



## **Universidad Autónoma de Querétaro**

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la  
República (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Calidad nutracéutica de extractos de granada dulce y ácida y  
bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo *in vivo*”**

### **TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

#### **Presenta:**

LNCA Ana Gabriela Díaz Mena

#### **Dirigido por:**

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2014  
México



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
 Facultad de Química  
 Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
 (PROPAC)  
 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Calidad nutracéutica de extractos de granada dulce y ácida y bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo *in vivo*”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
 Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

LNCA Ana Gabriela Díaz Mena

**Dirigido por:**

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

**SINODALES**

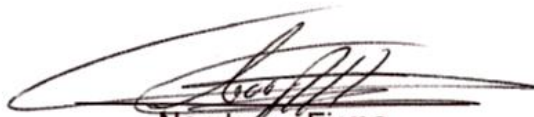
Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado  
 Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
 Secretario

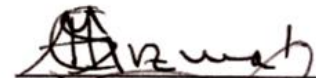
Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
 Vocal

Dr. Candelario Mondragón Jacobo  
 Suplente

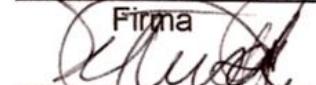
Dra. Minerva Ramos Gómez  
 Suplente



Nombre y Firma  
 Director de la Facultad



Firma



Firma



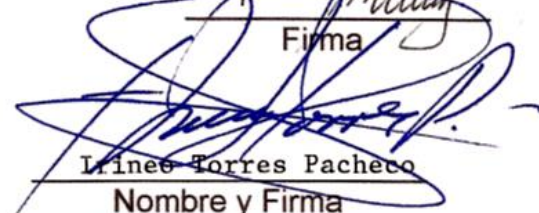
Firma



Firma



Firma



Irinea Torres Pacheco

Nombre y Firma

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
 Querétaro, Qro.  
 Noviembre 2014  
 México

## RESUMEN

La granada (*Punica granatum* L.) es una fruta que posee diferentes propiedades nutraceuticas, lo que ha sido correlacionado a la presencia de compuestos fenolicos. Las caracteristicas fisicoquimicas y nutraceuticas de los extractos de granada dependen del metodo de extraccion utilizado. El objetivo de este estudio fue evaluar las caracteristicas fisicoquimicas y nutraceuticas de extractos de granada elaborados a partir del fruto entero con un procesador y se compararon con dos metodos de extraccion utilizados para la elaboracion de jugos de granada: 1) arilos de granada separados manualmente y prensados; 2) mitades de fruta procesadas en un exprimidor de jugos electrico. Se utilizaron dos selecciones de granada, dulce y acida, desarrolladas por el INIFAP, asi como la variedad Wonderful con fines comparativos. Se determinaron las caracteristicas fisicoquimicas de los extractos, su composicion fenolica, vitamina C y capacidad antioxidante. Posteriormente se evaluo la bioaccesibilidad *in vivo* de los compuestos fenolicos de los extractos elaborados a partir del procesador, los cuales fueron administrados a ratas macho Wistar durante 72 horas en una concentracion equivalente a diez veces la estimacion del consumo de fenoles solubles totales en adultos. Se determino el perfil de compuestos fenolicos y capacidad antioxidante de los contenidos de intestino delgado y ciego, suero, heces y orina. El extracto elaborado a partir del procesador mostro un mayor rendimiento que los otros metodos; no se encontraron diferencias en los valores de pH, acidez titulable, solidos solubles totales ni indice de madurez entre los metodos de extraccion; el extracto de granada acida presento los valores mas bajos de pH y mas altos de acidez titulable, mientras que la dulce presento el efecto contrario. Los extractos elaborados a partir del procesador presentaron mejores caracteristicas nutraceuticas, mientras que las selecciones dulce y acida mostraron mayor contenido de compuestos fenolicos, vitamina C y capacidad antioxidante que la variedad Wonderful. Los compuestos fenolicos de los extractos de granada dulce y acida mostraron una mayor bioaccesibilidad de acidos fenolicos y flavan-3-oles. Por lo anterior, las selecciones mexicanas dulce y acida pudieran ser una excelente opcion para su consumo en fresco y elaboracion de subproductos de alta calidad nutraceutica.

**(Palabras clave:** extracto de granada, metodo de extraccion, compuestos fenolicos, bioaccesibilidad)

## ABSTRACT

The pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit that has different nutraceutical properties, which have been correlated with the presence of phenolic compounds. The physicochemical and nutraceutical characteristics of the pomegranate extracts depend on extraction methods. The aim of this study was to evaluate the physicochemical and nutraceutical characteristics of pomegranate extracts made from the whole fruit with a processor and compared with two extraction methods used for making pomegranate juice: 1) hand separated arils and pressed; 2) halves of fruit processed in an electric juicer. Two pomegranate selections, sweet and sour, developed by INIFAP were used; in order to compare, Wonderful variety were included. Physicochemical characteristics, phenolic composition, vitamin C and antioxidant capacity of the extracts were determined. Then the bioaccessibility *in vivo* of the phenolic compounds was assessed, the extracts were administered to male Wistar rats for 72 hours at a concentration ten times the estimate consumption total soluble phenols by adults. Phenolic profile and antioxidant capacity of small intestine and cecum contents, serum, faeces and urine was determined. The extract made from processor showed higher yield than the other methods; no differences in pH, titratable acidity, total soluble solids and maturity index between extraction methods were found; acid pomegranate extract had the lowest pH and higher titratable acidity values, while sweet selection presented the opposite effect. Extracts prepared from processor showed better nutraceutical characteristics, while selections sweet and acid showed higher phenolic content, vitamin C and antioxidant capacity than Wonderful variety. The phenolic compounds from the extracts of sweet and acid pomegranate showed greater bioavailability of phenolic acids and flavan-3-ols. Hence, the sweet and sour Mexican selections could be an excellent choice for fresh consumption and processing of high quality nutraceutical products.

**(Key words:** pomegranate extract, extraction method, phenolic compounds, bioaccessibility)

***Dedico este trabajo a Dios, a mi esposo,  
a mis padres y a mis hermanos,  
quienes estuvieron siempre a mi lado,  
apoyándome incondicionalmente.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis el Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado, por la aportación de sus conocimientos y experiencia que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A los profesores-investigadores que formaron parte de mi comité de sinodales, por sus valiosas observaciones y aportaciones al proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de alimentos del INIFAP, del laboratorio de biología celular y molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y del laboratorio de bioquímica molecular de la Facultad de Química, en especial a Ximena, Jos e Iza, por compartir su conocimiento y brindar su apoyo en todo momento.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades de la granada	3
2.2 Importancia económica y variedades	4
2.3 Extractos de granada	7
2.4 Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos	10
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Material biológico	20
5.2 Obtención de los extractos de granada	21
5.3 Análisis fisicoquímicos	21
5.3.1 Rendimiento	21
5.3.2 pH	22
5.3.3 Acidez titulable	22
5.3.4 Sólidos solubles totales	22
5.3.5 Índice de madurez	23
5.4 Calidad funcional	23
5.4.1 Fenoles solubles totales	23
5.4.2 Taninos totales	23
5.4.3 Flavonoides	24
5.4.4 Antocianinas	24
5.4.5 Punicalagina	25
5.4.6 Vitamina C por HPLC-DAD	26
5.5 Determinación de la capacidad antioxidante	26

5.5.1 Método ABTS	27
5.5.2 Método DPPH	27
5.5.3 Método FRAP	27
5.6 Ensayo de bioaccesibilidad	28
5.6.1 Extracción de compuestos fenólicos en muestras biológicas	28
5.6.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	29
5.6.3 Flavonoides	30
5.6.4 Antocianinas	30
5.6.5 Compuestos fenólicos por HPLC-DAD	30
5.6.6 Metabolitos de elagitaninos por HPLC-DAD-MSD	31
5.7 Análisis estadístico	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Análisis fisicoquímicos	32
6.1.1. Rendimiento	32
6.1.2. pH	33
6.1.3. Acidez titulable	33
6.1.4. Sólidos solubles totales	34
6.1.5. Índice de madurez	34
6.2. Calidad funcional	35
6.2.1. Contenido fenólico	35
6.2.2. Vitamina C	37
6.2.3. Capacidad antioxidante de los extractos de granada	38
6.3. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos	42
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. LITERATURA CITADA	58
IX. APÉNDICE	66



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Principales compuestos funcionales en las diferentes partes de la granada.	8
2. Rendimiento, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales e índice de madurez de extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.	32
3. Contenido fenólico de extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.	36
4. Capacidad antioxidante de los extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.	39
5. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido a partir del procesador.	40
6. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido a partir del exprimidor.	41
7. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido por el método manual.	42
8. Perfil fenólico de la dieta para roedores de laboratorio y de los extractos de granada dulce, ácida y comercial utilizados para los tratamientos.	44
9. Contenido fenólico del contenido de intestino delgado, contenido de ciego, heces, suero y orina de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	46
10. Perfil fenólico del contenido de intestino delgado de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	48
11. Perfil fenólico del contenido de ciego de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	49
12. Metabolitos de elagitaninos identificados en contenido de ciego de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	49
13. Perfil fenólico de heces de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	50
14. Perfil fenólico de suero de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	50
15. Perfil fenólico de orina de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).	51
16. Capacidad antioxidante del contenido de intestino delgado, contenido de ciego, heces, suero y orina de los tres tratamientos y el control.	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Partes del granado, a) hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes longitudinal y transversal del arilo.	4
2. Rutas de los compuestos fenólicos de la dieta y su metabolismo en humanos (modificado de Cardona y col., 2013).	12
3. Metabolismo microbiano de elagitaninos y ácido elágico (Espín y col., 2013).	17
4. Selecciones de granada evaluadas: A) Selección 36-1 (dulce). B) Selección 36-3 (ácida). C) Variedad Wonderful.	20
5. Contenido de ácido ascórbico y dehidroascórbico (mg/L) de los extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.	38

## I. INTRODUCCIÓN

La granada, *Punica granatum* L., es una planta que pertenece a la familia Punicaceae, es una fruta antigua que ha sido ampliamente consumida en diferentes culturas de Europa y Asia Central durante miles de años, sus cualidades terapéuticas han hecho eco a través de los milenios.

Los países reconocidos como los mayores productores son India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos. Se produce granada de diferentes variedades; sin embargo, el comercio mundial de granada está basado en la variedad Wonderful (Melgarejo y col., 2012).

En México, Guanajuato es uno de los principales productores debido a sus características geográficas. Además, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) se están creando nuevas selecciones de granada roja dulce y ácida, con características físicas similares a la variedad Wonderful, que permitan incursionar en el mercado de exportación, aprovechando la época temprana de maduración de las granadas mexicanas, y adicionalmente presenten mejores características nutracéuticas que esta variedad comercial.

El consumo de granada en el país es incipiente, generalmente en fresco, desgranando manualmente el fruto y consumiendo sólo los arilos. Sin embargo, existen varios estudios que indican que la cáscara y el albedo de la granada presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos, específicamente taninos hidrolizables, los cuales presentan diversas propiedades benéficas. Es por ello que los extractos elaborados a partir del fruto entero, es decir, en los que se incluyen además de los arilos, la cáscara y el albedo, presentan un mayor contenido de fenoles solubles totales, flavonoides y taninos hidrolizables, así como una mayor capacidad antioxidante (Gil y col., 2000; Tzulker y col., 2007; Rinaldi y col., 2013). Además, un proceso de extracción sencillo, donde se evita el desgranado manual, promueve la utilización del producto, incrementa el consumo y, a su vez, la demanda de la granada como fruta fresca.

También se ha demostrado que los taninos hidrolizables de la granada pueden actuar como antioxidantes, agentes antitumorales o antihepatotóxicos, y mejorar la salud cardiovascular. Así mismo, presentan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antidiabéticas, y pueden mejorar la salud oral y de la piel; también ayudan a prevenir la enfermedad de Alzheimer y mejorar la calidad del esperma y la disfunción eréctil en hombres (Viuda-Martos y col., 2010; De la Cruz y col., 2011).

Sin embargo, al evaluar la funcionalidad potencial de un compuesto es importante analizar si el proceso de digestión afecta a los compuestos bioactivos y su estabilidad, ya que esto, a su vez, afectará a su bioaccesibilidad y sus posibles efectos benéficos. El concepto de bioaccesibilidad se puede definir como la cantidad o la fracción que se libera de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y se vuelve disponible para la absorción (Heaney 2001; Carbonell y col., 2014).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de la granada

La granada es una fruta antigua que ha sido ampliamente consumida en diferentes culturas durante miles de años. Es nativa de la zona de Irán a los Himalayas en el norte de la India, y ha sido cultivada y naturalizada en toda la región mediterránea desde tiempos antiguos (Viuda-Martos, 2010). Los árabes la introdujeron en España y luego fue llevada por los españoles a América, donde ahora ocupa grandes extensiones, sobre todo en las zonas litorales del Pacífico (FAO, 2006).

El granado, *Punica granatum* L. procede de la familia *Punicaceae*, es un árbol pequeño caducifolio con porte arbustivo, de 3 a 6 m de altura, con el tronco retorcido, madera dura y corteza escamosa de color grisáceo, algunas de las ramas son espinosas, tiene ramillas angulosas, copa extendida y mucho ramaje.

Las hojas del granado son simples, opuestas, generalmente fasciculadas, cortamente pecioladas, oblongas u oval-lanceoladas de 3 a 8 cm de longitud, algo coriáceas y de color verde lustroso. En cuanto a sus flores, éstas son solitarias, o bien, reunidas en grupos de 2 a 5 al final de las ramas nuevas, grandes, de diferentes tonalidades de rojo, lustrosas, acampanadas, subsentadas, con 5 a 8 pétalos y sépalos, y el cáliz persiste en el fruto. En algunas variedades las flores son abigarradas e incluso matizadas en blanco (Figura 1).

La fruta de granada surge del crecimiento del ovario inferior tras la fecundación de la flor, es una baya grande, su piel es brillante y gruesa coriácea y globulosa de 10 a 15 cm de diámetro. Ésta encierra en su interior arilos, que corresponden a la parte comestible de esta fruta, y en promedio representan del 50 hasta 60% del peso de la fruta, mientras que la cáscara representa del 40 al 45% de peso total.

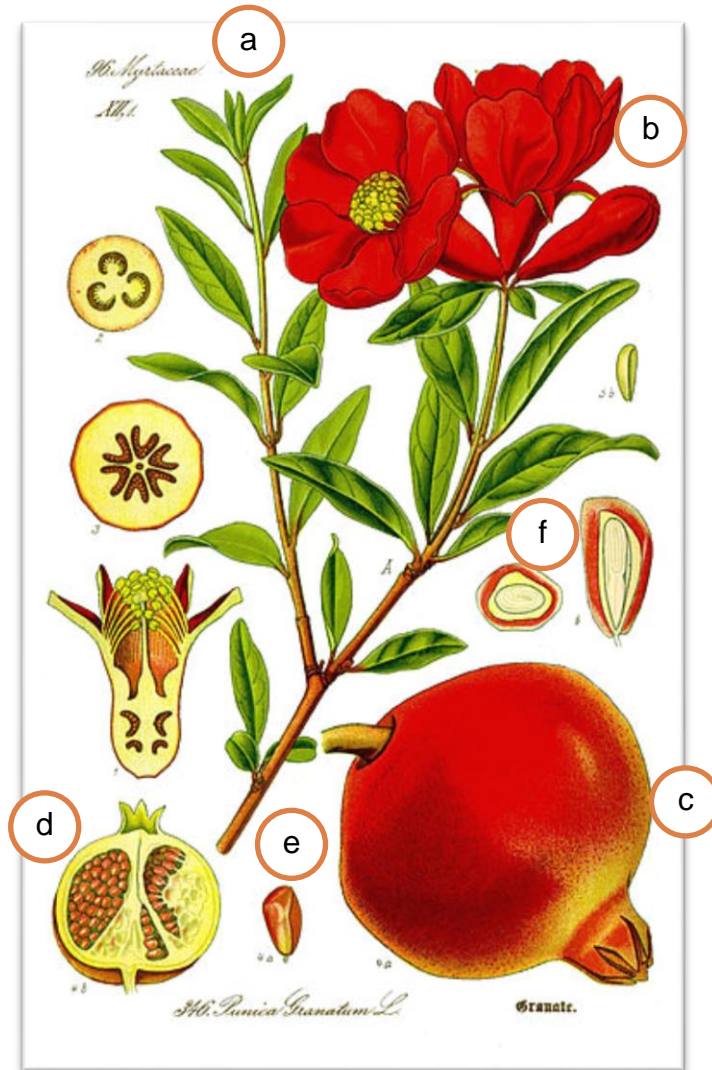


Figura 1. Partes del granado, a) hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes longitudinal y transversal del arilo.

## 2.2 Importancia económica y variedades

Los países reconocidos como los mayores productores de granada son India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos (Melgarejo y col., 2012). Desde los años ochenta la producción mundial de granada ha sido estable, encontrándose entre 800 000 a 1 millón de toneladas; sin embargo, desde principios del siglo XXI los cultivos tuvieron una detonación en producción de casi el doble, presentando actualmente una producción superior a los 2 millones de toneladas. Este incremento en su producción se debe a que, además de su uso ornamental, ha

aumentado el consumo de jugo de granada como principal subproducto y su uso en la industria farmacéutica debido a sus propiedades benéficas a la salud.

La exportación de granada fresca en el mundo no es tan extendida como otras frutas, por esta razón se le incluye dentro de la categoría “otras frutas exóticas” en las estadísticas de ventas mundiales de comercio internacional. La Organización para los Alimentos y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), Eurostat (Estadísticas y encuestas de la comunidad europea) e Ices (Instituto español de comercio exterior) la incluyen bajo el concepto de “otras frutas”, por lo que no existen datos netos en cuanto a los volúmenes que se comercializan.

Existe una gran diversidad de variedades de la granada; sin embargo, la principal variedad comercializada a nivel mundial es la Wonderful, la cual tiene un peso de alrededor de 200 a 700 g, su cáscara es de color rojo bermellón uniforme, el arilo es grande, de color rojo oscuro y de sabor semiácido.

En México, la superficie destinada a los plantíos de granado es mínima y su consumo es insignificante. En el año 2013, la producción de granada fue de alrededor de 4400 toneladas obtenidas de aproximadamente 630 hectáreas, siendo los estados de Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato los principales productores, los cuales aportaron el 77% de la producción nacional (SIAP, 2014).

En el estado de Guanajuato, el municipio más importante para la producción de granada es Apaseo el Alto, el cual posee el 90% de las huertas de granada del estado, debido a las características geográficas del municipio: altas temperaturas del verano, días soleados y disponibilidad de agua para riego; condiciones necesarias para alcanzar altos rendimientos y fruta de mayor calidad.

Las principales variedades de granada en México son: Apaseo (fruta de tamaño promedio (300 g), con cáscara gruesa de color amarillo-naranja con chapete rojo a la madurez, arilo color rojo brillante y dulce, semilla semidura, cosecha de julio a septiembre), Apaseo tardía (fruto grande, con peso promedio de

400 g, cáscara delgada de color verde-amarillento, arilo rojo oscuro y dulce, semilla semidura, cosecha de agosto a octubre) y Tecozautla, (frutos de tamaño intermedio a grande (> 250 g), redondos, de cáscara amarillo-naranja con un rubor de color rosa-rojizo ligero, arilos de color rojo oscuro, dulce con semillas pequeñas y suaves, cosecha de junio a agosto) (Mondragón y Juárez, 2008; Mondragón, 2012).

Sin embargo, desde el año 2002 México ha importado fruta de la variedad Wonderful producida en California para satisfacer la demanda de otoño, la cual adicionalmente presenta características sensoriales que son preferidas por el consumidor norteamericano; posee un sabor subácido y arilos de color rojo oscuro, este producto ha sido introducido como novedad, por lo que se presenta en bajos volúmenes en supermercados.

Es por ello que en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del estado de Guanajuato, se están creando nuevas variedades de granada roja, con el fin de ampliar la oferta de granada para consumo en fresco, con colores de fruta y grano distintos al ofrecido actualmente en el mercado nacional, es decir, selecciones similares a la variedad Wonderful (Mondragón, 2012). Finalmente se pretende contar con variedades que permitan incursionar en el mercado de exportación, aprovechando la época natural de maduración de las granadas mexicanas, que están disponibles casi dos meses antes que la variedad Wonderful.

Entre las selecciones desarrolladas por el INIFAP se encuentran la 36-1 (dulce) y 36-3 (ácida), con pesos que pueden alcanzar los 350 y 500 g, respectivamente. Estas selecciones se caracterizan por tener una cáscara de color rojo intenso uniforme y arilos grandes de color rojo oscuro, presentando características físicas similares a la variedad Wonderful. Así mismo, las modificaciones en la composición de las frutas debido a la variación fenotípica obtenida con el mejoramiento genético, pudieran conllevar a la modificación de sus propiedades funcionales.



### **2.3 Extractos de granada**

Los arilos representan la parte comestible de la granada y generalmente se consumen en fresco. Sin embargo, también pueden ser utilizados para la preparación de bebidas, gelatina, jalea, pasta y jugo fresco.

Existen diferentes métodos para la elaboración de jugo de granada, los más utilizados son: manual, donde se separan los arilos de la cáscara y albedo para prensarlos a través de una malla; y exprimidor, en donde se utiliza una prensa o exprimidor para comprimir la fruta entera, por lo que se extrae jugo tanto de los arilos como del albedo (Mousavinejad y col., 2009). El primero es un proceso complejo ya que la separación de los arilos resulta difícil y requiere de mucho tiempo, además el rendimiento es bajo; mientras que el segundo es relativamente más sencillo y es un proceso comúnmente utilizado en países asiáticos para la producción de jugo.

La composición del jugo de granada está fuertemente influenciada por la variedad, el método de extracción, el estado de maduración, así como las condiciones de almacenamiento. Por lo que estas variables deben ser consideradas para el desarrollo de un proceso industrial (Fischer y col., 2013).

Diversos estudios indican que los arilos de la granada presentan un elevado contenido de antocianinas, a las cuales se les atribuye la alta capacidad antioxidante de los jugos de granada. Sin embargo, se ha reportado que la cáscara y el albedo de la granada presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos, específicamente de taninos hidrolizables, los cuales han sido asociados con diversas propiedades benéficas a la salud (Cuadro 1). Es por ello que se han realizado numerosos estudios en donde se evalúa la composición nutracéutica y la capacidad antioxidante de extractos elaborados con distintos procesos (Gil y col., 2000; Tzulker y col., 2007; Fischer y col., 2011b; Turfan y col., 2011; Rajasekar y col., 2012; Fischer y col., 2013; Rinaldi y col., 2013; Wasila y col., 2013). De manera general, los extractos de granada donde se incluyen la cáscara y albedo presentan un elevado contenido de fenoles solubles totales, flavonoides y

elagitaninos, lo que conlleva a un incremento en la capacidad antioxidante de dichos productos.

Diversos autores han propuesto el uso de un procesador para la elaboración de extractos de granada, ya que con este método se utiliza la fruta entera (Tzulker y col., 2007; Rajasekar y col., 2012; Rinaldi y col., 2013). Este método permite la extracción de todos los compuestos bioactivos presentes en arilos, albedo y cáscara, por lo que se obtiene un extracto rico en fenoles solubles totales, flavonoides y taninos hidrolizables. Dicho extracto presenta una mayor composición de estos compuestos en comparación del extracto obtenido por exprimidor, ya que este último sólo permite la extracción de los compuestos fenólicos presentes en los arilos y parte del albedo. Sin embargo, aún no se ha reportado una caracterización de los compuestos fenólicos de los extractos obtenidos a partir del fruto entero.

Cuadro 1. Principales compuestos funcionales en las diferentes partes de la granada.

Parte de la planta	Constituyente
<b>Jugo</b>	Antocianinas, ácidos gálico, elágico y cafeico, catequina, elagitaninos, quercetina, rutina.
<b>Aceite de semilla</b>	Ácido linolénico conjugado, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido púnicico, ácido eleosteárico, ácido catálpico.
<b>Cáscara y albedo</b>	Punicalagina, punicalina, pedunculagina, ácidos elágico y galágico, luteolina, quercetina, kaempferol.

Modificado de: Viuda-Martos y col, 2010.

Se ha reportado que los compuestos fenólicos son uno de los principales compuestos nutraceuticos de la granada, a los cuales se les han atribuido sus propiedades benéficas a la salud. Fischer y col. (2011a, 2011b) reportaron alrededor de cincuenta compuestos en jugos de granada obtenidos de arilos y de exprimidor, así como en la cáscara y el albedo. De acuerdo a sus espectros UV y de masas reportaron antocianinas, galotaninos, elagitaninos, ésteres galagil, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos e dihidroflavonoles.

Las propiedades funcionales de la granada y sus extractos se han asociado principalmente a la presencia de elagitaninos, que son taninos hidrolizables derivados del ácido elágico (AE), así como de antocianinas, cuya concentración depende del método de extracción utilizado (Mena y col., 2011).

El ácido elágico presenta propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antivirales, antibacteriales, entre otras, debido a que actúa como formador de puentes de hidrógeno y aceptor de electrones (De la Cruz y col., 2011). Este compuesto se encuentra en pequeñas proporciones en el jugo de la granada. Sin embargo, la mayor aportación de ácido elágico al organismo proviene de la hidrólisis de la punicalagina, la cual es el elagitanino más abundante en la granada (Seeram y col., 2005). Los extractos obtenidos con un exprimidor contienen una mayor cantidad de taninos hidrolizables en comparación con los extractos elaborados a partir de sólo arilos, que representan de 30-44% y 1.4-20% de punicalagina, respectivamente (Fischer y col., 2013).

Por otro lado, las antocianinas son el grupo más grande de los flavonoides presentes en los arilos y son responsables del color característico del jugo de granada, además se les ha asociado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer (Viuda-Martos y col., 2010; Mena y col., 2011; Viladomiu y col., 2013). Entre las antocianinas encontradas en el jugo de granada destacan la delphinidina-3,5-diglucósido, cianidina-3,5-diglucósido, pelargonidina-3,5-diglucósido, delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, y pelargonidina-3-glucósido (Viuda-Martos y col., 2010; Johanningsmeier y Harris, 2011).

A diferencia del contenido de fenoles solubles totales y taninos hidrolizables, la concentración de antocianinas es menor en extractos elaborados a partir del exprimidor y del procesador que en los elaborados a partir del método manual (Fischer y col., 2011b; Fischer y col., 2013; Wasila y col., 2013). La baja concentración de antocianinas en los métodos de exprimidor y procesador, pudiera estar relacionada con la degradación de las antocianinas y/o la formación

de complejos con otras antocianinas o compuestos fenólicos (Turfan y col., 2011; Rajasekar y col., 2012). Además, se ha reportado que las antocianinas polimerizadas también poseen una alta capacidad antioxidante (Tsai y Huang, 2004).

Con respecto a la actividad antioxidante, se ha reportado que ésta es mayor en los extractos elaborados con los métodos del procesador (20 veces) y exprimidor (3 veces) en comparación con los extractos obtenidos de los arilos directamente. El incremento de la actividad antioxidante de dichos extractos ha sido correlacionado con el contenido de taninos hidrolizables, debido a que la cáscara de la fruta es una rica fuente de elagitaninos (ETs), los cuales representan el 80-85% de los fenoles solubles totales en la cáscara (De la Cruz y col., 2011). Mientras que, la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con el método manual está correlacionada con el contenido de antocianinas (Tzulker y col., 2007; Wasila y col., 2013).

Se ha demostrado que los taninos hidrolizables pueden actuar como antioxidantes, agentes antitumorales o antihepatotóxicos, y mejorar la salud cardiovascular; se les ha visto tener propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antidiabéticas, y pueden mejorar la salud oral y de la piel; también ayudan a prevenir la enfermedad de Alzheimer y mejorar la calidad del esperma y la disfunción eréctil en hombres (Viuda-Martos y col, 2010). Existen en el mercado diversos productos que aprovechan estas características, como concentrados líquidos de granada donde cada cucharadita ofrece el poder antioxidante de una taza de jugo de granada, cápsulas que contienen hasta 1000 mg de extracto de compuestos fenólicos de granada natural, jugos concentrados de diferentes frutas enriquecidos con cáscara, entre otros.

#### **2.4 Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos**

El concepto de bioaccesibilidad se puede definir como la cantidad o la fracción que se libera de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y se vuelve disponible para la absorción (Heaney 2001). Esto incluye transformaciones

digestivas de los alimentos en productos listos para la asimilación en las células del epitelio intestinal y, por último, el metabolismo pre-sistémico (intestinal y hepático) (Carbonell-Capella y col, 2014).

Los compuestos fenólicos sufren las siguientes transformaciones: 1) liberación de la matriz alimentaria; 2) cambios estructurales durante la digestión gástrica o intestinal y liberación del glúcido; 3) captación de los compuestos fenólicos libres (agliconas) y algunos conjugados por los enterocitos; 4) metabolismo microbiano de los compuestos fenólicos no absorbidos o aquellos re-excretados vía bilis o páncreas; 5); absorción de compuestos fenólicos y sus metabolitos; 6) excreción de los metabolitos no absorbidos a través de las heces; 7) modificaciones enzimáticas de fase I/II que ocurren después de la captación en intestino delgado, colon e hígado; 8) transporte en sangre y subsecuente distribución a tejidos; y 9) excreción vía riñones o re-excreción hacia el lumen intestinal vía jugos biliares o pancreáticos (Bohn, 2014; Sengul y col., 2014).

La absorción y el metabolismo de los compuestos fenólicos dependen principalmente de sus características fisicoquímicas, tales como el tamaño molecular, hidrofobicidad, solubilidad, pKa, estructura básica, grado de glucosilación y conjugación con otros compuestos fenólicos, así como factores biológicos incluyendo el tiempo de tránsito gástrico e intestinal, pH en el lumen y permeabilidad de la membrana (Spencer, 2003; Carbonell-Capella y col, 2014).

Al evaluar la funcionalidad potencial de un compuesto, es importante analizar si el proceso de digestión afecta a los compuestos bioactivos y su estabilidad, ya que esto, a su vez, afectará a su bioaccesibilidad y sus posibles efectos en el organismo. Los compuestos fenólicos presentes en el alimento pueden estar unidos a carbohidratos, ácidos orgánicos, entre otros. Es por ello que requieren ser liberados de la matriz alimentaria para posteriormente ser digeridos y metabolizados (Figura 2). Otros compuestos fenólicos tienden a acumularse en las vacuolas o bien, permanecen en el citosol con el retículo endoplásmico. Por lo tanto, para su posterior bioaccesibilidad, son necesarias la

disrupción de las paredes y compartimentos celulares, así como la escisión de los carbohidratos (Bohn, 2014).

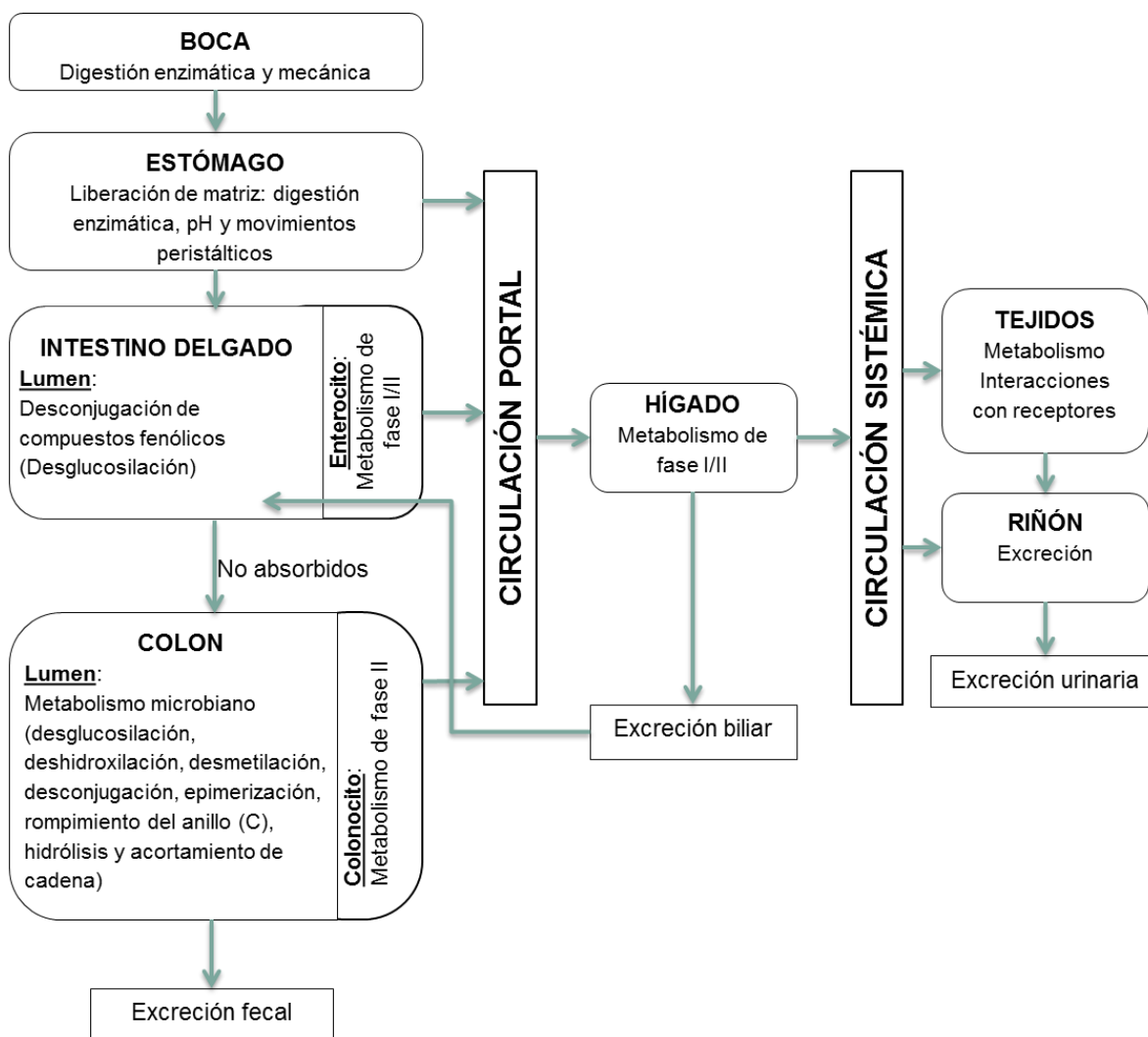


Figura 2. Rutas de los compuestos fenólicos de la dieta y su metabolismo en humanos (modificado de Cardona y col., 2013).

La digestión comienza en la cavidad oral, en donde la  $\alpha$ -amilasa es la enzima predominante. Debido al corto tiempo de interacción entre la matriz alimentaria y las enzimas digestivas, la liberación de compuestos fenólicos es mínima. Por otro lado, durante esta etapa se lleva a cabo una reducción del tamaño de partícula, lo que posteriormente permitirá un mayor acceso de las enzimas digestivas debido al aumento en la superficie de contacto. En la fase

gástrica, la digestión con pepsina, los movimientos peristálticos y el pH ácido, conllevan a una disminución del tamaño de partícula. Además, el pH ácido puede favorecer la presencia de compuestos fenólicos en forma no disociada, lo que facilita su difusión desde la matriz hacia la fase acuosa por la reducción de interacciones iónicas (Bohn, 2014).

Se ha sugerido que algunos flavonoides y ácidos fenólicos pueden ser absorbidos en estómago; sin embargo, la mayoría pasan al intestino delgado. El grado de polimerización de los compuestos fenólicos influye en su bioaccesibilidad, siendo indisponibles aquellos compuestos altamente polimerizados, tales como procianidinas poliméricas y taninos. Así mismo, los ácidos fenólicos esterificados tienen una baja biodisponibilidad en comparación con sus formas libres (Bohn, 2014). Los compuestos esterificados son hidrolizados por acción de las esterasas, tales como carboxilesterasas, las cuales se encuentran dentro de los enterocitos, y pueden también estar presentes en el borde en cepillo (Bohn, 2014).

Una vez que se liberan los compuestos fenólicos de la matriz alimentaria por la digestión mecánica y enzimática en las partes superiores del tracto gastrointestinal, éstos están sujetos a diversas modificaciones en intestino delgado. La mayoría de los compuestos fenólicos glucosilados deben ser separados de su azúcar antes de su absorción. La enzima lactato-florizina hidrolasa (LPH), que se encuentra en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado, libera la aglicona del azúcar, permitiendo su absorción en las células epiteliales por difusión pasiva, transporte facilitado o transporte activo (Bohn, 2014; Del Río y col., 2013). Por otro lado, algunos glucósidos polares pueden ser transportados al interior del enterocito con la participación de diferentes transportadores y posteriormente son hidrolizados en el interior de la célula por la  $\beta$ -glucosidasa citosólica (CBG). (Del Río y col., 2013).

Antes de pasar a la circulación sanguínea, las agliconas son sometidas al metabolismo de fase II dentro del enterocito formando metabolitos sulfatados,

glucuronidados y/o metilados a través de la respectiva acción de sulfotransferasas (SULTs), uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGT) y catecol-O-metiltransferasas (COMTs). Estas reacciones de fase II ocurren a baja velocidad, por lo que altas dosis de compuestos fenólicos favorecerían la captación de formas menos metabolizadas (Del Río y col., 2013).

Una vez metabolizados, los compuestos fenólicos pueden seguir dos rutas de transporte. Por un lado, pueden ser transportados desde la membrana basolateral de los enterocitos hacia el torrente sanguíneo por medio de diferentes transportadoras de membrana. Una vez en el torrente sanguíneo, los compuestos fenólicos hidrofílicos circulan unidos a proteínas, principalmente a albúmina, mientras que los compuestos más apolares circulan unidos a lipoproteínas; sin embargo, también pueden circular libres. Por otro lado, también puede favorecerse el flujo de algunos de los metabolitos de regreso al lumen intestinal a través de diferentes proteínas transportadoras (Manach y col., 2004; Del Río y col., 2013; Bohn, 2014).

La mayoría de los compuestos fenólicos son absorbidos en las secciones proximales del tracto gastrointestinal; sin embargo, algunos compuestos fenólicos pasan intactos al intestino grueso, tal es el caso de los que se encuentran conjugados con azúcares que son resistentes a la acción de LPH/CBG y aquellos de alta polimerización (Del Río y col., 2013).

Una vez en el colon, la microbiota colónica lleva a cabo reacciones de desglucosilación, deshidroxilación, desmetilación, desconjugación, epimerización, rompimiento del anillo (C), hidrólisis y acortamiento de cadena formando metabolitos con mayor bioactividad que los compuestos fenólicos originalmente presentes en la dieta para roedores de laboratorio. Todos estos metabolitos derivados de los compuestos fenólicos pueden ser absorbidos o excretados en las heces (Del Río y col., 2013; Bohn, 2014).



Los compuestos fenólicos y metabolitos que son absorbidos circulan a través de la vena porta al hígado, en donde son sujetos a metabolismo de fase I y II y posteriormente se dirigen hacia tejidos (hígado, riñones, cerebro, entre otros) o bien, son sometidos a la recirculación enterohepática, que puede resultar en su excreción hacia el intestino delgado a través de la vía biliar (metabolitos apolares de gran peso molecular y ampliamente conjugados), o bien, su transporte hacia los riñones para su posterior excreción por la vía urinaria (compuestos polares de bajo peso molecular) (Manach y col., 2004; Del Río y col., 2013). Debido a este dinamismo y a la acumulación de compuestos fenólicos en los tejidos, las concentraciones de éstos en suero pueden tener mucha variación, por lo que el análisis de las concentraciones en este fluido no representa un adecuado biomarcador de exposición (Bohn, 2014).

En el caso específico de las antocianinas, éstas son rápida y eficientemente absorbidas en el estómago (aproximadamente 25%), en donde no son sometidas a ningún tipo de metabolismo. Sin embargo, su absorción varía mucho de acuerdo a su estructura, al grado de glucosilación y al tipo de glúcido, es decir, se absorben con mayor rapidez las mono- que las diglucósido, así como las que tienen glucosa en lugar de otros azúcares (Talavéra y col., 2003).

La fracción de antocianinas que no se absorbe en el estómago alcanza el intestino delgado. A diferencia de los flavonoides, los glucósidos de antocianina son absorbidos en el intestino delgado de manera muy eficiente. Además, las antocianinas se metabolizan rápidamente y aparecen en la circulación o se excretan en la bilis y en la orina como formas tanto intactas como metabolizados (glucuronidados, sulfatados o derivados metilados). Otro posible mecanismo puede implicar la hidrolización de antocianinas por enzimas del borde en cepillo, tales como la LPH, antes de la difusión pasiva de la aglicona, como ya se ha demostrado para otros flavonoides.

Aquellas antocianinas que no son absorbidas llegan al colon, donde ocurre su degradación en ácidos fenólicos de bajo peso molecular por la acción de las

bacterias colónicas (Borges y col., 2007; González-Barrio y col., 2010); sin embargo, se ha sugerido que pueden someterse a una degradación espontánea bajo condiciones fisiológicas. La microbiota colónica hidroliza las antocianinas en sus respectivas agliconas, que posteriormente son degradadas a ácidos fenólicos simples, siendo el ácido protocatecuico el principal metabolito. Se ha reportado que este ácido puede representar alrededor del 73% de las antocianinas ingeridas. Otros metabolitos formados son los ácidos hipúrico, vainílico y siríngico, los cuales pueden ser posteriormente absorbidos en el colon (Borges y col., 2007; Vitaglione y col., 2007; González-Barrio y col., 2011).

Por otro lado, debido al gran tamaño de los elagitaninos, éstos no son absorbidos en estómago ni en intestino delgado. Su baja absorción puede deberse también a su baja solubilidad en agua, su ionización a pH fisiológico para formar complejos poco solubles con iones de calcio y magnesio y su habilidad para unirse al epitelio intestinal. Por lo tanto, los elagitaninos no han sido detectados en suero u orina y pasan hacia el intestino grueso donde son hidrolizados, liberando ácido elágico (Seeram y col., 2006).

El principal elagitanino de la granada es la punicalagina, la cual es capaz de liberar tres moléculas de ácido elágico (Cerdá y col., 2004), un intermediario en la producción de urolitinas. Estos metabolitos son formados por la microbiota a través de la pérdida de una de las dos lactonas presentes en el ácido gálico y por la sucesiva remoción de los grupos hidroxilo (Figura 3) (Espín y col., 2013).

Cerdá y col. (2004) evaluaron la biodisponibilidad de punicalagina por medio de la administración diaria de un litro de jugo de granada a seis voluntarios durante cinco días. Los autores no encontraron punicalagina ni ácido elágico en orina ni suero; sin embargo, encontraron tres metabolitos microbianos derivados de elagitaninos: 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona glucurónido (Urolitina A glucurónido), trihidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona (Urolitina C) e hidroxil-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona glucurónido (Urolitina B glucurónido). Adicionalmente, en este estudio se concluyó que los potenciales efectos biológicos sistémicos de la

ingestión de jugo de granada deben atribuirse a estos metabolitos de la microflora del colon en lugar de a los compuestos fenólicos presentes en el jugo.

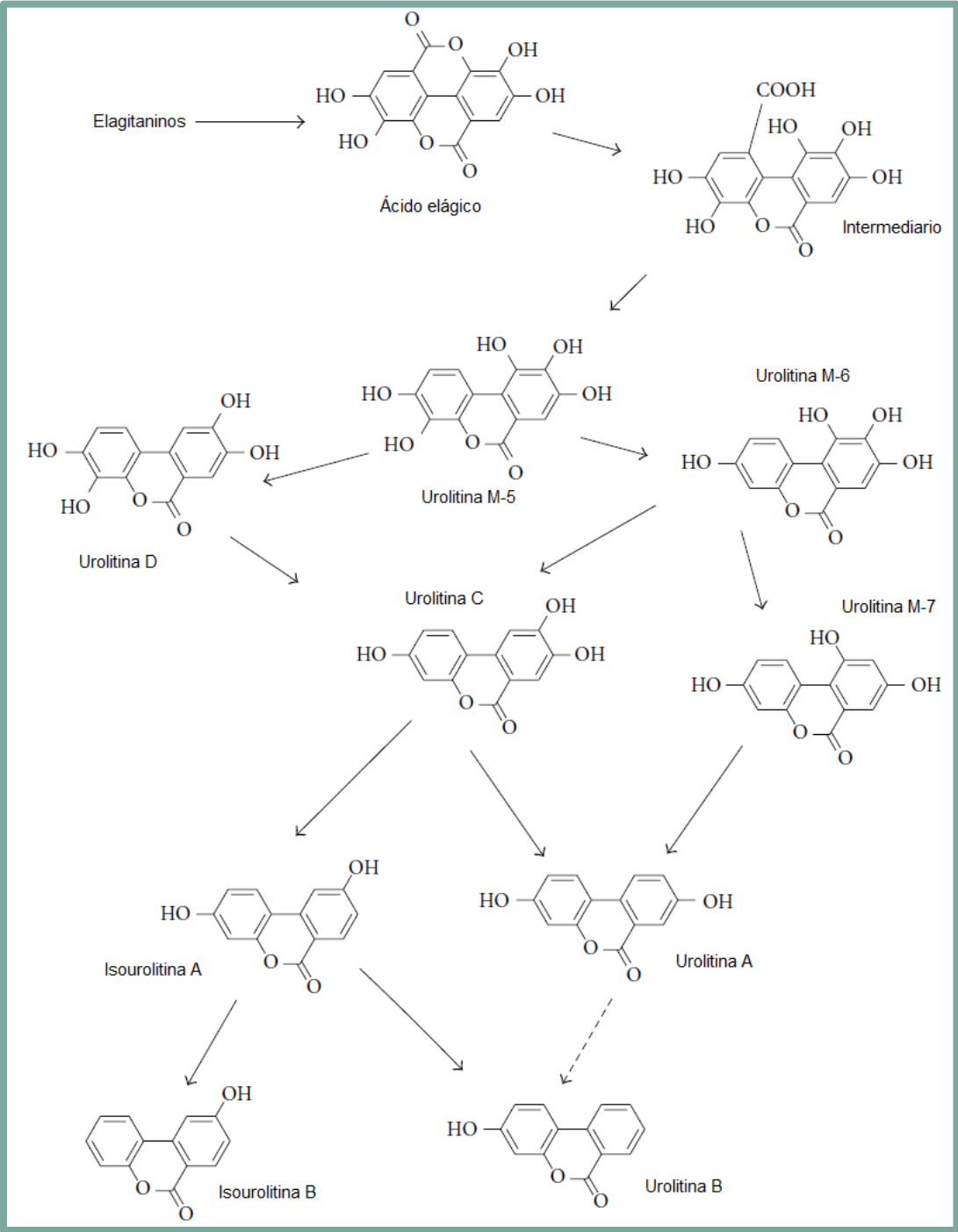


Figura 3. Metabolismo microbiano de elagitaninos y ácido elágico (Espín y col., 2013).

Después de su absorción, el ácido elálgico y las urolitinas son sometidas a conjugación, y formas conjugadas con grupos metil, glucuronil y sulfato son encontrados en plasma y excretados en orina; sin embargo, también se encuentran sus formas libres pero en menor proporción. Los principales metabolitos encontrados en heces, orina y suero son los glucurónidos y sulfatos de Urolitina A, así como ácido elálgico dimetil éter glucurónido (Espín y col., 2013).

La importancia de las urolitinas radica en su actividad biológica, ya que se ha demostrado que éstas tienen efecto antioxidante, modulador estrogénico, antiinflamatorio, anticarcinogénico, antimicrobiano e inhibitorio de la glicación proteica (Espín y col., 2013).

### III. JUSTIFICACIÓN

La cáscara, el jugo y la semilla de granada contienen compuestos bioactivos que poseen propiedades benéficas para el organismo. Un proceso de extracción adecuado es necesario para obtener un producto con un alto contenido de antioxidantes. Un proceso de extracción sencillo facilita la utilización del producto, incrementa el consumo y a su vez aumentaría la demanda de la granada como fruta fresca. No existe información sobre el perfil fenólico de extractos de granada entera ni sobre la bioaccesibilidad de dichos compuestos.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la calidad nutracéutica de extractos de granada dulce y ácida así como la bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo *in vivo*.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Producir extractos de granada dulce, ácida y comercial por tres métodos.
- Determinar las características fisicoquímicas de los extractos.
- Estimar la composición fenólica y capacidad antioxidante de los extractos.
- Evaluar la bioaccesibilidad *in vivo* de los compuestos fenólicos presentes en extracto con las mejores características funcionales.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Se cosecharon cuatro lotes de granada dulce y ácida (selección 36-1 y selección 36-3, respectivamente) de la huerta del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Celaya, Guanajuato (Figura 4).

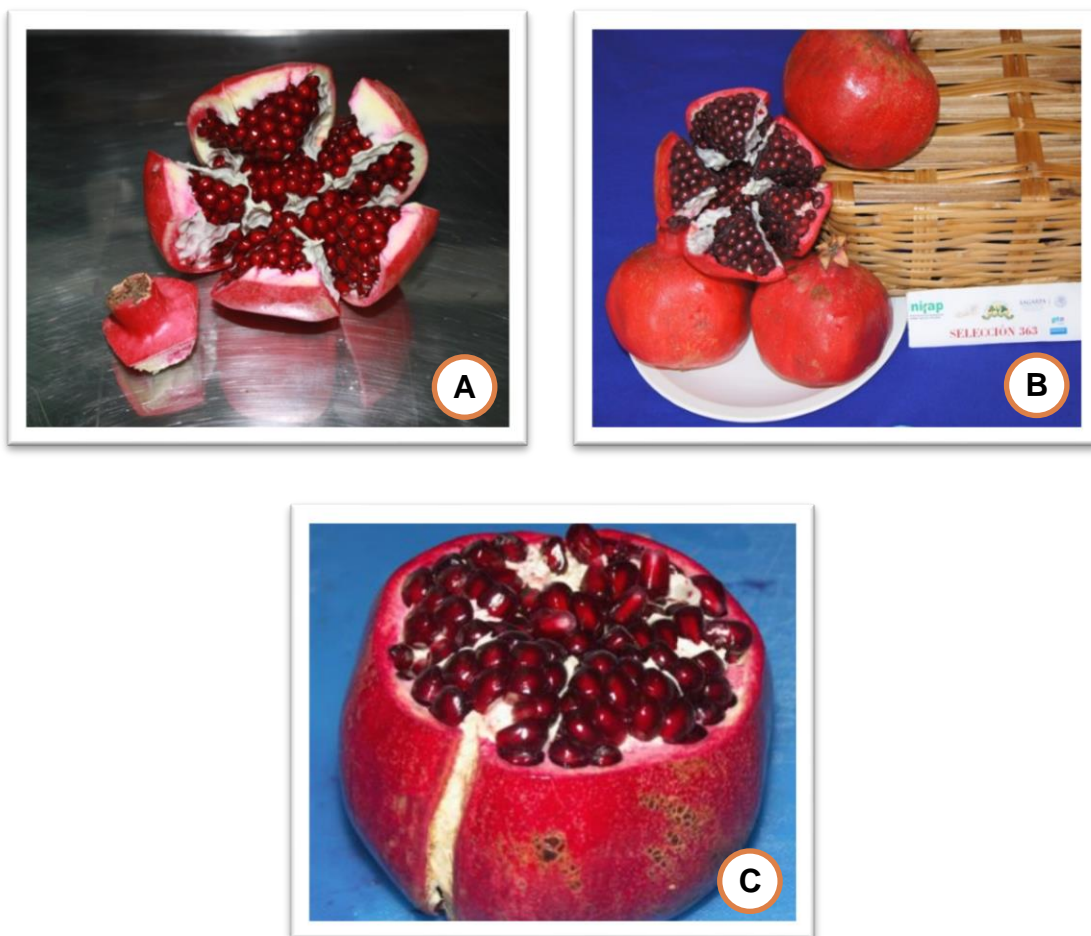


Figura 4. Selecciones de granada evaluadas: A) Selección 36-1 (dulce). B) Selección 36-3 (ácida). C) Variedad Wonderful.

Las frutas se cosecharon en su estado óptimo de madurez, en el periodo de Agosto a Octubre de 2013, mediante el corte con tijera de poda, dejando una

porción del pedúnculo de dos a cinco centímetros para reducir la deshidratación del fruto. Después de la cosecha, se pesaron los frutos, se lavaron, se desinfectaron y se almacenaron a 7 °C hasta su proceso. Con fines comparativos, se adquirió la variedad Wonderful en un centro comercial local y se sometió al mismo tratamiento antes de su almacenamiento.

Para el ensayo *in vivo*, aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (Apéndice A), se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso promedio de 495 g, provistas por el Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla.

## **5.2 Obtención de los extractos de granada**

Para obtener los extractos de granada dulce y ácida, así como de la variedad Wonderful, la fruta entera se cortó en trozos y se hizo pasar por un procesador de jugos eléctrico (Blenda Electric) y después por una malla de nylon para separar el bagazo.

Con fines de comparación, se elaboraron dos extractos por métodos utilizados para la producción comercial de jugo de granada. Uno de ellos, manual, donde los arilos se separaron manualmente de la cáscara y albedo para posteriormente ser prensados a través de una malla de nylon y obtener el extracto. Para obtener el extracto por el otro método se utilizó un exprimidor (International), la granada se cortó por la mitad y se prensó en este equipo.

Una vez obtenidos los diferentes extractos, se centrifugaron durante diez minutos a 8000 r. p. m. y los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

## **5.3 Análisis fisicoquímicos**

### **5.3.1 Rendimiento**

El rendimiento se calculó como mililitros de extracto obtenido por kilogramo de fruta.

### 5.3.2 pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro (Thermo Scientific Orion 3-star, 115/220 VAC) según la AOAC International (Método Oficial 981.12). Las determinaciones en cada muestra se llevaron a cabo por cuadruplicado.

### 5.3.3 Acidez titulable

La acidez titulable se determinó por el método volumétrico (AOAC Método Oficial 942.15), se tomaron 10 mL del extracto y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 mL, posteriormente se le adicionaron 90 mL de agua destilada. Esta solución se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta que el pH alcanzó un valor de 8.1 (valor indicado en la técnica); el volumen conocido de NaOH se utilizó para hacer los cálculos y los resultados se expresaron como gramos de ácido cítrico por litro de extracto:

$$\text{g ác. cítrico/L} = \frac{V * N * \text{Meq}}{\text{mL de muestra}} * 1000$$

Donde:

V = volumen de NaOH consumido

N = normalidad del NaOH

Meq = peso miliequivalente del ácido cítrico (0.0064)

Las determinaciones en cada muestra se llevaron a cabo por cuadruplicado.

### 5.3.4 Sólidos solubles totales

La prueba de sólidos solubles se determinó utilizando un refractómetro (Bausch & Lomb, Abbe-3L; Nueva York, EE.UU.). Cada determinación se realizó calibrando el equipo con agua y posteriormente colocando 0.5 mL del extracto de granada en el refractómetro, obteniendo valores en °Brix. Las determinaciones en cada muestra se llevaron a cabo por cuadruplicado.



### **5.3.5 Índice de madurez**

El índice de madurez o relación sólidos solubles totales/acidez titulable indica la evolución del proceso de maduración después de la recolección. Adicionalmente, algunos autores (Martínez y col., 2006; Rajasekar y col., 2012) han utilizado este índice para clasificar a las granadas en tres grandes grupos: 1) “dulces”, si su IM es de 31 a 98, 2) “agridulces”, de 17 a 24 y 3) “ácidas”, de 5 a 7.

## **5.4 Calidad funcional**

### **5.4.1 Fenoles solubles totales**

Se empleó el método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton y col. (1999). Este método está basado en la reducción de ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio). Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra con 250  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 125 del reactivo Folin-Ciocalteu, esta mezcla se sonicó durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 625  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% y se dejó reposar durante 2 horas en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Concluido ese tiempo se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan EX) a una longitud de onda de 760 nm.

Las concentraciones de fenoles solubles totales se estimaron mediante la elaboración de una curva estándar de calibración y reportadas como equivalentes de ácido gálico por litro de extracto de granada (mg EAG/L).

### **5.4.2 Taninos totales**

El contenido de taninos totales se determinó por medio de la técnica de Harbertson y col. (2002). Primeramente, los extractos se diluyeron en un buffer de etanol al 12% (v/v) (conteniendo 5 g/L de bitartrato de potasio, pH 3.3, ajustado con HCl). Luego, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocó 1 mL de buffer de ácido acético/NaCl (200 mM ácido acético y 170 mM NaCl, pH 4.9 ajustado a con NaOH) conteniendo 1 mg de seroalbúmina bovina. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  del extracto de granada. La mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 min con agitación lenta. Después de la incubación, la mezcla se llevó a

centrifugación a 13500 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió con 250  $\mu\text{L}$  de buffer ácido acético/NaCl. En seguida se procedió a centrifugar a 13500 g durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió nuevamente con 875  $\mu\text{L}$  de buffer TEA/SDS (trietanolamina 5% y dodecil sulfato de sodio 10% (p/v)). Esta nueva mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min. Al término de la incubación el tubo se agitó hasta disolver el precipitado para posteriormente colocar 140  $\mu\text{L}$  de la muestras en placas de 96 pozos y registrar la absorbancia a 510 nm, siendo ésta el factor de corrección. Después de esta lectura se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de cloruro de hierro hexahidratado 20 mM, dejando reposar la mezcla durante diez minutos para finalmente realizar la última lectura de absorbancia a 510 nm.

Los resultados calcularon a partir de la sustracción del factor de corrección a la segunda absorbancia, elaborando una curva de estándar de calibración de (+)catequina, graficando la absorbancia contra la concentración y la ecuación obtenida se aplicó en la determinación de taninos. La concentración final se expresó como miligramos equivalentes de (+)catequina/litro de muestra (mg EC/L).

#### **5.4.3 Flavonoides**

El método usado fue descrito por Oomah y col. (2005), 50  $\mu\text{L}$  de muestra diluida se mezclaron con 180  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de una solución de 2-aminoetildifenilborato al 1% en metanol en una placa de 96 pozos, posteriormente la absorbancia se midió a 404 nm.

Las concentraciones de flavonoides se estimaron mediante la elaboración de una curva estándar de calibración y reportadas como miligramos equivalentes de quercetina por litro de muestra (mg EQ/L).

#### **5.4.4 Antocianinas**

La cuantificación de antocianinas se realizó conforme al método desarrollado por Abdel y Hucl (1999). La reacción que se lleva a cabo durante la cuantificación se realizó a un pH ácido (pH 1) con la finalidad de llevar a las

antocianinas a la forma de ión flavilio que presenta coloración y de esta forma poder cuantificarlas espectrofotométricamente.

Se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de extracto en un tubo falcón, se adicionaron 12 mL de etanol acidificado (etanol/HCl 1 N en proporción 85:15, respectivamente) y se agitó en un vórtex a 8000 r. p. m. durante 30 min, se determinó el pH del extracto directamente desde el tubo; de ser necesario, se ajustó el pH a 1.0 con HCl 4 N este se vertió en un matraz volumétrico y se aforó a 25 mL con etanol acidificado. Se agitó el matraz manualmente por inversión vigorosa; se leyó la muestra a una absorbancia de 535 nm en el espectrofotómetro (6405 UV/Vis, JENWAY). La concentración de antocianinas totales en la muestra se calculó como miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por litro de extracto (mg EC3G/L), según la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (\text{vol}/1000) \times \text{PM} \times (1/\text{peso de la muestra}) \times 10^6$$

Donde:

C = Concentración de antocianinas totales (mg EC3G/L)

A = Absorbancia máxima

$\epsilon$  = Absortividad molar de cianidina 3-glucósido (25, 965  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )

Vol = Volumen total del extracto de antocianinas

PM = Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449)

#### 5.4.5 Punicalagina

Para la detección de punicalagina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC AGILENT 1100 series). Una muestra de 20  $\mu\text{L}$  se analizó con una columna Luna C18 (25 cm x 0.46 cm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ), con una precolumna ODS-C18 (4.0 x 3.0 mm). Se utilizó una fase móvil de ácido fórmico/agua (5:95 v/v) como solvente A y metanol como solvente B. La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El gradiente inició con 1% del solvente B, manteniendo condiciones isocráticas durante 5 min, alcanzando 20 % al minuto 20, 40% al minuto 30, 95% al minuto 35 y 1% después de 41 minutos.

La identificación de la punicalagina se realizó mediante comparación con el tiempo de retención y espectros de absorción de estándares comerciales y su cuantificación se llevó a cabo con curvas de calibración de los mismos. Los isómeros de punicalagina se cuantificaron como ácido elágico (detectados a 360 nm).

#### **5.4.6 Vitamina C por HPLC-DAD**

La determinación del contenido de ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (ADHA) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Corral-Aguayo y col. (2008) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC AGILENT 1100 series). Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada muestra. Se tomaron 1.5 mL de la muestra y se le adicionaron 0.5 mL de 1,2-fenilendiamina preparada en metanol/agua (5:95 v/v) y se incubó por 37 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, transcurrido el tiempo se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se colocó en un vial ámbar para su análisis en HPLC. Se utilizó una columna SB-C18 marca Zorbax (150 x 4.6 mm) y la fase móvil consistió en cetrimida (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 5 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM en metanol/agua (1:99 v/v) a pH 4.6. El flujo fue de 1.5 mL/min y el volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ . El ácido ascórbico se monitoreó a 261 nm y el dehidroascórbico a 348 nm.

La identificación de AA y ADHA se realizó mediante comparación con el tiempo de retención de estándares de AA y ADHA comerciales y su cuantificación se llevó a cabo con curvas de calibración de los mismos. Los valores se reportaron en miligramos de ácido ascórbico por litro (mg AA/L) y miligramos de ácido dehidroascórbico por litro (mg ADHA/L).

#### **5.5 Determinación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante de los extractos se midió utilizando tres metodologías, ABTS, DPPH y FRAP. Para el reporte de los resultados se realizó una curva de calibración de Trolox, reportando los datos como milimoles equivalentes de Trolox por litro (mmol ET/L).

### **5.5.1 Método ABTS**

La capacidad antioxidante se realizó mediante el método descrito por Van den Berg y col. (1999). Este método se basa en el atrapamiento de aniones de larga vida como el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato-HCL) (ABTS<sup>-</sup>). La reacción presenta una coloración intensa y se mide la capacidad antioxidante a través de la decoloración del radical ABTS a 734 nm, por medio de la transferencia de electrones del compuesto antioxidante reaccionando directamente con el radical. El radical ABTS se obtuvo disolviendo 0.0038 g de ABTS (7 mM) en 1 mL de persulfato de potasio (2.45 mM), se almacenó en refrigeración y se protegió de la luz 12 horas antes de su uso. Posteriormente se diluyó con solución amortiguadora de fosfato salino (pH 7.4). Se mezclaron 270 µL de esta solución con 30 µL del extracto, se dejó reposar seis minutos y se procedió a leer la absorbancia a 734 nm.

### **5.5.2 Método DPPH**

El ensayo de neutralización de radicales se determinó como se describe por Clarke y col. (2013), 20 µL del extracto de granada se mezclaron con 180 µL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 400 mM en metanol en una placa de 96 pozos. La placa se mantuvo en la oscuridad durante 15 min, después de lo cual se midió la absorbancia de la solución a 540 nm en un espectrofotómetro.

### **5.5.3 Método FRAP**

El poder antioxidante reductor del hierro (FRAP, por sus siglas en inglés) se determinó como se describe por Clarke y col. (2013), 20 µL del extracto de granada se mezclaron con 180 µL del reactivo FRAP en una placa de 96 pozos, se dejó reposar durante 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. El reactivo FRAP se preparó al momento mezclando buffer de acetato (300 mM, pH 3.6), TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) y FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O (20 mM) en una relación 10:1:1.

## **5.6 Ensayo de bioaccesibilidad**

Se realizó el ensayo de bioaccesibilidad *in vivo* de los extractos elaborados el método del procesador. Los animales se sometieron a una semana de adaptación bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, condiciones controladas de temperatura y humedad ( $22 \pm 2$  °C y  $55 \pm 15\%$ , respectivamente), con acceso libre a comida y agua. Se dividieron en cuatro grupos de cuatro animales cada uno: los de las selecciones dulce y ácida, la variedad Wonderful y un control. Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina y heces.

Durante 72 horas, los animales del grupo control se alimentaron con una dieta estándar y agua, mientras que los grupos de tratamiento se alimentaron con la dieta estándar y el extracto de granada respectivo de acuerdo al grupo de tratamiento. El consumo habitual de compuestos fenólicos se ha calculado en 1 g/día (Bravo, 1998; Manach y col., 2004; Bohn, 2014). En base a esto, el extracto de granada se administró en el agua de beber en una concentración diez veces esta cantidad para una mejor detección de los compuestos. Se recolectaron orina y heces a partir de 12 horas de comenzar el tratamiento. Pasando las 72 horas se sacrificaron los animales.

Para la obtención de muestras de suero sanguíneo se realizó una punción cardiaca, la sangre se recolectó en tubos heparinizados para después ser centrifugados a 8000 r. p. m. durante diez minutos, el suero resultante se colectó en tubos eppendorff. Se recolectaron los contenidos de intestino delgado y ciego. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### **5.6.1 Extracción de compuestos fenólicos en muestras biológicas**

Los contenidos del intestino delgado y ciego, así como las heces, previamente molidas con nitrógeno, se mezclaron con una solución de metanol/ácido clorhídrico/agua (79.9:0.1:20) y se homogeneizaron, después se centrifugaron a 14 000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con un filtro de nylon de 0.2 µm.

Para eliminar sustancias que pudieran interferir con la medición de los compuestos fenólicos en la orina, una vez mezclada con la solución de extracción y centrifugada, el sobrenadante se filtró a través de un cartucho de fase reversa Supel Select HLB 60 mg/3 mL (Supelco Park Bellefonte, PA, EEUU), previamente activado con 10 mL de MeOH y 10 mL de agua, posteriormente los compuestos fenólicos se eluyeron con metanol y finalmente se filtraron las muestras con un filtro de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ .

En el caso del suero, éste se mezcló con una solución de agua que contenía ácido ascórbico (0.2 g/L) y EDTA (1 mg/mL). Para romper posibles uniones de los compuestos fenólicos con proteínas plasmáticas se adicionó ácido fosfórico. Las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 14 000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ .

### **5.6.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante**

Se determinó el contenido de fenoles solubles totales, taninos totales, flavonoides, antocianinas, capacidad antioxidante por ABTS y FRAP de los contenidos de intestino delgado y ciego, heces, orina y suero de los animales, así como el perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS de los contenidos de intestino delgado y ciego, suero, orina, heces, así como del extracto de granada con las mejores características nutracéuticas y de la dieta para roedores de laboratorio.

Las determinaciones de fenoles solubles totales, taninos totales y capacidad antioxidante se llevaron a cabo por medio de las metodologías ya mencionadas en el apartado 5.4. Debido al volumen disponible de las muestras biológicas, las determinaciones de flavonoides y antocianinas se llevaron a cabo por los métodos descritos a continuación, así como la medición de los compuestos fenólicos y sus metabolitos por HPLC-DAD-MSD.

### 5.6.3 Flavonoides

Para la cuantificación de los flavonoides totales se empleó la técnica de quelación con  $\text{AlCl}_3$  (Shams-Ardekani y col., 2011). Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de las muestras con 120  $\mu\text{L}$  de agua y 7  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  5%, se dejó reposar durante 5 min y posteriormente se adicionaron 14  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  10%, se dejó reposar nuevamente durante 5 minutos. Se adicionaron 48  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M y 50  $\mu\text{L}$  de agua, se dejó reposar durante 30 minutos y se leyó su absorbancia a 510 nm.

Las concentraciones de flavonoides se estimaron mediante la elaboración de una curva estándar de calibración y reportadas como microgramos equivalentes de catequina por mg de muestra ( $\mu\text{g EC/mg}$ ).

### 5.6.4 Antocianinas

Se determinó el contenido total de estos pigmentos siguiendo el método desarrollado por Lee (2005) el cual está basado en el cambio reversible de color que experimentan las antocianinas debido a cambios en el pH.

Se mezclaron las muestras con una solución amortiguadora de cloruro de potasio (0.025 M, pH 1.0) para leer la absorbancia a 520 y 700 nm. Posteriormente, se repitió el procedimiento utilizando una solución amortiguadora de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.5). Las absorbancias obtenidas se sustituyeron en la siguiente fórmula para determinar la absorbancia absoluta:

$$A = (\text{Abs}_{520\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}}, \text{pH } 1.0) - (\text{Abs}_{520\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}}, \text{pH } 4.5)$$

Una vez obtenida la absorbancia absoluta, se sustituyó en la ecuación previamente descrita en el punto 5.4.4.

### 5.6.5 Compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Los compuestos fenólicos de los extractos de granada elegidos para el ensayo *in vivo*, la dieta para roedores de laboratorio y las muestras biológicas obtenidas de los animales se identificaron y se cuantificaron por medio de HPLC-



DAD (Agilent 1200), por el método descrito por Figueroa-Pérez y col. (2014). Se inyectó una alícuota de 20  $\mu$ L de cada muestra en una columna de fase reversa (Phenomenex C18 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió en dos solventes: (A) ácido fórmico-agua 1:99 v/v y (B) acetonitrilo en una proporción (A/B) de 98/2 al minuto cero, 68/32 al minuto 30, 45/55 al minuto 48, 5/95 al minuto 53, con un tiempo total de 55 minutos. Las absorbancias se midieron a 280, 320 y 370 nm. La cuantificación se llevó a cabo utilizando estándares de ácidos fenólicos (clorogénico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, protocatecuico, cumárico, ferúlico, sinápico, rosmarínico y elágico) y flavonoides (catequina, rutina, hesperidina, galocatequina galato, epigalocatequina galato, quercetina, naringenina, vainillina, cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido).

#### **5.6.6 Metabolitos de elagitaninos por HPLC-DAD-MSD**

Se llevó a cabo la identificación de los metabolitos provenientes de los elagitaninos por medio de HPLC-DAD-MSD (Agilent 1200). La separación de los compuestos se llevó a cabo con las condiciones descritas en el punto 5.6.5. El espectrómetro de masas se operó en el modo de ion negativo, usando las siguientes condiciones: voltaje capilar, 4000 V; presión del nebulizador, 40 psi; flujo de nitrógeno, 10 L/min; temperatura del gas, 300 °C; voltaje de fragmentador, 130 V; voltaje de octapolo, 150 V. Los espectros de masas se registraron en un rango de 50-1200 m/z.

#### **5.7 Análisis estadístico**

Los resultados de las determinaciones de la caracterización de los extractos son reportados como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de las cuatro repeticiones de cada método de extracción y los tres tipos de granada. Los resultados de los estudios *in vivo* se reportaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EE). El análisis estadístico se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer y la prueba de Dunnett (programa JMP 10.0), con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis fisicoquímicos

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos de los extractos de granada.

Cuadro 2. Rendimiento, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales e índice de madurez de extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.

Muestra		Rendimiento (mL/kg)	pH	Acidez titulable (g AC/L)	Sólidos solubles totales (°Brix)	Índice de madurez
Extracción	Tipo					
Procesador	Dulce	560.3 ± 49.7 <sup>ab</sup>	3.8 ± 0.03 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.9 <sup>d</sup>	16.1 ± 0.3 <sup>bc</sup>	19.4 ± 2.3 <sup>c</sup>
	Ácida	523.4 ± 50.7 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.03 <sup>e</sup>	32.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	18.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>e</sup>
	Wonderful	639.9 ± 82.5 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.03 <sup>d</sup>	19.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	16.2 ± 1.6 <sup>abc</sup>	8.3 ± 1.2 <sup>de</sup>
Exprimidor	Dulce	322.2 ± 12.5 <sup>cd</sup>	3.5 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.5 <sup>d</sup>	14.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	25.2 ± 2.6 <sup>b</sup>
	Ácida	381.6 ± 37.9 <sup>c</sup>	2.8 ± 0.03 <sup>f</sup>	35.2 ± 3.2 <sup>a</sup>	16.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>	4.8 ± 0.5 <sup>e</sup>
	Wonderful	363.7 ± 26.0 <sup>c</sup>	3.1 ± 0.02 <sup>d</sup>	14.7 ± 1.0 <sup>c</sup>	15.9 ± 0.4 <sup>bc</sup>	10.9 ± 0.9 <sup>d</sup>
Manual	Dulce	233.0 ± 19.4 <sup>d</sup>	3.4 ± 0.09 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.6 <sup>d</sup>	16.2 ± 0.3 <sup>abc</sup>	30.3 ± 3.3 <sup>a</sup>
	Ácida	383.6 ± 26.0 <sup>c</sup>	2.8 ± 0.01 <sup>f</sup>	36.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	17.2 ± 0.4 <sup>ab</sup>	4.8 ± 0.3 <sup>e</sup>
	Wonderful	335.4 ± 19.6 <sup>cd</sup>	3.1 ± 0.03 <sup>d</sup>	16.9 ± 2.3 <sup>bc</sup>	15.6 ± 0.6 <sup>bc</sup>	9.4 ± 1.8 <sup>de</sup>

Los valores son presentados como la media ± desviación estándar. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). AC = ácido cítrico.

#### 6.1.1. Rendimiento

Un rendimiento alto es una característica deseada para la industria debido a que se toman muchas decisiones de procesamiento con respecto a este parámetro; así como para el consumidor que desee obtener el máximo provecho de la fruta a un menor costo. En el Cuadro 2 se puede observar que el método de extracción por medio del procesador tiene un mayor rendimiento que los otros dos métodos, siendo el manual el de menor rendimiento. Esto pudiera deberse a que los extractos obtenidos con el exprimidor y procesador poseen gran cantidad de solutos provenientes de la cáscara, albedo y semillas como fibra, o bien, humedad; la misma relación fue encontrada por Rajasekar y col. (2012) en

extracciones elaboradas a partir de la fruta entera y por exprimidor. El rendimiento entre la selección ácida y la variedad Wonderful es muy similar, lo que indica que la granada ácida es igualmente redituable que la variedad Wonderful. En el caso de la granada dulce, ésta tiene un menor rendimiento, debido a que esta fruta contiene menor contenido de arilos en comparación con las otras granadas. Por lo que, para fines de rendimiento, sería más redituable utilizar el método del procesador y preferir la selección ácida o la variedad Wonderful.

### **6.1.2. pH**

El pH de los extractos se vio influenciado por el tipo de granada, siendo la dulce la que tuvo los valores más altos, seguida de la Wonderful y finalmente por la ácida. Los valores de pH encontrados son similares a lo reportado por Mena y col. (2011) para granadas españolas y Wonderful (3.0-4.0). Por otro lado, no se encontraron diferencias muy importantes de acuerdo al método de extracción, lo cual coincide con lo reportado por Rinaldi y col. (2013) y Wasila y col. (2013), quienes evaluaron diferentes procesos de extracción de granada Wonderful y una variedad china, respectivamente.

### **6.1.3. Acidez titulable**

En lo que respecta a la acidez titulable, los valores se encontraron en el rango de 5.4 a 36.3 g ácido cítrico/L, observando diferencias significativas entre los tipos de granada. Los valores más altos de acidez titulable se encontraron en los extractos elaborados a partir de la granada ácida, lo que pudiera estar relacionado con su alto contenido en ácido cítrico, responsable del sabor ácido de esta selección. La acidez titulable es de importancia tecnológica, ya que puede influir en la tasa de crecimiento de los microorganismos en la fruta y sus productos, y por lo tanto afecta a la calidad del extracto y su vida útil (Dumlu y Gürkan, 2007). Por su parte, el extracto de granada dulce presentó los valores más bajos, mientras que el de Wonderful se encontró en un valor intermedio. En lo que respecta al método de extracción, la acidez titulable del extracto obtenido con el procesador no mostró diferencias a los extractos obtenidos con los otros dos métodos.

#### **6.1.4. Sólidos solubles totales**

El contenido de sólidos solubles totales (°Brix) representa la cantidad de glucosa y fructosa que principalmente se acumula en los arilos de la granada y puede variar según el estado de maduración del fruto. Los sólidos solubles totales se encontraron en un rango de 14.9 a 17.2 °Brix, similar a lo encontrado por Sepúlveda y col. (2010), Mena y col. (2011) y Legua y col. (2012) en variedades marroquíes, españolas y chilenas, respectivamente. Cabe destacar que algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico son componentes de los SST, lo que podría explicar los valores más altos obtenidos en la selección ácida. Además de los ácidos orgánicos, en la determinación de los SST quedan incluidos aminoácidos, pigmentos, pectinas solubles y minerales (López et al., 2007). Sin embargo, aunque estadísticamente todos los tratamientos fueron diferentes, no se encontraron diferencias importantes entre las selecciones dulce y ácida y la variedad Wonderful, ni entre el método del procesador y los otros dos métodos.

#### **6.1.5. Índice de madurez**

El índice de madurez osciló entre 4.8 y 30.3, encontrándose importantes diferencias entre los tipos de granada; por otro lado, la extracción por medio del procesador no fue diferente a los otros dos métodos. El extracto de granada dulce obtuvo los valores más altos de IM, el de ácida los más bajos y el de Wonderful se posicionó entre las dos selecciones. Como lo demostró Mena y col. (2011), se encontró que el valor del IM es principalmente influenciado por la acidez titulable ( $r = -0.86$ ,  $p < 0.0001$ ), mientras que no se encontró correlación con los sólidos solubles totales. De acuerdo a su índice de madurez, se han clasificado a las granadas en tres categorías: 1) “dulces”, si su IM es de 31 a 98, 2) “agridulces”, de 17 a 24 y 3) “ácidas”, de 5 a 7 (Martínez, 2006; Rajasekar, 2012). En base a esto, las granadas de selección dulce y ácida se clasifican en las categorías “dulce” y “ácida”, respectivamente, y la variedad Wonderful, en la “agridulce”.

## **6.2. Calidad funcional**

### **6.2.1. Contenido fenólico**

En el Cuadro 3 se pueden observar los contenidos de fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, punicalagina y antocianinas, encontrándose diferencias significativas entre los diferentes métodos de extracción. A excepción de las antocianinas, se observa que entre más componentes de la fruta se incorporan al extracto, mayor es la cantidad de estos compuestos, es decir, el mayor contenido de compuestos fenólicos se encuentra en los extractos elaborados a partir del procesador que contiene el fruto completo, seguido del exprimidor donde se incluyen arilos y parte del albedo y por último el manual, donde se incluyen sólo los arilos, sin semilla. Esto se debe a que existe una gran cantidad compuestos fenólicos, principalmente taninos presentes en la cáscara y el albedo. Las diferencias más significativas se observan en el contenido de taninos. Este mismo efecto ha sido reportado por otros autores, tales como Tzulker y col. (2007) y Miguel y col. (2004). Esto es de gran importancia ya que la cantidad de compuestos extraídos por el método del procesador, a excepción de las antocianinas, es mucho mayor que en los otros dos métodos, por lo que el consumo de un extracto de este tipo podría mostrar mayores efectos benéficos.

Como ya se indicó, en el caso de las antocianinas ocurre el efecto contrario, en los extractos preparados a partir del procesador fueron los componentes minoritarios, mientras su contenido fue mayor en aquéllos preparados por el método manual. Con base en los resultados de este trabajo, no es posible dar alguna explicación del fenómeno; lo que se sabe es que las antocianinas, responsables del color del jugo, se encuentran precisamente en los arilos. Por otro lado, Fischer y col. (2011b) y Türkyilmaz y col. (2013) reportaron que el bajo contenido de antocianinas en extractos obtenidos por medio de exprimidor, puede deberse a las reacciones de condensación de antocianinas monoméricas con otros compuestos fenólicos, o a la oxidación de antocianinas y subsecuentes reacciones de polimerización, dando como resultado su transformación hacia co-pigmentos y/o pigmentos poliméricos, que no son detectados por la técnica utilizada.

Cuadro 3. Contenido fenólico de extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.

Muestra		Contenido fenólico				
Extracción	Tipo	Fenoles solubles totales (mg EAG/L)	Flavonoides (mg EQ/L)	Taninos totales (mg EC/L)	Punicalagina (mg/L)	Antocianinas (mg EC3G/L)
Procesador	Dulce	14639.2 ± 2017.6 <sup>a</sup>	1557.30 ± 204.66 <sup>bc</sup>	28136.3 ± 2205.1 <sup>a</sup>	13.78 ± 0.12 <sup>b</sup>	402.70 ± 47.46 <sup>b</sup>
	Ácida	15458.1 ± 1776.1 <sup>a</sup>	2412.41 ± 246.14 <sup>a</sup>	24718.9 ± 5550.7 <sup>a</sup>	13.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	496.94 ± 74.96 <sup>b</sup>
	Wonderful	12524.8 ± 2195.8 <sup>a</sup>	1779.38 ± 326.53 <sup>b</sup>	12669.5 ± 7197.4 <sup>b</sup>	15.34 ± 0.45 <sup>a</sup>	113.91 ± 39.68 <sup>c</sup>
Exprimidor	Dulce	7714.0 ± 419.6 <sup>b</sup>	1248.71 ± 203.70 <sup>cd</sup>	3714.1 ± 1027.4 <sup>bc</sup>	10.87 ± 0.67 <sup>c</sup>	552.28 ± 71.67 <sup>b</sup>
	Ácida	6123.1 ± 601.3 <sup>b</sup>	829.81 ± 50.51 <sup>de</sup>	3127.7 ± 980.7 <sup>c</sup>	11.32 ± 0.05 <sup>c</sup>	858.36 ± 71.46 <sup>a</sup>
	Wonderful	6783.3 ± 358.4 <sup>b</sup>	945.02 ± 34.25 <sup>de</sup>	2933.3 ± 902.0 <sup>c</sup>	13.34 ± 0.15 <sup>b</sup>	150.23 ± 47.16 <sup>c</sup>
Manual	Dulce	2154.7 ± 200.4 <sup>c</sup>	692.01 ± 81.50 <sup>e</sup>	847.5 ± 182.6 <sup>c</sup>	7.75 ± 1.2 <sup>e</sup>	971.62 ± 120.74 <sup>a</sup>
	Ácida	2284.6 ± 123.4 <sup>c</sup>	593.56 ± 17.56 <sup>e</sup>	941.6 ± 34.2 <sup>c</sup>	8.11 ± 0.3 <sup>e</sup>	945.90 ± 74.20 <sup>a</sup>
	Wonderful	1602.6 ± 60.2 <sup>c</sup>	115.49 ± 5.11 <sup>f</sup>	721.9 ± 253.6 <sup>c</sup>	9.34 ± 0.23 <sup>d</sup>	365.09 ± 96.47 <sup>b</sup>

Los valores son presentados como la media ± desviación estándar. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). EAG = Equivalentes de ácido gálico, EQ = Equivalentes de quercetina, EC = Equivalentes de catequina, EC3G = Equivalentes de cianidin-3-glucósido.

Los extractos de granada dulce y ácida presentaron un mayor contenido de taninos y antocianinas en comparación con la variedad Wonderful, por lo que estas selecciones mexicanas resultan ser mejor opción tratándose de contenido en compuestos funcionales. Lo que sugiere que el consumo de estos extractos o sus productos derivados pudieran mostrar mejores beneficios a la salud que la variedad Wonderful.

### **6.2.2. Vitamina C**

En la Figura 5 se muestran los valores de la vitamina C, lo cuales representan la suma de ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) en los extractos. El contenido de vitamina C se encontró en el rango de 26.8 a 249.4 mg/L. Mena y col. (2011) reportan valores de 80 a 200 mg/L en variedades españolas, mientras que Herrera-Hernández y col. (2013) encontraron un valor máximo de 148 mg/L en una selección desarrollada por INIFAP (36-11). Las muestras preparadas a partir del procesador mostraron un mayor contenido de vitamina C, lo que sugiere que la cáscara de granada tiene cantidades importantes de esta vitamina. Asimismo, se puede observar que las selecciones dulce y ácida presentaron un mayor contenido de vitamina C en comparación con el contenido de vitamina C de la variedad Wonderful. No se observa una tendencia clara en el contenido de ácido ascórbico comparado con el dehidroascórbico; sin embargo, la suma de ambos ácidos es lo que representa mayor significancia ya que, una vez en el organismo, el ADHA es reducido a AA, la forma activa de la vitamina C (Fiorani y col., 2014).

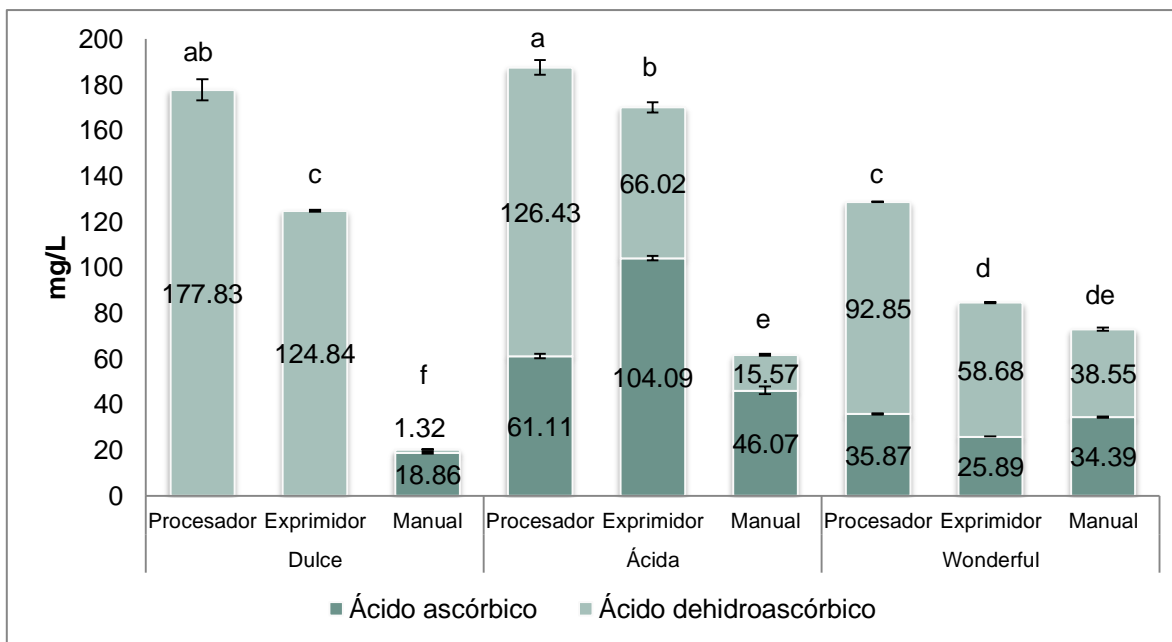


Figura 5. Contenido de ácido ascórbico y dehidroascórbico (mg/L) de los extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

### 6.2.3. Capacidad antioxidante de los extractos de granada

La capacidad antioxidante evaluada por ABTS, DPPH y FRAP de los extractos de granada se vio afectada principalmente por el método de extracción. Los niveles más altos de las tres capacidades antioxidantes fueron las de los extractos obtenidos con el procesador, seguido por los extractos del exprimidor y por último los extractos obtenidos por el método manual (Cuadro 4).

Aunque los extractos elaborados a partir del exprimidor presentaron una capacidad antioxidante de tres a seis veces mayor que los elaborados a partir del método manual, el extracto del procesador presentó una capacidad antioxidante de ocho a once veces mayor que el del manual. Esto resalta la importancia del método de extracción de la granada. Según lo reportado por Tzulker y col. (2007), extractos obtenidos por exprimidor y procesador tienen dos y veinte veces una mayor capacidad antioxidante (DPPH, FRAP) que los jugos elaborados sólo con los arilos, respectivamente, lo que fue asociado a que los primeros tienen mayores



contenidos de compuestos presumiblemente presentes en la cáscara. Por su parte, Gil y col., (2000) reportaron que el jugo de granada obtenido por un extractor triplica los valores antioxidantes en comparación del jugo elaborado a partir de arilos. Esto puede deberse a que la cáscara de granada posee altos niveles de una amplia gama de compuestos bioactivos tales como ácidos fenólicos, flavonoides, compuestos de proantocianidina (Li y col., 2006) y elagitaninos, tales como punicalagina y sus isómeros, así como cantidades menores de punicalina, ácido galágico, ácido elágico y sus glucósidos (Devatkal y col., 2010).

Cuadro 4. Capacidad antioxidante de los extractos de granada dulce, ácida y comercial obtenidos por los diferentes métodos.

Extracción	Tipo	ABTS (mmol TEAC/L)	DPPH (mmol TEAC/L)	FRAP (mmol TEAC/L)
Procesador	Dulce	296.2 ± 32.1 <sup>a</sup>	126.6 ± 14.2 <sup>ab</sup>	107.6 ± 13.0 <sup>ab</sup>
	Ácida	307.5 ± 30.0 <sup>a</sup>	135.2 ± 10.2 <sup>a</sup>	125.2 ± 12.6 <sup>a</sup>
	Wonderful	230.6 ± 48.2 <sup>b</sup>	103.0 ± 20.6 <sup>b</sup>	95.1 ± 18.9 <sup>b</sup>
Exprimidor	Dulce	137.8 ± 19.7 <sup>c</sup>	45.0 ± 6.6 <sup>c</sup>	51.6 ± 6.5 <sup>c</sup>
	Ácida	116.9 ± 5.0 <sup>c</sup>	50.6 ± 5.3 <sup>c</sup>	47.1 ± 0.9 <sup>c</sup>
	Wonderful	114.4 ± 9.2 <sup>c</sup>	46.3 ± 4.9 <sup>c</sup>	47.0 ± 3.3 <sup>c</sup>
Manual	Dulce	26.9 ± 2.4 <sup>d</sup>	13.5 ± 0.9 <sup>d</sup>	14.0 ± 1.0 <sup>d</sup>
	Ácida	28.6 ± 1.5 <sup>d</sup>	14.7 ± 0.4 <sup>d</sup>	15.1 ± 0.9 <sup>d</sup>
	Wonderful	20.1 ± 1.4 <sup>d</sup>	10.2 ± 0.4 <sup>d</sup>	10.2 ± 0.5 <sup>d</sup>

Los valores son presentados como la media ± desviación estándar. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

También se puede apreciar que las selecciones mexicanas tienen una capacidad antioxidante ligeramente mayor que la variedad Wonderful, en especial la granada ácida, lo que pudiera sugerir que estas selecciones representan una mejor alternativa que la variedad Wonderful por la relación que tiene la capacidad antioxidante de algunos alimentos con los beneficios a la salud.

Por otro lado, se llevaron a cabo las correlaciones entre los compuestos fenólicos evaluados y la capacidad antioxidante de los extractos de granada preparados por cada uno de los tres métodos. En el extracto elaborado a partir del

procesador, los compuestos fenólicos se correlacionan con los taninos totales ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.05$ ) (Cuadro 5). Las mediciones de capacidad antioxidante están correlacionadas con el contenido de fenoles solubles totales ( $r = 0.97$ ,  $0.96$  y  $0.95$ , ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente,  $p < 0.0001$ ) y taninos totales ( $r = 0.93$ ,  $0.90$ , ABTS y DPPH, respectivamente,  $p < 0.0001$ ). Tzulker y col. (2007), reportaron que la capacidad antioxidante en homogeneizados de frutas enteras se correlacionó significativamente con fenoles solubles totales ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.01$ ) y punicalagina ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.01$ ) pero no con el contenido total de antocianinas ( $r = -0.34$ ). Adicionalmente, Gil y col. (2000), reportaron que los isómeros de la punicalagina pueden ser responsables de aproximadamente la mitad de la capacidad antioxidante total del extracto.

Cuadro 5. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido a partir del procesador.

	<b>FST</b>	<b>FL</b>	<b>TT</b>	<b>ANT</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>FST</b>	1	0.58*	0.85*	0.41	0.97**	0.96**	0.95**
<b>FL</b>		1	0.28	0.39	0.55	0.61*	0.75*
<b>TT</b>			1	0.62*	0.93**	0.90**	0.78*
<b>ANT</b>				1	0.58*	0.59*	0.53
<b>ABTS</b>					1	0.99**	0.94**
<b>DPPH</b>						1	0.95**
<b>FRAP</b>							1

Los valores representan el valor  $r$  de la correlación. (Correlación de Pearson, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ ). FST = Fenoles solubles totales, FL = Flavonoides, TT = Taninos totales, ANT = Antocianinas.

Por otra parte, en los extractos elaborados a partir del exprimidor los fenoles solubles totales se correlacionaron sólo con los flavonoides ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.05$ ), esto puede deberse a la presencia de flavonoides diferente a las antocianinas como catequina, epicatequina, EGCG, entre otros, que pudieran encontrarse en el albedo. En estos extractos se observa que desaparece la correlación de las antocianinas con la capacidad antioxidante. Gil y col. (2000) reportaron que sólo el 6% de la capacidad antioxidante del jugo de granada

elaborado por exprimidor lo proporcionaban las antocianinas. Solamente la capacidad antioxidante evaluada por ABTS se correlacionó con el contenido de fenoles solubles totales ( $r = 0.60$ ,  $p < 0.05$ ) y flavonoides ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ), por su parte, FRAP se correlaciona únicamente con flavonoides ( $r = 0.70$ ,  $p < 0.05$ ) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido a partir del exprimidor.

	<b>FST</b>	<b>FL</b>	<b>TT</b>	<b>ANT</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>FST</b>	1	0.63*	0.54	-0.29	0.60*	-0.04	0.37
<b>FL</b>		1	0.11	-0.20	0.72*	0.06	0.70*
<b>TT</b>			1	0.01	0.47	0.32	0.37
<b>ANT</b>				1	-0.01	0.11	-0.08
<b>ABTS</b>					1	0.46	0.90**
<b>DPPH</b>						1	0.59*
<b>FRAP</b>							1

Los valores representan el valor  $r$  de la correlación. (Correlación de Pearson, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ ). FST = Fenoles solubles totales, FL = Flavonoides, TT = Taninos totales, ANT = Antocianinas.

Finalmente, en el método manual, el contenido de fenoles solubles totales está correlacionado con los flavonoides ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.05$ ) y antocianinas ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.05$ ), y éstas a su vez se correlacionan con la capacidad antioxidante del extracto ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.0001$ ;  $r = 0.88$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.92$ ,  $p < 0.0001$ , ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente) (Cuadro 7). Estos resultados coinciden con lo reportado por Tzulker y col. (2007).

Cuadro 7. Correlación entre fenoles solubles totales, flavonoides, taninos totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto de granada obtenido por el método manual.

	<b>FST</b>	<b>FL</b>	<b>TT</b>	<b>ANT</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>FST</b>	1	0.87*	0.43	0.87*	0.95**	0.94**	0.92**
<b>FL</b>		1	0.35	0.91**	0.88*	0.89*	0.91**
<b>TT</b>			1	0.37	0.40	0.55	0.47
<b>ANT</b>				1	0.90**	0.88*	0.92**
<b>ABTS</b>					1	0.95**	0.98**
<b>DPPH</b>						1	0.96**
<b>FRAP</b>							1

Los valores representan el valor  $r$  de la correlación. (Correlación de Pearson, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ ). FST = Fenoles solubles totales, FL = Flavonoides, TT = Taninos totales, ANT = Antocianinas.

Cabe mencionar que se llevaron a cabo las correlaciones con Vitamina C; sin embargo, ésta no mostró valores significativos con la capacidad antioxidante en ninguno de los tres métodos de extracción.

Los extractos elaborados con procesador presentaron la mayor cantidad de compuestos fenólicos, taninos totales y capacidad antioxidante que los extractos elaborados por los otros dos métodos; es decir, un extracto elaborado a partir del fruto entero presenta mejores características nutracéuticas que un jugo comercial de granada.

### 6.3. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos

En un estudio de bioaccesibilidad es necesario determinar el perfil de compuestos fenólicos de los tratamientos con la finalidad de establecer un punto de partida. Además, con la finalidad de detectar posibles interferencias en la interpretación de los resultados, se determinó el perfil fenólico de la dieta para roedores de laboratorio, adicionalmente a los extractos utilizados para los tratamientos (Cuadro 8). En la dieta no se observaron cantidades significativas de ningún compuesto fenólico; sin embargo, en el extracto de la variedad Wonderful se presentan grandes cantidades de los ácidos cafeico, protocatecuico, gálico y

cumárico. Estos compuestos fueron reportados anteriormente por Fischer y col. (2011a) en un extracto elaborado a partir del exprimidor: 6.1, 0.8, 2.1 y 0.6 mg/L, respectivamente, cantidades menores a las encontradas en este estudio. El ácido 4-hidroxibenzoico es otro de los compuestos predominantes en esta variedad (27.56 mg/L) y anteriormente se ha reportado en valores de 7.01 mg/L (Herrera-Hernández y col., 2013) en un extracto elaborado a partir de los arilos. Aunque epicatequina y el ácido clorogénico también forman parte de los compuestos mayoritarios de este extracto, no han sido reportados en otros estudios. Además, a excepción de la epicatequina, se encontró que los valores de dichos compuestos en la variedad Wonderful son estadísticamente menores a los encontrados en las selecciones dulce o ácida, desarrolladas por el INIFAP.

Adicionalmente a la capacidad antioxidante, se han reportado otras actividades biológicas de los ácidos fenólicos, tales como la disminución de marcadores relacionados con el proceso de inflamación (Russell y Duthie, 2011); se ha demostrado que los ácidos cafeico y clorogénico exhiben actividades antimutagénicas, carcinógenos y antioxidantes *in vitro* (Sato y col., 2010). Se ha demostrado que el ácido protocatecuico posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, así como hipoglucemiantes y neuroprotectoras; además, la acción quimiopreventiva de ácido protocatecuico ha sido evaluada en varios modelos de carcinogénesis *in vivo* y se ha reportado que puede ser utilizado para prevenir las enfermedades cardiovasculares (Tanaka y col., 2011; Masella y col., 2012; Tang y col., 2014). El ácido gálico puede interferir en diferentes etapas de desarrollo de tumores, es responsable de la supresión de la angiogénesis; asimismo tiene capacidad antiviral, antidiabética y previene la peroxidación lipídica y aterosclerosis (Lu y col., 2010; Punithavathi y col., 2011). Mientras que el ácido cumárico ha demostrado propiedades antiinflamatorias (Russell y Duthie, 2011).

Cuadro 8. Perfil fenólico de la dieta para roedores de laboratorio y de los extractos de granada dulce, ácida y comercial utilizados para los tratamientos.

Compuesto fenólico	Dieta (mg/kg)	Tratamientos (mg/L)		
		Dulce	Ácida	Wonderful
Ácido Clorogénico (2.4)	0.29 ± 0.00	24.96 ± 0.45 <sup>a</sup>	11.83 ± 0.16 <sup>c</sup>	17.77 ± 0.16 <sup>b</sup>
Epicatequina (3.1)	1.17 ± 0.01	56.99 ± 0.60 <sup>b</sup>	35.32 ± 0.42 <sup>c</sup>	62.05 ± 0.44 <sup>a</sup>
Catequina (4.1)	0.19 ± 0.00	0.33 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.01 <sup>a</sup>	DLD
Ci-3-gluc (7.9)	DLD	43.52 ± 1.49 <sup>b</sup>	80.64 ± 0.75 <sup>a</sup>	5.96 ± 0.52 <sup>c</sup>
Ácido Gálico (9.4)	DLD	33.74 ± 0.47 <sup>a</sup>	32.80 ± 0.25 <sup>a</sup>	20.19 ± 0.09 <sup>b</sup>
Pel-3-gluc (10.5)	DLD	9.29 ± 1.04 <sup>c</sup>	28.26 ± 0.45 <sup>a</sup>	12.33 ± 0.36 <sup>b</sup>
Ácido 4-HB (12.1)	DLD	32.96 ± 0.51 <sup>a</sup>	18.03 ± 0.24 <sup>b</sup>	13.69 ± 0.13 <sup>c</sup>
Ácido Cafeico (14.1)	0.15 ± 0.00	46.08 ± 0.39 <sup>c</sup>	85.81 ± 0.60 <sup>a</sup>	64.31 ± 0.77 <sup>b</sup>
Kaempferol (14.3)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido protocatecuico (15.7)	DLD	61.29 ± 0.69 <sup>a</sup>	50.19 ± 0.81 <sup>b</sup>	27.56 ± 0.29 <sup>c</sup>
Ácido cumárico (16.9)	0.35 ± 0.00	8.26 ± 0.10 <sup>c</sup>	14.27 ± 0.20 <sup>a</sup>	10.62 ± 0.13 <sup>b</sup>
Ácido ferúlico (18.7)	2.48 ± 0.03	5.41 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.52 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.04 <sup>b</sup>
Ácido sinápico (19.3)	DLD	DLD	1.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	3.99 ± 0.04 <sup>a</sup>
Eriocitrina (19.6)	DLD	1.31 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.01 <sup>c</sup>
Rutina (20.4)	0.34 ± 0.01	3.91 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.16 <sup>b</sup>
Ácido rosmarínico (22.4)	0.13 ± 0.00	2.68 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>c</sup>
Hesperidina (24.0)	0.02 ± 0.00	0.35 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>b</sup>
GCG (24.8)	0.14 ± 0.00	DLD	0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>	DLD
EGCG (26.1)	3.50 ± 0.04	DLD	DLD	DLD
Quercetina (27.5)	DLD	0.06 ± 0.00 <sup>a</sup>	DLD	DLD
Ácido elágico (30.3)	0.08 ± 0.00	DLD	DLD	DLD
Naringenina (31.9)	0.05 ± 0.00	0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>
Vainillina (35.2)	0.03 ± 0.00	0.27 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>b</sup>

Los valores son presentados como la media ± error estándar. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). Ci-3-gluc = Cianidina-3-glucósido; Pel-3-gluc = Pelargonidina-3-glucósido; Ácido 4-HB = Ácido 4-hidroxibenzoico; GCG = Galocatequina galato; EGCG = Epigalocatequina galato; DLD = Debajo del límite de detección.

En cuanto a las antocianinas evaluadas, la mayor diferencia entre los tratamientos evaluados se encuentra en cianidina-3-gluósido, encontrándose que las selecciones mexicanas presentaron una mayor concentración de este compuesto en comparación de la variedad Wonderful. Esto puede deberse a las variaciones en los cultivares, temporada de la cosecha, temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento, entre otros factores (Miguel y col., 2004; Fischer y col., 2011b). Este compuesto es de importancia ya que se ha encontrado que puede reducir la ganancia de peso corporal y atenuar la dislipidemia y la resistencia a la insulina asociadas a la obesidad en ratas (Yu y col., 2014).

En el Cuadro 9 se muestran los resultados de las determinaciones de fenoles solubles totales, flavonoides y taninos totales de los contenidos de intestino delgado y ciego, así como de heces, suero y orina de los animales. Cabe destacar que en ninguna de las muestras se detectaron antocianinas (datos no mostrados). Esto puede deberse a su absorción en estómago y su rápido metabolismo e ingreso a otros tejidos, por lo que no se detectaron en suero ni orina, o bien, a su degradación y/o polimerización con otros compuestos fenólicos.

Los valores de fenoles solubles totales no mostraron diferencias en intestino delgado frente al control; sin embargo, en ciego y en heces los tratamientos muestran valores mayores al control. Esto puede deberse a que después de ser hidrolizados, los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos quedan disponibles, siendo más fácil su detección que cuando estaban conjugados. Tanto en suero como en orina, el único tratamiento mayor al control fue el del extracto de granada ácida. Este efecto pudiera estar relacionado a que dicha selección presenta una mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación de las otras granadas (Cuadro 3), así como a una mayor tasa de absorción de estos compuestos.

Con respecto al contenido de flavonoides, no se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control en el contenido de intestino delgado, suero y orina; sin embargo, los tres tratamientos presentaron valores mayores al control en el contenido del ciego, esto pudiera deberse al aumento de catequina por la hidrólisis de otros flavan-3-oles. Por otro lado, en heces, los tratamientos de los extractos de granada dulce y Wonderful mostraron valores más altos que el control, lo que sugiere que existe una menor absorción de estos compuestos en dichos tratamientos en comparación del tratamiento con granada ácida.

Cuadro 9. Contenido fenólico del contenido de intestino delgado, contenido de ciego, heces, suero y orina de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Muestra	Tratamiento	Fenoles solubles totales	Flavonoides	Taninos totales
I. Delgado	Dulce	24.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	1346.1 $\pm$ 15.0 <sup>a</sup>	1742.8 $\pm$ 105.4 <sup>a*</sup>
	Ácida	24.4 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	1424.1 $\pm$ 169.9 <sup>a</sup>	1586.1 $\pm$ 104.3 <sup>a*</sup>
	Wonderful	24.5 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1345.9 $\pm$ 35.0 <sup>a</sup>	1392.3 $\pm$ 88.1 <sup>a*</sup>
	Control	22.6 $\pm$ 1.1	1284.8 $\pm$ 126.2	DLD
Ciego	Dulce	161.9 $\pm$ 4.5 <sup>a*</sup>	16947.3 $\pm$ 58.4 <sup>a*</sup>	21693.0 $\pm$ 354.9 <sup>a*</sup>
	Ácida	153.6 $\pm$ 5.4 <sup>a*</sup>	17739.3 $\pm$ 290.0 <sup>a*</sup>	26211.5 $\pm$ 1174.1 <sup>a*</sup>
	Wonderful	142.6 $\pm$ 3.3 <sup>a*</sup>	16481.9 $\pm$ 465.0 <sup>a*</sup>	23622.4 $\pm$ 886.4 <sup>a*</sup>
	Control	113.4 $\pm$ 4.2	13372.4 $\pm$ 698.3	5715.1 $\pm$ 1513.1
Heces	Dulce	84.8 $\pm$ 1.4 <sup>a*</sup>	12912.4 $\pm$ 438.3 <sup>a*</sup>	15946.6 $\pm$ 2135.1 <sup>a*</sup>
	Ácida	80.7 $\pm$ 3.2 <sup>a*</sup>	11668.4 $\pm$ 399.0 <sup>a</sup>	13426.9 $\pm$ 840.1 <sup>a*</sup>
	Wonderful	82.5 $\pm$ 2.3 <sup>a*</sup>	13834.8 $\pm$ 201.5 <sup>a*</sup>	16728.1 $\pm$ 583.7 <sup>a*</sup>
	Control	61.1 $\pm$ 2.8	9484.4 $\pm$ 545.8	3904.4 $\pm$ 107.3
Suero	Dulce	8.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	303.8 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	DLD
	Ácida	9.7 $\pm$ 0.2 <sup>a*</sup>	287.6 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	DLD
	Wonderful	8.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	306.3 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	DLD
	Control	7.7 $\pm$ 0.4	305.0 $\pm$ 8.0	DLD
Orina	Dulce	9.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	751.0 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	DLD
	Ácida	14.2 $\pm$ 0.8 <sup>a*</sup>	976.4 $\pm$ 95.2 <sup>a</sup>	DLD
	Wonderful	9.4 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	784.1 $\pm$ 53.5 <sup>a</sup>	DLD
	Control	7.6 $\pm$ 0.3	694.4 $\pm$ 14.3	DLD

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). DLD = Debajo del límite de detección.

En lo que respecta a los taninos totales, tanto en los contenidos de intestino delgado y ciego como en heces, los tratamientos muestran valores mayores a los del control, posiblemente por la presencia de punicalagina en los extractos de granada. Además, no se muestran diferencias entre los tratamientos, lo que pudiera indicar que poseen una cantidad similar de este compuesto. Por otro lado, no se encontraron taninos en suero ni en orina debido a que estos compuestos no son absorbidos íntegros, son hidrolizados en el colon y los metabolitos resultantes de la acción de la flora bacteriana son absorbidos.

De manera más particular se evaluaron los perfiles fenólicos de las diferentes muestras biológicas de cada tratamiento y del control (Cuadros 10-15).



Los compuestos que no son absorbidos en el estómago llegan al intestino delgado, en donde se lleva a cabo la degradación de los compuestos fenólicos así como su absorción y posterior metabolismo de fase II (Cuadro 10). Aquellos compuestos fenólicos que no son absorbidos en intestino delgado pasan a la primera sección del intestino grueso, el ciego (Cuadro 11), en donde hay una alta concentración de flora microbiana, capaz de transformar los compuestos fenólicos en sus metabolitos. En algunos casos estos últimos pueden tener mayor bioactividad que los compuestos fenólicos de los que provienen, influyendo tanto en la salud del colon como en la microbiota colónica, de ahí la importancia de su identificación (Cuadro 12). Los compuestos fenólicos que no son absorbidos o que son secretados nuevamente al lumen intestinal, así como sus metabolitos, son eliminados por medio de las heces (Cuadro 13), mientras que los que son absorbidos, ya sea en estómago o intestinos, pasan al torrente sanguíneo para ser transportados a los diferentes órganos y tejidos. Como se mencionó anteriormente, su presencia en sangre no es un buen indicador de la absorción de los mismos, ya que su metabolismo y transporte puede llevarse a cabo rápidamente, lo que puede dificultar su valoración en suero (Cuadro 14). Sin embargo, la presencia de los compuestos fenólicos en la orina (Cuadro 15) indica que éstos se absorbieron, pasaron al torrente sanguíneo y se transportaron a los diferentes órganos y tejidos para llegar finalmente al riñón y ser excretados.

Cuadro 10. Perfil fenólico del contenido de intestino delgado de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuesto fenólico (tiempo de retención)	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Ácido clorogénico (2.4)	3.70 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	3.10 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	5.57 $\pm$ 0.67 <sup>a*</sup>	2.23 $\pm$ 3.13
Epicatequina (3.1)	67.98 $\pm$ 10.65 <sup>ab</sup>	55.91 $\pm$ 3.29 <sup>b</sup>	88.76 $\pm$ 3.41 <sup>a*</sup>	48.41 $\pm$ 15.28
Catequina (4.1)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ci-3-gluc (7.9)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido gálico (9.4)	DLD	DLD	DLD	DLD
Pel-3-gluc (10.5)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido 4-HB (12.1)	1.61 $\pm$ 0.26 <sup>a*</sup>	DLD <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	DLD
Ácido cafeico (14.1)	0.97 $\pm$ 0.23 <sup>a*</sup>	0.69 $\pm$ 0.17 <sup>a*</sup>	0.53 $\pm$ 0.08 <sup>a*</sup>	DLD
Kaempferol (14.3)	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.14
Ácido protocatecuico (15.7)	0.32 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.02
Ácido cumárico (16.9)	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.05
Ácido ferúlico (18.7)	3.70 $\pm$ 2.75 <sup>a*</sup>	0.75 $\pm$ 0.20 <sup>a*</sup>	3.42 $\pm$ 0.60 <sup>a*</sup>	DLD
Ácido sinápico (19.3)	DLD	DLD	DLD	DLD
Eriocitrina (19.6)	DLD	DLD	DLD	DLD
Rutina (20.4)	DLD <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>a*</sup>	DLD <sup>b</sup>	DLD
Ácido rosmarínico (22.4)	0.86 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	3.26 $\pm$ 0.27 <sup>ab*</sup>	4.31 $\pm$ 1.07 <sup>a*</sup>	0.90 $\pm$ 0.12
Hesperidina (24.0)	DLD <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a*</sup>	DLD <sup>b</sup>	DLD
GCG (24.8)	0.33 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.02
EGCG (26.1)	1.75 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	11.51 $\pm$ 3.47 <sup>a</sup>	5.01 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	2.41 $\pm$ 0.42
Quercetina (27.5)	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.04
Ácido elágico (30.3)	1.81 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.13 <sup>b*</sup>	DLD <sup>c</sup>	1.34 $\pm$ 0.18
Naringenina (31.9)	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.31
Vainillina (35.2)	1.54 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	0.39 $\pm$ 0.05 <sup>b*</sup>	1.25 $\pm$ 0.16

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). Ci-3-gluc = Cianidina-3-glucósido; Pel-3-gluc = Pelargonidina-3-glucósido; Ácido 4-HB = Ácido 4-hidroxibenzoico; GCG = Galocatequina galato; EGCG = Epigalocatequina galato; DLD = Debajo del límite de detección.

Cuadro 11. Perfil fenólico del contenido de ciego de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuesto fenólico (tiempo de retención)	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Ácido clorogénico (2.4)	25.86 $\pm$ 2.62 <sup>ab*</sup>	30.78 $\pm$ 2.13 <sup>a*</sup>	19.92 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	17.51 $\pm$ 0.60
Epicatequina (3.1)	1.69 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>	3.42 $\pm$ 0.36 <sup>a*</sup>	1.40 $\pm$ 0.21
Catequina (4.1)	10.19 $\pm$ 4.46 <sup>a*</sup>	0.34 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	DLD <sup>b</sup>	DLD
Ci-3-gluc (7.9)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido gálico (9.4)	115.46 $\pm$ 26.88 <sup>a</sup>	108.56 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	113.05 $\pm$ 9.98 <sup>a</sup>	102.44 $\pm$ 6.30
Pel-3-gluc (10.5)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido 4-HB (12.1)	3.08 $\pm$ 0.53 <sup>a*</sup>	1.30 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	2.00 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	0.68 $\pm$ 0.00
Ácido Cafeico (14.1)	4.90 $\pm$ 0.73 <sup>a*</sup>	3.40 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	2.05 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	2.44 $\pm$ 0.28
Kaempferol (14.3)	0.62 $\pm$ 0.13 <sup>a*</sup>	1.37 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.10
Ácido protocatecuico (15.7)	0.33 $\pm$ 0.08 <sup>a*</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a*</sup>	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>a*</sup>	DLD
Ácido cumárico (16.9)	2.73 $\pm$ 0.15 <sup>a*</sup>	1.20 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.11
Ácido ferúlico (18.7)	2.30 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.20
Ácido sinápico (19.3)	1.15 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	4.53 $\pm$ 0.52 <sup>a*</sup>	2.78 $\pm$ 0.47 <sup>ab</sup>	2.39 $\pm$ 0.16
Eriocitrina (19.6)	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>b*</sup>	0.39 $\pm$ 0.08 <sup>b*</sup>	1.68 $\pm$ 0.21 <sup>a*</sup>	0.89 $\pm$ 0.08
Rutina (20.4)	0.76 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.11
Ácido rosmarínico (22.4)	1.11 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.10
Hesperidina (24.0)	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>a*</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a*</sup>	DLD
GCG (24.8)	2.05 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	12.38 $\pm$ 2.68 <sup>a*</sup>	3.26 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.01
EGCG (26.1)	9.89 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	8.33 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	14.47 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>	9.44 $\pm$ 1.38
Quercetina (27.5)	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01
Ácido elágico (30.3)	49.97 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	48.73 $\pm$ 3.89 <sup>a</sup>	54.24 $\pm$ 5.60 <sup>a</sup>	68.24 $\pm$ 6.60
Naringenina (31.9)	6.05 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	6.87 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	6.10 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	6.54 $\pm$ 0.78
Vainillina (35.2)	0.90 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	1.73 $\pm$ 0.36 <sup>a*</sup>	0.59 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.13

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). Ci-3-gluc = Cianidina-3-glucósido; Pel-3-gluc = Pelargonidina-3-glucósido; Ácido 4-HB = Ácido 4-hidroxibenzoico; GCG = Galocatequina galato; EGCG = Epigalocatequina galato; DLD = Debajo del límite de detección.

Cuadro 12. Metabolitos de elagitaninos identificados en contenido de ciego de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Metabolito (tiempo de retención)	m/z	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Urolitina A (7.2)	227	25.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	28.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	25.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	DLD
Urolitina C (30.4)	243	12.5 $\pm$ 0.8 <sup>a*</sup>	11.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	20.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	31.1 $\pm$ 2.8
Urolitina M6 (38.4)	275	34.3 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 4.1 <sup>a*</sup>	25.6 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	25.7 $\pm$ 3.1
Urolitina A-glucurónido (42.6)	403	14.1 $\pm$ 0.5 <sup>a*</sup>	10.4 $\pm$ 2.5 <sup>a*</sup>	17.8 $\pm$ 2.4 <sup>a*</sup>	30.4 $\pm$ 4.8
Urolitina B-glucurónido (44.9)	387	13.3 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>	10.8 $\pm$ 0.2 <sup>b*</sup>	18.0 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	34.8 $\pm$ 4.1

Los valores son presentados como porcentaje (%). Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). DLD = Debajo del límite de detección.

Cuadro 13. Perfil fenólico de heces de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuesto fenólico (tiempo de retención)	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Ácido clorogénico (2.4)	3.13 $\pm$ 0.45 <sup>a*</sup>	3.46 $\pm$ 0.19 <sup>a*</sup>	2.78 $\pm$ 0.19 <sup>a*</sup>	1.41 $\pm$ 0.23
Epicatequina (3.1)	5.17 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	10.31 $\pm$ 1.41 <sup>a*</sup>	5.96 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	5.33 $\pm$ 0.40
Catequina (4.1)	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.84 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.06
Ci-3-gluc (7.9)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido gálico (9.4)	12.20 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	13.64 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	14.28 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	8.92 $\pm$ 0.65
Pel-3-gluc (10.5)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido 4-HB (12.1)	2.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	2.86 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.19 $\pm$ 0.24
Ácido cafeico (14.1)	1.59 $\pm$ 0.22 <sup>a*</sup>	0.98 $\pm$ 0.22 <sup>a*</sup>	1.96 $\pm$ 0.28 <sup>a*</sup>	DLD
Kaempferol (14.3)	1.39 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.54 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.61 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.26
Ácido protocatecuico (15.7)	0.51 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.09
Ácido cumárico (16.9)	2.16 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	2.23 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	2.26 $\pm$ 0.18
Ácido ferúlico (18.7)	1.31 $\pm$ 0.34 <sup>a*</sup>	0.97 $\pm$ 0.11 <sup>a*</sup>	0.76 $\pm$ 0.06 <sup>a*</sup>	DLD
Ácido sinápico (19.3)	1.33 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	DLD <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.73 $\pm$ 0.03
Eriocitrina (19.6)	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>a*</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>a*</sup>	0.46 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.16
Rutina (20.4)	1.51 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.16
Ácido rosmarínico (22.4)	3.31 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	5.74 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	2.29 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.50
Hesperidina (24.0)	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	DLD <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.00
GCG (24.8)	1.35 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	13.61 $\pm$ 0.27 <sup>a*</sup>	4.57 $\pm$ 0.57 <sup>b*</sup>	1.30 $\pm$ 0.06
EGCG (26.1)	DLD	DLD	DLD	DLD
Quercetina (27.5)	0.14 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a*</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.01
Ácido elágico (30.3)	40.62 $\pm$ 1.14 <sup>a*</sup>	37.31 $\pm$ 5.62 <sup>a</sup>	45.11 $\pm$ 2.62 <sup>a*</sup>	30.59 $\pm$ 0.72
Naringenina (31.9)	4.24 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	3.98 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	4.55 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.04
Vainillina (35.2)	DLD <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	0.41 $\pm$ 0.01 <sup>a*</sup>	DLD

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). Ci-3-gluc = Cianidina-3-glucósido; Pel-3-gluc = Pelargonidina-3-glucósido; Ácido 4-HB = Ácido 4-hidroxibenzoico; GCG = Galocatequina galato; EGCG = Epigalocatequina galato; DLD = Debajo del límite de detección.

Cuadro 14. Perfil fenólico de suero de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuesto fenólico (tiempo de retención)	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Ácido clorogénico (2.4)	3.31 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	2.40 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	2.92 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.57
Epicatequina (3.1)	2.63 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	4.16 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	3.66 $\pm$ 0.21
Ácido elágico (30.3)	DLD <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	DLD <sup>b</sup>	DLD

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). DLD = Debajo del límite de detección.

Cuadro 15. Perfil fenólico de orina de los tres tratamientos y el control ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuesto fenólico (tiempo de retención)	Dulce	Ácida	Wonderful	Control
Ácido clorogénico (2.4)	1.41 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	1.56 $\pm$ 0.11
Epicatequina (3.1)	12.42 $\pm$ 0.56 <sup>a*</sup>	13.82 $\pm$ 1.44 <sup>a*</sup>	11.72 $\pm$ 0.40 <sup>a*</sup>	6.13 $\pm$ 0.84
Catequina (4.1)	0.44 $\pm$ 0.03 <sup>a*</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>a*</sup>	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.04
Ci-3-gluc (7.9)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido gálico (9.4)	25.74 $\pm$ 2.92 <sup>a*</sup>	33.80 $\pm$ 2.72 <sup>a*</sup>	26.45 $\pm$ 2.15 <sup>a*</sup>	13.26 $\pm$ 0.88
Pel-3-gluc (10.5)	DLD	DLD	DLD	DLD
Ácido 4-HB (12.1)	5.51 $\pm$ 0.49 <sup>a*</sup>	2.04 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.68 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.12
Ácido cafeico (14.1)	4.14 $\pm$ 0.46 <sup>b*</sup>	9.71 $\pm$ 0.58 <sup>a*</sup>	7.38 $\pm$ 0.88 <sup>a*</sup>	1.12 $\pm$ 0.02
Kaempferol (14.3)	2.31 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	3.54 $\pm$ 0.75 <sup>a*</sup>	2.68 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.08
Ácido protocatecuico (15.7)	2.74 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	5.83 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	2.74 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	3.06 $\pm$ 0.40
Ácido cumárico (16.9)	2.09 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	1.87 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.24
Ácido ferúlico (18.7)	4.18 $\pm$ 0.41 <sup>c*</sup>	9.62 $\pm$ 0.42 <sup>a*</sup>	7.38 $\pm$ 0.23 <sup>b*</sup>	2.68 $\pm$ 0.01
Ácido sinápico (19.3)	52.70 $\pm$ 1.50 <sup>c*</sup>	143.21 $\pm$ 5.29 <sup>a*</sup>	73.72 $\pm$ 0.95 <sup>b*</sup>	20.34 $\pm$ 1.42
Eriocitrina (19.6)	DLD <sup>b</sup>	5.13 $\pm$ 0.02 <sup>a*</sup>	DLD <sup>b</sup>	DLD
Rutina (20.4)	6.88 $\pm$ 0.66 <sup>b*</sup>	10.40 $\pm$ 0.73 <sup>a*</sup>	4.98 $\pm$ 0.63 <sup>b*</sup>	1.21 $\pm$ 0.23
Ácido rosmarínico (22.4)	6.63 $\pm$ 0.62 <sup>b*</sup>	9.20 $\pm$ 0.21 <sup>a*</sup>	7.65 $\pm$ 0.57 <sup>ab*</sup>	1.62 $\pm$ 0.19
Hesperidina (24.0)	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.13 <sup>a*</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	DLD
GCG (24.8)	24.69 $\pm$ 3.57 <sup>a*</sup>	30.66 $\pm$ 1.79 <sup>a*</sup>	12.88 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>	10.79 $\pm$ 0.32
EGCG (26.1)	29.91 $\pm$ 3.08 <sup>b</sup>	59.42 $\pm$ 3.01 <sup>a*</sup>	21.45 $\pm$ 1.75 <sup>b</sup>	24.38 $\pm$ 2.37
Quercetina (27.5)	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.10 <sup>a*</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.01
Ácido elágico (30.3)	61.11 $\pm$ 4.21 <sup>b</sup>	108.19 $\pm$ 8.72 <sup>a*</sup>	109.68 $\pm$ 9.57 <sup>a*</sup>	47.80 $\pm$ 3.82
Naringenina (31.9)	DLD <sup>c</sup>	0.77 $\pm$ 0.06 <sup>a*</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.57 $\pm$ 0.08
Vainillina (35.2)	2.77 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	3.47 $\pm$ 0.27 <sup>a*</sup>	1.98 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.96 $\pm$ 0.13

Los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con asterisco en la misma fila indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia entre tratamientos (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ). Ci-3-gluc = Cianidina-3-glucósido; Pel-3-gluc = Pelargonidina-3-glucósido; Ácido 4-HB = Ácido 4-hidroxibenzoico; GCG = Galocatequina galato; EGCG = Epigalocatequina galato; DLD = Debajo del límite de detección.

Los ácidos clorogénico, gálico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, protocatecuico y cumárico fueron los ácidos fenólicos mayoritarios detectados en los extractos de granada. Posterior a su ingesta, se encontró una concentración muy baja de estos ácidos en el intestino delgado. Sin embargo, una vez en el ciego, los ácidos fenólicos aumentan considerablemente; mientras que en heces disminuyen sus valores. Posteriormente, en suero, los únicos ácidos presentes son el clorogénico y el elágico. Finalmente, en orina, los valores de estos ácidos vuelven a disminuir; a excepción del ácido gálico, el cual presentó valores significativos en orina.

Por consiguiente, se puede deducir que los ácidos fenólicos son absorbidos, en mayor parte, en estómago y posteriormente aparecen en colon como resultado de la hidrólisis de otros compuestos fenólicos. Como lo indican Russell y Duthie (2011), muchas de las diversas especies de bacterias que constituyen la flora intestinal pueden llevar a cabo reacciones que transforman compuestos fenólicos tales como antocianinas, procianidinas, flavanonas, flavonoles, taninos e isoflavonas en metabolitos fenólicos simples como los ácidos fenólicos. Tal es el caso de los ácidos cafeico y cumárico, que pueden provenir del ácido clorogénico (Gómez-Ruiz y col., 2007); el gálico, de taninos hidrolizables (Landete y col., 2011); y el 4-hidroxibenzoico, de epigallocatequina galato y de catequina (Del Rio y col., 2013). Sin embargo, Russell y Duthie (2011) también mencionan que la microflora colónica varía mucho entre individuos y por lo tanto, es difícil de determinar *in vivo* los productos originales de los que proceden los metabolitos fenólicos. Una vez formados los ácidos fenólicos, son fácilmente absorbidos por lo que se presentan valores muy bajos en heces.

De igual forma, Manach y col. (2004) mencionan que los valores bajos en orina podrían ser indicativos de una excreción biliar pronunciada o un metabolismo muy activo. De manera que estos compuestos pueden ser encontrados en diferentes tejidos como estómago, intestino, hígado, cerebro, células endoteliales, corazón, riñón, bazo, páncreas, próstata, útero, ovarios, glándulas mamarias, testículos, vejiga, hueso y piel (Manach y col., 2004).

Además de los ácidos fenólicos, la epicatequina es otro de los compuestos mayoritarios presentes en los extractos de granada. Este compuesto se encontró a altas concentraciones en intestino delgado; sin embargo, al pasar al ciego disminuyen drásticamente sus valores para después aumentar nuevamente en heces y orina. Además, es uno de los únicos tres compuestos que se encontraron en suero. Esta cinética muestra que la epicatequina es principalmente absorbida y metabolizada en ciego y que su presencia en heces indica que puede provenir de otros compuestos, como epigallocatequina galato.

En lo que respecta a las antocianinas, aunque fueron de los principales compuestos presentes en los extractos de granada, éstas no se detectaron en ninguna muestra biológica, lo que sugiere su absorción en el estómago y su excreción vía biliar; o bien, su degradación o la formación de complejos entre ellas u otros compuestos fenólicos. Se ha demostrado que las antocianinas poliméricas no pueden ser absorbidas directamente por el intestino (Pacheco-Palencia y col., 2010). Tanto las antocianinas monoméricas y poliméricas, como sus metabolitos, llegan al colon donde son rápidamente metabolizadas por la flora microbiana a diversos ácidos fenólicos como el protocatecuico o el hipúrico.

Aunque no se encontraron valores significativos del ácido sinápico, galocatequina galato, epigalocatequina galato ni ácido elágico en los extractos de granada, en la orina se presentaron en cantidades significativas. Esto se debe a que dichos compuestos pueden provenir de la hidrólisis de otros compuestos fenólicos, debido a la acción de la microflora colónica, y además pueden presentar una alta tasa de absorción (Spencer, 2003; Janle, 2008). Se ha reportado que el ácido sinápico puede derivarse de las antocianinas (Dall'Asta y col., 2012), la galocatequina galato y epigalocatequina galato provienen de sus respectivas formas glucosiladas (Spencer, 2003) y el ácido elágico de la punicalagina (Lei y col., 2003; Seeram y col., 2004).

De los metabolitos derivados de los elagitaninos, la urolitina A y su precursor urolitina M6 se encontraron en mayor proporción en los extractos de granada, esto puede deberse a que la síntesis de urolitina A se lleva a cabo mediante la vía urolitina M6-C-A-B. Mientras que en el control, no se identificó urolitina A, lo que sugiere la activación de la vía M6-C-IsoA-B. Es importante resaltar que la urolitina A ha sido reportada como el principal metabolito bioactivo de los elagitaninos. Así mismo, la urolitina A se encontró en mayor proporción en su forma libre, esto puede deberse a que las formas glucuronidadas de las urolitinas son rápidamente absorbidas y se acumulan principalmente en los enterocitos (Kasimsetty y col., 2010; Espín y col., 2013).

De manera general se observó que, en orina, el tratamiento con granada ácida presenta valores mayores que el de granada dulce y Wonderful, así como del control. La presencia de compuestos fenólicos en orina es un indicativo de su posible bioactividad, ya que éstos fueron absorbidos en el tracto gastrointestinal, transportados primeramente hacia el hígado y después distribuidos hacia el resto de los tejidos, donde pudieron ejercer alguna acción y posteriormente ser eliminados.

En el Cuadro 16 se presenta la capacidad antioxidante de las muestras biológicas, en donde se observa que dicha capacidad es mayor en ciego con respecto al resto de las muestras evaluadas, seguida de heces, intestino delgado, y finalmente, orina y suero. Estos resultados sugieren que el consumo regular de extractos de granada incrementa la capacidad antioxidante del tracto gastrointestinal. Esto puede tener un efecto benéfico en el intestino grueso, donde el estrés oxidativo es generado durante enfermedades inflamatorias del intestino (Bialonska y col., 2010).

Todos los tratamientos mostraron una mayor capacidad antioxidante en intestino delgado, ciego y heces por ABTS en comparación con el control. Mientras que por el ensayo FRAP se observaron diferencias significativas en intestino delgado y ciego con respecto al control. Además, en intestino delgado la capacidad antioxidante se correlacionó con el contenido de taninos ( $r = 0.9437$  y  $r = 0.9732$ , ABTS y FRAP, respectivamente,  $p < 0.005$ ), esto puede deberse a que, además de la cantidad, éstos presentan un mayor potencial antioxidante con respecto a otros compuestos, por la cantidad de grupos hidroxilo disponibles. Por su parte, las correlaciones en ciego y heces se deben tanto a fenoles solubles totales, flavonoides y taninos, posiblemente debido a que estos últimos se degradaron en estas muestras biológicas y perdieron su gran potencial antioxidante.



Cuadro 16. Capacidad antioxidante del contenido de intestino delgado, contenido de ciego, heces, suero y orina de los tres tratamientos y el control.

Muestra	Tratamiento	Capacidad antioxidante (mmol ET/mL)	
		ABTS	FRAP
I. Delgado	Dulce	65.3 ± 1.5*	2.6 ± 0.1*
	Ácida	68.2 ± 1.3*	2.7 ± 0.1*
	Wonderful	64.3 ± 0.6*	2.3 ± 0.1*
	Control	25.2 ± 0.5	1.6 ± 0.1
Ciego	Dulce	525.5 ± 51.3*	23.8 ± 1.1*
	Ácida	639.7 ± 18.1*	26.3 ± 0.2*
	Wonderful	527.6 ± 49.7*	21.9 ± 1.3*
	Control	196.1 ± 25.7	16.9 ± 0.5
Heces	Dulce	291.1 ± 9.1*	15.3 ± 0.9 <sup>ab*</sup>
	Ácida	303.1 ± 3.4*	17.9 ± 0.6 <sup>a*</sup>
	Wonderful	285.1 ± 13.1*	12.2 ± 0.7 <sup>b</sup>
	Control	140.6 ± 5.1	9.0 ± 0.3
Suero	Dulce	2.7 ± 0.1	0.27 ± 0.03
	Ácida	2.7 ± 0.2	0.27 ± 0.00
	Wonderful	2.4 ± 0.1	0.27 ± 0.01
	Control	2.8 ± 0.1	0.24 ± 0.01
Orina	Dulce	22.4 ± 0.5	0.41 ± 0.00
	Ácida	24.7 ± 1.4	0.45 ± 0.04
	Wonderful	24.1 ± 1.8	0.41 ± 0.01
	Control	20.2 ± 0.1	0.38 ± 0.00

Valores con asterisco en la misma columna por muestra indican diferencia con respecto al control (Prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). Valores con diferente letra en la misma columna dentro de la misma muestra indican diferencia con respecto al control (Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante en suero ni orina. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Manach y col. (2004), quienes observaron un aumento en la capacidad antioxidante del plasma después del consumo de diversos alimentos ricos en compuestos fenólicos, y sugirieron que algunos de los metabolitos de los compuestos fenólicos retienen la actividad antioxidante. Estas diferencias pueden deberse a que los compuestos fenólicos y sus metabolitos son rápidamente captados por los órganos blanco, y metabolizados. Adicionalmente, Manach y col. (2004) reportaron que los metabolitos de los compuestos fenólicos son eliminados rápidamente del plasma, sugiriendo que el consumo de productos vegetales sobre una base diaria es necesario para mantener altas concentraciones de metabolitos en la sangre, y por lo tanto, un estado antioxidante en estas muestras.

Por otro lado, únicamente los tratamientos de granada dulce y ácida presentaron una mayor capacidad antioxidante en heces en comparación al control. Estos resultados sugieren que dichas selecciones presentan una alta capacidad antioxidante tanto en los extractos como después de su consumo en el organismo.

De manera general, a pesar de que los compuestos fenólicos de los extractos de granada presentaron alta bioaccesibilidad, se pudo observar que la selección ácida presentó una mayor absorción de los ácidos gálico, cafeico, elágico y sinápico, así como de los flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina galato y epigalocatequina galato), lo que pudiera deberse a una mayor velocidad de absorción, así como a una alta tasa de hidrólisis de sus precursores y posterior absorción.

## VII. CONCLUSIONES

Los extractos elaborados a partir del procesador poseen un mayor valor comercial debido a su rendimiento más alto y a la facilidad de la extracción, con lo que se podría incrementar su uso y demanda. Así mismo, la selección ácida desarrollada por el INIFAP podría ofrecer una mayor vida de anaquel debido al alto valor de su acidez titulable y bajo pH.

El uso de la fruta entera para la elaboración de extractos permite la obtención de un producto con mejores características nutracéuticas que los elaborados a partir de métodos comerciales para la elaboración de jugo de granada. Además, es un método factible de usar por el consumidor, lo que permitiría aprovechar los beneficios directamente de la fruta fresca y es más accesible en precio que los productos procesados. Por otro lado, las selecciones dulce y ácida presentan mejores características nutracéuticas al contener mayores cantidades de fenoles solubles totales, antocianinas, flavonoides, taninos totales y capacidad antioxidante en comparación con la variedad comercial Wonderful.

Las selecciones mexicanas dulce y ácida presentan una mayor bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos, lo que implica que pudieran ejercer mayores efectos benéficos a la salud y las convierte en una excelente opción para su comercialización, consumo en fresco y elaboración de subproductos de alta calidad. Sin embargo, la medición de la bioactividad de los diferentes compuestos fenólicos es necesaria para determinar la efectividad de la respuesta fisiológica de las células diana.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abdel ES, Hucl PA. A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry* 1999; 76:350-354.
- Bialonka D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 140:175-182.
- Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*. 2014; 72:429-452.
- Borges G, Roowi S, Rouanet JM, Duthie GG, Lean MEJ, Crozier A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51:714-725.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 1998; 56(11):317-333.
- Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014; 13:155-171.
- Cardona F, Andrés-Lacuevac C, Tulipaniana S, Tinahonesb FJ, Queipo-Ortuñoa MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24:1415-1422.
- Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition*. 2004; 43:205-220.
- Clarke G, Ting KN, Wiart C, Fry J. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*. 2013; 2:1-10.
- Corral-Aguayo RD, Yahia EM, Carrillo-López A, González-Aguilar G. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(22):10498-10504.

- Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. Identification of microbial metabolites derived from *in vitro* fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*. 2012; 28:197-203.
- De la Cruz R, Aguilera-Carbó A, Prado-Barragán A, Rodríguez-Herrera R, Contreras-Esquivel J, Aguilar C. Biodegradación Microbiana de Elagitaninos. *BioTecnología*. 2011; 15(3):11-18.
- Devatkal SK, Narsaiah K, Borah A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Science*. 2010; 85(1):155-159.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013; 18(14):1818-1892.
- Dumlu MU, Gürkan E. Elemental and Nutritional Analysis of *Punica granatum* from Turkey. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10(2):392-395.
- Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013:1-15.
- Figuroa-Pérez MG, Rocha-Guzmán NE, Mercado-Silva E, Loarca-Piña G, Reynoso-Camacho R. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*. 2014; 156:273-278.
- Fiorani M, Azzolini C, Guidarelli A, Cerioni L, Cantoni O. A novel biological role of dehydroascorbic acid: Inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent transport of ascorbic acid. *Pharmacological Research*. 2014; 84:12-17.
- Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. *Food Chemistry*. 2011a;127:807-821.
- Fischer UA, Dettmann JS, Carle R, Kammerer DR. Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *European Food Research and Technology*. 2011b; 233:797-816.
- Fischer UA, Jaksch AV, Carle R, Kammerer DR. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate

- (*Punica granatum* L.) fruits and juices. *European Food Research and Technology*. 2013; 237:209-221.
- Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48:4581-4589.
- Gómez-Ruiz JA, Leake DS, AMES JM. *In Vitro* Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55:6962-6969.
- González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58:3933-3939.
- González-Barrio, Edwards CA, Crozier A. Colonic Catabolism of Ellagitannins, Ellagic Acid, and Raspberry Anthocyanins: *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Drug Metabolism & Disposition*. 2011; 39(9):1680-1688.
- Harbertson JF, Kennedy JA, Adams DO. Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture. Vitic*. 2002; 53(1):54-59.
- Heaney RP. Factors Influencing the Measurement of Bioavailability, Taking Calcium as a Model. *Journal of Nutrition*. 2001; 131:1344S-1348S.
- Herrera-Hernández MG, Mondragón-Jacobo C, Soria-Lara DM, Guzmán-Maldonado SH. Comparative study of Physicochemical and Functional Characteristics in Juices from New Mexican Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) and Wonderful Variety. *Biochemistry and Biophysics*. 2013; 1(3):35-42.
- Janle EM. Pharmacokinetics of Green Tea Catechins in Extract and Sustained-Release Preparations. *Journal of Dietary Supplements*. 2008; 5(3):248-263.
- Johanningsmeier SD, Harris GK. Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annual Review of Food Science and Technology. Technol*. 2011;2:181–201.
- Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic Acids Are Absorbed from the Rat Stomach with Different Absorption Rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54:7539-7543.

- Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*. 2011; 44:1150-1160.
- Lee J, Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 2005; 88(5):1269-1278.
- Legua P, Melgarejo P, Abdelmajid H, Martínez JJ, Martínez R, Ilham H, Hafida H. Total Phenols and Antioxidant Capacity in 10 Moroccan Pomegranate Varieties. *Journal of Food Science*. 2012; 71(1):C115-C120.
- Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhaoa YN, Wang W, Zhang LJ. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *Journal of Chromatography B*, 2003; 796:189-194.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 2006; 96:254-260.
- Lin HH, Chen JH, Huang CC. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signalling activation. *International Journal of Cancer*. 2007; 120:2306-2316.
- López V, Artés HF, Artés, F. Evaluación de la calidad de granadas tratadas con UV-C y almacenadas en atmósfera controlada. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 2007; 137-145.
- Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 641:102-107.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79:727-47.
- Martínez JJ, Melgarejo P, Hernández F, Salazar DM, Martínez R. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*. 2006; 110:241-246.
- Masella R, Santangelo C, D'Archivio M, LiVolti, G, Giovannini C, Galvano, F. Protocatechuic Acid and Human Disease Prevention: Biological Activities and Molecular Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 19(18):2901-2917.

- Melgarejo P, Martínez JJ, Hernández F, Legua P, Melgarejo-Sánchez P, Martínez-Font R. The pomegranate tree in the world: Its problems and uses. *Options Méditerranéennes*, 2012; 103:11-26.
- Mena P, García-Viguera C, Navarro-Rico J, Moreno DA, Bartual J, Saura D. y col. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(10):1893-1906.
- Miguel G, Dandlen S, Antunes D, Neves A, Martins D. The Effect of Two Methods of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice Extraction on Quality During Storage at 4°C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004;5:332-337.
- Mondragón C. Breeding Mexican pomegranates to improve productivity and quality and increase versatility of uses. *Options Méditerranéennes*. 2012; 103:61-63.
- Mondragón C, Juárez S. Guía para la producción de granada roja en Guanajuato. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2008.
- Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*. 2009; 115:274-1278.
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2012) 19th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 942.15.
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2012) 19th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 981.12.
- Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition*. 2001;131(1):66-71.
- Oomah BD, Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005; 85:935-942.
- Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott SU, Talcott ST. *In vitro* absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*. 2010; 119:1071-1078.
- Punithavathi VR, Prince PSM, Kumar R, Selvakumari J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin



- induced diabetic Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650:465-471.
- Rajasekar D, Akoh CC, Martino KG, MacLean DD. Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia. *Food Chemistry*. 2012; 133:1383-1393.
- Rinaldi M, Caligiani A, Borgese R, Palla G, Barbanti D, Massini R. The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *Food Science and Technology*. 2013; 53:355-359.
- Russell W, Duthie G. Influences of food constituents on gut health Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011; 70:389-396.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 403:136-138.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45:287-306.
- Seeram NP, Lee R, Hardy M, Heber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*. 2005; 41:49-55.
- Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 348:63-68.
- Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *Journal of Nutrition*. 2006; 136:2481-2485.
- Sengul H, Surek E, Nilufer-Erdil D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*. 2014; 62:1069-1079.
- Sepúlveda E, Sáenz C, Peña A, Robert P, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2010; 70(1):50-57.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. Servicio de información estadística agroalimentaria y pesquera (Citado el 8 de abril de 2014). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>.
- Shams-Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, Gholam N, Moridi T. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10:519-24.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravent RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 1999; 299:152-178.
- Spencer JPE. Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Nutrition*. 2003; 133:3255S-3261S.
- Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Rémésy C. Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats. *Journal of Nutrition*. 2003; 133:4178-4182.
- Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2011; 3(1):27-33.
- Tang XL, Liu JX, Dong W, Li P, Li L, Lin CR, et al. The Cardioprotective Effect of Protocatechuic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2014; 125:176-183.
- Tsai PJ, Huang HP. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International*. 2004; 37:313-318.
- Turfan Ö, Türkyılmaz M, Yemis O, Özkan M. Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*. 2011; 129:1644-1651.
- Türkyılmaz M, Tağı S, Dereli U, Özkan M. Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chemistry*. 2013; 138:1810-1818.
- Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55:9559-9570.
- Van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation

- of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*. 1999; 66:511-517.
- Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013:1-18.
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *Journal of Nutrition*. 2007; 137:2043-2048.
- Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 9:635-654.
- Wasila H, Li X, Liu L, Ahmad I, Ahmad S. Peel Effects on Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and Making of Pomegranate Juice and Wine. *Journal of Food Science*. 2013; 78(8):C1166-C1172.
- Yu RQ, Wu XY, Zhou X, Zhu J, Ma LY. Cyanidin-3-glucoside attenuates body weight gain, serum lipid concentrations and insulin resistance in high-fat diet-induced obese rats. *Chinese Journal Of Contemporary Pediatrics*. 2014; 16(5):534-538.

## **IX. APÉNDICE**

## APÉNDICE A. Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Querétaro, Qro, 16 de enero de 2014

**Dra. Rosalía Reynoso**  
**Investigadora**  
**Facultad de Ciencias Naturales**

**Estimada Dra. Reynoso:**

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
<b>Evaluación de extractos naturales de plantas para el control de la obesidad y de sus problemas asociados</b>	<b>Aprobado</b>

Anexo a la presente comentarios que hizo el Comité de Bioética.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Dra. Olga P. García O.  
Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales