



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES Y ANTOCIANOS DE LA GRANADA

Q.F. LUIS FELIPE ZALAMEA MOLINA, MSc.
LIC. VICTORIA EUGENIA GARCÍA CASAS, MSc
ING. LILYA JANETT CASABONA THOMAS, MSc



Primera edición

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES Y ANTOCIANOS DE LA GRANADA

Autores

Q.F. LUIS FELIPE ZALAMEA MOLINA, MSc.
LIC. VICTORIA EUGENIA GARCÍA CASAS, MSC
ING. LILYA JANETT CASABONA THOMAS, MSC

Primera edición
julio 2017

Libro sometido a revisión de pares académicos.



Edición
Diagramación
Diseño
Publicación

Maquetación.

Grupo Compás

Cámara Ecuatoriana del Libro - ISBN-E: 978-9942-760-56-2

Guayaquil - Ecuador

Prólogo

Los autores del texto presentan un libro teórico en su totalidad, donde la definición de los términos muestran un papel fundamental en el entendimiento de la situación y la realidad del producto, la presentación de gráficos y tablas son fundamentales para establecer la relación entre la teoría y los datos investigados; en su contenido se pone de manifiesto que la mayoría de las enfermedades degenerativas son causadas por radicales libres, siendo los antioxidantes los agentes responsables del barrido de estos. La importancia de este estudio radica en la evaluación in vitro de las propiedades de las fracciones ricas en antioxidantes de la fruta granada. Se obtuvieron extractos metanólicos de la cáscara, jugo y semilla de la planta *Punica granatum L*, originarias del litoral ecuatoriano y se evaluó la actividad antioxidante frente al DPPH, (1,1-diphenyl - 2picrylhydrazyl), encontrándose una fuerte actividad de barrido, siendo la AOE del extracto del jugo en los primeros 30 segundos del 90.9 %, seguido por la cáscara y finalmente por la semilla. El estudio realizado permitió determinar el fuerte potencial de este fruto como fuente de antioxidantes naturales, así como la importancia de su aplicación en el desarrollo de suplementos nutraceuticos.

Índice

Prólogo	4
Introducción	7
Capítulo 1	9
1.1. La granada	10
1.2. Historia	11
1.3. Distribución mundial	11
1.4. Producción mundial de granada	12
1.5. Propiedades químicas y nutricionales	13
Capítulo 2	16
2.1. Antioxidantes	17
2.1.1. Preventivo	19
2.1.2. Reparador	19
2.1.3. Secuestrador	20
2.1.4. Ácido ascórbico	20
2.1.5. Glutatión	21
2.1.6. Melatonina	21
2.1.7. Tocoferoles y Tocotrienoles	22
2.1.8. Carotenoides	22
2.1.9. Polifenoles	23
2.1.10. Catalasas	23
Capítulo 3	25
3. Flavonoides y antocianos de la granada	26
3.1. Ácido elágico	26
3.1.1. Elagitaninos como precursores del ácido elágico	29
3.1.2. Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico	30
3.1.3. Propiedades industriales	30
3.1.4. Aplicaciones medicas del ácido elágico	31
3.1.5. Actividad antioxidante	31
3.1.6. Actividad anti-lipoxidación o disminución de ldl	31
3.1.7. Actividad anti-mutagénica y anti-carcinogénica	32
3.1.8. Actividad anti-microbiana	33
3.1.9. Actividad antiviral	33
3.1.10. Actividad gastroprotectiva	34
1.3.6. Reducción de los niveles de glucosa	34
3.2. Propiedades de los fitonutrientes	34
3.2.1. capacidad antioxidante	34
3.2.2. capacidad anticancerígena	35

3.2.3. capacidad antiinflamatoria.	38
3.2.4. capacidad anti aterosclerótica	37
3.2.5. otros mecanismos	39
Capítulo 4	38
4.1. Determinación de la capacidad antioxidante en la granada por el método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (dpph)	39
4.1.1. Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH)	39
4.2. Propiedades y aplicaciones	39
4.3. Materiales, reactivos y equipos utilizados	41
4.3.1. Reactivos	41
4.3.2. Materiales y equipos	41
4.4. Ensayo DPPH	41
4.4.1. Materiales	41
4.4.2 Equipos	41
4.4.3. Reactivos	46
4.5. Método de preparación del reactivo DPPH	42
4.6. Ensayo DPPH (Band-Williams et al.)	42
4.7. Procedimiento	50
4.7.1. Preparación de los Reactivos	51
4.7.2. Cálculos y resultados	52
Capítulo 5	
5.1. Conclusiones y recomendaciones	69
Bibliografía	70

Introducción

Los antioxidantes, sustancias capaces de prevenir o retrasar el envejecimiento, han sido estudiados ampliamente desde hace varios años. Es conocido que los alimentos son los encargados de transportar estas sustancias hasta el organismo, de ahí la importancia de consumir alimentos ricos en antioxidantes.

Los antioxidantes actúan de manera directa en la prevención de la oxidación de sustratos biológicos como proteínas y lípidos, compuestos que se ven afectados por los radicales libres, así como por sustancias reactivas capaces de producir la oxidación; tienen un importe sustancial en la reducción de enfermedades que aquejan a la población mundial, como las enfermedades tumorales y cardiovasculares.

La amplia difusión hacia los consumidores de la importancia de la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes ha motivado el estudio del nivel de antioxidantes de diferentes grupos de alimentos; en este sentido la ciencia continúa desarrollando diversos estudios que permitan mejorar las condiciones de vida del ser humano.

La granada (*Punica granatum L.*), especie de la familia *Punicaceae*, es una planta originaria de los países del medio oriente, cuyo cultivo se ha extendido a las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo; es una fruta de muy bajo nivel calorífico cuyo componente mayoritario es el agua; se destaca en ella la alta presencia de potasio, mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. También de alta importancia son el ácido cítrico, taninos y una serie de compuestos fenólicos y polifenólicos, todos ellos de alto

poder antioxidante. Los taninos se reconocen rápidamente por la sensación áspera que produce al paladar.

Diversos estudios publicados ponen de manifiesto las propiedades nutraceuticas de esta planta, a la que se le confiere poder anticancerígeno, antiinflamatorio, antitumoral, antiparasitario, entre otras. Su fruto es rico en antocianinas, taninos, vitamina c, riboflavina, tiamina, ácido elágico, ácido gálico. Los compuestos polifenólicos presentes en el fruto le atribuyen propiedades biológicas, especialmente antioxidantes.

En el Ecuador es muy favorable el cultivo de la granada por cuanto el territorio ecuatoriano cuenta con climas tropicales y subtropicales, donde el periodo de temperaturas elevadas coincide con la época de la maduración de la fruta. Son disponibles cinco meses del año para la cosecha de este fruto iniciándose en abril y finalizando en agosto, lo que refleja una ventaja amplia en relación a los demás países productores.

En el presente libro se recoge una investigación realizada para cuantificar el contenido de flavonoides y antocianos de la granada, así como determinar su capacidad antioxidante, abriendo una puerta al desarrollo de nuevos surtidos alimenticios a partir de este recurso natural, estableciéndose las bases para transferir los resultados de la investigación a la industria de alimentos y bebidas, fomentándose la utilización de los recursos naturales, la conservación, la caracterización y la evaluación de los mismos; todo esto en aras del bienestar de los consumidores.



CAPÍTULO 1

1. La granada

1.1. Descripción botánica.

La granada (*Punica granatum L.*) es el fruto del granado, planta que pertenece a la familia de las Punicáceas. Es un árbol de tamaño pequeño caducifolio muy resistente a condiciones extremas de sequía, sus flores son grandes y llamativas, presentan un hermoso color naranja. El fruto del granado es de tamaño medio con gran cantidad de semillas denominadas arilos de color granate brillante en su estado de madurez, su pulpa es muy jugosa y ácida ligeramente. (Sánchez, *et al*, 2005)



Figura No. 1. La Granada (*Punica granatum L.*)

Fuente: <http://www.fairtrasa.com/es/portfolio-items/pomegranate/>

Especialistas en la rama de la agricultura refieren que las mejores granadas son las que exhiben una coloración roja intensa, sin signos de laceración a marrón y sin grietas ni roturas; las de tamaño pequeño generalmente se ven desecadas, fibrosas y picantes. El tamaño de la fruta incide en la jugosidad de la misma. Para conocer la madurez de la fruta sin haber sido sometida a análisis físico químicos basta tan solo con tocar la parte externa, la que debe verse lisa y brillante, libre de magulladuras de marcas. Se dice que la fruta está madura cuando presionándola un poco, emite un ruido metálico. (Carbonell, 2012)

1.2. Historia

Es originaria del Oriente Medio, pero después se extendió hacia el este de la China y al oeste de África. Los árabes fueron los que la introdujeron en España, citándola ya en el siglo XIII Gonzalo de Berceo en uno de sus poemas, donde la llama milgrana (milgranos), por la abundancia de sus semillas. (Avalos & Zapata, 2013)

El nombre científico de la granada, es *Punican granatum*. “Punica” le fue otorgado por los romanos por cuanto este árbol fue introducido en las zonas mediterráneas por los cartagineses durante las Guerras Púnicas y “granatum” por la gran cantidad de semillas contenidas en el fruto. (Sheets, Dubois, & Willianson, 2004)

Las granadas proliferaron sobretodo en el sur de la Península, donde finalmente la ciudad de Granada tomó este nombre. Con la conquista de América, los colonos españoles llevaron esta fruta al continente.

No se sabe si este árbol se cultivó con éxito en Nuevo México en la época colonial, pero actualmente, su cultivo está generalizado en las zonas de Sudamérica y el sur de Estados Unidos.

1.3. Distribución mundial

El granado es un frutal cultivado desde la antigüedad y, como se ha indicado su Centro de Origen se encuentra en Oriente Próximo. Desde aquí se difundió a diferentes zonas donde se cultiva y en las que existe gran diversidad genética como consecuencia de su propagación por semillas, que germinan con gran facilidad o son difundidas por aves y otros animales. (Cubero, 2012)

La gran diversidad que presenta la especie queda patente por el gran número de variedades descritas en los diferentes países de Oriente, área mediterránea y occidente, e incluso América. (Mira, 2017)

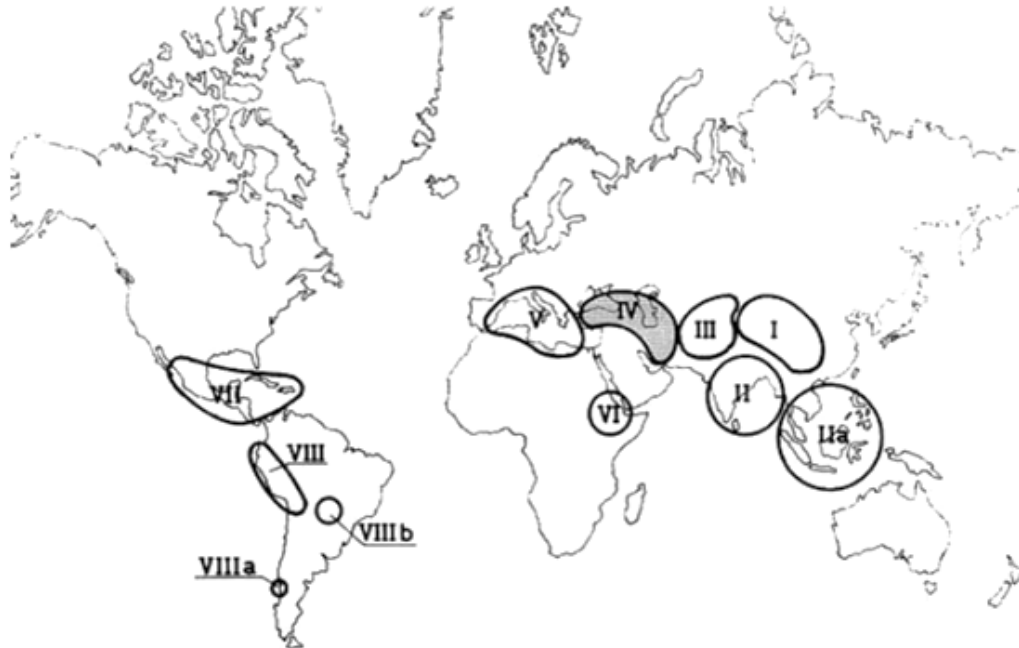


Figura No. 2. Distribución del cultivo de granada a nivel mundial.

Fuente: <http://granadasaludable.com/central6.htm>

1.4. Producción mundial de granada

Muchos países se están convirtiendo en serios competidores en el mercado europeo y mundial, como ocurre con Irán, India o Turquía (grandes productores) o con otros de más reciente incorporación al sector (Chile, Perú, Argentina) que exportan tanto a EE.UU como a Europa.

Algunos países del continente americano están creciendo muy considerablemente, especialmente EE.UU; también otros países como Sudáfrica o Australia aparecen ya en la lista de productores de granada.

En California las granadas se recolectan entre agosto y mediados de noviembre (como en España). EE.UU exportó a Japón (17.000 t), también exporta a Canadá, México e Inglaterra, destinando el 80% de su producción a la obtención de zumo, que en 2006 alcanzó los 0,35 \$/Kg, precio muy interesante para su procesamiento industrial. (Prochile, 2012)

Otro referente en América del Sur es Chile, país en el que las exportaciones están creciendo muy rápidamente y que exporta a EE.UU y a Europa; aquí la recolección se realiza entre marzo y abril.

La superficie dedicada al cultivo del granado en el mundo se estima en más de 300.000ha, de las que más del 50% se encuentran en tres países (India, China e Irán); sin embargo, los países que les siguen en superficie (Turquía, EE.UU, España, Egipto e Israel), con superficies entre 16.000 y 2.400 ha, son los de mayor desarrollo en materia de exportaciones, investigación, rendimientos, desarrollo de mercado y nuevas variedades.

1.5. Propiedades químicas y nutricionales.

Como se muestra en la Tabla 1, la granada posee un bajo valor energético, 100 g de porción comestible aportan unas 60 - 70 Kcal. Este bajo nivel calórico es debido a que los componentes mayoritarios son el agua (aprox. 80%) y los azúcares (12%-17%), que son principalmente glucosa y fructosa. En cuanto al contenido de grasa y proteína su contenido es poco significativo. (García & Pérez, 2004)

En cuanto a las vitaminas destacan la vitamina C, vitamina A, vitamina B1, vitamina K y beta carotenos; con relación a los minerales, es importante resaltar su contenido en hierro, calcio, zinc y potasio; este último representa un porcentaje importante en este fruto.

En la granada, además de los azúcares, vitaminas y minerales, se han identificado más de 120 compuestos diferentes, entre los que destacan: ácidos orgánicos, flavonas, flavonoles, antocianos, alcaloides, esteroides, glucósidos, taninos, polifenoles varios y punicalaginas.

Tabla No.1 Composición nutricional en 100g de granada (fruta fresca)

NUTRIENTES	UNIDADES	VALOR por 100 g
Agua	g	80,97
Energía	kcal	68
Proteína	g	0,95
Grasa	g	0,30
Colesterol	mg	0
Carbohidratos	g	17
Azúcares totales	g	16,57
Fibra dietética	g	0,6
VITAMINAS		
Vitamina C (ácido ascorbico)	mg	6,1
Vitamina A	UI	108
Vitamina E (α -tocoferol)	mg	0,60
Vitamina K (filoquinona)	μ g	4,6
α -Caroteno	μ g	50
β -Caroteno	μ g	40
Fitoesteroides	mg	17
MINERALES		
Potasio	mg	250
Hierro	mg	0,3
Calcio	mg	3
Sodio	mg	0

Fuente: Antonio J. Andreu-Sevilla, Antonio J. Signes-Pastor, Ángel A. Carbonell - Barrachina "La granada y su zumo."

Todas estas sustancias, típicas del metabolismo secundario del árbol, además de aportar color y aroma al fruto tienen la función de protegerlo frente a posibles agresiones y enfermedades externas como las parasitarias y microbianas, y

aportar color y aroma característico a sus frutos. Según algunos estudios comparativos realizados con esta fruta, la granada tiene un poder antioxidante tres veces superior al del té verde y del vino tinto. Esto es debido sobre todo a la acción de los polifenoles, el ácido elágico y los taninos hidrolizables. (López, López, & Palau, 2010)

La granada es una planta de la que se puede aprovechar todos sus componentes, semilla, jugo, cáscara, hoja, flor, corteza y raíz, las cuales poseen actividad farmacológica y presentan, un amplio rango de aplicaciones clínicas (Porras, Loaiza, López, & Malo, 2009); según la parte del árbol sea esta raíz, corteza, flor, fruto o semillas, la concentración de estas sustancias puede variar. Tal y como muestra la tabla 2, determinadas partes de la planta son más ricas en taninos, como la corteza, raíz y las hojas, y otras son más ricas en antocianos, ácidos orgánicos y polifenoles.

Tabla No. 2. Características de los constituyentes de la granada.

PARTE DE LA PLANTA	CONSTITUYENTES PRINCIPALES
PERICARPIO (PIEL + ARILOS)	Punicalaginas, compuestos fenólicos, ácido gálico y otros ácidos grasos, catequizas, EGCG, quercetina, rutina, flaonas, flavanonas y antocianidinas.
ACEITE DE SEMILLAS	95 % ácido púnico, ácido elágico, ácidos grasos,esteroles
ZUMO	Antocianos, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, catequinas, EGCG, quercetina, rutina, minerales, aminoácidos.
EXTRACTO DE LAS HOJAS	Taninos (punicalina y punicafolina), glicósidos de flavonas, incluido la luteolina y apigenina.
EXTRACTO DE LAS FLORES	Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, ácido asiático, ácido maslínico y otros constituyentes sin identificar
EXTRACTO DE LAS RAÍCES Y CORTEZA	Taninos (punicalina y punicalagina) y numerosos alcaloides

Fuente: C. García-Viguera, A. Pérez Vicente. Granada, alimento rico en antioxidantes. Laboratorio de Fitoquímica. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. CEBAS-CSIC.Murcia



CAPÍTULO 2

2. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de compuestos oxidables, atrapando radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo. (Coronado, Vega, Gutierrez, Vásquez, & Radilla, 2015)

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. (Guerra, 2001)



Figura. No. 4. Acción de un antioxidante neutralizando un radical libre

Fuente: Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, et al. (2004)

Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.

Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores, tales como tioles o polifenoles. (Venereo, 2002) Los antioxidantes se encuentran contenidos en el olivo, ajo, arroz integral, café, coliflor, brócoli, jengibre, perejil, cebolla, cítricos, semolina, tomates, aceite de semilla de la vid, té, romero, entre otras muchas frutas y vegetales. También son parte importante constituyente de la leche materna.

Tabla No. 4: Clasificación de los antioxidantes

Exógenos	Endógenos	Cofactores
<i>Vitamina E</i>	<i>Glutación</i>	<i>Cobre</i>
<i>Vitamina C</i>	<i>Coenzima Q</i>	<i>Zinc</i>
<i>Betacaroteno</i>	<i>Ácido tióctico</i>	<i>Manganeso</i>
<i>Flavonoides</i>	<i>Enzimas:</i> <i>Superóxidodismutasa(SOD)</i> <i>Catalasa</i> <i>Glutación peroxidasa</i>	<i>Hierro</i>
<i>Licopeno</i>		<i>Selenio</i>

Fuente: http://www.botanical-online.com/granada_propiedades.htm

Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutación, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peróxidasas.

Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células.

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebro vascular y enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, se desconoce si el estrés oxidativo es la causa o la consecuencia de tales enfermedades.

Los antioxidantes también son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica.(Salinas, Almaguer, Peña, & Ríos, 2009)

La oxidación celular en exceso puede resultar peligrosa para la salud ya que produce unas moléculas denominadas radicales libres que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en algunos tejidos. (Cabiscol, 2014)

Los antioxidantes ayudan a prevenir diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas, estimulando los mecanismos de reparación endógena al daño causado por el ataque de radicales libres. Suministra entidades químicas que aumentan la capacidad endógena de secuestro de radicales libres. (Zamora, 2007)

A pesar de todos los estudios realizados en aras de demostrar los múltiples beneficios que aportan para el ser humano la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes, existe una contraposición que refiere que los suplementos ricos en antioxidantes pueden presentar un efecto antagónico. . (Instituto Nacional del Cáncer, 2015)

Mecanismo de los antioxidantes.

2.1 Preventivo.

Previenen la formación de EROs por encima de los niveles normales del organismo. Estas son diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales como la albumina, metalotioneína y ceruloplasmina que son compuestos que contienen cobre; la ferritina, transferrina y mioglobina que son compuestos que contienen hierro; todos estos deben ser suministrado a través de la dieta, por cuanto el ser humano no los puede sintetizar. (Avello & Suwalsky, 2006)

2.2. Reparador.

Por cuanto reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de los radicales libres, tales como: Superóxido dismutasa (SOD), Glutación peróxidasa (GP), Glutación reductasa (GR), Catalasa.

2.3. Secuestrador.

Su acción secuestrante permite eliminar el exceso de radicales libres, estimulan enzimas como las SOD, GP, GR, Catalasa. Constan de entidades químicas con capacidad secuestradora de radicales libres como Tocoferol (VE), Beta caroteno (BC), Acido ascórbico (VC), Flavonoides.

2.4. Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante monosacárido encontrado en animales y plantas que debe ser suministrado a través de la dieta por cuanto no puede ser sintetizado por los seres humanos. (Villanueva, Condezo, & Ramírez, 2010)

La mayoría de los animales pueden producir este compuesto en sus cuerpos y no lo requieren en sus dietas. En células, es mantenido en su forma reducida por la reacción con el glutatión, que se puede catalizar por la proteína disulfuro isómerasa y las glutarredoxinas.

El ácido ascórbico es un agente reductor y puede reducir y de tal modo neutralizar especies reactivas del oxígeno tal como el peróxido de hidrógeno.

Además de sus efectos antioxidantes directos, el ácido ascórbico es también un sustrato para la enzima antioxidante Ascorbato Peróxidasa, una función que

es particularmente importante en resistencia al estrés en plantas. (Márquez & Vásquez, 2015)

2.5. Glutación.

El glutación es un péptido que contiene cisteína y es encontrado en la mayoría de las formas de vida aerobia. No es requerido en la dieta y es sintetizado en las células desde sus aminoácidos constitutivos. (Martínez, Torres, & Juárez, 2011)

El glutación tiene características antioxidantes ya que el grupo tiol en su porción de cisteína es un agente reductor y puede ser oxidado y ser reducido de forma reversible.

En las células, el glutación es mantenido en forma reducida por la enzima glutación reductasa y alternadamente reduce otros metabolitos y sistemas de enzimas así como reacciona directamente con los oxidantes.

Debido a su alta concentración y a su papel central en mantener el estado redox de la célula, el glutación es uno de los antioxidantes celulares más importantes. (Denzoin, Soraci, & Tapia, 2013)

2.6. Melatonina.

La Melatonina es un poderoso antioxidante que puede cruzar fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefálica. (Acuña *et al.*, 2009)

A diferencia de otros antioxidantes, la melatonina no experimenta un ciclo redox, que es la capacidad de una molécula de experimentar la reducción y la oxidación repetidas veces.

El completar un ciclo redox permite a otros antioxidantes (tales como la vitamina C) actuar como pro-oxidantes y promover la formación de radicales libre.

La melatonina, una vez que es oxidada no se puede reducir a su estado anterior porque forma varios productos finales estables una vez que reacciona con radicales libres. Por lo tanto, se le ha referido como antioxidante terminal (o suicida). (Carretero, 2010)

2.7. Tocoferoles y Tocotrienoles.

La vitamina E es el nombre colectivo para un sistema de ocho tocoferoles y tocotrienoles relacionados, que son vitaminas antioxidantes liposolubles. (National Institutes of Health, 2016)

De éstos, el α -tocoferol ha sido muy estudiado ya que tiene la biodisponibilidad más alta y el cuerpo preferentemente absorbe y metaboliza esta forma. La forma del α -tocoferol es la más importante de los antioxidantes liposolubles y protege las membranas de la célula contra la oxidación reaccionando con los radicales del lípido producidos en la reacción en cadena de peroxidación de lípidos. Esto quita las formas intermedias de radicales libres y evita que la propagación de la reacción en cadena continúe. (Febles, Soto, Saldaña, & García, 2002)

Los radicales oxidados del α -tocoferoxil producidos en este proceso se pueden reciclar de nuevo a la forma reducida activa a través de la reducción por el ascorbato, el retinol o el ubiquinol. (Arancet *et al.*, 2007)

Las funciones de las otras formas de la vitamina E están menos estudiadas, aunque el γ -tocoferol es un nucleófilo que puede reaccionar con

mutágenos electrofílicos y los tocotrienoles puede que tengan un rol especializado en la neuroprotección. (Amazan, 2012)

2.8. Carotenoides.

Los carotenoides están entre los pigmentos naturales más comunes y han sido caracterizados hasta ahora más de 600 compuestos diferentes. Los carotenoides son responsables por muchos de los colores rojos, amarillos y naranja de las hojas, frutas y flores de los vegetales, así como también por el color de algunos insectos, aves, peces y crustáceos. Solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo muchos animales los incorporan a través de la dieta. Dos carotenoides dietarios

importantes son el licopeno y el β -caroteno. (Beltrán, Estévez, Cuadrado, Jiménez, & Begoña, 2012)

2.9. Polifenoles.

Los flavonoides representan el subgrupo más común de los polifenoles y ampliamente distribuido y entre ellos los flavonoles son los más ampliamente distribuidos. Al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, constituyen parte integral de la dieta. Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Su propiedad como antioxidante, proviene de su gran reactividad como donantes de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y de localizar el electrón desapareado (termina la reacción en cadena) y de su habilidad para quelar iones de metales de transición. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante in Vitro, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y

cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. (Omnia Science, 2013)

2.10. Catalasas.

Las catalasas son enzimas que catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando hierro o manganeso como cofactor, el cual es oxidado por una molécula de peróxido de hidrógeno y después regenerado transfiriendo el oxígeno enlazado a una segunda molécula de sustrato. (Díaz, 2003)

Esta proteína se localiza en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariotas. La catalasa es una enzima inusual ya que aunque el peróxido de hidrógeno es su único sustrato, sigue un mecanismo de ping-pong. (García G. , 2009)

A pesar de su evidente importancia en la eliminación del peróxido de hidrógeno, los seres humanos con deficiencia genética de la catalasa, "acatalasemia" o los ratones genéticamente modificados para carecer completamente de catalasa sufren de pocos efectos negativos. (Delgado, 2015)



CAPÍTULO 3

3. Flavonoides y antocianos de la granada

Los jugos comerciales de granada muestran una actividad antioxidante tres veces mayor que el vino tinto. El principal compuesto antioxidante en el jugo de granada son los taninos hidrolizables, pero antocianidinas y derivados del AE contenidos en el jugo, también contribuyen a la capacidad antioxidante total. (Calín & Carbonell, 2016)

3.1. Ácido elágico

El ácido elágico (**AE**), es un elagitanino presente en el metabolismo secundario de los vegetales, su principal característica es su capacidad antimicrobiana, antioxidante, antimutagénica, anticarcinogénica y antiviral. (Ascacio, Aguilera, Rodríguez, & Aguilar, 2013)

Es por ello que se ha estudiado su fuente de obtención y su medio de extracción, ya sea por métodos químicos o biotecnológicos. (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002). Las técnicas biotecnológicas son relevantes, ya que la obtención de ácido elágico se efectúa en algunos casos con desechos y residuos agroindustriales, con la finalidad de que estos sean recursos renovables y con un valor agregado.

El ácido elágico (AE) es una molécula de naturaleza fenólica que puede estar presente en forma libre en algunas especies vegetales como producto del metabolismo de las mismas, o bien puede encontrarse a partir de sus precursores, los elagitaninos (Koponen, Happonen, Mathilla, & Torronen, 2007); su mecanismo de acción es muy complicado. Experimentos in-vivo indican que el AE posee gran actividad contra especies fisiológicas reactivas, por lo tanto representa una forma natural de eliminar radicales libres del cuerpo humano. (Cruz, 2009)

(ROO•, OH•, Cu²⁺ y O₂•⁻)

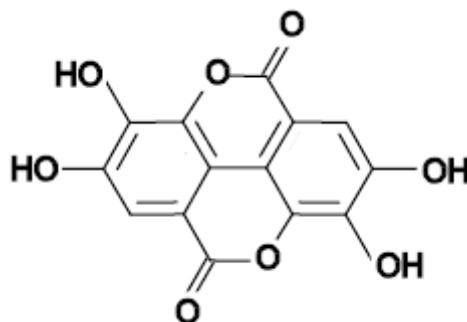


Figura No. 3 Acido Elágico.

Fuente: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ellagic_acid.png.

El subgrupo de los elagitaninos pertenece a un gran grupo de compuestos polifenólicos conocidos como taninos, que también provienen del metabolismo secundario de los vegetales. Los elagitaninos poseen en su estructura un grupo conocido como HHDP (6'6 dicarbonil 3'3, 4'4, 5'5 hexahidroxi difénico o bien, ácido hexahidroxi difénico), el cual es característico de los elagitaninos, y que cuando se encuentran en presencia de ácidos o bases fuertes se hidroliza y se libera el ácido HHDP de los elagitaninos, el cual sufre una reacción de lactonización espontánea que da origen a la molécula conocida como ácido elágico. (Ascacio J. , Aguilera, Rodríguez, & Aguilar, 2013)

El ácido elágico es una molécula muy estable, tiene un punto de fusión de 362°C (Bala y col., 2005), por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos. (Cruz *et al.*, 2010)

En vista de estas propiedades del ácido elágico, se han realizado distintos trabajos de investigación sobre su producción por procesos biotecnológicos. Se ha encontrado que el ácido elágico posee actividad contra agentes nocivos para la salud, como los radicales libres, que son los responsables de procesos como la

oxidación que promueve el envejecimiento de las células del organismo. (Guizar, 2014)

La presencia de radicales libres también representa un riesgo en la formación de distintas formas de cáncer, el ácido elágico se ha reportado como un producto efectivo en contra de estos agentes. (Cruz, 2009)

Las propiedades del ácido elágico también son aprovechadas en la industria de los alimentos, elaborando bebidas nutracéuticas y suplementos alimenticios. Su poder bacteriostático es de gran interés para esta industria, donde es utilizado para aumentar la vida útil de los alimentos perecederos, empleado como un agente inhibidor de microorganismos (Saucedo-Pompa y col., 2009), propiedad algunas veces asociada a la actividad antioxidante que incrementa la vida útil del alimento.

Los elagitaninos y el ácido elágico han sido empleados de manera artesanal en medicina rural, para aliviar enfermedades gastrointestinales, úlceras gástricas, quemaduras e infecciones bucales al ser ingeridos en infusiones de plantas que los contienen.

A partir de estas observaciones, los investigadores han desarrollado técnicas de aislamiento y caracterización de los principios activos de las mismas, descubriendo que los elagitaninos y el ácido elágico son los responsables de estos beneficios para la salud.

Su alta actividad antioxidante los llevó a ser considerados moléculas que pueden prevenir o disminuir enfermedades degenerativas como el cáncer (Ito y col. 1999; Clifford y Scalbert; 2000; Seeram y col. 2005), así como inhibir la replicación de los virus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana y el del papiloma humano (HIV y HPV por sus siglas en inglés) (Ruibal y col., 2003).

La propiedad más importante del ácido elágico es su capacidad para formar complejos con otras moléculas, siendo esta propiedad una de las más aprovechadas en las distintas aplicaciones que se le dan a los elagitaninos.

La propiedad astringente de los elagitaninos y el ácido elágico los ha identificado como ingredientes útiles en la medicina tradicional, así como también en la preparación de alimentos y maduración de frutas.

Bebidas como el té (Carretero, 2002) y el vino tinto a los que les da su propiedad astringente, color y aroma característicos (Doussot y col., 2000).

Tabla No 3. Propiedades del Acido Elágico.

PROPIEDADES DEL ACIDO ELAGICO
1.- Tiene propiedad antibacterial y antiviral. Se encontró su propiedad antiviral muy poderosa (la mayor causa de cáncer cervical es por el virus papillota, que son erradicados con el Ácido Elágico)
2.- Inhibe el crecimiento de células cancerosas. Provoca apoptosis en células cancerígenas, deteniendo su progresión reproductora geométrica, ya que no se reproduce, reinstala el gen p53 que provoca apoptosis.
3.-Promueve la cicatrización.
4.- Controla enfermedades periodontales.
5.- Protege al hígado de materiales tóxicos que dañen el tejido.
6.- Restaura el daño cromosomal producido por radiaciones.
7.- Detiene la expansión de SIDA en el cuerpo humano.
8.- Frena el daño degenerativo de envejecer.
9.- Previene los defectos del sistema nervioso y enfermedades neuro degenerativas.
10.- Restaura las funciones del páncreas en sus secreciones de insulina.

Fuente: Holling Cáncer Investigation University en Carolina del Sur. Dr. Nixon.

3.1.1. Elagitaninos como precursores del ácido Elágico

La característica de los elagitaninos son las unidades HHDP que se acoplan en las posiciones 4-6 o la posición 2-3 de la unidad D-glucopiranososa, y tienen la conformación (S), mientras que el acoplamiento en las posiciones 3-6 conduce únicamente a la formación (R) de las unidades HHDP. Los acoplamientos en 1-6 son raros en la naturaleza (Lei y col., 2002).

Los elagitaninos se pueden clasificar de acuerdo al número de grupos HHDP en la molécula debido a que, los monómeros de elagitaninos pueden ser oxidados en las plantas y formar dímeros, trímeros y tetrámeros, oligómeros y polímeros, con pesos moleculares de 4000 a 20000 Da (Carretero, 2000; Khanbabaei y Van Ree, 2001)

Cuando los elagitaninos son expuestos a ácidos o bases, los enlaces éster son hidrolizados y el grupo HHDP se libera, para tener estabilidad la molécula se lactoniza de manera espontánea, para formar al ácido elágico.

3.1.2. Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido Elágico.

Existen más de 500 diferentes de estructuras de elagitaninos reportadas (Feldman y col., 1999). La principal fuente de obtención de elagitaninos y ácido elágico es la vegetal, principalmente en las hojas, ramas, raíces, tallos, frutos y cortezas, como las del roble y el castaño (Lei, 2001).

Se sabe también que los árboles arbustivos o árboles de bayas son una fuente importante de elagitaninos y ácido elágico, por ejemplo el arándano, la frambuesa

y la granada (Clifford y Scalbert, 2000; Vatter y Shetty 2003; Seeram y col., 2005).

El contenido de elagitaninos se mide con base en la cantidad de ácido elágico presente, después de una hidrólisis. Puesto que las plantas contienen cierta concentración de ácido elágico libre de forma natural, éste debe ser medido antes y después de la hidrólisis; para determinar la cantidad real de elagitaninos presentes se resta el ácido elágico liberado (inicial) al ácido elágico total (final) presente en la planta.

Se debe tener en cuenta que ciertos procesos alimenticios pueden liberar ácido elágico (Clifford y Scalbert, 2000). El ácido elágico es consumido por el hombre de manera común en frutas, semillas y en los alimentos o bebidas elaborados a partir de ellos, como jugos o zumo de frutas, mermeladas, etc. (Clifford y Scalbert, 2000)

3.1.3. Propiedades industriales.

Dentro de la industria de bebidas, los elagitaninos y el ácido elágico se emplean para la clarificación de las bebidas, precipitando sustancias que forman coloides, como carbohidratos de alto peso molecular y proteínas, sobre todo en la industria cervecera. Otra aplicación es la fabricación de cremas y lociones aclaradoras de piel donde el poder antioxidante del ácido elágico es empleado como elagatos para disminuir la generación de melanina.

Otra importante aplicación se desarrolla en la industria de tratamiento de aguas residuales en donde se emplea para la precipitación de metales y la reducción de los mismos.

El ácido elágico ha ganado gran relevancia desde finales de la década del siglo pasado hasta la fecha, debido a su actividad biológica. Como se ha mencionado a la largo del texto, la capacidad de los elagitaninos y sobre todo del

ácido elágico de reaccionar con otras moléculas, confiere poder antioxidante (Ani y col., 2006)

3.1.4. Aplicaciones medicas del ácido elágico

Debido a sus propiedades químicas, el ácido elágico ha sido reportado principalmente por sus efectos fisiológicos positivos, que favorecen la salud de quienes lo consumen. A continuación se hace referencia a las actividades en que se ha encontrado actividad del ácido elágico.

3.1.5 Actividad anti-lipoxidación o disminución de LDL.

La propiedad antioxidante previene la formación de colesterolemias. Se han realizado estudios sobre esta propiedad y se evaluaron los polifenoles totales de nuez, se demostró que el ácido elágico en sinergismo con otros polifenoles reduce los niveles de LDL (Anderson y col., 2001), previniendo riesgos de problemas cardiacos y obstrucción de venas.

3.1.6. Actividad anti-Mutagénica y anti-Carcinogénica.

La reacción coordinada entre el ácido elágico y un típico carcinogénico benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epoxido (BPDE), prueba al ácido elágico como un agente quimioprotector contra tipos de cáncer causados por aromáticos

policíclicos (PAHs) (Huetz y col., 2005), inhibiendo la mutación de células sanas.

El ácido elágico redujo la multiplicidad de tumores en colon de ratón y la incidencia de carcinoma en vejiga de ratón, cuando fue administrado vía oral en la dieta (Kellof y col., 1994)

El ácido elágico es conocido por su acción de modular la activación de carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase 1 del citocromo P450 e induce las enzimas de la fase 2 que están involucradas en la detoxificación carcinogénica. (Hora, Maydew, Lansky, & Dwivedi, 2003)

El ácido elágico a concentraciones entre 1-100 $\mu\text{m/L}$, mostró una fuerte actividad anti-proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata (Losso y col., 2004)

Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, de estómago, esófago, hígado y otros (Ito y col., 1999; Clifford y Scalbert 2000; Seeram y col., ISRN Pharm. Published online 2012December 17.doi: 10.5402/2012/547942Cytotoxic Activities of seed oil *Punica granatum* Extract on Prostate Cell Line by Induction of Apoptosis Koushan Sineh Sepehr, Behzad Baradaran, Immunology Research Center (IRC),University of Medical Sciences Tabriz, 2005)

3.1.7. Actividad anti-Microbiana.

El ácido elágico ha probado ser un potente antimicrobiano, se han realizado trabajos experimentales contra patógenos como *Staphylococcus aureus* en donde no permitió la coagulación del plasma en un tiempo de incubación de 24 h a 37°C, inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Akiyama y col., 2001).

En otro estudio los precursores del ácido elágico (Punicalagina), obtenidos de cáscara de granada (*Punica granatum L.*), mostraron actividad antibacterial contra 18 cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (por sus siglas en inglés MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 61.5 μgmL^{-1} (Machado y col., 2002)

3.1.8. Actividad Antiviral.

El ácido elágico y los elagitaninos son estudiados ampliamente por su capacidad de inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH).

De la planta *Phyllanthus amarus* fueron extraídos y purificados dos elagitaninos, la geranina y la corilagina, ambos capaces de bloquear la interacción de la glucoproteína 120 del VIH-1, en concentraciones inhibitorias de 2.65 a 0.48 µg/mL (extracto agua/alcohol) receptor celular primario CD4. (Martínez, Contreras, & Belares, 2010). La inhibición fue más evidente para la enzima integrasa del VIH-1 (0.48-0.16 µg/mL), la transcriptasa reversa (8.17- 2.53 µg/mL) y proteasa (21.80-6.28 µg/mL) valores para geranina y corilagina respectivamente (Notka y col., 2004).

Esta investigación fue llevada a cabo con voluntarios, la administración fue oral y la potente actividad anti-VIH en sangre fue demostrada, obteniendo una reducción del 5% al 30% de la replicación del VIH.

Este estudio soporta la conclusión de que los elagitaninos tienen un efecto inhibitorio sobre el VIH no sólo in vitro sino in vivo. También la concentración de ácido elágico disminuye la propagación del virus VIH en el cuerpo de personas infectadas (Ruibal y col., 2003)

3.1.9. Actividad Gastroprotectiva

La activación de células pancreáticas es el primer paso en el desarrollo de la fibrosis pancreática, el AE ha demostrado inhibir esta activación (Masamune y col., 2005)

El efecto gastroprotectivo de los extractos de *Quercus suber* y *Quercus coccifera* y algunos taninos, como pedunculagina, castalagina, filliraeoidina A y

acutissimina B, purificados de los extractos, fueron probados en ratones usando el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol. Ambos extractos inhibieron la formación de las úlceras, lo mismo sucede con los taninos purificados utilizados, dentro de los cuales destaca el elagitanino castalgin como el más potente (Khenouf y col., 2003)

3.1.10. Reducción de los niveles de Glucosa.

Algunos precursores del ácido elágico (lagerstroemina, flosina B y reginina A) fueron aislados de una planta filipina (*Lagerstroemia speciosa*), empleada por los nativos para controlar la diabetes mellitus.

Los compuestos aislados incrementaron el transporte de glucosa en adipositos de rata pudiendo reducir los niveles de glucosa en la sangre. Sin embargo, es necesario el estudio detallado de este fenómeno debido a que no está dilucidado el mecanismo de estimulación del transporte de glucosa por estas moléculas (Hayashi y col., 2002)

Otra aplicación del ácido elágico es su capacidad de formar quelatos con metales. (Debenedetti & Wilson, 2014). Aun más el AE en forma de elagato tiene gran aplicación en la industria cosmética para la elaboración de cremas, agua de tocador, perfumes, maquillaje, corrector y otros productos, los cuales tienen un efecto aclarador de la piel. (Lemmel, 2002)

3.2. Propiedades de los Fitonutrientes

Existen una multitud de estudios científicos relacionados con la granada. En las últimas décadas ha experimentado un gran interés su actividad antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria. (González, 2009)

3.2.1. Capacidad antioxidante.

Estudios in vitro han demostrado que el zumo de granada y sus semillas tienen entre 2 y 3 veces más capacidad antioxidante que el vino tinto o el té verde.

Estudios en ratas y ratones, confirman que las propiedades antioxidantes de los extractos de granada muestran una reducción del 19% del estrés oxidativo en los macrófagos peritoneales de los ratones, una reducción del 42% de los peróxidos lipídicos y un incremento del 53% de los niveles de glutatión reducido. (De la Cruz, Rodríguez, Contreras, & Aguilar, 2011)

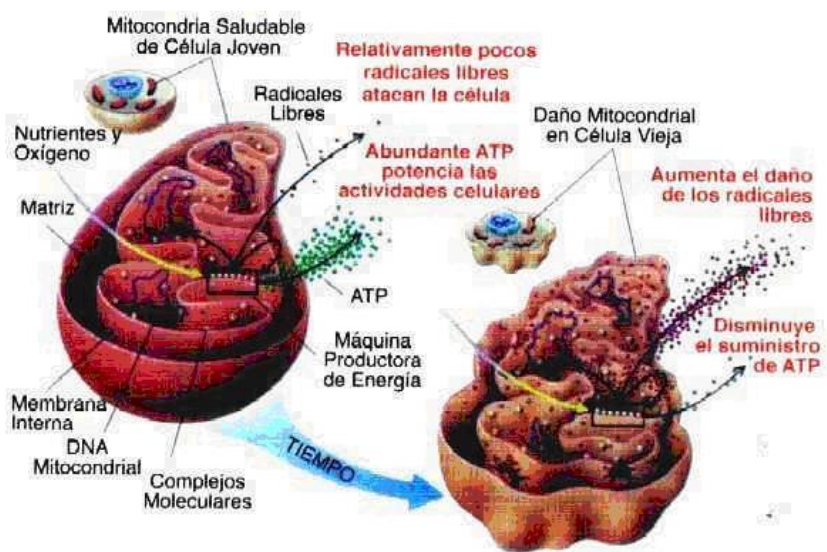


Figura No. 5. Daño celular a nivel de la mitocondria dada por el aumento de los radicales libres con el paso del tiempo

Fuente: Aviram M, Dornifeld L, Inventors. (2003)

Estudios en humanos muestran que el zumo elaborado a partir de la pulpa de la granada, tiene una capacidad antioxidante superior al zumo de otros frutos. A estos sujetos se les dio 250 ml de zumo de granada cada día durante cuatro semanas.

Los niveles de la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo incrementaron de 1,33 mmol a 1,46 mmol en personas que tomaron zumo de granada, mientras que los que tomaron zumo de manzana no hubo un incremento significativo. (Villanueva, Condezo, & Ramírez, 2010)

3.2.2. Capacidad Anticancerígena

Estudios in vitro usaron tres líneas celulares de células cancerígenas prostáticas demostraron que varios extractos de granada (zumo, aceite de semillas y piel) inhibía potencialmente la invasión de células cancerígenas prostáticas, induce a la apoptosis, causa disrupción en el ciclo celular e inhibe el crecimiento tumoral. Este estudio también demostró que las combinaciones de diferentes extractos de la granada son mucho más efectivas que usar un solo extracto. (Peña, Casa, Martínez, & Duménigo, 2014)

En un estudio de fase II realizado con 46 hombres con cáncer de próstata recurrente, 16 de ellos (35%) mostraron un decrecimiento significativo en el antígeno específico para la próstata (PSA) durante el tratamiento con el zumo de granada.

Estos resultados indican que la granada puede influenciar positivamente en la evolución del cáncer prostático gracias a sus efectos antiproliferativos, apoptóticos, antioxidantes y posible acción antiinflamatoria. (David Herber M.D PhD. F.A.C.P, F.A.C.N. Dietary Fat, Lipids, Hormones and Tumorigenesis, and Nutritional Oncology. University of California. 2006). Los ácidos linoléicos conjugados encontrados en las semillas de las plantas ejercen bioactividades, α -linolenic acid, cis 9, cis 12, cis 15–18:3 n-3) Yuan, Gao-Feng, 2014. Las actividades citotóxicas del aceite de la semilla de púnica granatum en las líneas celulares prostáticas por inducción de apoptosis Sineh Sepehr, Behzad Baradaran,

2012 Los altos niveles de ácidos linoléicos conjugados contenidos en la semillas de granada, tienen actividades anticancerígenas. También inducen a la apoptosis en coriocarcinoma de células JEG-3. (García & Pérez, 2004)

3.2.3. Capacidad Antinflamatoria.

El aceite prensado en frío de las semillas de la granada ha demostrado in vitro que inhibe los enzimas Lipoxigenasa y ciclooxygenasa. La ciclooxygenasa es un enzima que convierte el ácido Araquidónico en prostaglandinas, que son mediadoras de la inflamación. (Calín & Carbonell, 2016). La Lipoxigenasa cataliza la conversión del ácido Araquidónico en Leucotrienos, que también son mediadores proinflamatorios.

3.2.4. Capacidad anti aterosclerótica.

En las primeras etapas de la aterosclerosis, la concentración elevada de colesterol en el plasma, el incremento del estrés oxidativo y el incremento del colesterol esterificado, son factores que contribuyen a la formación de la placa de ateroma. (García & Pérez, 2004)

Estudios in vitro con animales y humanos, se ha obtenido resultados positivos con varios constituyentes de la granada en la prevención y atenuación de la aterosclerosis.

El zumo de la granada, rico en polifenoles antioxidantes y ácido gálico, ayudan a minimizar las lesiones ateroscleróticas, a controlar los niveles de lípidos y azúcar en sangre. (Betanzos, Izquierdo, & Álvarez, 2015)

La granada, al ser un alimento de origen vegetal, no contiene colesterol. Su alto contenido en potasio, a diferencia de otras frutas y su bajo contenido en sodio, hace que sea un alimento óptimo para las personas que tienen hipertensión. Esta proporción entre los dos minerales más la alta proporción de agua hace que sea un alimento con ligero efecto drenante y diurético. (García & Pérez, 2004)

3.2.5. Otros mecanismos.

Se han estudiado sus efectos en otras patologías como es la diabetes mellitus tipo II, VIH y la acción bactericida y fúngica. (Ramírez, 2013)



CAPÍTULO 4

4. Determinación de la capacidad antioxidante en la granada por el método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (dpph)

4.1. Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH)

DPPH es una abreviatura común para el compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Es un polvo cristalino de color oscuro, compuesto de moléculas estables de radicales libres. (Guija, Inocente, Ponce, & Zarzosa, 2015)

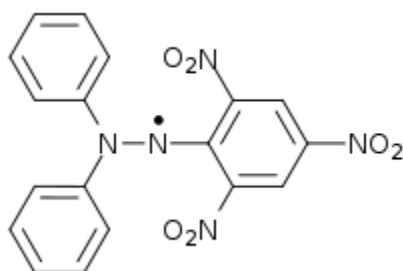


Figura No. 6. 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

Fuente: DPPH antioxidant assay revisited. Om P. Sharma and Tej K. Bhat, Food Chemistry, Volume 113, Issue 4, 15 April 2009, Pages 1202–1205.

4.2. Propiedades y aplicaciones.

DPPH tiene varias formas cristalinas que se diferencian por la simetría de celosía y punto de fusión (pf). El polvo comercial es una mezcla de fases, que funde a $130 \sim ^\circ \text{C}$. DPPH-I (pf 106°C) es ortorrómbica, DPPH-II (pf 137°C) es amorfo y es DPPH-III (pf $128\text{-}129^\circ \text{C}$) triclínico.

DPPH es un radical bien conocido y una trampa ("captador") para otros radicales. Por lo tanto, la reducción de velocidad de una reacción química después de la adición de DPPH se utiliza como un indicador de la naturaleza radical de esa reacción.

Debido a una banda de absorción fuerte centrada en alrededor de 520 nm, el radical DPPH tiene un color violeta intenso en solución, y se vuelve incoloro o ligeramente amarillo cuando se neutraliza.

Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (Ensayo DPPH) Este método se basa en la reducción del radical DPPH $\cdot$ por los antioxidantes de la muestra. (Monreal, Sánchez, & Martínez, 2012)

El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes.

En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método [Prior et al., 2005]. En general la reacción puede medirse a los 2, 3, 4, 5 y 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo se espera que la mayoría de sustancias completen la reacción con el DPPH, y posteriormente en intervalos de 5 minutos hasta que las variaciones de absorbancia esté en torno 0.003/minuto, lo cual indicaría que la reacción se ha completado (KusKoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Feett, 2005)

El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que para su cuantificación no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. En este ensayo no es necesario preparar radical previamente puesto que el DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol.

Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total. Es adecuado para medir la actividad antioxidante en

alimentos y extractos vegetales. No obstante algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al del DPPH, como es el caso de los carotenoides (Karre *et al.*,2013).

La evaluación de la actividad antioxidante de la granada se realizó mediante el método de captura de radicales libres utilizando el (DPPH).

Con el objetivo de determinar las condiciones físicas, químicas y termodinámicas del ensayo fotométrico utilizando los extractos metanólicos de la semilla, pulpa y pericardio de la granada.

Los resultados fueron leídos a una longitud de onda, a un tiempo de reacción y a una temperatura de reacción determinados; adicionalmente, se indica la baja estabilidad de las soluciones del radical libre usado.

4.3. Materiales, reactivos y equipos utilizados.

4.3.1. Reactivos.

Es el conjunto de solventes y estándares empleados en el desarrollo experimental son el grado analítico. Metanol y Etanol. El radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo.

4.3.2. Materiales y equipos

4.4. Ensayo DPPH

4.4.1. Materiales.

- Matraces 10 ml

- Pipetas 1ml, 5ml, 3 ml y micro pipetas
- Cubetos de plástico y cuarzo.

4.4.2. Equipos.

- Espectrofotómetro GENESIS 10

4.4.3. Reactivos.

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (radical DPPH), Sigma Aldrich
- Metanol p.a.

4.5. Método de preparación del reactivo DPPH

1. **Solución madre.-** Disolver 24 mg de DPPH en una fiola volumétrica de 100 ml. En metanol, esta solución obtenida es la solución madre; la cual se debe cubrir con papel aluminio y se guarda en refrigeración, su uso no debe extenderse por más de una semana.
2. **Solución de trabajo.-** De la solución madre una vez atemperado a temperatura ambiente, extraer 10 ml e incorporar 45 ml de metanol; deberá controlarse la absorbancia a 517 nm (llevando el espectrofotómetro a cero con metanol), y esta no debe estar de alrededor de $1,1 \pm 0,02$, esta solución debe taparse y cubrirse con papel de aluminio.(Brand et., 1995)

4.6. Ensayo DPPH (Band-Williams et al.)

a)

1. Colocar 5 g. de muestra y añadir uno de los siguientes solventes.
Metanol (25ml) → solo para fenoles

2. Mezclar hasta una consistencia uniforme por 15 minutos. Si el ensayo es para extractos hidrofílicos (fenoles), almacenar por 12-14 horas a 3-4 ° C (refrigerado). Si el ensayo es para extractos lipofílicos (carotenoides), entonces saltarse este paso y continuar con el siguiente.
3. Antes de tomar una alícuota para el análisis, centrifugar el homogenizado por 20 minutos a 15000 rpm.
4. Separar el sobrenadante en un tubo Eppendorf para la medida de la actividad antioxidante. Guardar la fase orgánica (para carotenoides) y
5. luego guardar ambos tubos cubiertos con papel de aluminio para su posterior análisis.
6. El sobrenadante puede guardarse a -20 ° C para análisis posteriores.
7. Llevar el espectrofotómetro a cero con metanol.
8. Asegurar la absorbancia inicial a 517 nm de la solución diluida de DPPH que es alrededor de $1,1 \pm 0,02$.
9. Con una micro pipeta añadir una alícuota de 150 μ L de la muestra (puede ser acuoso o fase orgánica) con 2850 μ L de la solución diluida de DPPH dentro de un vial de plástico limpio, correr un blanco con 150 μ L del solvente puro (de acuerdo a la solución de extracción) hasta obtener un factor de corrección (debido a la solución).
10. Dejar que la muestra y el DPPH reaccione en un agitador en la oscuridad y cerrar los viales. La temperatura ambiente debe ser 20° C.
11. En diferentes intervalos de tiempo (15 minutos) transferir la solución a una cubeta de vidrio limpio. Golpear la cubeta hasta eliminar las burbujas y tomar la lectura del espectrofotómetro a 517 nm.
12. Repetir las lecturas a través del tiempo hasta que se observe que no hay cambios significativos en la absorbancia. El punto final de la absorbancia es usado para calcular la actividad antioxidante.
13. Si la lectura de la absorbancia es por debajo de 0.1 diluir el extracto de la muestra a un factor conveniente y repetir el ensayo.

b)

1. Pesar 25.6mg de radical DPPH y diluir hasta los 100mL con metanol y posteriormente diluirla 1:10 con metanol.
2. Añadir una proporción de 1:10 de muestra (en el caso del blanco metanol).
3. Añadir una proporción de 9:10 de la dilución 1:10 de DPPH y agitar.
4. Realizar una lectura a 515 nm (lectura a t=0)
5. Al cabo de 1 hora, realizar una segunda lectura a 515 nm (lectura a t=60)

El resultado se obtiene como:

$$\% \text{ perdida absorbancia} = \left[\frac{(abs_0 - abs_{60})}{abs_0} - \frac{(abs_{B0} - abs_{B60})}{abs_{B0}} \right] * 100 \quad \text{Don de:}$$

Abs_x = absorbancia en **t = x**

Abs_{Bx} = absorbancia del blanco en **t = x**

Se utilizó un espectrofotómetro y celdas de vidrio. Además de pipetas de volumen variable de 100 – 1000 ul eppendorf research serie 2100, sometida periódicamente a procesos de calibración. El control de tiempos se efectuó con cronómetros y el control de temperatura con baño termostático.

4.7. Procedimiento.

Se introduce en la cubeta del espectrofotómetro 2 ml de la disolución de DPPH 0.1 Mm en metanol. Se le añade 0.05 ml del extracto de la granada obtenido previamente y se va leyendo la absorbancia a 517 nm, para determinar la concentración del radical. Si la disminución de la absorbancia es muy rápida, se realizara una dilución apropiada del extracto. Se determina el tiempo en que la concentración de DPPH se reduce a la mitad y el porcentaje de inhibición a los 30 minutos

4.7.1 Preparación de los Reactivos

Los fenoles totales se determinan mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando el ácido gálico como material de referencia.

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, se colocaron en un matraz aforado de 25 ml y

se llevaron a volumen con agua destilada, enseguida se preparó una dilución 1:10 con agua destilada (siempre se utiliza una solución recién preparada).

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20 % pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, Por otro lado se preparó una disolución 1N del reactivo de Folin Ciocalteu, el reactivo se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l y 5 mg/l para la preparación de la curva de calibración.

Esto se realizó tomando respectivamente 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL y 100 µL de la disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L en viales ámbar de 3 ml, luego se adicionó a cada vial, 250 µL de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se agitó durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente se adicionaron 250 µL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada vial, se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada y se dejó reposar por 2 h.

También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Finalmente se leyó la absorbancia a 517 nm en el espectrómetro GENESYS 10.

El contenido de fenoles de cada extracto es expresado en mg/g de peso seco de la planta, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término “Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada”.

4.7.2. Cálculos y resultados

Datos experimentales:

- **Extracto Granada: 17/07/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.01 1ml

% inhibición = 90,9

GRANADA 17/07/2012 1/100-0,5

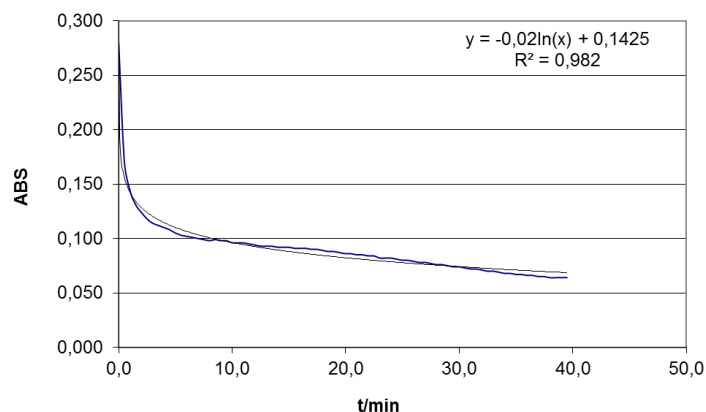


Gráfico No. 1: Ensayo No. 1

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto de Granada: 27/07/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.05 ml

% inhibición = 39,17

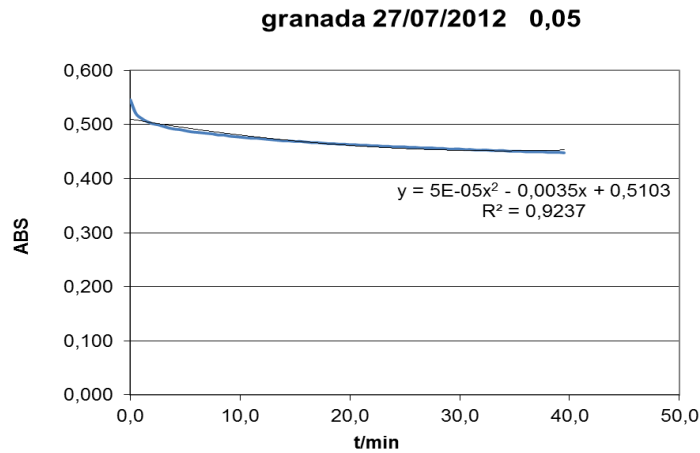


Gráfico No. 2: Ensayo No. 2

Fuente: Elaboración propia

- Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.05 ml

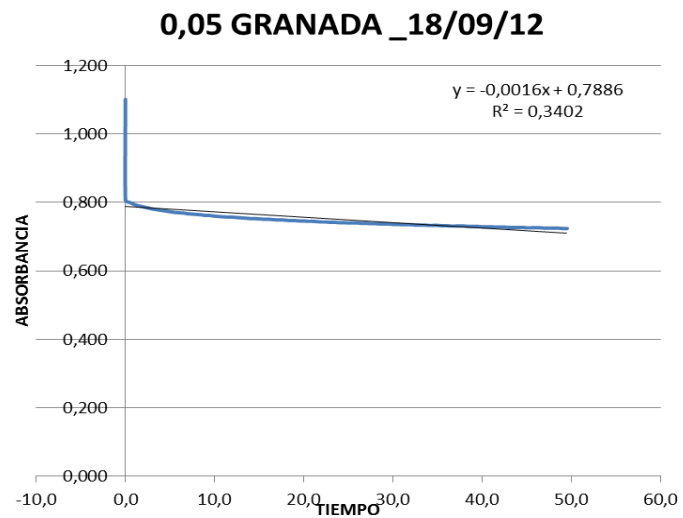


Gráfico No. 3: Ensayo No. 3.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.05 ml

% inhibición = 89,0

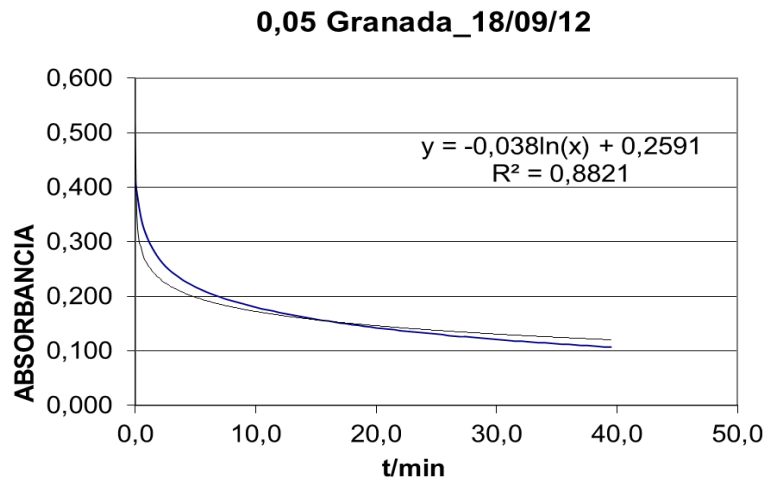


Gráfico No. 4: Ensayo No. 4.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.05 ml

% inhibición = 90.46

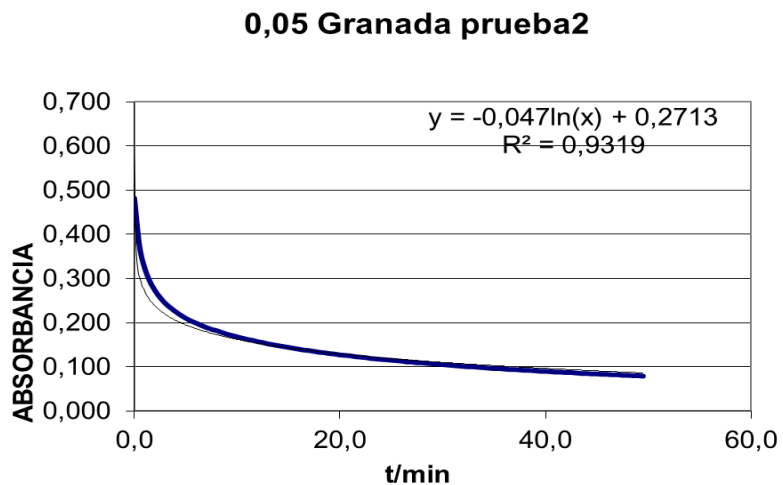


Gráfico No. 5: Ensayo No. 5.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.06 ml

% inhibición = 91.64

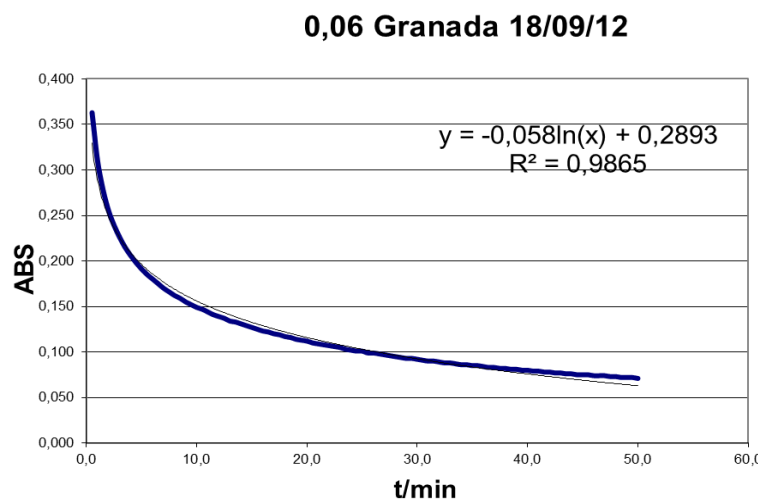


Gráfico No. 6: Ensayo No. 6.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.08 ml

% inhibición = 95.37

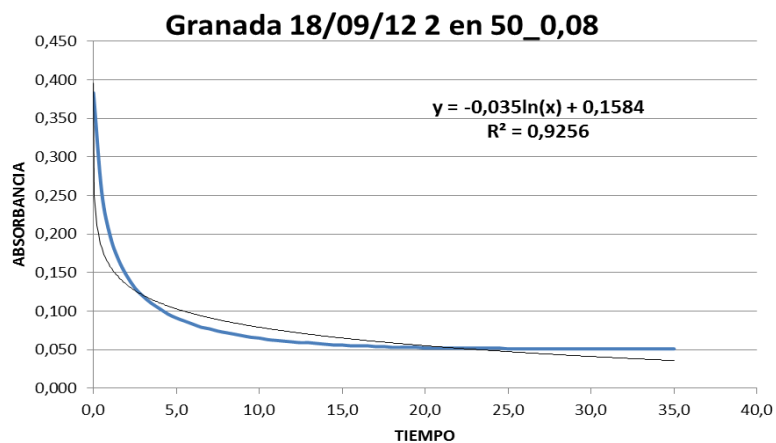


Gráfico No. 7: Ensayo No. 7.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.09 ml

Estabilizo antes de los 30 minutos por lo cual no se pudo obtener el % de inhibición.

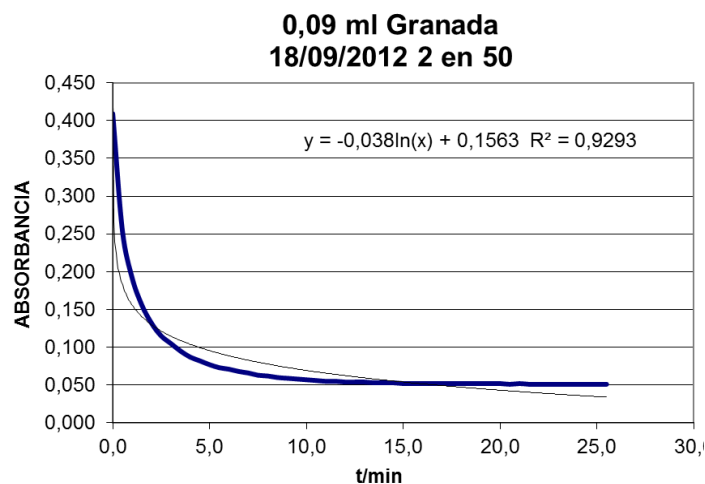


Gráfico No. 8: Ensayo No. 8.

Fuente: Elaboración propia

- **Extracto Granada: 18/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.07 ml

% inhibición = 91.53

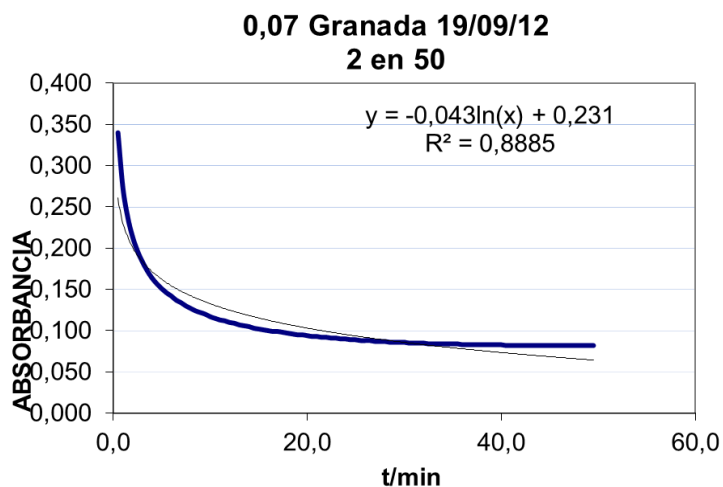


Gráfico No. 9: Ensayo No. 9.

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 19/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.1 ml

% inhibición = 49.95

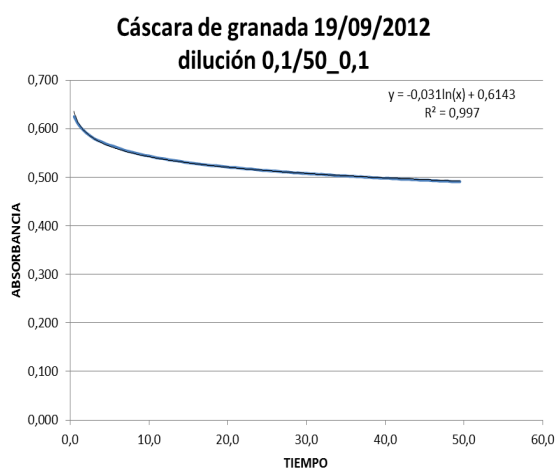


Gráfico No. 10: Ensayo No. 10.

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 19/09/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.2 ml

% inhibición = 47.88

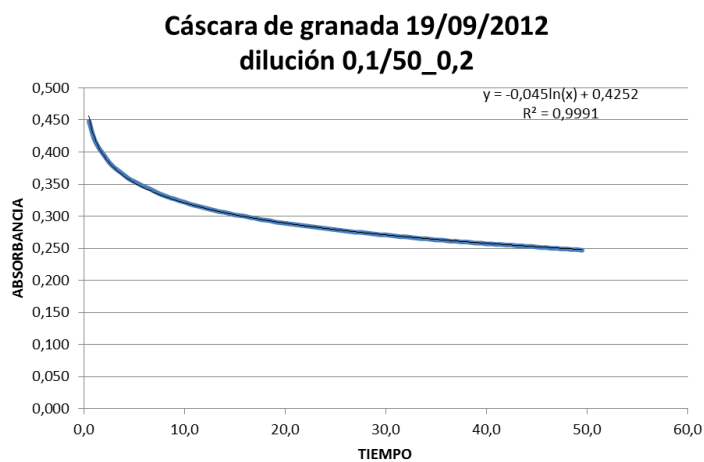


Gráfico No. 11: Ensayo No. 11.

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 19/09/2012**
Cantidad de extracto usado: 0.07 ml
% inhibición = 37.24

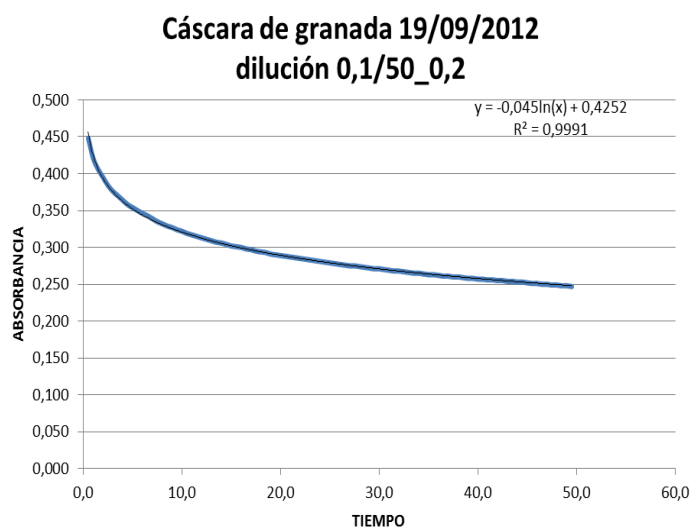


Gráfico No. 12. Ensayo No. 12.

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 10/10/2012**
Cantidad de extracto usado: 0.09 ml
% inhibición = 80.22

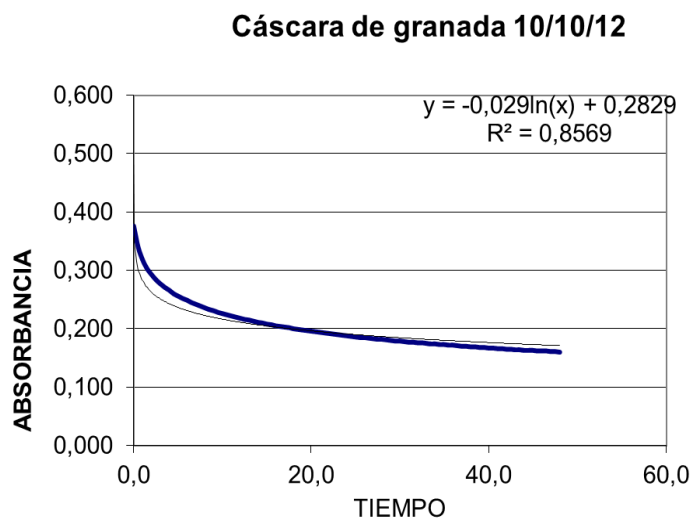


Gráfico No. 13: Ensayo No. 13.

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 10/10/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.04 ml

% inhibición = 84.23

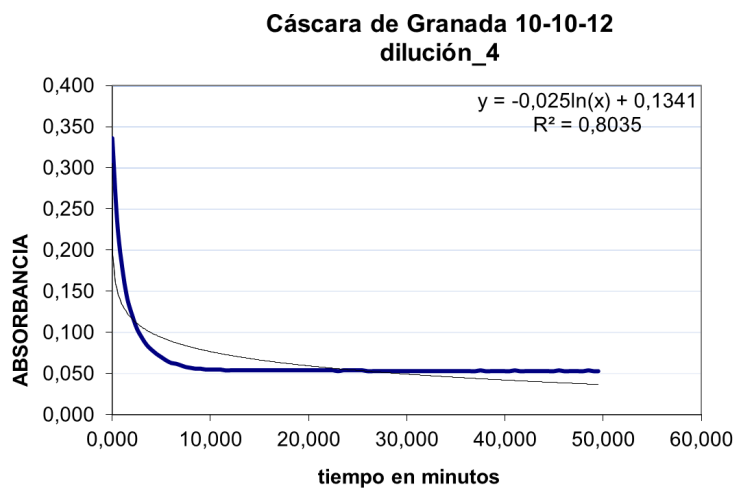


Gráfico No. 14. Ensayo No. 14

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 10/10/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.03 ml

% inhibición = 94.70

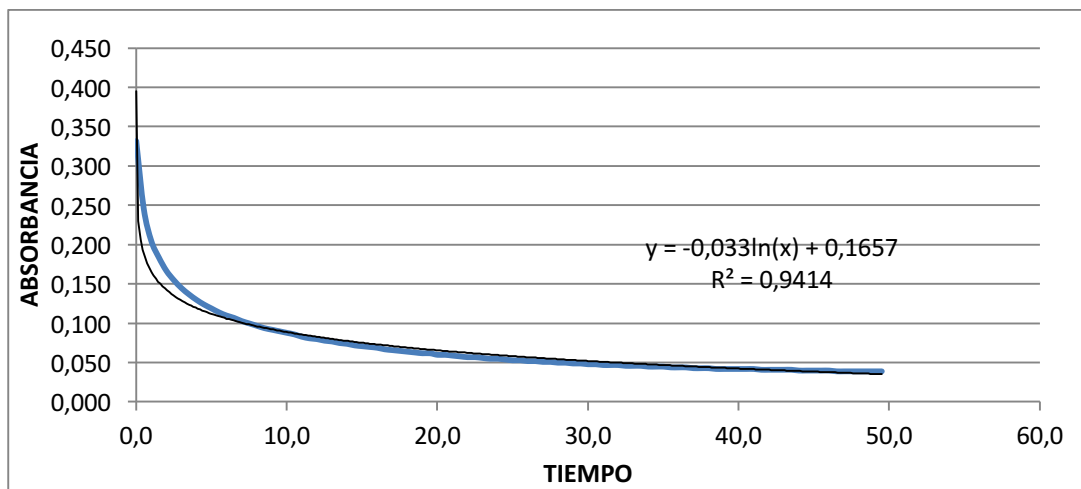


Gráfico No. 15: Ensayo No. 15

Fuente: Elaboración propia

- **Cáscara de granada: 10/10/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.02 ml

% inhibición = 57.13

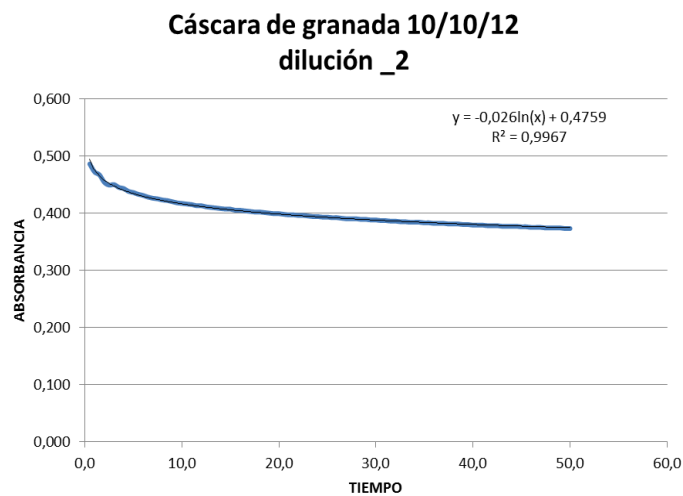


Gráfico No. 16: Ensayo No. 16

Fuente: Elaboración propia

- **Semilla de granada: 11/10/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.05 ml

% inhibición = 89.64

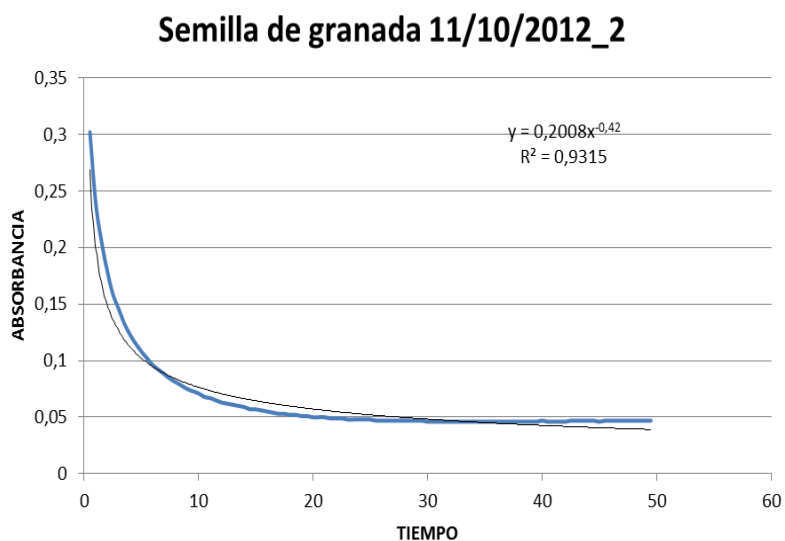


Gráfico No. 17. Ensayo No. 17

Fuente: Elaboración propia

- **Semilla de granada: 11/10/2012**

Cantidad de extracto usado: 0.06 ml

% inhibición = 84.36

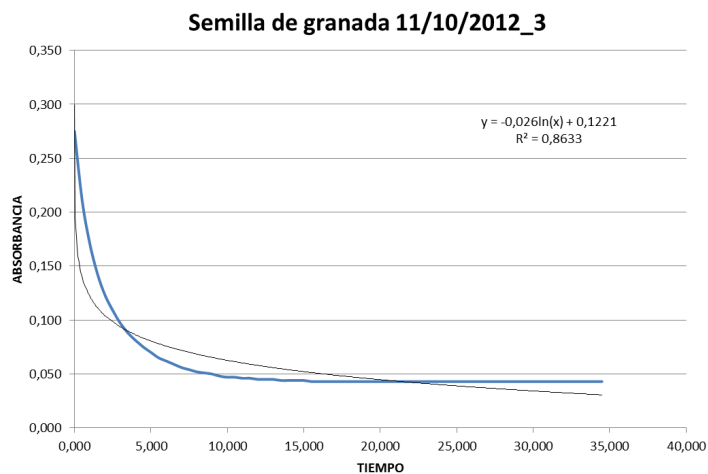


Gráfico No. 18. Ensayo No. 18

Fuente: Elaboración propia

- **Semilla de granada: 15/10/2012**
 Cantidad de extracto usado: 0.07 ml
 % inhibición = 48.15

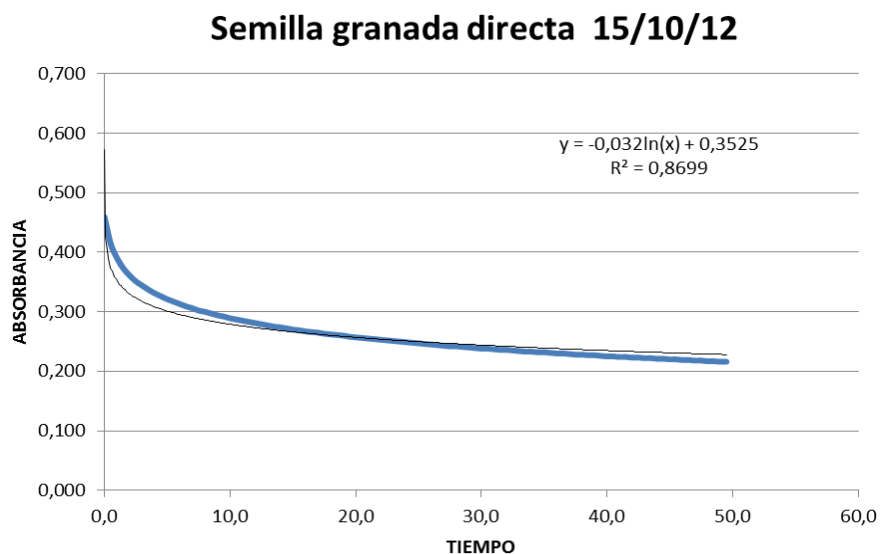


Gráfico No. 19: Ensayo No. 19

Fuente: Elaboración propia

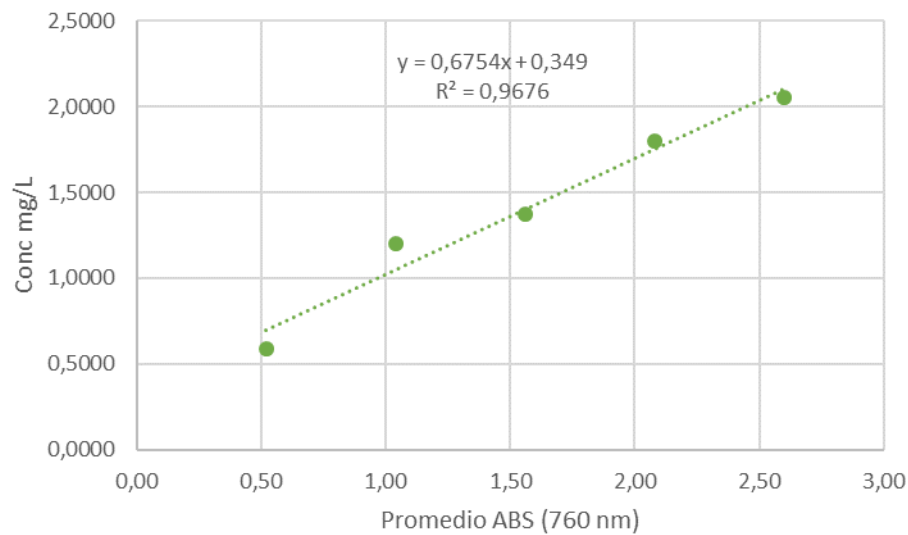


Gráfico No. 20: Curva de calibración ácido gálico (folin)

Fuente: Elaboración propia

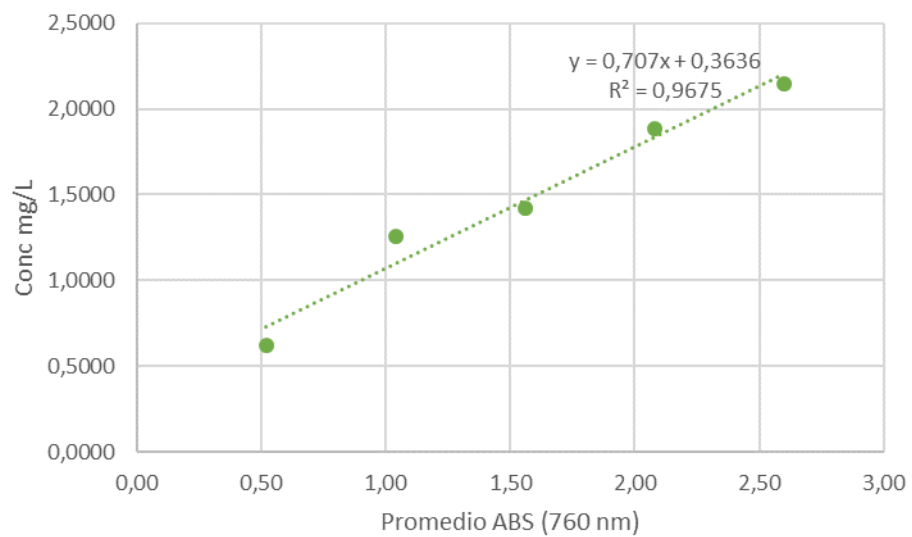


Grafico No. 21: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 1 27/10/2012

Fuente: Elaboración propia

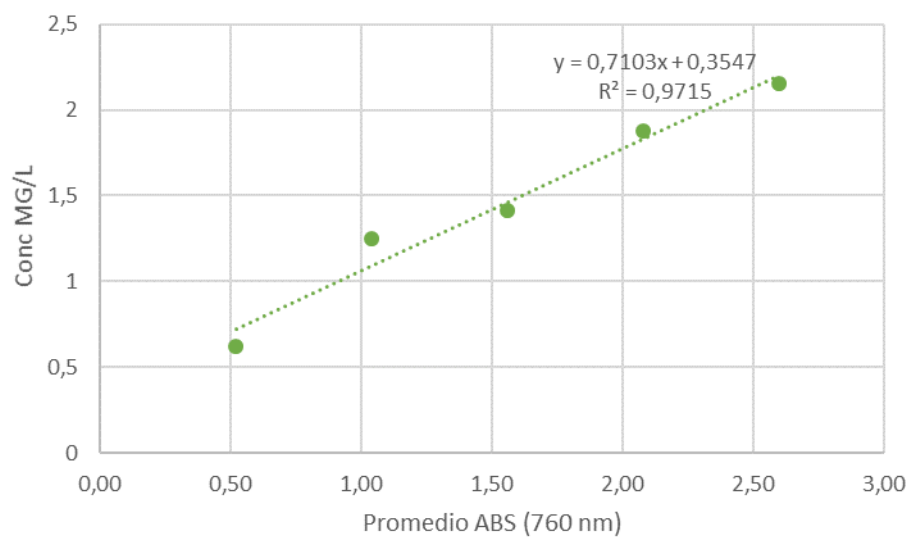


Gráfico No. 22: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 2 27/10/2012

Fuente: Elaboración propia

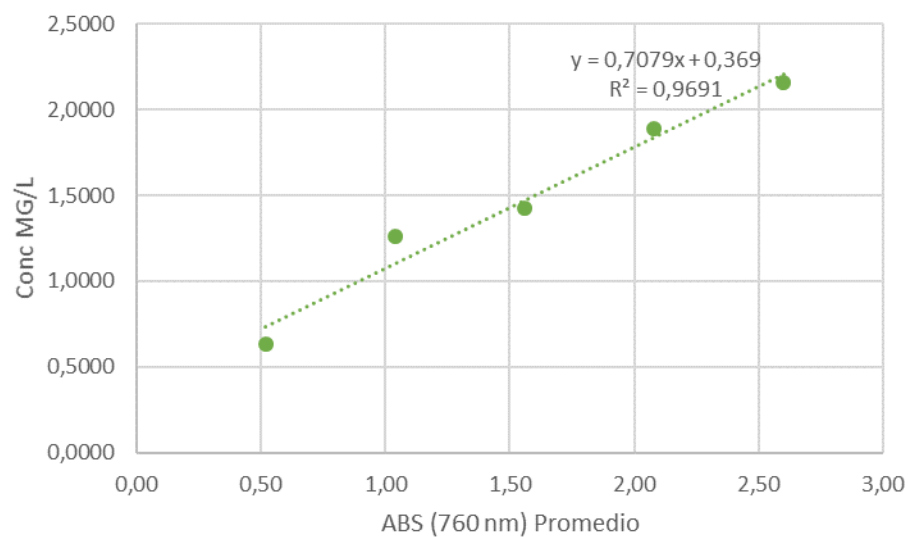


Gráfico No. 23: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 3 27/10/2012

Fuente: Elaboración propia

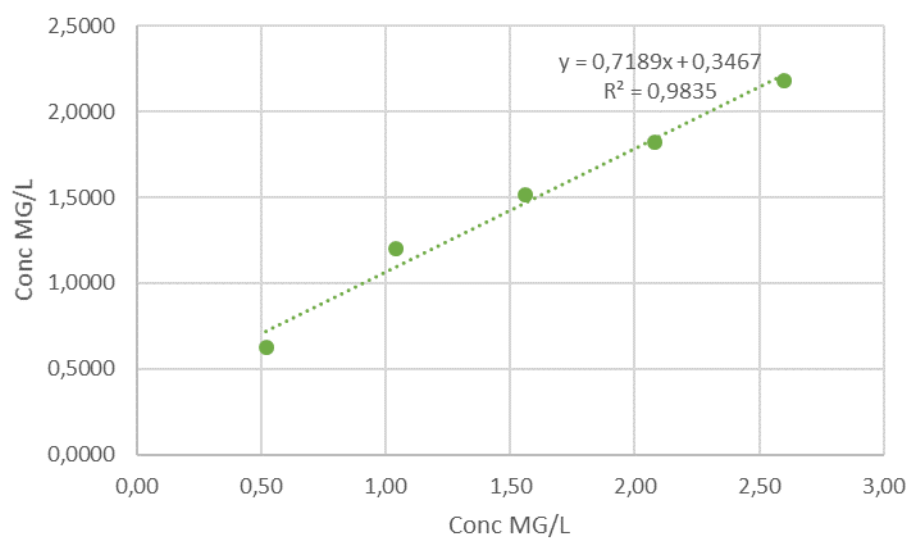


Gráfico No. 24: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 4 27/10/2012

Fuente: Elaboración propia

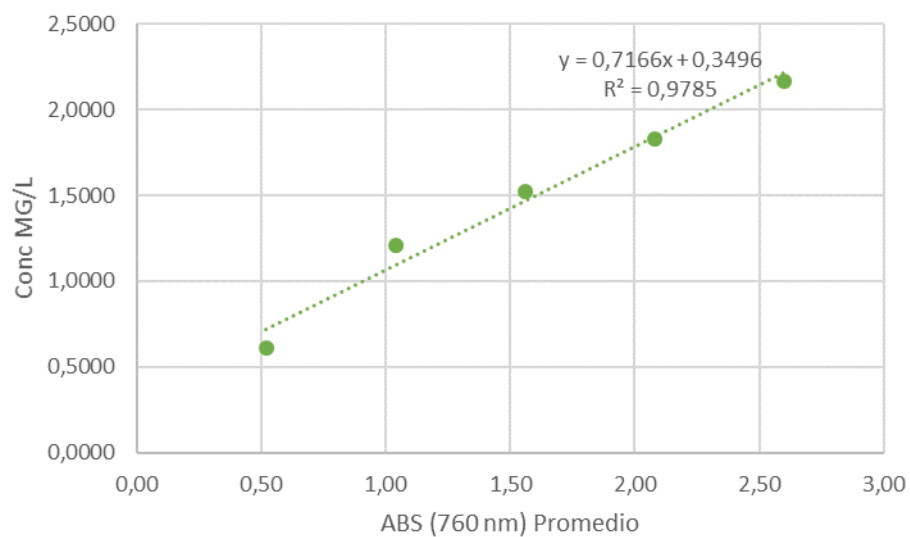


Gráfico No. 25: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 1 28/10/2012

Fuente: Elaboración propia

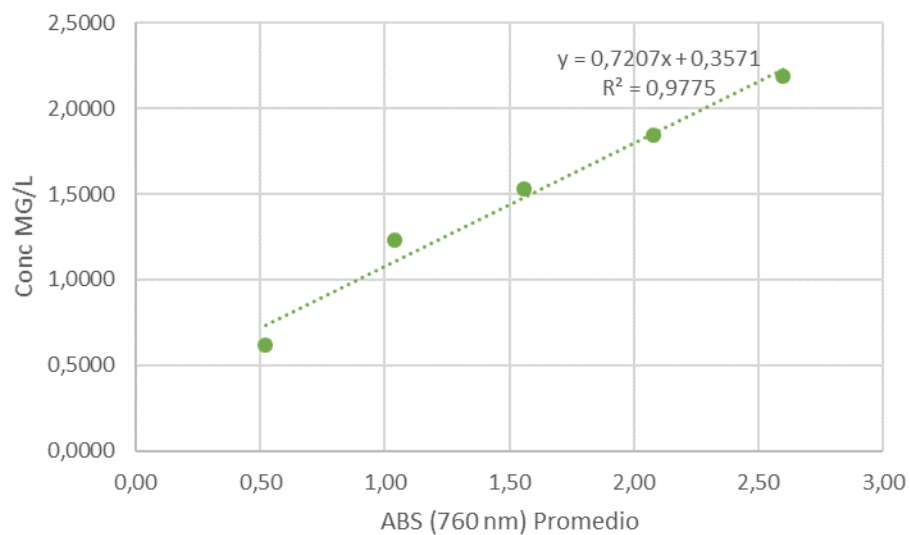


Gráfico No. 26: Curva de calibración ácido gálico (folin). Prueba 2 28/10/2012

Fuente: Elaboración propia

Tabla No 5: Cálculo de la eficiencia antioxidante (AOE) a 30 segundos.

Tipo	muestra	cantidad utilizada	Conc.	Abs 30s	% inhibición
Extracto	17/7/2012	0,01	0,002	0,171	90,9
Extracto	27/7/2012	0,05	0,01	0,521	39,17
Extracto	18/9/2012	0,05	0,01	0,8	33,1
Extracto	18/9/2012	0,05	0,01	0,341	89
Extracto	18/9/2012	0,05	0,01	0,373	90,46
Extracto	18/9/2012	0,06	0,012	0,363	91,64
Extracto	18/9/2012	0,08	0,016	0,254	95,37
Extracto	18/9/2012	0,09	0,018	0,254	Se estabilizó antes de los 30'
Extracto	18/9/2012	0,07	0,014	0,34	91,53
Cascara	19/9/2012	0,1	0,02	0,625	49,95
Cascara	19/9/2012	0,2	0,04	0,448	47,88
Cascara	19/9/2012	0,07	0,014	0,716	37,24
Cascara	10/10/2012	0,09	0,018	0,34	80,22
Cascara	10/10/2012	0,04	0,008	0,235	84,23
Cascara	10/10/2012	0,03	0,006	0,246	94,7
Cascara	10/10/2012	0,02	0,004	0,486	57,13
Semilla	11/10/2012	0,05	0,01	0,302	89,64
Semilla	11/10/2012	0,06	0,012	0,211	84,36
Semilla	15/10/2012	0,07	0,014	0,414	48,15

Fuente: Elaboración propia

Tabla No 6: Cálculo de la eficiencia antioxidante (AOE) a 30 segundos del Extracto de Granada.

Tipo	muestra	cantidad utilizada	Concentración .	Abs 30s	% inhibición
Extracto	41107	0,01	0,002	0,171	90,90
Extracto media de 0,010	41170	0,05	0,010	0,357	89,73
Extracto	41170	0,06	0,012	0,363	91,64
Extracto	41170	0,07	0,014	0,340	91,53
Extracto	41170	0,08	0,016	0,254	95,37
Extracto	41170	0,09	0,018	0,254	Se estabilizó antes de los 30'

Fuente: Elaboración propia

Extrapolación para el Extracto de Granada. 18/09/12

$A_0 = 0,6253$

$B = -51,89$

$e = 2,718281828$

$Y = 0,230035015$

$X = 0,019271536$
 $m = -11,93651691$
 $Cte. = 0,460070029$

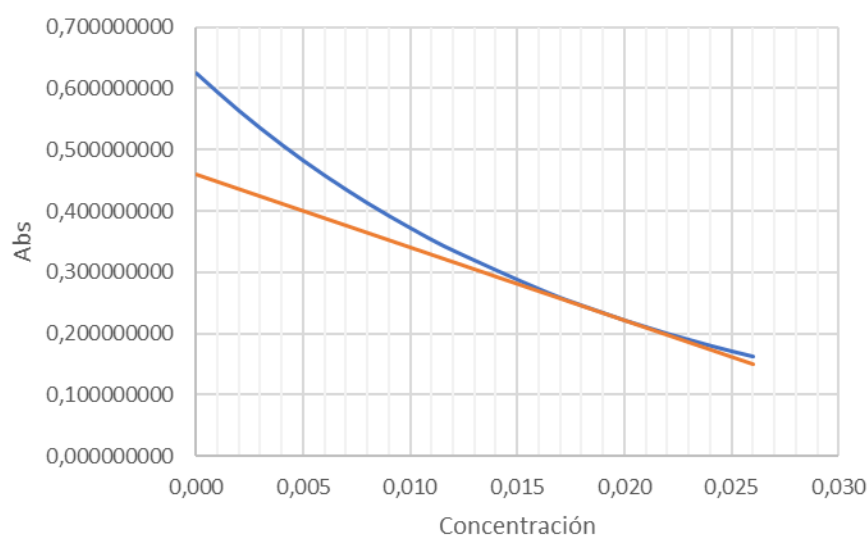


Gráfico No. 27: Extracto de granada. Curva AOE y línea tangente.

Fuente: Elaboración propia

Conclusión parcial. Se observa que la mejor eficiencia antioxidante en el Extracto de Granada fue con la concentración de 0,018, teniendo la Absorbancia un valor de 0,245724634, demostrado con la ecuación de la tangente a su curva.

Tabla No 7: Cálculo de la eficiencia antioxidante (AOE) a 30 segundos de la cáscara de granada.

Tipo	muestra	cantidad utilizada	Concentración .	Abs 30s	% inhibición
Cascara	41171	0,1	0,02	0,625	49,95
Cascara	41171	0,2	0,04	0,448	47,88
Cascara	41171	0,07	0,014	0,716	37,24
Cascara	41192	0,09	0,018	0,34	80,22
Cascara	41192	0,04	0,008	0,235	84,23
Cascara	41192	0,03	0,006	0,246	94,7
Cascara	41192	0,02	0,004	0,486	57,13

Fuente: Elaboración propia

Extrapolación para la cáscara de granada. 19/09/12

$A_0 = 0,9053$

$B = -17,69$

$e = 2,718281828$

$Y = 0,333041258$

$X = 0,056529112$

$m = -5,891499857$

$Cte. = 0,666082516$

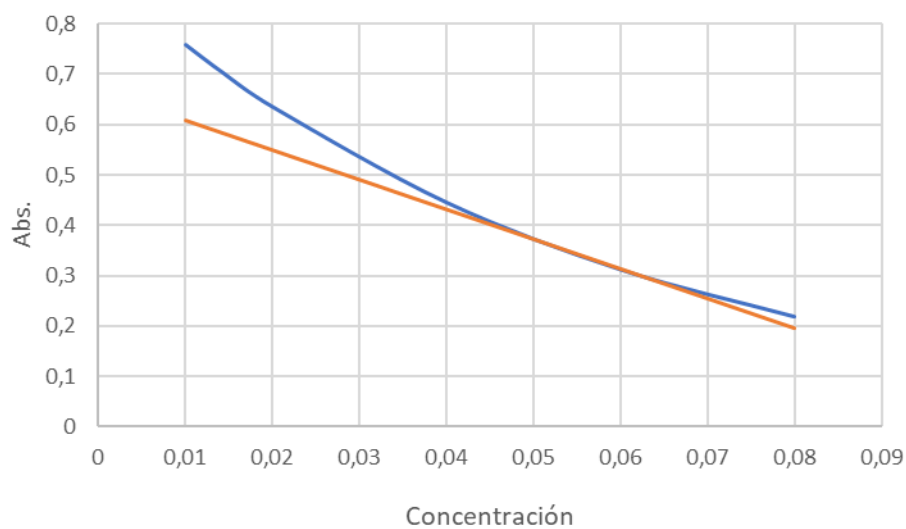


Gráfico No. 28: Cáscara de granada. Curva AOE y línea tangente.

Fuente: Elaboración propia

Conclusión. Se observa que la mejor eficiencia antioxidante se obtuvo con la concentración de 0,06 dando una Absorbancia de 0,313207647, demostrado con el cálculo de la ecuación de la tangente.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Las muestras del extracto, cáscara y semillas de granada al reaccionar frente al reactivo diphenyl picryl hydrazide lo decoloraron casi de inmediato demostrando la capacidad antioxidante de todos ellos como se demuestra en los gráficos.
- El extracto de la fruta posee mayor cantidad de antioxidantes, por lo que se tuvo que realizar mayor cantidad de ensayos, mientras que la cáscara le sigue en importancia y por último la semilla.
- La estabilización de las reacciones determina el porcentaje de inhibición ya que los gráficos con una curva y línea de estabilización mejor formada dan porcentaje de inhibición más alto.
- Al realizar la determinación para obtener los gráficos estabilizados se recomienda el uso de pequeñas cantidades de extracto y tomar notas de cada valor para realizar las correcciones adecuadas durante la experimentación.

5.2. Recomendaciones

- Incentivar la siembra de *Punica granatum* en el sector de la costa ecuatoriana.
- Realizar en plantas pilotos de la Facultad de Ing. Química la extracción de los principios activos de las diferentes partes de la planta como el ácido punícico a partir de la semilla además Informar acerca de las propiedades y beneficios de los fotoquímicos de la granada mediante la elaboración de una bebida antioxidante de consumo masivo.

6. Bibliografía

1. Acuña, D., Escames, G., López, L., Ortiz, F., López, A., & García, J. (2009). *viguera.com*. Obtenido de Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos: http://www.viguera.com/sepg/pdf/revista/0101/0101_03_21.pdf
2. Aranceta, J., Foz, M., Gil, B., Jover, E., Mantilla, T., Millan, J., . . . Moreno, B. (2007). *Dieta y riesgo vascular: Estudio Dorica II*. (Aranceta, Ed.) Buenos Aires, Argentina.
3. Ascacio, J., Aguilera, A., Rodríguez, R., & Aguilar, C. (2013). *redalyc.org*. Obtenido de Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano: <http://www.redalyc.org/html/579/57929952006/index.html>
4. Ascacio, J., Aguilera, J., Rodríguez, J., & Aguilar, C. (Junio de 2013). *scielo.org.mx*. Obtenido de Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200006
5. Aurbach, Rakus, Bauer, Gerner, & Ullmann. (19 de Abril de 2012). www.ncbi.nlm.nih.gov. Recuperado el 24 de Julio de 2017, de [www.ncbi.nlm.nih.gov: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240636](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240636)
6. Author Qian, W. H. (Volume 89 Oct, 2011). *Induction of apoptosis and inhibition of invasion in choriocarcinoma JEG-3 cells Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*.
7. Avalos, F., & Zapata, I. (Marzo de 2013). *researchgate.net*. Obtenido de Aspectos fundamentales de los elagitaninos de granada (*Punica granatum* L.): https://www.researchgate.net/publication/235953285_Aspectos_fundamentales_de_los_elagitaninos_de_granada_Punica_granatum_L
8. Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). *scielo.cl*. Obtenido de Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010
9. Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., & Begoña, O. (2012). *nutricionhospitalaria.com*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [nutricionhospitalaria.com: http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5886.pdf](http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5886.pdf)
10. Cabiscol, E. (Junio de 2014). *sebbm.es*. Obtenido de <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/343-oxidacion-celular-y-envejecimiento-radicales-libres-doctor-jekyll-y-mister-hyde>
11. Calín, Á., & Carbonell, Á. (2016). *zumodegranada.com*. Obtenido de El zumo de la granada: http://www.zumodegranada.com/wp-content/uploads/2016/06/LIBRO_El-zumo-de-granada-cultivado-en-Espa%C3%B1a_2016.pdf
12. Carbonell, A. (Enero de 2012). *researchgate.net*. Recuperado el 24 de Julio de 2017, de La granada y sus productos derivados: Propiedades beneficiosas para la

salud.:

https://www.researchgate.net/publication/236677134_La_granada_y_sus_productos_derivados_Propiedades_beneficiosas_para_la_salud

13. Carretero, M. (2010). *hera.ugr.es*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [hera.ugr.es: https://hera.ugr.es/tesisugr/19554606.pdf](https://hera.ugr.es/tesisugr/19554606.pdf)
14. Coronado, M., Vega, S., Gutierrez, R., Vásquez, M., & Radilla, C. (2015). *scielo.cl*. Obtenido de Antioxidantes: perspectiva actual: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
15. Cruz, F. (Agosto de 2009). *repositorio.uaaan.mx:8080*. Obtenido de *repositorio.uaaan.mx:8080*: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/403/60882s.pdf?sequence=1>
16. Cruz, F. (Agsoto de 2009). *repositorio.uaaan.mx:8080*. Obtenido de Efecto de los factores pH y temperatura sobre la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido por *Aspergillus niger* GH1, usando extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*): <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/403/60882s.pdf?sequence=1>
17. Cruz, F., Saucedo, S., Martínez, G., Aguilera, A., Rodríguez, R., & Aguilar, C. (2010). *posgradoeinvestigacion.uadec.mx*. Obtenido de Propiedades químicas industriales del ácido elágico: http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM3/5.-%20Cruz-Antonio_propiedades_acido.pdf
18. Cubero, S. (Mayo de 2012). *riunet.upv.es*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15999/tesisUPV3808.pdf?sequence=1>
19. Delgado, M. (Diciembre de 2015). *entretextos.leon.uia.mx*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [entretextos.leon.uia.mx: http://entretextos.leon.uia.mx/num/21/PDF/ENT21-1.pdf](http://entretextos.leon.uia.mx/num/21/PDF/ENT21-1.pdf)
20. Denzoin, L., Soraci, A., & Tapia, M. (Septiembre de 2013). *Homeostasis del glutatión*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [scielo.org.ar: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007)
21. Díaz, A. (2003). *uacj.mx*. Obtenido de La estructura de las catalasas: http://www.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB_DOC/2003/06/2003-2_LA%20ESTRUC_.pdf
22. Febles, C., Soto, C., Saldaña, A., & García, B. (2002). *redalyc.org*. Obtenido de Funciones de la vitamina E: Actualización: <http://www.redalyc.org/pdf/903/90326388007.pdf>
23. García, & Pérez. (2004). *digital.csic.es*. Obtenido de La granada. Alimento rico en polifenoles: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/17946/3/lecturaPDF.pdf>
24. García, G. (2009). *unisanitas.edu.co*. Obtenido de Los peroxisomas y su importancia biomédica: un tema mal entendido y muy misticado: <http://www.unisanitas.edu.co/Revista/1/gregory%20garcia.pdf>

25. Guerra, E. (2001). *scielo.isciii.es*. Obtenido de Oxidación, entre la vida y la enfermedad: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000100001
26. Guizar, T. (Mayo de 2014). *eprints.uanl.mx*. Obtenido de Productos naturales vegetales como inhibidores: <http://eprints.uanl.mx/4300/1/1080253712.pdf>
27. Instituto Nacional del Cáncer. (12 de 11 de 2015). *cancer.gov*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de www.cancer.gov: <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2015/antioxidantes-metastasis>
28. Koponen, J., Happonen, A., Mathilla, P., & Torronen, A. (21 de Febrero de 2007). *ncbi.nlm.nih.gov*. Obtenido de Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261015>
29. López, A., López, A., & Palau, E. (2010). *www.udlap.mx*. Obtenido de www.udlap.mx: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf)
30. Márquez, M., & Vásquez, G. (2015). Radicales libres. En M. Márquez, & G. Vásquez, *Radicales libres* (pág. 56). Madrid : EDAF, S.L.U.
31. Martínez, J., Torres, P., & Juárez, M. (2011). *facmed.unam.mx*. Obtenido de El Glutation y su asociación con las enfermedades neurogenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2011/02/f_2oArticulo.pdf
32. Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. J. (2002). *nutricionhospitalaria.com*. Obtenido de Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
33. National Institutes of Health. (11 de Mayo de 2016). *ods.od.nih.gov*. Obtenido de Datos sobre la vitamina E: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminE-DatosEnEspanol.pdf>
34. Omnia Science. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. En O. Science, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pág. 55). Yucatán: Omnipublisher.
35. Pharm., I. (s.f.). Published online 2012 December 17.doi: 10.5402/2012/547942.
36. Porras, Loaiza, López, & Malo. (2009). *www.udlap.mx*. Obtenido de www.udlap.mx: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)
37. Prochile. (Agosto de 2012). *www.prochile.gob*. Obtenido de Estudio de Mercado granadas procesadas en Estados Unidos: http://www.prochile.gob.cl/wp-content/files_mf/documento_08_08_12174838.pdf
38. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (Febrero de 2012). *scielo.isciii.es*. Obtenido de Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009

39. Salinas, Almaguer, Peña, & Ríos. (Enero de 2009). *scielo.org.mx*. Obtenido de Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa:
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v15n1/v15n1a14.pdf>
40. Sánchez, A., Cozzi, R., Cunduri, E., Ricordy, R., Fiore, M., Gensabella, G., . . . De salvia, R. (10 de 2 de 2005). *scielo.sld.cu*. Obtenido de scielo.sld.cu:
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla02205.pdf>
41. Sheets, Dubois, & Willianson. (2004). *miami-dade.ifas.ufl.edu*. Obtenido de La granada: <http://miami-dade.ifas.ufl.edu/old/programs/tropicalfruit/Publications/La%20Granada.pdf>
42. Venereo, J. (2002). *scielo.sld.cu*. Obtenido de Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009
43. Villanueva, E., Condezo, L. A., & Ramírez, E. (2010). *scielo.br*. Obtenido de Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante,:
<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30s1/23.pdf>
44. Zamora, J. D. (Marzo de 2007). *scielo.cl*. Obtenido de Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002
45. (2012 December 17). Published online ISRN Pharm. Published. Obtenido de doi: 10.5402/2012/547942
46. Amazan, D. (2012). *eprints.ucm.es*. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de *eprints.ucm.es*: <http://eprints.ucm.es/21807/1/T34538.pdf>
47. (–Apr 1, 2009). Journal of the Science of Food and Agriculture Volu. 89 (6) .
48. Aurbach, Rakus, Bauer, Gerner, & Ullmann. (19 de Abril de 2012). *www.ncbi.nlm.nih.gov*. Recuperado el 24 de Julio de 2017, de *www.ncbi.nlm.nih.gov*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240636>
49. Hora, J., Maydew, E., Lansky, E., & Dwivedi, C. (2003). NCBI. Recuperado el 24 de Julio de 2017, de NVBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585180>
50. Arango, G.J. 2010. Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido shikimico. Universidad de Antioquia.
51. Carbonell-Barrachina, A. Aprovechamiento integral de la granada: zumos, mermeladas, cuarta gama y suplementos dietéticos.
<http://tecnoagro.umh.es/caseal.htm>.
52. Du C.T.; Wang P.L.; Francis, F.J. 1975. Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. J.Food Sci 40 417-418.
53. Espín, J.C., Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. and García-Viguera, C. 2000. Antocyaninbased natural colorants: a new source of antiradical activity for foodsuff. J. Agric. Food Chem. 48: 1588-92.
54. Eurovirtual.net. 2009. Antioxidantes y cáncer.
<http://www.eurovirtual.net/paciente/saber/dietacancer/>
55. Font Quer, P. 1979. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Labor, S.A. 5ª ed. Barcelona. 1.033 pp.

56. García-Viguera, C.; Pérez Vicente, A. 2004. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alim., nutri. Salud*, vol. 11, nº 4, pp. 113-120.
57. Gil, M. ^a Isabel; Tomás-Barberán, Francisco Hess-Pierce, B.; Holcroft D. M.; Kade, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and procesing. *J. of Agric. Food Chem.* 48: 4581-4589.
58. Hora, J., Maydew, E., Lansky, E., & Dwivedi, C. (2003). NCBI. Recuperado el 24 de Julio de 2017, de NVBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458518>
59. Larrosa, M., González-Sarriás, A. Yáñez-Gascón, M.J., Selma, M.V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P., Espín, J.C. 2010. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolismo. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (8), pp. 717-725.
60. Lye, C. 2008. Pomegranate. Preliminary assessment of the potencial for an Australian industry. RIRDC Publication Nº 08/153. Australian Government.
61. Mars, M. 1998. Pomegranate plant material: genetic resources and breeding (review). I Symposium Internacional sobre el granado. MV-0. Orihuela (Alicante).
62. Melgarejo y Salazar. 2003. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas Vol. II. Mundi-Prensa y AMV, Ediciones. Madrid.
63. Melgarejo, P. y Martínez, R. 1992. El granado. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 163 pp.
64. Mirmiran, P., Fazeli, M.R., Asghari, G., Shafiee, A., Azizi, F. 2010. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutririon* 104 (3), pp. 402-406.
65. MMARM. 2009. Anuario de estadística agroalimentaria. Madrid.
66. Primo, E. 1987. Química Agrícola III. Alimentos. Alambra. Madrid. 683 pp.
67. Quiroz, I. 2009. Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de mercado. Fundación Chile.
68. Sánchez, F. 2009. Granado: Perspectivas y Oportunidades de un Negocio Emergente: Alternativas agroindustriales del granado. Fundación Chile.
69. Sánchez-Monge E. 1974. Fitogenética (mejora de plantas). Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio de Agricultura. Madrid. 456 pp.
70. Simonian, D. 2007. Análisis del mercado internacional del granado perspectivas para las exportaciones chilenas. *Redagráfica Edición* Nº 16, Mayo 2007.
71. Stover, E. and Mercure, E.W. 2007. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience* vol.42 (5).
72. Westwood, NH. 1982. Fruticultura de Zonas Templadas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 461 pp.
73. Weusthuis, M. 2009. Afghan pomegranates in the Netherlands. University of Applied Sciences. Wageningen.

74. Verma, N., Mohanty, A., & Lal, A. (2 de Junio de 2010). [globalsciencebooks.info](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf). Recuperado el 24 de Julio de 2017, de [globalsciencebooks.info](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf): [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4\(SI2\)/FVCSB_4\(SI2\)120-125o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf)
75. Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., & Begoña, O. (2012). [nutricionhospitalaria.com](http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5886.pdf). Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [nutricionhospitalaria.com](http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5886.pdf): <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5886.pdf>
76. Carretero, M. (2010). [hera.ugr.es](https://hera.ugr.es/tesisugr/19554606.pdf). Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [hera.ugr.es](https://hera.ugr.es/tesisugr/19554606.pdf): <https://hera.ugr.es/tesisugr/19554606.pdf>
77. Delgado, M. (Diciembre de 2015). [entretextos.leon.uia.mx](http://entretextos.leon.uia.mx/num/21/PDF/ENT21-1.pdf). Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [entretextos.leon.uia.mx](http://entretextos.leon.uia.mx/num/21/PDF/ENT21-1.pdf): <http://entretextos.leon.uia.mx/num/21/PDF/ENT21-1.pdf>
78. Denzoin, L., Soraci, A., & Tapia, M. (Septiembre de 2013). Homeostasis del glutatión. Recuperado el 22 de Julio de 2017, de [scielo.org.ar](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007): http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007
79. Márquez, M., & Vásquez, G. (2015). Radicales libres. En M. Márquez, & G. Vásquez, Radicales libres (pág. 56). Madrid : EDAF, S.L.U.
80. Mira, S. (2017). [dpvm.umh.es](http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf). Recuperado el 24 de Julio de 2017, de [dpvm.umh.es](http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf): <http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf>
81. Pharm., I. (s.f.). Published online 2012 December 17.doi: 10.5402/2012/547942.
82. Verma, N., Mohanty, A., & Lal, A. (2 de Junio de 2010). [globalsciencebooks.info](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf). Recuperado el 24 de Julio de 2017, de [globalsciencebooks.info](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf): [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4\(SI2\)/FVCSB_4\(SI2\)120-125o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)120-125o.pdf)
83. Yuan, G.-F. (Feb 28, 2014). Conjugated linolenic acid(CLNA) their-bioactivities acid(α -linolenic acid,cis 9, cis 12, cis 15–18:3 n-3) found in plant seeds. Food & Function journals Volume 5 (7) .

Q.F. LUIS FELIPE ZALAMEA MOLINA, MSc.

Químico y Farmacéutico- Titulado en la Universidad Estatal de Guayaquil.
Magister en "Procesamiento y Conservación de Alimentos"; Universidad Estatal de Guayaquil. Premio Contenta otorgado por el Consejo Universitario de la U. de Guayaquil Mención "Magna Cum Laude" otorgado por la Facultad de Ciencia Químicas. Profesor principal de Físico-Química I, Físico-Química II Facultad de Ciencia Químicas de la Universidad Técnica de Machala 1978-1979
Profesor principal de Química Analítica Cualitativa y Cuantitativa teórica Facultad de Ingeniería Química 1978-1999. Profesor de Procesos de Alimentos Facultad de Ing. Química U. de Guayaquil. Profesor de Microbiología y Bioquímica de los alimentos. Facultad de Ing. Química. U. de Guayaquil (Actual) Tutor de Proyectos De Titulación de la Facultad de Ingeniería Química
Tutor de Proyectos de Tesis de la Maestría en Procesamiento de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química. Expositor temas Microbiología Clínica en Congresos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Del Guayas. Expositor En el Primer Congreso Internacional de Investigación en Salud. Universidad de Guayaquil del 17 Al 21 De Octubre 2016. Conferencia Tema: "Polifenoles Biodisponibles a Partir de extractos de Frutas. Jornadas de Ingeniería Química Noviembre 2016. Colegio Regional De Ingenieros Químicos. Junio 2017

LIC. VICTORIA EUGENIA GARCÍA CASAS, MSC

Licenciada en Gastronomía en el 2009, Especialista en la elaboración de productos lácteos y cárnicos en el 2010 de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Magister en Procesamiento y Conservación de Alimentos de la Universidad de Guayaquil en el 2015. Publicaciones en revistas indexadas, participación como ponente en Congresos Internacionales, Docente Titular de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil, Directora de Proyecto de Investigación orientado a la recuperación de los macronutrientes del lactosuero residual de la industria quesera ecuatoriana, dirección en la que continúa su trabajo científico.

ING. LILYA JANETT CASABONA THOMAS, MSC

Ingeniera Química. Magister en Docencia Universitaria e Investigación Educativa. Diplomado en Docencia Superior. Coordinadora de Prácticas Pre profesionales Facultad de Ingeniería Química. Directora Encargada de los Laboratorios Centrales de Física de la Facultad de Ingeniería Química U. de Guayaquil. Profesora de Física y Laboratorio de Física. Tutora de Trabajos de Titulación de la Facultad de Ingeniería Química

ISBN: 978-9942-760-56-2

