



**Elaboración de un potencial alimento funcional con  
propiedades antioxidantes y antidiabéticas a partir  
de extractos de cáscara de granada.**

**María Noel González Rosell**

**Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Programa de Posgrado de la Facultad de Ingeniería y Facultad de  
Química, Universidad de la República (UdelaR)

Noviembre 2024

**Elaboración de un potencial alimento funcional con  
propiedades antioxidantes y antidiabéticas a partir  
de extractos de cáscara de granada.**

**María Noel González Rosell**

**Nombre del Director Académico: Dr. Luis Alberto Panízzolo**

**Nombre del Director(es) de Tesis: Dra. Alejandra Medrano y Dr. Ignacio Vieitez**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

**Tribunal:**

Dra. Berta Zecchi

Dra. Laura Fariña

Dr. Alexis Velez

## RESÚMEN

La necesidad imperiosa de generar procesos productivos sostenibles y de disminuir el impacto de las enfermedades no transmisibles en la población mundial fomenta el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales a partir de subproductos de la industria alimentaria. La granada es una fruta conocida por su alto contenido en compuestos bioactivos, destacándose los que presentan actividad antioxidante, antidiabética y antiinflamatoria. Su producción y consumo está en aumento a nivel mundial. La cáscara de granada representa casi el 50% del fruto, por lo cual resulta atractivo el estudio de sus propiedades bioactivas para convertir este residuo en un potencial ingrediente funcional. Tradicionalmente, los compuestos bioactivos se extraen a través de metodologías de extracción sólido/líquido como la maceración, pero en los últimos años, han surgido métodos “verdes” que permiten la extracción selectiva de compuestos utilizando bajas cantidades de solventes no tóxicos y permitiendo una extracción más rápida.

En el presente estudio se compararon las técnicas de maceración, extracción supercrítica con dióxido de carbono (SC-CO<sub>2</sub>), y extracción con líquidos presurizados (PLE) aplicadas a la cáscara de granada. En esta última las variables en el proceso de extracción fueron la temperatura y el solvente utilizado. La extracción PLE bajo la condición de 120°C, utilizando 100% etanol como solvente y 100 bar de presión fue seleccionada como la óptima. El extracto obtenido en esa condición presentó el mayor contenido de polifenoles totales (200,55 ± 15,32 mg GAE/g) y la mayor capacidad antioxidante medida por la técnica de ABTS (2860,19 ± 41,00 µmol TE/g). Sin embargo, el extracto de macerado presentó la mayor capacidad antioxidante medida por la técnica de ORAC-FL (1014,53 ± 14,25 µmol TE/g). Posteriormente, los extractos se incorporaron a una mermelada de frutilla y se analizaron las fracciones bioaccesibles luego de la simulación digestiva. La fracción bioaccesible de la mermelada con extracto PLE presentó el mayor contenido de polifenoles totales (7,16 ± 0,39 mg GAE/g) y la mayor capacidad antioxidante medida por la técnica de ORAC-FL (133,36 ± 5,96 µmol TE/g), mientras que la fracción bioaccesible de la mermelada con la incorporación del extracto de macerado presentó la mayor capacidad antioxidante medida por la técnica de ABTS (162,21 ± 12,00 µmol TE/g). En las dos mermeladas se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante

luego de la digestión, y ambas presentaron una capacidad antidiabética superior a la mermelada control (sin la adición de ningún extracto). Los compuestos mayoritarios en los extractos PLE y en el extracto macerado identificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron punicalagina A, punicalagina B, y ácido elágico.

En suma, los extractos de cáscara de granada constituyen un potencial ingrediente funcional con capacidad antioxidante y antidiabética. La mermelada de frutilla con la incorporación del extracto PLE obtenido bajo las condiciones óptimas es el producto más interesante logrado, por su elevada capacidad antioxidante y antidiabética y por formularse con un extracto obtenido a partir de una extracción verde.

## ABSTRACT

The urgent need to generate sustainable production processes and reduce the impact of non-communicable diseases on the global population promotes the development of new functional ingredients from the food industry by-products. Pomegranate is a fruit known for its high content of bioactive compounds, particularly those with antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory properties. Its production and consumption are increasing worldwide. Pomegranate peel accounts for almost 50% of the fruit, making it an attractive target for studying its bioactive properties to convert this waste into a potential functional ingredient. Traditionally, bioactive compounds are extracted using solid/liquid extraction methods, such as maceration. However, in recent years, “green” methods have emerged that allow for the selective extraction of compounds using small amounts of non-toxic solvents and enable faster extraction processes.

In the present study, the maceration, supercritical carbon dioxide extraction (SC-CO<sub>2</sub>), and pressurized liquid extraction (PLE) techniques applied to pomegranate peel were compared. For the latter, the process variables were temperature and solvent type. The PLE extraction under 120°C, using 100% ethanol as the solvent and 100 bar pressure, was selected as the optimal condition. The extract obtained under this condition exhibited the highest total polyphenol content ( $200.55 \pm 15.32$  mg GAE/g) and the highest antioxidant capacity measured by the ABTS method ( $2860.19 \pm 41.00$   $\mu$ mol TE/g). However, the macerated extract showed the highest antioxidant capacity measured by the ORAC-FL method ( $1014.53 \pm 14.25$   $\mu$ mol TE/g). Subsequently, the extracts were incorporated into a strawberry jam, and the bioaccessible fractions were analyzed following a simulated digestive process. The bioaccessible fraction of the jam with the PLE extract showed the highest total polyphenol content ( $7.16 \pm 0.39$  mg GAE/g) and the highest antioxidant capacity measured by the ORAC-FL method ( $133.36 \pm 5.96$   $\mu$ mol TE/g), while the bioaccessible fraction of the jam with the macerated extract showed the highest antioxidant capacity measured by the ABTS method ( $162.21 \pm 12.00$   $\mu$ mol TE/g). In both jams, a significant increase in antioxidant capacity was observed after digestion, and both showed higher anti-diabetic activity compared to the control jam (without any extract added). The major compounds in the PLE extracts and the macerated extract identified by high-performance liquid chromatography (HPLC) were punicalagin A,

punicalagin B, and ellagic acid.

In summary, pomegranate peel extracts represent a promising functional ingredient with antioxidant and anti-diabetic properties. The strawberry jam incorporating the PLE extract obtained under optimal conditions is the most interesting product, due to its high antioxidant and anti-diabetic capacities and because it is formulated with an extract derived from a green extraction method.

# ÍNDICE

<b>RESÚMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1 Pérdida y desperdicio de alimentos a nivel mundial.....	10
1.2 Alimentos funcionales y enfermedades no transmisibles.....	13
1.3 La Granada.....	16
1.4 Extracciones.....	25
1.5 Antecedentes relacionados: extracciones de cáscara de granada.....	28
1.6 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad.....	31
1.7 Perspectivas del trabajo.....	33
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo General.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Granadas.....	36
3.2 Selección de la temperatura de secado.....	36
3.3 Análisis fisicoquímicos de la cáscara de granada.....	37
3.4 Extracciones realizadas.....	38
3.4.1 Maceración.....	38
3.4.2 Extracción con fluidos supercríticos (CO <sub>2</sub> ).....	39
3.4.3 Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	41
3.5 Estudio del potencial funcional de la cáscara de granada, extractos y mermeladas. 42	
3.5.1 Bioaccesibilidad.....	42
3.5.2 Determinación de las propiedades bioactivas de la cáscara de granada, sus extractos, fracciones bioaccesibles y mermeladas.....	43
3.5.2.1 Contenido de polifenoles totales.....	44
3.5.2.2 Capacidad antioxidante.....	44
3.5.2.2.1 ABTS.....	44
3.5.2.2.2 ORAC-FL.....	45
3.5.2.3 Capacidad antidiabética: Inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa.....	45
3.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	46
3.7 Elaboración de mermelada.....	46
3.8 Análisis estadístico.....	47

<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
4.1 Ensayos preliminares.....	49
4.1.1 Determinación de las condiciones de secado.....	49
4.1.2 Determinación de las condiciones de extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> .....	51
4.1.3 Determinación de las condiciones de maceración.....	56
4.2 Ensayos finales.....	58
4.2.1 Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada.....	58
4.2.2 Extracciones y rendimientos de extracción.....	60
4.2.3 Análisis de extractos.....	63
4.2.4 Análisis de fracciones bioaccesibles de extractos.....	70
4.2.5 Análisis de mermeladas y sus fracciones bioaccesibles.....	76
4.2.6 Capacidad antidiabética.....	81
4.2.7 Identificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	84
4.3 Resultados globales.....	91
<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>94</b>
5.1 Conclusiones generales.....	94
5.2 Futuras investigaciones.....	94
<b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>96</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
7.1 Anexo 1: Contenido de polifenoles totales: Folin-Ciocalteu.....	109
7.2 Anexo 2: Capacidad antioxidante: ABTS.....	111
7.3 Anexo 3: Capacidad antioxidante: ORAC-FL.....	113
7.4 Anexo 4: Capacidad antidiabética: inhibición de la $\alpha$ -Glucosidasa.....	115
7.5 Anexo 5: HPLC.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)-dihidrocloruro
ABTS	2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo- tiazolina-6-ácido sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Association of Analytical Communities
AUC	Área debajo de la curva
Aw	Actividad de agua
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CIELAB	Commission Internationale d'Eclairage L*a*b*
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de varianza
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EFSA	European Food Safety Authority
ET	Transferencia de electrones
FAO	Food and Agriculture Organization
FDU	Fundación Diabetes Uruguay
FL	Fluoresceína
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GRAS	Generally Recognized As Safe
GXL	Extracción líquida con gases expandidos
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPE	Extracciones a alta presión
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria máxima media
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas

MSP	Ministerio de Salud Pública
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Bifosfato de sodio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de sodio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Fosfato di sódico
NaOH	Hidróxido de sodio
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
O.O	Ordenada en el origen
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
ORAC-FL	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno por fluorescencia
PBS	Solución buffer salino fosfato
PLE	Extracción con líquidos presurizados
RBN	Reglamento Bromatológico Nacional
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SC-CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SD	Desviación estándar
SGF	Fluido gástrico simulado
SIF	Fluido intestinal simulado
SSF	Fluido salival simulado
TE	Equivalentes de trolox
UdelaR	Universidad de la República
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide hydrate

## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Pérdida y desperdicio de alimentos a nivel mundial**

La humanidad enfrenta actualmente numerosos desafíos en materia alimentaria, reflejados en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Es indiscutible la necesidad de apuntar a modalidades de consumo y producciones sostenibles, que contribuyan a la mitigación de la pobreza y a la transición hacia economías verdes y circulares (ONU, 2021). La importancia a nivel mundial que se le ha adjudicado a la pérdida y el desperdicio de alimentos se ve reflejada en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, en la cual la meta 12.3 plantea, de aquí al 2030, reducir a la mitad el desperdicio de alimentos per cápita mundial en la venta al por menor y a nivel de los consumidores, y reducir las pérdidas de alimentos en las cadenas de producción y suministro, incluidas las pérdidas posteriores a la cosecha (FAO, 2019).

Según FAO (2012), alrededor de un tercio de la producción de los alimentos destinados al consumo humano se pierde o desperdicia en todo el mundo, lo que equivale a aproximadamente 1300 millones de toneladas al año. Esto representa, según las estimaciones del Banco Mundial, un 15% de las calorías disponibles para el consumo humano (FAO, 2017). Este fenómeno implica no sólo la pérdida del alimento propiamente dicho, sino que también refleja ineficiencias a lo largo de toda la cadena productiva, ya que recursos como agua, tierra, fertilizantes, entre otros, se pierden, por lo que constituyen un problema ambiental, social y económico (Charalampia & Koutelidakis, 2017), y un deterioro en la seguridad alimentaria (El-Beltagi et al., 2022). A nivel mundial la pérdida de alimentos es responsable de aproximadamente 3300 millones de toneladas métricas de emisiones de gases de efecto invernadero (dióxido de carbono equivalente) (FAO, 2017). En el año 2019, en América Latina y el Caribe, más de 36 millones de toneladas de alimentos se desperdiciaron únicamente en la etapa de elaboración (Toledo-Merma et al., 2022).

Por esta razón, se debe destinar esfuerzos a la búsqueda de la reducción de pérdida de alimentos, dándole valor a los subproductos obtenidos en toda la cadena

alimentaria. La importancia de lo anterior radica en que se prevé que el crecimiento demográfico y el aumento de los ingresos conducirán a un incremento en la demanda de productos agrícolas del 35% al 50% entre 2012 y 2050, ejerciendo aún más presión sobre los recursos naturales mundiales (FAO, 2019).

Del volúmen total de alimentos desperdiciados a nivel mundial, el 25,3% corresponde a la categoría de raíces, tubérculos y cultivos oleaginosos, seguido por las frutas y hortalizas con un 21,6%, carne y productos de origen animal 11,9%, cereales y legumbres 8,6% y otros alimentos 10,1% (FAO, 2019). Sin embargo, al analizar el rango de porcentajes declarados de pérdida y desperdicio de alimentos por etapa de la cadena de suministro, en el período 2000-2017, se observa que las pérdidas de la categoría frutas y hortalizas muestran grandes variaciones entre diferentes regiones del mundo, lo que indica que existen importantes posibilidades para reducirlas, especialmente durante el transporte y en la etapa de venta al por mayor y al por menor (FAO, 2019). Por lo tanto, es necesario profundizar en las estrategias de aquellas regiones que presentan los porcentajes más bajos para aplicarlas en las otras regiones con valores mayores, considerando que el aprovechamiento de subproductos puede ser una de las estrategias clave en este proceso. El elevado porcentaje de pérdida de esta categoría no resulta sorprendente, dado el carácter perecedero de las frutas y hortalizas, que se pueden deteriorar, a menudo en solo unas pocas horas ante la falta de instalaciones de almacenamiento adecuadas (FAO, 2019).

Complementando las oportunidades para la reducción del desperdicio de ésta categoría, diversos estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de frutas y verduras está inversamente relacionado con la aparición de enfermedades cardio y cerebrovasculares y algunos tipos de cáncer (Li et al., 2006). Adicionalmente, su elevado contenido de compuestos bioactivos (Kalantari et al., 2020) resalta la importancia de su utilización y la reducción de desperdicios.

En Uruguay, los resultados indican, para el periodo 2011-2016, que las pérdidas y desperdicios de alimentos constituyen el 11% de la oferta de alimentos disponible para

consumo humano, de los cuales el 25% fueron cereales, lácteos 20%, caña de azúcar 19%, oleaginosos 15%, frutas y hortalizas 12% y carne 8% (FAO, 2017). Dentro de la categoría de frutas y hortalizas, las mayores pérdidas se producen en los cítricos (48 mil toneladas/año), seguido por las frutas de hoja caduca (42 mil toneladas/año) y papa (36 mil toneladas/año). En todos los casos las mayores pérdidas se concentran en las etapas de producción y poscosecha con una incidencia relativa entre el 70% y 75% (FAO, 2017).

Asimismo, los desechos de frutas se producen en cantidades importantes durante el procesamiento industrial y su acumulación causa graves daños al medio ambiente, por lo que es necesario, cada vez más, gestionarlos y utilizarlos en un segundo ciclo de procesamiento (El-Beltagi et al., 2022). Los residuos generados a partir de las diferentes frutas son objeto de intensas investigaciones debido a que muchos de estos subproductos son potenciales fuentes de biocompuestos, actualmente desperdiciados, y por lo tanto pueden constituir novedosos y potenciales ingredientes funcionales. Los mismos podrían utilizarse para prevenir y controlar algunas de las enfermedades no transmisibles de mayor impacto mundial, como la obesidad, diabetes y enfermedades cardíacas (Ventura et al., 2012; Santos et al., 2019; Kalantari et al., 2020). Los desechos de frutas y verduras son naturalmente ricos en compuestos bioactivos como vitaminas, antioxidantes, compuestos fenólicos, minerales y fibra (Lotfy & Baraka, 2018). Se conoce que las cáscaras de frutas tienen compuestos bioactivos que pueden usarse como antimicrobianos y antioxidantes, dentro de los cuales se destacan los flavonoides, polifenoles, proantocianidinas, vitamina k, ácido fólico, elagitaninos, entre otros (El-Beltagi et al., 2022).

Por tanto, la utilización de subproductos de la industria alimentaria contribuye no solo a aumentar la eficiencia del sistema, mejorar la seguridad alimentaria y la nutrición, sino que también impacta positivamente en la economía y la sociedad, contribuyendo a la reducción de residuos orgánicos y contaminación de suelos y agua.

## **1.2 Alimentos funcionales y enfermedades no transmisibles**

En la última década han surgido nuevas tendencias en la industria alimentaria, impulsadas por los consumidores, que se caracterizan por una mayor preocupación por la calidad y seguridad de los productos, con una preferencia marcada por productos naturales y etiquetado limpio, acompañada de regulaciones más estrictas relacionadas con el nivel residual de solventes en los alimentos (Herrero et al., 2005). Además, el sector nutracéutico y de alimentos representa uno de los sectores de mayor crecimiento en un mercado de tendencias impulsado por los consumidores (Ahangari & Sargolzaei, 2012). Esta clara demanda de productos más saludables promueve el desarrollo de alimentos funcionales y la investigación de sus potenciales efectos benéficos en la salud del consumidor (Ventura et al., 2012; Çam et al., 2013). Un alimento funcional se puede definir como aquel que produce un efecto beneficioso en una o más funciones fisiológicas, aumenta el bienestar y/o disminuye el riesgo de sufrir una determinada enfermedad (Herrero et al., 2005). A su vez, para ser considerado funcional, el alimento debe ser convencional y cotidiano, consumido como parte de un régimen normal, en cantidades normales y no afectar las propiedades sensoriales del alimento (Jones & Jew, 2007).

Con respecto a las propiedades funcionales de un alimento, la regulación contempla dos posibilidades para la designación de los mismos: 1) declaración de propiedades funcionales: son las que afirman o sugieren que existe una relación entre el nutriente contenido en el alimento y la salud, y 2) declaración de propiedades saludables: son las que vinculan el consumo de un alimento que contenga uno o más componentes que favorezcan la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad (Cámara de Industrias del Uruguay, 2017). Es decir que, no está permitido, desde un punto de vista legal, promocionar un alimento como funcional o atribuirle de forma directa propiedades funcionales. En Uruguay, la habilitación y registro de alimentos funcionales se realiza en el Ministerio de Salud Pública (MSP), utilizando tablas de claims aprobados, pero no incluyen alimentos con propiedades antioxidantes o antidiabéticas. Para alimentos con potencial antioxidante, la EFSA (European Food Safety Authority) reconoce a aquellos alimentos con contenido de quercetina, a la cual se le atribuyen propiedades

antioxidantes, y propone los siguientes claims: “el contenido de quercetina en alimentos contribuye a mantener tu organismo saludable”, “los alimentos que contienen antioxidantes contribuyen al envejecimiento saludable”, y “los antioxidantes contribuyen a la capacidad antioxidante total de todo el cuerpo y puede contribuir al fortalecimiento de las defensas”. La condición para poder usar estos claims es que el alimento tenga un contenido de entre 20 y 30 mg de quercetina (European Food Safety Authority (EFSA), 2011).

Las dietas basadas en plantas se han asociado durante mucho tiempo con una mayor esperanza de vida y un menor riesgo de contraer enfermedades crónicas y degenerativas, por lo que la búsqueda de fuentes abundantes y económicas de biocompuestos naturales a partir de las mismas es de interés mundial (Masci et al., 2016). Por lo tanto, es necesario seguir investigando para seleccionar las fuentes de estos compuestos, y aquellos que se encuentran en subproductos agroindustriales son especialmente prometedores debido a su bajo costo (Yasoubi et al., 2007). Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos del reino vegetal. Pueden variar desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta moléculas altamente polimerizadas, como los taninos. Se conoce que los flavonoides son los polifenoles más abundantes en la dieta alrededor del mundo (Li et al., 2006). La extracción de compuestos polifenólicos de fuentes naturales y su agregado en alimentos es de gran interés, dada su conocida capacidad de neutralización de radicales libres y poder antioxidante (Yasoubi et al., 2007), asociados a una promoción en la salud, y a su papel en la conservación de los alimentos (Herrero et al., 2005). Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que pueden destruir una amplia gama de sustratos biológicos, incluidos carbohidratos, ADN, proteínas o ácidos grasos poliinsaturados (El-Beltagi et al., 2022). Por lo anterior, muchas investigaciones se centran hoy en día en la recuperación de los compuestos bioactivos de los subproductos generados en la industria hortofrutícola y su utilización en el desarrollo de un potencial alimento funcional (Šavikin et al., 2018).

Asimismo, existe actualmente un creciente interés en la población por dejar de consumir aditivos alimentarios sintéticos y sustituirlos por similares de origen natural. Esto se debe en parte a posibles efectos negativos que podrían provocar los aditivos sintéticos en el organismo humano (Nanditha & Prabhasankar, 2008, como se citó en Ismail et al., 2014). Por ejemplo, los antioxidantes sintéticos más utilizados, butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) han sido restringidos, mayoritariamente debido a su posible carcinogénesis (Mahadavi, 1995, como se citó en Yasoubi et al., 2007). Sumado a lo anterior, debido a la oxidación de lípidos, los sistemas alimentarios sufren deterioro altamente relacionado con la formación de sabores desagradables, pérdida de valor nutricional y un aumento en la concentración de subproductos tóxicos, por lo cual los extractos ricos en plantas tienen un gran potencial para ser utilizados como antioxidantes naturales en sustitución de los sintéticos homólogos (Charalampia & Koutelidakis, 2017). En esta línea se ha desarrollado y se promueve el estudio de nuevos métodos de obtención de aditivos naturales para el desarrollo de alimentos funcionales (Esquivel & Vargas, 2007). Además de su interés como potenciales antioxidantes, también se destaca su poder antidiabético, entre muchos otros (Okumus & Bakkalbasi, 2021).

La diabetes es un trastorno metabólico que resulta de la deficiencia de insulina y que afecta al metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas. En la actualidad, la prevalencia de la diabetes ha aumentado en todo el mundo y se prevé que aumentará en mayor medida en las generaciones futuras (Vos et al., 2012). Uno de los diversos enfoques terapéuticos implementados para prevenir la diabetes consiste en regular los niveles de glucosa en sangre mediante diversos mecanismos. Esto es evaluado mediante ensayos antidiabéticos *in vitro*, como la inhibición de las enzimas que digieren carbohidratos y glicosilación no enzimática de la hemoglobina (Sani & Nair, 2017). Hay estudios que demuestran que los compuestos fenólicos inhiben la actividad  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, enzimas responsables del aumento de la glucosa en sangre (Okumus & Bakkalbasi, 2021). La diabetes tipo 1 se trata con inyecciones de insulina, mientras que la diabetes tipo 2 se trata con medicamentos, que en muchos casos traen asociados efectos secundarios como el aumento de peso, hipoglicemia, trastornos intestinales,

lesiones hepáticas, entre otras (Sani & Nair, 2017). De allí la importancia de tratar esta enfermedad con productos naturales que no presenten estos efectos secundarios nocivos para la salud.

Las enfermedades crónicas no transmisibles, fundamentalmente enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer y las enfermedades respiratorias, son una de las principales causas de muerte a nivel mundial y también en Uruguay, (Organización Mundial de la Salud, 16 de setiembre de 2023). Se conoce que los principales factores de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades se relacionan con los estilos de vida, destacándose la alimentación inadecuada (Skapino & Alvarez, 2016). En Uruguay, se estima que el 10 % de la población tiene diabetes, siendo de éstos el 10% diabetes tipo 1 y el 90% diabetes tipo 2 (FDU, 2021). La prevalencia y tendencia en aumento de estas enfermedades, junto con su relación con la alimentación, enfatizan la importancia de abocar recursos a la investigación y desarrollo de nuevas fuentes de compuestos bioactivos naturales.

### **1.3 La Granada**

La granada (*Púnica granatum L.*) es una fruta que ha ganado atención en las últimas décadas debido a sus múltiples propiedades nutricionales y funcionales. Pertenece a la familia Punicaceae y ha sido cultivada desde la antigüedad, presentando más de 500 cultivares. Son conocidas al menos 7 variedades: Emek, Shany, Acco, 116, Hershkovits, Wonderful y Kamel (Vicencio, 2016). La variedad Wonderful es la más cultivada a nivel mundial, debido a sus características y principalmente por tratarse de una variedad de cosecha tardía; periodo comprendido entre los meses de otoño (Vicencio, 2016). Es una de las frutas comestibles más antiguas y ha sido utilizada extensamente en la medicina popular por varias culturas (Li et al., 2006) para tratar, entre otras enfermedades, la diabetes tipo 2 (Ventura et al., 2012). El uso de la granada se encuentra en aumento a nivel mundial, y es considerada una fruta sabrosa y saludable (Marra et al., 2022). Prácticamente todas las partes de la planta presentan actividad biológica y es usada en el tratamiento de numerosas enfermedades (Ventura et al., 2012).

La granada es un árbol originario de Oriente Medio, ahora cultivado en todo el mundo, especialmente en los países mediterráneos, China, el sudeste asiático y en otras áreas tropicales, subtropicales o secas (Mahdavi & Raofie, 2016; Marra et al., 2022). La superficie estimada de cultivo mundial de granada es de alrededor de 300.000 ha. con una producción de 3,0 millones de toneladas métricas, de las cuales más del 76% se localiza en India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos (Okumus & Bakkalbasi, 2021; Marra et al., 2022). Las frutas consideradas de mejor calidad son las que crecen a una temperatura en el entorno de 38°C bajo clima seco; así, la cuenca mediterránea tiene las condiciones climáticas ideales para una alta producción de frutos de granada de buena calidad (Marra et al., 2022). Al continente americano fueron introducidas en el periodo de conquista por los españoles, extendiéndose así su cultivo en las zonas cálidas y áridas del continente (Vicencio, 2016).

### Figura 1

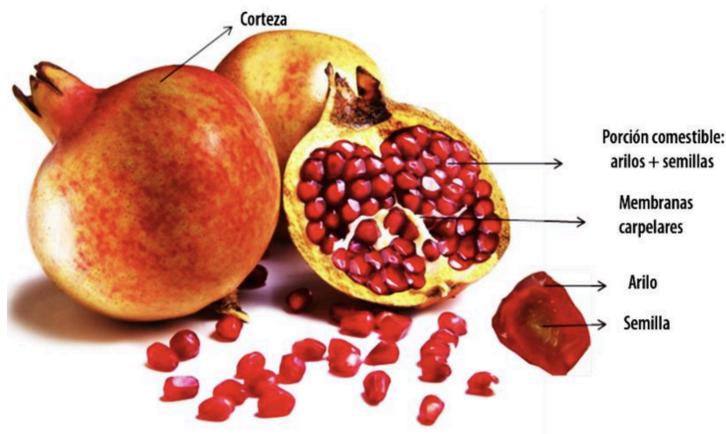
*Árbol de granada*



*Nota.* Adaptado de Aguilera-Arango et al. (2020).

## Figura 2

### Fruto de granada



*Nota.* Adaptado de Toledo (2020).

El árbol denominado granado se caracteriza por su follaje abundante, troncos y ramas torcidas, levemente espinosas, hojas de color verde y flor acampanada de color naranja brillante (Figura 1), (Vicencio, 2016). Los frutos de la granada tienen una forma redonda irregular con cáscaras coriáceas que varían en color de amarillo, verde o rosa a rojo intenso brillante, dependiendo de la variedad y etapa de maduración. Internamente tiene cámaras de múltiples óvulos separados por paredes membranosas (tabique) y un mesocarpio carnoso. Las cámaras están llenas de semillas envueltas en una pulpa rojo-rosa succulenta y comestible llamada arilos (Figura 2). En general, las frutas recolectadas con defectos moderados se utilizan para el procesamiento, mientras que los frutos sin defectos y con defectos leves se comercializan como frescos. Dentro de las principales causas de descarte de la granada se encuentra la partidura de piel y los golpes de sol. Sin embargo, si bien el presentar dichas características son causa de descarte de la fruta, el producto interno (arilos), no siempre es afectado (Vicencio, 2016).

Productos como jugo, jugo concentrado, vino, gelatina, mermeladas, arilos frescos aislados, arilos secos, corteza en polvo, y otros productos tienen una gran demanda y un mercado bien establecido, (Venkitasamy et al., 2019). La seguridad e inocuidad de

la granada y algunos de sus componentes se han estudiado experimental y también clínicamente, y no hay evidencia de efectos tóxicos en órganos corporales como corazón, hígado o riñón (Cerde et al., 2003; Aviram et al., 2004, como se citó en Šavikin et al., 2018). De todas formas, previo a la utilización de cualquier subproducto de la fruta como ingrediente alimentario es necesario analizar su estabilidad microbiológica.

Recientemente, ha habido un notable aumento en el cultivo comercial de granada a nivel mundial, debido a los beneficios potenciales para la salud que ofrece (Venkitasamy et al., 2019). En América del Sur, Perú es el principal país productor, superando las 35.000 toneladas por año, seguido de Argentina, con 4.000 a 5.000 toneladas por año y Chile, con 3.500 a 4.000 toneladas por año. En Uruguay el cultivo es incipiente aún pero se encuentra en crecimiento, existiendo emprendimientos comerciales en el departamento de Maldonado y, en menor escala, en Canelones, y algunos destinados a la investigación (Villamil et al., 2022). Su cosecha no es fácil y la adaptación al clima requiere sus cuidados (El Observador, 2017).

Según Venkitasamy et al. (2019), una fruta de granada bien madura contiene un 78% de humedad, 1,6% de proteína, 14,5% de carbohidratos, 5,1% de fibra, 0,7% de minerales y 0,1% de grasas. En cuanto a los minerales, se ha reportado la presencia de fósforo, ácido oxálico, magnesio, potasio, hierro, calcio y boro, y dentro de las vitaminas se destaca su composición en tiamina, riboflavina, ácido nicotínico y vitamina C (Ismail et al., 2014; Lotfy & Baraka, 2018; Venkitasamy et al., 2019; El-Beltagi et al., 2022). Presenta a su vez entre un 12% y un 16% de glucosa y fructosa digeribles y su acidez oscila entre el 1,5% y el 3,0%. Su aporte energético es de aproximadamente 65 cal/100 g (Venkitasamy et al., 2019). Las frutas de granada contienen entre un 38% y 50% de jugo, entre un 39% y 53% de cáscara, y entre un 8% y 12% de semillas (Venkitasamy et al., 2019), es de decir que, aproximadamente el 50% del fruto representa un desperdicio luego de extraído el jugo (Kalantari et al., 2020; Kumar et al., 2022).

De la amplia variedad de beneficios que se le atribuyen a la granada, se destaca su capacidad antioxidante, antidiabética, hipolipidémica, antibacteriana, antiinflamatoria, antiviral y anticancerígena (Viuda-Martos et al., 2010; Šavikin et al., 2018; Okumus & Bakkalbasi, 2021; Marra et al., 2022). Inflamación estomacal, fiebre, bronquitis, diarrea, infección del tracto urinario, entre otros, se han tratado con varias partes de granada (Marra et al., 2022). Algunos compuestos responsables de estas actividades podrían llegar a ser compuestos fenólicos como el ácido gálico y elálgico, taninos y flavonoides presentes en la fruta (Šavikin et al., 2018; Torres et al., 2020; Okumus & Bakkalbasi, 2021). En la granada predominan las antocianinas sobre los taninos, lo que explica su elevada actividad reductora. Cianidina-3,5-O-diglucósido y pelargonidina-3,5-O-glucósidos son las antocianinas más representativas en los diferentes genotipos de granada (Marra et al., 2022). En la Tabla 1 se resumen los principales compuestos presentes en la fruta y sus potenciales beneficios atribuidos para la salud.

**Tabla 1**

*Principales compuestos presentes en la granada y actividad benéfica reconocida*

Compuesto	Actividad benéfica reconocida	Referencia
Ácido gálico	antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética	Torres et al. (2020) Šavikin et al. (2018) Kumar et al. (2022)
Ácido elálgico	antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética	Torres et al. (2020) Šavikin et al. (2018) Kumar et al. (2022)
Cianidina-3,5-O-di glucósido	antioxidante	Marra et al. (2022)

Pelargonidina-3,5-O-glucósidos	antioxidante	Marra et al. (2022)
Punicalagina	antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética	Okumus & Bakkalbasi (2021)
Punicalina	antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética, antitumoral	Okumus & Bakkalbasi (2021) Ascacio-Valdés et al. (2012)
Quercetina	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria, antitumoral	Kumar et al. (2022) Lansky & Newman (2007) Al-Ansari et al. (2023)
Catequina	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria	Kumar et al. (2022)
Rutinapunicalina	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria	Kumar et al. (2022)
Kaempferol	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria	Kumar et al. (2022)
Luteolina	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria	Kumar et al. (2022)
Epicatequina	antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica	Kumar et al. (2022)

El creciente uso de suplementos naturales como los compuestos fenólicos extraídos de frutas y verduras o sus subproductos, como el caso de la cáscara de granada, han aumentado enormemente como sustituto de los aditivos sintéticos en alimentos y sistemas biológicos (Sharayei et al., 2019). Por los beneficios antes mencionados, los subproductos de la granada podrían utilizarse como sustrato para la producción de alimentos, aditivos alimentarios, nutraceuticos y suplementos valiosos desde el punto de vista nutricional y funcional (Charalampia & Koutelidakis, 2017).

El jugo de granada es un potencial quimiopreventivo, quimioterapéutico, antiaterosclerótico y antiinflamatorio (Çam, Hisil, & Durmaz, 2009, como se citó en Cam & Hisil, 2010). Sin embargo, los productos elaborados a partir de los subproductos de la granada aún no se han popularizado y existen muy pocos datos sobre la bioactividad de su cáscara y semillas (Charalampia & Koutelidakis, 2017). La cáscara de algunas frutas tienen mayor actividad antioxidante que la pulpa, como se ha reportado en el caso de la granada (Cam & Hisil, 2010). Sólo unos pocos estudios se centraron recientemente en la cantidad y composición de los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de la granada, en comparación a los numerosos estudios reportados sobre las propiedades del jugo. Sin embargo, Mahdavi & Raofie (2016) citan más de diez investigaciones sobre los beneficios de la cáscara de granada, donde destaca su actividad anticancerígena, hepatoprotectora, hipoglucémica, inmunomoduladora, antibacteriana, antitumoral, antiviral y antidiabética, entre otras. Los compuestos presentes en la cáscara son de naturaleza variada y provocan un efecto sinérgico en el organismo, que a menudo puede causar diferentes respuestas fisiológicas que actúan sobre diferentes órganos objetivo al mismo tiempo (Marra et al., 2022).

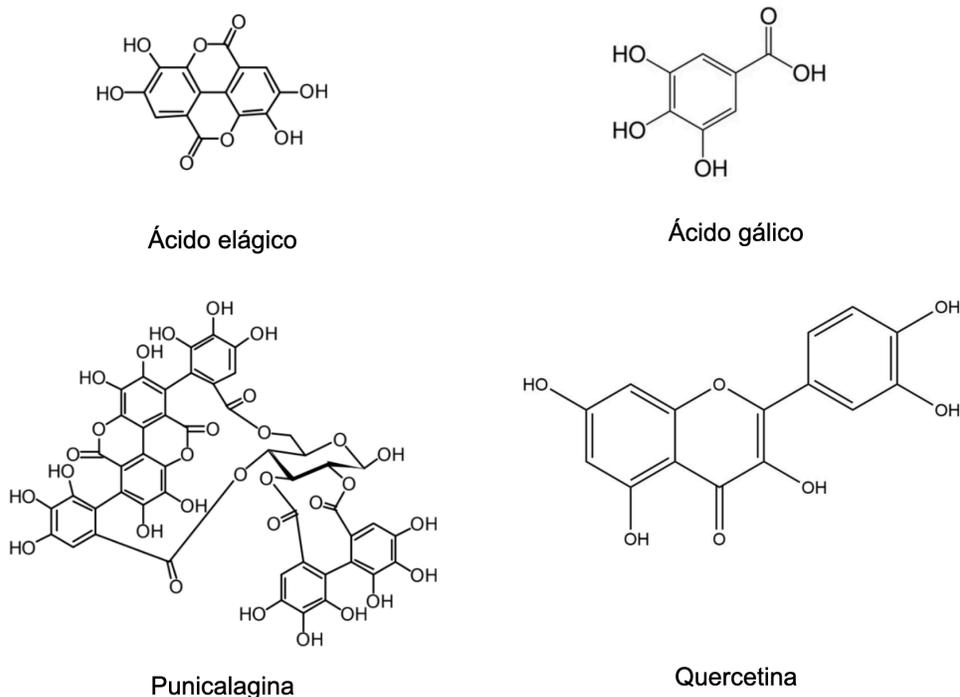
El contenido de compuestos bioactivos en la fruta en general y particularmente en la cáscara, depende de factores como la especie, variedad, índice de madurez, y las condiciones ambientales y manejo agronómico a las cuales fue expuesta la planta (Marra et al. 2022). La concentración de polifenoles en este tipo de fruto se va incrementando a medida que aumenta su estado de desarrollo y se detiene una vez alcanzada la maduración. La granada es un fruto no climatérico, por lo que es

necesario cosechar el fruto en el periodo correcto y así conservar sus características sensoriales y obtener la mayor concentración de compuestos bioactivos posible (Vicencio, 2016). Varios estudios han informado que el contenido fenólico de la cáscara de granada es 10 veces mayor que el que se encuentra en la pulpa (Li et al., 2006), y tiene un gran potencial para el desarrollo de productos con alto valor añadido a través de los procesos adecuados (Charalampia & Koutelidakis, 2017).

La cáscara de granada es rica en nutrientes, especialmente en compuestos fenólicos (Lotfy & Baraka, 2018), ácido elágico y sus derivados, ácido gálico, como elagitaninos (Ascacio-Valdés et al., 2012), taninos, punicalagina y punicalina (Bustamante et al., 2017), catequina, rutinapunicalina, kaempferol, luteolina, y epicatequina (Kumar et al., 2022) (Tabla 1). El más abundante de estos compuestos es la punicalagina, responsable también de más del 50% de la actividad antioxidante en el jugo de granada (Adams et al., 2006 como se citó en Cam & Hisil, 2010 ), junto con el ácido gálico, el ácido elágico y la quercetina (Figura 3), (Kumar et al., 2022).

### Figura 3

*Principales compuestos fenólicos presentes en la cáscara de granada*



La punicalagina es un elagitanino en el cual los ácidos gálico y elágico se unen a una molécula de glucosa siendo los isómeros de la misma los responsables de la coloración amarillenta de la corteza (García-Viguera & Pérez, 2004). La presencia de este biocompuesto y sus derivados se ha asociado con la protección contra enfermedades crónicas no transmisibles (Toledo-Merma et al., 2022), por sus propiedades antioxidante, antimicrobiana y antitumoral, entre otras, (Ascacio-Valdés et al., 2012). La quercetina ha sido asociada con la apoptosis de células tumorales (Lansky & Newman, 2007), y se le ha atribuido actividad antioxidante y anticancerígena (Al-Ansari et al., 2023).

Además de los beneficios potenciales de la cáscara de granada antes mencionados, otra ventaja de este subproducto es que resiste a condiciones de procesamiento y

almacenamiento tales como el tratamiento térmico y refrigeración, lo que lo convierte en un ingrediente alimenticio de gran interés (Charalampia & Koutelidakis, 2017).

Por todas sus virtudes, la cáscara de granada podría utilizarse en medicina o en la industria de alimentos, sin embargo, es considerado hoy en día un residuo agroindustrial (Ventura et al., 2012), siendo descartado o usado en alimentación animal (Magangana et al., 2020). Se estima que se generan anualmente alrededor de 3,6 millones de toneladas de cáscara de granada en el mundo (Grillo et al., 2023). Esta gran cantidad presenta un riesgo potencial para la salud y el medio ambiente, ya que contribuye a la contaminación ambiental y supone problemas de eliminación si no se gestiona adecuadamente. Por esta razón es necesario encontrar métodos apropiados para la extracción de compuestos bioactivos de residuos de granada y agregarle valor al incorporarlos, por ejemplo, a una nueva matriz alimentaria (Grillo et al., 2023).

#### **1.4 Extracciones**

La obtención y concentración de los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de granada depende, no solo del cultivar, zona del cultivo, y maduración de la fruta al ser cosechada (Charalampia & Koutelidakis, 2017), sino que también tiene una gran dependencia del método de extracción (Šavikin et al., 2018) y del solvente utilizado (Kalantari et al., 2020; Kumar et al., 2022). La eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos está influenciada por las condiciones a las que es sometido el subproducto durante el proceso, como la temperatura, tiempo de extracción, polaridad del solvente, entre otros, y sus efectos pueden ser independientes o interactivos (Santos et al., 2012). Estas condiciones seleccionadas provocan cambios importantes en la composición y estructura de la muestra, y por lo tanto también en su funcionalidad (Rivas et al., 2021). La temperatura de secado de la muestra previo a la extracción también influye en el perfil químico y biológico de los metabolitos secundarios que se encuentran en la cáscara (Magangana et al., 2020).

Los compuestos bioactivos presentes en las plantas son extraídos generalmente a partir de solventes orgánicos como el metanol, etanol, dietil éter y acetona. El metanol

es un solvente muy efectivo para extraer una amplia gama de polifenoles, y es por esto frecuentemente utilizado a escala de laboratorio e industrial, sumado a su fácil acceso y bajo costo (Cam & Hisil, 2010). Existen antecedentes de la extracción de los polifenoles de la cáscara de granada mayoritariamente a partir de metanol y/o una combinación de metanol con otros solventes orgánicos, a partir de extracciones clásicas (Cam & Hisil, 2010). El agua no es un solvente efectivo para la extracción de polifenoles en condiciones de presión atmosférica (Cam & Hisil, 2010). El solvente a utilizar es un factor esencial para la extracción y recuperación de los compuestos bioactivos; tanto solventes polares como los no polares logran extraer diferentes compuestos bioactivos y fenólicos de las plantas, utilizándose generalmente aquellos de baja polaridad para extraer compuestos lipófilos y pigmentos (Cam & Hisil, 2010).

Para la extracción de los compuestos de interés, los métodos convencionales como la maceración resultan tediosos, requieren mucho tiempo, grandes cantidades de solventes, tienen baja selectividad y provocan un impacto negativo en el medio ambiente en términos de emisión de compuestos orgánicos volátiles (Herrero et al., 2005; Mahdavi & Raofie, 2016; Venkitasamy et al., 2019). A su vez, pueden quedar residuos del solvente en los extractos que pueden comprometer su uso final (Rivas et al., 2021). Debido a estas desventajas, han surgido en los últimos años nuevas técnicas de extracción denominadas “verdes”, las cuales se basan en el diseño de procedimientos sostenibles que reducen el consumo de energía, utilizan agua o solventes y productos naturales renovables y en bajas cantidades, y garantizan un producto seguro y de alta calidad (Torres et al., 2020). Entre estas nuevas técnicas se destaca la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE). En este sentido, tanto la extracción PLE como la SFE son las técnicas más utilizadas basadas en el uso de fluidos comprimidos para la obtención de compuestos bioactivos. Este tipo de procesos son ampliamente conocidos como tecnologías verdes debido a su bajo (o nulo) consumo de solventes orgánicos.

La extracción con dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) se ha convertido en una técnica de elección para la extracción y aislamiento de productos naturales y

fitoquímicos de alto valor, por tratarse de un proceso ecológico, que permite la recuperación de compuestos puros y extractos sin trazas de solventes especialmente útiles para el desarrollo de alimentos funcionales, y productos nutracéuticos y farmacéuticos (Mushtaq, 2015). Los procesos de extracción que utilizan dióxido de carbono supercrítico son potenciales métodos alternativos para la recuperación de aceites esenciales y compuestos bioactivos que buscan reemplazar los procesos de extracción convencionales, como la maceración con solventes (Mahdavi & Raofie, 2016).

Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a una presión y temperatura por encima de su punto crítico, adquiriendo de esta forma propiedades que se encuentran entre las de un gas y las de un líquido. La densidad de un fluido supercrítico es similar a la de un líquido (buen poder solvente), su viscosidad es similar a la de un gas (buenas propiedades de transferencia de masa), y su difusividad es intermedia entre los dos estados, por lo cual se convierte en un fluido compresible con un poder solvente similar a la de un líquido (Herrero et al, 2005). Por tanto, una vez que se sobrepasa el punto crítico, el fluido adquiere propiedades significativamente diferentes como solvente, las cuales se alteran de forma importante al modificar su presión y temperatura. Esto permite tener una selectividad que puede ser ajustada hacia los compuestos de interés (Herrero et al, 2005). Las ventajas de utilizar CO<sub>2</sub> como solvente es que es seguro, no tóxico, no carcinógeno, no inflamable, tiene puntos críticos moderados (31,1°C, 7.38 MPa) , y es posible recuperarlo luego de la extracción para utilizarlo posteriormente en otros procesos industriales, por ejemplo en procesos de carbonatación de bebidas, congelación, conservación, entre otros, cumpliendo así con algunos de los principios de la Química Verde (Mahdavi & Raofie, 2016). Sumado a lo anterior, el CO<sub>2</sub> posee una serie de propiedades que lo convierten en un solvente supercrítico ideal, incluyendo, entre otras, su consideración como compuesto GRAS (Generally Recognized As Safe) para la industria alimentaria, su bajo costo y gran disponibilidad. Al ser un gas a temperatura ambiente es posible su completa evaporación y eliminación del producto final por simple despresurización. Esta última propiedad es muy importante ya que permite obtener un extracto libre de solvente

(Herrero et al., 2005). El CO<sub>2</sub> es apropiado para recuperar compuestos de naturaleza hidrofóbica o ligeramente hidrofílica. Si la extracción tiene como objetivo la obtención de compuestos hidrofílicos se le puede adicionar solventes orgánicos (co-solventes en baja proporción) de la misma naturaleza logrando modificar la polaridad del fluido (Ahangari & Sargolzaei, 2012; Toledo, 2020). Las variables para optimizar las extracciones de esta técnica son: la presión, la temperatura, el tiempo de extracción y el uso y volúmen de solventes y/o co-solventes (Mahdavi & Raofie, 2016).

Entre las tecnologías verdes disponibles, la extracción con líquidos presurizados (PLE) es otra técnica moderna que explora el uso de alta temperatura y presión con un solvente líquido. La alta temperatura favorece las interacciones de los analitos con la matriz, aumenta la transferencia de masa de los compuestos presentes en la muestra al solvente de extracción, facilita la difusión desde la matriz de la materia prima y aumenta la solubilidad de los compuestos extraídos (Santos et al., 2019). El principio básico es que utiliza solventes a temperaturas mayores a su punto de ebullición (y menores a su punto crítico), y a una presión suficiente para que se mantenga en estado líquido durante todo el proceso. La alta temperatura aumenta la solubilidad de los analitos en el solvente, mientras que la viscosidad y la tensión superficial del solvente disminuyen, permitiendo una mayor penetración en la matriz (Herrero et al., 2005). Sin embargo, la temperatura excesiva puede promover la degradación de los compuestos (Santos et al., 2019). La extracción con líquidos presurizados apareció como otra alternativa para la concentración y fraccionamiento de biocompuestos naturales, ya que permite una extracción más rápida que las técnicas tradicionales, y reduce el consumo de solventes a través de una tecnología verde, obteniendo rendimientos más altos con bajos volúmenes de solventes, disminuyendo así la dilución del extracto final (Arciniegas, 2020). Un caso particular de extracción con líquidos presurizados se da cuando el solvente utilizado es agua, lo que se conoce como extracción con agua subcrítica. A las temperaturas utilizadas (entre 100°C y 374°C, temperatura crítica del agua) los enlaces de hidrógeno se debilitan, modificando la constante dieléctrica del agua y por ende su polaridad. Dependiendo de la temperatura de operación, se pueden

extraer selectivamente distintos compuestos: los más polares a menor temperatura y los menos polares a mayor temperatura (Herrero et al, 2005).

### **1.5 Antecedentes relacionados: extracciones de cáscara de granada**

Se han reportado en bibliografía estudios sobre las propiedades bioactivas de la cáscara de granada y sus extractos, utilizando diferentes técnicas de secado y extracción. La mayoría de estas investigaciones utilizaron técnicas tradicionales, principalmente la maceración, variando los solventes utilizados. Dentro de estos trabajos se pueden destacar los de Masci et al. (2016) y Kumar et al. (2022).

Masci et al. (2016), estudiaron la eficiencia de varios métodos de extracción de compuestos bioactivos de cáscara de granada, sometiendo los extractos obtenidos a ensayos cuanti y cualitativos, evaluando su capacidad antioxidante *in vitro* y actividad antiproliferativa contra el cáncer de vejiga humana en células T24. Las técnicas de extracción ensayadas fueron maceración con: etanol, metanol, acetato de etilo y agua acidificada, y extracción por el método de Soxhlet. Los resultados mostraron que el acetato de etilo fue el solvente más efectivo para la obtención de extractos enriquecidos en ácido elágico y/o punicalaginas. La extracción con acetato de etilo se realizó sobre el extracto de la maceración con etanol. Los ensayos antioxidantes y antiproliferativos demostraron que la capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido fenólico, mientras que la capacidad antiproliferativa se debió principalmente al contenido de ácido elágico.

Kumar et al. (2022), evaluaron los efectos de diferentes métodos de secado (liofilizado, horno de bandeja y secado solar) y solventes de extracción (metanol, etanol, agua, acetona y hexano), en la extracción y recuperación de los principales compuestos bioactivos (ácido elágico, ácido gálico, quercetina y punicalagina) de la cáscara de granada para las variedades Bhagwa y Ganesh, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados indicaron que la mayor extracción de compuestos bioactivos se obtuvo utilizando metanol (10 mL por 0,2 g de harina de cáscara de granada) como solvente de extracción y el secado por liofilización.

Otros estudios realizaron extracciones sobre cáscara de granada utilizando técnicas innovadoras, como Kalantari et al. (2020), Garcia et al. (2021) y Rivas et al. (2021). Kalantari et al. (2020), estudiaron la eficacia de la aplicación de beta-ciclodextrina en una extracción asistida por ultrasonido (EAU) como método ecológico, sostenible y seguro para la extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de granada. Como resultado se logró cuantificar, por HPLC, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cinámico y apigenina como compuestos bioactivos mayoritarios. Garcia et al. (2021), determinaron las condiciones óptimas de extracción PLE, utilizando una combinación de agua presurizada y etanol, con el objetivo de obtener el extracto de cáscara de granada con el máximo contenido de polifenoles totales, punicalagina y actividad antimicrobiana, utilizando un diseño compuesto central con puntos axiales. Las variables estudiadas fueron el porcentaje de solvente agua:etanol (10-90% v/v) y la temperatura de extracción (55-200°C). Las condiciones se optimizaron en 200°C y 77% de etanol. Los hallazgos de esta investigación apoyan la eficacia de la extracción PLE en la recuperación de compuestos fenólicos totales pero no en la recuperación de punicalagina. Rivas et al. (2021), optimizaron la extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de granada a partir de la técnica de fluidos supercríticos, utilizando CO<sub>2</sub>. Llevaron a cabo un diseño Box-Behnken combinado con un método de superficie de respuesta, y se utilizó la metodología RSM para optimizar la presión de extracción (250-300 bar), la temperatura (45-55°C) y el tiempo (2-4 h). Concluyeron que las condiciones aplicadas a la cáscara de granada afecta de forma directa en la concentración y las propiedades funcionales de extractos y fibra dietética residual, siendo las condiciones óptimas encontradas en 291 bar, 46,5°C y 2,5 horas.

Sin embargo, a pesar de su potencial, el uso de la cáscara de granada en matrices alimentarias sigue siendo escaso y son pocos los estudios reportados donde se ha incorporado cáscara o extractos de cáscara de granada en alimentos. Entre ellos se puede mencionar el de El-Said et al. (2014), quienes prepararon yogur batido a partir de leche descremada en polvo reconstituida y enriquecida entre un 5% y un 35% con extracto acuoso de cáscara de granada. Los resultados mostraron que al aumentar el

porcentaje del extracto agregado, aumentó significativamente la actividad antioxidante en el alimento, destacándose el hecho de que la adición del extracto no tuvo efectos significativos sobre los atributos sensoriales en comparación con la muestra de control. En otro estudio de El-Beltagi et al. (2022), elaboraron tortas sustituyendo la harina de trigo por un 3% de cáscara de granada, y analizaron los compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes totales presentes en el alimento. La actividad antirradicalaria aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de 1,78% en la torta de control a 7,11% en la torta con adición de harina de cáscara de granada. Los autores concluyeron por tanto que la cáscara de granada puede ser utilizada en la preparación de tortas y otros alimentos como un conservante natural.

### **1.6 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad**

La bioaccesibilidad se define como la presencia de un constituyente en el intestino, como consecuencia de la liberación del mismo desde una matriz alimentaria, mientras que la biodisponibilidad hace referencia a la fracción del componente ingerido que se encuentra disponible en el sitio de acción para su utilización en funciones fisiológicas normales (Saura-Calixto et al., 2007). El estudio de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en un determinado alimento es necesario ya que para tener un efecto beneficioso en la salud, primero deben ser liberados de la matriz alimentaria y encontrarse biológicamente accesibles en el tracto gastrointestinal (Okumus & Bakkalbasi, 2021). Sólo los biocompuestos liberados de la matriz alimentaria por la acción de las enzimas digestivas en el intestino delgado, y por la microflora bacteriana en el intestino grueso, son bioaccesibles y, por lo tanto, potencialmente biodisponibles (Saura-Calixto et al., 2007). Por lo anterior, resulta indispensable estudiar, no sólo la presencia de compuestos bioactivos en un extracto o matriz alimentaria, sino que también la bioaccesibilidad de dichos compuestos. Entre las diferentes técnicas a las cuales se puede recurrir con este objetivo, se destaca la simulación digestiva *in vitro*, que presenta la ventaja de no utilizar animales para el estudio, y ser más accesible y de menor costo que la simulación *in vivo* (Brodkorb et al., 2019). La simulación digestiva *in vitro* puede ser estática o dinámica, y durante la misma se utilizan enzimas y fluidos gastrointestinales para simular las condiciones fisiológicas en sus tres fases (oral,

gástrica e intestinal), y evaluar posteriormente el contenido de biocompuestos en la fracción bioaccesible y en la fracción colónica (Saura-Calixto et al., 2007). La fracción colónica es aquella que no se digiere ni se absorbe en el intestino delgado y llega al colon, donde sirve como sustrato para la microflora fermentativa (Saura-Calixto et al., 2000 como se citó en Saura-Calixto et al., 2007). La misma está formada por fibra dietética y otros compuestos resistentes a la acción de las enzimas, como proteínas no digeribles, almidón resistente, polifenoles y otros compuestos bioactivos (Saura-Calixto et al., 2007). Debido a su simplicidad, los modelos estáticos que utilizan una proporción constante de alimentos, enzimas y electrolitos, y un pH constante para cada fase digestiva, se han utilizado ampliamente durante muchas décadas para fines alimentarios, demostrando que son muy útiles para predecir los resultados de la digestión *in vivo* (Brodkorb et al., 2019).

En las frutas, los polifenoles se encuentran en forma libre (principalmente como glucósidos), covalentemente unidos a componentes estructurales de la pared celular, o también pueden encontrarse físicamente atrapados o ligados a macronutrientes (por ejemplo, almidón, proteínas y lípidos), principalmente a través de interacciones no covalentes (Parada & Aguilera, 2007; Acosta-Estrada et al., 2014; Zhang et al., 2014, como se citó en Colantuono et al., 2017). Los polifenoles libres y no covalentemente unidos pueden disolverse en el tracto gastrointestinal superior, ya sea directamente o después de la acción de las enzimas digestivas sobre la matriz alimentaria. En cambio, aquellos covalentemente unidos a la fibra dietética, también conocida como fibra antioxidante, pasan sin modificar por el intestino superior y llegan al colon. En este sitio, los polifenoles unidos se liberan por acción de las enzimas microbianas, creando así un ambiente reductor y estando disponibles para su absorción en sus formas químicas originales o como metabolitos microbianos. En el colon, los polifenoles también pueden modificar positivamente la composición de la microbiota y, a su vez, la fisiología del hospedador, (Saura-Calixto, 1998; Vitaglione et al., 2008; Selma et al., 2009; Saura-Calixto, 2010; Etxeberria et al., 2013; Vitaglione et al., 2015, como se citó en Colantuono et al., 2017).

Se ha reportado en bibliografía el estudio de Okumus & Bakkalbasi (2021), quienes realizaron una simulación digestiva de extractos de cáscara de granada, pero no se ha encontrado ningún trabajo que haya realizado la simulación digestiva sobre un alimento con incorporación de cáscara o extractos de cáscara de granada, por lo que el análisis de este aspecto resulta sumamente innovador.

### **1.7 Perspectivas del trabajo**

La relación entre alimentación y salud tiene un impacto cada vez mayor en la innovación alimentaria debido a la popularidad del concepto de alimentos funcionales (Altunkaya et al., 2013). El presente trabajo se centra en evaluar la capacidad antioxidante y antidiabética de la cáscara de granada y busca caracterizar un potencial ingrediente alimentario funcional a partir de un subproducto agroindustrial, generando de esta forma un doble cometido de reducir los desperdicios de la industria fomentando procesos circulares sostenibles, y contribuir al conocimiento de la lucha contra las enfermedades no transmisibles. El mismo se llevó a cabo con la variedad Wonderful, que es la más frecuentemente comercializada en Uruguay, y la variedad más extendida y la estándar en la industria (Marra et al., 2022).

En este estudio se buscó comparar una técnica de extracción tradicional con técnicas innovadoras, analizando las propiedades antioxidantes y antidiabéticas de los extractos obtenidos, e incorporándolos luego a una matriz alimentaria. El alimento seleccionado fue una mermelada de frutilla, a la que posteriormente se le realizó una simulación digestiva para conocer la bioaccesibilidad de los compuestos de interés. La mermelada es uno de los alimentos más consumidos en los desayunos uruguayos, según fue reportado por el informe de investigación de Opción Consultores (2020), sobre hábitos y comportamiento de consumo de alimentos en Uruguay, luego de los panificados, quesos y fiambres y manteca. Se destacó además que la mermelada fue uno de los alimentos seleccionados como de preferencia por los consumidores que buscaban alimentos orientados a la salud, por lo que resulta interesante seleccionar esta matriz alimentaria para la incorporación de los extractos de cáscara de granada. Cabe

destacar que hoy en día no se comercializa en el mercado uruguayo ningún alimento con la incorporación de cáscara de granada.

Motivó el desarrollo de esta investigación la posibilidad de aprovechar un subproducto agroindustrial con numerosas propiedades bioactivas e incorporarlo a un alimento de un alto consumo en Uruguay, aportando al conocimiento científico sobre sus propiedades antioxidantes y antidiabéticas, fundamentales para combatir algunas de las enfermedades no transmisibles de mayor prevalencia en la actualidad.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Aplicar una técnica innovadora de extracción asociada a la química verde al subproducto cáscara de granada y utilizar el extracto obtenido en la elaboración de un alimento potencialmente funcional.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar fisicoquímicamente la cáscara de granada.
- Realizar una extracción de la cáscara de granada utilizando una técnica tradicional (maceración).
- Seleccionar las condiciones óptimas para la extracción de la cáscara de granada utilizando una técnica innovadora verde (se analizan dos técnicas: extracción con fluidos supercríticos y extracción con líquidos presurizados).
- Caracterizar los extractos obtenidos por la técnica tradicional y la innovadora seleccionada como la óptima. Estudiar la capacidad antioxidante y antidiabética de los extractos y la capacidad antioxidante de sus fracciones bioaccesibles.
- Incorporar los extractos obtenidos a una matriz alimentaria (mermelada).
- Comparar la capacidad antioxidante y antidiabética de las mermeladas elaboradas y sus fracciones bioaccesibles.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Granadas

Las granadas utilizadas fueron de la variedad Wonderful, comerciales y proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay. Las mismas se sanitizaron con agua y jabón detergente de cocina, y se pelaron a mano, separando la cáscara de la parte comestible y las semillas. La cáscara se molió en trozos pequeños en una procesadora para su posterior secado.

#### 3.2 Selección de la temperatura de secado

Se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares con el objetivo de determinar la temperatura óptima de secado de la cáscara de granada, para conservarla seca y refrigerada durante el periodo de estudio. Para ello, se realizaron ensayos de secado en estufa de convección marca Labotecgroup, modelo DHG-9053A, a 40°C, 60°C y 105°C, temperaturas seleccionadas por otros autores (Torres et al., 2020; Fernandez & Romero, 2021; Rivas et al., 2021). El secado se consideró terminado una vez que la cáscara de granada alcanzaba un porcentaje de humedad menor al 1%, de modo de asegurar su estabilidad microbiológica a lo largo de todo el estudio. Posterior al secado, se obtuvo una harina de cáscara de granada utilizando un molinillo de cocina convencional, y se analizó su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante por ABTS, con el fin de evaluar una posible pérdida de compuestos bioactivos por exposición al calor. Los resultados se muestran en el punto 4.1.1. La temperatura de secado seleccionada fue de 105°C ya que se observó que a esta temperatura el secado se lograba en un tiempo menor y el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medida por ABTS no presentó diferencias significativas con la cáscara secada a 40°C y 60°C.

Por lo anterior, el secado se determinó a 105°C durante 5 horas. Luego del secado la cáscara se molió hasta obtener una harina y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis (Figura 4).

## Figura 4

### *Obtención de harina de cáscara de granada*



### **3.3 Análisis fisicoquímicos de la cáscara de granada**

El contenido de humedad de la cáscara (sin secar) fue determinado por análisis gravimétrico en estufa de convección marca Labotecgroup, modelo DHG-9053A, a 105°C hasta peso constante (AOAC International, 2016). El resto de los ensayos fueron determinados sobre la harina de cáscara de granada. El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente a partir de la incineración de la muestra en mufla a 550°C hasta peso constante (AOAC, 1997). En cuanto al contenido graso de la muestra, el mismo se determinó a partir del método de Soxhlet (AOAC, 1997). El contenido de fibra se determinó a partir de una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos, utilizando un kit de ensayo de fibra dietética SIGMA (DF-100A y TDF-C10). Las enzimas utilizadas fueron:  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa (AOAC, 1997). El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl, utilizando un factor de 6,25. Para ello se utilizó un digestor Tecator 1007, Digestión System 6 y un destilador Tecator 1002, Kjeltel System (Hudson, 1982, Matissek et al., 1998, Pomeranz et al., 1980). Los carbohidratos se calcularon por diferencia. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

El color se midió utilizando un colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta Business Technologies Inc., Tokio, Japón). El color de la muestra se midió en el espacio CIELAB, con iluminante estándar D65, ángulo de observación de 10° y calibración de blanco y cero. Se midieron  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (rojo) y  $b^*$  (amarillo), donde:

$L^*$ : es el parámetro de la luminosidad; otorga la diferencia entre la claridad/oscuridad del objeto. Su escala va del 0 (negro) al 100 (blanco).

a: tonalidades desde el rojo al verde. Los valores positivos, ubicados a la derecha del eje L, corresponden a los rojos, mientras que los valores negativos, ubicados a la izquierda del eje L, se acercan al verde.

b: tonalidades desde el azul al amarillo. Los valores negativos corresponden al azul, mientras que los valores positivos se acercan al amarillo (Vicencio, 2016).

La actividad de agua de la muestra ( $A_w$ ) se determinó utilizando el equipo Aqualab LAB 4 TE. El mismo se calibró utilizando una sal ( $MgCl_2$ ) de  $A_w$  similar a la esperada en la muestra ( $A_w=0,3$ ). Este parámetro es uno de los factores más críticos para asegurar la calidad y seguridad de los productos alimenticios ya que representa la cantidad de agua disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar el crecimiento microbiano (Vicencio, 2016).

### **3.4 Extracciones realizadas**

Se realizaron extracciones supercríticas con  $CO_2$ , extracciones con líquidos presurizados y maceraciones sobre la harina de cáscara de granada, con el objetivo de comparar una técnica tradicional de extracción convencional, con técnicas innovadoras asociadas a la química verde.

#### **3.4.1 Maceración**

Se adaptó y escaló el método descrito por Santos et al. (2012). Se partió de 2 g de harina de cáscara (sin tamizar), a la cual se le agregó 30 mL de solvente en un tubo Falcon de 50 mL. Se utilizó como solvente etanol acuoso 75% (etanol/agua v/v) y metanol acuoso 75% (metanol/agua v/v) (este último únicamente para pruebas preliminares, pero luego fue descartado como solvente de extracción, ver punto 4.1.3). Posteriormente, se agitó constantemente en la oscuridad durante 4 horas, a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm y se filtró con papel de filtro. Se realizó un lavado con 15 mL del solvente utilizado, y se agitó durante media hora. Se procedió nuevamente a separar y filtrar la parte soluble y luego se evaporó todo el solvente en baño de agua a 40°C bajo flujo de nitrógeno, hasta llegar a peso

constante. Tanto el extracto de macerado como el residuo remanente de la extracción se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

El rendimiento másico de extracción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

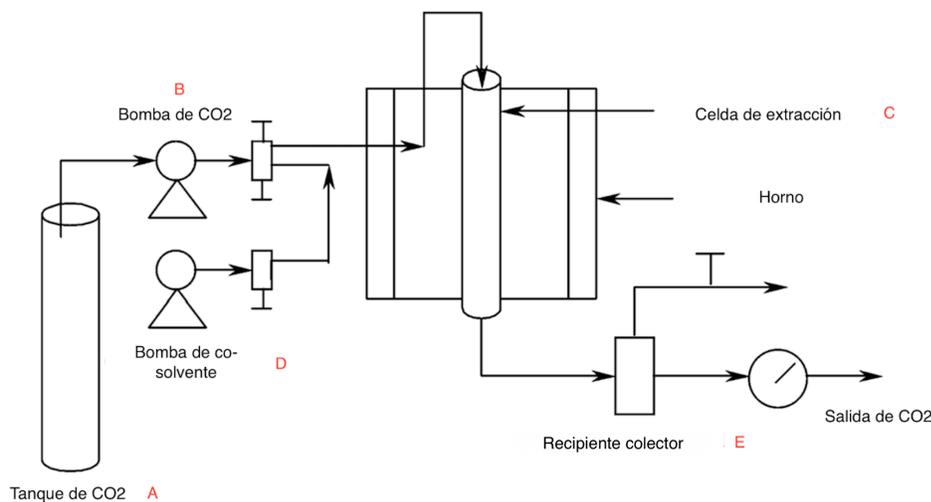
$$R (\%) = (\text{masa de extracto libre de solvente (g)} / \text{masa muestra inicial (g)}) * 100$$

### 3.4.2 Extracción con fluidos supercríticos (CO<sub>2</sub>)

Se llevó a cabo el ensayo de extracción supercrítica con dióxido de carbono empleando un equipo armado en la facultad de Química UdelaR. El equipo consiste en un reservorio de solvente (A), desde el cual se bombea el solvente a elevada presión mediante el uso de una bomba (B) hacia la celda de extracción de 25 mL (C), la cual está dentro de un horno de temperatura regulable. El extracto se despresuriza a través de una válvula de expansión y se junta en el recipiente colector (E). Es opcional el uso de un co-solvente que es bombeado a través de la matriz (D) (Figura 5).

**Figura 5**

*Representación esquemática del equipo de extracción supercrítica*



*Nota.* Adaptado de Yu et al. (2006).

El principio básico de esta técnica de extracción consiste en utilizar un solvente, en este caso el CO<sub>2</sub>, en estado supercrítico, es decir, a una temperatura y presión más elevadas que las de sus respectivos valores críticos (T<sub>c</sub> y P<sub>c</sub>).

Las condiciones de trabajo estudiadas se detallan en la Tabla 2. Las mismas fueron seleccionadas en base a la bibliografía disponible donde se aplicó la misma técnica: Mahadavi & Raofie (2016) y Rivas et al. (2021), y se fueron variando en base a los resultados obtenidos, buscando aumentar el rendimiento de extracción. La extracción se realizó sobre cáscara de granada seca (aproximadamente 6 g), variando el tamaño de molienda y el tamizado en función de sugerencias reportadas por los mismos autores (Mahadavi & Raofie, 2016 y Rivas et al., 2021). La extracción se llevó a cabo durante 120 minutos (30 minutos en estado estático y 90 minutos en dinámico) hasta alcanzar 100 L de CO<sub>2</sub> de acuerdo con lo reportado en Vieitez et al. (2018). En la fase inicial estática, la salida de extracto se encuentra cerrada y el solvente se encuentra en contacto con la muestra a una temperatura y presión constantes (según la corrida, Tabla 2). Una vez alcanzados los 30 minutos se procede con la fase dinámica, donde se mantiene un flujo de solvente de 0,5 L/min CO<sub>2</sub> promedio a través de la muestra, se abre la salida y la temperatura y presión del sistema se mantienen constantes.

**Tabla 2**

*Condiciones de extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>*

Corrida	Presión	Temperatura	Co-solvente	Condiciones de la muestra (cáscara de granada)
1	300 bar	55°C	10% etanol	Harina, sin tamizar
2	300 bar	55°C	10% etanol	Molida a trozos pequeños irregulares, sin tamizar

3	350 bar	55°C	10% etanol	Molida a trozos pequeños irregulares, sin tamizar
4	400 bar	55°C	20% metanol	Harina tamizada entre 500-1000 micrómetros

Se calculó el rendimiento másico de extracción a partir de la siguiente ecuación:

$$R \% = (masa\ de\ extracto\ libre\ de\ solvente\ (g) / masa\ muestra\ inicial\ (g)) * 100$$

### 3.4.3 Extracción con líquidos presurizados (PLE)

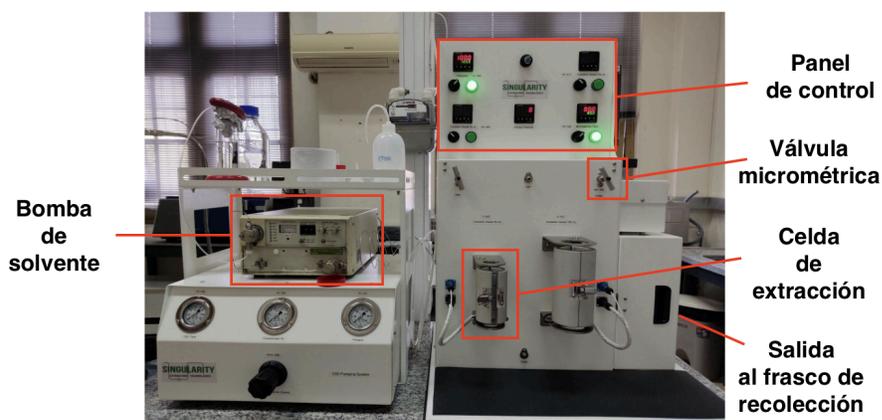
Se utilizó un equipo a escala laboratorio (Singularity Extraction Technologies, Brasil), (Figura 6), que consta de una bomba de alta presión para transportar el solvente al extractor, un sistema de calentamiento y una válvula micrométrica que permite regular la presión del sistema. La muestra (harina de cáscara de granada) se colocó en la celda de extracción de 25 mL; se pesaron aproximadamente 16 g y se agregaron perlas de vidrio para favorecer la distribución uniforme de la muestra y el extractante. El equipo se operó 10 minutos en modo estático y otros 30 minutos en modo dinámico. En el estado estático la salida de extracto se encuentra cerrada y el solvente se mantiene en contacto con la muestra, a una temperatura y presión constantes (según la corrida). En el estado dinámico, la salida del extracto se abre y se mantiene un flujo constante de solvente entre 1 y 2 mL/min, manteniendo también la temperatura y presión constantes. Se trabajó en todas las experiencias a 100 bar de presión. Se realizaron 4 corridas, variando la temperatura entre 100°C y 120°C, y el solvente entre 75% etanol/agua v/v y 100% etanol (Borrás, 2013; Cam & Hisil, 2010; Toledo, 2020), como se detalla:

- Corrida 1: 100 bar, 100 % etanol , 100°C
- Corrida 2: 100 bar, 100 % etanol, 120°C
- Corrida 3: 100 bar, 75 % etanol/ agua v/v, 100°C
- Corrida 4: 100 bar, 75 % etanol/ agua v/v, 120°C

El extracto obtenido en cada corrida se recogió en un frasco de vidrio, que posteriormente se rotaevaporó para eliminar el solvente y se llevó a peso constante. Tanto los extractos obtenidos como los residuos remanentes correspondientes se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

## Figura 6

*Equipo utilizado para las extracciones con líquidos presurizados*



El rendimiento másico de extracción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$R \% = (masa\ de\ extracto\ libre\ de\ solvente(g) / masa\ muestra\ inicial\ (g)) * 100$$

## 3.5 Estudio del potencial funcional de la cáscara de granada, extractos y mermeladas

### 3.5.1 Bioaccesibilidad

Se evaluó la bioaccesibilidad mediante simulación digestiva *in vitro*. La simulación se llevó a cabo mediante el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), el cual implica tres fases de la digestión: fase oral, gástrica e intestinal. En la digestión *in vitro* se utilizó  $\alpha$ -amilasa (Sigma Aldrich), pepsina (Sigma Aldrich), pancreatina (Sigma Aldrich), bilis (Sigma Aldrich),  $Na_2HPO_4$  (Mallinckrodt),  $NaH_2PO_4$  (J. T. Baker) para el buffer fosfato, HCl 1 M y  $NaHCO_3$  0,1 M para ajustar el pH.

La fase oral consiste en la dilución del producto 1:1 (m/m) en una mezcla que simula el fluido salival (SSF, pH 7.0) y la enzima presente en la saliva,  $\alpha$ -amilasa humana tipo IX. La mezcla se incubó durante 2 minutos a 37°C con agitación. En la fase gástrica se agregó a la mezcla de la fase oral fluido gástrico simulado (SGF, pH 3), pepsina porcina y HCl 1M hasta llegar a pH 3. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación. Luego, la fase del intestino comenzó con el agregado a la mezcla gástrica del fluido intestinal simulado (SIF, pH 7), pancreatina y bilis 160 mM, y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1M. Las muestras se incubaron por 2 horas a 37°C con agitación. Finalizada la simulación digestiva *in vitro*, se inactivaron las enzimas a 90°C, se centrifugó a 9.000 rpm por 10 minutos (4°C) y se separó el sobrenadante (fracción bioaccesible) del pellet (fracción colónica). La fracción colónica se liofilizó durante aproximadamente 4 días y ambas fracciones se almacenaron a -20 °C.

### **3.5.2 Determinación de las propiedades bioactivas de la cáscara de granada, sus extractos, fracciones bioaccesibles y mermeladas**

Previo a los análisis de propiedades bioactivas, fue necesario realizar extracciones de las diferentes muestras ensayadas, con el fin de poder extraer y medir los compuestos de interés. Se realizaron las extracciones sobre las siguientes muestras (todas ellas son muestras en estado sólido a excepción de las fracciones bioaccesibles): harina de cáscara de granada, extracto y residuo de macerado, extracto y residuo de extracciones supercríticas y PLE, mermeladas, y fracción bioaccesible de las digestiones. Éstas extracciones se realizaron con dimetil sulfóxido (DMSO), seleccionado por ser un solvente ampliamente utilizado y adecuado para extraer de la matriz un amplio rango de compuestos bioactivos (Fernández-Fernández et al., 2019). Para ello se prepararon, en todos los casos por duplicado, soluciones madre de 50 mg/mL, a partir de 50 mg de muestra libre de solvente, 940  $\mu$ L de agua destilada y 60  $\mu$ L de DMSO. Estas soluciones se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y se realizaron las diluciones requeridas para cada ensayo según la muestra a analizar.

### **3.5.2.1 Contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, a partir de la técnica propuesta por Fernández-Fernández et al. (2019), la cual consiste en una reacción de reducción/oxidación entre los polifenoles (ácido gálico, patrón) presentes en una muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Es una técnica que involucra reacciones de transferencia de electrones (ET). Se prepararon diluciones de las muestras en agua destilada y se utilizó ácido gálico (GAE) como estándar para la curva de calibración (0,05 – 1,0 mg/mL). La reacción de reducción-oxidación se siguió por espectrofotometría UV-Vis a 750 nm. Los resultados se expresaron como mg GAE/g muestra libre de solvente.

A la placa de 96 pocillos se agregaron 10  $\mu$ L de patrón o muestra en cada pocillo (cuadruplicado), 200  $\mu$ L de solución 20 % de carbonato de sodio, se esperaon 2 minutos y se le agregaron 50  $\mu$ L de solución de Folin (1/5), esperando 30 minutos en la oscuridad para medir posteriormente en un espectrofotómetro de microplacas MultiskanTM Go (Waltham, Massachusetts, USA).

### **3.5.2.2 Capacidad antioxidante**

#### **3.5.2.2.1 ABTS**

La técnica utilizada se basa en el método propuesto por Re et al. (1999), modificado por Fernández-Fernández et al. (2019), la cual consiste en la medida de la capacidad de los antioxidantes de atrapar los radicales catiónicos  $ABTS^{\cdot+}$ , formando el complejo reducido  $ABTS_2^-$  (inoloro), reacción de reducción/oxidación entre los antioxidantes (Trolox como patrón, ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) presentes en una muestra y el reactivo de ABTS. Es una técnica de ensayo que involucra reacciones de transferencia de electrones (ET).

Las muestras se prepararon en buffer fosfato (pH 7.4) y se realizó una curva de calibración con Trolox (TE) (0.25 – 1.5 mM). La reacción de reducción-oxidación se siguió por espectrofotometría UV-Vis a 750 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol TE/ g muestra libre de solvente.

En la placa de 96 pocillos se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de patrón (concentraciones de la curva de calibración y concentración 0 mM poniendo 10  $\mu\text{L}$  de PBS) o muestra en cada pocillo (cuadruplicado), se le agregaron 190  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de ABTS y se esperaron 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para medir en el lector de placas a 750 nm.

#### 3.5.2.2.2 ORAC-FL

Se utilizó la técnica basada en el método propuesto por Ou, Hampsch-Woodill y Prior, modificada por Dávalos, Bartolomé y Gómez-Cordovés, como se describe en Fernández-Fernández et al. (2019). La misma consiste en evaluar la habilidad de los antioxidantes presentes en la muestra para neutralizar radicales libres en un ambiente específico, utilizando fluorescencia para cuantificar la reducción de luz emitida por un marcador fluorescente, la fluoresceína (FL). Los radicales peroxilo son generados en la muestra por el agregado de AAPH, y oxidan a la fluoresceína provocando que ésta pierda fluorescencia. Frente a los radicales, los antioxidantes de la muestra ceden átomos de hidrógeno, por lo tanto es una técnica HAT. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en longitudes de onda de excitación de 485 nm y emisión de 520 nm, en una placa multimodal Varioskan<sup>TM</sup> Lux (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU.). El área bajo la curva (AUC) de fluorescencia vs. tiempo se calculó y normalizó a la AUC del blanco de la siguiente manera: AUC antioxidante (Trolox o muestra) – AUC blanco. Se construyó una curva de calibración (AUC vs. [Trolox]) y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol TE/ g}$  muestra libre de solvente.

#### 3.5.2.3 Capacidad antidiabética: Inhibición de $\alpha$ -Glucosidasa

Se siguió el método descrito por Fernández-Fernández et al. (2019), el cual se basa en determinar la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa a través de la medida de la fluorescencia, a  $\lambda_{\text{ex}}=360$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm, cuando la enzima está en presencia de un sustrato fluorescente (4-MUG) y la muestra, utilizando acarbosa como estándar con capacidad inhibitoria comprobada. Las mediciones se realizaron cada 1 minuto durante 30 minutos, a 37°C. Posteriormente se construyó la curva % Inhibición vs.

[Estándar/Muestra] (mg/mL) ajustando a una función logarítmica, expresando los resultados como IC50 (mg/mL).

### **3.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Se siguió el método descrito por Cam & Hisil (2010). Se utilizó un equipo HPLC Shimadzu 20A acoplado con una columna Macherey-Nagel, C18 (250 mm x 4,6 mm, 100 µm) y un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD M20 A. El software utilizado fue un LC Solution versión 1.25. Las separaciones cromatográficas de los extractos se llevaron a cabo usando como solvente: agua/ácido acético (98:2, v/v) (solvente A) y metanol (solvente B) como fases móviles con un flujo de velocidad de 1 mL/min. El programa de elución utilizado fue el siguiente: 5% B durante 5 min, 5–70% B durante 25 min y 70–5% B durante 10 min. La detección se realizó monitoreando a 260, 280, 320, 360 y 378 nm, ya que por datos bibliográficos se conoce que los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en la cáscara de granada se detectan a esas longitudes de onda, (Cam & Hisil, 2010; Kumar et al., 2022). Se pesaron 10 mg de extracto libre de solvente, se disolvieron en 1,5 mL de una mezcla de metanol/agua (1:1, v/v), y se filtraron por filtro de 0,45 µm. El volumen de inyección para estándares y muestras fue de 10 µL.

Los compuestos fenólicos presentes en las muestras se identificaron comparando los tiempos de retención de acuerdo con lo reportado en Cam & Hisil (2010). Luego se cuantificaron a partir de una curva de calibración realizada para quercetina a 378 nm. Los resultados se expresaron en mg de quercetina/100 g extracto libre de solvente.

### **3.7 Elaboración de mermelada**

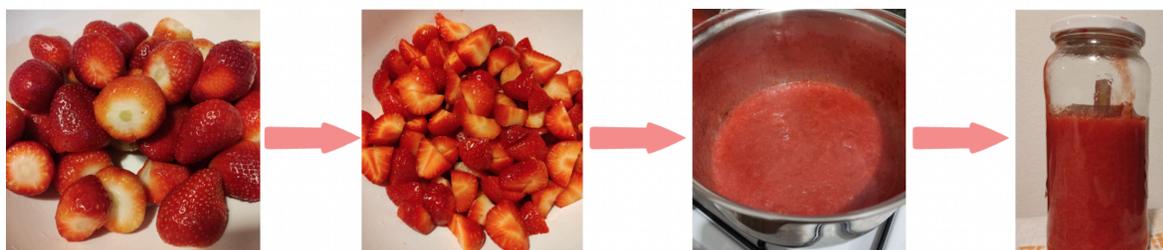
Se seleccionó como producto base para la incorporación del extracto de cáscara de granada una mermelada casera de frutilla, apta para diabéticos. Los ingredientes de la misma fueron: frutillas frescas obtenidas en el mercado local, gelatina sin sabor, jugo de limón natural, edulcorante sucralosa (Splenda®) y agua. La mermelada se elaboró de forma casera en una hornalla. Las cantidades de los ingredientes seleccionados, así

como también la fruta a utilizar y el gelificante y edulcorante a incorporar fueron determinados en pruebas previas.

Las frutillas se lavaron con detergente de cocina, se les extrajo el pedículo, se cortaron y se pusieron a hervir junto con el resto de los ingredientes, calentándolos hasta obtener la consistencia buscada (Figura 7).

## Figura 7

### *Proceso de elaboración de mermelada de frutilla*



Posteriormente, se procedió a incorporar a la mermelada los extractos obtenidos en la maceración y en la extracción PLE seleccionada como la óptima (ver Punto 4.2.3). Se decidió incorporar los extractos en un 5%, a partir de datos bibliográficos (Ismail, et al., 2014; Lotfy & Baraka, 2018; El-Beltagi et al., 2022). Se obtuvieron las siguientes mermeladas:

- 1- Mermelada control: sin ningún agregado
- 2- Mermelada + 5% extracto PLE 1
- 3- Mermelada + 5% extracto macerado

Para la incorporación de los extractos, los mismos se diluyeron en etanol y se ultrasonificaron durante 15 minutos. Luego se agregaron a la mermelada y la misma se calentó hasta evaporar todo el etanol. Las mermeladas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Las extracciones de las mermeladas elaboradas para la determinación de sus propiedades bioactivas se realizaron con DMSO, como se describe en el punto 3.5.2.

### **3.8 Análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado. El análisis estadístico se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA). Los resultados fueron expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  desviación estándar (SD). El test de Tukey se utilizó para determinar las diferencias significativas entre los valores obtenidos ( $p < 0,05$ ) usando el programa Infostat v. 2015. Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Ensayos preliminares**

#### **4.1.1 Determinación de las condiciones de secado**

Como primer paso para realizar la caracterización de la cáscara de granada, fue necesario establecer las condiciones de secado de la misma para almacenar de manera óptima la muestra durante el tiempo de duración del presente estudio y realizar las extracciones planteadas. Para ello se tuvieron en cuenta dos aspectos principales: la inhibición del crecimiento microbiológico, y evitar la pérdida de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales por exposición de la muestra a alta temperatura.

Se estudiaron tres temperaturas de secado (40°C, 60°C y 105°C) seleccionadas a partir de lo reportado por otros autores (Torres et al., 2020; Fernandez & Romero, 2021; Rivas et al., 2021). El secado se realizó hasta obtener una humedad de muestra menor al 1%. Se optó por secar la muestra hasta este valor para asegurar su estabilidad microbiológica durante el estudio, ya que la misma sería almacenada por un tiempo indefinido. La muestra secada se molió en un molinillo de laboratorio hasta obtener una harina y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

En la Tabla 3 se detallan las condiciones de secado y el resultado del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medida por ABTS de las harinas. En todos los casos, la harina de cáscara de granada presenta una humedad final menor al 1%. Por tratarse de pruebas preliminares se decidió analizar la capacidad antioxidante únicamente por un método ET. Los resultados obtenidos en esta instancia no constituyen los resultados finales, siendo utilizados como indicadores únicamente en esta primera etapa.

**Tabla 3**

*Tiempo de secado, contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de cáscara de granada secada a diferentes temperaturas*

Temperatura de secado de la cáscara (°C)	Tiempo de secado (h)	Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/g muestra)	Capacidad Antioxidante: ABTS (μmol TE/g muestra)
40	7,0	137,31 ± 11,66 <sup>a</sup>	2037,68 ± 99,56 <sup>b</sup>
60	6,5	131,02 ± 11,26 <sup>a</sup>	1908,56 ± 148,40 <sup>a</sup>
105	5,0	131,57 ± 11,82 <sup>a</sup>	2156,45 ± 86,91 <sup>c</sup>

*Nota.* El resultado se expresa como el promedio de las repeticiones ± SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con (p<0,05).

Dado que los resultados no presentaron diferencias significativas entre sí para el contenido de polifenoles totales variando la temperatura de secado de la cáscara, y que el mayor valor de capacidad antioxidante se obtuvo con la cáscara secada a 105 °C, se define ésta como la temperatura de secado. A su vez, desde el punto de vista microbiológico es la temperatura que lograría la mayor eliminación de microorganismos en la muestra (Hawaree et al., 2009), y el secado se realiza en un tiempo menor. Como desventaja se destaca el hecho del mayor consumo energético. Por lo anterior, las

condiciones seleccionadas para los ensayos finales fueron: secado en estufa a 105°C durante 5 horas, obteniendo así una humedad inferior al 1%.

Este resultado difiere con lo publicado por Fernández & Romero (2021), quienes evaluaron tres temperaturas de secado de cáscara de granada (40°C, 60°C y 80°C) y observaron que a menor temperatura, el contenido de polifenoles y actividad antioxidante fue mayor, demostrando una relación directa entre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, y una relación indirecta con la temperatura. En este estudio el contenido de polifenoles totales fue determinado por Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por el método de DPPH. La misma relación indirecta entre capacidad antioxidante y temperatura fue observada por Díaz (2018) quien evaluó tres temperaturas de secado (45°C, 50°C y 55°C) sobre hojas de guanábana, midiendo la capacidad antioxidante por el método de DPPH. Sin embargo, en otras investigaciones la relación entre capacidad antioxidante y temperatura de secado no fue lineal, como se verificó en el estudio de Garay & Villafuerte (2015), quienes evaluaron la capacidad antioxidante de harina de cáscara de camu camu secada a 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C, analizando la capacidad antioxidante por el método de DPPH, expresada como el IC50 (mg/mL). El resultado obtenido fue una capacidad antioxidante máxima a la temperatura de secado de 50°C, seguida de las temperaturas de secado de 40°C, 30°C, 60°C y 70°C. La diferencia encontrada entre el presente estudio con los reportados en bibliografía puede deberse a varios factores; por un lado, ninguno de los trabajos reportados evaluaron temperaturas mayores a 70°C, y podría ocurrir que debido a las altas temperaturas se rompan ciertas estructuras de la matriz, por ejemplo interacciones proteicas o con la fibra, liberando así compuestos antioxidantes que no estaban expuestos a temperaturas de secado menores. Esto explicaría por qué se obtuvo una mayor actividad antioxidante a 105°C en el presente trabajo. Por otro lado, si bien se están comparando dos metodologías de transferencia de electrones (ET), ABTS y DPPH constituyen métodos diferentes entre sí, por lo que los resultados entre ambas pueden diferir.

#### **4.1.2 Determinación de las condiciones de extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>**

Inicialmente, se analizó como técnica de extracción innovadora la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Sin embargo, mediante esta técnica no se logró extraer de la cáscara de granada los compuestos de interés, como se detalla a continuación, por lo tanto, los resultados obtenidos en esta etapa del estudio se incluyen en la sección de resultados preliminares.

Se realizaron extracciones supercríticas con CO<sub>2</sub> con la cáscara secada a 105°C y a 60°C. Si bien el secado a 60°C había sido descartado según se detalló en el punto 4.1.1, como el rendimiento de la extracción supercrítica con la cáscara secada a 105°C dio resultados preliminares bajos (Tabla 4), se decidió probar también con la cáscara secada a esta temperatura, para determinar si influye en el rendimiento obtenido. Los parámetros seleccionados para las extracciones y los rendimientos másicos obtenidos se detallan en la Tabla 4. En todos los casos las extracciones se llevaron a cabo durante 120 minutos; 30 minutos en estado estático y 90 minutos en estado dinámico, como se detallo en la sección 3.4.2. No se realizaron duplicados.

**Tabla 4**

*Condiciones de extracción supercrítica y rendimiento másico de extracción obtenido*

<b>Muestra</b>	<b>Condiciones de extracción</b>	<b>Rendimiento másico de extracción (%)</b>
Cáscara secada a 105°C	P: 300 bar T: 55°C Co-solvente: etanol 10% Muestra: Cáscara molida en pequeños trozos irregulares	0,059

	P: 400 bar	
	T: 55°C	
	Co-solvente: metanol 20%	0,034
	Muestra: Cáscara tamizada entre 500 y 1000 micrómetros.	
	P: 300 bar	
	T: 55°C	0,064
	Co-solvente: etanol 10%	
Cáscara secada a 60°C	Muestra: Cáscara molida a polvo	
	P: 350 bar	
	T: 55°C	
	Co-solvente: etanol 10%	0,058
	Muestra: Cáscara molida en pequeños trozos irregulares	

Se observa que los rendimientos máxicos obtenidos en las cuatro extracciones fueron bajos: 0,059%, 0,034%, 0,064% y 0,058%. Resultados similares, aunque superiores, fueron reportados por Mahdavi & Raofie (2016) y Rivas et al. (2021). Los primeros autores reportaron un rendimiento máximo de 1,18% bajo la condición de 355 bar, 55°C, tiempo de extracción de 30 minutos y metanol como co-solvente. Rivas et al. (2021) optimizaron las condiciones de extracción supercrítica en 291 bar, 46,5°C y tiempo de extracción de 2,5 h, obteniendo un rendimiento entre 1 y 1,5%.

Posteriormente, se analizó el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medida por ABTS de los extractos y residuos obtenidos en las extracciones supercríticas antes mencionadas. Dado que los rendimientos de extracción presentaron valores bajos y similares entre sí, se optó por juntar los extractos supercríticos obtenidos a partir de cáscaras secadas a la misma temperatura. De la misma forma se realizó para los residuos de extracción. Los resultados se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de extractos y residuos obtenidos por extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>*

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/ g muestra)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ABTS (μmol TE/g muestra)</b>
Extracto de cáscara secada a 105°C	16,45 ± 0,56 <sup>a</sup>	84,26 ± 3,97 <sup>b</sup>
Residuo de cáscara secada a 105°C	120,32 ± 9,53 <sup>d</sup>	2141,41 ± 62,84 <sup>c</sup>
Extracto de cáscara secada a 60°C	8,37 ± 0,43 <sup>b</sup>	24,44 ± 1,35 <sup>a</sup>
Residuo de cáscara secada a 60°C	112,91 ± 5,60 <sup>c</sup>	2548,46 ± 10,64 <sup>d</sup>

*Nota: El resultado se expresa como el promedio de las repeticiones ± SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con (p<0,05). Los resultados se expresan por g de muestra libre de solvente.*

Se obtuvo un resultado de 16,45 ± 0,56 mg GAE/g muestra y 84,26 ± 3,97 μmol TE/g muestra para el extracto obtenido a partir de cáscara secada a 105°C, y de 8,37 ± 0,43 mg GAE/g muestra y 24,44 ± 1,35 μmol TE/g muestra para el extracto obtenido a partir de cáscara secada a 60°C. Estos resultados muestran un bajo contenido de polifenoles totales y una baja capacidad antioxidante de los extractos al ser comparados con los

resultados obtenidos para la cáscara (Tabla 3). Estos resultados son contrarios a los esperados ya que en la extracción se busca concentrar estos compuestos. Sin embargo, es similar a lo reportado por Bustamante et al. (2017), quienes optimizaron la extracción supercrítica de cáscara de granada bajo las condiciones de 399 bar, 48°C y 19,9% de etanol como co-solvente, obteniendo un resultado de polifenoles totales para el extracto de 10,01 mg GAE/g muestra, y una capacidad antioxidante de 99,4  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra (por el método de DPPH).

Con el fin de descartar la posibilidad de que, pese al bajo rendimiento másico obtenido la técnica sea efectiva en la extracción de los compuestos antioxidantes, pero el tratamiento aplicado al extracto previo al análisis de su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante por ABTS no sea el adecuado (ver punto 3.6, extracción con DMSO), fue que también se analizó el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante del residuo de las extracciones (Tabla 5). Los resultados obtenidos de polifenoles totales y capacidad antioxidante, respectivamente, fueron:  $120,32 \pm 9,53$  mg GAE/g muestra y  $2141,41 \pm 62,84$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra para el residuo obtenido a partir de la extracción supercrítica de la cáscara secada a 105°C, y de  $112,91 \pm 5,60$  mg GAE/g muestra y  $2548,46 \pm 10,64$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra para el residuo obtenido a partir de la extracción supercrítica de la cáscara secada a 60°C. A partir de estos valores, comparándolos con los obtenidos para la cáscara (Tabla 3) y para los extractos (Tabla 5), se comprueba que los compuestos con actividad antioxidante no fueron extraídos con la técnica aplicada, sino que se mantuvieron en el residuo de extracción. Por lo anterior se concluye que la técnica de extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico, bajo las condiciones estudiadas, no fue adecuada para extraer los compuestos antioxidantes de la cáscara de granada.

Mushtaq et al. (2015), destaca que, en la extracción de compuestos fenólicos vegetales, al ser de naturaleza polar, no son completamente solubles en  $\text{SC-CO}_2$ . Por lo anterior, aunque la adición de un co-solvente como el etanol o el metanol puede mejorar la polaridad y extractabilidad del  $\text{SC-CO}_2$ , la recuperación de compuestos fenólicos enlazados covalentemente o ligados hidrofobicamente es difícilmente

alcanzable. Esto puede explicar el hecho de que no se hayan podido extraer compuestos antioxidantes de la cáscara de granada con la técnica aplicada, por su carácter polar. Para lograr extraerlos a partir de esta técnica es posiblemente necesario utilizar un proceso de pretratamiento antes de la extracción para aumentar la liberación de los compuestos fenólicos unidos, rompiendo la estructura celulósica de la pared celular (Magangana et al., 2020).

En concordancia con lo anterior, numerosos estudios han demostrado que la cáscara de granada contiene muchos componentes biológicamente activos, incluyendo antioxidantes naturales (Mahdavi & Raofie, 2016), dentro de los cuales se destacan taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido gálico y elágico) y flavonoides (antocianinas, catequinas y otras sustancias complejas) (Mahdavi & Raofie, 2016; Torres et al., 2020). La mayor parte de los compuestos nombrados anteriormente son solubles en agua y, consecuentemente, es muy probable que sean extraídos en gran medida por ella y en poca proporción por CO<sub>2</sub>, por su carácter apolar. Sumado a lo anterior, según Saura-Calixto et al. (2010), los compuestos fenólicos se encuentran unidos a polisacáridos por interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes, haciendo necesaria la hidrólisis para su extracción. Se ha reportado que los compuestos que permanecen unidos a la fibra de cáscara de granada corresponden a taninos hidrolizables, como punicalagina, punicalina, pedunculagina, entre otros compuestos fenólicos, como ácido elágico, ácido gálico, rutina y quercetina (Middha et al., 2013). Esto permite suponer que determinados polifenoles, a pesar de ser solubles, permanezcan en la fracción insoluble incluso luego de la extracción (Torres et al., 2020), por lo cual la técnica aplicada debe ser capaz de vencer estas interacciones para lograr la extracción y separación de los compuestos de interés. Al consultar otros trabajos reportados en bibliografía (Mahdavi & Raofie, 2016 y Rivas et al., 2021) se esperaba que al agregar un co-solvente polar en la extracción se lograría obtener los compuestos de interés de la cáscara de granada. Sin embargo, como se detalló anteriormente, ésto no fue suficiente.

En este punto del trabajo se decide no avanzar con el estudio de la técnica de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, y continuar con el análisis de extracción con líquidos presurizados (resultados detallados en el punto 4.2 - Ensayos finales). Ambas metodologías son las más empleadas basadas en el uso de fluidos comprimidos para obtener compuestos bioactivos, y ambas tecnologías están ampliamente reconocidas como procesos de extracción limpias debido a su bajo (o nulo) consumo de solventes orgánicos.

#### 4.1.3 Determinación de las condiciones de maceración

Se llevaron a cabo maceraciones utilizando etanol 75% (etanol/agua v/v) como solvente y otras utilizando metanol 75% (metanol/agua v/v), con el fin de determinar cuál de los dos solventes lograba una mayor extracción de los compuestos de interés. Estos dos solventes se seleccionaron a partir de maceraciones de cáscara de granada estudiadas por otros autores (Li et al., 2006; El-Said et al., 2014; Šavikin et al., 2018; Rivas et al., 2021). Para ello se analizó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante por el método de ABTS del macerado obtenido en cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Rendimientos máxicos de extracción, contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los macerados*

<b>Solvente</b>	<b>Rendimiento máxico (%)</b>	<b>Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/ g muestra)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ABTS (μmol TE/g muestra)</b>
Etanol 75% (etanol/ agua v/v)	54,22 <sup>a</sup>	231,84 ± 15,92 <sup>a</sup>	5774,50 ± 227,80 <sup>a</sup>
Metanol 75%	50,37 <sup>a</sup>	226,81 ± 11,55 <sup>a</sup>	6232,95 ± 72,95 <sup>b</sup>

(metanol/ agua v/v)

*Nota: El resultado se expresa como el promedio de las repeticiones  $\pm$  SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan por g de muestra libre de solvente.*

Los resultados obtenidos con ambos solventes no presentaron diferencias significativas entre sí, a excepción de la capacidad antioxidante, un poco superior para el caso de la maceración con metanol. Este resultado difiere de lo reportado por El-Beltagi et al. (2022), quienes obtuvieron un valor superior de polifenoles totales para el extracto de macerado con metanol (4,9 mg GAE/g) comparado con el extracto etanólico (3,5 mg GAE/g).

Debido a los resultados anteriores, y dado que el etanol es un solvente considerado de grado alimenticio asociado a la química verde (Šavikin et al., 2018), menos nocivo y tóxico que el metanol (Pohanka, 2016) se decide utilizarlo en adelante como solvente de extracción en las maceraciones y también para las extracciones PLE.

En esta etapa del estudio quedaron definidas las condiciones de secado de la muestra, las condiciones de la extracción tradicional (maceración), y se descartó la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. A partir de este punto se detallan los resultados finales del trabajo, avanzando con la extracción con líquidos presurizados como técnica de extracción innovadora.

## **4.2 Ensayos finales**

### **4.2.1 Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada**

En la Tabla 7 se muestra la caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada de variedad Wonderful utilizada para todos los estudios detallados en el punto 4.2.

**Tabla 7***Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada*

<b>Componente</b>	<b>Contenido</b>
Proteína (%)	2,72 ± 0,06
Grasa (%)	0,14 ± 0,10
Fibra (%)	22,98 ± 1,57
Humedad (%)	73,78 ± 1,00
Cenizas (%)	3,60 ± 0,12
Carbohidratos (%)	70,56
	L= 49,59 ± 1,68
Color	a= 10,29 ± 0,43 b= 25,35 ± 1,80
Aw	0,23 ± 0,01

*Nota: El resultado se expresa como el promedio de las repeticiones ± SD. Todos los resultados se expresan en base seca, a excepción de la humedad.*

Los resultados obtenidos se compararon con lo reportado por otros autores. El porcentaje de proteína de la cáscara en estudio fue de 2,72 ± 0,06 %, mientras que Ismail et al. (2014), reportaron un valor de 0,70 ± 0,03% y Buenrostro et al. (2017), un valor superior de 8,66 ± 0,01 %. Kalantari et al. (2020), reportaron un valor de 3,86%, y El-Beltagi et al. (2022), un valor de 4,98 ± 0,50%. El contenido de grasa obtenido fue del 0,14 ± 0,10 %, similar al reportado por Ismail et al. (2014), de 0,40 ± 0,03%, Kalantari et al. (2020), del 0,52%, y El-Beltagi et al. (2022), del 0,68 ± 0,10%. Buenrostro et al. (2017), reportaron un valor superior del 2,64 ± 0,08 %.

El valor de fibra determinado para la granada en estudio fue de  $22,98 \pm 1,57$  %, cercano al doble de lo reportado por Kalantari et al. (2020) y El-Beltagi et al. (2022), del 11,2% y  $13,9 \pm 0,2$ %, respectivamente, mientras que Ismail et al. (2014), reportaron un valor de  $17,53 \pm 0,74$  %, y Buenrostro et al. (2017), del  $8,81 \pm 0,07$  %. El valor obtenido para cenizas ( $3,60 \pm 0,12$  %) se asemeja al reportado por estos tres autores (Buenrostro et al., 2017; Kalantari et al., 2020; El-Beltagi et al., 2022), de  $4,0 \pm 0,2$ %, 3,88% y  $4,51 \pm 0,01$ %, respectivamente. Un valor inferior de  $2,70 \pm 0,23$ % fue reportado por Ismail et al. (2014). Los carbohidratos fueron determinados por diferencia, obteniendo un valor del 70,56 %. Ismail et al. (2014), reportaron un valor superior del  $78,67 \pm 0,32$  %, Kalantari et al. (2020), del 85,54%, y El-Beltagi et al. (2022), un valor inferior del  $33,97 \pm 1,20$  %.

Sharayei et al. (2019) realizaron estudios de cáscara de granada de variedad SisheKape-Ferdos, publicando resultados de humedad del  $46,62 \pm 0,08$  %. Este resultado difiere de lo analizado en la granada en estudio ( $73,78 \pm 1,00$  %). En el mismo estudio, Sharayei, et al. (2019), reportaron valores de color de L ( $30,62 \pm 1,25$ ), a ( $9,56 \pm 0,58$ ) y b ( $7,51 \pm 1,01$ ), siendo el parámetro a muy similar al encontrado en el presente estudio ( $10,29 \pm 0,43$ ), defiriendo en mayor medida el parámetro L ( $49,59 \pm 1,68$ ) y b ( $25,35 \pm 1,80$ ). Cabe destacar que el color reportado por estos autores se midió sobre la muestra sin secar, y en el presente estudio sobre el polvo de cáscara seca. Por otra parte, Vicencio (2016), obtuvo los siguientes valores para la cáscara secada a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos en un tambor rotatorio: L: 39,25, a: 8,83 y b: 12,42, también diferentes a lo analizado en la granada en estudio. Se ha reportado que las antocianinas son los principales pigmentos a los que se les ha atribuido la causa del color del fruto de la granada, como por ejemplo los mono y diglucósidos de cianidina (rojo), pelargonidina (naranja) y delfinidina (púrpura) (Borochoy-Neori et al., 2011; Fischer, Carle y Kammerer, 2011, como se citó en Sharayei, et al., 2019).

La actividad de agua de la cáscara de granada seca fue de  $0,23 \pm 0,01$  %. Esta baja actividad de agua resulta microbiológicamente segura para la muestra, según lo

establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional, donde se establece un máximo de 0,65% para la categoría de condimentos deshidratados y/o en polvo (RBN, 1994).

Cabe destacar que la composición y características fisicoquímicas de cada granada varía según la variedad y la cosecha, siendo influenciada por el clima, el suelo, y las condiciones geográficas (Marra et al. 2022), por lo cual es esperable que los resultados obtenidos difieran con lo reportado por otros autores.

#### 4.2.2 Extracciones y rendimientos de extracción

El rendimiento másico de la maceración de harina de cáscara de granada utilizando como solvente etanol 75% (etanol/agua v/v) se muestra en la Tabla 8. Adicionalmente, se llevaron a cabo cuatro extracciones PLE, en las cuales se varió la temperatura de trabajo (100°C y 120°C) y el solvente utilizado (etanol 75% - etanol/agua v/v- y etanol 100%), con el fin de determinar las condiciones óptimas para este método de extracción, teniendo en cuenta los antecedentes que había disponible y las capacidades del equipo (que tiene una temperatura máxima de operación de 140°C). Los rendimientos másicos obtenidos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Rendimientos másicos de extracción por maceración y extracciones PLE*

<b>Técnica</b>	<b>Rendimiento másico (%)</b>
Maceración (75% etanol/ agua v/v)	66,9 ± 0,8 <sup>d</sup>
PLE 1: 100% etanol, 120°C	43,8 ± 0,8 <sup>b</sup>
PLE 2: 75% etanol/agua v/v, 120°C	51,4 ± 1,1 <sup>c</sup>
PLE 3: 100% etanol, 100°C	27,8 ± 1,2 <sup>a</sup>
PLE 4: 75% etanol/ agua v/v, 100°C	46,3 ± 0,9 <sup>b</sup>

*Nota.* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ).

El rendimiento másico obtenido para la maceración ( $66,9 \pm 0,8$  %) fue superior al reportado por Rivas et al. (2021), en cuyo estudio se llevó a cabo la maceración utilizando etanol/agua (80: 20, v/v), obteniendo un rendimiento de 26,9%. Yasoubi et al. (2007), obtuvo un rendimiento de 23% en la extracción por maceración utilizando etanol 75% (etanol/agua v/v) como solvente.

En las extracciones PLE se obtuvieron rendimientos menores que en la maceración y similares a lo reportado en bibliografía. En orden decreciente, se obtuvieron rendimientos del  $51,4 \pm 1,1$  %,  $46,3 \pm 0,9$  %,  $43,8 \pm 0,8$  %, y  $27,8 \pm 1,2$  %, para las extracciones PLE 2, 4, 1 y 3, respectivamente (Tabla 8). Toledo (2020), realizó diferentes extracciones PLE variando la temperatura (entre 40°C y 60°C) y la presión (entre 20 y 100 bar), utilizando en todos los casos etanol como solvente, y obtuvo rendimientos de extracción entre 27% y 44%, muy similar al rango obtenido en el presente estudio. Asimismo, Toledo-Merma et al. (2022), reportaron rendimientos de extracciones PLE entre 27,4% y 45,0%.

Al comparar las cuatro extracciones PLE entre sí, se observa que al utilizar etanol 75% (etanol/agua v/v) como solvente (extracciones PLE 2 y 4) el rendimiento aumentó para ambas temperaturas en relación a cuando se utilizó 100% etanol como solvente. Esto se puede deber a que la diferencia en las polaridades del solvente utilizado amplió el rango de compuestos extraídos y por ende aumentó el rendimiento másico. Alexandre et al. (2017), realizaron extracciones a alta presión (HPE) de cáscara de granada, concluyendo que, de las variables medidas (porcentaje de etanol, presión y tiempo de extracción), la concentración de etanol tuvo el mayor impacto en el rendimiento de extracción. Li et al. (2006), consideraron en su estudio que una combinación de

diferentes solventes podría ser más eficiente para extraer compuestos antioxidantes, ya que la solubilidad de éstos difiere según el solvente utilizado. Como resultado obtuvieron que el extracto de cáscara obtenido mediante el uso de una mezcla de metanol, etanol, acetona y agua, presentó una capacidad antioxidante significativamente mayor que la de los extractos obtenidos utilizando los mismos solventes de forma individual, lo que refuerza la conclusión de que al aumentar el rango de polaridades del solvente utilizado, aumenta la extracción de compuestos bioactivos de interés.

También, se observa que a igual presión y solvente, al aumentar la temperatura aumenta el rendimiento de extracción. Esta misma influencia de la temperatura sobre el rendimiento fue reportada por Toledo-Merma et al. (2022).

Cabe destacar que al comparar la maceración con la metodología de PLE, como técnica de extracción, la maceración llevó en el presente estudio, un 80% más de solvente que las extracciones PLE y demoró 4,2 veces más, de allí la importancia en investigar nuevas técnicas de extracción que sustituyan a las tradicionales.

Con la maceración se obtuvo el rendimiento másico más alto, sin embargo, un mayor rendimiento de extracción no implica necesariamente una mayor extracción de compuestos antioxidantes y antidiabéticos de interés, por lo que este análisis se complementa con los estudios de actividad bioactiva de los extractos obtenidos.

#### **4.2.3 Análisis de extractos**

Se analizó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, por el método de ABTS y el de ORAC-FL de la harina de cáscara de granada, el extracto de macerado, los extractos de PLE y sus respectivos residuos de extracción. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

#### **Tabla 9**

*Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de harina de cáscara de granada, extracto de macerado, extractos de PLE y residuos de extracción*

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/g muestra)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ORAC-FL (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>
Harina de cáscara de granada	156,30 $\pm$ 15,32 <sup>d</sup>	2058,04 $\pm$ 170,68 <sup>d</sup>	744,59 $\pm$ 39,76 <sup>e</sup>
Extracto de macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)	164,40 $\pm$ 16,92 <sup>de</sup>	2531,15 $\pm$ 188,02 <sup>e</sup>	1014,53 $\pm$ 14,25 <sup>f</sup>
Extracto PLE 1: 100 % etanol, 120 °C	200,55 $\pm$ 15,32 <sup>f</sup>	2860,19 $\pm$ 41,00 <sup>f</sup>	806,85 $\pm$ 67,33 <sup>e</sup>
Extracto PLE 2: 75 % etanol (etanol/agua v/v), 120 °C	182,45 $\pm$ 17,99 <sup>ef</sup>	2503,65 $\pm$ 8,02 <sup>e</sup>	428,47 $\pm$ 33,00 <sup>c</sup>
Extracto PLE 3: 100 % etanol, 100 °C	162,22 $\pm$ 11,22 <sup>de</sup>	2408,26 $\pm$ 94,39 <sup>e</sup>	431,20 $\pm$ 40,85 <sup>c</sup>
Extracto PLE 4: 75 % etanol	168,87 $\pm$ 13,24 <sup>de</sup>	2832,55 $\pm$ 28,89 <sup>f</sup>	742,78 $\pm$ 21,59 <sup>e</sup>

(etanol/agua v/v),  
100 °C

Residuo de macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)	21,03 ± 1,97 <sup>a</sup>	391,22 ± 38,74 <sup>a</sup>	117,13 ± 9,90 <sup>a</sup>
--	---------------------------	-----------------------------	----------------------------

Residuo PLE 1: 100 % etanol, 120 °C	81,29 ± 7,36 <sup>c</sup>	1717,06 ± 45,38 <sup>c</sup>	566,25 ± 51,90 <sup>d</sup>
---	---------------------------	------------------------------	-----------------------------

Residuo PLE 2: 75 % etanol (etanol/agua v/v), 120 °C	18,71 ± 1,08 <sup>a</sup>	457,27 ± 3,04 <sup>a</sup>	144,10 ± 9,72 <sup>ab</sup>
---	---------------------------	----------------------------	-----------------------------

Residuo PLE 3: 100 % etanol, 100 °C	55,61 ± 2,61 <sup>b</sup>	1341,59 ± 57,29 <sup>b</sup>	227,24 ± 12,44 <sup>b</sup>
---	---------------------------	------------------------------	-----------------------------

Residuo PLE 4: 75 % etanol (etanol/agua v/v), 100 °C	16,07 ± 0,54 <sup>a</sup>	327,23 ± 7,49 <sup>a</sup>	221,99 ± 12,15 <sup>b</sup>
---	---------------------------	----------------------------	-----------------------------

---

*Nota:* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones ± SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre valores de la misma columna. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan por g de muestra libre de solvente.

Las curvas de calibración obtenidas y los cálculos realizados se detallan en el Anexo 1, 2 y 3.

En referencia al contenido de polifenoles de la cáscara de granada, Abid et al. (2017), reportaron valores entre  $109,21 \pm 0,34$  y  $304,60 \pm 14,20$  mg GAE/g muestra para las diferentes variedades analizadas en su estudio, realizando las extracciones con agua, acetona y etanol, rango que comprende el resultado encontrado en el presente trabajo realizando la extracción con DMSO ( $156,30 \pm 15,32$  mg GAE/g muestra). Kalantari et al. (2020), reportaron un valor de  $242,3$  mg GAE/g muestra para la cáscara analizada, de variedad Malas Fars, valor superior al encontrado en este trabajo.

Con respecto a la capacidad antioxidante de la cáscara, se obtuvo un valor de  $2058,04 \pm 160,68$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra aplicando la técnica de ABTS, y de  $744,59 \pm 39,76$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra por el método de ORAC-FL. Torres et al. (2020), reportó un valor de  $578,7 \pm 0,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra medida a partir de la técnica de ABTS, valor inferior al encontrado en este estudio.

Para el extracto de macerado de cáscara de granada, se obtuvo un resultado de contenido de polifenoles totales de  $164,40 \pm 16,92$  mg GAE/g muestra. El-Said et al. (2014), obtuvieron los siguientes resultados de contenido de polifenoles totales: extractos obtenidos con la cáscara secada en horno, entre  $16,00$  y  $17,78$  mg GAE/g muestra en el extracto metanólico y entre  $14,23$  y  $16,34$  mg GAE/g muestra en el extracto acuoso, mientras que para las muestras secadas al sol el resultado fue entre  $14,83$  y  $15,80$  mg de GAE/g muestra en el extracto metanólico y entre  $13,98$  y  $14,81$  mg GAE/g muestra en el extracto acuoso. Como se observa, todos los resultados son inferiores a lo encontrado en este estudio. Rivas et al. (2021), obtuvieron un valor de  $2554 \pm 63$  mg GAE/g para el extracto de cáscara de granada obtenido por maceración con etanol 80% (etanol/agua v/v), y El-Beltagi et al. (2022), reportaron un valor de  $3,5$  mg GAE/g para su extracto etanólico. Masci et al. (2016), reportaron un valor de  $255,7$  mg GAE/g para su extracto de macerado de cáscara de granada, utilizando etanol como solvente. Se aprecia que los resultados obtenidos en bibliografía difieren entre sí

y con lo obtenido en la presente investigación, y esto puede deberse a que son muchas las variables que influyen en este punto, desde la variedad de la granada analizada, el estado de maduración, la región en la cual se encuentra, hasta las condiciones de secado y extracción de la muestra, el solvente utilizado, la temperatura, entre otros.

En cuanto a la capacidad antioxidante del extracto de macerado, se determinó un valor de  $2531,15 \pm 188,02$   $\mu\text{mol TE/g}$  por el método de ABTS y de  $1014,53 \pm 14,25$   $\mu\text{mol TE/g}$  por el método de ORAC-FL. Masci et al. (2016), reportaron un valor de  $3145$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra medido por el método de ORAC. Fernández- Fernández et al. (2021), reportaron una capacidad antioxidante para un extracto etanólico de marcela de  $4190$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra y  $2300$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra, medida por las técnicas de ABTS y ORAC-FL, respectivamente, valores superiores a lo encontrado en el extracto macerado en estudio.

Asimismo, para las cuatro condiciones de extracción PLE detalladas en la Tabla 9, se obtuvieron resultados de contenido de polifenoles totales, ordenados de forma decreciente, de:  $200,55 \pm 15,32$ ;  $182,45 \pm 17,99$ ;  $168,87 \pm 13,24$  y  $162,22 \pm 11,22$  mg GAE/g muestra, para la condición 1, 2, 4 y 3, respectivamente. Los extractos 1 y 2 no presentaron diferencias significativas entre sí, y únicamente el extracto PLE 1 presenta diferencias significativas con el extracto macerado, mostrando un contenido de polifenoles totales superior a éste. Garcia et al. (2021), reportaron un valor máximo de  $149,0$  mg GAE/g para un extracto PLE en condiciones óptimas ( $198,6^{\circ}\text{C}$  y  $50\%$  etanol/agua v/v como co-solvente) que es menor que el encontrado en este trabajo.

En cuanto a su capacidad antioxidante, los resultados fueron los siguientes:  $2860,19 \pm 41,00$ ;  $2832,55 \pm 28,89$ ;  $2503,65 \pm 8,02$ ;  $2408,26 \pm 94,39$   $\mu\text{mol TE/g}$  por el método de ABTS para la condición PLE 1,4,2 y 3, respectivamente, y de  $806,85 \pm 67,33$ ;  $742,78 \pm 21,59$ ;  $431,20 \pm 40,85$ ;  $428,47 \pm 33,00$  para la condición PLE 1,4,3 y 2, respectivamente por el método de ORAC-FL. Los extractos PLE 1 y 4 no mostraron diferencias significativas entre sí en su valor de capacidad antioxidante medida por ambos métodos, pero sí con los otros dos extractos PLE. Garcia et al. (2021), reportaron

valores de capacidad antioxidante para su extracto PLE de  $2265,6 \pm 100,5$   $\mu\text{mol TE/g}$  por el método de FRAP y de  $916,4 \pm 102,0$   $\mu\text{mol TE/g}$  por ORAC.

Al analizar los resultados de polifenoles totales para la cáscara y sus extractos, se observa que la cáscara de granada presentó el menor valor, sin embargo sin presentar diferencias significativas con el extracto de macerado y extractos PLE 3 y 4. El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en el extracto PLE 1, obtenido bajo las condiciones de extracción de 100% etanol y  $120^{\circ}\text{C}$  ( $200,55 \pm 30,65$  mg GAE/g muestra), y no presentó diferencias significativas con el extracto PLE 2 obtenido bajo las condiciones de extracción de 75% etanol/agua v/v y  $120^{\circ}\text{C}$  ( $182,45 \pm 17,99$  mg GAE/g muestra).

Con respecto al contenido de polifenoles totales de los residuos de las extracciones, se obtuvieron resultados sin diferencias significativas para el residuo de macerado y residuos de las extracciones PLE bajo las condiciones 2 y 4, siendo un poco superior para las condiciones 1 y 3. El mayor contenido de polifenoles en los residuos se cuantificó en el residuo de la extracción PLE 1, con un valor de  $81,29 \pm 7,36$  mg GAE/g muestra. Se destaca que la extracción PLE 1 fue la que obtuvo el resultado más alto en contenido de polifenoles (junto con la extracción PLE 2) en el extracto, y también en el residuo, por lo que se puede concluir que es la condición más favorable para la extracción de estos compuestos de la matriz.

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS, los valores inferiores se encontraron en todos los residuos, resultado esperable, siendo superior para el caso del residuo PLE 1. A continuación se encuentra la cáscara de granada, con una capacidad antioxidante de  $2058,04 \pm 160,68$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra, seguida por los extractos PLE 2 y 3 y el extracto de macerado, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí. Finalmente, los extractos PLE 1 y 4 son los que presentaron los valores más altos de  $2860,19 \pm 41,00$  y  $2832,55 \pm 28,89$   $\mu\text{mol TE/g}$  muestra, respectivamente, no presentando diferencias significativas entre sí.

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL, el mayor valor medido en  $\mu\text{mol TE/g}$  muestra se obtuvo para el extracto de macerado ( $1014,53 \pm 14,25$ ), seguido por el extracto PLE 1 ( $806,85 \pm 67,33$ ), el extracto PLE 4 ( $742,78 \pm 21,59$ ), y la cáscara de granada ( $744,59 \pm 39,76$ ), sin diferencias significativas entre ellos. Valores inferiores se obtuvieron para los extractos generados bajo las otras condiciones, y para los residuos. Se observa que el residuo PLE 1 presenta una capacidad antioxidante ( $566,25 \pm 51,90$ ) superior a la de los extractos PLE 2 y 3 ( $428,47 \pm 33,00$  y  $431,20 \pm 40,85$ ). Este resultado no esperado podría deberse a que la técnica de extracción PLE bajo las condiciones ensayadas no es tan específica para extraer de la matriz compuestos antioxidantes con metodología HAT como la extracción por maceración, cuyo extracto obtuvo el mayor valor de capacidad antioxidante medida por ORAC-FL y su residuo el menor valor. Las diferencias en los resultados también se pueden explicar por los diferentes métodos de extracción utilizados, y diferentes concentraciones del solvente de extracción (Šavikin et al., 2018).

Los residuos de extracción tienen un alto contenido de fibra, y el resultado obtenido, tanto de polifenoles totales como de capacidad antioxidante, principalmente para el residuo de extracción PLE 1, indica que parte de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra quedaron retenidos en esta fibra, constituyendo lo que se denomina fibra antioxidante.

Resulta interesante señalar que, si bien la maceración como método de extracción fue la que obtuvo el mayor rendimiento (Tabla 8), su contenido de polifenoles y capacidad antioxidante medida a partir del método de ABTS fue inferior al de algunas de las condiciones de extracción obtenidas mediante las extracciones PLE, por lo que lleva a afirmar que la segunda es una técnica más eficiente para la extracción de los compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes con metodología ET (transferencia de electrones), y que adicionalmente insume menor cantidad de solvente y tiempo de extracción, como fue mencionado anteriormente. Lo contrario se observó para la

medida de capacidad antioxidante medida por un método HAT, donde el extracto de macerado fue el que obtuvo el mayor valor, como fue presentado anteriormente. Se evidencia que no necesariamente la técnica que obtiene el mayor rendimiento es la que logra extraer en mayor proporción los compuestos antioxidantes que se detectan con los métodos utilizados, o aquellos compuestos con una capacidad antioxidante mayor. Lo anterior fue reportado también por Toledo (2020). Se esperaba que la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales del extracto de macerado y de los extractos PLE fuera superior en todos los casos a los valores obtenidos para la cáscara, pero esto se cumplió únicamente para la técnica ABTS. Al analizar el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL, la cáscara de granada presentó resultados sin diferencias significativas con algunos de los extractos.

Estos resultados permiten observar que las metodologías de extracción realizadas bajo diferentes condiciones, ya sea por la técnica utilizada (maceración o PLE) o por las condiciones de las mismas (como la temperatura, solvente de extracción, presión, entre otros), determinan no solo el rendimiento de extracción sino también la cantidad y variedad de compuestos extraídos. El hecho de que los residuos de extracción presenten contenido de polifenoles y capacidad antioxidante porcentualmente menores al extracto correspondiente dejan en evidencia la eficacia de la extracción. De todas formas, algunos residuos presentan valores considerables y podrían también, en algunos casos, ser usados como ingredientes con potencial funcional ya que además presentan un aporte de fibra alimentaria.

En conclusión, se evidenció que el extracto PLE 1 fue el que presentó, de las 4 condiciones PLE ensayadas, siempre uno de los resultados más altos en las técnicas aplicadas. Por lo anterior, se selecciona la extracción PLE 1 (100% etanol, 120°C) como la condición óptima y se continúa con dicho extracto en los estudios posteriores.

Como se comentó anteriormente, la composición de cada granada varía según la variedad y la cosecha, siendo influenciada por el clima, el suelo, y las condiciones geográficas (Marra et al. 2022), y a su vez, la variabilidad genética conduce a la variación en la biosíntesis de metabolitos secundarios fenólicos (Abid et al., 2017). Las diferencias observadas entre el presente estudio y los reportados en bibliografía pueden deberse también a la etapa de maduración de la fruta al momento de los análisis (Maillard et al., 2019).

#### **4.2.4 Análisis de fracciones bioaccesibles de extractos**

Se llevó a cabo la simulación digestiva del extracto PLE 1 que se obtuvo bajo las condiciones de 120°C y 100% etanol como solvente, seleccionado por ser el que obtuvo el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante de los cuatro extractos PLE. Se logró extraer la fracción bioaccesible y poca cantidad de fracción colónica, lo cual era esperado ya que la muestra de partida era un extracto y no contenía grandes cantidades de fibra. Como se describió en el punto 4.2.3, en el residuo de extracción queda retenida la fibra antioxidante, por lo que la fracción colónica obtenida luego de la digestión fue despreciable y no fue analizada. La fracción bioaccesible fue analizada para conocer su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante por el método de ABTS y ORAC-FL. Se analizó también la fracción bioaccesible de la harina de cáscara y la fracción bioaccesible del extracto de macerado. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

#### **Tabla 10**

*Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de fracciones bioaccesibles de extractos y harina de cáscara de granada*

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/g muestra)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ORAC-FL (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>
Fracción bioaccesible de la harina de cáscara	170,23 $\pm$ 3,76 <sup>a</sup>	2986,74 $\pm$ 277,55 <sup>a</sup>	724,48 $\pm$ 42,59 <sup>a</sup>
Fracción bioaccesible del extracto PLE 1	178,59 $\pm$ 12,96 <sup>a</sup>	3316,40 $\pm$ 65,94 <sup>b</sup>	774,85 $\pm$ 29,37 <sup>a</sup>
Fracción bioaccesible del extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)	180,28 $\pm$ 5,72 <sup>a</sup>	3530,28 $\pm$ 221,47 <sup>c</sup>	706,64 $\pm$ 46,83 <sup>a</sup>

*Nota:* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan por g de muestra libre de solvente.

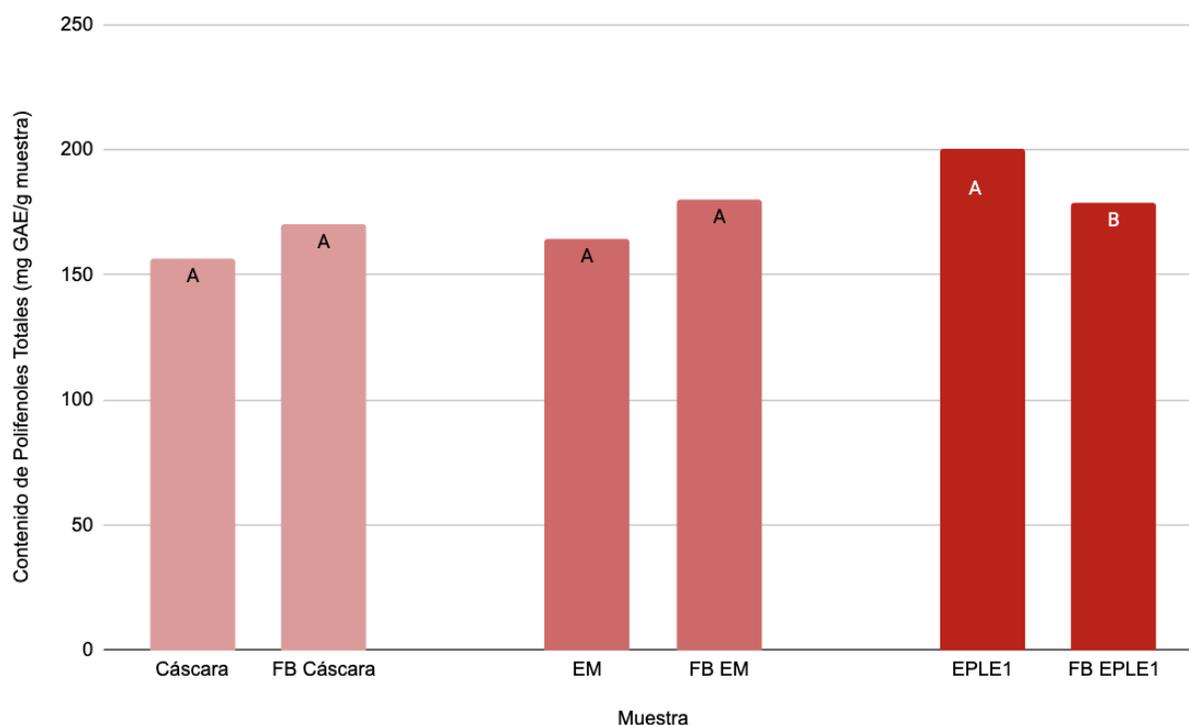
Las curvas de calibración obtenidas y los cálculos realizados se detallan en el Anexo 1, 2 y 3.

Se observa que, en cuanto al contenido de polifenoles totales, las tres fracciones bioaccesibles no presentaron diferencias significativas entre sí. Al comparar estos

resultados con el contenido de polifenoles totales para la cáscara y extractos de partida (Tabla 9), luego de la digestión no se observan diferencias significativas para el caso de la cáscara y el extracto de macerado, pero si para el extracto PLE 1, que disminuyó su valor luego de la digestión. Lo anterior se visualiza en la Figura 8. Con respecto a la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS, la fracción bioaccesible de la cáscara fue la que obtuvo el menor resultado ( $2986,74 \pm 277,55 \mu\text{mol TE/g muestra}$ ), seguido por la fracción bioaccesible del extracto PLE 1 y la fracción bioaccesible del extracto macerado, con un valor de  $3530,28 \pm 221,47 \mu\text{mol TE/g muestra}$ . Al comparar los resultados obtenidos antes y después de la digestión, representado en la Figura 9, se aprecia un aumento de la capacidad antioxidante para las tres fracciones bioaccesibles luego de la misma. En cuanto a la capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL, no se observaron diferencias significativas entre las tres fracciones bioaccesibles. El extracto de macerado disminuyó su capacidad antioxidante luego de la digestión, y las otras dos muestras se mantuvieron iguales, sin diferencias apreciables luego del proceso digestivo (Figura 10).

### **Figura 8**

*Contenido de polifenoles totales antes y después de la simulación digestiva, para la harina de cáscara de granada, extracto macerado y extracto PLE 1*



*Nota.*

Cáscara: Harina de cáscara de granada

FB Cáscara: Fracción bioaccesible de la harina de cáscara de granada

EM: Extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v), libre de solvente

FB EM: Fracción bioaccesible del extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)

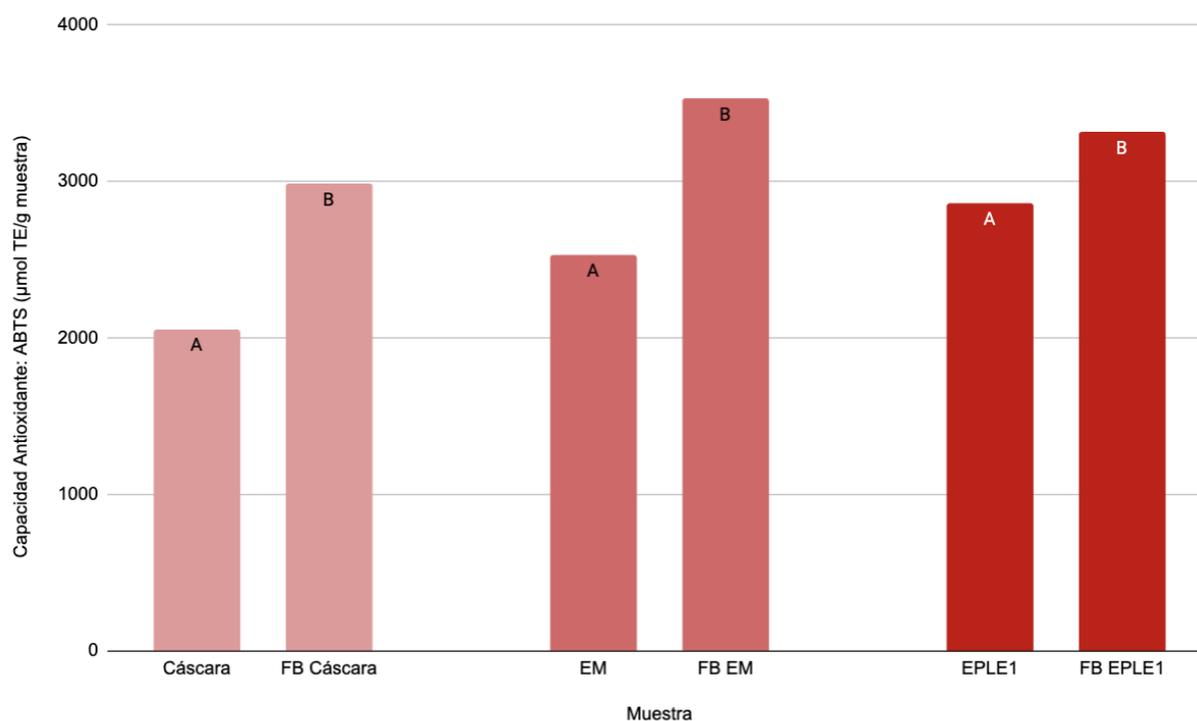
EPLE1: Extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1, libre de solvente

FB EPLE1: Fracción bioaccesible del extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1

El análisis estadístico se realizó por pares de muestra (la misma muestra antes y luego de la simulación digestiva), como se representa en la figura.

## Figura 9

*Capacidad antioxidante medida por ABTS antes y después de la simulación digestiva, para la harina de cáscara de granada, extracto macerado y extracto PLE 1*



*Nota.*

Cáscara: Harina de cáscara de granada

FB Cáscara: Fracción bioaccesible de la harina de cáscara de granada

EM: Extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v), libre de solvente

FB EM: Fracción bioaccesible del extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)

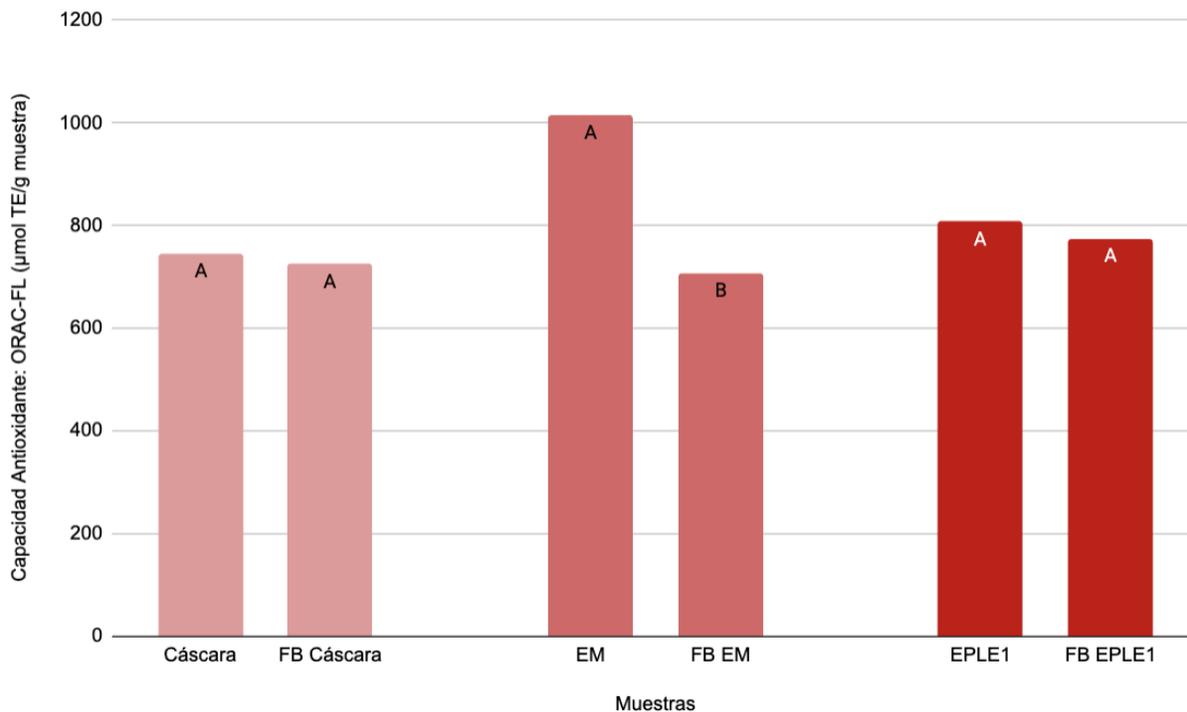
EPLE1: Extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1, libre de solvente

FB EPLE1: Fracción bioaccesible del extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1

El análisis estadístico se realizó por pares de muestra (la misma muestra antes y luego de la simulación digestiva), como se representa en la figura.

## Figura 10

*Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL antes y después de la simulación digestiva, para la harina de cáscara de granada, extracto macerado y extracto PLE 1*



*Nota.*

Cáscara: Harina de cáscara de granada

FB Cáscara: Fracción bioaccesible de la harina de cáscara de granada

EM: Extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v), libre de solvente

FB EM: Fracción bioaccesible del extracto macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)

EPLE1: Extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1, libre de solvente

FB EPLE1: Fracción bioaccesible del extracto PLE bajo las condiciones de la corrida 1

El análisis estadístico se realizó por pares de muestra (la misma muestra antes y luego de la simulación digestiva), como se representa en la figura.

Los resultados anteriores muestran que, en general, no se observaron diferencias apreciables de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (medida por ORAC-FL) de los extractos de macerado, extracto PLE 1 y cáscara de granada antes y después de la simulación digestiva, por lo que este proceso no estaría influyendo en la disponibilidad de los compuestos que estas técnicas miden. Sin embargo, se observó

un aumento de la capacidad antioxidante medida por ABTS para todas las muestras luego de la digestión. Esto podría deberse a que el proceso de simulación digestiva logra liberar y exponer a aquellos compuestos que presentan actividad antioxidante de metodología ET, los cuales son detectados con la técnica de ABTS.

Okumus & Bakkalbasi (2021), analizaron tres variedades de cáscara de granada y realizaron una simulación digestiva de los extractos obtenidos con etanol 60% (etanol/agua v/v) y metanol. Luego de la digestión, reportaron valores de polifenoles totales entre 111,9 y 120,9 mg GAE/g muestra, capacidad antioxidante medida por ABTS entre 19100 y 49000  $\mu\text{mol TE/g}$ , y capacidad antioxidante medida por DPPH entre 91400 y 125700  $\mu\text{mol TE/g}$ . Para la capacidad antioxidante se observan valores superiores a lo encontrado en el presente trabajo, y se observa una disminución de la capacidad antioxidante luego del proceso de simulación digestiva, contrario a lo encontrado en este trabajo.

#### **4.2.5 Análisis de mermeladas y sus fracciones bioaccesibles**

Como se indicó anteriormente, el extracto obtenido en la extracción PLE 1 bajo las condiciones de 100% etanol, 120°C fue el seleccionado para incorporar a la mermelada de frutilla. Con fines comparativos se incorporó también a la mermelada el extracto obtenido en la maceración. De esta forma se elaboraron tres mermeladas de frutilla: una mermelada control sin agregados, una mermelada con extracto PLE 1 y otra con extracto de macerado. Ambos extractos se incorporaron al alimento en la misma proporción del 5%.

Se evaluó el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de las dos mermeladas, comparándola con la mermelada control. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Posteriormente, se realizó la simulación digestiva de las tres mermeladas, analizando el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de las fracciones bioaccesibles. Estos resultados también se muestran también en la Tabla 11.

**Tabla 11**

*Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de mermeladas y sus fracciones bioaccesibles*

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de Polifenoles Totales (mg GAE/g muestra)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>	<b>Capacidad Antioxidante: ORAC-FL (<math>\mu\text{mol TE/g muestra}</math>)</b>
Mermelada de frutilla control	2,69 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,06 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	7,84 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Mermelada de frutilla con extracto PLE 1	7,84 $\pm$ 0,48 <sup>e</sup>	28,31 $\pm$ 2,19 <sup>c</sup>	10,77 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>
Mermelada de frutilla con extracto de macerado	6,12 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	17,85 $\pm$ 1,54 <sup>b</sup>	8,10 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
Fracción bioaccesible de mermelada control	3,95 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	109,40 $\pm$ 3,18 <sup>d</sup>	71,08 $\pm$ 5,41 <sup>b</sup>
Fracción bioaccesible de la mermelada con extracto PLE 1	7,16 $\pm$ 0,39 <sup>d</sup>	141,93 $\pm$ 8,21 <sup>e</sup>	133,36 $\pm$ 5,96 <sup>d</sup>
Fracción bioaccesible de la mermelada con extracto macerado	5,77 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	162,21 $\pm$ 12,00 <sup>f</sup>	112,13 $\pm$ 4,73 <sup>c</sup>

*Nota:* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los valores. Por columna, letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ).

Las curvas de calibración obtenidas y los cálculos realizados se detallan en el Anexo 1, 2 y 3.

La mermelada control presenta un contenido de polifenoles totales bajo de  $2,69 \pm 0,19$  mg GAE/g muestra, presentes naturalmente en la fruta a partir de la cual fue elaborada. La incorporación de un 5% de extracto, dio como resultado un contenido mayor de  $7,84 \pm 0,48$  mg GAE/g muestra para la mermelada con extracto PLE 1, y de  $6,12 \pm 0,31$  mg GAE/g para la mermelada con extracto de macerado. Es decir que se aprecia un aumento del 292% y 228%, respectivamente, luego de la incorporación de los extractos al alimento. Al analizar sus fracciones bioaccesibles, no se observan diferencias significativas en los resultados de polifenoles totales luego de la digestión para el caso de la mermelada con extracto de macerado, pero si se aprecia un aumento en la mermelada control y una disminución para la mermelada con incorporación de extracto PLE 1. A pesar de dicha disminución para el extracto PLE 1 luego de la simulación digestiva, su valor sigue siendo superior al de la fracción bioaccesible de la mermelada control y de la mermelada con extracto de macerado.

Al analizar la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS, se observa una capacidad mayor de las mermeladas con agregado de extracto, al compararlas con la mermelada control. También, se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante luego de la simulación digestiva, para las tres mermeladas. La misma tendencia se observó para la capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL, lo cual evidencia que el proceso digestivo logra una exposición o liberación de los compuestos antioxidantes de interés de la matriz analizada. La fracción bioaccesible de la mermelada con agregado de extracto PLE 1, fue la que obtuvo la

mayor capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL y el mayor contenido de polifenoles totales. La fracción bioaccesible de la mermelada con extracto de macerado fue la que obtuvo el resultado más alto de capacidad antioxidante medida por el método de ABTS.

Resulta interesante destacar la falta de correlación directa entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante para las fracciones bioaccesibles, ya que se esperaría que, si luego del proceso de simulación digestivo se detecta una capacidad antioxidante mayor en las muestras, por ambos métodos, también se observe para el contenido de polifenoles, pero esto no fue así para el caso de la mermelada con extracto de macerado, cuyo contenido de polifenoles totales antes y después de la simulación digestiva no presentaron diferencias significativas entre sí, ni para la mermelada con extracto PLE 1, la cual disminuyó su contenido de polifenoles totales luego de la digestión. Esto podría explicarse por los diferentes compuestos que son detectados a través de los diferentes métodos ensayados, pudiendo aumentar en un caso y disminuir en el otro por consecuencia de los cambios estructurales y composicionales en la matriz producidos por la simulación digestiva.

Altunkaya et al. (2013), incorporaron cáscara de granada en productos panificados, con un porcentaje de sustitución de harina entre el 0 y 10%, resultando en una capacidad antioxidante del producto final entre 0,0018 y 0,0068 mmol  $\mu$ mol TE/g de pan recién horneado, valores inferiores a los de la mermelada del presente trabajo.

El-Said et al. (2014), incorporaron un extracto acuoso de cáscara de granada a un yogurt, y los resultados de contenido de polifenoles totales, expresados en mg GAE/g muestra fueron los siguientes: 3,09; 4,01; 4,89; 5,67; 6,09, 7,39; 7,49 y 7,61, después de la inoculación, con porcentajes de extracto de 5%,10%, 15%, 20%, 25%, 30% y 35%, respectivamente. Se observa que, con el mismo agregado de extracto del 5%, en el presente estudio se obtiene un alimento con el doble de contenido de polifenoles totales que el reportado por estos autores.

Ismail et al. (2014), cocinaron galletas con incorporación de diferentes porcentajes de polvo de cáscara de granada. Los resultados de polifenoles totales obtenidos, expresados en mg GAE/g muestra fueron los siguientes: 0,90 para la galleta control y 1,04; 1,19; 1,33; 1,47 y 1,61 para las galletas con incorporación de polvo de cáscara de granada en un 1,5%, 3%, 4,5%, 6% y 7,5%, respectivamente. Estos valores son inferiores al de las mermeladas de este estudio.

Lotfy & Baraka (2018), incorporaron cáscara de granada en tortas, obteniendo un resultado de polifenoles totales de 0,0029; 0,0043; 0,0058 y 0,0067 mg GAE/g, para las tortas con una incorporación del 5%, 10%, 15% y 20%, respectivamente, de polvo de cáscara de granada. Todas las tortas antes mencionadas presentaron un valor final de contenido de polifenoles totales inferior al de las mermeladas elaboradas en el presente trabajo. El-Beltagi et al. (2022), también incorporaron extracto de cáscara de granada a tortas; la torta control (sin agregado de extracto) presentaba un contenido de polifenoles totales de  $1,15 \pm 0,1$  mg GAE/g, y el agregado de un 3% de extracto dió como resultado un valor de  $8,01 \pm 0,2$  mg GAE/g. Se observa que el agregado de extracto de cáscara en el producto control logró un aumento del contenido de polifenoles totales en la muestra, tal como se observó en el presente estudio.

Santos et al. (2012), reportaron valores de 0,96 mg GAE/g muestra para un queso con agregado de extracto de romero y de 3,96 mg GAE/g muestra para un queso fresco para untar con extracto de orégano. Ambos alimentos presentaron un contenido de polifenoles totales inferior a las mermeladas elaboradas en el presente estudio, destacando la cáscara de granada y sus extractos por su elevada capacidad antioxidante y contenido de polifenoles.

No se han encontrado estudios de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de fracciones bioaccesibles de alimentos con incorporación de extractos de cáscara de granada en bibliografía.

#### 4.2.6 Capacidad antidiabética

Los resultados obtenidos de capacidad antidiabética, medida a partir de la técnica de la inhibición de la  $\alpha$ -Glucosidasa y expresados a través del IC50 (mg/mL) se muestran en la Tabla 12. Se realizó el ensayo para la cáscara de granada, extractos de macerado y PLE 1 y para las mermeladas con agregado de extracto y mermelada control. También se realizó el ensayo sobre los residuos de extracción, con el fin de evaluar la eficacia de la misma sobre los compuestos antidiabéticos. Sobre las fracciones bioaccesibles no se realizó este ensayo, ya que la enzima  $\alpha$ -Glucosidasa actúa en el organismo antes de la digestión del alimento.

**Tabla 12**

*Capacidad antidiabética, inhibición de la  $\alpha$ -Glucosidasa*

Muestra	Capacidad antidiabética (IC50 mg/mL)
Harina de cáscara de granada	0,98 ± 0,96 <sup>a</sup>
Extracto de macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)	0,79 ± 0,08 <sup>a</sup>
Extracto PLE 1: 100 % etanol, 120°C	0,75 ± 0,03 <sup>a</sup>
Residuo de macerado en etanol 75% (etanol/agua v/v)	6,13 ± 0,67 <sup>b</sup>
Residuo PLE 1: 100 % etanol, 120°C	1,99 ± 0,20 <sup>a</sup>
Mermelada de frutilla control	81,80 ± 3,03 <sup>e</sup>
Mermelada de frutilla con extracto PLE 1	19,89 ± 1,32 <sup>c</sup>
Mermelada de frutilla con extracto de macerado	29,76 ± 1,67 <sup>d</sup>

*Nota:* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ).

La curva de calibración obtenida y los cálculos realizados se detallan en el Anexo 4.

Los resultados reflejan que todas las muestras presentaron capacidad antidiabética, pero en diferentes proporciones. El mayor porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -Glucosidasa se le adjudica a la acarbosa con un IC50 de  $4,0 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ , Fernández-Fernández et al. (2019). Se obtuvieron los menores valores de IC50 (mayor capacidad antidiabética), sin diferencias significativas entre ellos, para la cáscara de granada, extracto de macerado y extracto y residuo PLE 1.

Okumus & Bakkalbasi (2021), reportaron valores de IC50 para sus extractos de cáscara de granada entre 0,06 y 0,14 mg/mL, dependiendo de la variedad analizada, a través de la inhibición de la  $\alpha$ -Glucosidasa, siendo una capacidad antidiabética superior a la encontrada en el presente trabajo para los extractos estudiados.

Fernández- Fernández et al. (2021), analizaron la capacidad antidiabética de sus muestras por el método de la  $\alpha$ -Glucosidasa, y reportaron valores de IC50 de 0,151 mg/mL y de 0,157 mg/mL para un extracto acuoso y otro etanólico de Marcela, respectivamente, observándose una capacidad antidiabética en el mismo orden que la encontrada para la cáscara y sus extractos.

Al observar los resultados obtenidos para las mermeladas, se aprecia que la incorporación de los extractos a la mermelada control en una proporción del 5% logró un aumento considerable de la capacidad antidiabética original de partida, pasando de un valor de IC50 (mg/mL) de  $81,80 \pm 3,03$  a valores de  $19,89 \pm 1,32$  y  $29,76 \pm 1,67$ , para la mermelada con agregado de extracto PLE 1 y de macerado, respectivamente.

La mermelada con el agregado del 5% de extracto PLE 1 fue la que obtuvo la mayor capacidad antidiabética de las tres mermeladas, constituyéndose así como una opción de alimento saludable y funcional apto para el sector de consumidores que presenta o tiene tendencia a presentar diabetes.

Çam et al. (2013a), incorporaron compuestos fenólicos de cáscara de granada encapsulados en helado, obteniendo un resultado de IC50 de 0,05 mg/mL para el helado con 0,5% de compuestos fenólicos incorporados, y de 0,02 mg/mL para el helado con una incorporación del 1% de compuestos fenólicos, aplicando la técnica de la *α-Glucosidasa*. Se observa en ambas matrices alimentarias una capacidad antidiabética mayor a la encontrada en el presente estudio, tanto en las mermeladas como en los extractos, lo cual se explica probablemente por el hecho de que en el estudio de estos autores los polifenoles se agregaron encapsulados al helado, generando una protección de los mismos y permitiendo que lleguen en concentraciones mucho más elevadas al alimento final.

En otro estudio de Çam et al. (2013b), incorporaron extracto de cáscara de granada obtenido a partir de una extracción con acetona a helado, en una concentración de 0,1% y 0,4%. Los resultados obtenidos de capacidad antidiabética, medidos por el método de la *α-Glucosidasa* fueron de 0,05 y 0,02 respectivamente, expresados como el IC50 (mg/mL). El helado control no presentó capacidad antidiabética. Resulta interesante observar que estos valores coinciden con el estudio mencionado previamente, pero en este caso se realizó la extracción sólido-líquido y no se encapsularon los compuestos de interés. La mayor capacidad antidiabética en este caso podría deberse a la técnica de extracción utilizada.

Los resultados obtenidos en las mermeladas del presente estudio indican que tanto la cáscara de granada como los extractos evaluados poseen actividad antidiabética, y que al ser incorporados a un alimento con una baja capacidad antidiabética logran transformarlo en un alimento con potencial para inhibir la acción de la *α-Glucosidasa*, enzima que participa en la digestión de carbohidratos. Esta capacidad antidiabética

podría relacionarse con su contenido en polifenoles, compuestos conocidos por sus propiedades antioxidantes y antidiabéticas (Okumus & Bakkalbasi, 2021).

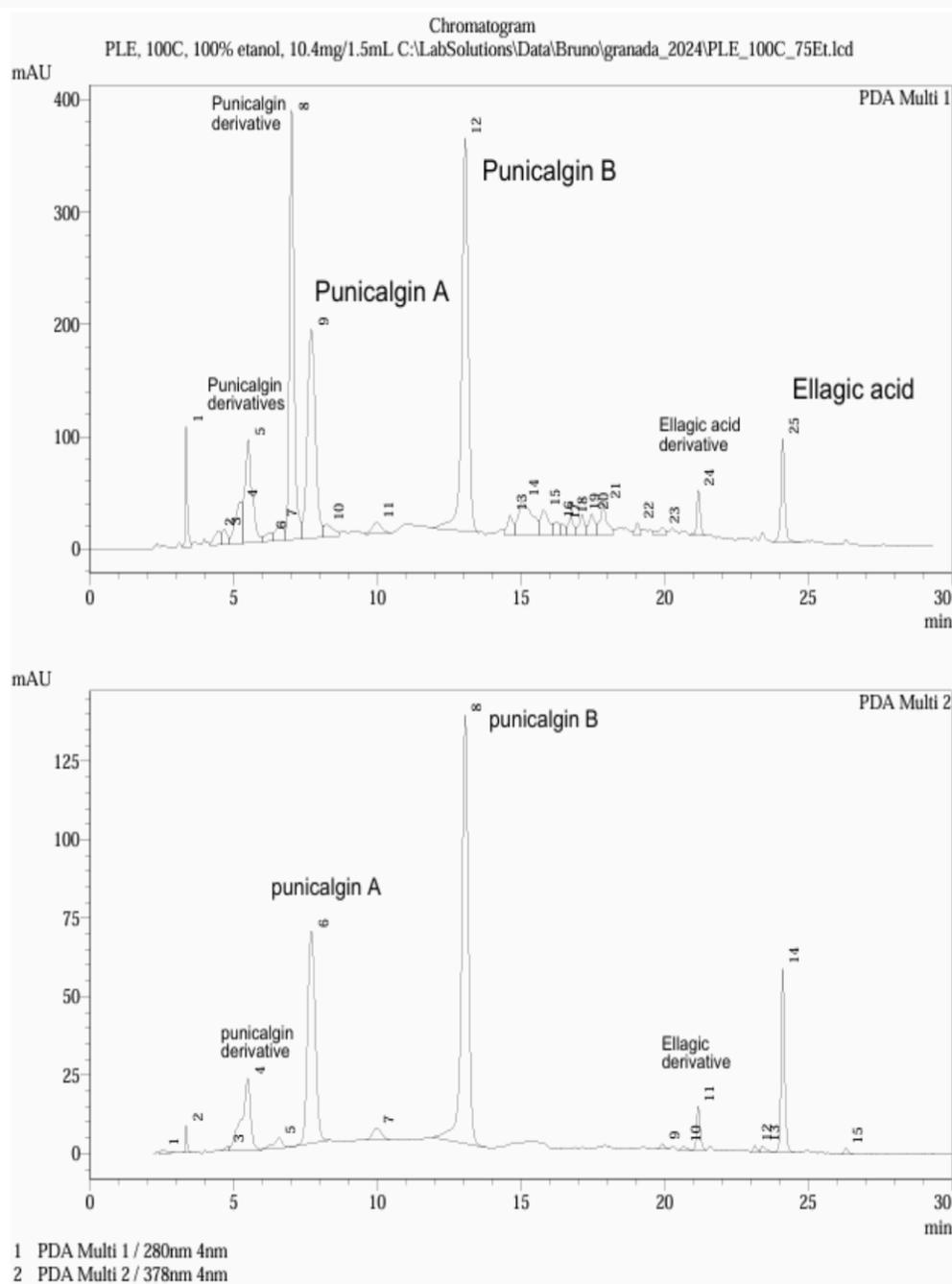
Se evidencia que ninguna de las dos técnicas de extracción logró concentrar los compuestos con capacidad antidiabética (al comparar los resultados con el de la cáscara de partida), sin embargo, la mermelada con la incorporación del extracto PLE 1 presentó una capacidad antidiabética considerablemente superior a la mermelada con incorporación del extracto de macerado. Esto podría explicarse por interacciones diferentes entre los extractos y la matriz a la cual se incorporaron. Son necesarios más estudios para concluir al respecto.

#### **4.2.7 Identificación de compuestos fenólicos por HPLC**

Se llevó a cabo un estudio por HPLC de los cuatro extractos PLE y del extracto de macerado, con el fin de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos mayoritarios en las muestras y compararlos, evidenciando posibles diferencias debidas a las técnicas y condiciones de extracción. Se siguió el procedimiento reportado por Cam & Hisil (2010), utilizando como patrón quercetina para realizar una curva de calibración con el fin de cuantificar los compuestos de interés. Se obtuvieron cromatogramas a 280 nm y 378 nm para cada extracto, muy similares entre sí. Se muestra a modo de ejemplo en la Figura 11 los cromatogramas del extracto PLE 3 (100% etanol, 100°C).

#### **Figura 11**

*Cromatogramas del extracto PLE 3 a 280 nm y 378 nm*



A partir de los cromatogramas obtenidos a 378 nm y de lo reportado por Cam & Hisil (2010), comparando los tiempos de retención, se identificaron los compuestos de los picos principales en los cinco extractos: punicalagina A, punicalagina B, derivados de punicalagina, ácido elágico y derivados del ácido elágico. No se identificó ácido gálico ni quercetina en ninguna de las muestras. A partir del área de los picos se cuantificaron

los compuestos. Los tiempos de retención y los cálculos de cuantificación se detallan en el Anexo 5.

La punicalagina B fue el compuesto mayoritario encontrado en todos los extractos, en una cantidad expresada en mg quercetina/ 100 g de muestra (libre de solvente) de 568,4; 685,5; 972,1 y 1082,9, para los extractos PLE 1, 3, 2 y 4, respectivamente, y de 1001,27 para el extracto de macerado. La punicalagina A fue cuantificada en una cantidad de 164,2; 256,8; 344,3 y 454,6 mg quercetina/ 100 g de muestra libre de solvente, para los extractos PLE 1, 3, 2 y 4, respectivamente, y de 978,67 para el extracto de macerado. También, se identificó una cantidad apreciable de derivados de punicalagina en todos los extractos de 69,1; 70,7; 180,3 y 261,2 mg quercetina/ 100 g de muestra (libre de solvente), para los extractos PLE 1, 3, 4 y 2, respectivamente, y de 369,73 para el extracto de macerado. El ácido elágico fue cuantificado en todos los extractos en valores de 233,4; 291,7; 303,3 y 385,4 mg quercetina/ 100 g de muestra (libre de solvente), para los extractos PLE 4, 1, 3 y 2, respectivamente y de 212,19 en el extracto de macerado. Finalmente, los derivados del ácido elágico fueron identificados en mayor cantidad en el extracto PLE 2, con un valor de 122,6 mg quercetina/ 100 g de muestra (libre de solvente), seguido por el extracto de macerado con un valor de 116,28 y de los extractos PLE 3, 1 y 4, con valores de 83,1; 80,0 y 63,8 mg quercetina/ 100 g de muestra, respectivamente. A partir de los valores antes mencionados se calculó el contenido total de compuestos fenólicos en las muestras, detallado en la Tabla 13.

### **Tabla 13**

*Contenido total de compuestos fenólicos determinados por HPLC*

Muestra	Contenido de compuestos fenólicos (%)
Extracto PLE 1: 100 % etanol, 120°C	1,64 ± 0,10 <sup>ab</sup>
Extracto PLE 2: 75 % etanol/agua v/v, 120°C	2,10 ± 0,13 <sup>b</sup>
Extracto PLE 3: 100 % etanol, 100°C	1,38 ± 0,04 <sup>a</sup>
Extracto PLE 4: 75 % etanol/agua v/v, 100°C	1,98 ± 0,21 <sup>b</sup>
Extracto macerado: 75% etanol/agua v/v	2,57 ± 0,03 <sup>c</sup>

*Nota:* Los resultados están expresados como el promedio de las mediciones ± SD. El análisis de ANOVA se llevó a cabo utilizando el test de Tukey para establecer las diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ).

El mayor porcentaje de compuestos fenólicos se obtuvo en el extracto de macerado con un valor de  $2,57 \pm 0,03$  %, seguido de los extractos PLE 2 ( $2,10 \pm 0,13$  %), PLE 4 ( $1,98 \pm 0,21$ ) y PLE 1 ( $1,64 \pm 0,10$  %), sin diferencias significativas entre sí.

Como se aprecia en los cromatogramas (Figura 11), la punicalagina A y B fueron los compuestos mayoritarios identificados en las muestras. La suma de los dos anómeros se cuantificó entre un 31% y 78% de los compuestos fenólicos totales identificados en las diferentes muestras, con una proporción mayoritaria de punicalagina B en todos los casos. En el caso del extracto de macerado, sin embargo, la proporción de punicalagina A y B son muy similares (ver Anexo 5). El ácido elágico también se encontró en una proporción apreciable en los cinco extractos, entre un 8% y un 24%

del total de compuestos fenólicos (ver Anexo 5), caracterizándose el extracto de macerado por tener una cantidad inferior a los cuatro extractos PLE. Por lo anterior, se puede concluir que la maceración favorece la extracción de punicalaginas sobre la extracción de ácido elágico, y lo contrario se observa en las extracciones PLE.

Toledo-Merma et al. (2022), reportaron un valor máximo de 0,05% de punicalagina A, 0,2% de punicalagina B, y 0,03% de ácido elágico en el extracto, luego de optimizar las condiciones de la extracción PLE con etanol como solvente (60°C y 20 bar), valores inferiores a lo encontrado en esta investigación. Garcia et al. (2021), reportaron en su extracto un contenido de punicalagina (A+B) bajo las condiciones de extracción PLE óptimas (198,6°C y 76,6 % etanol/agua v/v) de 17 mg/g, es decir un 1,7%, valor del mismo orden al encontrado en el presente estudio para el contenido total de polifenoles.

Asimismo, Alexandre et al. (2017), optimizaron la obtención de compuestos fenólicos en una extracción asistida con altas presiones utilizando etanol como solvente, y cuantificaron los compuestos por HPLC. Encontraron los mismos compuestos mayoritarios: punicalagina y sus derivados y ácido elágico, y también otros no identificados en el presente estudio como ácido gálico y granatina A. En otro estudio reportado por Santos et al. (2019), realizaron extracciones líquidas con gases expandidos (GXL) de cáscara de granada de variedad Wonderful asistida con ultrasonido, detectándose veinte picos diferentes en los extractos, entre los cuales la punicalagina A, punicalagina B y el ácido elágico también fueron identificados como los compuestos mayoritarios. Kumar et al. (2022), en su estudio con granada de la variedad Bhagwa secada al sol, reportaron, para el extracto obtenido por extracción con etanol asistida por ultrasonido, un contenido de ácido gálico del 0,16%, ácido elágico 0,74%, punicalagina 0,014% y quercetina 0,012%, haciendo un total de 0,93% entre estos compuestos. Este resultado se aproxima al encontrado en esta investigación para el total de polifenoles. Se concluye que, aún utilizando metodologías diferentes de extracción sobre la cáscara de granada, se detectaron en los trabajos antes mencionados los mismos tres compuestos fenólicos mayoritarios.

Otros estudios informaron resultados mayores, entre los que se destaca el de Marra et al. (2022), quienes reportaron un valor de 24% de ácido elágico para su muestra de cáscara de granada secada por método spray como el compuesto mayoritario, seguido por las punicalaginas con un porcentaje del 8,6%. Cabe destacar que la cáscara en este estudio pasó por un proceso de extracción previo a la detección de los compuestos por HPLC, la cual se realizó con metanol y acetona (primero 0,1 g de cáscara de granada liofilizada se disolvieron en 10 mL de HCl 1% en metanol y luego 0,1 g de la mezcla obtenida se disolvió en 10 mL de solución de acetona: HCl 1% en metanol (1:1)). Esto podría explicar el elevado porcentaje de polifenoles cuantificados en este estudio que difiere con lo encontrado en esta investigación, sin embargo, los compuestos mayoritarios son los mismos.

Çam & Hisil (2010), reportaron que los principales compuestos cuantificados por HPLC en su estudio con cáscara de granada fueron punicalagina A, punicalagina B, ácido elágico y gálico. Los autores calcularon la cantidad de estos compuestos presentes en su muestra de extracto de cáscara de granada (obtenido a partir de una extracción con agua presurizada) medida a 378 nm para las punicalaginas y ácido elágico, y a 280 nm para el ácido gálico, obteniendo un contenido de punicalagina (A+B) de  $116,6 \pm 12,2$  mg/g, derivados de punicalagina un total de 25,96 mg/g, ácido elágico  $1,25 \pm 0,2$  mg/g, derivados de ácido elágico 3,23 mg/g, y ácido gálico  $1,43 \pm 0,3$  mg/g. Estos resultados suman un total de 148,5 mg/g, es decir un 15%, valor superior al encontrado en este trabajo para todas las muestras (Tabla 13).

Šavikin et al. (2018), cuantificaron el contenido de compuestos fenólicos por HPLC de extractos etanólicos de cáscara de granada, obteniendo los siguientes resultados: punicalagina (A+B) 5,8%, punicalina 16,5%, ácido elágico 2,2% y ácido gálico 0,8%. El-Beltagi et al. (2022), realizaron cromatografía LC-MS/MS sobre extracto de cáscara de granada obtenido con una mezcla de metanol, etanol y agua, reportando como componentes mayoritarios ácido gálico (17,44%), ácido elágico (16,54%), cianidina-3-O-glucósido (14,54%), punicalagina B (9,25%) y punicalagina A (6,34%).

Finalmente, Okumus & Bakkalbasi (2021), realizaron una extracción de cáscara de granada con etanol 60% y metanol, reportaron valores de punicalagina A entre 9,7 y 27,8%, según la variedad de la fruta utilizada, de punicalagina B entre 10,1 y 23,7%, y de ácido elágico entre 0,5 y 1,0%. Estos trabajos también presentan resultados superiores a los encontrados en esta investigación.

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con lo reportado en bibliografía, se evidencia la dependencia directa de los compuestos extraídos con la técnica de extracción utilizada y los solventes empleados, y con las características del material de partida. La detección y cuantificación de los compuestos mayoritarios en los extractos PLE explica, en gran medida, la gran capacidad antioxidante y el alto contenido de polifenoles totales detectados por las otras técnicas y detallados en el punto 4.2.3. De los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos, el ácido elágico presenta propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, neuroprotectoras, antihepatotóxicas, anticolestáticas, antifibrogénicas, anticancerígenas, citotóxicas y antivirales, (Marra et al., 2022). Por su parte, la punicalagina presenta actividad antioxidante, hepatoprotectora, antiaterosclerótica y antitumoral comprobada (Marra et al., 2022).

Los resultados obtenidos mediante HPLC para los extractos PLE indican que, al utilizar etanol al 100% como solvente en condiciones de extracción PLE a temperatura constante, se observó una disminución en el contenido de punicalagina y sus derivados, mientras que se incrementó la concentración de ácido elágico y sus derivados, al compararlo con el extracto obtenido con una mezcla de etanol y agua. Este comportamiento se puede atribuir a la menor polaridad del solvente, que restringe la extracción de punicalaginas y favorece la de ácidos fenólicos. Este hallazgo coincide con los reportes de Rocchetti et al. (2018) y García et al. (2021). Adicionalmente, al mantener la misma composición de solvente en la extracción PLE y aumentar la temperatura, se evidenció un incremento en la concentración de ácido elágico y sus derivados, junto con una disminución en el contenido de punicalaginas. Este fenómeno sugiere que temperaturas elevadas facilitan la hidrólisis de compuestos poliméricos,

como los elagitaninos, generando compuestos fenólicos monoméricos, como el ácido elágico. Este comportamiento también puede explicar el resultado obtenido de polifenoles totales en los extractos, ya que los que obtuvieron los mayores valores (extracto PLE 1 y 2) fueron los obtenidos bajo la condición de temperatura mayor (120°C). La alta temperatura aplicada en estas extracciones favorece la hidrólisis de los compuestos poliméricos, formando compuestos fenólicos monoméricos que son detectados por el método de Folin-Ciocalteu, (García et al., 2021).

### **4.3 Resultados globales**

Se elaboraron dos productos con la incorporación de extractos de cáscara de granada; ambos presentan el aspecto y consistencia típica de una mermelada, y fueron elaborados sin azúcar.

Tomando como referencia lo establecido por la EFSA (European Food Safety Authority (EFSA), 2011) en cuanto al contenido de quercetina en una muestra y su capacidad antioxidante, si bien no se identificó quercetina en las mermeladas elaboradas, la mermelada con agregado de extracto PLE 1, por ejemplo, presentó un contenido de polifenoles totales medida por Folin-Ciocalteu de  $7,84 \pm 0,48$  mg GAE/g muestra. En un consumo normal de mermelada de 10 gramos al día, el contenido de polifenoles es de 78,4 mg GAE, por lo cual podría llegar a promocionarse con un claim que le atribuya una potencial actividad antioxidante. Según otros autores (Scalbert & Williamson, 2000, como se citó en Santos et al., 2012) la ingesta recomendable de compuestos fenólicos es de 1 g/día, es decir que el consumo planteado de mermelada estaría satisfaciendo el 7,84%, mientras que en la investigación llevada a cabo por Saura-Calixto et al. (2007), la ingesta media diaria de polifenoles en las dietas españolas se estimó entre 2590 y 3016 mg/día, por lo que el consumo de esta mermelada representaría entre el 2,5 y 3%. No existen reglamentaciones para declarar alimentos con potencial antidiabético.

Al analizar la efectividad de las técnicas de extracción aplicadas (maceración y PLE) se observa que las dos lograron concentrar los compuestos antioxidantes de la cáscara de granada, para algunas de las condiciones estudiadas. La extracción PLE bajo las

condiciones de 100% etanol y 120°C se identificó como la óptima, permitiendo obtener el extracto con el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante medida por ABTS, valores superiores al del extracto de macerado. Por otro lado, el extracto macerado fue el que presentó, de todos los extractos, la mayor capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL. Sin embargo, ésta técnica tradicional presenta la desventaja de su mayor consumo de solvente y mayor tiempo de extracción al compararla con la extracción PLE, por lo que se identifica esta última como la técnica más eficiente para extraer los compuestos antioxidantes de la cáscara de granada. Este resultado permite concluir que la extracción PLE concentra principalmente compuestos antioxidantes con metodología ET. Al analizar en conjunto este resultado con lo obtenido mediante HPLC, se esperaría que el ácido elágico, cuya extracción fue favorecida mediante la técnica PLE presente principalmente metodología antioxidante ET, mientras que la punicalagina A y B, extraídas en mayor proporción en la maceración podrían presentar principalmente capacidad antioxidante con metodología HAT.

Posteriormente, se realizó la simulación digestiva de la cáscara y de los extractos, no observándose diferencias apreciables de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (medida por ORAC-FL) de los extractos de macerado, extracto PLE 1 y cáscara de granada antes y después de la simulación digestiva, por lo que este proceso no estaría influyendo en la disponibilidad de los compuestos que estas técnicas miden. Sin embargo, sí se observó un aumento de la capacidad antioxidante medida por ABTS para todas las muestras luego de la digestión, por lo que se puede concluir que el proceso de simulación digestiva sí logra liberar de la matriz y exponer los compuestos antioxidantes detectados en esta técnica. Al final del proceso digestivo, la cáscara, el extracto de macerado y el extracto PLE 1 presentan contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medida por ORAC-FL sin diferencias significativas, destacándose el extracto macerado por su capacidad antioxidante medida por ABTS superior al de las otras dos muestras.

Luego de incorporar los extractos en la mermelada en una proporción del 5% y analizar las propiedades bioactivas de las mismas, se observó un aumento en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante al compararse con la mermelada control. La mermelada con la incorporación del extracto PLE 1 fue la que presentó el mayor contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medida por ABTS, no presentando diferencias significativas en la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL con la mermelada con agregado de extracto de macerado.

Se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante luego de la digestión para las dos mermeladas, tanto por ABTS como por ORAC-FL, lo cual evidencia que el proceso digestivo logra una exposición o liberación de los compuestos antioxidantes de interés de la matriz analizada. La fracción bioaccesible de la mermelada con agregado de extracto PLE 1, fue la que obtuvo la mayor capacidad antioxidante medida por el método de ORAC-FL y el mayor contenido de polifenoles totales. La fracción bioaccesible de la mermelada con extracto de macerado fue la que obtuvo el resultado más alto de capacidad antioxidante medida por el método de ABTS.

Con respecto a la capacidad antidiabética, el extracto PLE 1 obtuvo uno de los mayores resultados, sin diferencias significativas con la cáscara de granada, extracto de macerado y residuo PLE 1. Sin embargo, la mermelada con la incorporación del extracto PLE 1 fue el producto final que demostró tener la mayor capacidad antidiabética. Los compuestos bioactivos interaccionan con la matriz en la cual se encuentren y los complejos e interacciones que se forman varían en función de la misma y del compuesto de interés. Esto podría explicar el resultado observado, donde se partió de extractos con capacidad antidiabética sin diferencias significativas, pero al introducirlos en una misma matriz se obtuvieron dos productos finales con capacidad antidiabética diferente (Altunkaya et al., 2013; El-Said et al., 2014).

## **5 CONCLUSIONES**

### **5.1 Conclusiones generales**

En el presente estudio se han alcanzado los objetivos propuestos. Se caracterizó fisicoquímicamente la cáscara de granada estudiada, y se realizó la extracción de la misma, utilizando una técnica tradicional (maceración) y una técnica innovadora (PLE). Los extractos obtenidos por ambas técnicas fueron caracterizados.

La extracción PLE se destacó sobre la extracción por maceración, logrando un proceso más eficiente en términos de tiempo y cantidad de solvente utilizado, y el extracto obtenido se caracterizó por una mayor concentración de los compuestos antioxidantes con metodología ET, siendo los mayoritarios encontrados punicalagina A y B, y ácido elágico.

La mermelada que incorpora el extracto PLE 1 se presenta como el producto más destacado, debido a su capacidad antioxidante y antidiabética, constituyendo un alimento con potencial funcional novedoso que busca satisfacer la creciente demanda del mercado por productos naturales con beneficios para la salud. Además, cumple la doble función de aprovechar un subproducto agroindustrial, contribuyendo así a la reducción de la contaminación ambiental y promoviendo procesos sostenibles.

La presente investigación contribuye al conocimiento científico sobre las propiedades antioxidantes y antidiabéticas de la cáscara de granada y sus extractos, analizando de manera innovadora la fracción bioaccesible de un alimento con la incorporación de los extractos obtenidos. Los resultados obtenidos son alentadores y representan un punto de partida para futuras investigaciones.

## **5.2 Futuras investigaciones**

El presente estudio no incluyó la elaboración de una mermelada que incorpore harina de cáscara de granada de manera directa, lo cual representa una oportunidad interesante, dada la capacidad antioxidante y antidiabética demostrada de este ingrediente, que no requiere extracciones previas. A su vez, la incorporación de cáscara de granada de forma natural contribuiría al aporte de fibra alimentaria. En este punto sería necesario realizar un estudio sensorial comparando las 4 mermeladas

(control, con agregado de extracto macerado, con agregado de extracto PLE y con harina de cáscara de granada). La literatura sugiere que los compuestos fenólicos influyen significativamente en los atributos sensoriales de los alimentos, como el sabor, el aroma y el perfil organoléptico (El-Beltagi et al., 2022), y la incorporación directa de cáscara de granada podría tener un impacto negativo mayor en estos aspectos, por lo cual realizar estudios de evaluación sensorial resulta necesario.

Asimismo, es relevante evaluar el efecto de la adición de cáscara o extractos de cáscara de granada en la vida útil de los productos elaborados, ya que se ha documentado una influencia positiva de la misma, logrando prolongar significativamente la vida útil de diversos alimentos (Ismail et al., 2014; El-Beltagi et al., 2022). Sin embargo, los compuestos antioxidantes son conocidos por su inestabilidad durante el almacenamiento, ya que son susceptibles a factores como temperatura, luz, pH, oxígeno y la actividad de agua en la matriz alimentaria (Ventura et al., 2012). Por ello, es de gran interés estudiar sus propiedades bioactivas a lo largo del tiempo. Además, el análisis de la estabilidad microbiológica de las mermeladas complementaría el estudio sensorial y de vida útil, aportando valiosa información a la investigación.

Finalmente, aunque este trabajo se centró exclusivamente en la capacidad antioxidante y antidiabética de la cáscara de granada y sus extractos, es importante señalar que este residuo posee numerosas propiedades bioactivas que merecen ser exploradas en las mermeladas elaboradas.

## **6 BIBLIOGRAFÍA**

Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., Ayadi, M. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *J Food Sci Technol*, 54, 2890–2901.

<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2727-0>

Aguilera-Arango, G., Lombo-Ortiz, D., Burbano-Erazo, E., Orduz-Rodriguez, J. (2020). Granado (*Punica granatum L.*), un cultivo con potencial productivo: revisión y situación en Colombia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23.

Ahangari, B. & Sargolzaei, J. (2012). Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, Vol. 46, No. 3, 258–265.

Al-Ansari, M., Al-Humaid, L., Aldawsari, M., Abid, I., Jhanani, G., Shanmuganathan, R. (2023). Quercetin extraction from small onion skin (*Allium cepa L. var. aggregatum Don.*) and its antioxidant activity. *Environmental Research*, 224.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115497>

Alexandre, E., Araújo, P., Duarte, M., Freitas, V., Pintado, M., Saraiva, J. (2017). Experimental design, modeling, and optimization of high-pressure-assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel. *Food Bioprocess Technol*, 886–900.

<https://doi.org/10.1007/s11947-017-1867-6>

Altunkaya, A., Hedegaard, R., Brimer, L., Gokmen, V., Skibsted, L. (2013). Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder. *Food Funct.*, 4, 722–727.

<https://doi.org/10.1039/C3FO30296B>

AOAC (1997). Official Methods of Analysis of AOAC International (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

AOAC (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20th ed.). Method 925.10: Moisture in Meat. AOAC International.

Arciniegas Cabrera, V. (2020). *Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua presurizadas*. [Tesis de maestría, Universidad de Burgos].

Ascacio-Valdés, J., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez-Herrera, R., Aguiar-González, C. (2012). Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44 (2).

Borrás Linares, M. (2013). *Uso de técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabólicos de nutraceuticos y matrices vegetales*. [Tesis de doctorado, Universidad de Granada].  
<http://hdl.handle.net/10481/32116>

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Martins, C., Marze, S., McClements, D., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C., Souchon, I., Singh, R., Vegarud, G., Wickham, M., Weitschies, W., Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.*, 14(4), 991-1014.  
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

Buenrostro, J., Sepúlveda, L., Ascacio, L., Aguiar, C., Huerta, S., Prado, A. (2017, junio). *Cáscara de Granada como soporte para la producción de pectinasas*. Póster presentado al XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Jalisco, México.

Bustamante, A., Hinojosa, A., Robert, P., Escalona, V. (2017). Extraction and microencapsulation of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* var. Wonderful) residues. *International Journal of Food Science and Technology*.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.13422>

Cámara de Industrias del Uruguay. (2017). Informe Normativa y legislación vigente para nuevos productos.

<https://www.ciu.com.uy/wp-content/uploads/2022/09/Normativa-y-Legislacion-vigente-para-nuevos-productos.pdf>

Çam, M., Erdogan, F., Aslan, D., Dinc, M. (2013). Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products. *Journal of Food Science*, Vol. 78, Nr. 10.

<https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1111/1750-3841.12258>

Çam, M & Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123, 878–885.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>

Çam, M., İçyer, N., Erdogan, F. (2013). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *Food Science and Technology*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>

Charalampia, D. & Koutelidakis, A. (2017). From pomegranate processing by-products to innovative value added functional ingredients and bio-based products with several applications in food sector. *Bio Accent.*, 3, 1:025.

Colantuono, A., Vitaglione, P., Ferracane, R., Campanella, O., Hamaker, B. (2017). Development and functional characterization of new antioxidant dietary fibers from pomegranate, olive and artichoke by-products. *Food Research International*, 101, 155–164.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.001> Get rights and content

Díaz, E. (2018). *Efecto de tres niveles de temperatura de secado en la concentración de antioxidantes y contenido de polifenoles totales presentes en hojas de guanábana (annona muricata)*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Ucayali]. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3902>

El-Beltagi, H., Eshak, N., Mohamed, H., Bendary, E., Danial, A. (2022). Physical characteristics, mineral content, and antioxidant and antibacterial activities of punica granatum or citrus sinensis peel extracts and their applications to improve cake quality. *Plants*, 11, 1740.

<https://doi.org/10.3390/plants11131740>

El Observador. 2017. Recuperado el 21 de noviembre de 2021. <https://www.elobservador.com.uy/nota/granada-la-fruta-magica-y-curativa-2017124500>

El-Said, M., Haggag, H., Fakhr El-Din, H., Gad, A., Farahat, A. (2014). Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. *Annals of Agricultural Science*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aosas.2014.11.007>

Esquivel, A. & Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en marcha*, Vol. 20-4-2007.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Cientific opinion on the substantiation of health claims related to quercetin and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1647), “cardiovascular system” (ID 1844), “mental state and performance” (ID 1845), and “liver, kidneys” (ID 1846) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, pp. 15. <https://doi:10.2903/j.efsa.2011.2067>.

FAO. 2012. El estado mundial de la agricultura y la alimentación.

FAO. 2017. Estimación de pérdidas y desperdicio de alimentos en Uruguay. Alcance y Causas.

FAO. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progreso en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos.

Fernández, C. & Romero, G. (2021). Actividad antioxidante y polifenoles totales de una bebida funcional a base de zumo y cáscara de *Punica Granatum*. Universidad Nacional del Santa, Perú.

Fernández-Fernández, A., Dumay, E., Lazennec, F., Miguez, I., Heinzen, H., Lema, P., López-Pedemonte, T., Medrano-Fernandez, A. (2021). Antioxidant, anti-diabetic, and antiobesity properties, TC7-Cell cytotoxicity and uptake of *Achyrocline satureioides* (Marcela) conventional and high pressure-assisted extracts. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(4), 893.

<https://doi.org/10.3390/foods10040893>

Fernández-Fernández, A., Iriundo-DeHond, A., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., del Castillo, M. (2019). Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a tannat winemaking by-product. *Eur. Food Res. Technol*, 245, 1539–1551.

<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03252-w>.

Fundación Diabetes Uruguay (FDU), Secretaría Nacional del Deporte (SND), Ministerio de Salud (MSP), Sociedad de Diabetología y Nutrición del Uruguay (SDNU), Sociedad Uruguaya de Endocrinología y Metabolismo (SUEM). (2021). Guía de diabetes para docentes de educación física y guardavidas.

Garay, N. & Villafuerte, E. (2015). *Evaluación de diferentes temperaturas de secado en la concentración de antioxidantes y las características organolépticas de la bebida*

*funcional elaborada a partir de la cáscara de camucamu (myrciaria dubia)*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia]. <http://repositorio.unia.edu.pe/handle/unia/76>

García, P., Fredes, C., Cea, I., Lozano-Sánchez, J., Leyva-Jiménez, F., Robert, P., Vergara, C., Jimenez, P. (2021). Recovery of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel using pressurized liquid extraction. *Foods*, 10, 203. <https://doi.org/10.3390/foods10020203>

García-Viguera, C. & Pérez, A. (2004). La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alimentación Nutrición y Salud*, Vol. 11, N.º 4, 113-120.

Grillo, G., Capaldi, G., Radošević, K., Jakopovic, K., Markov, K., Brncic, M., Gallina, L., Calcio Gaudino, E., Cravotto, G. (2023). Unlocking the bioactive potential of pomegranate peels: a green extraction approach. *Antioxidants*, 12, 1796. <https://doi.org/10.3390/antiox12101796>

Hawaree, N., Chiewchan, N., Devahastin, S. (2009). Effects of drying temperature and surface characteristics of vegetable on the survival of salmonella. *Journal of Food Science*, Vol. 74, Nr. 1. [https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01010.xopen\\_in\\_newISSN](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01010.xopen_in_newISSN)

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2005). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*, 98, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>

Hudson, B. (1982). *Developments in Food Proteins*. Volume 1. London: Elsevier Applied Science.

Ismail, T., Akhtar, S., Riaz, M., Ismail, A. (2014). Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *Int J Food Sci Nutr*, 661–666.

<https://doi.org/10.3109/09637486.2014.908170>

Jones, P., Jew, S. (2007). Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 387-390.

<https://doi:10.1016/j.tifs.2007.03.008>

Kalantari, S., Roufegarinejad, L., Pirsa, S., Gharekhani, M., (2020). Green extraction of bioactive compounds of pomegranate peel using  $\beta$ -Cyclodextrin and ultrasound. *Main Group Chemistry*, 19, 61–80.

<https://doi.org/10.3233/MGC-190821>

Kumar, N., Rokayya, S., Ebtihal, K., Amani, H., Amina, A. (2022). Effects of drying methods and solvent extraction on quantification of major bioactive compounds in pomegranate peel waste using HPLC. *Sci, Rep* 12.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11881-7>

Lansky, E. & Newman, R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177–206.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.*, 96, 254–260.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>

Lotfy, L. & Barakat., E. (2018). Utilization of pomegranate peels flour to improve sponge cake quality. *J. Food and Dairy Sci.*, 91-96.

<https://doi.org/10.21608/jfds.2018.77760>

Magangana, T., Makunga, N., Fawole, O., Opara, U. (2020). Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel waste: a review. *Molecules*, 25, 4690.

<https://doi.org/10.3390/molecules25204690>

Mahadavi, K., Raofie, F. (2016). Application of response surface methodology for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *J Food Sci Technol*, 53(7), 3113-3121.

Maillard, B., Pérez, C., Ponce, A., Schettino, B. (2019). *Caracterización bromatológica y microbiológica de la cáscara de granada (Punica granatum L.) como fuente de ingredientes funcionales* [Archivo pdf].

<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/9/112.pdf>

Marra, F., Petrovicova, B., Canino, F., Maffia, A., Mallamaci, C., Muscolo, A. (2022). Pomegranate wastes are rich in bioactive compounds with potential benefit on human health. *Molecules* 27, 5555.

<https://doi.org/10.3390/molecules27175555>

Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., Cesa, S. (2016). Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry*, 202, 59-69.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.106>

Matissek R., Schnepel F., Steiner G. (1998). *Análisis de los alimentos*. Zaragoza: Ed. Acribia.

Middha, S., Usha, T., Pande, V. (2013). HPLC Evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from Punica granatum fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences*, 6.

<https://doi.org/10.1155/2013/296236>

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., Rizvi, S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *J. of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.020>

Okumus, E. & Bakkalbasi, E. (2021). Determination of the bioaccessibility and antidiabetic properties of pomegranate peels. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 3357-3366.

<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00921-x>

Opción Consultores. (2020). Informe de investigación de hábitos y comportamiento de consumo de alimentos en Uruguay. <https://www.ciu.com.uy/wp-content/uploads/2022/09/Investigacion-de-habitos-y-comportamiento-de-consumo-de-alimentos-en-Uruguay.pdf>

Organización de las Naciones Unidas (ONU). Recuperado el 14 de noviembre de 2021. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (16 de setiembre de 2023). Recuperado el 2 de noviembre de 2024.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Paes, J., Dottaa, R., Barbero, G., Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8-16.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>

Pohanka, M. (2016). Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 160, 54-63.

Pomeranz, Y., & Meloan, C. (1980). *Food Analysis: Theory and practice*. 2a Ed. Westport: Avi Publishing Company Inc.

Reglamento Bromatológico Nacional. (1994). Decreto No. 315/994. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>

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. Biol. Med.*, 26, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Rivas, M., Casquete, R., de Guía, M., Benito, M., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., Martín, A. (2021). Functional properties of extracts and residual dietary fibre from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel obtained with different supercritical fluid conditions. *LWT Food Science and Technology*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111305>

Rocchetti, B., Correa de Souza, M., Pacifico dos Santos, M., Neves, R., da Cunha, D., Martinez, J., Rostagno, M. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics - Sonochemistry*, 48, 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>

Sani, S., Nair, S. (2017). Studies on in vitro evaluation of antidiabetic potentials of watermelon and pomegranate peels. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 101, 32-35.

Santos, M., Souza, M., Sumere, B., da Silva, L., Cunha, D., Bezerra, R., Rostagno, M. (2019). Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.)

with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 54, 11–17.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.021>

Santos, R., Shetty, K., Cecchini, A., da Silva, L. (2012). Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 2, 655-666.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p655>

Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J., Goñi, I., (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Nutr. Food Res.*, 54(7), 939-946.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900276>

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492–501.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>

Šavikin, K., Živković, J., Alimpić, A., Zdunić, G., Janković, T., Duletić- Laušević, S., Menković, N. (2018). Activity guided fractionation of pomegranate extract and its antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative properties. *Industrial Crops & Products*, 113, 142-149.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.031>

Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Ramaswamy, H. (2019). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 342–350.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>

Skapino, E. & Alvarez, R. (2016). Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en funcionarios de una institución bancaria del Uruguay. *Cardiol*, 31, 246-255.

Toledo-Merma, P., Cornejo-Figueroa, M., Crisosto-Fuster, A., Strieder, M., Chañi-Paucar, L., Náthia-Neves, G., Rodríguez-Papuico, H., Rostagno, M., Meireles, M., Alcázar-Alay, S. (2022). Phenolic compounds recovery from pomegranate (*Punica granatum* L.) by-products of pressurized liquid extraction. *Foods*, 11, 1070.

<https://doi.org/10.3390/foods11081070>

Toledo, P. (2020). *Aprovechamiento de los residuos de la Granada (Punica granatum) variedad Wonderful para la obtención de compuestos fenólicos mediante la aplicación de tecnologías limpias*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann].

<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/4120>

Torres, A., Lebed, M., Arcia, P., Curutchet, A., Cozzano, S. (2020). De residuo industrial a ingrediente funcional: el potencial de la cáscara de granada. *INNOTEC*, 19, 76-96.

<https://doi.org/10.12461/19.04>

Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., Pan, Z. (2019). Pomegranate. En Z. Pan, R. Zhang, S. Zicari (Eds.), *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* (181-216). Elsevier.

Ventura, J., Alarcón-Aguilar, F., Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega, M., Boone-Villa, V., Jasso-Villagómez, E., Aguilar, C. (2012). Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136, 109-115.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.039>

Vicencio, V. (2016). *Estudio del proceso de secado en tambor rotatorio doble y el efecto sobre la calidad funcional de la cáscara de frutos de granada (Punica Granatum)*. [Tesis de grado, Universidad Técnica Federico Santa María].

Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 58-64.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>

Villamil, J., Zoppolo, R., Bianchi, D. (2022). Experiencias en los cultivos de granado y avellano en INIA. *INIA - N° 68*.

Viuda-Martos, M., Fernández-Lopez, J., Pérez-Alvarez, J. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635-654.

<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>

Vos, T., Flaxman A., Naghavi M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya K., Salomon J., Abdalla S., Aboyans V., et al. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380 (9859), 2163–96.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)

Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M., Azizi, M. (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica Granatum L.*) peel extracts. *J. Agric. Sci. Technol.*, Vol. 9, 35-42.

Yu, J., Dandekar, D., Toledo, R., Singh, R., Patil, B. (2006). Supercritical Fluid Extraction of Limonoid Glucosides from Grapefruit Molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6041–6045.

<https://doi.org/10.1021/jf060382d>

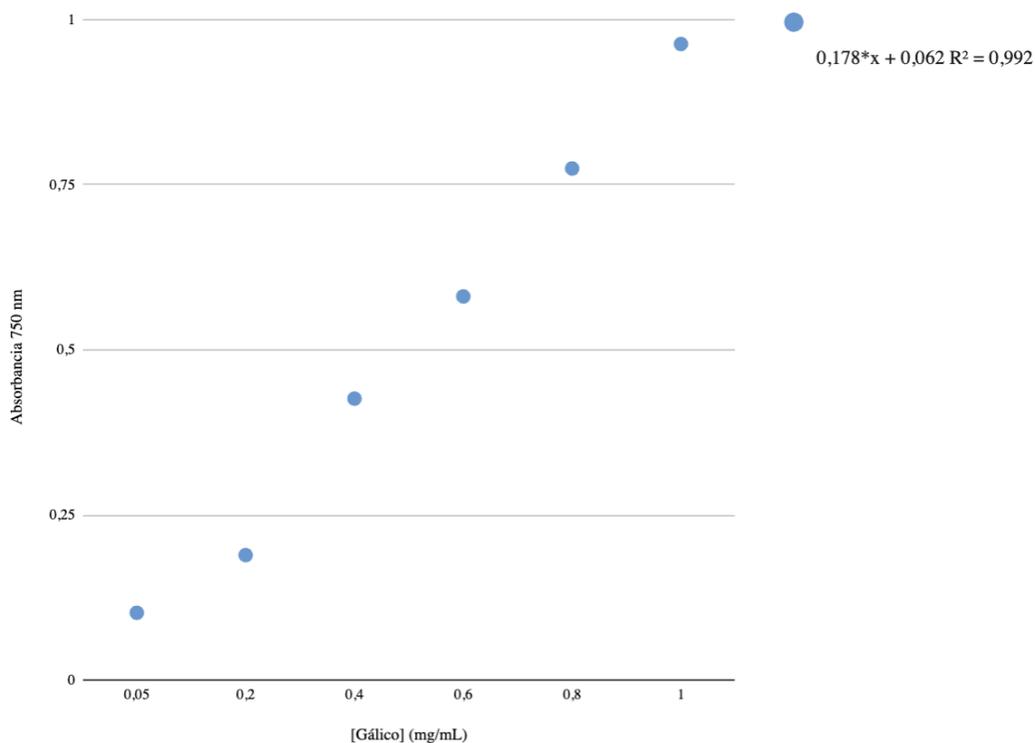
## 7 ANEXOS

Se muestra a continuación, a modo de ejemplo, una curva de calibración para cada uno de los métodos utilizados a lo largo del trabajo, las mediciones realizadas y el cálculo correspondiente para obtener el resultado final.

### 7.1 Anexo 1: Contenido de polifenoles totales: Folin-Ciocalteu

**Figura 12**

*Curva de calibración Absorbancia a 750 nm vs. concentración de ácido gálico (mg/mL)*



Muestra: fracción bioaccesible de mermelada con extracto de macerado

Masa de muestra: 127,1 (repetición 1,2,3 y 4) y 124,3 mg (repetición 5,6,7 y 8)

Dilución: sin dilución

**Tabla 14**

*Contenido de polifenoles totales en la fracción bioaccesible de mermelada con extracto de macerado*

<b>Repetición</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>mg GAE/g muestra</b>	<b>Promedio mg GAE/g muestra</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
1	0,678	5,466			
2	0,71	5,739			
3	0,718	5,807			
4	0,691	5,577			
5	0,725	5,999	5,77	0,26	4,50
6	0,756	6,269			
7	0,677	5,580			
8	0,694	5,728			

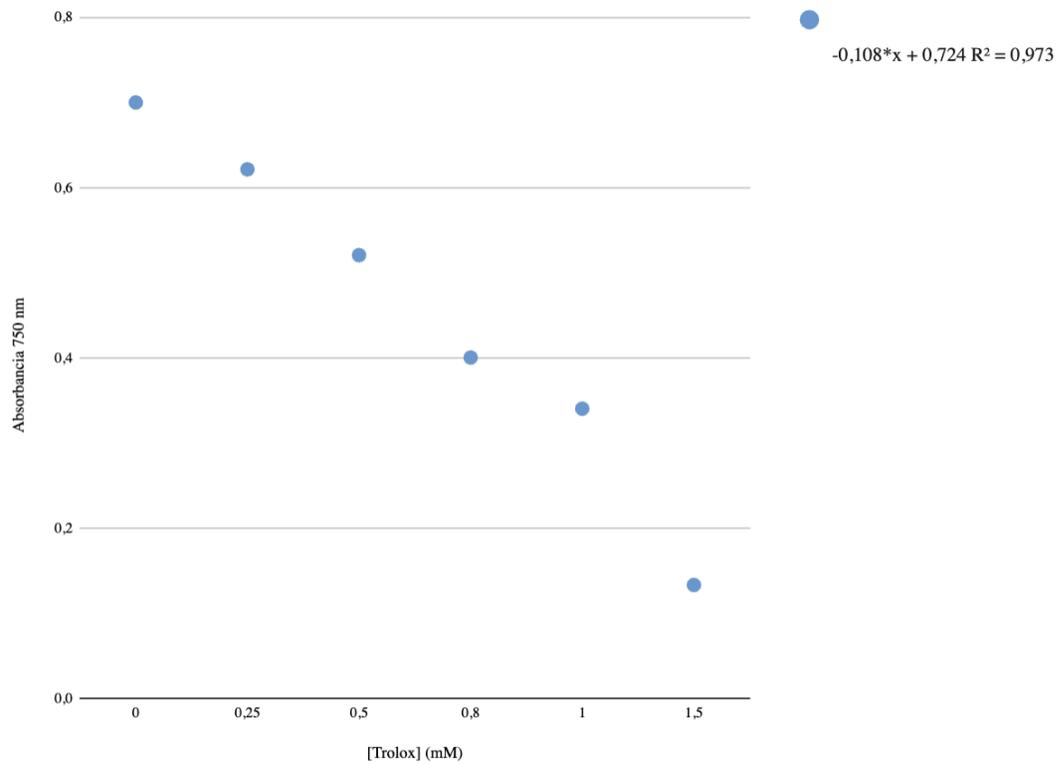
---

$$\text{mg GAE/g muestra} = ((\text{absorbancia} - o.o)/\text{pendiente}) * (\text{dilución}/\text{masa (g)})$$

## 7.2 Anexo 2: Capacidad antioxidante: ABTS

Figura 13

Curva de calibración Absorbancia a 750 nm vs. concentración de trolox (mM)



Muestra: Fracción bioaccesible del extracto PLE 1

Masa de muestra: 25,29 mg (repetición 1,2,3 y 4) y 25,23 mg (repetición 5,6,7 y 8)

Dilución: 1/100

**Tabla 15**

*Capacidad antioxidante medida por ABTS de la fracción bioaccesible del extracto PLE*

1

Repetición	Absorbancia	$\mu\text{mol TE/g}$ muestra	Promedio $\mu\text{mol}$ TE/g muestra	SD	CV
1	0,402	3199,347			
2	0,385	3376,664			
3	0,388	3345,373			
4	0,392	3303,651	3316,40	65,94	1,99
5	0,398	3248,134			
6	0,384	3394,478			
7	0,388	3352,666			
8	0,392	3310,853			

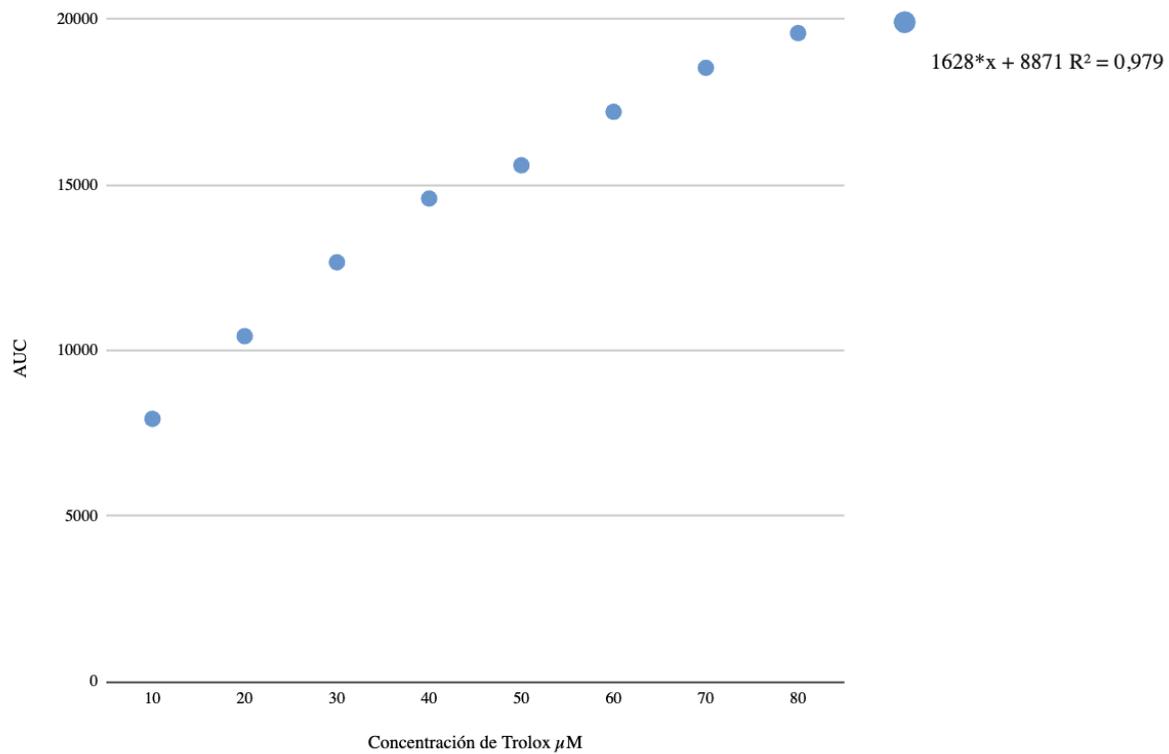
---

$$\mu\text{mol TE/g muestra} = ((\text{absorbancia} - o.o)/\text{pendiente}) * (\text{dilución}/\text{masa}(g))$$

### 7.3 Anexo 3: Capacidad antioxidante: ORAC-FL

Figura 14

Curva de calibración AUC vs. concentración de trolox ( $\mu\text{M}$ )



Muestra: extracto PLE 1, libre de solvente

Masa de muestra: 52,6 mg (repetición 1 y 2) y 51,6 mg (repetición 3 y 4)

Dilución: 1/1000 (repetición 1 y 2) y 1/1500 (repetición 3 y 4)

**Tabla 16***Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL del extracto PLE 1*

<b>Repetición</b>	<b>AUC</b>	<b>μmol TE/g muestra</b>	<b>Promedio μmol TE/g muestra</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
1	14930,00	897,63			
2	13840,00	770,34			
3	11410,00	743,99	806,85	67,32	8,34
4	11810,00	815,42			

$$\mu\text{mol TE/g muestra libre de solvente} = ((\text{absorbancia} - \text{o.o})/\text{pendiente}) * (\text{dilución}/\text{masa (g)})$$

## 7.4 Anexo 4: Capacidad antidiabética: inhibición de la $\alpha$ -Glucosidasa

Figura 15

Curva de calibración: % inhibición vs. concentración (mg/mL)

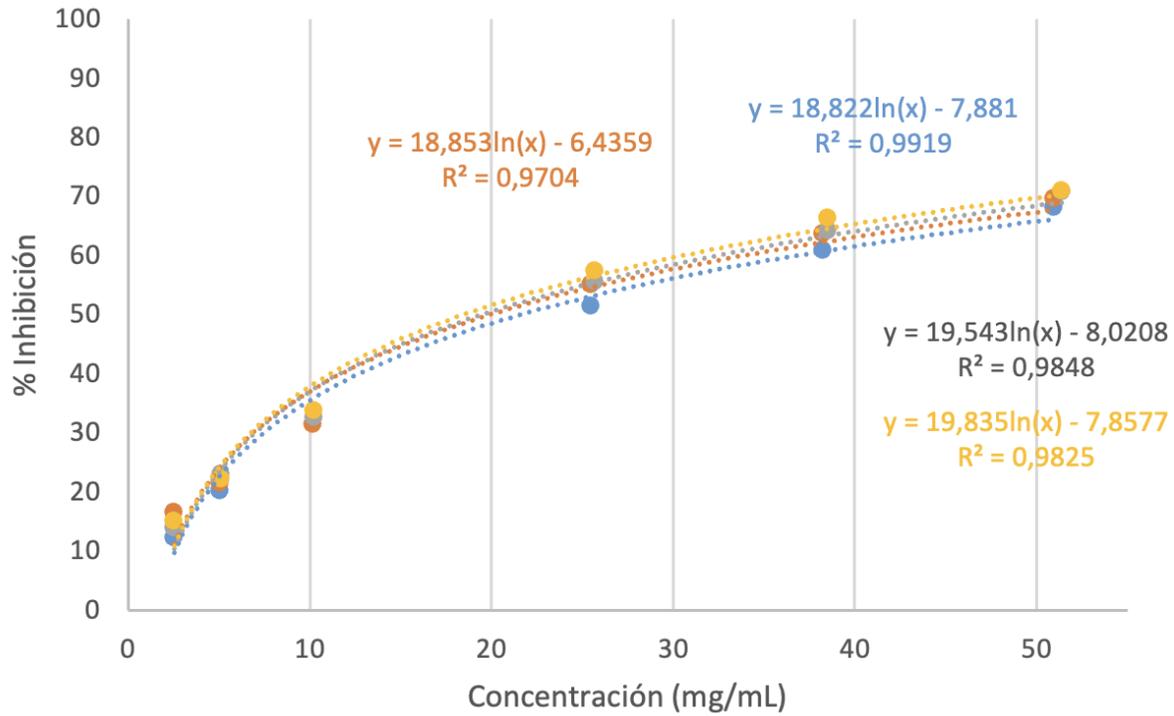


Tabla 17

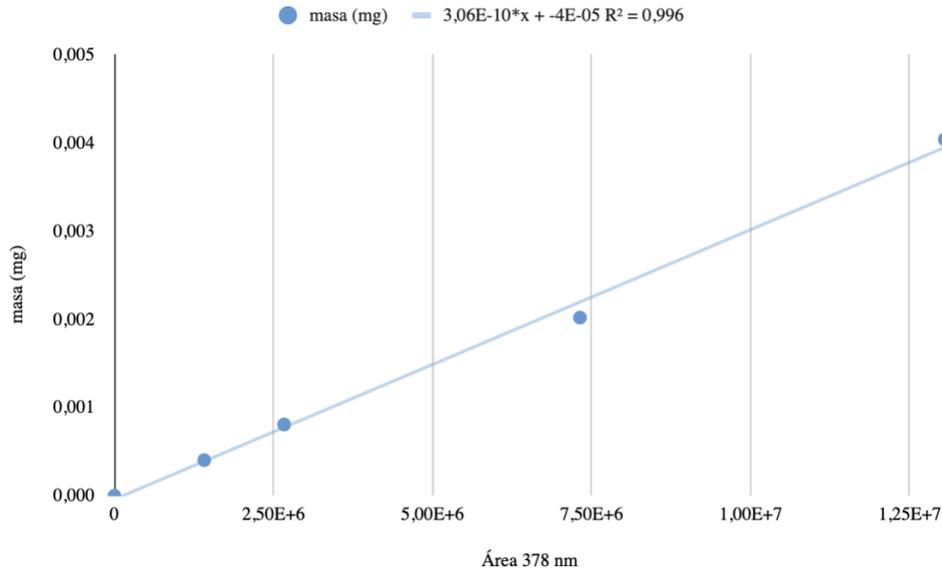
Capacidad antidiabética de la mermelada con extracto PLE 1

IC 50	Promedio mg/mL	SD	CV
21,6537356			
19,9548163			
18,4848197	19,89	1,32	6,66
19,4700791			

## 7.5 Anexo 5: HPLC

**Figura 13**

*Curva de calibración mg quercetina vs. área, a 378 nm*



$\% \text{ de quercetina en la muestra} = (\text{mg de quercetina en el vial} / \text{mg muestra en el vial}) * 100$

$\text{mg de quercetina en el vial} = (\text{v. vial} * \text{mg de quercetina}) / \text{v. inyectado}$

$\text{mg de quercetina} = \text{pendiente} * \text{Área} - o.o$

**Tabla 18**

*Masa de muestra en el vial*

Muestra	masa (mg) corrida 1	masa (mg) corrida 2
Extracto PLE 1	9,1	10,8
Extracto PLE 2	9,8	10,1
Extracto PLE 3	10,4	9,8
Extracto PLE 4	10,0	10,4

Extracto macerado en  
etanol 75% etanol/agua v/v

9,7

10,9

**Tabla 19**

*HPLC del extracto PLE 1 (100 % etanol, 120 °C): tiempos de retención, área de pico, contenido del compuesto en la muestra y porcentaje del compuesto en el total de compuestos identificados*

Compuesto	tr (min) corrida 1	Área corrida 1	mg quercetina/ 100 g muestra c1	% corrida 1	tr (min) corrida 2	Área corrida 2	mg quercetina/ 100 g muestra c2	% corrida 2
Derivados de punicalagina	-	-	-	-	5,2	12.533	5,7	0,3
Derivados de punicalagina	5,5	237.689	107,3	7,5	5,5	55.982	25,3	1,4
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivados de punicalagina	-	-	-	-	-	-	-	-
Punicalagina A	7,7	516.121	233,0	16,3	7,7	211.126	95,3	5,2
Punicalagina B	13,0	1.434.594	647,7	45,4	13,0	1.083.067	489,0	26,4
Derivados de ácido elágico	21,2	182.619	82,4	5,8	21,1	109.249	49,3	2,7
Derivados de ácido elágico	23,1	17.799	8,0	0,6	23,1	12.704	5,7	0,3
Derivados de ácido elágico	23,4	18.489	8,3	0,6	23,3	13.636	6,2	0,3
Ácido elágico	24,1	754.800	340,8	23,9	24,0	537.370	242,6	13,1

**Tabla 20**

*HPLC del extracto PLE 1 (100 % etanol, 120 °C): promedio final de compuestos fenólicos*

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Contenido promedio (%)	SD	CV
Área Total	3.162.111	4.095.667			
C (mg/mL)	6,07	7,20			
Viny (mL)	10	10	1,64	0,10	6,18
Masa iny. (mg)	0,061	0,072			
Contenido (%)	1,57	1,71			

**Tabla 21**

*HPLC del extracto PLE 2 (75 % etanol/agua v/v, 120 °C): tiempos de retención, área de pico, contenido del compuesto en la muestra y porcentaje del compuesto en el total de compuestos identificados*

Compuesto	tr (min) corrida 1	Área corrida 1	mg quercetina / 100 g muestra c1	% corrida 1	tr (min) corrida 2	Área corrida 2	mg quercetina / 100 g muestra c2	% corrida 2
Derivados de punicalagina	-	-	-	-	5,3	107.921	48,7	2,4
Derivados de punicalagina	5,5	741.856	334,9	15,6	5,5	307.045	138,6	6,9
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-	-	-

Derivados de punicalagina	-	-	-	-	-	-	-	-
Punicalagina A	7,7	932.386	421,0	19,6	7,7	592.869	267,7	13,2
Punicalagina B	13,0	2.030.272	916,7	42,7	13,0	2.276.018	1027,6	50,8
Derivados de ácido elágico	21,1	214.592	96,9	4,5	21,1	250.236	113,0	5,6
Derivados de ácido elágico	23,1	19.705	8,9	0,4	23,1	21.133	9,5	0,5
Derivados de ácido elágico	23,4	18.176	8,2	0,4	23,3	19.449	8,8	0,4
Ácido elágico	24,1	800.175	361,3	16,8	24,0	907.020	409,5	20,2

**Tabla 22**

*HPLC del extracto PLE 2 (75 % etanol/agua v/v, 120 °C): promedio final de compuestos fenólicos*

<b>Parámetro</b>	<b>Corrida 1</b>	<b>Corrida 2</b>	<b>Contenido promedio (%)</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
Área total	4.757.162	4.481.691			
C (mg/mL)	6,53	6,73			
Viny (mL)	10	10	2,10	0,13	6,35
Masa iny. (mg)	0,065	0,067			
Contenido (%)	2,19	2,00			

**Tabla 23**

*HPLC del extracto PLE 3 (100 % etanol, 100 °C): tiempos de retención, área de pico, contenido del compuesto en la muestra y porcentaje del compuesto en el total de compuestos identificados*

Compuesto	tr (min) corrida 1	Área corrida 1	mg quercetina / 100 g muestra c1	% corrida 1	tr (min) corrida 2	Área corrida 2	mg quercetina / 100 g muestra c2	% corrida 2
Derivados de punicalagina	5,2	80.113	36,2	2,5	5,3	40.710	18,4	1,4
Derivados de punicalagina	5,5	136.324	61,5	4,2	5,5	56.056	25,3	1,9
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivados de punicalagina	-	-	-	-	-	-	-	-
Punicalagina A	7,7	728.893	329,1	22,4	7,7	408.430	184,4	13,8
Punicalagina B	13,0	1.476.395	666,6	45,5	13,0	1.560.128	704,4	52,9
Derivados de ácido elágico	21,2	132.427	59,8	4,1	21,1	139.470	63,0	4,7
Derivados de ácido elágico	23,1	20.630	9,3	0,6	23,1	20.167	9,1	0,7
Derivados de ácido elágico	23,4	27.809	12,6	0,9	23,3	27.761	12,5	0,9
Ácido elágico	24,1	645.045	291,2	19,9	24,0	698.573	315,4	23,7

**Tabla 24**

*HPLC del extracto PLE 3 (100 % etanol, 100 °C): promedio final de compuestos fenólicos*

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Contenido promedio (%)	SD	CV
Área Total	3.247.636	2.951.295			
C (mg/mL)	6,93	6,53			
Viny (mL)	10	10	1,38	0,04	2,56
Masa iny. (mg)	0,069	0,065			
Contenido (%)	1,41	1,36			

**Tabla 25**

*HPLC del extracto PLE 4 (75 % etanol/agua v/v, 100 °C): tiempos de retención, área de pico, contenido del compuesto en la muestra y porcentaje del compuesto en el total de compuestos identificados*

Compuesto	tr (min) corrida 1	Área corrida 1	mg quercetina / 100 g muestra c1	% corrida 1	tr (min) corrida 2	Área corrida 2	mg quercetina / 100 g muestra c2	% corrida 2
Derivados de punicalagina	-	-	-	-	5,3	95.294	43,0	2,3
Derivados de punicalagina	5,5	491.105	221,7	10,4	5,5	146.369	66,1	3,5
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivados de punicalagina	6,6	66.080	29,8	1,4	6,6	-	-	-
Punicalagina A	7,7	1.260.272	569,0	26,8	7,7	753.563	340,2	17,9

Punicalagina B	13,1	2.247.930	1014,9	47,7	13,0	2.548.919	1150,8	60,5
Derivados de ácido elágico	21,2	114.373	51,6	2,4	21,1	130.525	58,9	3,1
Derivados de ácido elágico	23,1	15.906	7,2	0,3	-	-	-	-
Derivados de ácido elágico	23,4	21.727	9,8	0,5	-	-	-	-
Ácido elágico	24,1	492.991	222,59	10,5	24,0	540.894	244,2	12,8

**Tabla 26**

*HPLC del extracto PLE 4 (75 % etanol/agua v/v, 100 °C): promedio final de compuestos fenólicos*

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Contenido promedio (%)	SD	CV
Área total	4.710.384	4.215.564			
C (mg/mL)	6,67	6,93			
Viny (mL)	10	10	1,98	0,21	10,60
Masa iny. (mg)	0,067	0,069			
Contenido (%)	2,13	1,83			

**Tabla 27**

*HPLC del extracto macerado: tiempos de retención, área de pico, contenido del compuesto en la muestra y porcentaje del compuesto en el total de compuestos identificados*

Compuesto	tr (min) corrida 1	Área corrida 1	mg quercetina / 100 g muestra c1	% corrida 1	tr (min) corrida 2	Área corrida 2	mg quercetina / 100 g muestra c2	% corrida 2
Derivados de punicalagina	5,3	554.403	250,3	10,0	5,3	759.194	342,8	12,3
Derivados de punicalagina	5,5	-	-	-	5,5	-	-	0,0
Ácido gálico		-	-	-	-	-	-	0,0
Derivados de punicalagina	6,6	71.222	32,2	1,3	6,6	252.962	114,2	4,1
Punicalagina A	7,7	2.149.950	970,7	38,9	7,7	2.185.244	986,6	35,4
Punicalagina B	13,0	2.187.505	987,7	39,6	13,1	2.247.803	1014,9	36,4
Derivados de ácido elágico	21,1	81.947	37,0	1,5	21,1	130.523	58,9	2,1
Derivados de ácido elágico	23,1	27.574	12,4	0,5	23,1	14.639	6,6	0,2
Derivados de ácido elágico	23,4	42.899	19,4	0,8	23,4	65.068	29,4	1,1
Ácido elágico	24,0	415.042	187,4	7,5	24,0	524.856	236,9	8,5

**Tabla 28***HPLC del extracto macerado: promedio final de compuestos fenólicos*

<b>Parámetro</b>	<b>Corrida 1</b>	<b>Corrida 2</b>	<b>Contenido promedio (%)</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
Área total	5.530.542	6.180.289			
C (mg/mL)	8,33	9,00			
Viny (mL)	10	10	2,57	0,01	0,39
Masa iny. (mg)	0,083	0,090			
Contenido (%)	2,57	2,56			