

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO Y DE LOS EXTRACTOS
HIDROALCOHÓLICO Y ACUOSO OBTENIDOS DE *Punica granatum* Y SU
RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE POLIFENOLES**

**Antioxidant capacity of the juice and hydroalcoholic and aqueous extracts obtained
from *Punica granatum* and its relation to the polyphenol content**

Juan Arbayza Fructuoso^{1*}, Segundo Ruiz Reyes¹, Edmundo Venegas Casanova¹, David Ruidias Romero¹, Kevin Cosavalente Burgos²

Recibido: 15 de junio 2014; Aceptado: 02 de diciembre 2014

RESUMEN

Objetivo: Determinar la relación existente entre la capacidad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles totales en zumo y extractos acuoso e hidroalcohólico de la cáscara del fruto de *Punica granatum*, adquiridos en Shirán-Trujillo. **Material y Métodos:** Para medir la capacidad antioxidante se utilizó el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]), cuyas lecturas espectrofotométricas se realizaron a 517 nm. Los resultados de polifenoles fueron expresados en mg de ácido tánico equivalente en 100 mL del zumo y de extractos acuoso e hidroalcohólico de cáscara del fruto de *P. granatum*. **Resultados:** El porcentaje de captura de radicales libres de DPPH[•] del zumo y de los extractos acuoso e hidroalcohólico fueron 25.6, 59.7, 43.2 y 84.4% respectivamente. El porcentaje de polifenoles del zumo y de los extractos acuoso e hidroalcohólico fueron: 25.4, 21.5, 19.7 y 23.6% respectivamente. **Conclusión:** La capacidad antioxidante en el extracto hidroalcohólico de la cáscara de *P. granatum* fue mayor que en las otras muestras, pero el contenido de polifenoles fue mayor en el zumo, encontrando que no hay correlación entre los valores de la capacidad antioxidante y el contenido en polifenoles totales.

Palabras Clave: *Punica granatum* (granada), capacidad antioxidante, zumo, extracto acuoso, extracto hidroalcohólico, DPPH[•].

ABSTRACT

Objective: To determine the relationship between antioxidant capacity and total polyphenol content of juice fruit, aqueous and hydroalcoholic extracts from *Punica granatum* peel, acquired in Shiran-Trujillo. **Material and Methods:** To measure the antioxidant capacity 2,2-diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH[•]) was used, whose spectrophotometric readings were performed at 517 nm. Polyphenols results were expressed in mg equivalent of tannic acid in 100 mL of juice fruit, aqueous and hydroalcoholic extracts of peel from *P. granatum*. **Results:** The rate of capture of free radicals of DPPH[•] juice, aqueous and hydroalcoholic extracts were 25.6, 59.7, 43.2 and 84.4% respectively. The percentage of polyphenols in juice, aqueous and hydroalcoholic extracts were 25.4, 21.5, 19.7 and 23.6% respectively. **Conclusion:** The antioxidant capacity of the hydroalcoholic extract from peel of *P. granatum* was higher than in the other samples, but the polyphenol content was higher in the juice, finding that not a correlation between the values of the antioxidant activity and the total polyphenol content.

Keywords: *Punica granatum* (pomegranate), antioxidant capacity, juice, aqueous extract, hydroalcoholic extract, DPPH[•].

¹ Departamento de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

² Alumno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

*Autor para correspondencia: juanarfru@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que los radicales libres causan daño en las células a través de diversos mecanismos como por ejemplo, la unión covalente y la peroxidación lipídica con el consiguiente daño a los tejidos¹. Los antioxidantes de origen natural tienen un inusual interés en la actualidad porque ellos protegen al organismo de los radicales libres^{2,3}.

Nuestro organismo produce radicales libres constantemente. Sin embargo, éstos están controlados rigurosamente por los antioxidantes y diversos sistemas de detoxificación. Cuando este precario equilibrio se rompe a favor de los radicales libres, se produce el denominado “estrés oxidativo”, el cual puede atacar a los lípidos, que constituyen las membranas celulares, las bases de ADN y los aminoácidos de proteínas. Los antioxidantes combaten los radicales libres y, por lo tanto, pueden ayudar a prevenir las enfermedades que sustentan su base fisiopatológica en la producción interna de radicales libres. En la actualidad se ha notado el mayor interés por el estudio de antioxidantes naturales^{4,5}.

Los vegetales producen una gran cantidad de antioxidantes para controlar el estrés oxidativo, pueden constituir una fuente de nuevos compuestos con actividad antioxidante. Dentro de este grupo de sustancias se tiene vitaminas, minerales y enzimas⁶. Entre las vitaminas antioxidantes naturales están los carotenos (pro vitamina A), la familia de compuestos de vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y la vitamina C o ácido ascórbico. Asimismo, existen cuatro enzimas que neutralizan naturalmente los radicales libres presentes en el organismo y son la superóxido dismutasa, metionina reductasa, catalasa y la glutatión peroxidasa; y también otros elementos como metaloenzimas (minerales), por ejemplo el selenio (parte de la glutatión peroxidasa), el cobre (parte del superóxido dismutasa) y el zinc que cumple funciones similares^{3,7}.

Asimismo, se han identificado un numeroso grupo de antioxidantes en plantas como polifenoles, que tiene un creciente

interés. Las clases de polifenoles dependen de la naturaleza de su esqueleto de carbono y entre las más conocidas están: ácidos fenólicos, flavonoides, flavonoles (catequinas, quercetina), los estilbenos (resveratrol) lignanos, taninos, etc. Entre las fuentes principales que poseen este tipo de antioxidantes están por ejemplo las frutas, las verduras y el vino⁵.

Los antioxidantes provenientes de estas fuentes además de disminuir el estrés oxidativo pueden poseer actividad antiinflamatoria, antitrombótica, antiteratogénica y antialérgica, entre otras⁸.

Por esta razón, existe un gran interés en conocer el efecto antioxidante de la dieta humana y de los suplementos dietarios; muchos estudios epidemiológicos han asociado a las dietas de contenido moderado a alto de antioxidantes en frutas y verduras con el descenso de la morbimortalidad y menor riesgo en desarrollar enfermedades; dentro de estos grupo de frutos están la granada, nativa del sureste de Europa y Asia, fueron cultivadas en el antiguo Egipto, Babilonia, India e Irán; en España se cultivaba intensamente^{9,10,11}.

En nuestro país la granada se utiliza como árbol frutal y además como ornamental en pequeños jardines; pero también en medicina complementaria en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades como diarrea, gastroenteritis, colitis, gingivitis, amigdalitis faringitis así como por su acción vermífuga tomada en forma de infusión. Contiene alcaloides como la pelletierina, taninos glucósidos de acción astringente, bromuros, ácido cítrico, málico, flavonoides, polifenoles, potasio, magnesio^{13,14}.

Los taninos son, al menos en parte, responsables de una fuerte actividad antioxidante. También es conocido que los taninos tienen propiedades antiinflamatorias, antidiarreicas y cicatrizante de heridas, además, han demostrado actuar inhibiendo algunas funciones enzimáticas específicas^{8,15}. Las propiedades antiinflamatorias de los taninos son principalmente debido a su actividad destructora de radicales libres, por lo que pueden parar algunos de los procesos antiinflamatorios^{12,16,17}. Por otro lado, esta

planta también posee flavonoides y éstos poseen una fuerte actividad destructora de radicales libres^{18, 19}.

Con este estudio, se pretende validar la capacidad antioxidante y su relación con el contenido de polifenoles totales en el zumo y extractos acuoso e hidroalcohólico de la cáscara de la granada, lo que serviría para recomendar su utilización en la prevención de enfermedades degenerativas y así mejorar la calidad de vida de la población de nuestra región y del país.

MATERIAL Y MÉTODO

Material de estudio:

Se utilizaron 5 kg de frutos de granada que se adquirieron en Shirán- Trujillo de los cuales se usó el zumo, y las cáscaras para preparar los extractos acuosos (infuso y decocto) e hidroalcohólico.

Material y equipos de laboratorio:

- **Material de laboratorio:** De uso común en el laboratorio de Farmacognosia.
- **Equipos:** Espectrofotómetro Thermo, modelo Genesis 10 UV, y espectrofotómetro Hewlett Packard de arreglo de diodos modelo 8452 a 517nm, y de uso común en el laboratorio de Farmacognosia.
- **Reactivos y solventes:** 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH[·]) laboratorios Sigma-Aldrich, alcohol etílico 96°GL, agua bidestilada, ácido tánico patrón (laboratorios Sigma-Aldrich), Reactivo Folin-Ciocalteu (Laboratorios Merck).

Diseño Experimental:

• Preparación del decocto al 2%:

Se pesaron 2g de droga vegetal seca y se llevó a ebullición con 100 ml de agua destilada. El extracto obtenido se filtró empleando papel filtro Whatman 1, se trasvasó a un matraz aforado y se finalmente se completó a 100 ml utilizando agua destilada.

• **Preparación del infuso al 2%:** Se pesaron 2g de droga vegetal seca y se vertieron sobre ella 100 ml de agua destilada hirviendo. El extracto obtenido se dejó en reposo por 15 min. y luego se filtró empleando papel filtro Whatman, se trasvasó a un matraz aforado y finalmente se completó a 100 ml utilizando agua destilada.

• **Preparación de extracto hidroalcohólico 2%:** Se pesaron 2g de droga vegetal seca y se llevó a ebullición en sistema de reflujo con 100 ml de etanol de 96°GL. El extracto obtenido se filtró empleando papel filtro Whatman 1, se trasvasó a un matraz aforado y finalmente se completó a 100 ml etanol de 96°GL.

• **Obtención del zumo:** Se pesaron 200 g de semillas de *P.granatum* obteniendo de ellas el zumo mediante proceso de expresión. Del zumo obtenido se midió el volumen equivalente a 2g de droga, se trasvasó a un matraz aforado y finalmente se completó a 100 ml con agua destilada.

• **Capacidad antioxidante:** La capacidad antioxidante se determinó según la propuesta de Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. 1995. Basado en la reducción del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[·])²⁰, La reducción del reactivo es seguido midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométrica a 517 nm, de la mezcla de reacción según la técnica modificada²¹.

Las condiciones óptimas de la reacción de radicales libres para el sistema fueron las siguientes: Para obtener la curva de calibración se preparó una solución madre del reactivo DPPH[·] 0,1 mM, a partir del cual se realizaron diluciones y luego las lecturas en el espectrofotómetro Hewlett Packard de arreglo de diodos modelo 8452 a 517nm.

• **Determinación de los porcentajes de captura del radical DPPH[·]:** Se trabajó con un control 10 mL de la solución de DPPH[·] 0,1 mM y se leyó a 517 nm.

Para las muestras se usaron alícuotas de 10 µL de las muestras y se enfrentaron a la solución de DPPH· 0,1mM y se leyó a 517 nm.

La captura de radicales libres de DPPH· se calculó con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de captura de radicales libres de DPPH}^{\bullet} = \left(\frac{\text{Abs. Control} - \text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}} \right)$$

- **Cuantificación de polifenoles totales (PT):** La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu²². Permitiendo clasificar al zumo y los diferentes extractos en función de su riqueza fenólica. Se utilizó como referencia una solución patrón de ácido tánico de 1,2 mg/mL.
- **Análisis estadístico:** Todos los datos fueron procesados mediante paquete estadístico SPSS.15.0 para Windows, con p<0,05 tanto para la determinación de la media y su desviación estándar como para ANOVA.

RESULTADOS

Se midió la capacidad antioxidante del zumo, extractos acuosos (decocto e infuso) e hidroalcohólico de *P. granatum*, que expresa la captura de radicales libres DPPH· en porcentaje (Tabla 1), el Análisis de varianza muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas p<0,05, entre los promedios de las muestras, siendo más notorio el extracto hidroalcohólico.

También se determinó el porcentaje del contenido de polifenoles expresados como ácido tánico en las muestras anteriores (Tabla 2), su Análisis de varianza mostró que existe diferencias estadísticamente significativas p<0,05 entre los promedios de las muestras. Sin embargo, no hay una correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad

antioxidante entre los extractos hidroalcohólico y acuosos.

Tabla 1. Promedio de las concentraciones y del porcentaje de captura de radicales libres DPPH· por el zumo, extractos hidroalcohólico y acuosos (decocto e infuso) de *Punica granatum*

Muestra	Cc (µg/mL)	% captura de Radicales libres
Patrón	0.1072	0.0
Zumo	0.0293	25.6
Extracto Hidroalcohólico	0.0909	84.4
Decocto al 2%	0.0651	59.7
Infuso al 2%	0.0477	43.2

Leyenda: **Patrón:** Solución 0,1mM de 2,2-difenil-1-picirilhidraczil (DPPH·)
Nivel de significancia estadística p < 0 05.

Tabla 2. Promedios de la concentración de ácido tánico y del porcentaje de polifenoles del zumo, extractos hidroalcohólico y acuosos (decocto e infuso) de *Punica granatum*

Muestras	Conc. Tánico (mg)	Ác. % de polifenoles
Zumo	0.006086441	25.4
Extracto Hidroalcohólico	0.005658982	23.6
Decocto al 2%	0.005154349	21.5
Infuso al 2%	0.004727029	19.7

Nivel de significancia estadística p < 0 05.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que el extracto hidroalcohólico de la cáscara de granada tiene mayor capacidad antioxidante 84,4 % (Tabla 1) que los extractos acuosos (decocto e infuso) y que el zumo de este fruto, estas diferencias en los porcentajes de captura de radicales libres de DPPH· son estadísticamente significativas p<0,05.

La cáscara de la granada es muy rica en elagitaninos y galataninos, taninos hidrolizables como punicalagina y punicalina a quienes se podría atribuir la capacidad antioxidante. Además, la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico no

sólo se debería a la presencia de polifenoles sino, también a la presencia de otros antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido cítrico, etc. presentes en este fruto^{23, 24, 25}.

Si hubiera una relación directa entre el contenido de polifenoles expresado como ácido tánico y la capacidad antioxidante, se tendría un mayor porcentaje de éstos en el extracto hidroalcohólico, pero se observa en la Tabla 2, que el mayor porcentaje 25,4% de polifenoles se presenta en el zumo de granada mientras que en el extracto hidroalcohólico se muestra 23,6%. Por la mayor polaridad del solvente hidroalcohólico, respecto a las otras muestras el porcentaje debería ser mayor, porque debería haberse extraído mayor cantidad de polifenoles de la cáscara de granada. Es probable, que parte de los polifenoles en el extracto hidroalcohólico y algunos compuestos antioxidantes derivados de grupos fenólicos puedan haberse degradado o transformado en otros compuestos durante la congelación a que fueron sometidos las muestras antes de su cuantificación; otros pueden haberse hidrolizados como es el caso de la punicalagina y punicalina y no hayan sido cuantificados^{23, 24}.

Se encontraron 25,4% de polifenoles como taninos en el jugo de granada congelado, obtenido de los arilos frescos, mayor que en las otras muestras, téngase en cuenta que los principales compuestos antioxidantes en el jugo de granada son los taninos hidrolizables, pero las antocianinas y ácido elágico y ácido derivados también contribuyen a la capacidad antioxidante total del jugo. Estos resultados aparentemente contradictorios en el que no existiría una relación directa entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante en este caso de zumos y extractos podrían deberse quizá a que las muestras fueron cuantificadas después de haberse conservado en refrigeración, y esto podría haber alterado el contenido de polifenoles por su probable hidrólisis o su transformación en otros compuestos⁷. En el caso del zumo también influye el procedimiento de obtención, si fueron obtenidos por extrusión de los arilos de la granada, puede haberse extraído parte

de los polifenoles (elagitaninos) de la cáscara. También debe tenerse en cuenta que el método DPPH^{*} para medir la capacidad antioxidante en compuestos hidrofílicos es menos sensible⁷.

CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de la cáscara de *P. granatum* es el que presenta mayor capacidad antioxidante.

El zumo del fruto de *P. granatum* presenta mayor contenido de polifenoles que los extractos acuosos e hidroalcohólico de la cáscara de granada.

No hay correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante.

Conflicto de interés

No existen conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brittin J, Glende E, and Richard O. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. 1985; 1:27-38 in Babu B.H., Shylesh B.S., Padikkala J. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. Phytotherapy. 2001; 72: 272-77.
2. Osawa T, Kavakishi S, Namiki M. In Kuroda Y, Shankal DM, Waters M, editors. Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II. New York: Plenum. 1990; 139-153.
3. Aviram M. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr. 2000; 71, 1062-76.
4. Talla O, Villegas L, Fernández I. Efecto hipoglicémico del extracto acuoso de *Geranium ayavacense* en ratas tratadas con estreptozotocina. en Fito 2000, primer Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia 27-30 setiembre. 2000. Lima- Perú
5. Mirmiran P, Fazeli R, Asghari G, Shafiee A, Azizi F. Effect of

- pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*. 2010; 104(3): 402-406.
6. Aviram M. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 2001; 158: 195-98.
 7. Gil I, Francisco A. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 4581-4589.
 8. Barry H. Antioxidant effects a basis for drug selection. *Drugs*. 1 991; 42: 569-573.
 9. ICEX-2010. Estadísticas de comercio exterior. España. Fecha acceso: 01.10.14. Disponible en: <http://datacomex.comercio.es>
 10. MMARM, Anuario estadístico agroalimentario. Madrid. 2009. Fecha acceso. 12.09-14. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2012/ae_2012_completo.pdf
 11. Quiroz I., Granado perspectiva y oportunidades de un negocio emergente: antecedentes de mercado. Fundación Chile. 2009.
 12. Halliwell B. Radicales libres, antioxidantes y enfermedad humana: ¿Curiosidad, causa o consecuencia? *The Lancet*. 1994; 344: 721-724
 13. García-Viguera C., Pérez-Vicente A. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alim. Ni. Salud*. 2004; Vol. 11, N.4: 113-120.
 14. Larrosa M. Antiinflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010; 21 (8): 717-725.
 15. Wade L. Química Orgánica. segunda Edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México D.F. 1993; 135.
 16. Zúñiga L. Situación actual de la conservación y cultivo de plantas medicinales en el Perú en Fito. 2001. Primer curso nacional de plantas medicinales y fitoterapia 6-12 de agosto 2001. Lima-Perú
 17. Yokozawa T. Comparative protection against oxyradicals by tree flavonoides on cultured endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 1 998; 56: 213.
 18. Hirano R. Antioxidant ability of various flavonoides against DPPH radicals and LDL oxidation. Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. *J Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. 2 001; 47: 357-362.
 19. Sánchez C. Free radical scavenging capacity of selected red rosé and white wines. *J. Science of Food and Agriculture*. 1999; 79: 1301-1304.
 20. Brand-Williams W., Cuvelier M.E, and Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss , Technology*. 1995; 28: 25-30.
 21. Sandoval M, Okuhama N, Angles M, *et al.* Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 2002; 79: 207 – 213.
 22. Sotelo I, Casas N, Camelo G. Borojón: source of polyphenols with antimicrobial activity. *Vitae, Set/Dec.* 2010; 17(3):329-336.
 23. Mayer W. Punicalagin und punicalin, zwei gerbstoffe aus den schalen der granatapfel Liebigs. *Ann. Chem.* 1977; 1976-1986.
 24. Tanaka T. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of Punicalin and Punicalagin, and isolation and characterization of 2-Galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum L.* *Chem. Pharm. Bull.* 1986; 34: 650-655.
 25. El-Nemr S. E, Ismail I and Ragab M. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Nahrung*, (1990) 34(7): 601–606.
doi: 10.1002/food.19900340706