 15 ml de solución salina, con un asa bacteriológica se arrastra una cantidad media de bacterias de la caja de Petri donde están sembradas y se sumerge en la solución salina del tubo agitando hasta disolver por completo. En un tubo se inocula *E. coli* y en el otro *S. aureus*.
3. Se toman tres celdas en una gradilla, en la primera celda se coloca la solución salina sin inocular (blanco), en la segunda y tercera celda se coloca la solución de bacterias de *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.
4. Por medio del uso de un espectrofotómetro de visible se toman lecturas de absorbancia a una longitud de 625 nm. Las lecturas que se obtengan deben oscilar en un rango entre 0.08 y 0.1 nm, por lo que si las lecturas son menores a estos valores se deben agregar más bacterias a la solución; si por el contrario se superan estos valores es necesario diluir con solución salina.

Realizada la solución de bacterias es necesario marcar el lugar donde se colocará cada sensidisco en las cajas de Petri, así como el control que representan por medio de la siguiente nomenclatura:

- A = antibiótico (control positivo).
- H₂O = agua (control negativo).
- M = Solvente A.
- I, II, III y IV = corresponde al número de lote.

Concluida esta acción se procede con la técnica de halo de inhibición:

1. Se toma un tubo Falcon con la solución de bacterias que se preparó anteriormente y se sumerge un hisopo estéril en ella. Con el hisopo húmedo se toma la caja de Petri y se realiza un estriado por agotamiento en varias direcciones. Se siembra en 5 cajas de Petri *E. coli* y en las 5 restantes *S. aureus*.



Figura 46. Estriado de hisopo

2. Cada caja se deja semi abierta cerca de la lámpara de alcohol para mantener la esterilidad, hasta que se seque la solución de bacterias. Una vez seca se deben colocar los sensidiscos en los lugares marcados previamente como se muestra en la figura 7.0.10.



Figura 47. Halos de inhibición.

Ubicación de los sensidiscos

3. Para el control positivo se debe colocar un sensidisco impregnado con antibiótico, en el caso de *E. coli* se utiliza un antibiótico para bacterias Gram negativas y para *S. aureus* se requiere un antibiótico para bacterias Gram positivas.
4. Se colocan el resto de los sensidiscos y a cada uno se le agrega 2 ml de extracto, agua o solvente según le corresponda por la nomenclatura ya mencionada.
5. Cuando las cajas estén terminadas y secas se tapan, se voltean y se sellan. Se deben incubar por 48 horas a una temperatura de 37°C.

8.1 Halos de inhibición

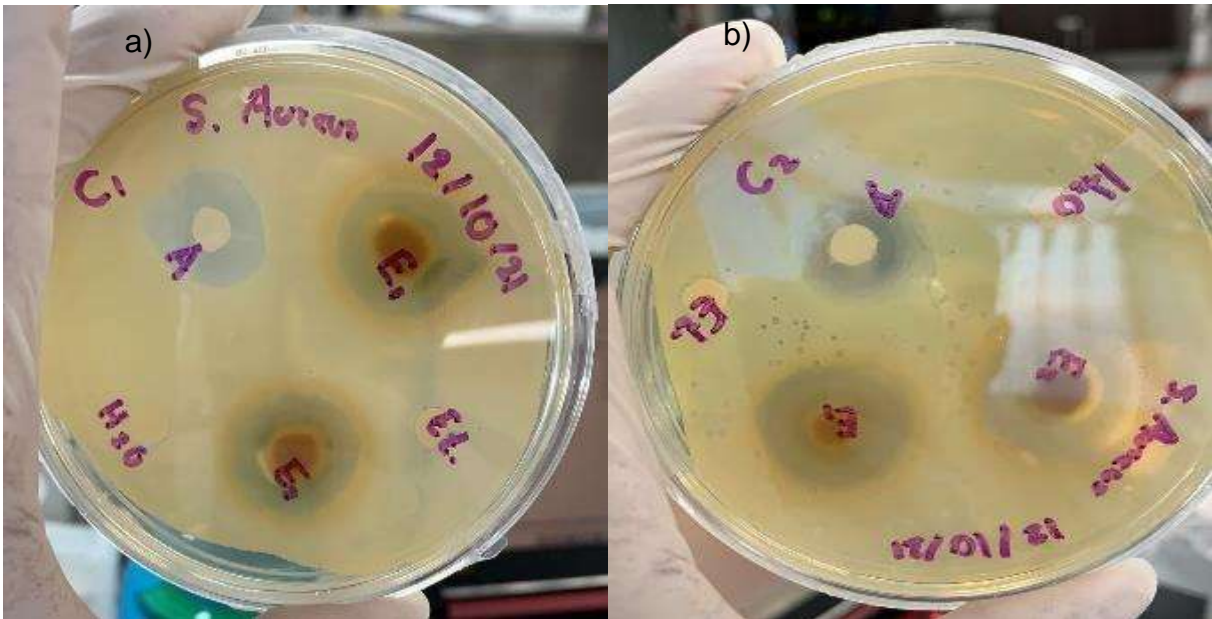


Figura 48. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *S. aureus* corrida a) 1 y b) 2.

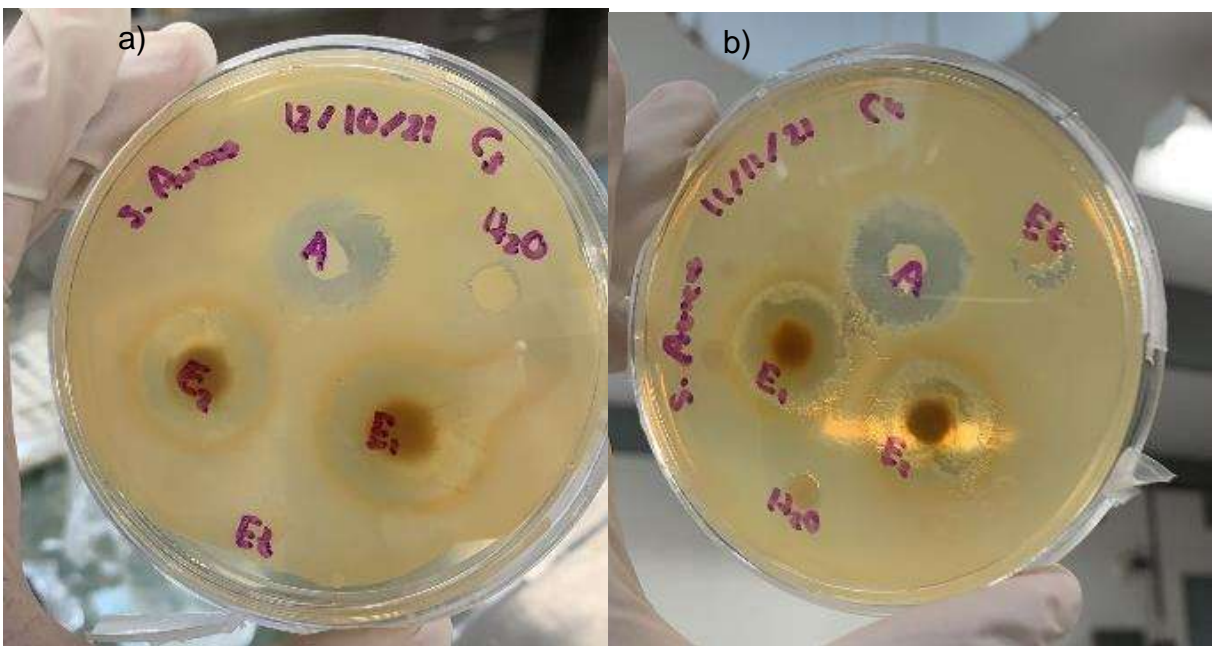


Figura 49. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *S. aureus* corrida a) 3 y b) 4.

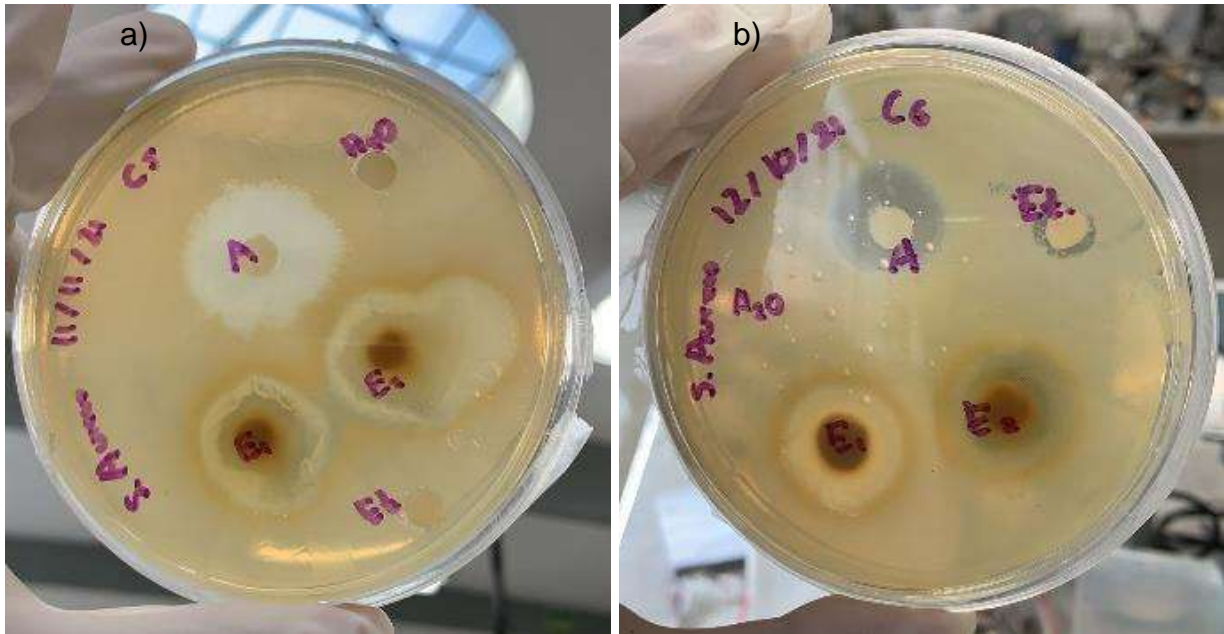


Figura 50. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *S. aureus* corrida a) 5 y b) 6.

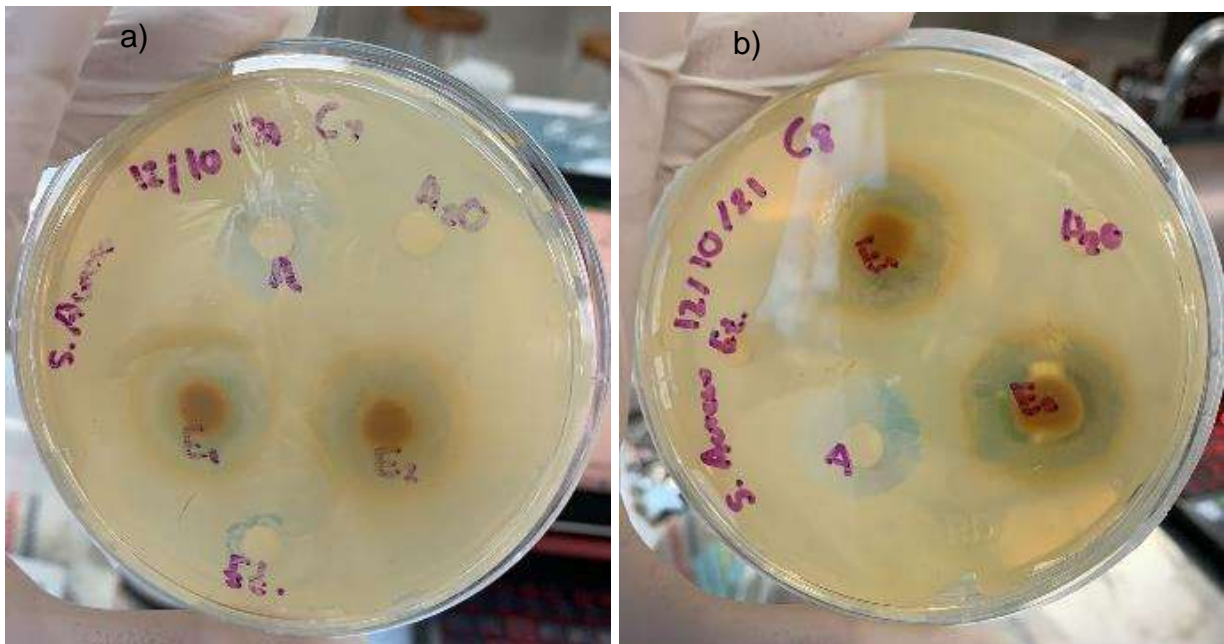


Figura 51. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *S. aureus* corrida a) 7 y b) 8.

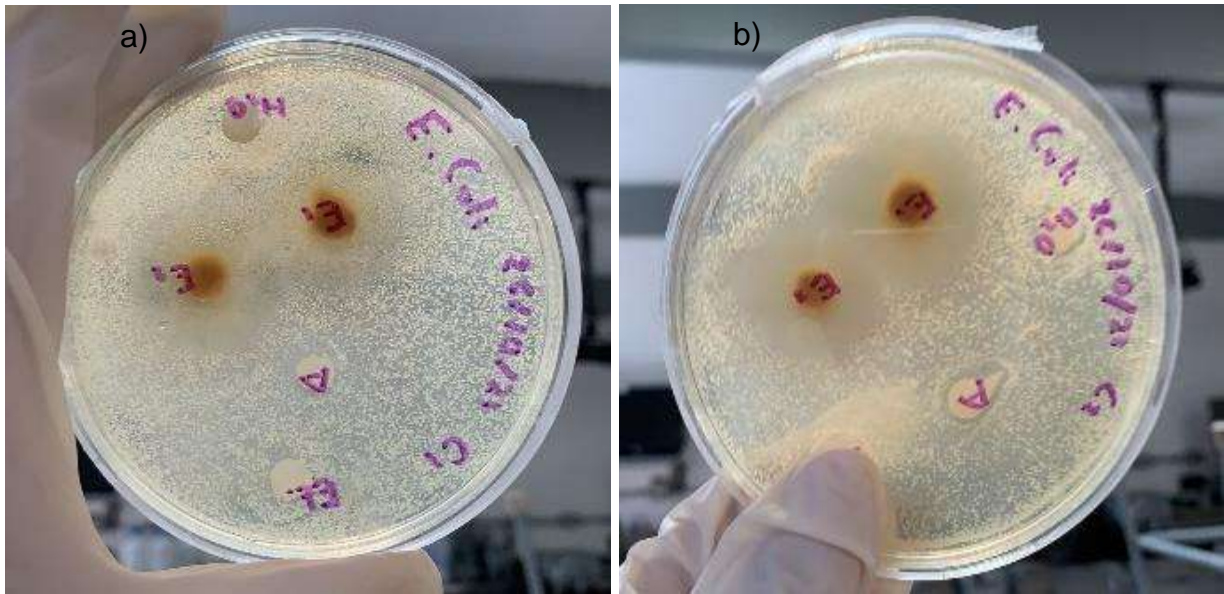


Figura 52. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *E. coli* corrida a) 1 y b) 2.

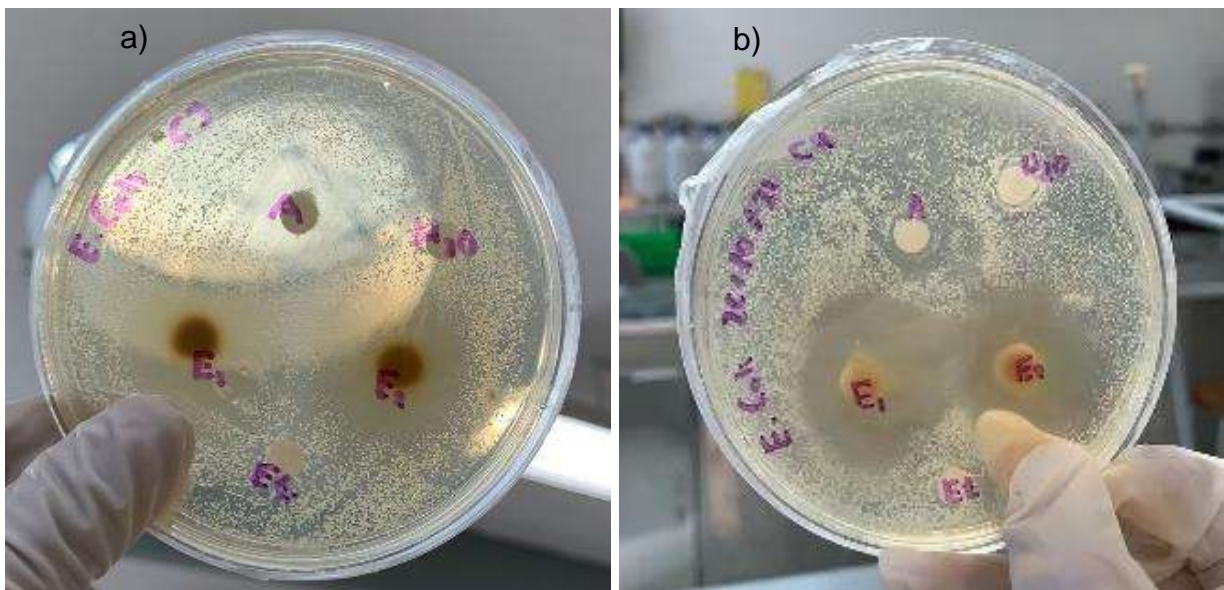


Figura 53. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana* sobre *E. coli* corrida a) 3 y b) 4.

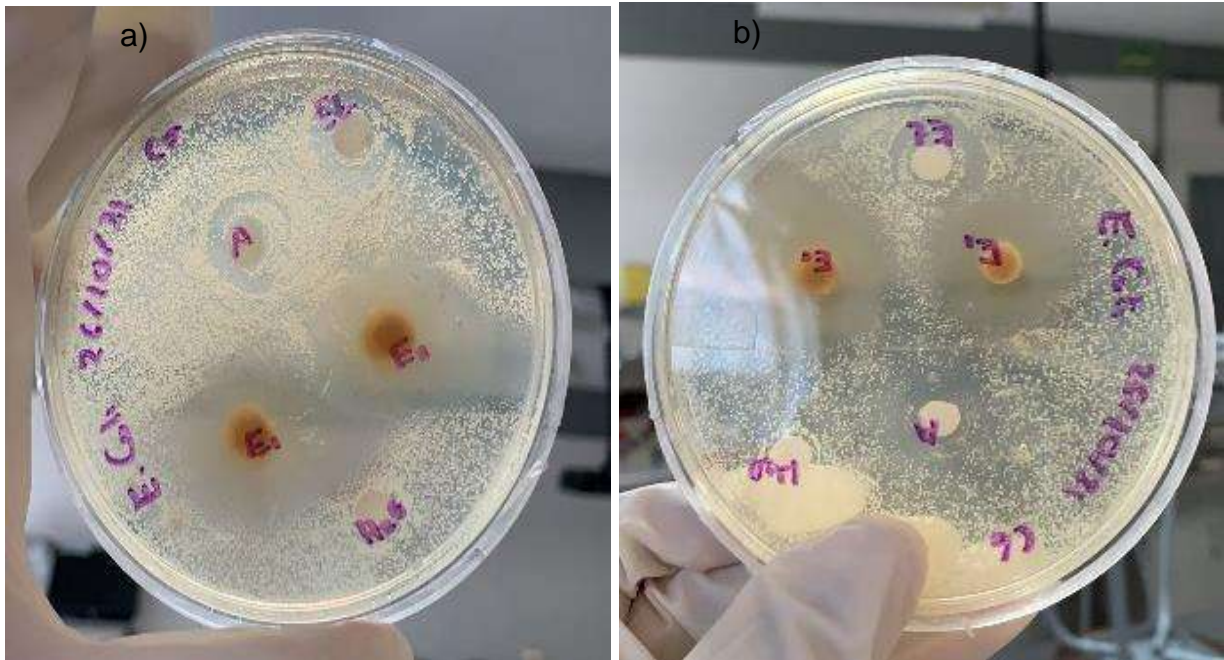


Figura 54. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad Valenciana sobre *E. coli* corrida a) 5 y b) 6.



Figura 55. Halos de inhibición formados por extractos de cáscara de granada variedad Valenciana sobre *E. coli* corrida a) 7 y b) 8.

8.3 Método ABTS^{•+}

Preparación de reactivo ABTS^{•+}

1. Solución acuosa de ABTS^{•+} 7mM

Pesar 0.03602 g del reactivo y disolver en 10 mL de agua.

2. Solución acuosa de persulfato de amonio 2.45 mM

Pesar 0.0027 g y disolver en 5 mL de agua.

Mezclar las dos soluciones acuosas, almacenar en un frasco ámbar, rotular con los datos respectivos. El reactivo debe estar en reposo en oscuridad de 12-16 horas antes de utilizarse para que el radical se estabilice.

Preparación stock de trolox

Para preparar un stock de Trolox a una concentración de 80 $\mu\text{M}/\text{mL}$, se adicionan 0.01564 g de Trolox y se afora a 25 mL utilizando etanol. Almacenar y rotular.

Determinación de actividad antioxidante

Tabla 24. Materiales y reactivos necesarios para cuantificación de actividad antioxidante por ABTS^{•+}.

Radical ABTS ^{•+}	Micropipetas
Tubos de ensaye	Espectrofotómetro
Agua destilada	Celda para lectura
Etanol	Stock de Trolox
Puntas de micropipeta	

Elaboración de curva de calibración

La curva se realiza para reportar los resultados en μM de Trolox equivalentes.

1. Se preparan diluciones del stock de Trolox de acuerdo con la Tabla 36 para obtener las diferentes concentraciones.

Tabla 25. Volúmenes empleados para elaboración de soluciones para curva de Trolox.

Concentración Trolox (μM)	μL de stock	μL de agua destilada
0	0	1000
10	125	875
20	250	750
30	375	625
40	500	500
50	625	375
60	750	250
70	875	125
80	1000	0

2. Calibrar el espectrofotómetro a 734 nm con etanol como blanco.
3. Ajustar la absorbencia del ABTS^{•+}, diluyendo la solución stock con etanol hasta obtener una absorbencia de entre 0.70±0.02 a 734 nm. Anotar el valor de absorbencia al que se ajuste la solución.
4. Utilizar 10 μL de cada concentración Trolox por cada 990 μL de solución ajustada ABTS^{•+}.
5. Realizar la lectura de las muestras después de 5 minutos de mezclar la muestra y la solución de ABTS^{•+}.
6. Reportar resultados en % de inhibición, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial ABTS}^{\bullet+}} - AM}{A_{\text{inicial de ABTS}^{\bullet+}}} \right) \times 100 \quad (8.1)$$

donde A es absorbencia (nm) y AM absorbencia de la muestra (nm).

7. La curva se grafica como concentración de Trolox vs porcentaje de inhibición

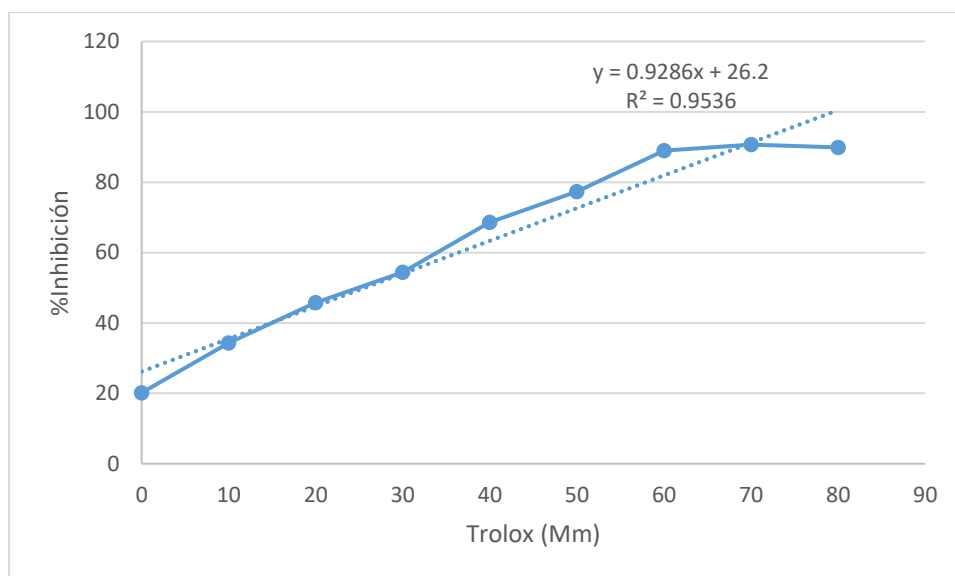


Figura 56. Curva de calibración para ABTS•+.

A partir de la ecuación de la curva se despeja el valor de x para obtener los μM de Trolox equivalentes, refiriéndose a 1 mL de extracto.

Procedimiento para medición de muestras

1. Calibrar el espectrofotómetro a 734 nm con etanol.
2. Ajustar la absorbencia del ABTS•+ diluyendo la solución stock con etanol hasta obtener una absorbencia de entre 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Anotar el valor de absorbencia al que se ajuste la solución.
3. Utilizar 10 μL de muestra problema por cada 990 μL de solución ajustada.
4. Realizar la lectura de las muestras después de mezclar la muestra y la solución de ABTS•+
5. Reportar resultados en % de inhibición se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial ABTS}\bullet+} - AM}{A_{\text{inicial de ABTS}\bullet+}} \right) \times 100 \quad (8.2)$$

donde A es absorbencia (nm) y AM absorbencia de la muestra (nm).

6. Para reportar los resultados como miliequivalentes de Trolox se utiliza la ecuación obtenida de la curva de calibración.

8.4 Método DPPH⁺

Preparación de reactivo (Solución DPPH⁺)

7. Se disuelve 0.046 g de DPPH⁺ en 1L de metanol.

El reactivo se almacena en un frasco ámbar rotulado con los datos correspondientes.

Preparación stock de trolox

Para preparar un stock a una concentración de 80 µM, se adicionan 0.01564 g de Trolox y se afora a 25 mL utilizando etanol. Almacenar y rotular.

Determinación de actividad antioxidante

Tabla 26. Materiales y reactivos necesarios para cuantificación de actividad antioxidante por DPPH.

Radical DPPH 0.046 g/L	Metanol
Tubos de ensaye	Agua destilada
Stock de Trolox 80 µM/mL	

Elaboración de curva de calibración

La curva se realiza para reportar los resultados en µM de Trolox equivalentes

1. Se preparan diluciones del stock de acuerdo con la Tabla 23 para obtener las diferentes concentraciones.

Tabla 27. Volúmenes empleados para elaboración de soluciones para curva de Trolox

Concentración Trolox (µM)	mL de Stock	mL de agua destilada
0	0	1000
10	125	875
20	250	750
30	375	625
40	500	500
50	625	375

2. Calibrar espectrofotómetro a 515 nm con metanol como blanco.
3. Ajustar la absorbancia del DPPH entre 0.8 y 1 a 515 nm, de no ser si agregar metanol o DPPH según se necesario hasta alcanzar la absorbancia requerida.
4. Agregar 3.9 mL de DPPH y 100 ml de cada concentración de Trolox de la Tabla 23 a cada tubo de ensaye y agitar.
5. Dejar reposar durante 30 minutos en un lugar oscuro.
6. Realizar la lectura de las muestras a 515 nm.
7. Reportar resultados en % de inhibición se utiliza la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial DPPH}} - AM}{A_{\text{inicial de DPPH}}} \right) \times 100 \quad (8.3)$$

donde A es absorbancia (nm) y AM absorbancia de la muestra (nm).

8. La curva se grafica como concentración de Trolox vs % de inhibición.

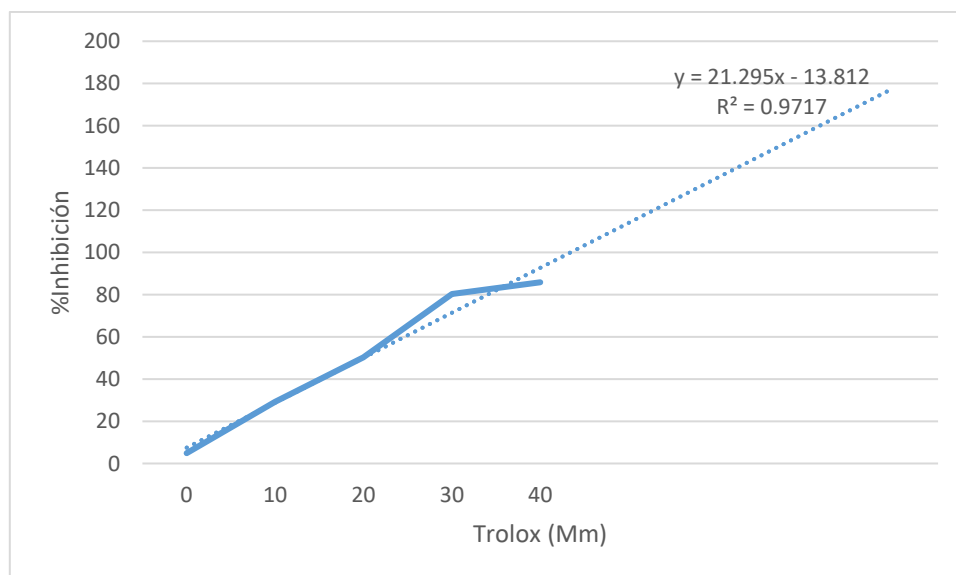


Figura 57. Curva de calibración para DPPH.

9. A partir de la ecuación de la curva se despeja el valor de x para obtener los miliequivalentes de Trolox.

Medición de muestras

Procedimiento:

1. Calibrar el espectrofotómetro a 515 nm con metanol.
2. Ajustar la absorbencia del DPPH entre 0.8 y 1 a 515 nm, de no ser si agregar metanol o DPPH según se necesario hasta alcanzar la absorbencia requerida.
3. Agregar 3.9 mL de DPPH y 100 ml de muestra a cada tubo de ensaye y agitar.
4. Dejar reposar durante 30 minutos en un lugar oscuro.
5. Realizar la lectura de las muestras a 515 nm.
6. Reportar resultados en % de inhibición se utiliza la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial de DPPH}} - AM}{A_{\text{inicial de DPPH}}} \right) \times 100 \quad (8.4)$$

donde A es absorbencia (nm) y AM absorbencia de la muestra (nm).

7. Para reportar los resultados como miliequivalentes de Trolox se utiliza la ecuación obtenida de la curva de calibración.

8.5 Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se requiere realizar una curva de calibración. Para ellos se utiliza una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se toman volúmenes de 0 μ L a 23 μ L en intervalos de:

Tabla 28. Volúmenes de ácido gálico utilizados para curva de calibración de fenoles totales.

Tubo	Stock ácido gálico (0.5/mL)
1	0 μL
2	2.5 μL
3	5 μL
4	7.5 μL
5	12.5 μL
6	23 μL

En cada tubo se adicionan además 500 μL de agua destilada, 10 μL de solvente C, 500 μL reactivo Folin-Ciocalteu 1N, después de este reactivo se debe dejar reposar por 5 minutos cada tubo, posteriormente adicionar 1900 μL de Na_2CO_3 al 10%. Se dejan reposar los tubos por 1 hora. El contenido de cada tubo se mide en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 625 nm. Las absorbencias obtenidas se registran para generar un gráfico.

Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se emplea el siguiente procedimiento:

1. Se prepara una muestra blanco para calibrar el espectro, por lo cual a este no se le adicionará extracto, únicamente se colocará el solvente.
2. Para las diluciones se deben colocar en cada tubo de ensaye los siguientes volúmenes de extracto, solvente C, agua y reactivo de Folin-Ciocalteu, tal como se muestra en la siguiente tabla. El volumen de carbonato de sodio se agrega en pasos posteriores.

Tabla 29. Preparación de diluciones para la cuantificación de fenoles.

Tubos	Extracto (μL)	Solvente C (μL)	H_2O (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Carbonato de sodio 10% (μL)
1 (Blanco)	0	50	1500	250	1000
2-13	5	45	1500	250	1000

3. Después de añadir el reactivo Folin-Ciocalteu cada tubo se debe agitar y dejar en reposo durante 15 min. Tornándose la solución de incolora a un color amarillo.

- Pasado este lapso se añade el carbonato de sodio al 10%, donde después de su adición se deja reposar 60 min a temperatura ambiente (23°C).
- Finalmente se procederá a la lectura en el espectro a una longitud de 625 nm.

Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se obtiene a partir de la ecuación de la recta que se origina en la curva patrón mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ácido gálico: } \left(\frac{mg}{mL}\right) = \left(\frac{A+b}{m}\right) \times FD \quad (8.5)$$

Donde:

A = absorbencia

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD= Factor de dilución

8.7 Flavonoides totales

El contenido de flavonoides es determinado mediante el ensayo de Liu *et al.* en el 2002, cuyo procedimiento se muestra a continuación:

- Para la preparación de la curva estándar de calibración se requiere una solución estándar de quercetina (0.27 mg/mL) de la cual se toman volúmenes de 0 µL a 500 µL en los siguientes intervalos:

Tabla 30. Volúmenes de quercetina utilizados para curva de calibración de flavonoides totales

Tubo	Stock de quercetina (0.27 mg/mL)
1	0 µL
2	50 µL
3	100 µL
4	200 µL
5	350 µL
6	500 µL

2. Posteriormente se adicionan 200 μL de AlCl_3 al 10%, cada tubo debe dejarse reposar durante 5 minutos. Después de esto se adicionan 200 μL de NaCH_3COO 1M y finalmente se completa el volumen de cada tubo con los siguientes volúmenes de agua destilada:

Tabla 31. Volumen de agua adicionado de las discusiones

Tubo	Volumen agua adicionado (μL)
1	2600
2	2500
3	2450
4	2400
5	2250
6	2100

3. El contenido de cada tubo se mide en un espectrofotómetro de visible a una longitud de onda de 475 nm. Las absorbancias se registran para la elaboración de un gráfico donde el resultado es expresado en mg de quercetina por g de extracto (mg quercetina/g extracto).

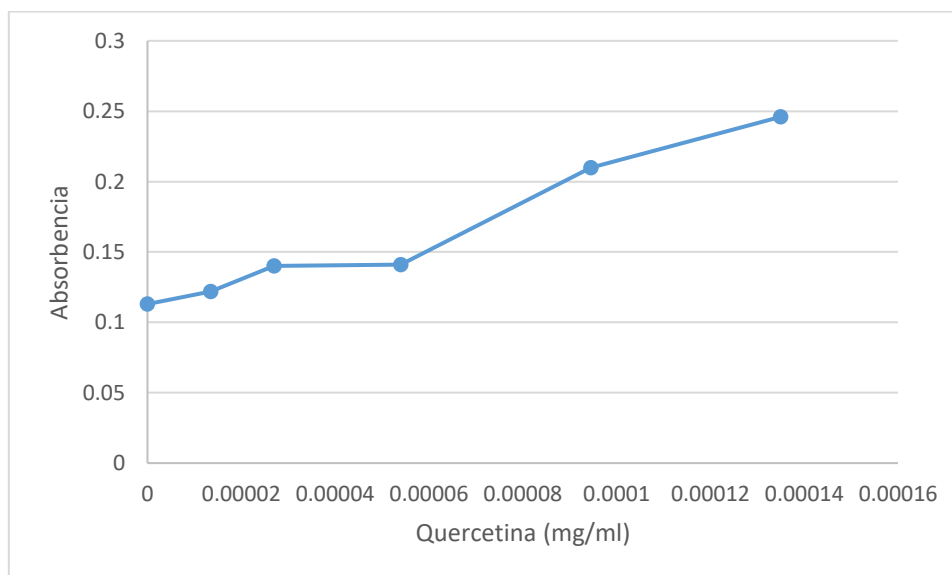


Figura 58. Curva de calibración para flavonoides totales.

Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se sigue el procedimiento mostrado a continuación:

1. Para la elaboración de la muestra blanco no se añadirá extracto, ya que será utilizado para calibrar el espectrofotómetro.
2. En el caso de las diluciones se añadirán los siguientes volúmenes:

Tabla 32. Diluciones para la cuantificación de flavonoides totales

Tubo	Extracto de arándano 0.27 mg/mL (μL)	Cloruro de aluminio al 10% (AlCl3) (μL)	Acetato de sodio 1M NaNO3 (μL)	Solvente de extracción (μL)
Blanco	0	200	200	9600
1	50	200	200	9600
2	100	200	200	9600
3	150	200	200	9600
4	200	200	200	9600

NOTA: En el procedimiento de cuantificación de flavonoides será necesario la preparación de un blanco por cada muestra de extracto. Donde su preparación consiste en la adición del extracto correspondiente y el volumen señalado de acetato de sodio.

3. Después de añadir el cloruro de aluminio, cada tubo se deja reposar durante un lapso de 5 min, para después añadir acetato de sodio y el solvente de extracción, obteniendo una coloración azul.
4. Finalmente se lee cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm.

Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se obtiene a partir de la ecuación de la recta que se origina en la curva patrón mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Quercetina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{A+b}{m} \right) \times FD \quad (8.6)$$

Donde:

A = absorbencia

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

8.7 Cinética de degradación

A partir de los datos obtenidos se calcula el orden de reacción y las constantes de velocidad siguiendo el modelo de Arrhenius:

Una vez graficado el tiempo vs concentración y realizando la regresión lineal se determinó que el orden de la reacción es de 1, esto se determinó ajustando la recta a la ecuación y observando que la ecuación que más se aproximaba estadísticamente era la de grado 1.

Y ahora se puede continuar con los cálculos cinéticos:

Considerando ajustar las cinéticas al modelo de Arrhenius y como se determinó de primer orden, por lo tanto, se sigue la siguiente ecuación:

$$k = k_0 \exp\left(\frac{Ea}{RT}\right) \quad (8.7)$$

Donde k (h^{-1}) es la constante cinética, k_0 (h^{-1}) es la constante de velocidad cinética a tiempo 0, Ea (J/mol) es la energía de activación, R ($\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) es la constante de los gases ideales y T (K) la temperatura.

Después se determinan las constantes de velocidad, para ello es necesario graficar el tiempo vs el logaritmo de la concentración.

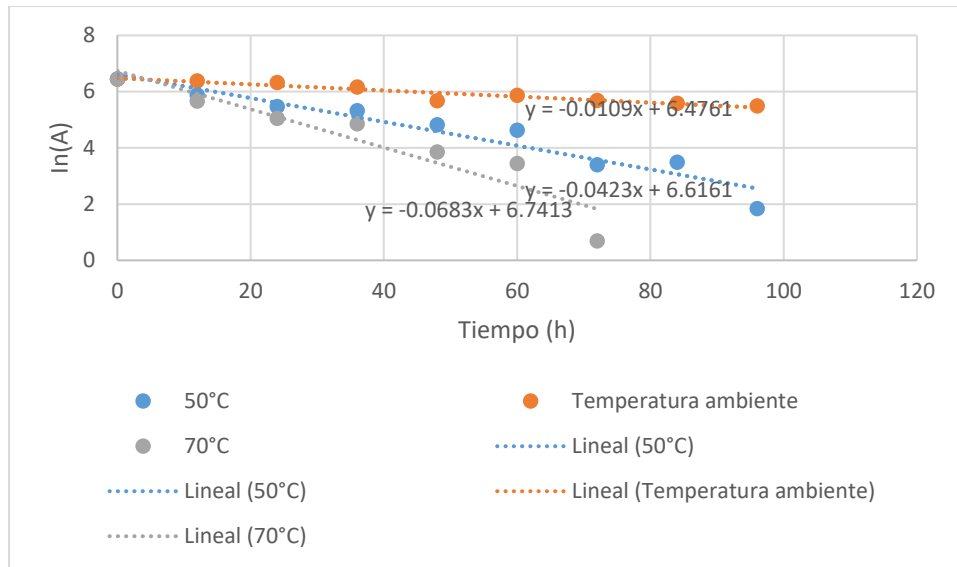


Figura 59. Gráfico ln(A) vs tiempo de las cinéticas para el cálculo de las constantes de velocidad.

Y la constante de velocidad viene dada por:

$$k = -m \quad (8.8)$$

También podemos calcular la energía de activación con la ecuación de Arrhenius:

$$K(T) = Ae^{\frac{E_a}{RT}}$$

Y graficando ln(K) vs 1/T se puede obtener la energía de activación:

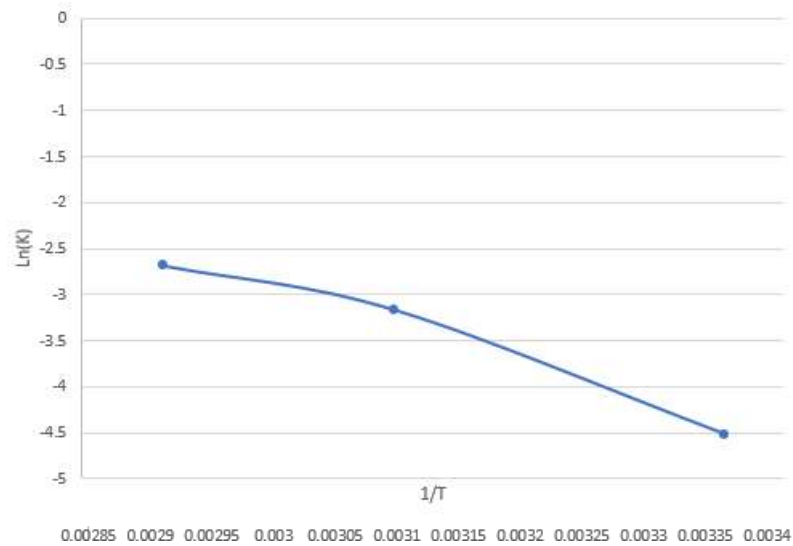


Figura 60. Gráfico Ln(K) vs 1/T de las cinéticas para el cálculo de la energía de activación.

Ahora si se obtiene la velocidad con la ecuación encontrada:

$$r = \ln\left(1 - \frac{X_A}{X_{Aeq}}\right) = -k_1 t \quad (8.9)$$

Y la vida media quedaría dada por:

$$k_1 t_{1/2} = -\ln(1/2) \quad (8.10)$$

Despejando:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_1} \ln(2) \quad (8.11)$$

Y el valor D se calculó con la ecuación:

$$D = \frac{1}{k} \quad (8.12)$$

8.8 Datos experimentales

Tabla 33. Datos experimentales de resistencia a penetración del fruto en granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

Número de muestra	Variedad <i>Wonderful</i>	Variedad <i>Valenciana</i>
	Dureza (N)	Dureza (N)
1	22	16
2	17.5	36
3	18	22
4	18	32
5	17.5	35
6	17.5	17
7	24	27.5
8	12	24.5
9	20	19
10	22	22.5

Tabla 34. Datos experimentales de los parametros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad *Wonderful*.

Número de muestra	L	a*	b*
1	37.64	11.28	11.59
1	36.93	18.87	12.05
1	33.87	21.56	8.56
2	35.09	20.83	10.30
2	31.75	14.52	10.72
2	40.43	17.29	13.29
3	36.41	28.00	11.01
3	37.20	21.92	10.76
3	40.58	11.20	14.35
4	37.47	22.70	12.27
4	36.48	22.40	12.58
4	44.12	13.27	15.03
5	40.33	26.76	14.38
5	50.11	15.88	19.22
5	47.39	19.65	16.78
6	32.49	24.13	9.57
6	42.45	10.49	14.06
6	38.48	18.08	12.75
7	36.18	28.86	9.71
7	45.90	25.96	13.44
7	43.51	25.03	13.28
8	33.30	23.64	9.56
8	43.32	14.42	13.13
8	35.39	20.13	8.69
9	38.18	22.96	11.63
9	31.63	13.47	8.71
9	39.85	18.88	12.49
10	38.16	21.72	10.70
10	34.44	22.41	9.41
10	40.49	15.35	15.22

Tabla 35. Datos experimentales de los parametros de color en coordenadas CIELab en muestras de granada variedad *Valenciana*.

Número de muestra	L	a*	b*
1	39.1	15.19	15.91
1	47.83	6.10	21.75
1	40.13	13.36	16.46
2	49.53	-6.91	24.60
2	48.66	-3.84	22.66
2	50.30	8.23	22.76
3	42.77	10.16	18.07
3	47.17	2.41	22.17
3	46.39	10.48	19.19
4	54.48	10.59	23.31
4	61.33	0.83	28.30
4	53.39	0.98	24.32
5	53.92	-5.55	25.31
5	58.87	-4.25	27.08
5	56.78	0.71	25.09
6	46.15	8.87	19.99
6	50.29	2.35	21.60
6	43.38	10.39	17.49
7	43.60	22.03	16.43
7	51.01	3.70	22.06
7	43.58	13.91	18.45
8	44.10	4.27	19.24
8	50.88	-2.99	24.24
8	57.22	0.36	26.24
9	47.56	11.01	21.49
9	40.40	18.67	17.67
9	48.42	7.33	22.07
10	38.09	24.11	16.34
10	42.53	20.78	18.43
10	38.66	4.42	16.96

Tabla 36. Resultados experimentales de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful*.

Corrida	Fenoles totales (mg/ml EQ)	Flavonoides (mg/ml EAG)	ABTS (%inhibición)	DPPH (%inhibición)	<i>E. coli</i> (mm inhibición)	<i>S. Aureus</i> (mm inhibición)
1	8.51E-04	7.05E-05	90.3089	85.0054	15	17
1	9.03E-04	4.08E-05	90.1685	83.8188	13	13
1	1.52E-03	3.95E-05	81.6011	85.5448	-	-
2	6.31E-03	7.17E-04	90.3225	82.1990	15	17
2	6.08E-03	6.57E-04	88.6395	83.7696	15	17
2	6.01E-03	3.68E-04	89.6213	84.1885	-	-
3	3.23E-03	3.84E-04	89.3408	85.1309	18	17
3	2.84E-03	3.60E-04	89.6213	87.2251	17	15
3	2.33E-03	2.78E-04	90.6030	83.9791	-	-
4	2.85E-03	2.13E-04	82.4684	84.6073	13	14
4	1.97E-03	2.06E-04	89.7615	86.2827	13	17
4	2.11E-03	1.97E-04	89.9018	84.2932	-	-
5	4.68E-03	1.78E-04	77.4566	78.0749	20	19
5	5.10E-03	2.42E-04	77.3121	78.5027	24	18
5	4.49E-03	2.42E-04	79.3352	77.3262	-	-
6	7.18E-03	7.05E-04	74.7109	79.1444	22	20
6	3.25E-03	6.98E-04	76.4450	81.2834	25	21
6	3.88E-03	6.98E-04	80.2023	82.2460	-	-
7	8.37E-03	3.35E-04	79.9132	78.1818	26	20
7	8.96E-03	6.62E-04	80.3468	76.4706	23	20
7	7.63E-03	3.49E-04	79.0462	78.0749	-	-
8	1.45E-03	1.96E-04	79.6242	79.8930	34	19
8	2.60E-03	3.66E-04	78.3236	81.4973	31	20
8	1.47E-03	2.55E-04	73.4104	81.7112	-	-

Tabla 37. Resultados experimentales de las corridas del diseño experimental para extractos de cáscara de granada variedad *Valenciana*.

Corrida	Fenoles totales (mg/ml EQ)	Flavonoides (mg/ml EAG)	ABTS (%inhibición)	DPPH (%inhibición)	<i>E. coli</i> (mm inhibición)	<i>S. Aureus</i> (mm inhibición)
1	7.14E-03	5.43E-04	88.4561	84.1997	24	23
1	7.94E-03	4.06E-04	86.9262	85.7288	25	21
1	6.72E-03	3.70E-04	87.3435	84.4036	-	-
2	5.10E-02	2.46E-03	88.8734	84.0978	26	21
2	5.46E-02	2.76E-03	88.0389	80.5300	28	22
2	6.09E-02	2.76E-03	88.0389	83.8939	-	-
3	7.18E-03	6.16E-04	88.5952	87.1559	21	21
3	6.34E-03	4.44E-04	90.4033	84.8114	23	23
3	6.25E-03	3.83E-04	86.6481	85.6269	-	-
4	1.99E-02	7.88E-04	90.1251	85.8307	25	20
4	1.68E-02	8.42E-04	89.7079	86.3404	25	22
4	1.84E-02	8.23E-04	90.4033	80.9378	-	-
5	4.41E-02	2.15E-03	87.3435	85.0152	23	23
5	4.34E-02	2.11E-03	90.1251	83.4862	23	25
5	3.87E-02	1.94E-03	88.3171	85.9327	-	-
6	1.87E-02	1.09E-03	90.1251	83.4862	20	20
6	1.59E-02	9.01E-04	85.5354	84.4036	22	21
6	1.77E-02	8.71E-04	89.1515	83.7920	-	-
7	2.29E-02	8.73E-04	88.8734	84.6075	23	20
7	1.83E-02	7.15E-04	89.4297	87.6656	23	21
7	2.02E-02	9.86E-04	87.6216	80.9378	-	-
8	1.35E-02	8.82E-04	89.0125	84.7094	22	21
8	1.33E-02	7.88E-04	87.0653	85.4230	22	23
8	1.49E-02	8.03E-04	87.0653	86.7482	-	-

Tabla 38. Resultados de rendimientos obtenidos de las corridas experimentales en extractos de cáscara de granada variedad *Wonderful* y *Valenciana*.

Corrida experimental	Rendimiento (%)	
	<i>Wonderful</i>	<i>Valenciana</i>
1	65.4330	26
2	66.6920	10
3	45.1880	24.6667
4	66.7765	20
5	56.7469	9.3333
6	58.6058	16
7	65.3570	11.3333
8	50.8492	14.6667

8.9 Constancias de participación en congresos



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ingeniería Química

División de Estudios de Posgrado

A través de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo hace patente su

RECONOCIMIENTO

A:

I.Q. Fernando Ayala Flores

Por su valiosa exposición con la Conferencia:

“Extracción de Compuestos Polifenólicos en Cascara de Granada (Punmica Granatum) VAR Wonderful.”

En el programa del **Coloquio Internacional de Ingeniería Química** celebrado del 11 al 13 de Agosto de 2021.

Morelia, Mich. México
12 de Agosto de 2021



Jefe de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

ATENTAMENTE

J. M. Ponce Ortega
Dr. José María Ponce Ortega

Figura 61. Constancia de participación en el Coloquio Internacional de Ingeniería Química celebrado del 11 al 13 de agosto del 2021.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Fernando Ayala-Flores, Ma. del Carmen Chávez-Parga, Juan Carlos González-Hernández

Por la presentación del trabajo en modalidad oral:

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN CÁSCARA DE GRANADA (*Punica granatum*) VAR. WONDERFUL

ID: 61



Dra. María del Rosario Enriquez Rosado
PRESIDENTA DEL AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR



Dr. Tomás Miveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Evento virtual del 08 al 11 de septiembre de 2021

Figura 62. Constancia de participación en el XLII Encuentro Nacional del AMIDIQ celebrado del 8 al 11 de septiembre del 2021.



El Gobierno del Estado de Michoacán, a través del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación, en colaboración con el Tecnológico Nacional de México, campus Instituto Tecnológico de Morelia y el respaldo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgan la presente:

CONSTANCIA

FERNANDO AYALA-FLORES, WENDOLYNE MONROY-MARTÍNEZ, MARIANA RODRÍGUEZ-ROJAS, MA. DEL CARMEN CHÁVEZ-PARGA, JUAN CARLOS GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ

A:

POR LA EXPOSICIÓN DE SU PONENCIA *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SOXHLET MEDIANTE UN DISEÑO EXPERIMENTAL DE CRIBADO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA CÁSCARA DE GRANADA (*Punica granatum*) VAR. WONDERFULEN EL EJE 1. INVESTIGACIÓN BÁSICA DE LA MESA 3: CIENCIAS AGRÍCOLAS Y BIOTECNOLOGÍA*

En el marco de las actividades académicas del



Morelia, Michoacán, a 22 de Octubre de 2021


Biol. María Piedad Trujillo García
 Directora General del Instituto de Ciencia
 Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán


Dr. José Luis Gil Vázquez
 Director del Tecnológico Nacional de México,
 campus Instituto Tecnológico de Morelia

Figura 63. Constancia de participación en el 16 Congreso Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación celebrado el 22 de septiembre del 2021.