



Effect of the extraction conditions on the antioxidant capacity of phenolic compounds from pomegranate shell

Efecto de las condiciones de extracción sobre la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de cáscara de granada

Astrid Salinas-Flores¹, Alexandro Guevara-Aguilar², Ever Adrián Natividad-Torres², Ramiro Baeza-Jiménez², José Juan Buenrostro-Figueroa^{2*}

¹Universidad Tecnológica de Camargo-Unidad Meoqui. Meoqui, Chihuahua, México. ²Laboratorio de Biotecnología Bioingeniería. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Delicias, Chihuahua, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: jose.buenrostro@ciad.mx (J.J. Buenrostro-Figueroa)

Article history:

Received: 9 January 2019 / Received in revised form: 20 March 2019 / Accepted: 21 March 2019 / Published online: 1 April 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.33>

ABSTRACT

In the present study, two extraction methods were evaluated (maceration and ultrasound) to obtain the phenolic compounds content in pomegranate shell. The test parameters were temperature (30, 60 and 90°C), mass/volume ratio (m/v; 1:10, 1:25 and 1:50) and solvent (water, ethanol:water, 50:50 and ethanol). The antioxidant activities of the extracts were examined by three different methods, ABTS, DPPH and lipoperoxidation assays. The results showed that the best extraction conditions were: m/v ratio of 1:50 (0.02 g/mL), water as solvent and a temperature of 60°C, which prevent the degradation of the phenolic compounds and loss of the antioxidant activity (AA). Under these conditions, values of phenolic compounds, AA-DPPH and AA-ABTS were increased up to 10.41, 7.41 and 8.30-fold higher with respect to the control, respectively. Total phenols content, AA-DPPH and AA-ABTS by maceration were \approx 1.36-fold higher than those obtained under ultrasound-assisted extraction.

Keywords: Antioxidant capacity, Box-Behnken, Phenolic compounds, Pomegranate shell.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron dos métodos de extracción (maceración y ultrasonido) para la obtención de compuestos fenólicos presentes en cáscara de granada. Las variables que se evaluaron son: temperatura (30, 60 y 90°C), relación masa/volumen (m/v; 1:10, 1:25 y 1:50) y disolvente (agua, etanol:agua, 50:50 y etanol). La actividad antioxidante de dichos extractos se evaluó por los métodos ABTS, DPPH y lipoperoxidación. Los resultados obtenidos muestran que las mejores condiciones de extracción son: relación m/v de 1:50 (0.02 g/mL), agua como disolvente de extracción y una temperatura de 60°C para evitar degradación de los compuestos y pérdida de la capacidad de inhibir la lipoperoxidación. Bajo estas condiciones, se obtuvieron incrementos para fenoles totales, AA-DPPH y AA-ABTS de 10.41, 7.41 y 8.30 veces más altos con respecto al control, respectivamente. Los valores obtenidos para fenoles totales, AA-DPPH y AA-ABTS mediante maceración son ≈ 1.36 veces mayores a los obtenidos bajo extracción asistida por ultrasonido.

Palabras clave: Antioxidante, Box-Behnken, Cáscara de granada, Compuestos fenólicos.

1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias formadas por vitaminas, minerales, enzimas, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales tales como los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos presentan propiedades biológicas tales como antiaterogénica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, cardioprotectora y con efecto vasodilatador (Manach *et al.*, 2005). Dichas actividades se derivan de la habilidad de los compuestos para estabilizar los radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que actúan como agentes quelantes (Amarowicz *et al.*, 2004). Los estudios se enfocan a reemplazar el uso de aditivos antioxidantes con antioxidantes obtenidos a partir de fuentes naturales, empleándolos en el desarrollo de alimentos funcionales. Existe una amplia gama de compuestos bioactivos con actividad antioxidante que pueden ser obtenidos a partir de plantas y frutas, así como residuos agroindustriales, ofreciendo alternativas de valorización de estos subproductos considerados un desecho. En lo que a residuos respecta podemos destacar los provenientes de la granada.

La granada (*Punica granatum* L.) es un importante fruto de regiones tropicales y subtropicales, originario de la India y el Este Medio (Saad *et al.*, 2012). En México, para 2017 se tuvo una producción de 6816 toneladas, siendo los principales estados productores (ton/año) Morelos (1473), Oaxaca (1248), Hidalgo (1211) y Guanajuato (1069), cuya producción abarca el 74% del total nacional (SIAP, 2017). De acuerdo a Kazemi *et al.* (2016), por cada tonelada de granada se generan 669 kg de subproductos, que incluyen 78% cáscaras y 22% de semillas.

La actividad biológica más reportada atribuida a la granada es la antioxidante, debido a la presencia de compuestos fenólicos en los subproductos, tales como punicalagina y punicalina (Calani *et al.*, 2013), moléculas de gran interés industrial debido a sus propiedades biológicas (Ascacio-Valdés *et al.*, 2011). Por otra parte, las semillas de granada son una fuente importante de ácidos grasos como linoleico, púnico, oleico, esteárico y palmítico, que contribuyen a mantener un buen estado de salud (Holic *et al.*, 2018). Por ello, la granada es considerada como un alimento funcional ya que sus componentes no solo son nutrientes, sino que otorgan una serie de beneficios a la salud del consumidor (Akhtar *et al.*, 2015).

La extracción es la primera etapa para recuperar compuestos fenólicos a partir de cualquier material vegetal. Los métodos de extracción aplicado a jugos o residuos comúnmente emplean disolventes orgánicos como metanol, etanol, etil acetato y acetona, siendo el metanol el disolvente con los mejores rendimientos de extracción (Castro *et al.*, 2016). Dentro de los métodos de extracción destaca el convencional o maceración, ampliamente usado, pero que requiere de tiempos de extracción muy largos (horas). En últimas décadas han surgido estrategias de extracción más eficientes, tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de las diferentes moléculas en estudio. Algunos ejemplos de ellos son los fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Comparado con la extracción convencional, la EAU presenta ventajas como tiempos de extracción muy cortos, menos uso de solvente y alta velocidad de extracción (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013).

El uso de la EAU ha sido reportado para obtener compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos (Ma *et al.*, 2009), compuestos aromáticos a partir de ajo (Poojary *et al.*, 2017) y aceites a partir de semillas de uva (Da Porto *et al.*, 2013). En el presente estudio se evaluaron las condiciones de extracción (temperatura, relación m/v y concentración de disolvente) de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de granada, empleando dos metodologías de extracción (convencional y asistida por ultrasonido) con la finalidad de obtener un extracto rico en actividad antioxidante que pueda ser adicionado en la formulación de un alimento tradicional mexicano y otorgar un beneficio a la salud de quien lo consuma. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación era evaluar el efecto de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante presentes en la cáscara de granada, obtenidos por maceración y ultrasonido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colecta y acondicionamiento del material vegetal

La cáscara de granada se colectó en la empresa Mashei, ubicada en Tasquillo, Hidalgo. El material se colocó en bolsas negras y se trasladó al Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería para su acondicionamiento, con la finalidad de reducir y homogenizar el tamaño de partícula del residuo.

2.2. Extracción de compuestos fenólicos

Para llevar a cabo la extracción de los compuestos fenólicos, se eligieron dos metodologías: extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU). Para la EC, se emplearon 15 matraces Erlenmeyer de 250 mL (tratamientos), a los cuales se agregó la cáscara de granada previamente deshidratada (3% humedad), molida y tamizada (600 μm), y se adicionaron 25 mL de disolvente (Agua, Etanol-Agua (50/50) y Etanol (100%)) a tres diferentes relaciones masa/volumen: 1:10 (0.1 g/mL), 1:25 (0.04 g/mL) y 1:50 (0.02 g/mL), tal como se muestra en la Tabla 1. La mezcla se homogenizó en un vórtex y se incubó a 30, 60 y 90°C durante 30 min.

Para la EAU también se siguieron las condiciones antes mencionadas (Tabla 1). Las muestras se colocaron en un sonicador (VWR Scientific Aquasonic 150-D, 60 Hz) a 30, 60 y 90°C durante 30 min. Una vez finalizado el tiempo, el extracto se recuperó por centrifugación y se almacenó en viales de 2 mL a -20°C hasta antes de su uso para determinar el contenido de fenoles totales, la inhibición de la lipoperoxidación, así como la actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS.

2.3. Evaluación de la actividad antioxidante

Fenoles Totales Hidrolizables

El contenido de fenoles totales (FT) se determinó en microplaca, de acuerdo a la metodología reportada por Wong-Paz *et al.* (2015). Para ello se mezclaron 20 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu con 20 μL de la muestra, y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente se agregaron 200 μL de Na_2CO_3 0.01 M, se mezcló y se dejó reaccionar por 5 min. Finalmente, se diluyó la muestra añadiendo 125 μL de agua destilada, la solución se mezcló y se registró su absorbancia a 730 nm empleando un lector de microplacas UV-Vis (Multiskan Go, Thermo Scientific). El contenido de fenoles totales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mgEAG/gms) mediante una curva estándar de ácido gálico (0-200 $\mu\text{g/L}$). Cada tratamiento se analizó por triplicado.

Actividad antioxidante-DPPH

La determinación de la actividad antioxidante se realizó empleando el radical 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH). El DPPH posee una coloración morada, y cuando encuentra un H^\bullet con el cual complementa su estructura pierde la coloración. El cambio de coloración es lo que permite cuantificar el poder antioxidante de la sustancia colocada como muestra. El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Meléndez *et al.* (2014). Para ello se mezclaron 193 μL del radical DPPH 60 μM con 7 μL de extracto, las muestras se dejaron reposar durante 30 min en la oscuridad. Finalmente se registró la absorbancia a 517 nm empleando un lector de microplacas UV-Vis (Multiskan Go, Thermo Scientific). La actividad antioxidante se expresó como miligramos de equivalentes de Trólox por gramo de

materia seca (mgET/gms) empleando una curva estándar de Trólox (0-200 µg/L). Cada muestra se analizó por triplicado.

Actividad antioxidante-ABTS

La capacidad antioxidante frente al radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) se determinó de acuerdo a Re *et al.* (1999) adaptado a microplaca. Para la formación del radical ABTS se mezclaron 12.5 mL de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM (0.0662 g/100 mL de agua) con 25 mL de ABTS 7 mM (0.3602 g/100 mL de agua). La mezcla mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad durante 12-16 h. Se midió la absorbancia a 734 nm, y se diluyó la solución ABTS⁺ con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.7 ± 0.01 nm de acuerdo a Re *et al.*, (1999). Para el ensayo, se mezclaron 190 µL de solución ABTS⁺ con 10 µL de muestra, se dejó reaccionar la mezcla durante 1 min y se registró la absorbancia con un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific). Se empleó un blanco (etanol 100%) y un control (ABTS-Etanol). La actividad antioxidante se expresó como miligramos de equivalentes de Trólox por gramo de materia seca (mgET/gms) empleando una curva estándar de Trólox (0-200 µg/L). Cada muestra se analizó por triplicado.

Inhibición de la lipoperoxidación

La determinación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición de la oxidación de los lípidos o lipoperoxidación (LO) se llevó a cabo empleando ácido linoleico como fuente de lípidos de acuerdo al método reportado por Martínez-Ávila *et al.* (2012) adaptado a microplaca. La solución de ácido linoleico se preparó diluyendo 0.56 g de ácido linoleico y 1.5 g de Tween-20 en 8 mL de etanol al 96%. Se mezclaron 5 µL de muestra con 10 µL de solución de ácido linoleico y 150 µL de buffer de acetatos 0.02 M, pH 4.0). El control era agua destilada (5 µL). Todas las muestras se homogenizaron en un vórtex (Labnet International, Edison, NJ) y sonicadas (VWR Scientific Aquasonic 150-D) durante 3 min. Las emulsiones obtenidas se incubaron a 37°C; después de 1 min, se añadieron 75 µL de solución de cloruro ferroso (FeCl) 50 mM (0.0994 g de FeCl y 0.168 g de EDTA diluidos en 1 L de agua destilada) para inducir la oxidación del ácido linoleico. Después de incubar 1 y 24 h, se tomaron 14 µL de la muestra y se colocaron en un pozo de la microplaca, antes de mezclar con 53 µL de NaOH 0.1 M (0.1 g NaOH/100 mL etanol al 10%) para detener la reacción de oxidación. Finalmente, se agregaron 133 µL de etanol al 100 %, se homogenizó y se registró la absorbancia a 232 nm empleando como blanco etanol al 10%. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad antioxidante o % de inhibición de la lipoperoxidación, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición LO} = 100 - (B * 100 - A)$$

Donde A es la diferencia entre la absorbancia de la muestra control (agua destilada) después de 24 h y 1 h de incubación, y B es a diferencia entre la absorbancia de la muestra después de 24 y 1 h de incubación. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Este experimento se realizó planteando un Diseño Factorial Box-Behnken 3³ [(Statistica 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA)] para evaluar el efecto de la temperatura, la relación masa/volumen y la concentración de disolvente sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de extractos obtenidos a partir de cáscaras de granada.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en el cual se evaluó el efecto del método de extracción (EC y EAU) y la fuente vegetal sobre FT, AA-DPPH, AA-ABTS e inhibición de LO. Cuando era necesario, se llevó a cabo una prueba de comparación de medias, mediante el procedimiento del rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabla 1. Matriz experimental Box-Behnken 3^k para evaluar los efectos de la temperatura (A), relación m/v (B) y la concentración de etanol (C) sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de extractos obtenido por EC y EAU a partir de cáscara de granada.

Trat	A	B	C	FT (mgEAG/gms)	AA-DPPH (mgET/gms)	AA-ABTS (mgET/gms)	LO (%Inhibición)
1	1	-1	0	44.43 ^{cd}	115.09 ^{bcd}	70.83 ^c	99.60 ^{ab}
2	1	0	1	15.99 ^e	73.10 ^{cd}	79.50 ^c	97.81 ^{ab}
3	-1	0	-1	42.39 ^{cd}	164.78 ^{abc}	162.60 ^b	100.04 ^a
4	0	0	0	50.26 ^{bcd}	185.39 ^{ab}	166.30 ^b	97.33 ^b
5	-1	0	1	7.08 ^e	35.91 ^d	47.70 ^c	98.38 ^{ab}
6	0	1	-1	54.81 ^{bc}	206.17 ^{ab}	180.00 ^b	98.00 ^{ab}
7	-1	1	0	59.98^{ab}	195.05^{ab}	204.11^{ab}	100.17^a
8	1	0	-1	41.87 ^{cd}	177.32 ^{abc}	157.25 ^b	100.23 ^a
9	0	1	1	17.80 ^e	78.15 ^{cd}	77.10 ^c	99.49 ^{ab}
10	0	-1	1	6.80 ^e	31.03 ^d	32.43 ^c	99.35 ^{ab}
11	-1	-1	0	38.68 ^d	112.92 ^{bcd}	70.81 ^c	98.20 ^{ab}
12	0	-1	-1	37.86 ^d	185.50 ^{ab}	70.78 ^c	98.14 ^{ab}
13	1	1	0	70.85^a	230.00^a	269.24^a	98.91^{ab}
14	0	0	0	53.18 ^{bc}	195.11 ^{ab}	166.62 ^b	97.84 ^{ab}
15	0	0	0	59.27 ^{ab}	190.10 ^{ab}	162.09 ^b	99.02 ^{ab}
Factor/Nivel				-1	0	1	
(A) Temperatura (°C)				30	60	90	
(B) Relación m/v (g/mL)				1:10 (0.1)	1:25 (0.04)	1:50 (0.02)	
(C) [Etanol] (%)				0 (Agua)	50	100	

Trat: Tratamiento; FT: Fenoles totales; AA-DPPH (Actividad antioxidante-DPPH; Actividad antioxidante-ABTS; Inhibición de la lipoperoxidación).

**mgEAG/gms: miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca.

**mgET/gms: miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de materia seca.

***Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos (Tukey 0.05).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se llevó a cabo la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de granada, y la evaluación de la capacidad antioxidante de dichos extractos, obtenidos mediante extracción convencional (maceración) y extracción asistida por ultrasonido. En el caso de la extracción por el método convencional, los tres factores evaluados son significativos para FT (Fig. 1A). Sin embargo, la concentración de etanol influye mayormente, de manera negativa, por lo que, al aumentar la concentración, la extracción se verá afectada y la cantidad de FT y su actividad antioxidante disminuyen. Existe una fuerte correlación entre FT y la actividad antioxidante, debido a que esa actividad la otorgan los compuestos fitoquímicos extraídos.

En cuanto a la relación m/v y la temperatura, el efecto es positivo, de tal manera que, al aumentar los niveles de estos factores, se verán favorecidas las variables de respuesta. Para AA-DPPH (Fig. 1B) todos los factores son significativos, mostrando el mayor efecto la relación m/v (positivo), seguido de la concentración de etanol (negativo) y la temperatura (positiva). Lo anterior coincide con el perfil para FT. El efecto positivo de la relación m/v y el negativo de la concentración de etanol se observó también para la AA-ABTS (Fig.1C). No obstante, para AA-ABTS no mostraron ningún efecto significativo los niveles evaluados de temperatura. Finalmente, la inhibición de LO no se vio afectada por ninguno de los niveles evaluados para cada uno de los factores (Fig. 1D). Los resultados del diagrama de Pareto coinciden con lo obtenido cuando se obtienen los extractos por ultrasonido (datos no mostrados), mostrando una mayor afinidad hacia el uso de agua como disolvente de extracción.

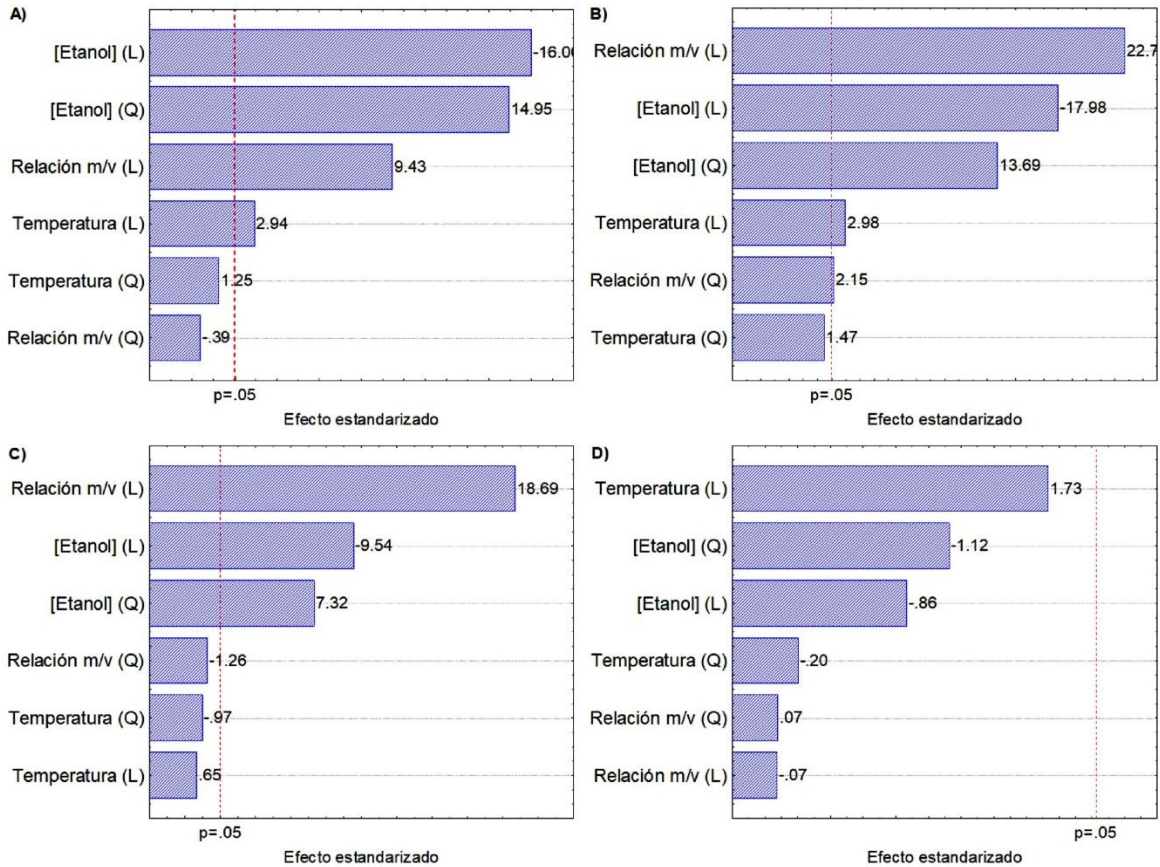


Fig. 1. Diagrama de Pareto describiendo los efectos de la temperatura, la relación m/v y la concentración de disolvente sobre A) FT, B) AA-DPPH, C) AA-ABTS y D) inhibición de la LO de extractos obtenidos por EC a partir de CG.

Con la finalidad de estimar el grado de relación entre FT, AA-DPPH, AA-ABTS y LO, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 2). El valor del coeficiente varía de -1 a 1, donde el signo indica el sentido de la relación.

Tabla 2. Coeficiente de Correlación de Pearson

	FT	DPPH	ABTS	LO
FT	1.00	0.85**	0.87**	0.17*
DPPH	0.85**	1.00	0.84**	0.18*
ABTS	0.87**	0.84**	1.00	0.18*
LO	0.17*	0.18*	0.18*	1.00

*Significativo ($p < 0.05$), **Altamente significativo ($p < 0.001$)

Se observaron coeficientes de correlación altos para la mayoría de las relaciones, excepto la relación con LO. Los coeficientes de correlación para FT, AA-DPPH y

AA-ABTS son altamente significativos ($p \leq 0.001$), con valores por encima del 0.85. Las correlaciones con la inhibición de LO son bajas, pero significativas ($p \leq 0.05$). Lo anterior indica que a medida que aumenta el contenido de FT, también se ve favorecida la actividad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS, y en menor medida aumenta la capacidad para inhibir la LO. Este comportamiento se atribuye al aumento en la cantidad de compuestos fitoquímicos extraídos, mismos que incrementan los valores de FT y, por tanto, la actividad antioxidante de los extractos.

Una vez identificados los efectos de los factores evaluados, se realizó el ANOVA para determinar el efecto del tratamiento y el método de extracción sobre las diferentes variables de respuesta (FT, AA-DPPH, AA-ABTS y LO). En el caso de los extractos obtenidos a partir de cáscara de granada, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre el tratamiento y el método de extracción sobre FT, AA-DPPH, AA-ABTS e inhibición de LO. Es decir, que al menos una de las diferentes combinaciones entre factores (temperatura, relación m/v y la [Etanol]) y el tipo de extracción (EC y EAU) es diferente en cuanto al contenido de FT, así como la actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS y la inhibición de la LO. Para establecer diferencias entre tratamientos y métodos de extracción se realizó una prueba de comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Es importante considerar las propiedades químicas de los disolventes empleados, ya que la polaridad influye en el tipo de compuesto y la capacidad de extracción, así como la eficiencia de los compuestos frente a radicales libres (Bae *et al.*, 2012; Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, debido que al disminuir la concentración de etanol y emplear solo agua, aumenta la polaridad. Esto se explica por el tipo de compuestos presentes en la cáscara de granada, los cuales son elagitaninos o taninos hidrolizables, más solubles en disolventes polares, por lo cual al emplear únicamente agua como disolvente su extracción se ve favorecida.

La temperatura de extracción juega un papel importante en la eficiencia, debido a que un incremento en ésta puede aumentar la transferencia de masa de los compuestos fenólicos, reduciendo la viscosidad del disolvente y la tensión superficial, favoreciendo la hidrólisis de la pared celular, intensificando las vibraciones moleculares y ruptura de fuerzas intermoleculares, y en consecuencia la activación de enzimas responsables de romper enlaces entre compuestos complejos unidos mediante puentes de hidrógeno a compuestos fenólicos, lo cual favorece su extracción (Chew *et al.*, 2011). En el presente estudio, los niveles evaluados de temperatura (30, 60 y 90°C) no mostraron un efecto significativo sobre la extracción de los compuestos bioactivos. No obstante, se sabe que por encima de 60°C puede iniciar un fenómeno de degradación de estos compuestos, por lo cual se recomienda trabajar por debajo de 60°C (Ascacio-Valdés *et al.*, 2010).

Finalmente, un incremento en la relación m/v (a temperatura y tiempo constante), maximiza la fuerza impulsora o la concentración de gradiente) lo cual favorece la

recuperación de solutos (Spigno y De Faveri, 2009). No obstante, llega un valor dado de relación m/v donde se alcanza la máxima extracción, y por encima de éste, solo ocurre un gasto excesivo del disolvente.

Las mejores condiciones para la extracción de los compuestos a partir de cáscara de granada son los tratamientos 7 y 13 (30°C, 0.04 g/mL; 50% de etanol y 90°C, 0.02 g/mL; agua, respectivamente) (Tabla 1) con los valores más altos para fenoles totales (59.98 y 70.85 mgEAG/gms, respectivamente), AA-DPPH (195.05 y 230.00 mgET/gms, respectivamente), AA-ABTS (204.11 y 269.24 mgET/gms, respectivamente) e inhibición de LO (100.17 y 98.91%, respectivamente), sin diferencia entre todos ellos ($p \leq 0.05$). El extracto obtenido a partir de cáscaras de granada mostró un contenido de fenoles de hasta 70.85 mgEAG/gms y una actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS de 230.00 y 269.24 mgET/gms, respectivamente. Todos los extractos lograron inhibir la lipoperoxidación por encima del 97.81 y hasta un 100%.

Para el caso del efecto del método de extracción, el ANOVA demostró que los valores más altos de FT, AA-DPPH, AA-ABTS e inhibición de la LO se obtienen al emplear la extracción convencional (Tabla 3, Fig. 2).

Tabla 3. Efecto del método de extracción a partir de CG.

Método	FT (mgEAG/gms)	AA-DPPH (mgET/gms)	AA-ABTS (mgET/gms)	LO (% Inhibición)
Ultrasonido	34.01 ^b	122.46 ^b	107.60 ^b	98.18 ^b
Maceración	46.16 ^a	167.62 ^a	148.04 ^a	99.49 ^a

*Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos (Tukey 0.05).

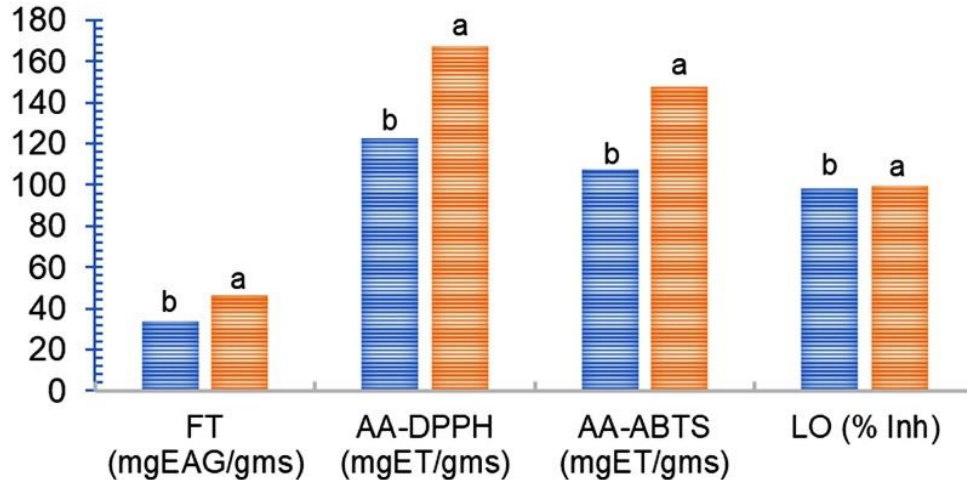


Fig. 2. Efecto del método de extracción por ultrasonido (■) y maceración (■) a partir de cáscara de granada sobre FT, AA-DPPH, AA-ABTS e inhibición de la LO.

De acuerdo con el análisis, la obtención de compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante se ve favorecida a una relación m/v de 1:50 (0.02 g/mL), empleando agua como disolvente de extracción y una temperatura de 60°C para evitar la degradación de los compuestos y pérdida de la capacidad antioxidante. Dichas condiciones se ven favorecidas cuando la extracción se realiza por el método de maceración.

CONCLUSIÓN

Se logró obtener extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de cáscaras de granada (CG), con alta capacidad antioxidante. La relación m/v y la concentración de etanol mostraron el mayor efecto significativo para el proceso de extracción, donde existe una mayor afinidad por una relación m/v alta (0.02 g/mL) y una concentración de etanol de 0 % (solo agua). Los niveles evaluados de temperatura no mostraron un efecto significativo, estableciendo un valor de 60°C. Los extractos obtenidos mediante EC mostraron valores ligeramente mayores a los obtenidos por EAU en cuanto a FT, AA-DPPH y AA-ABTS.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 252365 del programa PEI 2017.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Akhtar S., Ismail T., Fraternali D. & Sestili P. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*. 174: 417-425.

Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Bart, B., & Weil, J.A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84: 551-562.

Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A., Martínez-Hernández, J., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. 2010. *Euphorbia antisyphilitica* residues as a new source of ellagic acid. *Chemical Papers*, 64(4): 528-532.

Ascacio-Valdés J. A., Buenrostro-Figueroa J. J., Aguilera-Carbó A., Prado-Barragán A., Rodríguez-Herrera R. & Aguilar, C. N. 2011. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(19): 4696-4703.

Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., Patil, B. S. 2012. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry* 130 (3):751-758.

Castro-López, C., Rojas-Molina, R., Sánchez-Alejo, E. J., Niño-Medina, G. & Martínez-Ávila, C. G. 2016. Phenolic Compounds Recovery from Grape Fruits and By-products: An overview of Extraction Methods. In: *Grape and Wine Biotechnology*. InTech; 2016. pp. 103-123. DOI: 10.5772/64821.ch5

Calani, L., Beghè, D., Mena, P., Del Rio, D., Bruni, R., Fabbri, A., Dall'Asta, C. & Galaverna G. 2013. Ultra-HPLC–MSn (Poly)phenolic Profiling and Chemometric Analysis of Juices from Ancient *Punica granatum* L. Cultivars: A Nontargeted Approach. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 61: 5600-5609.

Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., Ho, C. W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Research Journal* 18(4): 1427-1435.

Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4): 1076-1080.

Holic, R., Xu, Y., Caldo, K. M., Singer, S. D., Field, C. J., Weselake, R. J. 2018. Bioactivity and biotechnological production of punicalic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:3537-3549.

Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., Abdul Hamid, A., 2016. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 206: 156-166.

Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Ye, X.-Q. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1): 57-62.

Manach C., Scalbert A., Morana C., Ramesy C. & Jimenez L. 2005. Polyphenols food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 23(4):727-747.

Martínez-Ávila G. C., Aguilera-Carbó A. F., Rodríguez-Herrera R. & Aguilar C. N. 2012. Fungal enhancement of the antioxidant properties of grape waste. *Annals of Microbiology*. 62(3): 923-930.

Meléndez N. P., Nevárez-Moorillón V., Rodríguez-Herrera R., Espinoza J. C. & Aguilar, C. N. 2014. A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research*. 8(1): 14-18.

Muñiz-Márquez, D.B., Martínez-Ávila, G.C., Wong-Paz, J.E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. 2013. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5): 1149-1154.

Poojary, M.M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Dias, D.A., Shpigelman, A. 2017. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium genus* processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61: 28-39.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9): 1231-1237.

Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Durán, C., Grimaldo-Juarez, O. & Aviles-Marin, M. 2015. Efecto antifúngico de extractos

fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *Glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología* 47(1):72-77.

Saad H., Charrier-El Bouhtoury F., Pizzi A., Rode K., Charrier B. & Ayed N. 2012. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*. 40: 239-246.

SIAP. 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (Granada). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado: 07/03/2019).

Spigno, G. Y De Faveri, D.M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering* 93:210-217.

Wong-Paz J. E., Contreras-Esquivel J. C., Rodríguez-Herrera R., Carrillo-Inungaray M. L., López L. I., Nevárez-Moorillón G. V. & Aguilar, C. N. 2015. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8(2): 104-111.