



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ESTUDIO DEL EFECTO
FOTOQUIMIOPROTECTOR DE DIFERENTES
EXTRACTOS DE SEMILLA Y CÁSCARA DE
Punica granatum L. (granada).**

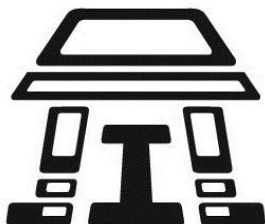
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CRISTINA ESÁSTIGA MANTEROLA



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi mamá por su amor incondicional, por apoyarme todos los días de mi vida, por ayudarme a salir adelante. No existe un amor más fuerte que el tuyo. Te amo Mamá.

A mi papá por todo el apoyo así por todas sus anécdotas, enseñanzas y cariño.

A mis hermanos por todo lo vivido de pequeños así como su ejemplo el cual me ha inspirado a ser una mejor persona y a creer que todo es posible.

A mi familia por brindarme una hermosa vida, por todo el apoyo incondicional y por tanto amor. Sin ustedes no lo hubiera logrado. Los amo.

A la Dra Ana Maria Garcia Bares por ayudarme tanto lo largo de este trabajo, por ayudarme a encontrarme a mi misma y por darnos tanto de su alma en todo momento.

Al Dr. Guillermo Avila Acevedo por enseñarme a confiar en mí así como por compartir con todos el mundo su pasión por la vida.

Al Maestro en C. Andrés Martínez Cortés por haberme mostrado la filosofía que podemos aprender de la ciencia.

A la Señora Bety por todo el apoyo así como por compartir su ser con todos.

A los miembros del laboratorio de Fitoquímica, el cual fue como mi segunda casa, por todas las experiencias compartidas así como el apoyo en momentos buenos y malos en especial a Fany, Alma, Miguel, Marisol, Monse, Frick, Sebas, Caro, Alfonso, Ari, Caro Montes y Zule.

A todos mis compañeros del 51 por todas las aventuras compartidas, en especial a Majo, Nancy, Jorch, Ale, Juan y Yadira.

A la Biología y al Universo por todo lo que nos enseña diariamente.

Índice general

	Página
Índice general.....	I
Índice de figuras y tablas.....	II
Lista de abreviaturas.....	III

	Pág.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	8
Pregunta científica.....	8
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	9
Materiales y métodos.....	10
Resultados y Discusión.....	16
Conclusiones.....	30
Bibliografía.....	31
Anexos.....	36

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Árbol y fruto de la granada (<i>P. granatum</i>).....	7
Figura 2. Evaluación de la actividad fotoprotectora con un modelo bacteriano.....	12
Figura 3. Reacción de identificación de fenoles con FeCl ₃	13
Figura 4. Muerte exponencial de <i>E. coli</i> por radiación UVB.....	19
Figura 5. Cinética de muerte de <i>E. coli</i> ante la radiación UVB con el control negativo metanol agua.....	21
Figura 6. Fotoprotección del extracto Metanol-Agua Cáscara Fresca (MACF) de <i>P. granatum</i> a la radiación UVB en la supervivencia de <i>E. coli</i>	21
Figura 7. Cinética de muerte de <i>E. coli</i> ante la radiación UVB con el control negativo Diclorometano.....	23
Figura 8. Fotoprotección del extracto Diclorometano Semila Seca (DSS) de <i>P. granatum</i> a la radiación UVB en la supervivencia de <i>E. coli</i>	23

Figura 9.	Compuestos del extracto Diclorometano Semilla Seca (DSS) hallados en el análisis del Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas (CG-EM).....	26
Figura 10.	Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu.....	26
Figura 11.	CI ₅₀ del extracto Metanol-Agua Cáscara Fresca (MACF) y quercetina.....	28
Figura 12.	Curva de crecimiento poblacional de la cepa <i>E. coli</i> ATCC MR 1249 expresado en log de UFC/mL.....	37
Figura 13.	Absorbancia del crecimiento poblacional de la cepa <i>E. coli</i> ATCC MR 1249 medida en espectrofotómetro.....	37
Figura 14.	Curva de porcentaje de decoloración de quercetina con el radical DPPH*.....	40
Figura 15.	Curva de porcentaje de decoloración del extracto de Metanol-Agua Cáscara Fresca (MACF).....	40
Figura 16.	Cromatograma del extracto Diclorometano Semilla Seca (DSS) del fruto de <i>P. granatum</i>	41

Índice de tablas

	Página	
Tabla 1.	Extractos de diferente polaridad del fruto de <i>P. granatum</i>	11
Tabla 2.	Rendimiento de los extractos Diclorometano Semilla Seca (DSS) y Metanol-Agua Cáscara Fresca (MACF) del fruto de <i>P. granatum</i>	16
Tabla 3.	Picos máximos de absorción en la región UV de los diferentes extractos del fruto de <i>P. granatum</i>	18
Tabla 4.	Resultados de los experimentos de radiación UV-B y fotoprotección a la radiación UV-B con los diferentes solventes y extractos en un modelo bacteriano.....	24
Tabla 5.	Compuestos del extracto Diclorometano Semilla Seca (DSS) encontrados en el análisis del Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas (CG-EM).....	25

Lista de abreviaturas

CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH₂Cl₂	Diclorometano
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
DPPH*	Radical difenil picril hidrazilo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FeCl₃	Cloruro férrico
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
MeOH-H₂O	Metanol-Agua
MR	Multi resistencia

Resumen

El Sol es un astro que genera la radiación ultravioleta (RUV) la cual se divide en RUV-A, RUV-B y RUV-C. La RUV-B produce efectos benéficos en los seres vivos favoreciendo diversos procesos biológicos, sin embargo, un exceso de este tipo de radiación puede ocasionar daño directo al DNA y/o indirecto a otras biomoléculas por estrés oxidativo, desencadenando efectos sistémicos perjudiciales que pueden ser contrarrestados por los organismos mediante sistemas de reparación así como moléculas que puedan absorber, revertir y/o prevenir el daño ocasionado por la RUV-B. Algunas moléculas que pueden tener estas propiedades son los compuestos fenólicos presentes en cáscara, semilla y mesocarpo del fruto de la granada (*Punica granatum* L.). A pesar de ello, existen pocos estudios acerca de la actividad fotoquimioprotectora de los compuestos fenólicos en este fruto, por lo que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad fotoquimioprotectora del fruto de *P. granatum*. Primero se elaboraron extractos de mediana y alta polaridad de cáscara y semilla. Una vez realizado lo anterior, a cada extracto se le determinó su espectro de absorción en la región RUV-B. Posteriormente, se evaluó la actividad fotoprotectora de los mismos en un modelo bacteriano. Los experimentos evidenciaron la muerte de toda la población bacteriana expuesta a la RUV-B sin protección a los 5 minutos, mientras que en los experimentos con protección utilizando los extractos Metanol-Agua Cáscara Fresca (MACF) y Diclorometano Semilla Seca (DSS) la población bacteriana sobrevivió durante 90 minutos. El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas del extracto DSS indicó la presencia del compuesto 2,4-bis (1,1-dimetil etil) y ácido, mientras que en el extracto de MACF se detectó la presencia de compuestos fenólicos mediante una prueba colorida con FeCl_3 y se determinó la concentración de estos con el método de cuantificación de fenoles totales Folin-Ciocalteu obteniendo 14.94 ± 1.72 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto. La actividad antioxidante del extracto MACF fue determinada con el método del radical DPPH* obteniendo una CI_{50} de 27.71 ± 0.22 $\mu\text{g/mL}$ la cual se aproxima a lo obtenido con el control positivo, en este caso la quercetina (5.54 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$), por lo que se concluyó que ambos extractos presentan actividad fotoprotectora y que el extracto de MACF además de dicha actividad mostró actividad antioxidante, es decir que posee actividad fotoquimioprotectora.

Introducción

El sol

El Sol es un astro conformado principalmente por Helio e Hidrógeno. En su interior se llevan a cabo procesos de fisión y de fusión nuclear generando diversos tipos de ondas energéticas con diferentes propiedades físicas las cuales en su conjunto conforman el espectro electromagnético. Estas radiaciones u ondas emitidas se clasifican dependiendo de su energía o longitud de onda en ondas de radio, microondas, infrarrojo, luz visible, radiación ultravioleta (RUV), rayos X y rayos α , β , γ (Afaq, 2011; Avila et al., 2005; Maverakis et al., 2009).

La radiación ultravioleta (RUV)

La RUV se divide dependiendo de la longitud de onda en UVA (320-400nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm). Diversos autores también mencionan la radiación ultravioleta lejana o de vacío que abarca de los 10 a 200nm (Volhardt, 1994; Fitzpatrick, 2005). La radiación de vacío y la RUV-C son bloqueadas por la capa de ozono, mientras que el 10% de la RUV-B y el 100% de la RUV-A alcanzan la superficie terrestre. La RUV-A y RUV-B corresponden aproximadamente al 5% y 0.5% de la radiación total que penetra la atmósfera (Gilaberte et al., 2003; Maverakis et al., 2009; Mohammad et al., 2014).

De las radiaciones que llegan a la Tierra, la RUV-B es la más energética debido a la longitud y frecuencia de sus ondas. La energía contenida en este tipo de radiación es absorbida por ciertos enlaces de moléculas cuyas características permiten saltos energéticos de orbitales de menor a mayor energía. Las moléculas capaces de absorber la RUV-B se denominan cromóforos los cuales se caracterizan por tener orbitales enlazantes (π) no enlazantes (n) y sistemas conjugados (Volhardt, 1994; Jacobs et al, 2007; Garland et al., 2009; González et al., 2009).

La radiación UVB en los organismos

La RUV-B posee efectos benéficos para los organismos vivos tanto en procesos biológicos como ecológicos. En suelos, favorece la degradación de compuestos. En plantas, este tipo de radiación modifica las rutas metabólicas implicadas en la producción de los compuestos fenólicos alterando indirectamente diversas funciones entre las que se encuentran la alelopatía, señales de transducción,

hormonas, defensa ante la herbivoría, rigidez estructural de las plantas así como la relación existente entre la coloración de las flores y los polinizadores (Björm et al., 2002; Rozema et al., 2002). En vertebrados, contribuye tanto a la obtención de calcio así como a la localización de presas y selección de machos (Nigel y Gwynn-Jones, 2003).

A pesar de lo mencionado anteriormente, un exceso de la RUV-B puede provocar efectos perjudiciales ya que al ser absorbida por ciertas biomoléculas, puede dañar a nivel molecular y celular a los organismos (Jacobs et al, 2006). Los daños pueden ser atribuidos a alteraciones en el DNA, aumento del estrés oxidativo, así como daños en la membrana (González et al, 2009).

Daño al DNA y estrés oxidativo

En los seres humanos, la radiación se absorbe directamente por diversos cromóforos como las bases nitrogenadas. Esta absorción genera fotoproductos como son los dímeros cíclicos de pirimidinas (DCP) y pirimidina (6-4) pirimidona. Los dímeros de pirimidinas producen mutaciones de tipo transicionales entre las que se encuentran C→T, CC→TT, T→C así como transversionales como C→A, C→G, T→A y T→G. La acumulación de dichas mutaciones puede afectar al gen p53 el cual es el encargado de la supresión de tumores, impidiendo de esta manera el proceso apoptótico normal, acelerando el fotoenvejecimiento y propiciando la fotocarcinogénesis (Cabrera y López-Nevot, 2006; González et al., 2009). A su vez, la radiación también provoca la isomerización del ácido urocánico, de la forma *trans* a *cis* ocasionando inmunosupresión (Ravanat et al., 2001;Maverakis et al., 2009; Afaq, 2011).

Las alteraciones al DNA pueden resultar en daños indirectos debido a un desequilibrio celular propiciando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). El daño oxidativo puede afectar a estructuras como son los lípidos, las proteínas y el mismo material genético, además de activar los factores de transcripción como el factor nuclear kappa B y proteína activadora 1, proteínas cinasas activadas por mitógeno, las enzimas ciclooxigenasa y óxido nítrico sintetasa. Las proteínas c-jun y c-fos también pueden verse afectadas ocasionando procesos inflamatorios e inmunosupresivos. A su vez el DNA puede ser dañado por roturas simples y de doble cadena, entrecruzamientos DNA-proteína y formación de 8-oxo-7 y 8-hidroxi-2-deoxi-guanosina (García y Ávila, 2008; Afaq, 2010).

Daños en membrana celular

La RUV-B es transferida por diversos receptores hacia la membrana celular provocando la internalización de los ligandos del factor de crecimiento epidermal, la actividad de las proteínas

cinastas activadas por mitógeno (MAPK) y la transcripción de genes. Dichos efectos están involucrados en efectos crónicos de la piel (Krutmann, 2006).

Daños sistémicos

Los efectos agudos ocasionados por este tipo de radiación incluyen quemaduras solares, eritema, reacciones fototóxicas, reacciones fotoalérgicas y fotosensibilidad, mientras que dentro de los efectos crónicos están el fotoenvejecimiento, la fotoinmunosupresión, tumores y/o cáncer de piel (García y Avila, 2008).

Cáncer melanómico y no melanómico

El proceso de cáncer de piel también conocido como fotocarcinogénesis incluye 3 etapas. La primera denominada iniciación es cuando ocurre el daño en el material genético, el cual al no ser reparado puede desencadenar la proliferación de las células dañadas, entrando en la segunda etapa denominada promoción en la cual se forman tumores. Posteriormente, dichas células pueden llegar a la última fase nombrada progresión, es decir cuando las células tumorales invaden otros tejidos (Afaq et al., 2011).

El cáncer de piel se divide dependiendo del tipo de células afectadas en melanómico y no melanómico. El melanómico se presenta cuando el daño ocurre en los melanocitos de la epidermis. Cabe mencionar, que este tipo de cáncer se encuentra asociado a metástasis. El de tipo no melanómico sucede en los queratinocitos de la piel. A su vez, este cáncer se divide en carcinoma basocelular el cual ocurre en los queratinocitos del estrato basal y el carcinoma espinocelular que tiene su origen en los queratinocitos que conforman el estrato espinoso de la epidermis (Cabrera y López-Nevot, 2006).

Protección ante la radiación UVB

Los organismos han desarrollado a través de miles de años sistemas adaptativos para protegerse así como contrarrestar los efectos producidos por la RUV entre los que se encuentran diversos mecanismos de reparación del DNA, sistemas antioxidantes y sustancias capaces de absorber la luz (Björm et al., 2002; García, 2010).

Sistemas de reparación

Los mecanismos de reparación del DNA ante la radiación UVB han sido conservados por los organismos durante miles de años. Entre estos mecanismos de reparación se encuentran la separación de los dímeros de pirimidinas por las fotoliasas; el sistema de reparación denominado escisión de nucleótidos encargado de cortar la zona de material genético dañado y sustituirlo por la acción de helicasas, endonucleasas, polimerasas y ligasas; el sistema de recombinación homóloga que consiste en completar los genes dañados dando lugar a genes funcionales por la recombinación de los mismos (Björm et al., 2002; González et al., 2009).

Por otro lado la radiación ultravioleta B puede producir Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) como son radical superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y radical hidroxilo. Para "limpiar" estas especies reactivas, se producen sustancias antioxidantes capaces de donar electrones y/o atrapar dichos radicales (Park et al., 2010; Jurado-Santa et al., 2011).

Protección ante la radiación ultravioleta

Los organismos han conservado durante millones de años mecanismos de protección ante la radiación UV ya sea mediante barrera física como pelo, cutículas, realizando movimiento hacia zonas con menos radiación ó el uso de sustancias cromóforas a las radiación UV. No obstante, a pesar de tener la misma función protectora, estas moléculas difieren estructuralmente en los diferentes grupos de organismos. Por ejemplo, las cianobacterias tienen pigmentos denominados escitoneminas, de la misma en el fitoplancton y algas se encuentran las micosporinas, aunque también se han identificado la presencia de flavonoides en algas verdes. En líquenes y plantas superiores están los compuestos fenólicos que incluyen fenilpropanoides, flavonoides y polifenoles. Finalmente en los seres humanos se encuentran la melanina y los carotenoides (Björm, 2002; Rozema et al., 2002; Nigel, 2003; Gilaberte y González, 2010).

Fotoquimiopreención

El hombre ha buscado prevenir los daños ocasionados por la RUV mediante diversas acciones entre las que se encuentran: protegerse de la exposición directa a los rayos; el uso de ropa, sombreros y lentes que cubran las partes más expuestas de la piel (cuello, hombros, brazos, cara); sustancias

capaces de absorber directamente la RUV como los bloqueadores y filtros solares (Gilberte et al., 2003).

Los bloqueadores y filtros solares pueden contener sustancias que provoquen efectos perjudiciales para la salud humana como irritación, alergia, reacciones fototóxicas así como la generación de ERO. Debido a ello, se ha evaluado el uso de sustancias producidas naturalmente por otros organismos para protegerse de la radiación. En general es recomendable que estas sustancias tengan propiedades fotoquimiopreventivas, es decir que sean sustancias que prevengan, detengan y/o reviertan el daño ocasionado por la RUV (Kullanvanijaya y Lim, 2005; García-Bores y Avila, 2008).

Por consiguiente, debido a los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas contra la RUV-B, se ha optado por evaluar los metabolitos secundarios de las mismas, entre los que destacan por su actividad antioxidante y fotoprotectora los compuestos fenólicos.

Se ha encontrado que el té verde (*Camelia sinensis*), el extracto de *Polypodium leucotomus*, el extracto de brócoli (*Brassica oleraceae*), *Curcuma longa*, *Zingibe officinale*, *Silybum marianum*, *Vitis vinifera*, *Coffea arabica* y la granada (*Punica granatum L.*) entre otros poseen moléculas capaces de absorber este tipo de radiación (Jansen, 1998; García-Bores y Avila, 2008).

Punica granatum

Punica granatum L. conocida comúnmente como granada, es una planta originaria de Irán que ha sido cultivada por miles de años en Europa, Asia y América. Actualmente, se cultiva en India, Irán, España, Estados Unidos, Argentina y Chile. En México, se produce principalmente en los Estados de Hidalgo y Guanajuato (López et al., 2010; Texerra et al., 2013).

Clasificación de *P. granatum L.* con base al Grupo Filogenético de Angiospermas 2009 (APG III).

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Myrales

Familia: Lythraceae

Género: *Punica*

Especie: *Punica granatum L.*

Características morfológicas

P. granatum L., es un árbol que mide entre 5 y 10 metros. Estos árboles se caracterizan por poseer hojas pecioladas y oblongadas. Las flores son terminales, axilares y actinomorfas. Estas pueden ser macho, hembra y hermafroditas. La polinización de las flores es realizada por hormigas, abejas, mariposas o mediante autopolinización. La maduración del fruto ocurre de 6 a 7 meses después de la fecundación. El fruto es complejo de tipo balaústa y se caracteriza por tener un pericarpo coriáceo, un mesocarpo, el cual se encuentra dividido en cámaras que contienen numerosas semillas rodeadas por un endocarpo denominado aril (Moreno, 1987; López et al, 2010; Texeira et al, 2013) (Fig. 1).

Estudios de *Punica granatum* L.

Estudios recientes reportan que la granada posee propiedades anticancerígenas, antitumorales, antimicrobianas, antidiarréicas, hepatoprotectivas, contra enfermedades renales, así como fotoprotectoras y antioxidantes (López et al, 2010; Afaq, 2011).

Por otra parte, se ha encontrado que el fruto de *Punica granatum* L. contiene más de 35 compuestos fenólicos distribuidos en el pericarpo (cáscara) como son polifenoles (Afaq, 2011), flavonoides (Park, 2007; Kumar, 2013) elagitaninos (Afaq, 2011; Jain, 2011; Khan et al; 2012; Kumar, 2013) antocianinas (Texeira, 2013), antocianidinas (Afaq, 2011; Khan et al., 2012) y taninos hidrolizables (Khan et al, 2012) mientras que en la semilla, además de los mencionados anteriormente, se han detectado ácidos grasos (Hosseini y Rahemi, 2007; Gundogdu y Yilmaz, 2012) y ácidos hidroxicinámicos (Gundogdu y Yilmaz, 2012; Caleb et al., 2015; Fernandes et al., 2015) que pueden ser cromóforos a la RUV-B.



Fig 1. Árbol y fruta de la granada (*P. granatum*).

Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Punica_granatum_004.JPG

Justificación

En las últimas décadas, el adelgazamiento de la capa de ozono ha ocasionado un incremento de la irradiación UV sobre la superficie terrestre, lo que representa un factor de riesgo para desarrollar cáncer de piel según lo reporta la Organización Meteorológica Mundial (2010).

En México, diversos estudios epidemiológicos, han registrado un incremento en la frecuencia de las neoplasias malignas de la piel entre las que se encuentran cáncer de piel no melanoma y melanoma (Tirado y Granados, 2007; Jurado-Santa et al., 2011; Sosa y García, 2013). Debido a esto se han buscado alternativas fotoprotectoras para evitar la exposición directa a la radiación solar como son usar ropa, sombreros y lentes así como el uso de bloqueadores y filtros solares que contengan sustancias naturales con propiedades fotoquimioprotectoras (García-Bores y Avila, 2008).

Pregunta científica

¿Los extractos de semilla y cáscara de la fruta de *P. granatum* L. tendrán actividad fotoquimioprotectora?

Hipótesis

Debido a que se ha reportado que *P. granatum* L. contiene más de 35 compuestos fenólicos distribuidos en la cáscara, semilla y mesocarpo, es probable que los extractos de este fruto tengan actividad fotoquimioprotectora.

Objetivo general

-Evaluar la actividad fotoquimioprotectora de extractos de diferente polaridad del fruto de *P. granatum* L.

Objetivos particulares

-Obtención de extractos de diferente polaridad de cáscara y semilla de *P. granatum*.

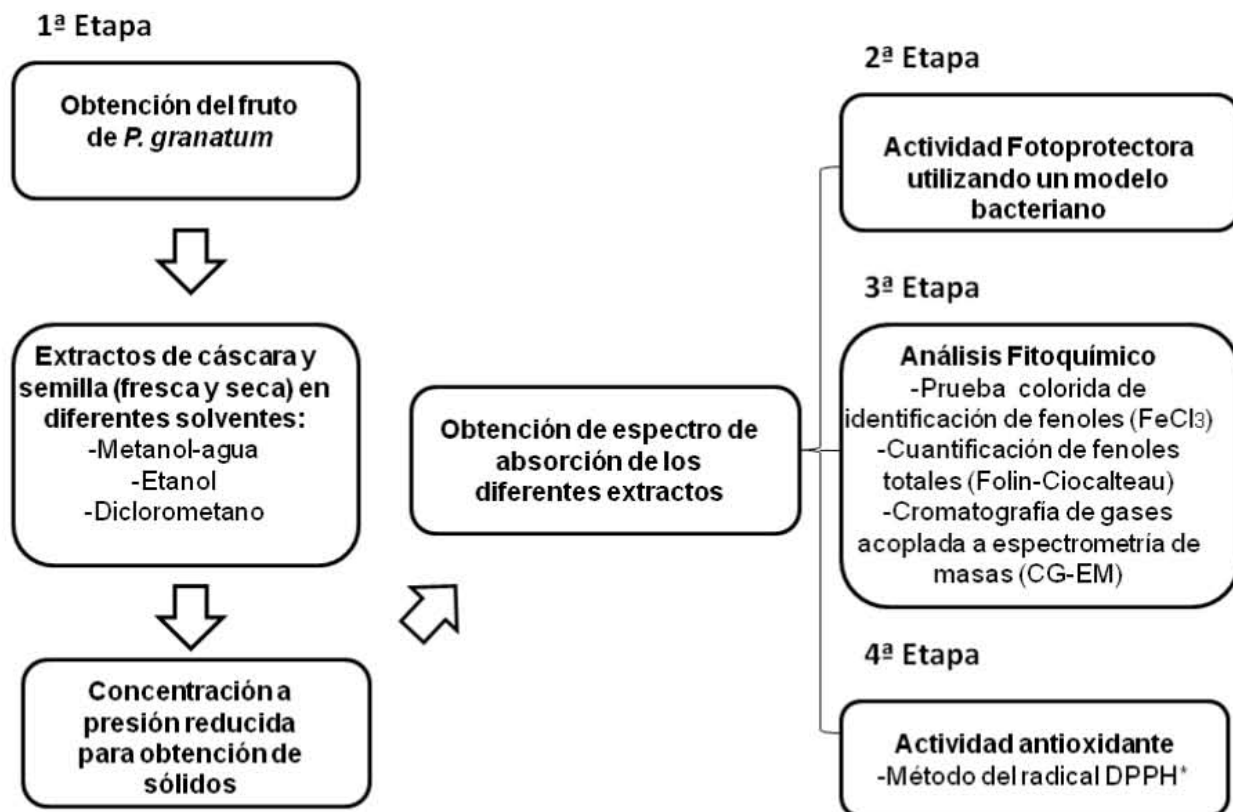
-Obtener el espectro de absorción en la región ultravioleta de los diferentes extractos de *P. granatum*.

-Evaluar el efecto fotoprotector de los extractos que absorben en la región UVB utilizando a la bacteria *Escherichia coli* MR 1249 como modelo biológico.

Determinar la presencia de fenoles en los diferentes extractos de *P. granatum* que hayan presentado actividad fotoprotectora mediante reacciones de identificación coloridas y por CG-EM.

-Evaluar la actividad antioxidante de los diferentes extractos de *P. granatum* que posean actividad fotoprotectora.

Materiales y métodos



Materiales y Métodos

Primera etapa

La primera etapa consistió en la obtención del fruto de *P. granatum*, la elaboración de extractos y la obtención de su espectro de absorción en la región ultravioleta mediante espectrofotometría.

Elaboración de los extractos

Los frutos de *P. granatum* se obtuvieron en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México en el mes de Agosto del 2014. Los frutos se separaron manualmente en semillas y cáscara, de las cuales una parte se dejó secar a temperatura ambiente antes de su maceración y la otra se maceró en fresco directamente. Las maceraciones se llevaron a cabo con disolventes de diferente polaridad (diclorometano, etanol, metanol-agua 50-50 v/v) y se concentraron al vacío en un rotavapor (Kuklinski, 2003). Una vez realizado lo anterior, se obtuvieron 12 extractos de cáscara y semilla tanto fresca como seca los cuales fueron utilizados en la siguiente fase de la investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Extractos de diferente polaridad obtenidos de la fruta de *P. granatum*.

Semilla seca	Cáscara seca
Diclorometano Etanol Metanol-agua	Diclorometano Etanol Metanol-Agua
Semilla fresca	Cáscara fresca
Diclorometano Etanol Metanol-agua	Diclorometano Etanol Metanol-Agua

Obtención del espectro de absorción en el UV

Para conocer los máximos de absorción en la región ultravioleta de los 12 extractos de *P. granatum* (Tabla 1), se llevaron a cabo diluciones de uno entre rangos de 0.8 a 0.03 mg/mL. Después, se les realizó a cada extracto un barrido espectrofotométrico utilizando un espectrofotómetro modelo T80+VIS/UV.

Cabe mencionar que para determinar si los extractos de metanol-agua cáscara fresca y diclorometano semilla seca tuvieron un cambio en los máximos de absorción provocados por la RUV-

Posterior a la evaluación de la actividad fotoprotectora, se les realizó por segunda ocasión un barrido espectrofotométrico.

Segunda etapa

Una vez identificados los extractos que absorbieron en la RUV-B se procedió a efectuar las pruebas de actividad fotoquimioprotectora.

Evaluación de la actividad fotoprotectora con un modelo bacteriano

La actividad fotoprotectora se evaluó con el método propuesto por Avila et al (2005) que consiste en hacer crecer poblaciones bacterianas en fase exponencial (Apéndice 1) e irradiarlas con luz UVB con y sin protección para así poder determinar el número de sobrevivientes y la constante de mortalidad (K) de la población con respecto a las dosis (tiempos de irradiación) (Figura 2) (Apéndice 2).



Fig 2. Evaluación de la actividad fotoprotectora con un modelo bacteriano.

Tercera etapa

Análisis fitoquímico

Con el fin de identificar los tipos compuestos a los que se les puede atribuir las actividades fotoquimioprotectoras de los extractos de *P. granatum* se procedió a un estudio fitoquímico de los mismos mediante reacciones coloridas de identificación así como análisis espectrométricos:

Detección de fenoles

La determinación cualitativa de fenoles se obtuvo mediante la reacción con FeCl_3 , la cual es utilizada para identificar la presencia o ausencia de estos compuestos mediante el cambio de coloración en la muestra, la cual va de diferentes tonalidades de verde. El color se debe a la formación de un complejo férrico con 3 fenóxidos provenientes de los fenoles del extracto (Figura 3)(Apéndice 3) (López, 2011).

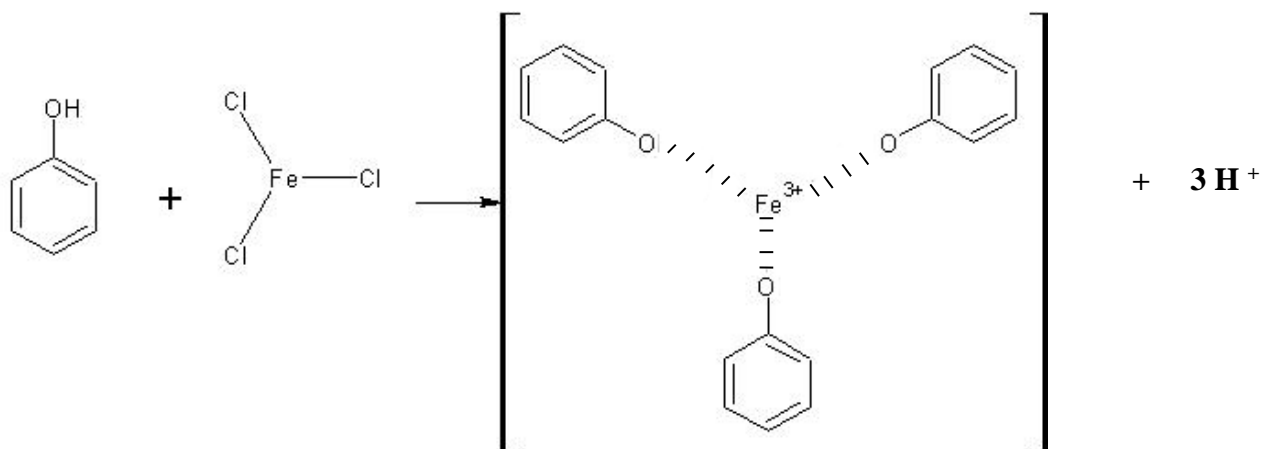


Fig 3. Reacción de identificación de fenoles con FeCl_3 .

Método Folin-Ciocalteu

La cuantificación de los fenoles totales de los extractos de *P. granatum* se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Este método consiste en la formación del complejo de coordinación fosfomolibdico-fosfotúngstico por la reacción entre el molibdato y tungstato sódico. Dicho complejo reacciona con los fenoles los cuales actúan como agentes reductores al transferir electrones reduciendo los complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La reacción genera un cambio de coloración del amarillo al azul el cual se mide espectrofotométricamente a 750 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico con base a una curva patrón del mismo (López, 2011; Serrano, 2013). Esta técnica fue llevada a cabo de acuerdo a lo reportado por Serrano en 2013 (Apéndice 3).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La CG-EM se utiliza para la separación, cuantificación e identificación de compuestos volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. Esta técnica, consiste en la inyección de una muestra en la fase móvil, la cual generalmente es Helio, el cual va avanzando a través de una columna capilar donde los compuestos son separados dependiendo de la afinidad de los mismos con la fase estacionaria. Una vez separados los compuestos de la mezcla, estos son ionizados con disparos de electrones emitidos por el espectrómetro de masas y después mediante campos magnéticos o eléctricos se llevan a un sistema colector. La velocidad que alcanzan los iones en este trayecto ayuda a identificar la masa de las moléculas, así como su mapa de fragmentación, mientras que la corriente iónica genera el pico Gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto en la mezcla (Gutiérrez, 2002).

Con el objetivo de identificar los compuestos presentes en el extracto diclorometano de semilla seca de *P. granatum*, se inyectaron 0,2 µL de una concentración del extracto de 2mg/mL en un CG-EM (Agilent Technologies) modelo 6850. Las condiciones de corrida para el CG-EM fueron a una temperatura inicial de 70°C durante 2 minutos, con una rampa de calentamiento de 20°C por minuto hasta 230°C y una segunda rampa de calentamiento de 8°C por minuto hasta 280°C las cual se mantiene durante 5 minutos; el modo de inyección fue spitless con un tiempo de 0.5 minutos con un flujo de 1mL/min y una temperatura del inyector de 250°C. Se empleó una columna HP-5MS con una longitud de 30 metros, un diámetro de 0.25 mm, y una película de 0.25 µm. El gas utilizado como fase móvil fue Helio. En el espectrómetro de masas, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C y del cuadropolo de 150°C con una técnica de ionización por impacto electrónico a 70 Ev y un rango de masas de 35 a 750 m/z.

Cuarta etapa

Actividad antioxidante

Método del radical DPPH*

El método del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}) fue utilizado para obtener la capacidad inhibitoria media (CI₅₀) de los diferentes extractos mediante la lectura de la absorbancia a 519 nm del radical reducido con las diferentes concentraciones de los extractos, las cuales en este estudio

oscilan entre 4 y 42 ppm. Cabe mencionar que el metanol fue utilizado como blanco mientras que la quercetina como control positivo (García, 2010).

$$\% \text{ decoloración} = \frac{\text{Absorbancia DPPH}^* - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia DPPH}^*} \times 100$$

Posteriormente los valores del porcentaje de decoloración (y) y los valores de las ppm del extracto en una gráfica lineal. Con esta gráfica se despejó el valor de (x) de la ecuación de la recta. El valor de (y) se sustituyó por 50 debido a que en esta prueba antioxidante se busca la concentración del extracto necesaria para reducir el radical DPPH* en un 50% (Apéndice 4).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de dos factores ($p < 0.05$) utilizando Microsoft Excel 2007 para saber si existieron diferencias significativas entre las concentraciones inhibitorias medias y la sustancias a probar, las diferentes concentraciones de las sustancias, así como la interacción de las mismas.

Resultados y Discusión

De los 12 extractos obtenidos (Tabla 1), los extractos de metanol-agua (MACF) y diclorometano semilla seca (DSS) fueron los que se utilizaron para la obtención del rendimiento así como para las etapas experimentales de fotoprotección, fitoquímica y antioxidantes debido a que presentaron sus máximos de absorción en la RUV-B del espectro electromagnético (Tabla 3).

Rendimientos del material vegetal

Los extractos del fruto de *P. granatum* se obtuvieron mediante maceración y concentración al vacío. En seguida, se obtuvo el rendimiento de los mismos para poder así inferir la naturaleza de los compuestos que se encuentran en el material vegetal (cáscara y semilla) con base al disolvente utilizado durante la extracción. Los rendimientos de los extractos de MACF y DSS se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento obtenido de los extractos de semilla y cáscara de la fruta *P. granatum*.

Extracto	Peso fruto g	Porcentaje %
MACF	100	16.37
DSS	33.1	0.55

El rendimiento del extracto de MACF (Tabla 2) fue cercano en comparación a lo obtenido por Jain et al (2011) en un extracto metanólico de cáscara de *P. granatum* (26.67%). Dicho porcentaje sugiere que el extracto posee moléculas de naturaleza polar, ya que éstas al tener grupos OH en su estructura pueden formar puentes de hidrógeno, lo que les permite ser solubles en solventes como alcohol, metanol y agua. Esto coincide con la alta cantidad de polifenoles que se han reportado en la cáscara de la granada (Fischer et al, 2010). No obstante, pueden existir diferencias por factores ambientales o por cambios durante el proceso de extracción. Por ejemplo López (2011) obtuvo rendimientos de extractos metanólicos de *P. granatum* de 3.9% y 3.2% en extractos de cáscara de *P. granatum*. Estos porcentajes pueden deberse a que la extracción fue sucesiva, es decir que previamente al solvente metanólico, utilizaron hexano, éter y acetona para elaborar extractos de otras polaridades. Mientras que en este trabajo, se realizó una extracción directa, utilizando una solución

metanol-agua (50-50 v/v), por lo que es probable que el agua haya arrastrado mayor cantidad de moléculas de alta polaridad, resultando así un incremento del rendimiento del extracto (Harborne, 1989; Kuklinski, 2003).

El rendimiento del extracto DSS (0.55%) indicó que la semilla de *P. granatum* posee pocas moléculas de polaridad intermedia. Este resultado difiere con respecto al reportado por Fernandes et al (2015) en semillas de granada, el cual fluctuó entre 4.44 y 13.17% del peso seco. Esto puede deberse a que las semillas fueron exprimidas previamente para retirar el exceso de H₂O, y evitar la oxidación de las mismas, por lo que es probable que el agua, haya arrastrado diversos compuestos que se encontraban en el fruto de *P. granatum* (Kuklinsky, 2003; Sánchez et al, 2005). Algunos de los compuestos que contienen los extractos, pueden ser identificados con base a la absorción de la luz que presenten.

Obtención de los espectros de absorción de los diferentes extractos de semilla y cáscara de la fruta de *P. granatum*.

Los espectros de absorción de un compuesto en el espectro electromagnético se encuentran dados por la transición de los electrones de los orbitales moleculares de cada enlace con base a la energía absorbida, lo que indica la longitud de onda que pueden absorber las moléculas que se encuentran en una muestra (Vollhardt, 1994). En este estudio, para conocer las propiedades de absorción en la región UVB de los extractos elaborados, se realizó una lectura espectrofotométrica en la región ultravioleta. Los picos de absorción indicaron que los extractos de MACF y DSS absorbieron en la región UV con una concentración de 83 µg/mL para el extracto de MACF y 0.26 µg/mL para el extracto DSS, por lo que es probable que el coeficiente de extinción molar (ϵ) de las moléculas que absorbieron en dicha región UV sea alto, es decir que éstas pueden ser eficientes absorbiendo en la región UVB (Voldhart, 1994; García, 2010), sin embargo, sería necesario realizar una separación y aislamiento de las moléculas presentes en los extractos para afirmar lo mencionado (Tabla 3). Los espectros de absorción de los extractos de MACF (285 y 296 nm) y DSS (275 y 290 nm) de la fruta de *P. granatum* (Tabla 3), a pesar de lo mencionado anteriormente, son cercanos a lo que se reporta para el ácido p-aminobenzóico el cual absorbe a los 293 nm y se caracteriza por poseer un anillo aromático mientras que el cinoxato, que absorbe a 289 nm, presenta un anillo doble conjugado (García, 2010; Moreno y Moreno, 2010), por lo que es probable que la estructura de las moléculas presentes en los extractos de granada sean similares a estos compuestos.

Tabla 3. Concentración de los picos máximos de absorción de los diferentes extractos de *P. granatum*.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)	Picos de absorción (nm)	Absorbancia
MACF	83	285	0.802
		296	0.771
DSS	0.26	275	0.250
		290	0.199

Además, la absorción en la región UVB puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales han sido reportados por diversos autores en la cáscara y semilla de *P. granatum* como son ácido gálico, elágico, ferúlico y caféico, catequina, cianidina, delfinidina, pelargonidina, galotaninos, elagitaninos, peduncalagina, antocianinas y punicalagina (Harborne, 1989; Hossein y Rahemi, 2007; Fischer, 2010; Jain, 2011; Gundogdu y Yilmas, 2012; Kumar; 2013; Texeira, 2013; Caleb et al, 2015; Fernandes et al, 2015).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por actuar como cromóforos a la radiación UV debido a sus dobles enlaces conjugados con anillos aromáticos, los cuales les confieren orbitales π que pueden excitarse por la absorción de los fotones de la UVB, resultando en una transición electrónica hacia un estado energéticamente mayor (Jansen et al, 1998; Ascón-Bieto y Talón, 2000; Skoog et al, 2008).

Con respecto al extracto DSS, éste presentó un pico de absorción a los 275 nm. Dicha absorción puede deberse a la presencia de una molécula encontrada en el análisis de CG-EM, la cual será abordado más adelante (Tabla 3).

Fotoprotección usando un modelo bacteriano

El potencial fotoprotector de los extractos de *P. granatum* fue evaluado con base al modelo propuesto por Avila et al (2005). En este caso se utilizó como modelo biológico a la cepa bacteriana *Escherichia coli* MR 1249, la cual se hizo crecer hasta alcanzar una población de de 10^8 UFC/mL . Posteriormente, la población bacteriana fue irradiada con RUV-B durante diversos intervalos de tiempo, ocasionando la mortalidad de la misma, como se observa en la Figura 4, donde a los 5

minutos el orden de magnitud logarítmica de la población es 4 veces menor al inicial, mientras que a los 10 minutos la población bacteriana decae en su totalidad.

La luz UVB es absorbida directamente por el material genético, ocasionando la formación de dímeros de pirimidina, resultando en mutaciones, así como un desequilibrio en el sistema antioxidante celular pudiendo llegar a ocasionar la muerte de la población bacteriana. Los daños celulares se ven reflejados en la constante de mortalidad (K) o inclinación, la cual se refiere al tamaño del genoma si la reparación es constante, mejor conocido como tamaño del blanco, es decir, el daño que está siendo recibido directamente por el genoma bacteriano así como la capacidad que tienen los microorganismos para poder repararlo. Cabe mencionar que el coeficiente de determinación (R^2) indica el grado de relación existente en el log de organismos sobrevivientes y el tiempo de irradiación. (Dulbeco, 1984).

En la Figura 4, la (K) fue de 0.9017 lo que significa que gran parte del daño ocasionado por la RUV-B actúa principalmente sobre un blanco en la población bacteriana además que los sistemas de reparación no están siendo suficientes para contrarrestar el daño ocasionado por lo que el tamaño de la población disminuye drásticamente, sin embargo, como se puede notar, la curva de supervivencia es multi impacto debido a que la ordenada al origen de la recta (9,2747) no coincide con la población inicial bacteriana, es decir que la población sufrió aproximadamente 9 cambios o impactos en alguna unidad determinada como puede ser la membrana celular o el DNA. La acumulación de dichos cambios ocasionó la muerte de la población bacteriana a los 10 minutos (Tabla 4) (Dulbeco, 1984; Madiga et al, 2004).

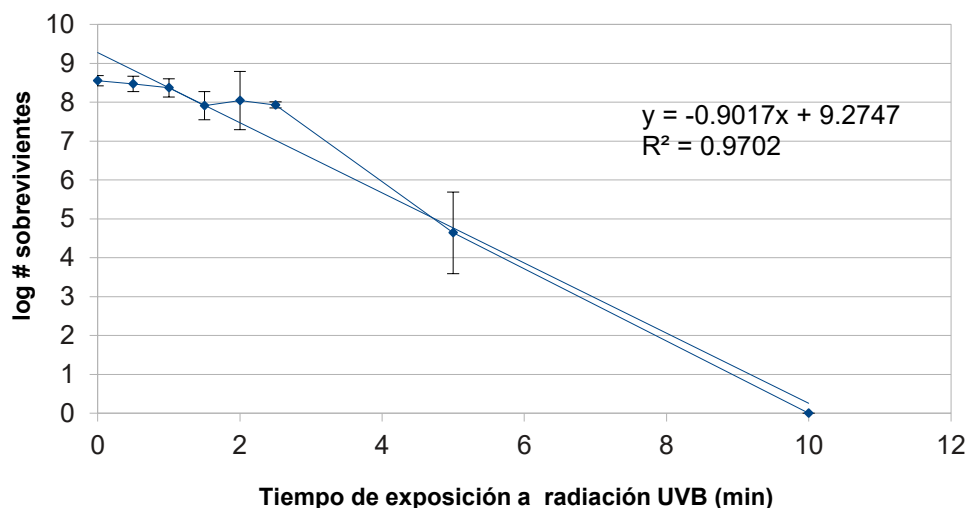


Fig 4. Muerte exponencial de *E.coli* ante la RUV-B sin protección. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Por otra parte en las figuras 5 y 7, se observan las curvas de supervivencia de *E. coli* utilizando los solventes metanol-agua y diclorometano, las cuales son curvas multimpacto ya que la ordenada al origen no coincide con la población bacteriana inicial por lo que la inactivación bacteriana se debe a impactos en diferentes blancos de *E. coli*. En este caso, la población bacteriana recibió 7 impactos al utilizar metanol-agua y 5 al utilizar diclorometano (Dulbeco, 1984). Los impactos acumulados se ven reflejados en los valores de la K tanto del solvente metanol-agua 50-50 v/v como de diclorometano que fueron de 0,4447 y 0,1136 respectivamente lo que significa que el daño no ocurrió específicamente en un solo blanco, sino que ocasionó diversos daños en las vías metabólicas de las células de la población. Esta distribución de daños probablemente permitió la reparación de estructuras, aumentando el tiempo de muerte celular a diferencia de la K obtenida después de la exposición directa a la RUV-B (0,9017)(Tabla 4).

En la Figura 6 se puede observar que el extracto de MACF protegió contra la muerte de la luz UVB durante 90 minutos ya que a este intervalo de tiempo la población bacteriana posee una población 1×10^5 UFC/ml, en comparación con la irradiación directa y la irradiación con el solvente metanol-agua (Tabla 4), en las cuales se advierte la muerte celular a los 5 y 10 minutos. El daño ocasionado a la población bacteriana en dicha curva, es de un impacto porque la población inicial (antes de ser irradiada) coincide con la ordenada al origen de la ecuación de la recta, es decir que la población se vio afectada debido a un único cambio.

La fotoprotección se ve reflejada en la constante de mortalidad del extracto MACF la cual es 29 veces menor en comparación con la K de la irradiación sin protección y 2.4 veces menor en comparación con el solvente metanol-agua (Tabla 4). Esta protección probablemente se debe a la absorción del extracto en la región UVB (Tabla 3) por parte de compuestos fenólicos que se han reportado anteriormente en la cáscara de *P. granatum* (Harborne, 1989; Fischer, 2010; Jain, 2011; Kumar, 2013; Texeira, 2013).

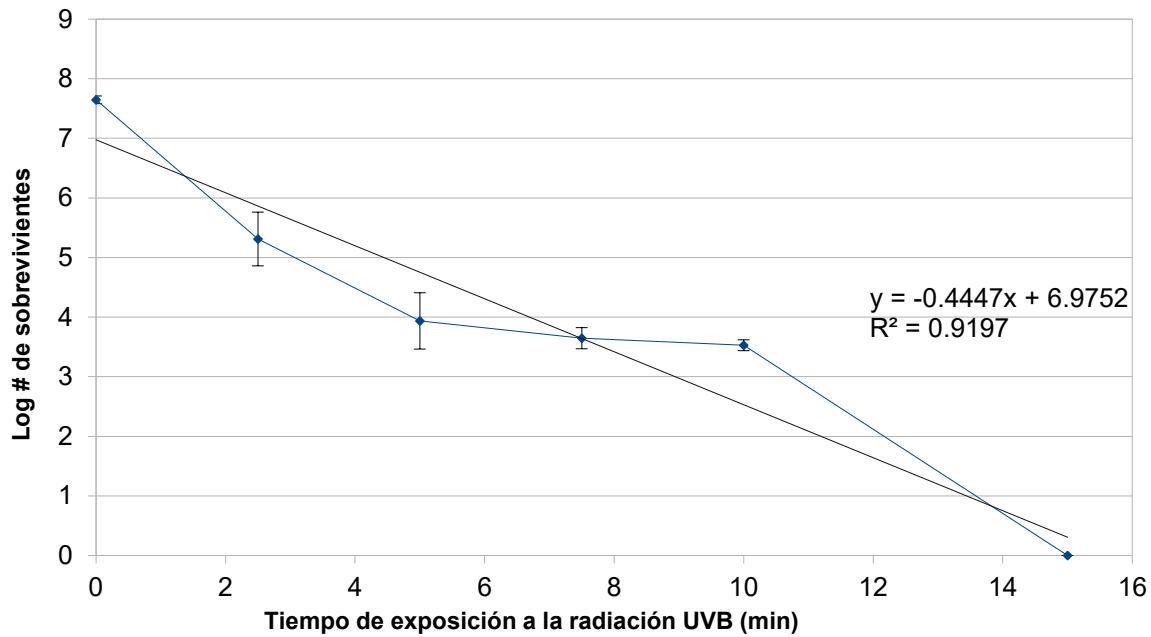


Fig 5. Cinética de muerte de *E. coli* ante la RUV-B con el control negativo Metanol-Agua. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

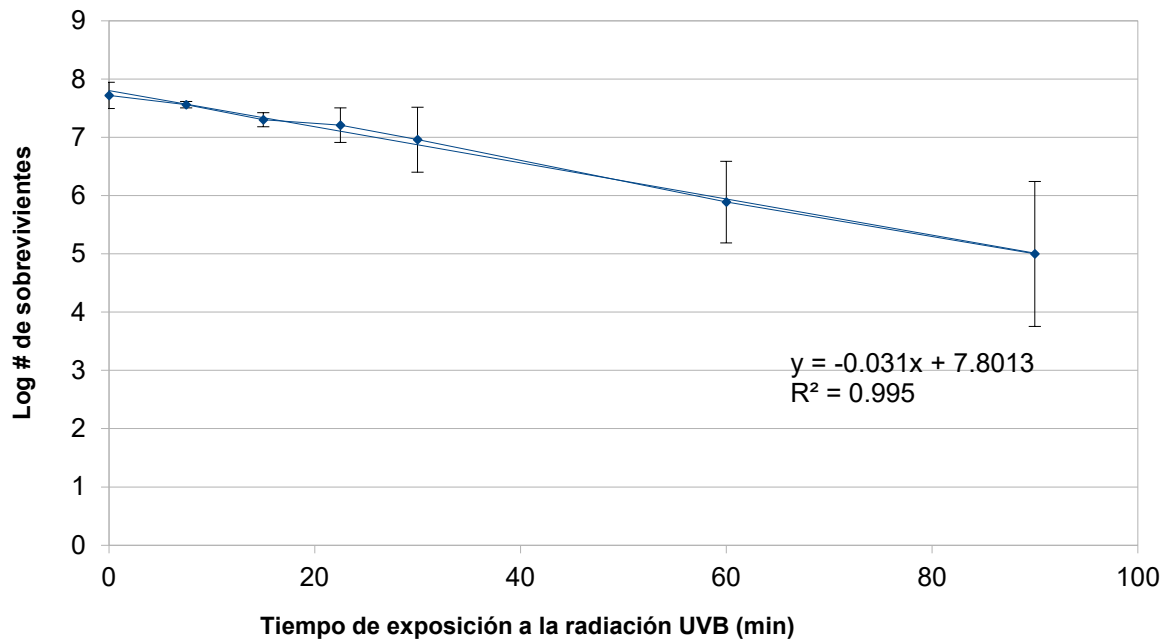


Fig 6. Fotoprotección del extracto de MACF ante la RUV-B. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Finalmente en la Figura 8, se observa que el extracto DSS protegió a la población bacteriana durante 90 minutos ya que a este intervalo de tiempo tiene una población con un orden de magnitud logarítmico de 5 (1×10^5 UFC/ml) presentando una K de 0.02631 la cual es 0.07 veces menor en comparación al MACF, es decir que la protección es ligeramente mayor al MACF. Además, la K del extracto de semilla (0,02631) es 34 veces menor a la que presenta la irradiación sin protección (0,9017) y 4.31 veces a la K (0.1136) del solvente sin extracto (Tabla 4). La actividad fotoprotectora se encuentra relacionada con los picos de absorción que este extracto presentó en la RUV-B los cuales fueron de 275 y 290 nm (Tabla 3). Del mismo modo que el extracto MACF, el extracto DSS presentó una curva de impacto único (Dulbeco, 1984).

Cabe mencionar, que la actividad fotoprotectora del extracto de DSS, coincide con diversos estudios de extractos de la fruta de *P. granatum* en distintos modelos biológicos como respuestas a nivel celular ó genético en cultivos celulares de fibroblastos de piel humana, así como en análisis histológicos en ratones SKH-1 (Park, 2010, Afaq, 2011; Khan, 2012).

Con base a los resultados descritos anteriormente, los extractos de cáscara fresca metanol-agua y semilla seca diclorometano de la fruta de *P. granatum* demostraron poseer actividad fotoprotectora significativamente alta, por lo que podrían ser considerados como sustancias naturales alternativas contra los daños provocados por la radiación UVB debido a que a los 90 minutos más de la mitad de la población de *E. coli* continuaba viva (Figura 6 y 8).

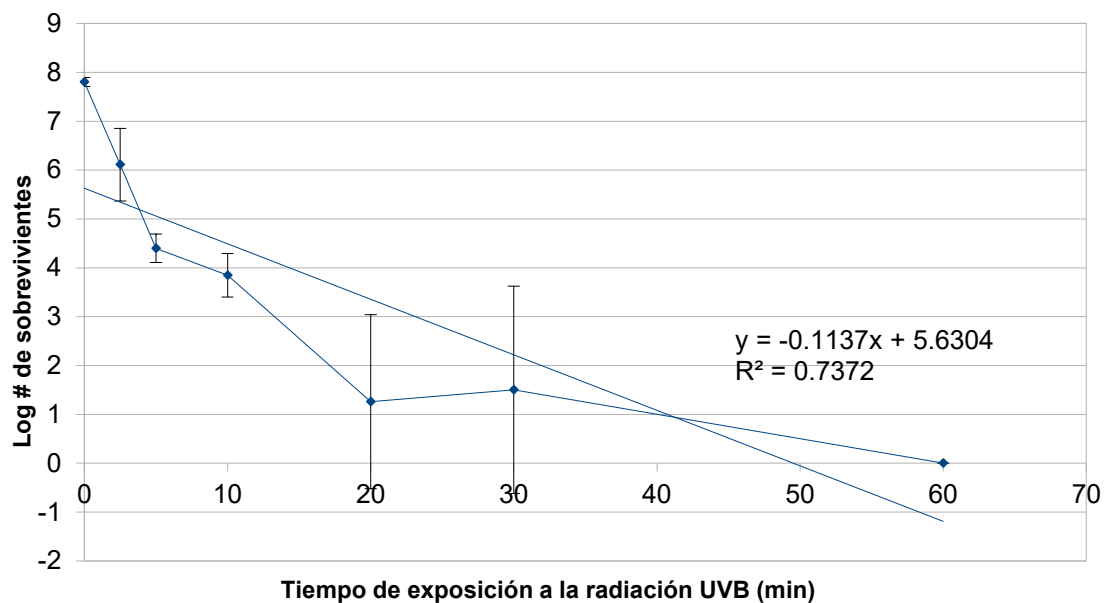


Fig 7. Cinética de muerte de *E. coli* ante la RUV-B con el control negativo Diclorometano. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

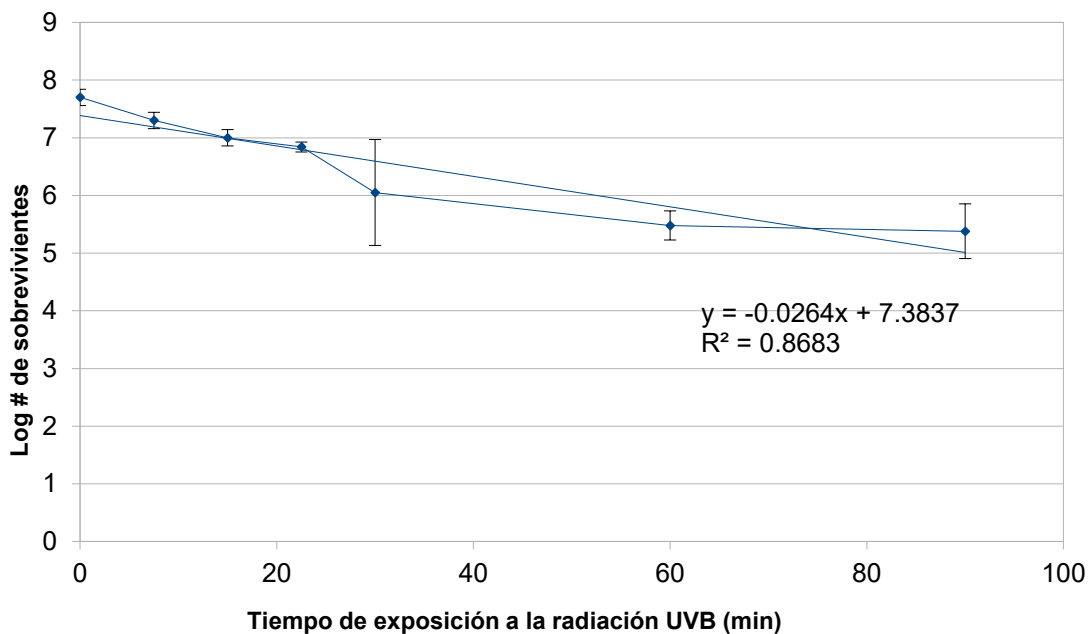


Fig 8. Fotoprotección del extracto DSS ante la radiación UVB. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Tabla 4. Comparación de las constantes de mortalidad, coeficientes de determinación y protección celular de los diferentes solventes y/o extractos de *P. granatum* expuestos a la radiación UVB

Solvente	Constante de mortalidad K	Coeficiente de determinación R²	Protección celular (minutos)
Sin solvente	0.9017	0.9702	5
Metanol-agua	0.4447	0.9197	10
Extracto cáscara fresca MACF	0.031	0.995	90
Diclorometano	0.1136	0.7372	20
Extracto semilla seca DSS	0.0264	0.8683	90

Análisis fitoquímico

La absorción de la radiación de los extractos en la RUV-B se encuentra dada por los enlaces de la molécula (Vollhart, 1994), es por ello que se procedió a analizar las características fitoquímicas y antioxidantes de los extractos MACF y DSS de *P. granatum*.

Determinación cualitativa de fenoles

La prueba cualitativa de cloruro férrico demostró que el extracto de MACF de *P. granatum* contiene compuestos fenólicos. Esto coincide con lo reportado por López (2011) en un extracto metanólico de cáscara de granada así como también a los hallados por Kumar et al (2013) en un extracto metanólico de cáscara de *P. granatum*, tales como ácido gálico, rutina, quercetina, ácido elágico y punicalagina. Asimismo, se han identificado en la cáscara de granada compuestos fenólicos tales como flavonoides, antiocianinas, antocianidinas y taninos hidrolizables (Harborne, 1989; Fischer, 2010; Jain, 2011; Kumar, 2013; Texeira, 2013). Además, la presencia de estos compuestos puede deberse a que las plantas poseen mecanismos de defensa ante diversos factores ambientales como la radiación ultravioleta, la cual estimula la ruta del ácido shikímico, resultando en el incremento de la producción de fenoles, flavonoides y antiocianinas, las cuales les ayudan actuando como cromóforos a la RUV así como evitando el estrés oxidativo de las mismas. Estas moléculas se encuentran principalmente en los tejidos dermales de las plantas, por lo que es probable que debido a

ello la cáscara de la fruta contenga mayor cantidad de los mismos ya sea para su protección y/o defensa del fruto (Dixon, 1995; Harborne, 1989; Doy y Harborne, 1997).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La CG-EM mostró que el extracto de DSS contiene un fenol (Tabla 5) (Fig. 9). La extracción de dicha molécula en diclorometano se debe a similitud de la polaridad que tienen con del solvente (Mora, 2005). La absorción en la región UV de este compuesto es a los 272nm. Este valor se aproxima a la longitud de onda absorbida del extracto DSS de *P. granatum*. la cual fue de 275 nm (Tabla 3), por lo que es probable que parte de la actividad fotoprotectora de este extracto se deba al anillo aromático del compuesto (Ascón-Bieto y Talón, 2000).

Tabla 5. Compuesto encontrados en la CG-EM del extracto DSS

No. de compuesto	Nombre del compuesto	Tiempo de retención	Abundancia	Fórmula
Compuesto 1	Fenol 2,4- bis (1,1-dimetil etil)	8.395	23. 927 %	C ₁₄ H ₂₂

La radiación RUV estimula la síntesis de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos ya por la acumulación en las células epidermales de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés) después de la exposición a la RUV (Schemelzer et al., 1988). Dicha acumulación propicia un incremento de la síntesis de compuestos fenólicos para que la planta logre defenderse contra la RUV (Rozema et al., 2002). Debido al incremento de estos compuestos, es probable que se haya encontrado el compuesto 1 en el extracto DSS (Tabla 5). Además, es probable que el compuesto 1 (Figura 9) sirva como antioxidante natural retardando los procesos oxidativos de las semillas, conllevando así a la protección del embrión para la supervivencia de la planta (Figura 9) (Hosseini y Rahemi, 2007; Tejero y Granillo, 2011).

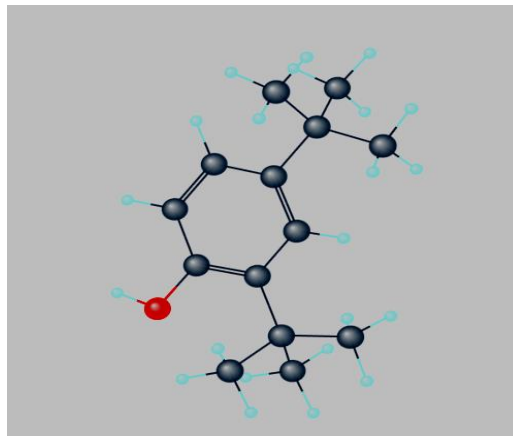
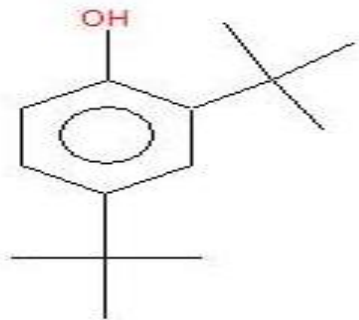


Fig 9. Compuesto detectado en la CG-EM del extracto DSS: Fenol, 2,4-bis (1, (dimetil etil)).

Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de los fenoles totales en el extracto MACF de *P. granatum* fue determinada mediante la prueba de Folin-Ciocalteu, en la cual se obtuvieron 14.94 ± 1.72 mg de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto (Fig 10).

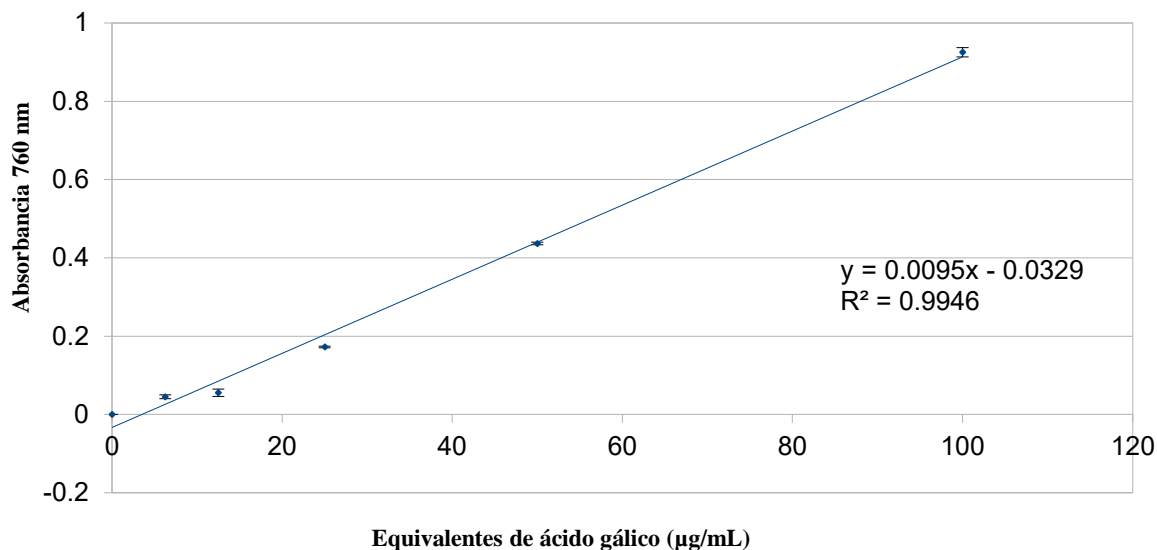


Figura 10. Curva patrón de ácido gálico para la determinación de los fenoles totales con el método Folin-Ciocalteu del extracto MACF de *P. granatum* (14.94 ± 1.72 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto).

Se ha reportado que la granada contiene compuestos fenólicos como son la punicalina,

punicalagina, ácido gálico y ácido elágico, reportados por Jain et al (2011) en extractos metanólicos de cáscara. Además se ha descrito que la concentración de compuestos fenólicos en *P. granatum*. es mayor en la cáscara que en otras partes del fruto ya que se ha encontrado que ésta es rica en flavonoides y proantocianidinas. La presencia de estos metabolitos secundarios puede deberse a su producción por parte de la planta para protegerse de factores climáticos adversos, defensa contra depredación y microorganismos (Rozema et al., 2002; Hossein y Rahemi, 2007).

Por otro lado Kumar et al (2013) encontraron en un extracto acuoso de cáscara de *P. granatum* una concentración de 185 ± 2.45 mg/g, mientras que en un extracto metanólico obtuvieron valores de 298 ± 4.86 mg/g. También reportan la presencia de ácido gálico, rutina, quercetina, ácido elágico y punicalagina.

Fischer et al (2010) obtuvieron una concentración de 101.856 ± 12.8 mg/g en un extracto de metanol-agua de cáscara de *P. granatum*, mientras que en el mesocarpo de la fruta tuvieron valores de 198.173 ± 2.89 mg/g. Dicha cantidad es mayor a la obtenida con el extracto de MACF de *P. granatum* que fue de 14.94 ± 1.72 mg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto (Figura 10).

La cantidad de fenoles del extracto de MACF de *P. granatum* (14.94 ± 1.72 mg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto) (Figura 10), es menor a la que reportan otros autores, probablemente porque la planta creció bajo condiciones de poco estrés, dando como resultado que la ruta del ácido shikimico no haya sido estimulada suficientemente.

Por otra parte, es probable que el tiempo después de la cosecha del fruto, que en este caso fue a principios de Agosto, haya influido en la concentración de dichos compuestos como lo reportado por Hossein y Rahemi (2007) quienes observaron una disminución en la concentración de fenoles en la cáscara de *P. granatum* desde valores de 110 a 50 mg/g.

Los compuestos fenólicos, que provienen del metabolismo secundario, poseen diversas funciones de supervivencia en las plantas como son estructural, atracción de polinizadores, aleloquímicas y de defensa contra depredadores así como también para atrapar radicales libres y proteger de la radiación de tipo ultravioleta (Harborne, 1989; Jansen et al., 1998).

Actividad antioxidante con el método del radical DPPH*

Las moléculas antioxidantes son aquellas capaces de prevenir o retrasar la oxidación de algún substrato mediante reacciones de oxido reducción. Además algunas de ellas, como los compuestos fenólicos pueden absorber la radiación UVB (Zhang et al., 2015).

Con la prueba del radical 2,2-difenil-1 picril hidrazilo (DPPH*) se puede determinar la concentración a la cual este radical es reducido en un 50% por la sustancia antioxidante. La concentración inhibitoria media (CI₅₀) del radical DPPH* con el extracto de MACF de *P. granatum* fue de $27.71 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$. Este valor es mayor en comparación con el valor del control positivo, la quercetina, cuyo valor fue de $5.54 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ (Figura 11). La CI₅₀ del extracto puede deberse a la acción de una o dos moléculas en toda la mezcla, por lo que es probable que si se aíslan los compuestos del mismo, la concentración inhibitoria media, sea menor (Harborne, 1989).

Además, el análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el extracto MACF y la quercetina así como en la concentración de los mismos.

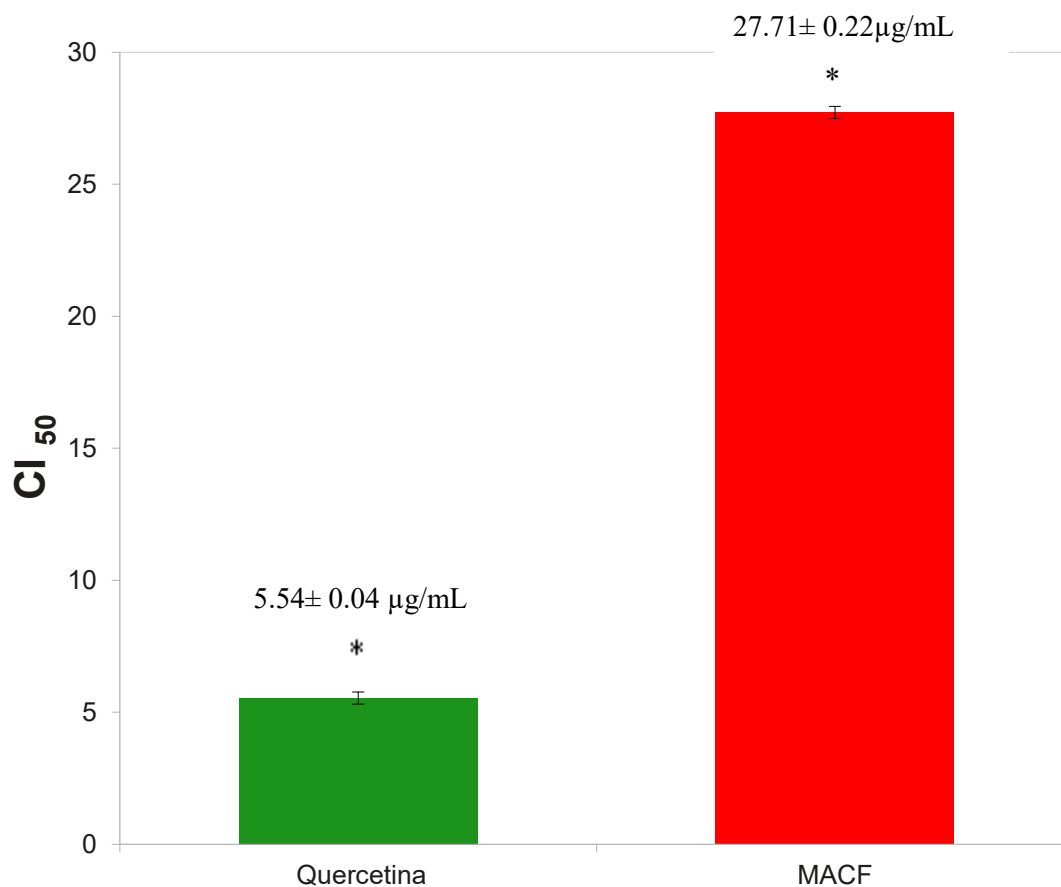


Figura 11. Concentración eficaz media del extracto MACF de *P. granatum* ($27.71 \mu\text{g/ml}$) en comparación con quercetina ($5.54 \mu\text{g/ml}$).

Diversos estudios, en los que se utiliza la prueba del radical DPPH* reportan actividad en la cáscara de *P. granatum*. Zahin et al (2010) obtuvieron en una fracción metanólica de cáscara de *P. granatum*

una CI_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$, el cual es ligeramente menor al extracto de MACF de *P. granatum*.

Por otra parte López, (2011), reportó la actividad de dos extractos metanólicos de cáscara de *P. granatum* los cuales presentaron valores de 114.25 $\mu\text{g/mL}$ y 126.75 $\mu\text{g/mL}$. Dichos valores, son más altos al extracto de MACF de *P. granatum*, es decir poseen menor actividad antioxidante.

Kumar et al (2013) obtuvieron de un extracto acuoso de cáscara de *P. granatum* una CI_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en un extracto metanólico fue de 168 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera, al comparar estos datos, se puede advertir que el extracto MACF tiene una actividad antioxidante mucho mayor, ya que alcanzó la reducción del radical con menor concentración del extracto (Figura 14 y 15). Esto probablemente se deba a que los compuestos disueltos en la mezcla son capaces de actuar como agentes reductores además que el solvente utilizado, el cual era una mezcla de agua con metanol, facilita la extracción de los polifenoles de las células de las plantas (Teixeira et al., 2013).

Finalmente, Arbayza et al (2014) obtuvieron en un extracto hidro alcohólico de cáscara de *P. granatum* valores de 84.4 $\mu\text{g/mL}$ mientras que de los extractos acuosos de cáscara presentaron valores de 59.7 $\mu\text{g/mL}$ y 43.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La actividad que reportan dichos autores es menor en comparación con la actividad de este estudio (Figura 11) probablemente a que como lo mencionan dichos autores es probable que los extractos al ser congelados previamente a su análisis, la conformación de las moléculas que hubieran podido tener actividad antioxidante, se haya modificado.

La actividad antioxidante de la quercetina ($5.57 \pm 0.04\mu\text{g/mL}$) se debe a que este flavanol posee en su estructura grupos hidroxilo que favorecen la delocalización electrónica del anillo aromático cuando la molécula absorbe fotones de la RUV-B, además que el metanol es un alcohol, lo que confiere la capacidad tanto de donar átomos de hidrógeno como de quelar metales, ayudando así la disminuir reactividad de los radicales libres (López-de-Dicastillo, 2010; Zhang et al., 2015).

Conclusiones

- Se obtuvieron 12 diferentes extractos de metanol-agua, etanol y diclorometano de la fruta de *P. granatum* L.
- El extracto metanol-agua de cáscara fresca presentó el mayor rendimiento de extracción de sólidos.
- Los extractos de metanol-agua de cáscara fresca y de diclorometano semilla seca presentaron picos máximos de absorción en la región UVB.
- Los extractos de diclorometano de semilla seca y el de metanol-agua de cáscara fresca mostraron una buena actividad fotoprotectora en el modelo bacteriano.
- El extracto de diclorometano semilla seca presentó un Fenol, 2,4-bis (1, (dimetil etil).
- El extracto de metanol-agua cáscara fresca presentó 14.94 mg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto de compuestos fenólicos y una CI_{50} de 27.71 $\mu\text{g/mL}$ de actividad antioxidante con el radical DPPH*.

Bibliografía

- Afaq, F. (2011). Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 508: 144-151.
- Arbayza, J., Ruiz, S., Venegas, E., Ruidias, D., Casavallente, K. (2014). Capacidad antioxidante del zumo y de los extractos hidroalcohólico y acuoso obtenidos de *Punica granatum* y su relación con el contenido de polifenoles. *Pharmacencia*. 2(2): 50-55.
- Ascón-Bieto, J. y M. Talón. (2000). La luz y el aparato fotosintético. En (1a) *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp.137-138). Madrid. España. McGraw-Hill
- Avila, A.J.C., C.M.C. Castañeda, F.J.C. Benitez, D.A. Durán, V.R. Barroso, C.G. Martínez, L.J.L. Muñoz, C.A. Martínez y A. Romo de Vivar. (2005). Photoprotective activity of *Budleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76: 301-309.
- Björn, L., S.Widell y T. Wang. (2002). Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Advances in Space Research*. 30 (6): 1557-1562.
- Cabrera, C. y M. López-Nevot. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*. 29 (7): 291-298.
- Caleb, O. J., O. A. Fawole, R. R. Mphahlele y U. L. Opara (2015). Impact of preharvest and post harvest factors on changes in volatile compounds of pomegranate fruit and minimally processed arils- Review. *Scientia Horticulturae*. 188: 106-114
- Dixon, A.R. y N.L. Paiva. (1995). Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*. 7: 1085- 1097.
- Doy,P.M. y J.B. Harborne (1997). Phenolic Metabolism. En (1ª) *Plant Biochemistry* (pp 387-415). California: Academic Press.
- Dulbeco, R., Davis, B., Eisen, H y H. Ginsberg. (1984). Esterilización y desinfección. En (3ª) *Tratado de Microbiología* (pp 1025-1028). Barcelona: Salvat Editores S.A.
- Fitzpatrick, T. (2005). Fundamentos de fotobiología y fotoimmunología cutáneas. En (7ª) *Dermatología en medicina general* (pp. 798). Madrid: Panamericana.
- Fernandes,L., J.A. Pereira, I. López-Cortés, D.M. Salazar, E. Ramathosa y S. Casal. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*. 39: 13-22.

- Fischer, U., C. Reinhold y D. Kammenrer. (2010). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. Food Chemistry. 127: 807-821.
- García, A y J. Avila. (2008). Natural products: molecular mechanisms in the photochemoprevention of skin cancer. Revista Latinoamericana de Química. 36 (3): 83-101
- García, A. (2010). Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado (Ciencias Biológicas). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 84-86, 89-93.
- Garland, C., F. Garland y E. Gorham. (2009). Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. Ultraviolet radiation in melanoma mortality rates. 13 (16): 395-404.
- Gilaberte, Y., C. Consojuela, M. Sáenz de Santamaría y S. González. (2003). Fotoprotección. Actas Dermosifiliográficas. 94 (5): 271-293.
- Gilaberte, Y. y S. González. (2010). Novedades en fotoprotección. Actas dermo-sifiliográficas. 101(8): 659-672.
- González, M., M. Vernhes y A. Sánchez. (2009). La radiación ultravioleta su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. Theoria. 18 (2): 69-80.
- Gundogdu, M. y H. Yilmaz. (2012). Organic acid, phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars and selected genotypes. Scientia Horticulturae. 143: 38-42.
- Gutiérrez, (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes del mal olor. Boletín Intexter (U.P.C.). 122 (1):35-41.
- Harborne, J.B. (1997). Phenols and Phenolic Acids. En Methods in Plants Biochemistry (pp 29-67). California, USA: Academic Press
- Hossein, S y M. Rahemi. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit. Scientia Horticulturae. 111(1): 120-127.
- Jacobs, J.F., G.J.M. Koper y W.N.J. Ursem. (2007). UV protective coatings: A botanical approach. Progress in Organic Coatings. 58: 166-171.
- Jain, V., G. Muruganathan, M. Deepak, G. Viswanatha y D. Manohar. (2011). Isolation and standardization of various phytochemical constituents from methanolic extracts of fruit rinds of *Punica granatum*. Chinese Journal of Natural Medicines. 9 (6): 0414-0420.

- Jansen, M., V. Gaba y B. Greenberg. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*. 3(4): 131-135.
- Jurado-Santa Cruz, F., A. Medina, R. Gutierrez y J. Ruiz. (2011). Prevalencia del cáncer de piel. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 49 (3): 253-258.
- Khan, N., D.N. Syed, H. Chandra Pal, H. Huktar y F. Afaq. (2012). Pomegranate fruit extract inhibits UVB-induced inflammation and proliferation by modulating NF- κ B and MAPK signalling pathways in mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 88: 1126-1134.
- Kumar, S., T. Usha y V. Pande. (2013). HPLC Evaluation of phenolic profile, nutritive content and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences*. 1-6.
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia*. (1ª). Barcelona: Ediciones Omega
- Kullavanijaya, P. y H. W. Lim. (2005). Photoprotection *American Academy of Dermatology*. 1:937-958.
- Krutmann, J. 2006.. The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92: 105-107.
- López, O., López, A. y E. Palou. (2010). Granada. (*Punica granatum* L.): una fuente de antioxidantes de interés actual. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 1: 64-73.
- López-de-Dicastillo, C., Alonso, J., Catalá, M., Gavara, R. y Hernández, P. (2010). Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating Natural Flavonoids into Ethylene-Vinyl Alcohol Copolymer (EVOH) Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 10958-10964.
- López, J. (2011). Contribución al estudio químico de *Punica granatum* L. (Granada). Tesis de Licenciatura. Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 22-23, 74,75, 90.
- Madiga, M., Martinko, J y J. Parker. (2004). Crecimiento bacteriano. En (10ª). *Biología de los microorganismos* (pp 142-152). Madrid: Pearson educación, S.A.
- Maverakis, E., Y. Miyamura, M. Bowen, G. Correa, Y. Ono y H. Goodarzi. (2009). Light including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*. XXX: I-II.
- Mohammad, A.E., R. Enayatifard, M. Khalili, M. Ghaffarloo, M. Saeedi y J. Chorati (2014). Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13(3). 1041-1047.

- Moreno, M y L. Moreno. (2010) Fotoprotección. Rev Asoc Colomb Dermatol. 18: 33-39.
- Mora, V. (2005). Modelo de enlace covalente. En (1ª)Química 1 Bachillerato(pp110-111). México. St Editorial.
- Moreno, N. (1987). Glosario botánico ilustrado. (1ª ed.) Veracruz: Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.
- Nigel, D. y D. Gwynn-Jones. (2003). Ecological roles of solar UV radiation towards an integrated approach. TRENDS in Ecology. 18(1): 48-55.
- Ortega, G y M. Guerra. 2006. Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico físicos. ICIDCA. 40 (3): 3-11.
- Park, M., E. Moon, A. Kim, M. H. Kim, S. Lee, J.B. Lee, Y.K. Park, H. Jung, Y. Kim y S.Y. Kim. (2010). Extract of *Punica Granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. International Journal of Dermatology. 49: 276-282.
- PubChem. (2015). Open Chemistry Data Base. Recuperado el 18 de Octubre de 2015, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ravanat, J., T. Douki y J. Cadet. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and it's components. Journal of Photochemistry and Photobiolog. 63: 88-102.
- Rozema, J., L.O. Björm, J.F. Bornman, A. Gaberscik, D.P. Hader, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A.Groniger, R.P. Sinha, M.Lebert, Y.Y. He, R. Buffoni-Hall, N.V.J. de Bakker, J. van de Stoaij y B. Meijkamp. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. Journal of Photochemistry and Photobiology. 66: 2-12.
- Sánchez, M. L., Martínez, A. R. y M. R, Yunta. (2005). Química: un proyecto de la American Chemical Society. (1ª). USA: Reverté
- Sermakkani, M. y V. Thangapandian (2012). GC-MS Analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. Assian Journal of Pharmaeutical and Clinical Research. 5(2): 90-94.
- Serrano, R. (2013). Efecto cicatrizante de *Bursera moreliensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Doctorado (Ciencias Biológicas). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 86.
- Schmelzer, W. Jahnen y K. Hahlbrock. (1988). *In situ* localization of light-inducen chalcone synthase Mrna, chalcone synthase and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. Porc. Natl. Acad. Sci. 85: 2989-2993.

- Sosa, E. y F. García. (2013). Panorama epidemiológico del cáncer en México. *Anestesiología en Oncología*. 36 (1): 130-132.
- Skoog, D., J. Holler y S. Crouch. 2008. *Principios de análisis instrumental*. (6ª edición). México. Cengage Learning.
- Tejero, D. y M. Granillo. (2011). *Fanerógamas*. En (2ª) *Plantae* (pp. 133). México. UNAM.
- Teixeira da Silva, J., Singh, T., Narzary, D., Verma, N., Tarachamd, D. y S. Ranade. (2013). Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*. 160: 85-107.
- Tirado, L. y M. Granados. (2007). Epidemiología y etiología del cáncer de la cabeza y cuello. *Cancerología*. 2: 9-17.
- Vollhardt, P. 1994. *Sistemas pi deslocalizados y espectroscopía UV*. En (1ª): *Química Orgánica* (pp 603-608). Barcelona. Omega, S.A.
- World Meteorological Organization, (2011). *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2010*. Global Ozone Research and Monitoring Project-Report 52:516 pp.
- Zahin, M., F.Aquil y I. Ahmad. 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica Granatum L.* peel extracts. *Mutation Research*. 703: 99-107.
- Zhang, Y., Shen, Y., Zhu, Y. y Xu, Z. (2015). Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*. 63 (1): 569-57

Apéndices

Apéndice 1. Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se llevó a cabo para poder identificar las fases de crecimiento así como los intervalos de tiempo de la cepa *E. coli* (ATCC MR 1249). Esta cepa bacteriana fue proporcionada por el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

El crecimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se inoculó una colonia de la cepa de *E. coli* en medio de cultivo infusión cerebro corazón de 10 mL y se dejó incubando a 37°C durante 18 horas. Después, se tomaron 100µL del cultivo y se vaciaron en un tubo Conneman y se leyeron en un espectrofotómetro para conocer la densidad óptica en solución de una población bacteriana. La lectura se realizó a 550nm ya que esta es la que se ha establecido para *E. coli*.

Enseguida, se tomaron 100µL del cultivo y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} en una solución de NaCl al 0.7%. Una vez realizado lo anterior, se tomaron 100 µL de cada dilución y se prosiguió con el método de vertido en placa mediante siembra por extensión en agar EMB. Inmediatamente el medio de cultivo utilizado, se regresó a la incubadora donde se dejó incubar el cultivo inicial en intervalos de 2, 3, 4, 6, 8 y 10 horas. Entre cada intervalo se realizaron las diluciones y la siembra del de cultivo. Después de incubar a las bacterias sembradas, se prosiguió con el conteo el placa de las unidades formadoras de colonia (UFC/ml) (Madiga et al, 2004).

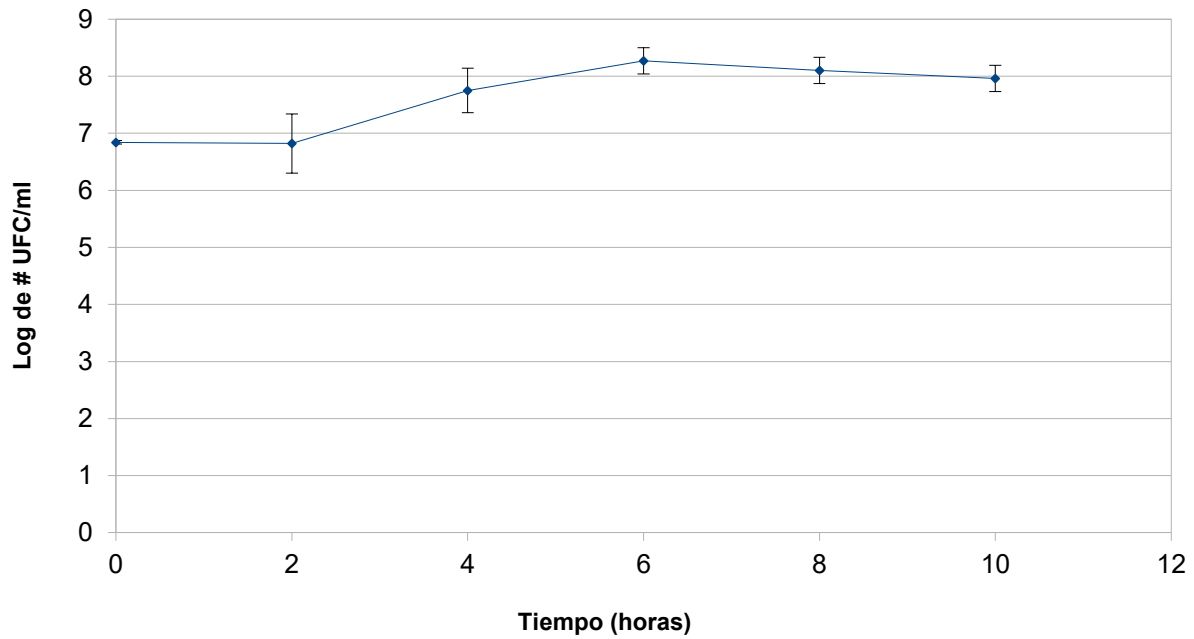


Fig 12. Log de UFC/mL de la cepa *E. coli* (ATCC MR 1249) en diferentes intervalos de tiempo.

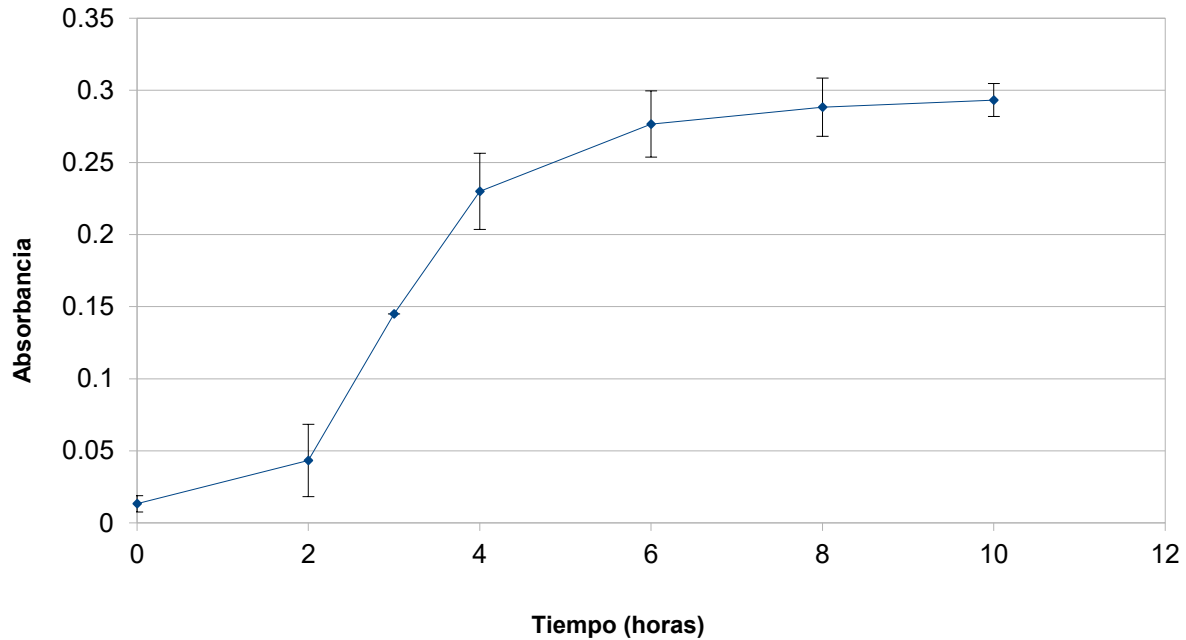


Fig 13. Absorbancia del crecimiento de la cepa *E. coli* (ATCC MR 1249) en diferentes intervalos de tiempo. Se puede observar que la fase de crecimiento exponencial de esta cepa es a las 3 horas.

Apéndice 2. Actividad fotoprotectora con un modelo bacteriano

La actividad fotoprotectora se llevó a cabo conforme a lo elaborado por García (2010), procedimiento al cual se le realizaron algunas modificaciones en las dosis de irradiación y en la cepa bacteriana utilizada como modelo biológico.

Este método consistió en inocular a la cepa *E. coli* (ATCC MR 1249) para su crecimiento en 30 mL de medio de cultivo infusión cerebro corazón durante 18 horas a 37°C. Después, se tomaron 100 µL y se inocularon durante 3 horas a 37°C en un tubo Conneman con 10 mL del mismo medio de cultivo, el cual se leyó en el espectrofotómetro previamente calibrado a 550 nm hasta obtener una lectura de 0.14 ya que a este intervalo de tiempo la población bacteriana se encuentra en la fase log ó de crecimiento exponencial. Una vez realizado lo anterior, las bacterias se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se suspendieron en 10 mL de una solución salina estéril de NaCl al 0.7% y después en un matraz Erlenmeyer con 90 ml de la misma solución para obtener una población con un orden logarítmico de aproximadamente 10^7 bacterias/mL. A continuación se colocaron 2 mL de la suspensión bacteriana en cubetas de cuarzo estériles para proseguir con la irradiación sin protección, con el solvente y con el extracto. Cabe mencionar que los extractos fueron disueltos en una concentración de 2mg/mL. Después, las unidades experimentales fueron irradiadas utilizando una lámpara UVB con una longitud de onda de 312 nm en intervalos de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 300 y 600s en la irradiación directa, con el solvente metanol-agua se utilizaron intervalos de 0, 2.5, 5, 7.5, 10,15 y 20 minutos y con Diclorometano fueron de 0, 2.5, 5,10, 20 y 30 min. Cabe mencionar que la irradiación con Diclorometano fue más larga debido a que en pruebas anteriores, la inactivación de la población fue más tardada que con metanol-agua. La dosis de irradiación con protección, para ambos extractos fueron de 0, 7.5, 15, 22.5, 30, 60 y 90 minutos. La dosis de irradiación fue de 0.60 J/cm² a una distancia de 15 cm de la cubeta que contenía la suspensión bacteriana. Dicha dosis fue determinada utilizando un radiómetro.

Después de las irradiaciones, para determinar las células viables, se tomaron 100 µL de la unidad experimental y se realizaron diluciones seriadas para obtener diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} . Una vez realizado lo anterior, se llevó a cabo el método de vertido en placa mediante siembra por extensión en agar EMB. Por último, las placas se dejaron incubar durante 12 horas a 37°C. Cada experimento así como la siembra en placa se realizó por triplicado (Madiga *et al*, 2004).

Apéndice 3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Prueba colorimétrica de FeCl₃

La reacción de FeCl₃ es una prueba colorida utilizada para la identificación de compuestos fenólicos por el cambio de color de una muestra, el cual va de rojizo a diferentes tonalidades de verde cuando hay presencia de compuestos fenólicos. Esta prueba se llevó a cabo al disolver 0.5 g del extracto de cáscara fresca en 10 mL de metanol-agua. Posteriormente se adicionaron 3 gotas de FeCl₃ al 1% e inmediatamente se observó el cambio de coloración en la muestra (López, 2011).

Método de Folin-Ciocalteu

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante del método Folin-Ciocalteu el cual consiste en la lectura al espectrofotómetro del cambio de coloración provocado por la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu por parte de los agentes oxidantes de los fenoles en una sustancia a evaluar (Serrano, 2013).

Esta técnica se elaboró con base a la modificación realizada por Serrano (2013) la cual consistió en elaborar una curva de calibración de ácido gálico a partir de una concentración de 0.200 µg/mL, de la cual se realizaron diversas diluciones hasta obtener concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Para el extracto a evaluar, se obtuvo una concentración de 0.4mg/mL. Una vez realizado lo anterior, se tomaron 750 µL de las concentraciones y se aforaron hasta obtener un volumen de 3 mL de agua destilada. Después se añadió 1 mL de las concentraciones de ácido gálico a tubos con 6 mL y para el tubo de la sustancia a evaluar se añadió 1 mL. Después se agregaron 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu a cada tubo, y se dejaron incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizado lo anterior se agregó Na₂CO₃ al 20% hasta aforar los tubos a 10 mL. Finalmente se dejó incubar en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente y se prosiguió a la lectura en el espectrofotómetro a 760nm. Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto.

Apéndice 4. Curvas de porcentaje de decoloración de DPPH*

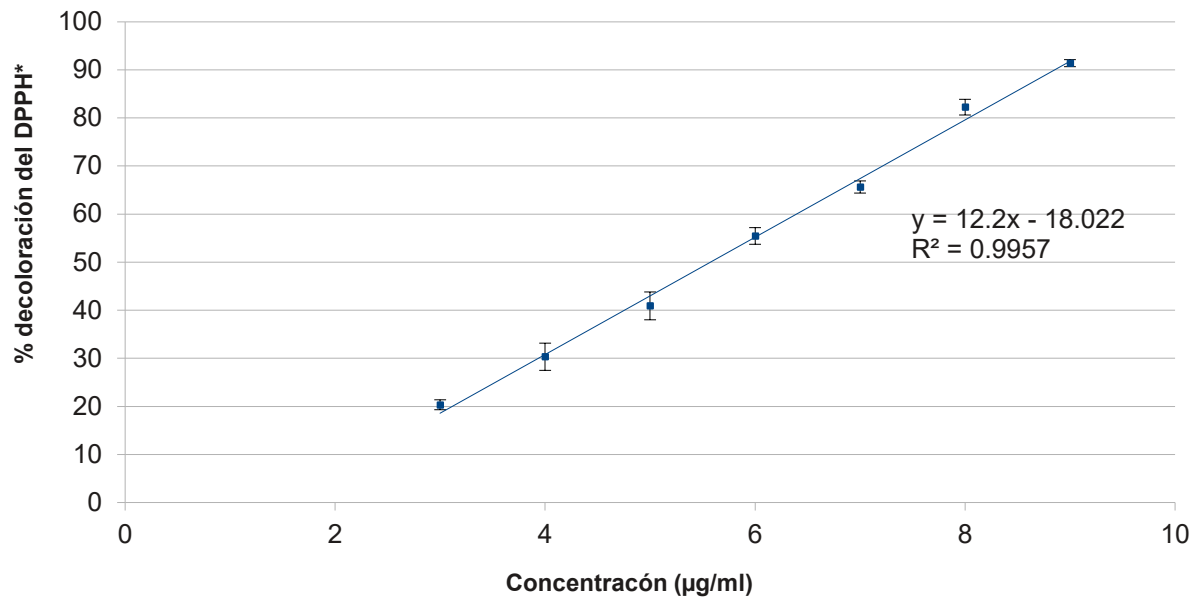


Figura 14 . Método del radical DPPH* con quercetina.

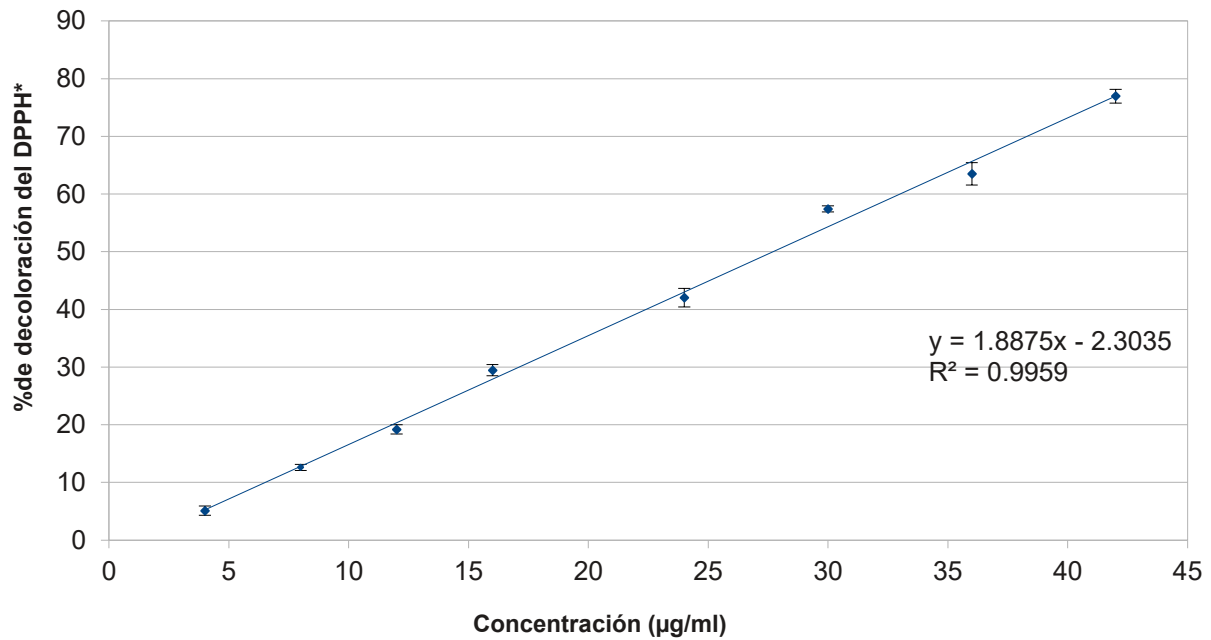


Figura 15. Método del radical DPPH* con el extracto MACF de *P. granatum*.

Apéndice 5. Resultados de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

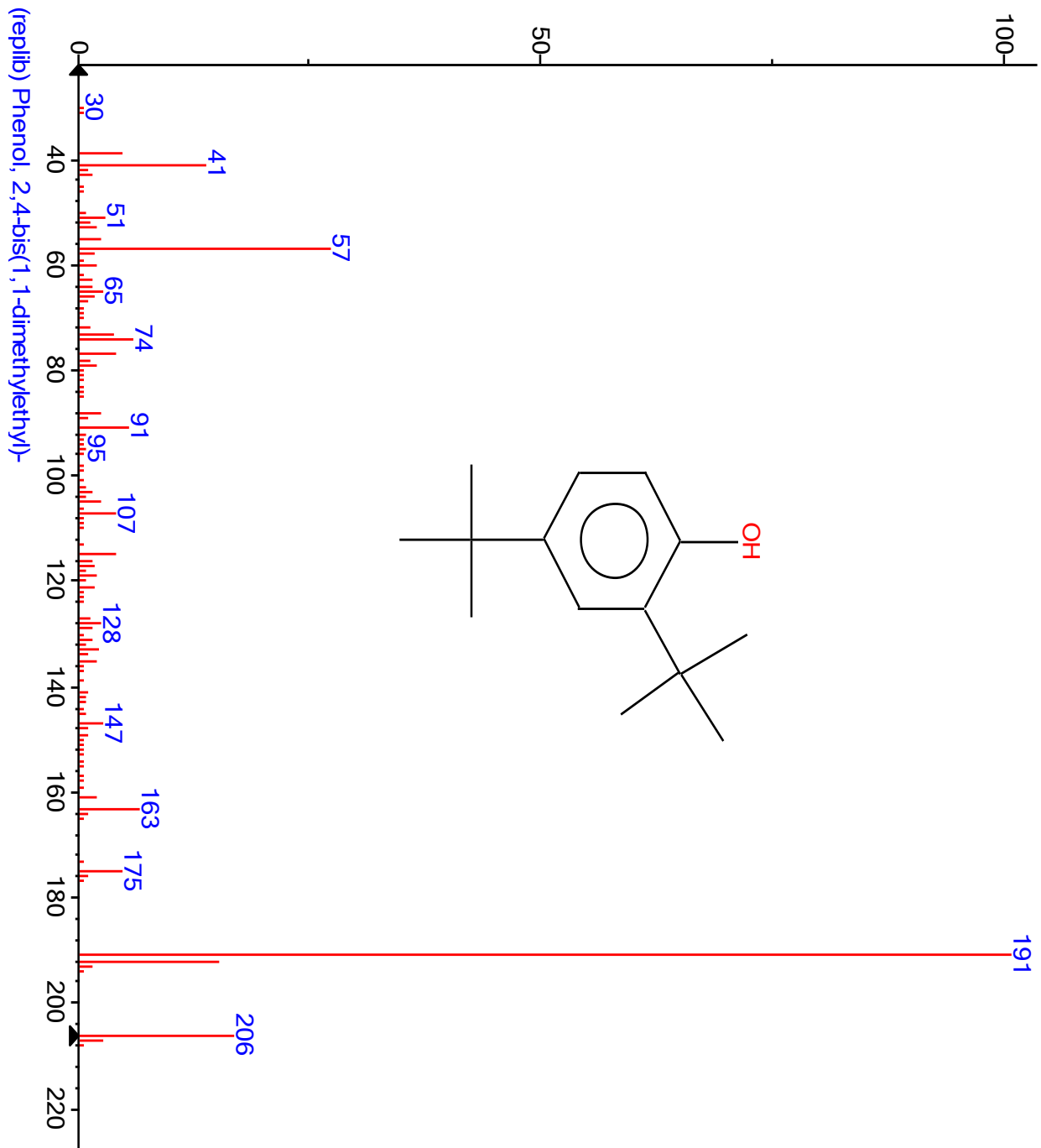


Figura 16. Análisis por CG-EM del extracto de DSS de la fruta *P. granatum*.