



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Extracción asistida por ultrasonido/microonda y evaluación de las propiedades funcionales de compuestos bioactivos de cáscara de granada (*Punica granatum* L.)

Ultrasound/Microwave assisted extraction and evaluation of functional properties of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.)

Valero-Mendoza, A.G.¹, Meléndez-Rentería, N.P.², Chávez-González, M.L.¹, Flores-Gallegos, A.C.¹, Govea-Salas, M.¹, Wong-Paz, J.E.³, Zugasti-Cruz, A.¹, Ascacio-Valdés, J.A.^{a*}

¹Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioproductos. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila; C. P. 25280 Saltillo, Coahuila.

²Centro de Investigación y Conservación de la Biodiversidad y Ecología de Coahuila, Universidad Autónoma de Coahuila, C. P. 27640 Cuatro Ciénegas, Coahuila.

³Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ciudad Valles S.L.P. C. P. 79060 Cd. Valles, S.L.P.

a.valero@uadec.edu.mx; paola.melendez@uadec.edu.mx; monicachavez@uadec.edu.mx;
adrianaflores@uadec.edu.mx; m.govea.salas@uadec.edu.mx; jorge.wong@uaslp.mx;
alejandrozugasti@uadec.edu.mx; *albertoascaciovaldes@uadec.edu.mx

Innovación tecnológica: Uso de tecnologías verdes para obtención de compuestos bioactivos naturales.

Área de aplicación industrial: farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Recibido: 24 mayo 2022

Aceptado: 14 noviembre 2022

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a tropical and subtropical fruit native to Asia that has been researched in recent years due to the bioactive compounds it possesses. It is estimated that the pomegranate juice extraction processing industry produces approximately 1.9 million metric tons of pomegranate peel worldwide as agro-industrial waste since only the arils are used and the peel, which comprises about 50% of the total weight of the fruit, it is discarded. This residue can be used due to the higher content of the phenolic compounds, that has demonstrated high antioxidant capacity among other biological activities such as antimicrobial and antiviral.

In this work, emerging technologies such as microwave, ultrasound, and hybridization of both techniques were experimented with for the extraction of bioactive compounds from pomegranate

peel. The results show that extraction with hybrid technology yielded the highest polyphenolic content (377.77 mg GAE/g dried pomegranate peel). HPLC/MS/ESI analysis showed that punicalagin, punicalin, and ellagic acid are the major compounds present in the pomegranate peel. These compounds reveal positive results from the biological assays, namely the antioxidant activity evaluated by DPPH and ABTS assays, which showed a high antioxidant capacity with 79.31% and 100% respectively. As well as the antimicrobial activity with *E. coli* and *Salmonella* spp. with inhibition diameters of 8.40 mm and 4.18 mm. It also proved the influence on stimulating the growth of the bacterium *Lactobacillus brevis*. Finally, the phenolic compounds recovered from the pomegranate peel showed no activity as a result of the cell toxicity tests. Being all this set of results favorable and promising for the manufacture of products in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries.

Key words: Emerging technologies, biological activities, Industrial application.

Resumen

La granada (*Punica granatum* L.), es una fruta tropical y subtropical originaria de Asia que ha sido investigada en los últimos años, debido a los compuestos bioactivos que posee. Se estima que la industria del jugo de granada produce en todo el mundo aproximadamente 1.9 millones de toneladas métricas de cáscara de granada, como residuos agroindustriales, ya que sólo se utilizan los arilos y se deshecha la cáscara, que comprende alrededor del 50% del peso total de la fruta. Este residuo puede utilizarse, debido a que contiene una alta concentración de compuestos fenólicos, los cuales han demostrado poseer alta capacidad antioxidante, entre otras actividades biológicas tales como la antimicrobiana y la antiviral.

En este trabajo se experimentaron tecnologías emergentes como el microondas, el ultrasonido y la tecnología híbrida de ambas técnicas; en la extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de granada. Los resultados muestran que la extracción con tecnología híbrida consiguió el mayor contenido polifenólico (377.77 mg GAE/g de cáscara seca de granada). El análisis HPLC/MS/ESI mostró que la punicalagina, la punicalina y el ácido elágico son los compuestos mayoritarios presentes en dicha cáscara. Estos compuestos obtuvieron resultados positivos en los ensayos biológicos, a saber, la actividad antioxidante evaluada por los ensayos de DPPH y ABTS mostraron un resultado favorecedor con un 79.31% y 100%, respectivamente, de capacidad antioxidante. La actividad antimicrobiana con *E. coli* y *Salmonella* spp. resultó con diámetros de inhibición de 8.40 y 4.18 mm. También demostró tener un efecto para el estímulo de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus brevis*. Para finalizar, los compuestos fenólicos recuperados de la cáscara de granada no mostraron actividad como resultado de los ensayos de toxicidad celular. Siendo todo este conjunto de resultados favorecedores y prometedores para la fabricación de productos en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Palabras clave: Tecnologías emergentes, Actividades biológicas, Aplicación industrial.

1. Introducción

La granada (*Punica granatum* L.), ha sido un cultivo utilizado por la humanidad desde la antigüedad y pertenece a la familia *Punicaceae*, que crece en regiones tropicales y subtropicales [1]. Es originaria de Irán, pero se cultiva principalmente en India, Túnez y Turquía [2,3]. La producción mundial de granada se estimó en 3.8 millones de toneladas métricas en 2017. Siendo India el mayor productor con 234.000 hectáreas y una producción de 2.84 millones de toneladas métricas [3]. En México, el granado se cultiva en los estados de Oaxaca, Morelos, Guanajuato e Hidalgo, que representan más del 50% de la producción de granada [4]. La granada se consume generalmente en fresco, sin embargo, su uso ha aumentado debido su delicioso sabor, ya que ha ganado la aceptación del consumidor, incrementando la producción de vinos, jaleas y mermeladas [5]. En consecuencia, la cantidad de subproductos de granada también se ha ido aumentando, dado que se estima que la industria del zumo de granada genera en todo el mundo aproximadamente 1.9 millones de toneladas métricas de cáscara de granada [3]. La porción comestible representa el 50% del peso total y el 50% restante correspondiente a la cáscara. Esto se convierte en una problemática medio ambiental, debido a que, al representar la mitad del fruto, se acumula como residuo, que podría tener aplicaciones para su mayor aprovechamiento. Estudios previos han demostrado que los residuos de frutas tienen importantes e incluso actividades biológicas, con alta efectividad. Un hallazgo que sirve como referencia, ha sido la semilla de uva. Se ha reportado de manera *in vitro* que las proantocianinas promueven la apoptosis de las células de cáncer de colon (a través de la vía mitocondrial) [6]. Los resultados de otro estudio demostraron que los subproductos de la industria frutícola son una fuente prometedora de aceite de semilla de sandía

(*Citrullus lanatus*), melón dulce (*Cucumis melo*), espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*), grosella roja (*Ribes rubrum*), granada (*Punica granatum*), membrillo japonés (*Chaenomeles japonica*), uva (*Vitis vinifera*), grosella espinosa (*Ribes uva-crispa*) y manzana (*Malus domestica*); dónde cada uno de los nueve aceites de semilla recuperados de diferentes especies de fruta, tenía una composición y concentración únicas de ácidos grasos, fitoesteroles y escualeno [7]. Esta información sirve de referencia a este trabajo para darle paso a los subproductos a nuevas aplicaciones. La cáscara de granada ha sido objeto de estudio demostrando que se puede usar en distintas aplicaciones. Este residuo contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos como los flavonoides (catequinas y antocianinas). Además, es rica en taninos hidrolizables, especialmente elagitaninos; isómeros de punicalagina, que son los polifenoles más comunes en esta fruta y constituyen hasta el 85% (p/p) de los taninos presentes en la cáscara de la granada [8,9]. Estas moléculas son reconocidas en la literatura por poseer un gran efecto terapéutico, por ejemplo, capacidad antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antiviral y anti-obesidad [10,11,12]. También se ha informado de que la cáscara de granada ejerce efectos antiproliferativos contra líneas celulares de cáncer de mama, colon e inhiben el crecimiento células de cáncer de próstata [13,14,15]. Otra actividad biológica estudiada de la cáscara de granada ha sido la actividad antimicrobiana. Los extractos de cáscara de granada se han estudiado como agentes eficaces para tratar o prevenir diferentes infecciones causadas por distintos patógenos como, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* [16,17].

Las tecnologías verdes tienen la finalidad de extraer compuestos fenólicos en un menor tiempo, y la utilización de menos solventes.

Los compuestos recuperados pueden ser aplicados ya sea en el área farmacéutica, cosmética o alimentaria. En el pasado, se utilizaban procesos de extracción convencionales, tales como la extracción con solventes, sin embargo, éstos poseen desventajas que afectan la calidad de los compuestos y elongan los tiempos de extracción. En la actualidad, se ha reportado el uso de extracciones verdes, tales como: extracción asistida por ultrasonido, microondas, y la tecnología híbrida de ultrasonido y microondas. La extracción asistida por ultrasonido (UAE) logra la extracción de fitoquímicos en menor tiempo, a baja temperatura, con menor requerimiento de energía y de solventes [18]. Las ondas de ultrasonido inducen la disrupción en el tejido vegetal, a través de las fuerzas físicas desarrolladas durante la cavitación acústica y ayudan a liberar los componentes extraíbles en el disolvente [19]. La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica de calentamiento sin contacto que ayuda a reducir el gradiente térmico y a acelerar la transferencia de energía. Las microondas pueden asociarse con los ultrasonidos, una combinación que puede actuar como una tecnología híbrida emergente denominada extracción asistida por ultrasonidos/microondas (U/M-AE). La U/M-AE, comparada con los métodos convencionales, tiene más ventajas, al reducir el tiempo de extracción, dar mayores rendimientos y consumir menor cantidad de solventes [20]. Esto da paso a las nuevas tecnologías, debido a las ventajas que ofrecen con respecto a los métodos convencionales, para procesos que aceleren la recuperación de moléculas con alta bioactividad.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue, extraer e identificar los compuestos presentes en la cáscara de granada mediante el uso de ultrasonidos, microondas y tecnologías emergentes híbridas, así como comparar la efectividad de extracción de estos tres

métodos. Además de caracterizar las propiedades funcionales de estos compuestos en términos de actividades antioxidante, prebiótica, antimicrobiana y anti hemolíticas para futuras aplicaciones en las industrias, alimentaria, farmacéutica y cosmética.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de la materia prima

Las granadas (*Punica granatum* L.) se obtuvieron de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Dichas granadas fueron lavadas y los arilos fueron separados de la cáscara. Las cáscaras se secaron a 50 °C durante 48 h dentro de una estufa de secado por flujo de aire laminar, para reducir el contenido de humedad. Posteriormente se molieron y tamizaron a un tamaño de partícula de 0,6-0,8 mm. Las muestras se empaquetaron en bolsas de plástico y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

2.2. Extracción de polifenoles

Los extractos se obtuvieron mediante tres tecnologías emergentes: MAE, UAE, y la tecnología híbrida de las tecnologías anteriores, para conservar un aspecto más ecológico y limpio en el proyecto. Las condiciones utilizadas para la extracción con las tres tecnologías fueron definidas previamente por el grupo de trabajo de Hernández-Hernández *et al.* [20]. En las tres extracciones se utilizó agua como disolvente con una relación masa/volumen de 1:16 (un litro de agua y 62.5 g de polvo de cáscara de granada). Para la EAU, el equipo se hizo funcionar a una frecuencia de 25 kHz durante 20 minutos. En el caso de la MAE, el equipo se operó a 2450 MHz y el tiempo de extracción fue de 5 min hasta alcanzar una temperatura objetivo de 70 °C, manteniendo así los compuestos polifenólicos intactos, ya que no se vieron afectados, debido al bajo tiempo de exposición a la alta temperatura. Los periodos prolongados de altas temperaturas pueden conducir a la

degradación y pérdida de rendimiento y calidad. Las extracciones del contenido polifenólico mediante la combinación de ultrasonidos y extracción asistida por microondas se realizaron con un sistema de tecnología híbrida, es decir, la estación de trabajo cooperativa de ultrasonidos/microondas (Nanjing ATPIO Instruments Manufacture Co., Ltd. Company, Nanjing, China). Para la extracción asistida por híbridos, se emplearon a la vez las mismas condiciones utilizadas para las extracciones asistidas por ultrasonidos y por microondas. Todos los extractos se filtraron por papel, se conservaron y se almacenaron con protección de luz hasta sus posteriores análisis.

2.3. Determinación del contenido total de polifenoles

El contenido de polifenoles condensados e hidrolizables en los extractos de cáscara de granada se cuantificó mediante los métodos de HCL-Butanol y Folin-Ciocalteu [21], respectivamente. El experimento se realizó por triplicado de cada tratamiento. Como estándares de referencia se utilizaron catequina (taninos condensados) y ácido gálico (taninos hidrolizables) en una curva de calibración para cada familia. El contenido total de polifenoles se obtuvo con la suma de polifenoles hidrolizables y condensados.

2.4. Separación y purificación parcial de las fracciones de polifenoles

La separación de las fracciones fenólicas de la cáscara de granada con Amberlite XAD-16 se preparó siguiendo la metodología definida por Ascacio-Valdés *et al.* [22]. Se utilizó la resina Amberlita XAD-16 en una columna de cromatografía. Los extractos polifenólicos se pasaron por la columna empleando agua destilada como eluyente. Posteriormente, se utilizó etanol para recuperar la fracción fenólica. La fracción fenólica obtenida se

sometió a una estufa a 50 °C para la recuperación de los compuestos en polvo.

2.5. Identificación por HPLC/ MS

La identificación de los compuestos fenólicos obtenidos del extracto de cáscara de granada se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con el método descrito por Hernández-Hernández *et al.* [20]. El polvo recuperado del extracto de cáscara de granada que contiene polifenoles se preparó en una solución de 2000 partes por millón (ppm). La solución se filtró usando membranas de nylon de 0.45 μm . Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa en un sistema HPLC marca Varian, que incluía un automuestreador (ProStar 410, Varian, Palo Alto, CA, EE.UU.), una bomba ternaria (ProStar 230I, Varian, Palo Alto, CA, EE.UU.) y un detector PDA (Photo Diode Array, ProStar 330, Varian, Atlanta, GA, EE.UU.).

También se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica de cromatografía (Varian 500-MS I.T. Mass Spectrometer, Palo Alto, CA, USA) equipado con una fuente de iones de electrospray, acoplado al sistema HPLC. Las muestras (5 μl) se inyectaron en una columna Denali C18 preequilibrada (150 mm \times 2.1 mm, 3 μm , Grace, Albany, OR, EE.UU.) y la temperatura del horno se mantuvo a 30 °C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2%, v/v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: 3% B de 0 a 5 min, 9% B lineal de 5 a 15 min, 16% B lineal de 15 a 45 min y 50% B lineal de 45 a 60 min. A continuación, se lavó y reacondicionó la columna. La velocidad de flujo se mantuvo en 0.2 mL/min, y la elución se monitorizó a 245, 280, 320 y 550 nm para los compuestos de interés. Todo el efluente (0.2 mL/min) se inyectó posteriormente en la fuente del espectrómetro de masas (MS) sin dividirlo.

Todos los experimentos de se llevaron a cabo en el modo negativo. Se utilizó nitrógeno [M-H] como gas nebulizador y helio como gas de amortiguación. Los parámetros de la fuente de iones fueron los siguientes 5,0 kV de tensión de nebulización, 90.0 V de tensión capilar y 350 °C de temperatura. Los datos se recogieron y procesaron con el software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en modo de barrido completo adquirido en el rango m/z 50-2000. Los análisis MS/MS se realizaron sobre una serie de iones precursores seleccionados. Posteriormente, los compuestos se compararon utilizando una base de datos de compuestos bioactivos (base de datos WorkStation versión 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, USA).

2.6. Actividad antioxidante anión radical

2,2-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺)

La actividad antioxidante total de los polifenoles recuperados de cáscara de granada se determinó mediante el ensayo ABTS⁺ de acuerdo con el método de Stämpfli, *et al.* [23] con ligeras modificaciones. Se formó ABTS⁺ mezclando solución madre de ABTS⁺ (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM) en agua destilada y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12-16 h. El ensayo se realizó en celdilla de 2000 µl. La reacción se inició mezclando 100 µL de la solución de muestra o Trolox diluido con 900 µL de ABTS⁺ diluido (absorbancia 0.7 a 734 nm). La disminución de la absorbancia se midió a 734 nm después de 1 minuto de incubación de cada celda. El efecto de eliminación se expresó como porcentaje de actividad de eliminación de radicales con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ABTS} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

(Ec. 1)

2.7. Actividad antioxidante por 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

Para la actividad de eliminación de radicales DPPH, el método utilizado se basa en el método de Molyneux, [24] con algunas modificaciones. La solución de DPPH se preparó en metanol a una concentración de 60 mM. Se utilizó metanol como blanco de lectura. Se colocaron en una microplaca de 96 pocillos 7 µL de cada muestra y 193 µL de radical DPPH. Las muestras se taparon y se incubaron por 30 minutos protegidas de la luz. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm (espectrofotómetro de microplacas Epoch, Bio Tek, Winooski, VT, EE. UU.). El efecto de barrido de radicales DPPH se expresó, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\% \text{ DPPH} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

(Ec. 2)

2.8. Evaluación del efecto prebiótico

La estimulación del crecimiento de las bacterias probióticas por los compuestos fenólicos presentes en el extracto se evaluó como se llevó a cabo según la metodología de Estrada-Gil *et al.* [25]. Se utilizó la cepa bacteriana prebiótica *Lactobacillus brevis*. La cepa pertenece a la colección de cepas del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. Esta cepa bacteriana fue activada en medio de cultivo MRS e incubada a 37 °C durante 24 h. El día del experimento, el cultivo bacteriano en crecimiento exponencial fue diluido en solución salina estéril hasta una concentración final de 1.5×10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los experimentos se llevaron a cabo en caldo MRS sin glucosa y fue complementado con los polifenoles en polvo de cáscara de granada (PCG). Cada pocillo se inoculó con 4.17 µl de cada suspensión bacteriana (1.5 X

10^8 UFC/mL) y diluciones seriadas de (PCG) (31.25, 62.5, 125, 250, 500 1000 ppm). Las

placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Los tratamientos se hicieron por triplicado.

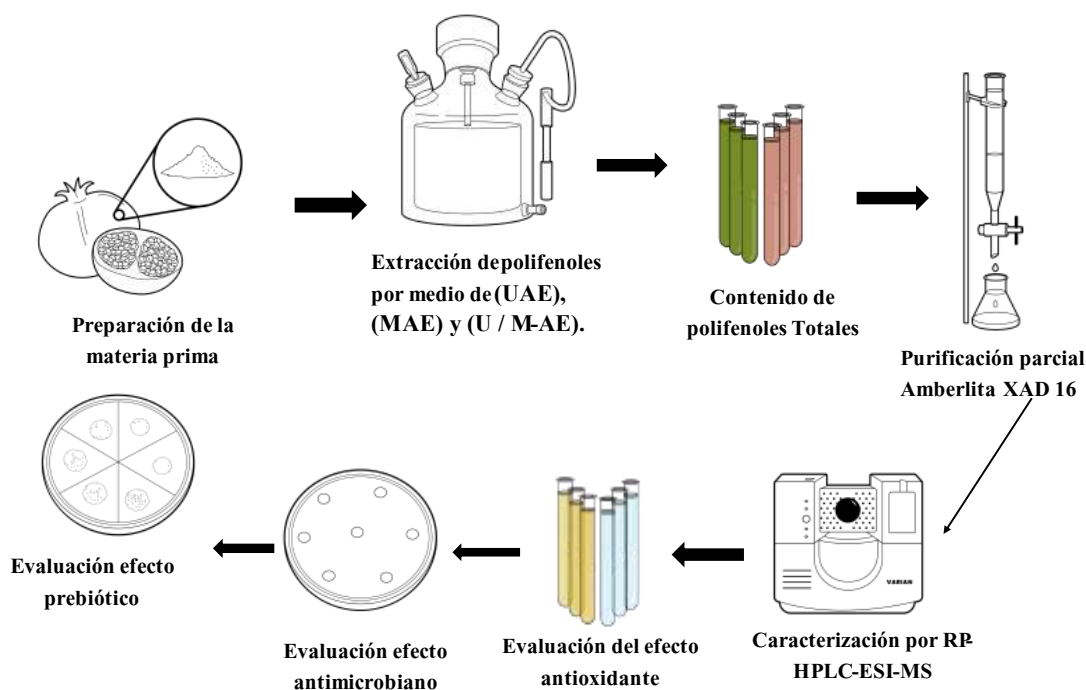


Figura 1. Diagrama de flujo de los ensayos que se llevaron a cabo: Preparación de la materia prima para la obtención de polvo de cáscara de granada, proceso de extracción por ultrasonido (UAE), microondas (MAE) e hibridación de las tecnologías ya mencionadas (U/M-AE), determinación del contenido fenólico por Folin-Ciocalteu y HCl-Butanol, purificación parcial Amberlita XAD 16 (selección de la fracción etanólica), caracterización por HPLC-ESI-MS y evaluación de propiedades biológicas (actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y actividad prebiótica).

2.9. Actividad antimicrobiana por ensayo de difusión de agar (ADA)

Se determinó la actividad antimicrobiana de las diluciones de polifenoles de cáscara de granada contra patógenos como *Escherichia coli*, y *Salmonella typhi*, según Venegas-Ortega *et al.* [26] con algunas modificaciones. Se inocularon las bacterias en agar Soya Trypticaseína y se realizó un ajuste de inóculo a estándares de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). Una vez solidificado el agar, se perforaron orificios de aproximadamente 7 mm, se agregaron 50 μ l de cada disolución en cada pocillo por triplicado, además de añadir el agua como control negativo y antibiótico (Tetraciclina) como control positivo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h y se midieron las zonas despejadas alrededor de los pocillos

para calcular la actividad antimicrobiana, que se expresó como unidades arbitrarias (AU) con la siguiente ecuación:

$$AU = \frac{\text{Área de inhibición (mm)} - \text{Área de pozo (mm)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}} \quad (\text{Ec 3})$$

2.10. Determinación de la actividad hemolítica en eritrocitos humanos aislados

Se determinó la actividad hemolítica en eritrocitos humanos aislados según Nubi *et al.* [27], con algunas modificaciones. Se extrajo sangre de un voluntario sano y no fumador, por punción venosa, del brazo, siguiendo los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, para estudios donde se utilizan muestras humanas. La sangre se colectó en tubos Vacutainer con

citrato de sodio como anticoagulante. La muestra fue centrifugada a 2500 rpm durante 4 minutos a 4 °C. El pellet de eritrocitos fue lavado tres veces con una solución Alsever (pH 6.4). Una vez que se obtuvo el pellet de eritrocitos lavados, se preparó una dilución 1:99. Se agitó suavemente hasta formar una suspensión homogénea que sirvió de base para las pruebas de hemólisis. Para cada prueba se realizaron dos experimentos y cada uno por triplicado, teniéndose además de las muestras de estudio, un control negativo (eritrocitos en la solución Alsever sin la muestra experimental) y un control positivo (eritrocitos colocados en agua destilada para obtener el 100% de hemólisis). Se procedió a incubar las muestras de sangre con dosis crecientes del extracto de las diluciones de polifenoles de cáscara de granada (0, 125, 250, 500 y 1000 g/ml) por 60 minutos de incubación a 37 °C. Una vez terminado el tiempo, se centrifugaron los tubos para separar el sobrenadante, del cual se colocó 1 ml en celdas multiplaca, para la determinación de la absorbancia a 415 nm.

Los resultados de la actividad hemolítica se cuantificaron de acuerdo con la Ec. 4.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs. Grupo experimental} - \text{Control-}}{\text{Control+} - \text{Control-}} \times 100$$

(Ec. 4)

2.11. Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre las muestras. El análisis de las medias se realizó mediante el procedimiento LSD Fisher a $p < 0.05$ utilizando el software Infostat versión 2020.

3. Resultados y Discusión

3.1. Polifenoles totales

Se utilizaron tres tecnologías de extracción UAE, MAE y (U/M-AE), definiendo una extracción con base a la eficiencia en la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de cáscara de granada.

Tabla 1. Contenido polifenólico del extracto de cáscara de granada.

	Hidrolizables	Condensados
UAE	109.33 ± 30.55 ^b	27.97 ± 0.16 ^a
MAE	119.82 ± 1.32 ^b	36.55 ± 3.88 ^a
(U/M-AE)	345.33 ± 72.03 ^a	34.36 ± 3.56 ^a

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. En cada columna, los valores seguidos de letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de Fischer ($P \leq 0.05$).

La evaluación se llevó a cabo por los ensayos de Folin-Ciocalteu y HCl-Butanol. La combinación de las tecnologías UAE y MAE mostró un mayor efecto para extraer polifenoles hidrolizables. Por otro lado, el contenido polifenólico condensado, a diferencia de los polifenoles hidrolizables obtuvo concentraciones en un rango inferior, ya que no existió diferencia significativa entre ninguna tecnología. Sin embargo, los métodos de extracción analizados y los resultados muestran que hay una diferencia

significativa entre la tecnología U/M-AE), MAE y UAE en los resultados de polifenoles totales. Los resultados del contenido de taninos hidrolizables y condensados se pueden observar en la tabla 1.

Los resultados determinaron que la tecnología (U/M-AE), fue la tecnología de mayor rendimiento, ya que fue significativamente diferente de las otras dos tecnologías, mientras que no se pudieron

encontrar diferencias significativas entre los resultados de UAE y MAE.

Considerando los resultados del contenido, se puede observar que el mayor contenido total se encuentra en la extracción (U/M-AE), la extracción por el método híbrido obtuvo un rendimiento de 377.77 GAE/g de materia seca de polifenoles solubles totales indicando que el 91.42% de los polifenoles totales corresponden a los hidrolizables. Comparado

con los estudios realizados por Seeram *et al.* [28], quienes reportaron un porcentaje de 85% (p/p) de los isómeros de punicalagina que constituyen el peso total de taninos hidrolizables. De acuerdo con los resultados antes mencionados, las tecnologías verdes de extracción tienen mayor eficacia para la recuperación de compuestos bioactivos, con lo que se observó que la combinación de las tecnologías UAE y MAE mostró un gran potencial para la extracción de polifenoles.

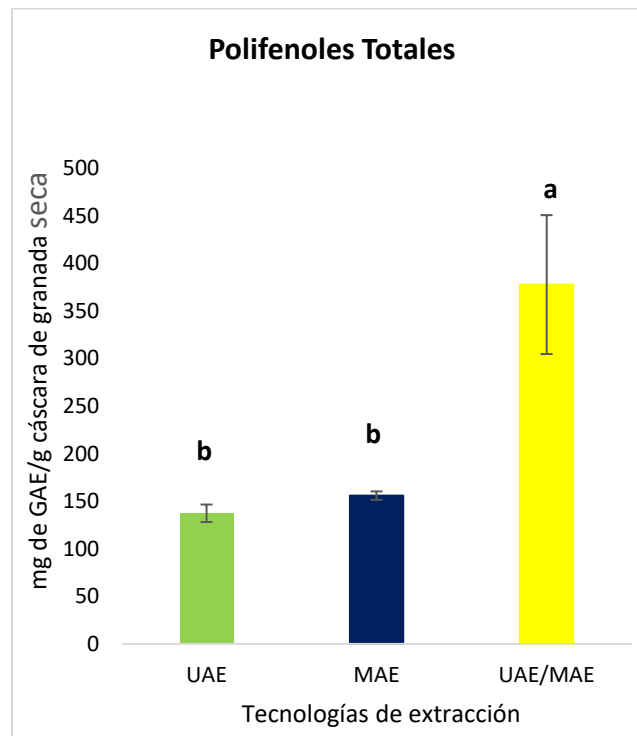


Figura 2. Contenido polifenólico total del extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$). Proceso de extracción por ultrasonido (UAE), microondas (MAE) e hibridación de las tecnologías ya mencionadas (U/M-AE).

El contenido polifenólico encontrado en la extracción híbrida de la cáscara de granada demostró ser mayor que el encontrado en otras frutas. Estrada-Gil *et al.* [25] realizaron una extracción de polifenoles de cáscara de rambután mexicano, utilizando la tecnología obtuvieron un rendimiento de extracción dos veces menor con respecto a la cáscara de granada. Ordoñez-Torres *et al.* [29], también se realizaron extracciones por medio de una tecnología de extracción híbrida, con un

resultado de un mejor rendimiento de extracción en comparación con los resultados obtenidos por las tecnologías convencionales. En otro estudio realizado por More & Arya [30] extrajeron compuestos bioactivos de cáscara de granada con una tecnología asistida por ultrasonidos pulsados (PUAE), para intensificar la eficacia de extracción, en la cual obtuvieron como resultado 177.54 mg de GAE/g de materia seca de polifenoles. Esto indica que la tecnología híbrida

empleada en el presente trabajo obtuvo un resultado dos veces mayor. La razón de este fenómeno podría deberse a que, con la ayuda de la cavitación acústica y el calentamiento rápido seleccionado de las microondas, la extracción mejoró de forma evidente [31], además de reducir los tiempos y con ello dar como resultado mayor concentración de contenido fenólico. El tiempo es una cuestión que se debe tomar en cuenta para la extracción de compuestos de interés, autores han reportado que en tiempos más cortos obtuvieron mejores resultados en la extracción de compuestos de cáscara de mango, esto es de gran importancia desde un punto de vista de sostenibilidad, ya que se ahorra mayor cantidad de energía [29].

Por consiguiente, una tecnología combinada, ha resultado en mayor eficacia a la hora de recuperar compuestos bioactivos como se demostró en el presente trabajo; por lo que para el resto de los análisis de la presente investigación se seleccionó la tecnología U/M-AE.

3.2. Identificación de los polifenoles de la cáscara de granada

Los compuestos presentes en el extracto de cáscara de granada se recuperaron por medio de la tecnología de (U/M-AE). El extracto fue sometido a una purificación parcial y analizado mediante HPLC/ESI/MS que permitió la identificación de los compuestos reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto polifenólico de la cáscara de granada.

Tiempo de Retención	Masa	Compuesto	Familia
3.39	316.8	Hidroxitirosol4-O-glucósido	Tirosoles
4.03	195.0	3,4-DHPEA-AC	Tirosoles
5.26	330.9	Acido gálico 4-O-glucosido	Ácidos hidroxibenzoicos
6.95	480.9	HHDP-hexósido	Elagitaninos
12.635	780.9	Punicalina	Elagitaninos*
13.557	706.9	(-)-Epicatequina-(2a-7) (4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido	Dímeros de proantocianidina
14.258	1082.6	Punicalagina	Elagitaninos*
15.144	1082.6	Punicalagina	Elagitaninos*
20.537	462.9	Ácido elágico-hexósido	Elagitaninos
26.707	300.9	Ácido elágico	Dímeros de ácido hidroxibenzoico

*compuestos mayoritarios presentes en el extracto.

La purificación parcial del extracto de cáscara de granada fue realizada por Amberlita XAD-16 y se eluyó con etanol, produciendo (5.12%) de rendimiento de polvo de extracto polifenólico. En un estudio por Aqil *et al.* [32] obtuvieron 2.7% de rendimiento, por lo que el resultado en el presente trabajo es 2 veces más alto. La amberlita XAD-16 es una resina no iónica que permite la separación de los compuestos de interés por su contraste de

polaridad de los compuestos no polares. La columna permite que los compuestos no deseados como carbohidratos, interfieran en la identificación y caracterización de los compuestos objetivo.

Se detectó la punicalagina como el compuesto mayoritario, seguido de los compuestos punicalina, epicatequina y ácido elágico hexósido, estos compuestos han sido

identificados previamente en la cáscara de la granada y han sido estudiados por su amplia variedad de propiedades biológicas.

De acuerdo a un estudio realizado por Sepúlveda *et al.* [33] donde trabajo con fermentación sólida para la purificación de ácido elálgico (EA), identifico por medio de HPLC/ESI/MS punicalagina (1082,97 m/z), punicalina (780,99 m/z) y ácido elálgico (300,80 m/z). Otro estudio por Muñiz-Márquez *et al.* [4] donde realizaron una extracción asistida por ultrasonidos de EA a partir de cáscara de granada. Se confirmaron como compuestos mayoritarios los elagitaninos llamados punicalagina y EA respectivamente que al igual que en el presente estudio pudieron ser identificados.

Por otro lado en otro estudio Gosset-Erard *et al.* [34] demostraron que los extractos de cáscara de granada estaban formados principalmente por compuestos fenólicos como las pedunculaginas I y II, el ácido elálgico, el ácido elálgico-O- pentósido y las punicalaginas α , sin embargo se identificaron compuestos como pedunculaginas I y II que no fueron reconocidos en este estudio. Cabe destacar que, en los tres estudios, los compuestos mayoritarios fueron también la punicalagina, punicalina y ácido elálgico, sin embargo, la identificación de otros compuestos puede ser atribuida a la variedad de granada que se utilizó, ya que en el previo estudio se analizaron dos variedades de granada originarias de Marruecos y Turquía. Estos resultados están relacionados con las diferentes composiciones fitoquímicas entre plantas de diferentes variedades y/o regiones geográficas, ya que el clima y el tipo de suelo también tienen una influencia en el crecimiento y composición química del cultivo.

3.3. Ensayos antioxidantes

Los ensayos antioxidantes se realizaron exclusivamente con el contenido polifenólico extraído de la cáscara de granada sometida a una extracción híbrida. Para estudiar la capacidad antioxidante de dicho extracto de cáscara, se utilizó la actividad de barrido ABTS y DPPH. En este caso, la actividad antioxidante se determinó mediante el porcentaje de inhibición.

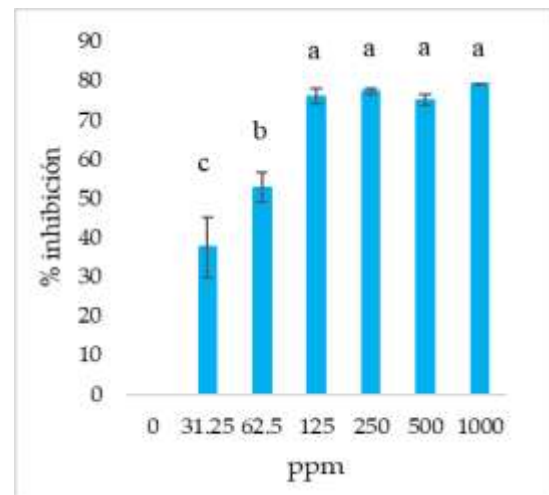


Figura 3. Prueba DPPH de las diferentes concentraciones de polifenoles de extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$).

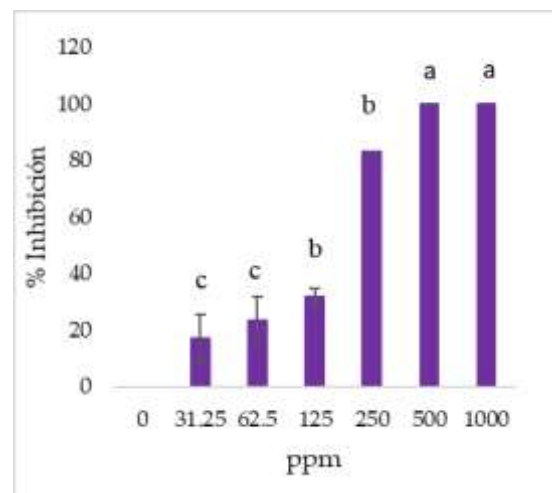


Figura 4. Prueba ABTS de las diferentes concentraciones de polifenoles de extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$).

Los resultados de la actividad antioxidante con DPPH se observan en la figura 3, los polifenoles a una concentración de 1000 ppm (79.18%) y 500 ppm (75.22%) no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero si se diferenciaron de las demás concentraciones. Mientras tanto la correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante por DPPH es positiva, es decir hay una relación directa entre la concentración y la actividad. El extracto tuvo una mejor actividad antioxidante en el ensayo ABTS (figura 4), en la cual hubo diferencias significativas en las concentraciones más altas donde se obtuvo en 1000 y 500 ppm (100%), resultados diferentes de correlación fueron los reportados por Kaderides *et al.* [35], dónde usó el método de DPPH, los resultados de la efectividad de barrido de radicales, de los extractos de cáscara de granada optimizados para MAE y UAE fueron del 94.91% y 94.77%, respectivamente. Otro estudio reportado por More & Arya [29] en el cual trabajaron con el extracto obtenido por extracción por ultrasonido optimizada, obtuvieron resultados de 81.67% y 76.50% de inhibición utilizando los reactivos DPPH y ABTS respectivamente. Kennas *et al.* [36] obtuvieron resultados del extracto crudo de cáscara de granada para aumentar la capacidad antioxidante en yogurt, dónde se presentaron valores de 40 y 65 %, estas diferencias pueden ser atribuidas a otros compuestos como carbohidratos presentes que pueden interferir en la interacción de los polifenoles con los radicales.

En este estudio los polifenoles recuperados de la cáscara de granada poseen presumiblemente una alta actividad antioxidante. Los resultados obtenidos anteriormente, son atribuidos a la presencia de elagitaninos hidrolizables, que fueron identificados anteriormente como compuestos mayoritarios: punicalagina, punicalina y el ácido elágico, lo que

concuera con otros estudios recientes [37,38]. Algunos investigadores han reportado que la punicalagina y la punicalina tienen un alto grado de hidroxilación, y esto le podría otorgar una mayor capacidad de eliminación de radicales libres que el ácido elágico [38,39]. Dicha bioactividad puede estar implicada con la inhibición de enfermedades como el cáncer, ya que en el cuerpo se producen naturalmente radicales libres, sin embargo, en altas concentraciones, los radicales libres pueden ser peligrosos para el cuerpo y pueden dañar todos los componentes principales de las células [40]. Los polifenoles de cáscara de granada al poseer alta efectividad contra estas moléculas interactúan con los radicales libres y los neutralizan, lo que les impide causar daño, por lo que los resultados con los ensayos antioxidantes demuestran que pueden tener efectos positivos en el uso como antioxidantes [41].

3.4. Evaluación del efecto antimicrobiano

La tabla 3 contiene los resultados del efecto antimicrobiano de *Salmonella*. El control positivo tuvo un halo de inhibición de 8.23 mm, mientras que las concentraciones de extracto de polifenoles de cáscara de granada tuvieron una correlación positiva con la actividad antimicrobiana. Es decir, a mayor concentración mayor halo de inhibición, siendo significantes las diferencias entre el control positivo (8.23 mm) y las diferentes concentraciones evaluadas (4.47 mm para 500 ppm y 8.40 mm para 1000 ppm). El efecto contra *Escherichia coli* (tabla 3) muestra un comportamiento similar, debido a que se sigue la misma tendencia, a mayor concentración mayor halo de inhibición, siendo significantes las diferencias entre el control positivo, el halo de inhibición de (2.1 mm), mientras que las concentraciones de extracto de cáscara de granada tuvieron una semejanza positiva con la actividad antimicrobiana, teniendo diferencias

significativas (4.18 mm para 1000, 2.70 mm para 250 y 1.45 mm para 250 ppm). Resultados diferentes fueron reportados por Al-Zoreky *et al.* [42] quienes tuvieron resultados de 16 mm de diámetro de inhibición, esta diferencia puede ser atribuida a que utilizaron metanol para diluir los polifenoles, debido a que el metanol es un fuerte antimicrobiano. Otro estudio realizado por Khan & Haneer [43] tuvieron resultados similares a este trabajo, debido a la utilización de tetraciclina como control positivo. Además, demostró que el extracto acuoso de cáscara de granada contra *Pseudomonas aeruginosa* tuvo un efecto de inhibición mayor comparado con el control positivo (tetraciclina). Otro estudio realizado por Harini *et al.* [44] donde trabajaron con seis microorganismos, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae y *Salmonella enteritidis*, donde *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser el patógeno alimentario con más resistencia al extracto de cáscara de granada en acetona. *Salmonella* y *Klebsiella* resultaron ser más susceptibles a los compuestos activos presentes en el extracto, dando como resultado diámetros de inhibición de 6.53 y 10.45 mm, respectivamente. Los extractos acuosos de cáscara de granada y jugo también han sido probados contra *Salmonella*. Los resultados han reportado que inhibe eficazmente el crecimiento de la bacteria [45]. Kharchoufi *et al.* [46] probaron con otros microorganismos como como *Penicillium digitatum*, *Pseudomonas putida* y *Saccharomyces cerevisiae*, los resultados demostraron una inhibición mayor con los extractos de cáscara de granada en metanol respecto al extracto acuoso, donde hubo una inhibición significativa entre los tratamientos.

Tabla 3. Diámetro de inhibición del crecimiento (mm) de los microorganismos objetivo por diferentes concentraciones de polifenoles de cáscara de granada.

Concentración ppm	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>
250	0 ± 0	1.45 ± 0.15 ^c
500	4.47 ± 0.35 ^b	2.70 ± 0.12 ^b
1000	8.40 ± 0.10 ^a	4.18 ± 0.18 ^a
Control positivo (tetraciclina)	8.23 ± 0.06 ^a	2.10 ± 0.06 ^b

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. En cada columna, los valores seguidos de letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de Fischer ($P \leq 0.05$).

La efectividad antioxidante y antimicrobiana de los taninos hidrolizables, condensados y de los flavonoides se rige por sus estructuras químicas [11]. Los compuestos mayoritarios identificados en este estudio por HPLC-MS, principalmente la punicalagina han sido estudiados previamente, la punicalagina ha sido extraída y ha sido probada su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* [47]. Este hallazgo está respaldado por los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los taninos hidrolizables [48,49]. Estos taninos poseen mecanismos inhibidores, que varían según sus estructuras como grupos hidroxilo fenólicos que

transportan los residuos de hidroxilo a los radicales libres, bloqueando así estas especies nocivas [45].

La estructura básica de anillos aromáticos otorga a los polifenoles una adaptación lipofílica. Los polifenoles lipofílicos pueden interactuar y cambiar la permeabilidad e integridad de las membranas celulares bacterianas. Esto dependiendo de las variaciones en las estructuras de la superficie celular entre las especies Gram-negativas y Gram-positivas Cetin-Karaca & Newman. [50]. Siendo las Gram-positivas más susceptibles a la acción de los ácidos

fenólicos que las bacterias Gram-negativas [51,52]. Además, otros autores reportan que la catequina, una sustancia polifenólica predominante en la cáscara de la granada, puede también inhibir el crecimiento de las células bacterianas al dañar sus membranas celulares [53].

3.5. Evaluación del efecto prebiótico

Los ensayos prebióticos mostraron resultados diferentes para *Lactobacillus brevis*.

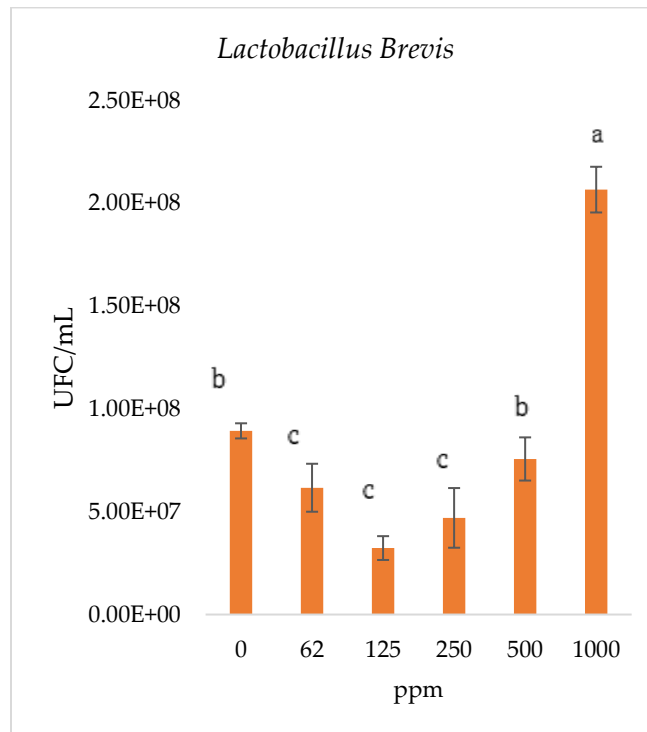


Figura 5. Crecimiento máximo y ratio de crecimiento máximo recogidos en el ensayo prebiótico. Se realizó una prueba de comparación de medias de Fischer en las concentraciones de polifenoles de cáscara de granada con la cepa bacteriana de *L. brevis* con un nivel de significación de ($P \leq 0.05$) lo que indica que hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

Es posible observar la tendencia de crecimiento de *L. brevis* con diferentes concentraciones de polifenoles de cáscara de granada (62, 125, 250, 500 y 1000 ppm), donde la mejor respuesta de crecimiento fue con la más alta concentración figura 5, la dilución de 1000 ppm obtuvo un crecimiento de 2.07×10^8 UFC/mL. Estrada-Gil *et al.* [25] trabajó con *Lactobacillus brevis* utilizando polifenoles extraídos de cáscara de rambután, no obtuvo crecimiento de esta bacteria, ya que la geranina el compuesto mayoritario en la cáscara de rambután mexicano, puede beneficiar selectivamente la proliferación de

ciertas bacterias probióticas, caso contrario a lo encontrado con los polifenoles de cáscara de granada, ya que estos pueden ejercer un mayor estímulo para el crecimiento de *Lactobacillus brevis*. Previos estudios han demostrado que los subproductos de granada, tales como el extracto de cáscara, mejora el crecimiento de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* así como la creación de ácidos grasos de cadena corta en medios inoculados con microflora fecal humana [54,55] obtuvieron un aumento en los recuentos de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* e inhibieron el crecimiento del grupo *B.*

fragilis, los clostridios y las enterobacterias en cultivos fecales *in vitro*. Otros autores corroboraron que los compuestos mayoritarios presentes en la cáscara de granada (punicalaginas, punicalinas, ácido gálico y ácido elágico) inhiben parcialmente el crecimiento de *Bifidobacterium animalis lactis* y de *Bifidobacterium bifidum*, mientras que el crecimiento de *Bifidobacterium brevis* y *Bifidobacterium infantis* se vio significativamente fomentado. Sin embargo, patógenos como *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium ramosum* y *Bacteroides fragilis* fueron fuertemente inhibidos por los elagitaninos [56].

Se ha evaluado, utilizando la digestión gastrointestinal simulada, la actividad prebiótica del zumo y la cáscara de granada con bacterias ácido-lácticas. Dando como resultado el aumento de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y garantiza la supervivencia de las bacterias del ácido lácticas que puede deberse al metabolismo de los elagitaninos, la catequina y la epicatequina [57]. Los polifenoles consiguen ser absorbidos en el intestino delgado, sin embargo, esto generalmente solo ocurre con aquellas estructuras que son mono o diméricas [58], después llega la liberación de agliconas que ingresan al revestimiento celular intestinal y se someten a

biotransformación, después de lo cual los productos metabólicos se pasan por todo el cuerpo o se excretan [59]. Probablemente el tamaño molecular de los polifenoles influye en la absorción de estos, debido a que los polifenoles de menor peso se absorben con mayor rapidez, mientras que los más complejos consiguen llegar al colon sin cambios, además de que estos sufren transformación enzimática (por las enzimas α -ramnosidasa, β -glucosidasa y β -glucuronidasa) por el microbioma intestinal, se rompen las estructuras de los compuestos que pueden ser absorbidos para ejercer un beneficio a la salud [60].

Conforme los resultados obtenidos por la prueba prebiótica, los polifenoles extraídos de la cáscara de granada muestran actividad prebiótica en todas las concentraciones, sin embargo, la mayor concentración mostró un mayor efecto de crecimiento.

3.6. Actividad hemolítica

Para validar el uso de plantas biológicamente activas, es necesario realizar ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo humano, ya que es un paso ineludible para poder integrar productor herbales en los sistemas de salud [56]. Esto con el fin de tener productos seguros, que no perjudiquen con efectos secundarios la salud.

Tabla 4. Actividad hemolítica los polifenoles de cáscara de granada.

Muestra (extracto de la cáscara de granada)	Actividad hemolítica <i>Media ± DE</i>
Control negativo (Solución Alsever))	0.05 ± 0.009
125 µg/mL	0.01 ± 0.019
250 µg/mL	0.1 ± 0.013
500 µg/mL	0.1 ± 0.014
1000 µg/mL	0.1 ± 0.019
Control positivo (Agua destilada)	100 ± 0.008

Los resultados de este ensayo de hemólisis mostraron que los polifenoles de cáscara de granada no afectan o destruyen los eritrocitos

humanos. Por lo cual, no tendrían un efecto secundario en células sanguíneas humanas y se puede garantizar un producto seguro. Las

diferentes concentraciones de polifenoles analizadas muestran un 0% de actividad hemolítica, estos datos se compararon con un control positivo y uno negativo. Los resultados se muestran en la tabla 4. Se observa que el control positivo muestra diferencia significativa donde obtuvo un 100% de actividad hemolítica respecto a las demás concentraciones. Previamente se han realizado estudios con extractos polifenólicos de otros residuos de frutas tales como el rambután mexicano. De acuerdo con Estrada-Gil *et al.* [25] se obtuvieron en todas las concentraciones analizadas un 0% de actividad hemolítica. En otro estudio, se trabajó con el extracto de Semilla de *Moringa oleífera*, se estudió la actividad endosomolítica y citocompatibilidad por medio de un ensayo hemolítico en eritrocitos bovinos. Se demostró un aumento de la hemólisis dependiente de la concentración a 80 µg/ml, el extracto mostró un 45% de hemólisis en comparación con el control (11%) [27]. Asimismo, los aceites esenciales de algunas plantas medicinales como *Pituranthos scoparius*, *Argelia*, *Myrtus nivellei*, *Mentha piperita* y *Rosmarinus officinalis*, han mostrado más del 40% de actividad hemolítica. Esto con un mayor tiempo de incubación con glóbulos rojos [61].

4. Conclusión

La cáscara de granada al representar el 50% del peso total del fruto es una oportunidad de aprovechamiento del residuo agroindustrial. Dentro de este residuo se encuentran compuestos fenólicos con efectos biológicos, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas, anticancerígenas y antivirales.

En el presente estudio dichos compuestos fueron extraídos, purificados e identificados como la punicalagina y punicalina. Además, que se comprobó la alta capacidad antioxidante, así como efecto antimicrobiano,

prebiótico y también la nula actividad hemolítica.

En la actualidad, las pruebas previamente realizadas en este trabajo son altamente relevantes para el desarrollo de productos de valor agregado, como lo son la elaboración de suplementos alimenticios, entre otros productos de valor agregado. Tanto la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, buscan la forma de obtener moléculas con una actividad biológica interesante y una forma viable de obtenerlas.

Hoy en día el estilo de vida y las enfermedades han incrementado y con ello el uso de fármacos, que a su vez tienen efectos secundarios a la salud. Con ello se pretende buscar en los residuos de frutas más alternativas que ayuden a contrarrestar o evitar estos daños. Con este estudio se demuestra la importancia de darle mayor valorización a los residuos agroindustriales, ya que muchos pueden contener efectos positivos que pueden contribuir a la salud. El presente estudio abre la posibilidad de seguir investigando en el tema para la creación nuevos productos en las industrias alimentaria, cosmética.

5. Referencias

1. Pareek, S., Valero, D., & Serrano, M. (2015). *Postharvest biology and technology of pomegranate*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(12), 2360–2379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7069>
2. El Barnossi, A., Moussaid, F., & Iraqi Housseini, A. (2021). *Tangerine, banana and pomegranate peels valorisation for sustainable environment: A review*. Biotechnology Reports, 29, e00574. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00574>

3. Kahramanoglu, I. (2019). *Trends in Pomegranate Sector Production, Postharvest Handling and Marketing*. International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences, 3(2), 239–246.
4. Muñiz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Sepúlveda, L., Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, J. A., & Aguilar, C. N. (2021). *Effect of ultrasound on the extraction of ellagic acid and hydrolysis of ellagitannins from pomegranate husk*. Environmental Technology and Innovation, 24, 102063. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102063>
5. Jaiswal, V., DerMarderosian, A., & Porter, J. R. (2010). *Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (Punica granatum L.)*. Food Chemistry, 118(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.095>
6. Zhang, C., Chen, W., Zhang, X., Zheng, Y., Yu, F., Liu, Y., et al. (2017). *Grape seed proanthocyanidins induce mitochondrial pathway-mediated apoptosis in human colorectal carcinoma cells*. Oncology Letters, 14(5), 5853–5860. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6992>
7. Górna, P., & Rudzi, M. (2016). *Seeds recovered from industry by-products of nine fruit species with a high potential utility as a source of unconventional oil for biodiesel and cosmetic and pharmaceutical sectors*. Industrial Crops and Products 83, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.021>
8. Lu, J., Wei, Y., & Yuan, Q. (2007). *Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 857(1), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.038>
9. Wu, S., & Tian, L. (2017). *Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (punica granatum)*. Molecules, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101606>
10. Zhang, L., Fu, Q., & Zhang, Y. (2011). *Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity*. Food Chemistry, 127(4), 1444–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.077>
11. Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). *Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts*. Industrial Crops and Products, 111(October 2016), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
12. Al-Megrin, W. A. (2017). *In vivo study of pomegranate (Punica granatum) peel extract efficacy against Giardia lamblia in infected experimental mice*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.018>
13. Seidi, K., Jahanban-Esfahlan, R., Abasi, M., & Abbasi, M. M. (2016). *Anti tumoral properties of Punica granatum (Pomegranate) seed extract in different*

- human cancer cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(3), 1119–1122.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.3.1119>
14. Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Xie, Y., Ye, T., Xia, Y., & Yin, W. (2017). *The extract from Punica granatum (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 976–984.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.008>
 15. Gumus, Z. P., Ustun Argon, Z., & Celenk, V. U. (2020). *Cold pressed pomegranate (Punica granatum) seed oil. In Cold Pressed Oils. Elsevier Inc.*
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818188-1.00053-0>
 16. Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., & Yuenyongsawad, S. (2010). *Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. Food Chemistry*, 123(2), 400–403.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.054>
 17. Gulube, Z., & Patel, M. (2016). *Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microbial Pathogenesis*, 98, 45–49.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.027>
 18. Rajha, H. N., Koubaa, M., Boussetta, N., Maroun, R. G., Louka, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2020). *Selective ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7), 1–9.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14545>
 19. Ashokkumar, M. (2015). *Applications of ultrasound in food and bioprocessing. Ultrasonics Sonochemistry*, 25(1), 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
 20. Hernández-Hernández, C., Aguilar, C. N., Flores-Gallegos, A. C., Sepúlveda, L., Rodríguez-Herrera, R., Morlett-Chávez, J., Govea-Salas, M., & Ascacio-Valdés, J. (2020). *Preliminary testing of ultrasound/microwave-assisted extraction (U/M-AE) for the isolation of Geraniin from Nephelium lappaceum L. (Mexican Variety) peel. Processes*, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/PR8050572>
 21. Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008). *Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189–199.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
 22. Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado-Barragán, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). *The complete biodegradation pathway of ellagitannins by Aspergillus niger in solid-state fermentation. Journal of Basic Microbiology*, 56(4), 329–336.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201500557>
 23. Stämpfli, R., Brühwiler, P., Mourad, S., Verdejo, R., & Shaffer, M. (2007). *Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. EMPA Activities*, 26(2007), 51.
 24. Molyneux P. (2004). *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-*

- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(May), 211–219.
25. Estrada-Gil, L., Contreras-Esquivel, J. C., Flores-Gallegos, C., Zugasti-Cruz, A., Govea-Salas, M., Mata-Gómez, M. A., & Ascacio-Valdés, J. A. (2022). *Recovery of bioactive ellagitannins by ultrasound/microwave-assisted extraction from mexican rambutan peel (Nephelium lappaceum L.)*. *Molecules* 27, 1592.
 26. Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernández, J. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). *Multi-functional potential of presumptive lactic acid bacteria isolated from Chihuahua cheese*. *Foods*, 9(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods9030276>
 27. Nubi, T., Adewole, T. S., Agunbiade, T. O., Osukoya, O. A., & Kuku, A. (2021). *Purification and erythrocyte-membrane perturbing activity of a ketose-specific lectin from Moringa oleifera seeds*. *Biotechnology Reports*, 31(October 2020), e00650. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00650>
 28. Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). *Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry*. *Separation and Purification Technology*, 41(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.04.003>
 29. Ordoñez-Torres, A.; Torres-León, C.; Hernández-Almanza, A.; Flores-Guía, T.; Luque-Contreras, D.; Aguilar, C.N.; Ascacio-Valdés, J. *Ultrasound-Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Mexican “Aaulfo” Mango Peels: Antioxidant Potential and Identification by HPLC/ESI/MS*. *Phytochem. Anal.* 2021, 32, 495–502 <https://doi.org/10.1002/pca.2997>
 30. More, P. R., & Arya, S. S. (2021). *Intensification of bio-actives extraction from pomegranate peel using pulsed ultrasound: Effect of factors, correlation, optimization and antioxidant bioactivities*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 105423. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105423>
 31. Lianfu Z, Zelong L. *Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes*. *Ultrason Sonochem.* 2008;15(5):731-737. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.12.001>
 32. Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). *Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk*. *Food Research International*, 49(1), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059>
 33. Sepúlveda, L., Wong-Paz, J. E., Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A., & Aguilar, C. N. (2018). *Solid state fermentation of pomegranate husk: Recovery of ellagic acid by SEC and identification of ellagitannins by HPLC/ESI/MS*. *Food Bioscience*, 22(October 2017), 99–104.

- <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.006>
34. Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). *Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels*. *Food Chemistry*, 352(October 2020), 129396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129396>
35. Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). *Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction*. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137(November 2018), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
36. Kennas, A., Amellal-Chibane, H., Kessal, F., & Halladj, F. (2020). *Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.07.001>
37. SUN, Y. qing, TAO, X., MEN, X. ming, XU, Z. wei, & WANG, T. (2017). *In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin*. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1808–1818. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61560-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61560-5)
38. Wang Y, Zhang H, Liang H, Yuan Q. 2013. Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chemistry*, 138, 437–443. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.10.092](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.092)
39. Pfundstein B, El Desouky S K , Hull W E , Haubner R , Erben G, Owen R W. 2010. *Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (Terminalia ballerica, Terminalia chebula and Terminalia horrida): Characterisation, quantitation and determination of antioxidant capacities*. *Phytochemistry*, 71, 1132–1148. DOI: [10.1016/j.phytochem.2010.03.018](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.018)
40. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
41. Diplock, A. T., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., & Viña-Ribes, J. (1998). *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S77–S112. <https://doi.org/10.1079/bjn19980106>
42. Al-Zoreky, N. S. (2009). *Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels*. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
43. Khan, J.A. and Hanee, S. (2011). *ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF*

- PUNICA GRANATUM PEELS*. Inter. J. Appl. Biolog. and Pharmaceutic. Technol. (2): 3.
44. Harini, K., Chandra Mohan, C., Ramya, K., Karthikeyan, S., & Sukumar, M. (2018). *Effect of Punica granatum peel extracts on antimicrobial properties in Walnut shell cellulose reinforced Biothermoplastic starch films from cashew nut shells*. *Carbohydrate Polymers*, 184(August 2017), 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.072>
 45. Wu, W., Mis Solval, K., & Chen, J. (2022). *Inhibitory activity of aqueous extracts of pomegranate peel products and juice powder against Salmonella enterica*. *Lwt*, 155, 112934. and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
 46. Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). *Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts*. *Industrial Crops and Products*, 111(October 2016), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
 47. Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). *Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels*. *Food Chemistry*, 352(October 2020), 129396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129396>
 48. Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Balakrishnan, A. (2016). *Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent*. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1035–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.v30.710.1002/ptr.5616>.
 49. Xu, Y., Shi, C., Wu, Q., Zheng, Z., Liu, P., Li, G., ... Xia, X. (2017). *Antimicrobial Activity of Punicalagin Against Staphylococcus aureus and Its Effect on Biofilm Formation*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(5), 282–287. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2226>.
 50. Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). *Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, 11, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.03.002>
 51. Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., et al. (2010). *Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria*. *Research in Microbiology*, 161, 372–382.
 52. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. *BBA - Biomembranes*, 1147(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)
 53. Bialonska, D., Ramnani, P., Kasimsetty, S. G., Muntha, K. R., Gibson, G. R., & Ferreira, D. (2010). *The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota*. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2–3), 175–182.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038>
54. Li, Z., Summanen, P. H., Komoriya, T., Henning, S. M., Lee, R. P., Carlson, E., Heber, D., & Finegold, S. M. (2015). *Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria invitro: Implications for prebiotic and metabolic effects*. *Anaerobe*, 34, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.012>
55. Ahtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). *Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features*. *Food Chemistry*, 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
56. Kandyli, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). *Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives*. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020122>
57. Sayers, B., Wijeyesekera, A., & Gibson, G. (2021). *Exploring the potential of prebiotic and polyphenol-based dietary interventions for the alleviation of cognitive and gastrointestinal perturbations associated with military specific stressors*. *Journal of Functional Foods*, 87, 104753. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104753>
58. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scanzocchio, B., & Masella, R. (2010). *Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies*. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
59. Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). *Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: A review*. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 325–341. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0852-y>
60. Ezuruike, U. F., & Prieto, J. M. (2014). *The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations*. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 857–924. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.055>
61. Halla, N.; Boucherit, K.; Zeragui, B.; Djelti, A.; Belkhedim, Z.; Hassani, R.; Benatallah, S.; Djellouli, H.; Kacimi, O.; Boucherit- Otmani, Z. *Polyphenols Content and Antimicrobial, Antioxidant and Hemolytic Activities of Essential Oils from Four Selected Medicinal Plants Growing in Algeria*. *Biol. Med. Nat. Prod. Chem.* 2020, 9, 65–75.