



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PERFIL POLIFENÓLICO EN CÁSCARA DE
PUNICA GRANATUM CULTIVADA EN GUANAJUATO Y OAXACA

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

PRESENTA:
I.A. JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ CASTILLO

DIRECTORA:
DRA. EDITH GRACIELA GONZÁLEZ MONDRAGÓN

CO-DIRECTORA:
DRA. ARACELI VEGA PAZ

Huajuapán de León Oaxaca, México, mayo 2018.

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Programa de estudios de posgrado de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos, que pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Las actividades de este proyecto se realizaron en el laboratorio de Biotecnología, Edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), Huajuapán de León, Oaxaca.

José Francisco Gómez Castillo fue apoyado con la beca de manutención (598631) financiada por el CONACYT.

El trabajo de investigación fue realizado con el apoyo otorgado por el CONACYT por medio de los proyectos de investigación PDCPN2013-01 (215144) e INFR2015-01 (254019).

ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una solicitud de registro de patente (MX/a/2017/007342), en la cual fueron incluidos parte de los resultados generados en el presente proyecto.

Se colaboró en el trabajo presentado en modalidad poster titulado "Characterization of a hybrid beverage supplemented with polyphenolic extract from *Punica granatum* peel" en el III National and II International Student Congress of Food Science and Technology, Valencia, España del 3 al 4 de marzo de 2016.

Adicionalmente, otros resultados fueron presentados en el VIII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste, en modo cartel, organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería Delegación Yucatán, A.C., durante los días 19 al 21 de octubre de 2016, realizado en Mérida, Yucatán.

Se realizó una estancia de trabajo del 7 al 10 de febrero de 2017, en la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Azcapotzalco, ubicada en la Ciudad de México con la Dra. Araceli Vega Paz en el Área de Química y Fisicoquímica.

Se participó en el análisis sensorial de carne molida en el proyecto "Efecto del extracto de epazote (*Telexys ambrosioides* L.) sobre la vida útil de la carne picada de bovino y porcino durante su almacenamiento en refrigeración", durante los periodos del 7 al 30 de marzo y del 13 de junio al 6 de julio del 2017; en las instalaciones de la UTM.

Se participó con el cartel "Análisis comparativo de compuestos polifenólicos de cáscara de *Punica granatum* cultivada en Guanajuato y Oaxaca", en la 18a Feria de Posgrados de Calidad 2017 con sede en la Ciudad de México los días 25 y 26 de marzo de 2017, organizada por el CONACYT.

Se asistió a los seminarios “Secado por aspersión, microencapsulación de partículas y formación de perlas, cápsulas y liofilización” y “Determinación kjeldahl y métodos de extracción para análisis bromatológicos y el uso de rotavapor”; impartidos por la empresa Equipar S. A. de C. V., en las instalaciones de la UTM los días 7 y 8 de junio de 2017.

*Dedico este trabajo a:
mi esposa Zuzette por su apoyo incondicional
y a mis hijos Daniela y José Emilio.
Los amo.*

Izas.

*En memoria de
A. C. V.*

AGRADECIMIENTOS

A la UTM por la oportunidad para recibir una formación profesional de calidad y al CONACYT por la beca de manutención otorgada.

A la Dra. Edith G. González Mondragón por la oportunidad de confiarme la realización de este trabajo, por su valiosa dirección y apoyo en todo momento y sobre todo por su paciencia ante mi inconsistencia. De igual manera a la Dra. Araceli Vega Paz, codirectora de este proyecto de investigación; por el tiempo invertido para perfeccionarlo, por su invaluable colaboración e interés en la culminación del trabajo.

A la Dra. Rocío Gómez Cansino, por su apoyo con bibliografía y sugerencias para la mejora del presente trabajo.

Al comité evaluador de esta tesis, integrado por las Doctoras Beatriz Hernández Carlos y Laura Marquez de Santis, así como los Doctores Raúl Salas Coronado y Rogelio Valadez Blanco, quienes a través de sus revisión, observaciones y comentarios contribuyeron en el desarrollo del presente trabajo.

A Gabriel Arellanes Jiménez, estudiante de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la UTM, por su apoyo en el proceso de obtención del polvo de cáscara de granada.

Así mismo al M.C. Edgar T. Vázquez Ramos y al Ing. Jorge A. Váldez Amezcua, personal del soporte técnico de la empresa Waters S.A. de C. V.

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, conocimientos y apoyo. A profesores y compañeros quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis consistió en analizar comparativamente el perfil polifenólico de los extractos obtenidos a partir de la cáscara de *Punica granatum*, cultivada en los estados de Guanajuato y Oaxaca, por extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU). La EC se llevó a cabo a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), sin agitación ni exposición a la luz por 24 h, y la EAU se realizó a 20 ± 3 °C empleando un baño ultrasónico a 280 W, 40 ± 2.4 kHz por 10 min. En ambos casos se emplearon 0.2 g de polvo de cáscara de *P. granatum* y 10 mL de etanol (70%). Se realizaron etapas consecutivas de extracción, hasta que el contenido de polifenoles totales fue menor o igual al 10% en cada una con respecto a la suma del CPT de todas las etapas realizadas. Posteriormente, se analizó comparativamente la composición de los 4 extractos estudiados por cromatografía de líquidos de ultra desempeño acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-QToF). Por último, para la asignación de los compuestos sin contar con el reactivo comercial, se realizaron experimentos de MS/MS con perfil de energía de colisión (10, 20 y 30 V). Los resultados mostraron que, en la tercera etapa de extracción el CPT fue menor al 10% para las 4 muestras, con respecto a la sumatoria del CPT las 3 etapas realizadas. Por otro lado, los rendimientos de los extractos obtenidos tanto por EC y EAU fueron mayores para la muestra de Oaxaca, no obstante, presentaron un menor CPT; a pesar de esto dichos valores se encuentra dentro de lo reportado para otros residuos agroindustriales. Sin embargo, de acuerdo al análisis de varianza realizado, se observó que estadísticamente no hubo diferencia significativa tanto en los rendimientos de los extractos como para el CPT obtenidos de cada tipo de extracción y por el contrario en los orígenes sí (a un nivel de significancia de 0.05), lo cual se confirmó por la prueba de Tukey. Respecto a los cromatogramas, se observó que fueron similares en la mayoría de las señales de los 4 extractos analizados, pero con intensidad diferente, lo que puede sugerir que tienen la misma composición, pero difieren en cuanto a su concentración. Las señales de los tiempos de retención (t_R) 3.10 y 3.17 se observaron únicamente en los extractos de Guanajuato obtenido por EC y EAU. Por otro lado, las señales a los t_R de 11.67 y 13.83 min, se observaron únicamente en los extractos obtenidos por EAU de ambos orígenes. Lo anterior, sugiere que el ultrasonido permitió la liberación de un mayor número de metabolitos contenidos en las muestras. Se observó que la intensidad de las señales en los cromatogramas de los extractos de las muestras de Guanajuato fue mayor, lo que puede asociarse a una mayor concentración de los compuestos presentes. Lo anterior puede deberse a la composición del suelo y clima de donde provienen los frutos utilizados en este trabajo. También se identificaron 47 compuestos con un error de masas igual o menor a los 5 mDa, todos ellos ya han sido reportados en cáscara de *P. granatum*. Se identificó un compuesto que solamente se ha reportado para el jugo de *P. granatum* (hexósido de floretina), y tentativamente otro que hasta el momento no ha sido reportado para granada (pseudotsuganol). Los fragmentos de estos compuestos fueron comparados con base de datos y un programa de predicción de espectros. Finalmente, las conclusiones fueron que: 1) Se requirieron 3 extracciones sucesivas para reducir a menos del 10% el CPT en la muestra para ambos métodos de extracción, siendo la de Guanajuato la que presentó el mayor rendimiento, 2) Se identificaron 49 compuestos distribuidos de la siguiente manera: 41, 38, 27 y 23 en la EC_Oax, EC_Gto, EAU_Oax y EAU_Gto, respectivamente, y 3) En los 4 extractos se identificaron 2 compuestos uno de los cuales únicamente ha sido reportado en jugo de granada (hexósido de floretina) y otro que fue asignado tentativamente como pseudotsuganol.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	3
2.2 Métodos de extracción de compuestos polifenólicos de residuos sólidos	3
2.2.1 Extracción convencional.....	4
2.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	5
2.3 Compuestos polifenólicos	6
2.3.1 Caracterización de extractos polifenólicos	9
2.3.1.1 Cuantificación de polifenoles.....	9
2.3.1.2 Identificación de polifenoles mediante espectrometría de masas	10
2.3.1.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.....	13
2.4 Generalidades de <i>Punica granatum</i>	16
2.4.1 Polifenoles cuantificados en jugo y semillas de <i>Punica granatum</i>	17
3. ESTADO DEL ARTE	19
3.1 Extracción y cuantificación de polifenoles en cáscara de <i>P. granatum</i>	19
3.2 Caracterización de la composición de extractos de cáscara de <i>P. granatum</i>	19
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
6. METAS.....	25

7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 Reactivos y materiales.....	26
7.2 Adquisición de frutos de granada	26
7.3 Cálculo del rendimiento de la cáscara de <i>P. granatum</i>	27
7.4 Extracción sólido-líquido.....	27
7.4.1 Extracción convencional.....	27
7.4.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	28
7.5 Contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Cioalateau.	28
7.6 Preparación de los extractos para su análisis por UHPLC-QToF.....	28
7.7 Perfil polifenólico de los extractos por UHPLC-QToF	29
7.7.1 Cromatogramas y espectros de masas.....	29
7.7.2 Identificación de compuestos polifenólicos	30
7.7.3 Análisis comparativo del perfil polifenólico de los extractos.....	31
7.8 Análisis estadístico	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
8.1 Contenido de polifenoles totales en la cáscara de granada	32
8.2 Compuestos polifenólicos identificados.....	35
9. CONCLUSIONES.....	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. REFERENCIAS	46
ANEXOS.....	54
Anexo I	54
Anexo II.....	55
Anexo III	58
Anexo IV	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles con base a su estructura y compuestos representativos de cada clase.	8
Tabla 2. Iones característicos de la fragmentación de polifenoles por MS/MS con ESI (-).....	11
Tabla 3. Compuestos identificados por LC-MS en diferentes partes del fruto de <i>P. granatum</i> .18	
Tabla 4. Contenido de polifenoles totales en extractos de cáscara de <i>P. granatum</i>	20
Tabla 5. Compuestos identificados y cuantificados en cáscara de <i>P. granatum</i>	22
Tabla 6. Etapas de extracción y contenido de polifenoles totales, obtenidos por extracción convencional, para la cáscara de <i>P. granatum</i> de Oaxaca.....	32
Tabla 7. Contenido de polifenoles totales en los extractos de cáscara de granada de dos orígenes (Oaxaca y Guanajuato) en etapas de extracción consecutivas, por dos métodos de extracción.	33
Tabla 8. Rendimientos de la obtención de extractos etanólicos y del contenido de polifenoles totales obtenidos a partir de polvo de cáscara de <i>P. granatum</i>	34
Tabla 9. Compuestos identificados y confirmados en extractos de cáscara de <i>P. granatum</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de extracción sólido-líquido. (Modificado de GmbH, 2018).....	3
Figura 2. Esquema del fenómeno de cavitación por ultrasonido (Modificado de Ecosphere Technologies, Inc., 2018).....	5
Figura 3. Estructuras base de compuestos fenólicos. a: ácidos fenólicos, b: flavonoides.....	7
Figura 4. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	9
Figura 5. Fragmentación característica de flavonoides. (Pinheiro y Justino, 2012).....	11
Figura 6. Esquema de la formación del ión m/z 151 en flavonoides del grupo de las flavonas (A), flavonoles (B) y flavanonas (C).....	12
Figura 7. Esquema de la fragmentación de flavonoides para la formación del ión m/z 125, característico de flavanonas (A) y flavanoles (B).....	12
Figura 8. Esquema de la formación de los iones y su trayectoria hacia el espectrómetro de masas. Modificado de Herbert y Johnstone (2002).....	14
Figura 9. Esquema del principio de operación de un analizador cuadrupolar. Tomado de Westman-Brinkmalm y Brinkmalm (2009).....	14
Figura 10. Esquema de espectrómetro de masas con analizadores cuadrupolo-tiempo de vuelo (QToF). Modificado de Herbert y Johnstone (2002).....	15
Figura 11. Partes que constituyen al fruto de <i>P. granatum</i>	17
Figura 12. Equipo UHPLC-QToF, Laboratorio de Biotecnología, UTM.....	29
Figura 13. Cromatogramas comparativos por método de extracción, generados a partir de los extractos de cáscara de <i>P. granatum</i> de Guanajuato y Oaxaca. a) Extracción convencional, b) Extracción asistida por ultrasonido.....	36
Figura 14. Cromatogramas comparativos por origen, generados a partir de los extractos de cáscara de <i>P. granatum</i> de Guanajuato y Oaxaca. a) Oaxaca, b) Guanajuato.....	37
Figura 15. Patrón de fragmentación para la m/z 435, obtenido con el UHPLC-QToF empleando MS/MS-ESI (-) y perfil de colisión con 10, 20 y 30 V.....	40

Figura 16. Estructura y posible ruta de fragmentación del hexósido de floretina (m/z 435).....	40
Figura 17. Perfil de fragmentación del compuesto 2.....	42
Figura 18. Estructura de la molécula del pseudotsuganol.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

bh	Base húmeda
bs	Base seca
CD	Corriente directa
CPT	Contenido de polifenoles totales
cs	Cáscara seca
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EAU_Gto	Extracción asistida por ultrasonido, muestra de Guanajuato
EAU_Oax	Extracción asistida por ultrasonido, muestra de Oaxaca
EC	Extracción convencional
EC_Gto	Extracción convencional, muestra de Guanajuato
EC_Oax	Extracción convencional, muestra de Oaxaca
ESI	Ionización por electroespray
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto desempeño, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alto desempeño acoplado a espectrometría de masas en cascada con detector de arreglo de diodos, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i>
HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ	Cromatografía de líquidos de alto desempeño acoplado a espectrometría de masas multi-etapas con detector de arreglo de diodos, con ionización por electroespray, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector-Electrospray Ionization/Mass Spectrometry tandem</i>
HPLC-PDA-MS	Cromatografía de líquidos de alto desempeño acoplado a espectrometría de masas con detector de arreglo de fotodiodos, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector-Mass Spectrometric</i>
HPLC-UvD	Cromatografía de líquidos de alto desempeño con detector de ultravioleta, por sus siglas en inglés <i>High Performance Chromatography Liquid with Ultraviolet Detector</i>
InChI	Identificador químico internacional, por sus siglas en inglés <i>International Chemical Identifier</i>

LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, por sus siglas en inglés <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas/masas, por sus siglas en inglés <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
RF	Radio frecuencia
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
UHPLC-QToF	Cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño acoplada a espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo tiempo de vuelo, por sus siglas en inglés: <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight</i>
VSRh	Virus sincitial respiratorio humano

1. INTRODUCCIÓN

La agroindustria genera una alta producción de residuos los cuales pueden ser aprovechados para la obtención de productos con mayor valor agregado, generando posibles soluciones para la reducir el impacto negativo del medio ambiente. Dichos residuos pueden ser fuente de compuestos polifenólicos cuya importancia radica en sus actividades biológicas: antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, y antiviral; útiles para el desarrollo de alimentos funcionales (Kalamara, Goula y Adamopoulos, 2015).

La cáscara de granada (*Punica granatum*) contiene polifenoles en el orden de mg/g; además, se ha reportado el uso de sus extractos para enriquecer con estos compuestos diversos sistemas alimenticios (Akhtar, Ismail, Fraternali y Sestili, 2015). En México se puede generar hasta 1,980 ton de residuos de granada, tomando como base la producción nacional de este fruto (5,210 ton de acuerdo al SIAP, 2018) y que el 38% del fruto corresponde a la cáscara.

La extracción es la operación unitaria utilizada para la recuperación de compuestos polifenólicos a partir de residuos agroindustriales; y se puede clasificar en dos grupos; convencional (EC) y no convencional. En el primero se encuentran la maceración, lixiviación, decocción, infusión, extracción Soxhlet entre otros. En el segundo grupo están la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la asistida por microondas, así como la de fluidos supercríticos (Azmir et al., 2013). Los procesos de EC son los más utilizados para la obtención de polifenoles y se utilizan como referencia para el desarrollo de técnicas no convencionales, sin embargo, presentan ciertas desventajas como el alto consumo de disolventes y energía, así como largos periodos de tiempo (Ameer, Shahbaz y Kwon, 2017). Por otro lado, la EAU utiliza la energía generada por las ondas de ultrasonido, acorta el tiempo de extracción debido a la cavitación que se produce durante el proceso y es recomendable para la extracción de compuestos termolábiles como los polifenoles (Tabaraki, Heidarizadi y Benvidi, 2012).

Por otro lado, la identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos presentes en los extractos se realiza por métodos colorimétricos (método de Folin–Ciocalteu) y cromatográficos; dentro de estos últimos se encuentra la cromatografía de líquidos de alto desempeño (UHPLC, por sus siglas en inglés: *Ultra High-Performance Liquid Chromatography*), además estas técnicas pueden estar acopladas a sistemas de detección como espectrometría de masas las cuales permiten el análisis de matrices complejas como es el caso de los extractos de material vegetal.

Por otro lado, en trabajos previos del grupo, se evaluó el potencial de los extractos polifenólicos obtenidos a partir de cáscara de granada cultivada en Oaxaca por EC, con actividad contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh), para el desarrollo una bebida funcional con actividad anti-VSRh. Por lo anterior, se consideró importante estudiar la cáscara de granada cultivada en Guanajuato, otro de los estados con mayor producción de este fruto, como materia prima para la obtención de extractos polifenólicos, así como el uso de otro método de extracción como la EAU. También es relevante tener el perfil químico de dichos extractos y realizar un análisis comparativo de su composición.

Por todo lo anterior expuesto, en el presente trabajo se obtuvieron y caracterizaron los extractos polifenólicos de cáscara de *P. granatum*, cultivadas en dos zonas geográficas de México, con características de clima y suelo diferentes, importantes en la producción de granada. Dichos extractos se obtuvieron empleando como disolvente etanol al 70% y dos métodos de extracción: 1) La EC se realizó por maceración a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y 2) La EAU se llevó a cabo a 20 ± 2 °C. La cuantificación de los polifenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, y la identificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó empleando un UHPLC-QToF, en modo negativo. Los resultados de la identificación fueron analizados comparativamente tanto por origen del fruto como por método de extracción empleados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aprovechamiento de residuos agroindustriales

Las frutas son ricas en compuestos bioactivos como polifenoles, carotenos y vitaminas, los cuales también se pueden encontrar en concentraciones importantes en cáscaras y semillas, residuos que se derivan del procesamiento de dichas frutas (Mirabella, Castellani y Sala, 2014). El aprovechamiento integral de los residuos agroindustriales incluye la extracción de compuestos de interés, los cuales pueden utilizarse en la industria alimentaria o farmacéutica (Ayala-Zavala, Rosas-Domínguez, Vega-Vega y González-Aguilar, 2010). Goula y Lazarides (2015), recuperaron polifenoles a partir de los residuos generados de la molienda de aceitunas, así como de la cáscara y semillas de granada; de estas últimas también obtuvieron aceite. Los compuestos fueron encapsulados para su uso como conservadores naturales y como nutraceuticos. Aizpurua-Olaizola et al. (2015), recuperaron polifenoles y ácidos grasos de semillas y cáscara de uvas, residuos generados de la producción de vino y además optimizaron el proceso de extracción de estos compuestos por extracción con CO₂ supercrítico, por 5 min.

2.2 Métodos de extracción de compuestos polifenólicos de residuos sólidos

El principio termodinámico de la extracción sólido-líquido es la separación de solutos de interés presentes en una fase sólida, mediante el contacto con una fase líquida o disolvente (Figura 1), donde el soluto se distribuye hasta alcanzar el equilibrio (McCabe, Smith y Harriott, 2004).

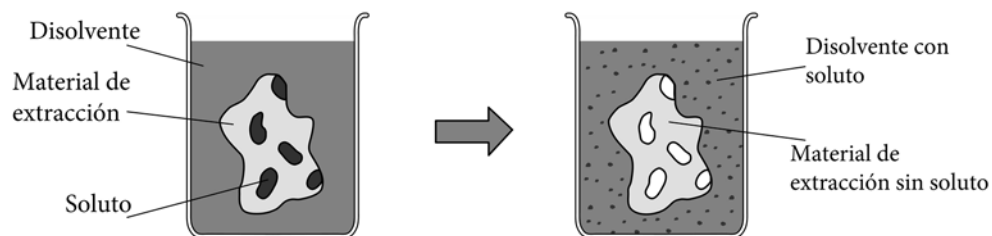


Figura 1. Esquema del proceso de extracción sólido-líquido. (Modificado de GmbH, 2018).

El proceso de extracción sólido-líquido implica la difusión del soluto a través del disolvente contenido en la matriz sólida y la transferencia del soluto desde las inmediaciones de la interfase sólido-líquido hasta el seno de la masa principal de disolvente, este proceso se rige por la primera ley de difusión de Fick, que establece que el transporte de un soluto ocurre por un gradiente de concentración del soluto entre las fases. Los factores que influyen sobre la velocidad de extracción son: tamaño de partícula, composición de la matriz sólida, polaridad del disolvente, proporción sólido/disolvente, tiempo, temperatura, agitación y velocidad de agitación (Geankoplis, 2009); además, para recuperar la mayor cantidad de soluto es necesario establecer el número de etapas requeridas para reducir el contenido de este en el sólido hasta un valor mínimo determinado (Treybal, 1990). Por otro lado, para la optimización de los procesos de extracción que implican la variación de uno o más de los factores antes mencionados, se puede hacer uso de modelos matemáticos como regresión lineal, cuadrático y/o productos cruzados (Sood y Gupta, 2015). Los métodos de extracción se pueden clasificar en 2 grupos: 1) convencionales, como la extracción Soxhlet, hidrodestilación, lixiviación, y maceración; y 2) no convencionales, como la asistida por ultrasonido (Azmir et al., 2013), sin embargo, el uso de cualquiera de ellos tiene como finalidad aumentar el rendimiento de los solutos extraíbles (Wang et al., 2013).

2.2.1 Extracción convencional

La maceración es uno de los métodos de extracción convencional, Treybal (1990), la describió como un proceso de lixiviación por lotes, en estado no estacionario, en el cual la fase sólida se pone en contacto con la fase líquida. En el presente trabajo de tesis se denotó como extracción convencional (EC) al proceso de maceración. Uno de los requisitos en la EC es que el disolvente no reaccione con los compuestos de interés, para que posteriormente se puedan recuperar de este, es por ello que se debe elegir un disolvente con punto de ebullición bajo. Algunas de las ventajas de la EC son: *i)* ausencia de agitación, *ii)* todo el proceso se lleva a cabo a

temperatura ambiente y *iii*) se utiliza solamente un tanque de extracción. Por otro lado, las desventajas de éste método son que requiere periodos largos de tiempo así como, grandes volúmenes de disolventes, además de presentar cierta toxicidad residual, lo que no es recomendable cuando los extractos se adicionan a un sistema alimenticio (Boggia et al., 2016) como es el caso para la acetona o el hexano. Por otro lado, se ha reportado que el etanol es un disolvente efectivo para la recuperación de polifenoles y es recomendado para la recuperación de este grupo de compuestos ya que es considerado un disolvente GRAS (por sus siglas en inglés: *Generally Recognized As Safe*) y está ubicado en la clase 3 de la guía Q3C de la FDA (por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration*) (Takeuchi et al., 2009).

2.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La EAU es un tipo de extracción no convencional que utiliza ondas de ultrasonido no ionizantes, en un intervalo de frecuencias de 20–100 kHz. Las vibraciones de estas ondas producen ciclos de compresión y expansión induciendo el fenómeno de cavitación (Figura 2), por lo que la implosión de las burbujas genera la ruptura de las estructuras celulares (Knorr, Ade-Omowaye y Heinz, 2002). Las principales ventajas de la EAU son que la cavitación incrementa la polaridad del sistema y por lo tanto se incrementa la eficiencia de extracción de metabolitos, permite la extracción de analitos termolábiles y tiempos cortos de operación (Tabaraki et al., 2012).

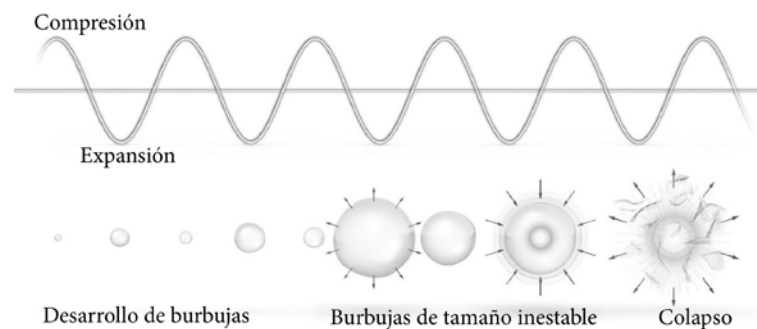


Figura 2. Esquema del fenómeno de cavitación por ultrasonido (Modificado de Ecosphere Technologies, Inc., 2018).

Kamiloglu et al. (2016), obtuvieron polifenoles a partir de subproductos de zanahoria negra (*Daucus carota* L.), empleando disoluciones de metanol (75%) y etanol (100%), ambos disolventes con 0.1% de ácido fórmico; utilizando un baño ultrasónico por 15 min, sin especificar la temperatura del proceso, comprobando que dichos polifenoles pueden ser empleados para enriquecer productos alimenticios. Por otro lado, Pan, Qu, Ma, Atungulu y McHugh (2012), redujeron el tiempo de extracción de polifenoles a partir de cáscara de granada, hasta en un 90% y lograron incrementar la extracción de estos en un 24%, utilizando EAU comparado con extracción convencional.

2.3 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son un grupo importante de metabolitos secundarios, sintetizados por las plantas como resultado de su adaptación a condiciones de estrés bióticas o abióticas (Materska y Perucka, 2005). Los polifenoles se pueden encontrar tanto en la parte comestible como en la no comestible de frutas y vegetales (El Gharras, 2009), contribuyendo a su calidad sensorial (color, sabor y aroma) cuya presencia y concentración está determinada por factores como el estado de madurez, la exposición a la luz, estrés hídrico, clima, composición del suelo e incluso por las variedades del cultivo (García-Salas, Morales-Soto, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez, 2010). Cabe mencionar, que mediante estudios experimentales en líneas celulares, modelos animales y clínicos, se ha evidenciado que los polifenoles pueden ayudar a prevenir o tratar enfermedades crónicas no transmisibles como las cardiovasculares, apoplejía, diabetes tipo 2 y varios tipos de cáncer (Bohn, 2014).

Estructuralmente, los compuestos polifenólicos poseen al menos un anillo aromático con uno o más hidroxilos, y generalmente se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. De acuerdo a la base de datos Phenol Explorer, se pueden clasificar en ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, lignanos, metabolitos no fenólicos y otros polifenoles (Rothwell et al., 2013). En el grupo de los ácidos se encuentran los hidroxibenzóicos, hidroxicinámicos, entre

otros, y los flavonoides se categorizan en; antocianinas, chalconas, flavonoles, flavanonas, flavonas e isoflavonas. La estructura base de los ácidos fenólicos se muestra en la Figura 3a, donde los grupos R pueden ser hidroxilos u otros sustituyentes. Por otro lado, los flavonoides están constituidos por un esqueleto de 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos aromáticos conectados por un heterociclo de tres carbonos (C6-C3-C6), como se muestra en la Figura 3b. Los anillos de seis miembros (A y B), así como el heterociclo (C) pueden tener grupos hidroxilo como sustituyentes lo que promueve que puedan presentar una gran cantidad de interacciones tanto intra- como inter-moleculares (Kantappa, Birajdar y Lee, 2016).

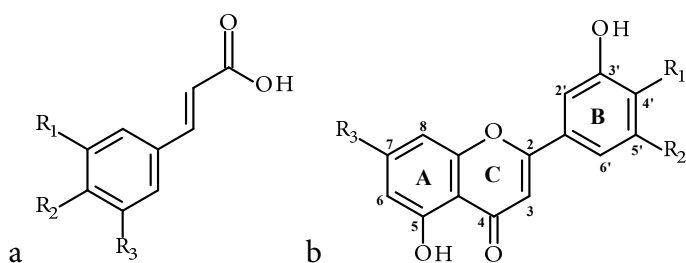
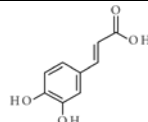
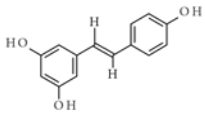
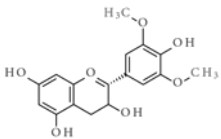
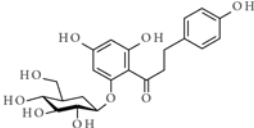
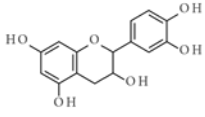
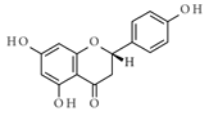
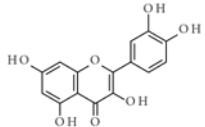
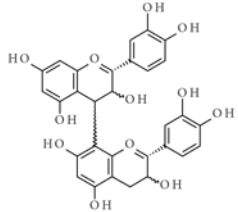
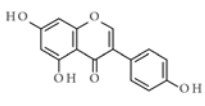
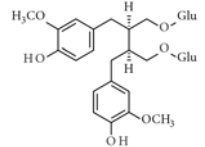


Figura 3. Estructuras base de compuestos fenólicos. a: ácidos fenólicos, b: flavonoides. R₁, R₂, R₃: pueden ser H, OH u otros sustituyentes.

Las antocianinas estructuralmente son antocianidinas glicosiladas o aciladas (Zhao, Yuan, Fang, Yin y Feng, 2013), y son metabolitos responsables de la coloración púrpura, azul, roja y naranja de una gran variedad de frutas y plantas. En la Tabla 1 se muestra la estructura de algunos polifenoles comunes presentes en residuos agroindustriales.

Debido a que los compuestos polifenólicos no pueden ser producidos por el cuerpo humano, estos deben ingerirse en la dieta diaria, obteniéndolos de alimentos naturales (Materska y Perucka, 2005) o procesados. Se ha reportado el consumo *per cápita* de polifenoles en algunos países: Finlandia, 0.4–1.2 g/día; Estados Unidos, 1.0–1.1 g/día; y Polonia, 0.8–1.6 g/día (Bohn, 2014).

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles con base a su estructura y compuestos representativos de cada clase.

Clases*	Residuo agroindustrial/Compuesto**	Estructura
Ácidos fenólicos	Bagazo de guayaba y papa/Ácido caféico	
Estilbenos	Semillas y piel de uvas/Resveratrol	
Flavonoides Antocianinas	Pericarpio y semillas de litchi, cáscara de sandía/Malvidina	
Chalconas	Cáscara de manzana/Floreцина	
Flavanoles	Cáscara de manzana y de plátano/Catequina	
Flavanonas	Cáscara de cítricos/Naringenina	
Flavonoles	Bagazo de guayaba/Quercetina	
Taninos conden- sados	Cáscara de manzana, semillas de cocoa, moras, /Procianidinas (dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros)	
Otros flavonoi- des	Residuos de soya/Genisteina	
Lignanós	Cáscara y semilla de lino/Secoisolariciresinol	

* Clasificación de acuerdo a Tsao (2010). ** Compuestos representativos de cada residuo agroindustrial de acuerdo a Babbar y Oberoi (2014).

2.3.1 Caracterización de extractos polifenólicos

2.3.1.1 Cuantificación de polifenoles

Existen diversos métodos para la cuantificación de polifenoles, como el de Folin-Ciocalteu que es un método colorimétrico (Ignat, Volf y Popa, 2011), que consiste en mezclar tungstato y molibdato de sodio en medio básico. Los fenoles son fácilmente oxidables en medio básico y reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno (MoO_3) el cual presenta una coloración azul (Figura 4). La cuantificación se lleva a cabo con ácido gálico como estándar de referencia por espectrofotometría UV-visible a 765 nm (Agbor, Vinson y Donnelly, 2014), la absorción de luz a esa longitud de onda es proporcional a la concentración de los compuestos polifenólicos, expresados como mg de equivalentes de ácido gálico.

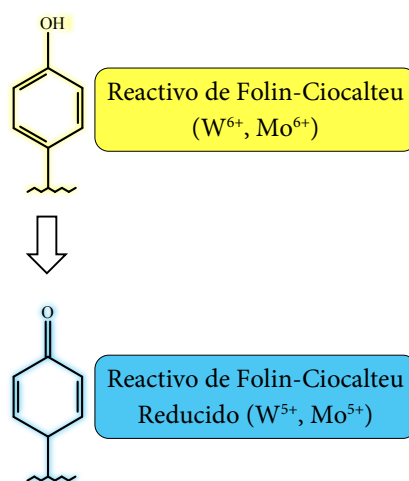


Figura 4. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu. W: tungsteno, Mo: molibdeno.

Por otro lado, los avances en la tecnología en el área de la cromatografía han permitido la caracterización de los compuestos presentes en diversas fuentes. La cromatografía es un término usado para describir una gran variedad de técnicas, las cuales se basan en la partición o distribución de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria y una móvil. La primera puede ser un líquido o un sólido (Ismail y Nielsen, 2010), mientras que la fase móvil puede

ser un gas (cromatografía de gases), un líquido (cromatografía de líquidos) o un fluido supercrítico (cromatografía de fluido supercrítico). Mediante estas técnicas se lleva a cabo la separación de los compuestos polifenólicos para su identificación y cuantificación, siendo la más empleada la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, HPLC (por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Las condiciones de los métodos de HPLC para el análisis de compuestos polifenólicos comúnmente utilizan columnas de fase reversa, un sistema binario de disolventes como agua acidificada y de tipo orgánico polar con diferentes sistemas de detección como el de arreglo de diodos o espectrometría de masas, MS (por sus siglas en inglés *Mass Spectrometry*) (Ignat et al., 2011). El desarrollo de la cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño, UHPLC (por sus siglas en inglés *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), ha perfeccionado los métodos para el análisis de matrices complejas y su acoplamiento a un MS incrementa la resolución y reduce el consumo de disolventes, permitiendo una mejor separación y caracterización de los compuestos presentes en los extractos vegetales (Taamalli et al., 2014).

2.3.1.2 Identificación de polifenoles mediante espectrometría de masas

Como ya se mencionó, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas es una de las técnicas más sensibles y efectiva para la identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos presentes en los extractos de matrices complejas (Ignat et al., 2011). La gran mayoría de los reportes en relación a la identificación de compuestos polifenólicos por MS se han enfocado principalmente al estudio de flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas (Vukics y Guttman, 2010). A partir de dichos estudios se ha reportado que los patrones de fragmentación pueden variar dependiendo del tipo de analizador con que cuente el equipo, así como de las condiciones de fragmentación (energía de colisión, temperatura del gas de colisión), por lo que Vukics y Guttman (2010) refieren que los patrones de fragmentación son aparentemente independientes del tipo de ionización que se utilice (electrospray, química a presión atmosférica, o desorción laser), y que únicamente variarán las intensidades de los iones fragmento.

En el caso de los flavonoides, las fragmentaciones más comunes involucran la ruptura de enlaces del anillo C de su estructura general (Figura 5), nombradas como retro Diels-Alder por la analogía que tiene con las reacciones de ciclo-adición de Diels-Alder, produciéndose iones conteniendo el anillo A o B y parte del C (Pinheiro y Justino, 2012).

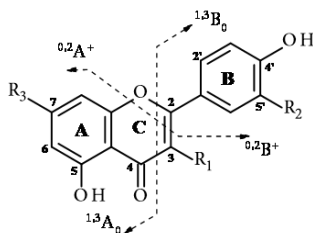


Figura 5. Fragmentación característica de flavonoides. (Pinheiro y Justino, 2012).

En la Tabla 2 se muestran los iones característicos resultantes de la fragmentación de algunos flavonoides, donde se puede observar que todos los grupos pierden sistemáticamente CO_2 a partir del ión molecular. El ión $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ se observó con menor abundancia en los flavanoles, y en el caso de las flavanonas no es clara su formación debido a la ausencia del doble enlace en el anillo C (Schmidt, 2016).

Tabla 2. Iones característicos de la fragmentación de polifenoles por MS/MS con ESI (-).

Ión característico	Flavonoides					
	Estilbenos	Flavonas	Isoflavonas	Flavanoles	Flavanonas	Flavanoles
$[\text{M}-\text{H}]^-$	+	+	+	+	+	+
$[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$		+		+	+	+
$[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$		+	+	+		
$[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}]^-$	+	+	+	+		
$[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$	+	+	+	+	+	+
$[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}]^-$			+	+		
$[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}-\text{CO}]^-$	+			+		
$[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$		+	+	+		
$[\text{M}-\text{H}-2\text{CH}_2\text{CO}]^-$	+	+				+
$[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_2\text{CO}]^-$			+	+		
$[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}_2]^-$		+	+			
$[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{O}_2]^-$	+	+	+			

Modificado de Schmidt (2016).

También se reportó la pérdida inusual de subóxido de carbono (C_3O_2) en estilbenos, flavonas e isoflavonas, así como la formación de los iones con m/z 151 (Figura 6) y 125 (Figura 7), característicos en el análisis de flavonoides a través de MS/MS (Schmidt, 2016).

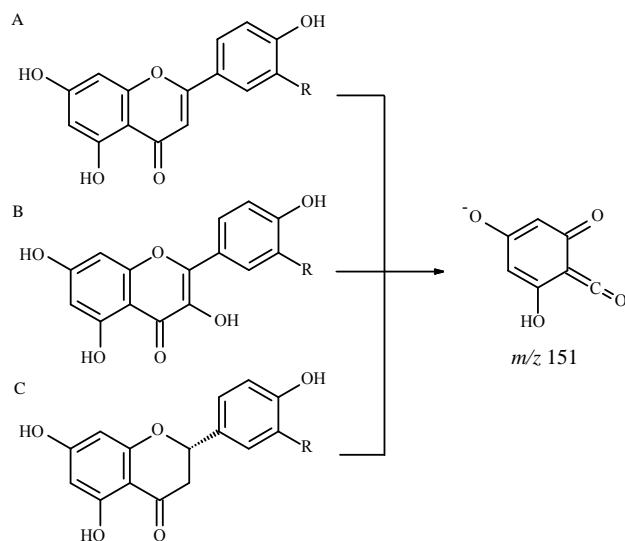


Figura 6. Esquema de la formación del ión m/z 151 en flavonoides del grupo de las flavonas (A), flavonoles (B) y flavanonas (C).

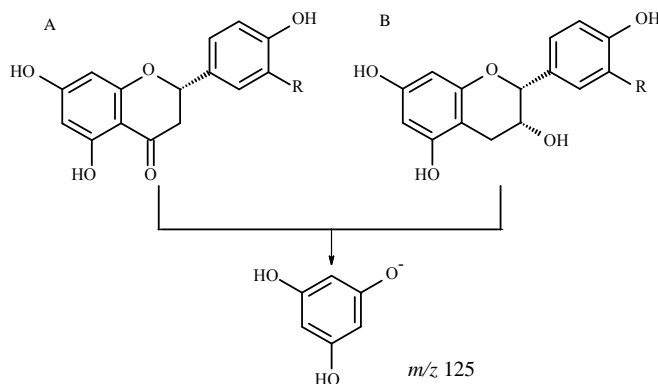


Figura 7. Esquema de la fragmentación de flavonoides para la formación del ión m/z 125, característico de flavanonas (A) y flavanoles (B).

La principal ventaja del uso de MS/MS, es el incremento en la sensibilidad en la detección, lo que permite tener mayor información de la estructura de un compuesto con base en su patrón de fragmentación. La UHPLC-DAD ha sido usada en la determinación de polifenoles en diversos tipos de matrices como vino, cerveza, frutas, vegetales, té, cocoa, aceite de oliva, entre otros (Lambert et al., 2015).

2.3.1.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

El sistema UHPLC-QToF consta de un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo de tiempo de vuelo. Algunas características del cromatógrafo de líquidos son: tamaño de partícula reducido de la fase estacionaria (columna), operación con una bomba capaz de incrementar la presión hasta 15,000 psi y consumo bajo de disolventes (orgánicos o acuosos), en el orden de los microlitros. A pesar de que la eficiencia en la separación de los compuestos es proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al radio de las partículas, en el UHPLC se reduce el tamaño de partícula de la fase estacionaria y por consiguiente la longitud de la columna, sin afectar la resolución de la respuesta (Chawla y Ranjan, 2016).

Para el análisis de los analitos en el espectrómetro de masas primeramente se debe eliminar el disolvente y enseguida ser ionizados. Para tal fin, existen diferentes métodos de ionización siendo uno de ellos electrospray (ESI, por sus siglas en inglés: *Electrospray Ionization*), en el cual frecuentemente se producen iones multi-cargados que hacen que la medición de masas grandes sea más precisa, permitiendo así el análisis de compuestos polares de alto peso molecular (hasta 10,000 Da). En la Figura 8 se esquematizó la trayectoria que siguen los iones: donde (1) el flujo proveniente del cromatógrafo es introducido a través de un capilar al que se le aplica un potencial eléctrico (positivo o negativo) de 3–5 kV; (2) por efecto del campo eléctrico la solución es atomizada y con ayuda de un gas como el nitrógeno, se promueve la evaporación del disolvente evitando la condensación de las gotas que cada vez se hacen más pequeñas y que al estar cargadas eléctricamente en su superficie la densidad de carga aumenta hasta que la repulsión natural entre cargas similares provoca la liberación de iones. (3) A continuación, únicamente los iones con la carga seleccionada en las condiciones de trabajo del equipo, siguen su trayectoria hacia el analizador, mientras que el resto de los iones son depurados con el gas de desolvatación (Herbert y Johnstone, 2002).

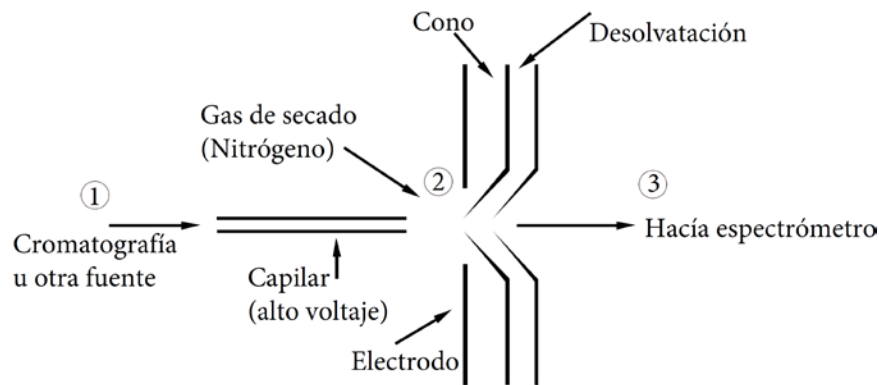


Figura 8. Esquema de la formación de los iones y su trayectoria hacia el espectrómetro de masas. Modificado de Herbert y Johnstone (2002).

Los filtros de masas cuadrupolar y el tiempo de vuelo (ToF, por sus siglas en inglés: *Time of Flight*) son analizadores de masa. Estos dispositivos pueden separar especies como iones, átomos, moléculas o grupos de moléculas, de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Un analizador cuadrupolar combina los potenciales de corriente directa (CD) y radiofrecuencia (RF), en un arreglo de cuatro barras orientadas de forma simétrica (Figura 9).

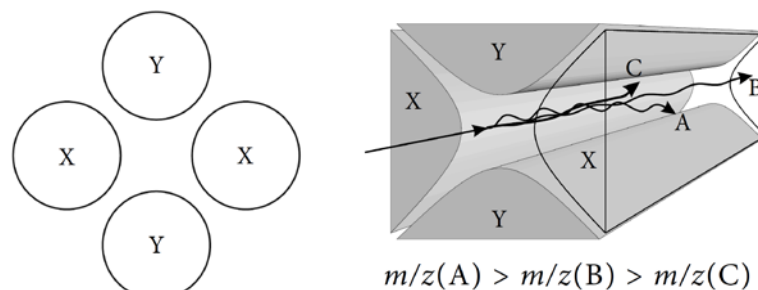


Figura 9. Esquema del principio de operación de un analizador cuadrupolar. Tomado de Westman-Brinkmalm y Brinkmalm (2009). X, Y: sección transversal de barras paralelas combinando potenciales de CD y RF. A, C: trayectoria de los iones con valores inestables de m/z ; B: trayectoria de iones estables que atraviesan el cuadrupolo para su subsecuente detección.

Las barras opuestas están conectadas eléctricamente en pares los cuales tienen en cualquier momento potenciales de igual magnitud, pero de signo opuesto. Los iones acelerados que provienen de la fuente de ionización, entran al analizador y viajan paralelamente a las barras del cuadrupolo. Únicamente los iones con la relación m/z estable, es decir, aquella cuyo valor o que

ser encuentre dentro del intervalo de valores que fueron indicados en el equipo tendrán trayectorias viables a través del cuadrupolo y llegarán al detector.

Por otro lado, el analizador ToF separa los iones con base a la diferencia de tiempo entre una señal inicial y el pulso generado cuando chocan con el detector. Idealmente todos los iones tienen la misma energía cinética y diferentes velocidades, dependiendo de la relación m/z . En la Figura 10 se muestra la trayectoria de los iones en un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo. El proceso inicia cuando los iones generados en la fuente de ionización (1) se dirigen mediante un campo eléctrico hacia el cuadrupolo (2); posteriormente la corriente de iones con un valor específico de m/z o que posean valores en un intervalo de m/z definido, pasan a través del primer cuadrupolo. Cuando llegan al electrodo deflector se les aplicará un potencial eléctrico en forma de pulsos para que se aceleren dentro del tubo analizador ToF dirigiéndose hacia el reflectrón (3), en donde se incrementarán los intervalos de tiempo en los que los valores sucesivos de m/z se detectarán al llegar al detector (4) (Herbert y Johnstone, 2002).

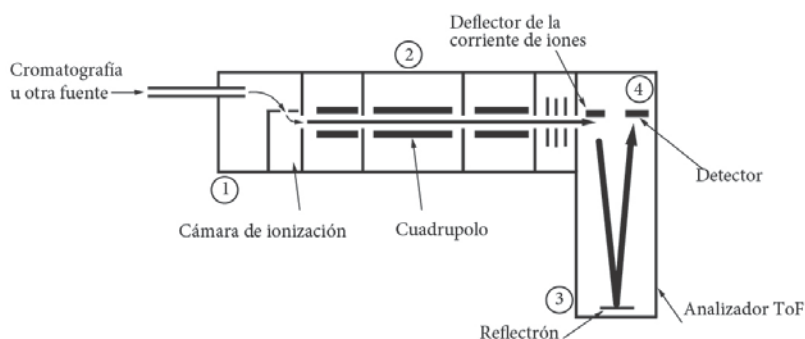


Figura 10. Esquema de espectrómetro de masas con analizadores cuadrupolo-tiempo de vuelo (QToF). Modificado de Herbert y Johnstone (2002).

Las principales ventajas de los instrumentos que poseen QToF, son la rápida adquisición de espectros de masa, permitiendo obtener al menos 30 espectros por segundo y una alta sensibilidad en la medición de las masas, lo que hace que esta técnica sea adecuada para la identificación de compuestos presentes en muestras complejas. El equipo utilizado en el presente trabajo de tesis tiene ambos analizadores (QToF).

Es importante mencionar que en este tipo de tecnología se hace uso de sustancias estabilizadoras las cuales mejoran la eficiencia de la ionización, incrementan la sensibilidad así como la intensidad de las señales hasta en dos órdenes de magnitud (Watson, Atsriku y Oliveira, 2003). Esto también se puede lograr manipulando la configuración electrónica del MS. En la caracterización de polifenoles se han usado compuestos estabilizadores, por ejemplo, Huck y Bonn (2001), reportaron la sustitución de ácido trifluoracético por ácido acético, para incrementar la sensibilidad en la detección de trimetoxiflavona; por otro lado, Rauha, Vuorela y Kostianen (2001), lograron mejorar el límite de detección empleando una solución amortiguadora de acetato de amonio (pH 4) o bien adicionando ácido fórmico (0.4%, pH 2.3) para el análisis de flavonoides. Adicionalmente, se han desarrollado nuevas estrategias de ionización para la detección de flavonoides en donde se emplean complejos metálicos con ligandos neutros (Satterfield y Brodbelt, 2000).

La fragmentación de compuestos por espectrometría de masas de alta resolución multi-etapas (MS^n) expresado como MS/MS, se emplea para la identificación de compuestos basándose en la ruptura sistemática de los compuestos, formando de este modo un árbol denominado espectral (Hoof, Vervoort, Bino, Beekwilder y De Vos, 2011). En la elucidación estructural basada en datos generados por MS/MS, los iones fragmento de los espectros de masas proveen información importante sobre la estructura molecular así como de la interacción entre los átomos, por lo que puede emplearse como herramienta para la diferenciación entre isómeros (Demarque, Crotti, Vessecchi, Lopes y Lopes, 2016). Cabe señalar que para la separación de enantiómeros es necesario el uso de columnas quirales, ya que estos tienen la misma m/z .

2.4 Generalidades de *Punica granatum*

La granada es una fruta que pertenece a la familia *Punicaceae*, con un sólo género *Punica*, que comprende a la especie *Punica granatum* (Teixeira da Silva et al., 2013). El granado es un arbusto que se adapta a climas de temperaturas cálidas y templadas, de follaje abundante, con

ramas torcidas y levemente espinosas. El fruto (Figura 11) tiene una forma globosa de 6 a 12 cm de diámetro, la corteza es de color amarillo rojizo o verde con zonas rojizas, carpelo y arilos distribuidos de forma ordenada, los cuales son comestibles y con sabor dulce o agridulce. La cáscara representa el 38% del fruto total, y es un residuo que se genera tanto por el consumo en fresco del fruto como por su procesamiento para la elaboración de jugos, mermeladas y vinos (Aguilar, Aguilera-Carbo y Robledo, 2008). La temporada de cosecha se sitúa en los meses de julio a octubre (Borochoy-Neori et al., 2009), y es seleccionada de acuerdo a las prácticas habituales de cosecha en la que se consideran color, tamaño y forma del fruto; así como dos propiedades fisicoquímicas del jugo: acidez titulable ($< 1.85\%$) y contenido de sólidos totales ($> 17\%$) (Crisosto, Mitcham y Kader, 2013).

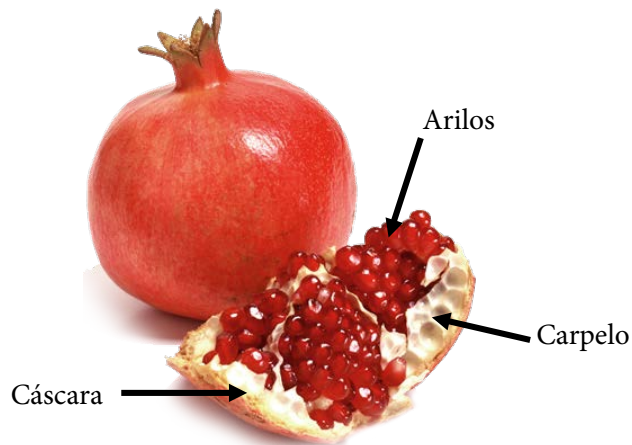


Figura 11. Partes que constituyen al fruto de *P. granatum*.

La granada en México se consume de forma esporádica y estacional (Mercado, Mondragón, Rocha, y Álvarez, 2011). Su producción en el año 2016 fue de 5,210 ton; siendo Guanajuato, Hidalgo y Oaxaca, los principales estados productores (SIAP, 2018).

2.4.1 Polifenoles cuantificados en jugo y semillas de *Punica granatum*

El contenido de polifenoles en el fruto de la granada ha sido ampliamente estudiado, incluyendo las flores y hojas del granado. Por ejemplo, empleando extracción convencional con

etanol al 70%, el CPT en pétalos, estambres y hojas de *P. granatum* fue de 332.48, 415.86, 289.76 mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/g bs (base seca), respectivamente (Zhang, Yang, Zhang, Wang y Zhang, 2011). Por otra parte, Gözlekçi, Saraçoğlu, Onursal y Ozgen (2011), registraron un CPT de 1.21 y 0.13 mg EAG/g bh (base húmeda), en el jugo y semillas, respectivamente, de granada cultivada en Turquía, empleando etanol al 50% como disolvente de extracción. Orak, Yagar e Isbilir (2012), reportaron también con *P. granatum* de Turquía, un CPT en el jugo y la semilla de 26.97 y 58.87 µg EAG/mg de extracto, respectivamente; la extracción se realizó con agitación durante una noche a temperatura ambiente. Cabe señalar, que los reportes únicamente mencionan el lugar de la colecta del fruto de *P. granatum* y que fueron adquiridos en estado de madurez comercial, sin mencionar sus condiciones de cultivo o el tipo de suelo.

En la Tabla 3 se muestran algunos compuestos identificados por LC-MS característicos en el fruto entero, jugo y semillas. Como se puede observar algunos de ellos están presentes tanto en el jugo, como en la semilla o bien en el fruto entero.

Tabla 3. Compuestos identificados por LC-MS en diferentes partes del fruto de *P. granatum*.

Compuestos identificados	Parte del fruto analizada	Referencias
Isómeros de punicalagina Granatina A y B Pedunculagina	Fruto entero	Nuncio-Jáuregui et al. (2015)
Punicalina Punicalagina Pedunculagina I Lagerstanina C Ácido elágico	Jugo	Mena et al. (2012)
Punicalagina α y β Pedunculagina I Granatina B Ácido elágico	Jugo	Gómez-Caravaca et al. (2013)
Pedunculagina Dímero de procianidina B Catequina Derivado de ácido cumárico Glucósido de kaempferol	Semillas	He et al. (2011)

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Extracción y cuantificación de polifenoles en cáscara de *P. granatum*

Existen reportes del uso de la cáscara de *P. granatum* como fuente de polifenoles cuyos frutos fueron cultivados en Turquía (Çam y Hişil, 2010), Estados Unidos (Pan et al., 2012), Yemen (Shiban, Al-Otaibi y Al-Zoreky, 2012) e Irán (Basiri, Shekarforoush, Aminlari y Akbari, 2015; Tabaraki et al., 2012). Con respecto a la cáscara de granada de origen mexicano, se reportó la extracción de polifenoles a partir de este subproducto de la industria de zumos de fruta, en un intervalo de 6.40 a 18.92 mg EAG/g de extracto, empleando diferentes métodos de extracción (maceración, decocción, EAU y asistida por microondas), empleando agua como disolvente (Castro et al., 2017); cabe señalar que no se especifica el origen de la cáscara.

La Tabla 4 muestra el CPT en los extractos de cáscara de *P. granatum* empleando diferentes métodos de extracción, condiciones y origen del fruto. La mayor cantidad de polifenoles se logró por EC empleando metanol; por otro lado, en la EAU se obtuvieron mayores concentraciones del CPT empleando agua como disolvente. En el presente trabajo las condiciones empleadas para la EC no han sido reportadas; en el caso de las utilizadas en la EAU se ha realizado usando etanol (70%) por 10 min a 30 °C (Tabaraki et al., 2012), 10 °C más que los utilizados en el presente trabajo.

3.2 Caracterización de la composición de extractos de cáscara de *P. granatum*

La identificación y cuantificación de algunos compuestos presentes en la cáscara de *P. granatum* se han realizado por técnicas cromatográficas como HPLC-DAD (Fischer, Carle y Kammerer, 2011) y HPLC-UV (Li et al., 2015). También el análisis de extractos de cáscara de *P. granatum* se ha realizado por UHPLC-QToF, los cuales fueron obtenidos por decocción (60 °C durante 2 h, con agitación a 180 rpm y sin exposición a la luz) así como por extracción asistida por microondas (70 °C, 90 s, 550 W), empleando agua como disolvente (Castro et al., 2017).

Tabla 4. Contenido de polifenoles totales en extractos de cáscara de *P. granatum*.

CPT (mg EAG/g bs)	Disolvente	Métodos de extracción y condiciones		País de origen de granada	Referencia
		EC	EAU		
226.9 ± 13.5	Agua	25 °C, 24 h		Irán	Tehraniyar, Selahvarzi, Kharrazi y Bakhsh (2011)
423.5 ± 31.8	Metanol	25 °C, 24 h			
148	Agua		25 °C, (59.2 W/cm ²) continua por 6 min	Estados Unidos	Pan et al. (2012)
132	Agua		25 °C, (59.2 W/cm ²), intervalos de 5 s por 12 min		
119	Agua	25 °C, 60 min			
274.1	Metanol 80%	25 °C, 60 min		Yemen	Shiban et al. (2012)
91.2	Agua				
8.5	Éter etílico				
70.94	Etanol 70%		30 °C, 10 min (35 kHz, 140 W)	Irán	Tabaraki et al. (2012)
91.98	Etanol 50%		60 °C, 30 min (35 kHz, 140 W)		
314.8	Etanol 40%	22 °C, 60 min, con agitación		Grecia	Amyrgialaki, Makris, Mauromoustakos y Kefalas (2014)
36 ± 3.46	Etanol 80%	25 °C, 15 min		Brasil	Pimenta, Barroz, Salgado, Melo y Biazotto (2014)
129	Agua		35 °C, 10 min (130 W, 20 kHz)	Grecia	Goula et al. (2015)
138.5	Agua		34.7 °C, 10 min (130 W, 20 kHz)	Grecia	Kaderides, Goula y Adamopoulos (2015)
6.4	Agua	30 °C, 2 h, con agitación (180 rpm)		México	Castro et al. (2017)
n.e.	Agua		25 °C, 60 min (40 kHz, potencia 100%)		

CPT: contenido de polifenoles totales, EC: extracción convencional, EAU: extracción asistida por ultrasonido, mg EAG/g bs: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo en base seca, n.e.: no especificado.

En la Tabla 5 se muestran los compuestos identificados y cuantificados en cáscara de *P. granatum*. Fischer et al. (2011), para la cuantificación emplearon curvas de calibración de compuestos de referencia, en el caso para los cuales no tuvieron estándares, construyeron curvas de calibración con compuestos estructuralmente relacionados, empleando como factor de corrección el peso molecular de dichos compuestos. Por otro lado, la identificación de compuestos realizada por Li et al. (2015), se llevó a cabo empleando estándares con porcentajes de pureza superiores al 98%. En el caso de los compuestos identificados por Castro et al. (2017), realizaron la comparación de espectros de masas reportados en literatura y bases de datos.

Qu, Breksa, Pan y Ma (2012), reportaron la recuperación de metabolitos a partir de bagazo de granada (semillas y cáscara) generado de la obtención del jugo. Los autores mediante HPLC-PDA aislaron α y β punicalagina, así como ácidos orgánicos como elágico y gálico, y mencionaron que los tiempos de extracción dependen del compuesto de interés, por ejemplo, para los ácidos gálico y elágico se requieren 20 min y 60 min para la α y β punicalagina.

En el grupo de investigación se obtuvieron extractos a partir de polvo de cáscara de *P. granatum* de Oaxaca por EC (maceración), a temperatura ambiente, sin agitación por 24 h. En dichos extractos fueron identificados por UHPLC-QToF α y β punicalagina, punicalina, ácido elágico, ácido caféico y ácido gálico; y por HPLC-DAD se identificaron pedunculagina y ácido cumárico (López-Hernández, 2017).

Tabla 5. Compuestos identificados y cuantificados en cáscara de *P. granatum*.

Compuesto	Concentración (mg/g bs)		
	Fischer et al. (2011)	Li et al. (2015)	Castro et al. (2017)
*Ácido elágico-hexósido	0.96		
*Ácido elágico-pentósido	0.62		
*Bilactona de ácido valonéico	0.44		
*bis-Hexahidroxidifenoil-hexósido	3.50		
*Derivado de castalagina	2.94		
*Digaloil-Hexahidroxidifenoil-hexósido	1.83		
*Galoil-bis-hexahidroxidifenoil-hexósido	2.09		
*Hexahidroxidifenoil-hexósido	0.51		
*Lagerstanina B	2.12		
Ácido caféico		0.20	
Ácido cinámico			nc
Ácido clorogénico		0.35	
Ácido dihidrocaféico			nc
Ácido elágico	0.64		
Ácido elágico		2.83	
Ácido gálico		2.59	
Catequina		12.65	
Derivado de ácido elágico			nc
Epicatequina		0.94	
Galocatequina			nc
Granatina B			nc
Hexahidroxidifenoil-hexósido			nc
Pedunculagina			nc
Punicalagina	10.54		
Punicalagina		64.98	
Punicalagina			nc
Punicalina			nc
Rutina		0.36	

mg/g bs: miligramos por gramo base seca, nc: no cuantificado. *Compuestos identificados a partir de curvas de calibración construidas con estándares de referencia estructuralmente relacionados y utilizando un factor de corrección de peso molecular (Fischer et al., 2011).

4. JUSTIFICACIÓN

En el 2016, la producción de granada en México fue de 5,210 ton, que pueden generar 1,980 ton de cáscara aproximadamente, la cual representa una fuente importante de compuestos polifenólicos. En trabajos previos del grupo de investigación, se obtuvieron extractos etanólicos a partir de la cáscara de granada cultivada en el estado de Oaxaca, empleando EC (maceración), a temperatura ambiente, sin agitación por 24 h. Se estableció que dichos extractos tuvieron actividad contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh) (Asprón-Moncada et al., 2014), y fueron utilizados para el desarrollo de una bebida funcional híbrida con actividad contra el VSRh (López-Hernández, 2017). Estos resultados son importantes porque a la fecha no se cuenta con un medicamento eficaz contra este virus. Por otro lado, los compuestos identificados en la muestra de Oaxaca fueron α y β punicalagina, punicalina, ácido elágico, ácido caféico y ácido gálico (UHPLC-QToF), y pedunculagina y ácido cumárico (HPLC-DAD) (López-Hernández, 2017).

Con base a lo anterior, se considera a la cáscara de granada una fuente importante para la obtención de compuestos con aplicación potencial en la elaboración de alimentos funcionales con actividad antiviral contra el VSRh, por lo que se propuso estudiar comparativamente la cáscara obtenida de frutos cultivados en Oaxaca y en Guanajuato, otro estado con producción alta de granada en México, para los cuales se ha reportado que las características de clima y suelo son diferentes (INEGI, 2017) (Anexo I). Es importante establecer las condiciones de EC para obtener mayores rendimientos de extracto y de CPT, a las condiciones previamente establecidas, implementando etapas sucesivas de extracción hasta agotar el CPT en la cáscara de granada (\leq 10%). También es relevante estudiar otro tipo de extracción como la EAU, considerando que esta técnica es de las más utilizadas para compuestos termolábiles como los polifenoles. Además, se requiere generar información con más detalle del perfil de compuestos polifenólicos de los extractos obtenidos a partir de cáscara de granada, lo cual es posible empleando la UHPLC-QToF.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar y comparar el perfil polifenólico de extractos de cáscara de *Punica granatum*, cultivada en Guanajuato y Oaxaca, obtenidos mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, utilizando UHPLC-QToF.

5.2 Objetivos específicos

1. Agotar el contenido de polifenoles totales ($\leq 10\%$), en la cáscara de *P. granatum* procedente de Guanajuato y Oaxaca, empleando extracción convencional a temperatura ambiente, con respecto a la suma del CPT de cada una de las etapas realizadas.
2. Agotar el contenido de polifenoles totales ($\leq 10\%$), en la cáscara de *P. granatum* procedente de Guanajuato y Oaxaca, empleando extracción asistida por ultrasonido a 20 ± 3 °C, con respecto a la suma del CPT de cada una de las etapas realizadas.
3. Obtener el perfil de compuestos polifenólicos de los extractos de cáscara de *P. granatum*, utilizando UHPLC-QToF.
4. Analizar comparativamente la composición de los extractos polifenólicos de la cáscara de *P. granatum*.
5. Identificar y confirmar compuestos no reportados en cáscara de *P. granatum* mediante experimentos de MS/MS.

6. METAS

1. Número de recambios de disolvente (etapas) establecidos empleando extracción convencional a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), para que la concentración de polifenoles totales sea igual o menor al 10% con respecto a la suma del CPT de cada una de las etapas realizadas.
2. Número de recambios de disolvente (etapas) establecidos empleando extracción asistida por ultrasonido a 20 ± 3 °C, para que la concentración de polifenoles totales sea igual o menor al 10% con respecto a la suma del CPT de cada una de las etapas realizadas.
3. Extractos de cáscara de *P. granatum* caracterizados en cuanto a su perfil de compuestos polifenólicos.
4. Compuestos identificados en cada uno de los extractos de cáscara de *P. granatum*.
5. Compuestos identificados que no han sido reportados en cáscara de *P. granatum*, en cada uno de los extractos.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivos y materiales

En la obtención de los extractos se utilizaron etanol desnaturalizado 40 B (J.T. Baker) y agua desionizada. Para la extracción en fase sólida se utilizó una columna de 3 mL LC-18 preparativa (Supelclean), de base silica enlazada a octadecilo (C18) de 45 μm y 6 nm de tamaño de partícula y poro respectivamente, así como los disolventes metanol anhidro (J.T. Baker), diclorometano (Meyer) y acetonitrilo (Tedia). En el método para la cuantificación de polifenoles totales se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M (Sigma Aldrich) y carbonato de sodio (Meyer). Para el análisis de los extractos por UHPLC-QToF se utilizaron ácido fórmico al 88% y leucina/encefalina (Waters), ácido acético (J.T. Baker), acetonitrilo-HPLC (Tedia), agua-LC/MS y metanol-LC/MS (Fisher Chemical), y viales de vidrio de 2 mL con septo (Waters). Se utilizaron estándares de punicalagina 98% grado HPLC, ácido elágico 95% y ácido gálico (Sigma-Aldrich). Para la filtración de los extractos se utilizaron membranas de nylon de tamaño de poro de 0.45 y 0.20 μm (Whatman).

7.2 Adquisición de frutos de granada

Se adquirieron granadas en huertos de traspatio de San Juan Bautista Cuicatlán, Oaxaca y Santiago Maravatío, Guanajuato; en el mes de septiembre de 2015, que corresponde a la época de recolección de estos frutos. Dichos frutos fueron obtenidos en el estadio maduro, de acuerdo a lo reportado por Al-maiman y Ahmad (2002) quienes establecieron una textura suave y un color rojizo de la cáscara para esta etapa de madurez de la granada. Debido a que el interés del presente trabajo fue el análisis de la cáscara de *P. granatum*, se cuidó que los frutos adquiridos no presentaran agrietamiento, infestación y pudrición, en la cáscara. Los frutos frescos se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología, Universidad Tecnológica de la Mixteca.

7.3 Cálculo del rendimiento de la cáscara de *P. granatum*

Los frutos de granada colectados fueron lavados con agua potable y la cáscara fue separada manualmente de la parte comestible. La cáscara se secó en un horno (Marca Felisa, mod. F292-DA), por 72 h a 40 °C. El % de humedad fue calculado con la ecuación 1.

$$\% \text{ humedad} = \frac{W_1 - W_2}{W} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde W_1 es el peso del crisol con cáscara fresca, W_2 corresponde al peso del crisol con cáscara seca y W es el peso de la cáscara fresca. Seguido, se redujo el tamaño de partícula de la cáscara seca empleando un molino ciclónico con apertura de malla de 0.5 mm (Marca Cyclotec, mod. CT193), obteniendo un tamaño de partícula homogéneo de 0.45 mm. El polvo obtenido se almacenó a 4 °C en un frasco ámbar de cierre hermético hasta su uso.

El rendimiento de la cantidad de cáscara de *P. granatum*, se obtuvo por medio de la ecuación 2.

$$\% \text{ Cáscara seca} = \frac{M_2}{M_1} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde M_2 es el peso de la cáscara seca (g) y M_1 es el peso de la cáscara fresca (g).

7.4 Extracción sólido-líquido

7.4.1 Extracción convencional

Se adicionaron 10 mL de etanol al 70% a 0.2 g de polvo de cáscara de *P. granatum* en un recipiente de vidrio ámbar, la mezcla se mantuvo sin agitación a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), durante 24 h (Etapa 1), después se centrifugó a 4000 rpm, 4 °C por 30 min (centrifuga refrigerada, Marca Eppendorf, mod. 5810R) para recuperar el sobrenadante y el precipitado. El sobrenadante se filtró y se le determinó el contenido de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu. El pellet se sometió nuevamente al proceso de extracción a las mismas condiciones mencionadas (Etapa 2), este procedimiento se repitió hasta que el CPT fue menor o

igual al 10% con respecto a la suma del CPT de todas las etapas de extracción realizadas (100%) (Etapa n). Finalmente, los extractos de las diferentes etapas se mezclaron y se determinó el CPT. Estos extractos se prepararon para su análisis por UHPLC-QToF (sección 7.6).

7.4.2 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se realizó a 20 ± 3 °C, durante 10 min en un baño ultrasónico (Marca Branson, mod. CPX8800H) a 280 W, 40 ± 2.4 kHz. Tomando en cuenta que fueron necesarias 3 extracciones para llegar a 10% del CPT, se siguió el procedimiento mencionado en la extracción convencional, para la preparación del extracto, recuperación del pellet, agotamiento de la muestra y cuantificación de polifenoles totales.

7.5 Contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se tomaron 50 μ L de extracto y se añadieron a 3 mL de agua, posteriormente se adicionaron 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, esta disolución se dejó en reposo durante 5 min a temperatura ambiente y después se adicionaron a la mezcla 750 μ L de Na_2CO_3 al 20% y 950 μ L de agua, se homogeneizó y se dejó reposar durante 40 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Marca Hach, mod. DR500). Previamente se construyó una curva de calibración con el estándar de ácido gálico (AG), a 5 concentraciones; 100, 300, 500, 700 y 900 μ g AG/mL, obtenidas a partir de una solución de 2 mg AG/mL, con el método de Folin-Ciocalteu descrito. El CPT se reportó como mg equivalentes de ácido gálico por g de cáscara seca (mg EAG/g cs). Todos los extractos fueron analizados por triplicado.

7.6 Preparación de los extractos para su análisis por UHPLC-QToF

Primeramente, la resina de la columna LC-18 de 3 mL fue activada añadiendo 2 mL de los siguientes disolventes de manera consecutiva: acetonitrilo, agua y metanol. Seguido, se inyectaron 500 μ L de extracto a la columna y se eluyeron con 2 mL de metanol. La columna se

lavó con 2 mL de cada disolvente en el siguiente orden: acetonitrilo, diclorometano, acetonitrilo y finalmente se equilibró con 2 mL de metanol; este procedimiento se realizó hasta terminar el volumen total de extracto obtenido. El eluido total colectado fue llevado a sequedad a presión reducida en un rotavapor (Marca Ika, mod. RV10D), y se registró el peso del extracto seco, el cual fue almacenado en refrigeración, sin exposición a la luz hasta su uso.

7.7 Perfil polifenólico de los extractos por UHPLC-QToF

Los extractos secos fueron re-disueltos en metanol, a una concentración de 1 mg/mL. Todos los extractos fueron filtrados con una membrana de nylon de 0.2 μm . Se adicionó 1 μL de ácido fórmico para obtener una concentración final del 0.1% en 1 mL de extracto. La mezcla se colocó en el vial de vidrio y se introdujo en el automuestreador del equipo.

7.7.1 Cromatogramas y espectros de masas

Se utilizó un equipo Acquity UPLC Clase I con detector Xevo® G2 XS QToF (Figura 12), con fuente de ionización ESI. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó con el software Masslynx versión 4.1 (Waters).



Figura 12. Equipo UHPLC-QToF, Laboratorio de Biotecnología, UTM.

Las condiciones de la cromatografía de líquidos fueron: Columna Acquity UPLC HSS T3 C18 2.1 x 100 mm, tamaño de partícula 1.8 μm . Fase móvil A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v), fase móvil B: acetonitrilo (100%), volumen de inyección de 5 μL , velocidad de flujo de 0.2 mL/min. La elución se realizó con un gradiente lineal de la siguiente manera: de 0 a 15 min (97-60% A), 15-16 min (60-3% A), de 16-16.5 min (3-97% A). La columna se mantuvo a 40 °C y el automuestreador a 7 °C.

Condiciones del Q-ToF: El sistema MS fue operado en modo negativo (-) y modo sensibilidad. La fuente de ionización operó con voltaje del capilar 2.5 kV, temperatura de la fuente 120 °C, y temperatura de desolvatación 400 °C. El voltaje del cono se fijó en 25 V, se utilizó nitrógeno como gas del cono con un flujo del gas de desolvatación de 1000 L/h. Se recogieron los datos de espectrometría de masas en el modo de barrido completo desde m/z de 100 a 1200 en formato continuo cada 0.5 s. Se utilizó como estándar de referencia de masas leucina/encefalina, $[M-H]^- = 554.2615$.

Para la identificación de ácido elágico y punicalagina se utilizaron estándares comerciales, en metanol a una concentración de 1 mg/mL. Los patrones de fragmentación de los compuestos característicos de la cáscara de granada se obtuvieron con energía de colisión a 40 V. Por otra parte, para la identificación de los compuestos no reportados en cáscara de granada, la fragmentación se realizó con un perfil de energía de colisión empleando 10, 20 y 30 V, lo cual implica que durante el experimento la energía tendrá los tres valores de energía, optimizando de este modo la fragmentación de dichos compuestos.

7.7.2 Identificación de compuestos polifenólicos

La identificación de los compuestos polifenólicos se realizó comparando los tiempos de retención del ión $[M-H]^-$ respecto al de estándares comerciales. Los compuestos para los cuales no se tuvo estándares de referencia se asignaron de la siguiente manera: primero se calculó su masa monoisotópica de acuerdo a las fórmulas reportadas para compuestos presentes en la

cáscara, jugo, semilla y mesocarpio de la granada. Posteriormente, en el cromatograma general se ubicó la masa del ión $[M-H]^-$ así como su tiempo de retención correspondiente, y se generó su respectivo espectro de masas, a partir del cual se hizo la asignación del compuesto considerando su fórmula molecular y un margen de error de 5 mDa. La asignación de compuestos se apoyó con el análisis del espectro de MS/MS sin energía de colisión y con perfil de energía de colisión (10, 20 y 30 V), tomando en cuenta el tiempo de retención de cada uno de los compuestos. Adicionalmente, se utilizó un programa de predicción de espectros (<http://cfmid.wishartlab.com/>), que los genera a partir de la estructura química dada, ingresando datos en formato InChI (identificador químico internacional por sus siglas en inglés: *International Chemical Identifier*) a diferentes niveles de energía: baja (10 V), media (20 V) y alta (40 V). Los datos obtenidos experimentalmente se compararon con los del nivel de energía media de 20 V.

7.7.3 Análisis comparativo del perfil polifenólico de los extractos

Una vez que se asignaron los compuestos a las masas identificadas por UHPLC-QTOF, se construyó una tabla que permitió el análisis comparativo entre métodos de extracción como por origen de los frutos.

7.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico para los extracto y contenido de polifenoles se realizó, mediante ANOVA de dos vías y una prueba de Tukey para un $\alpha < 0.05$; considerando dos factores y dos niveles, factor A: tipo de extracción (niveles: EC y EAU) y factor B: origen de los frutos (niveles: Oaxaca y Guanajuato). Se utilizó el programa OriginPro© 2016.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Contenido de polifenoles totales en la cáscara de granada

Se obtuvieron 379.67 g de cáscara/kg de fruto (base húmeda), de cada uno de los orígenes; después del proceso de secado se registró un peso medio de 171 g (base seca) de cáscara seca. El rendimiento de cáscara seca fue del 45% para ambos orígenes, similar a lo reportado por López-Hernández (2017).

Empleando la cáscara de granada de Oaxaca y etapas consecutivas de extracción convencional, se determinó que fueron suficientes 3 para tener un 9% de CPT, valor menor a lo establecido como objetivo del presente trabajo, con respecto a la sumatoria del CPT correspondiente a las 5 extracciones (Tabla 6).

Tabla 6. Etapas de extracción y contenido de polifenoles totales, obtenidos por extracción convencional, para la cáscara de *P. granatum* de Oaxaca.

Etapas	CPT (mg EAG/g cs)	% CPT
1	221.75 ± 5.90	68
2	66.65 ± 0.90	20
3	29.90 ± 0.50	9
4	5.15 ± 0.25	2
5	2.80 ± 0.10	1
Total*	326.25 ± 6.00	100

CPT: Contenido de polifenoles totales, mg EAG/g cs: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de cáscara seca. *Valor que corresponde a la sumatoria del CPT de las 5 etapas de extracción convencional realizadas, el cual fue considerado como el 100%. Se utilizaron 0.2 g de cáscara de granada de Oaxaca y 10 mL de etanol al 70%, para la extracción convencional a temperatura ambiente, sin agitación ni exposición a la luz, por 24 h.

Con base a lo anterior, para ambos métodos de extracción realizados en el presente trabajo de tesis se implementaron 3 etapas de extracción consecutivas (Tabla 7), lo que permitió evaluar el CPT de cada una de las etapas de extracción, a diferencia de otros reportes en los que la cuantificación de CPT la hacen únicamente con el extracto total colectado (Ventura et al., 2013; Orak et al., 2012).

Tabla 7. Contenido de polifenoles totales en los extractos de cáscara de granada de dos orígenes (Oaxaca y Guanajuato) en etapas de extracción consecutivas, por dos métodos de extracción.

Método de extracción/origen	EC			EAU		
	Oaxaca	Guanajuato	Oaxaca	Guanajuato	Oaxaca	Guanajuato
Etapa	mg EAG/g cs	% CPT	mg EAG/g cs	% CPT	mg EAG/g cs	% CPT
1	151.81 ± 3.22 a	77.2	224.45 ± 9.54 b	73.8	201.35 ± 10.52 c	89.1
2	32.69 ± 0.64 e	16.6	59.08 ± 0.49 f	19.4	20.13 ± 1.12 g	8.9
3	12.23 ± 0.24 j	6.2	20.61 ± 0.69 k	6.8	4.55 ± 0.31 l	2.0
Total*	196.73 ± 3.29	100.0	304.14 ± 9.58	100.0	226.03 ± 10.58	100.0

EC: extracción convencional, EAU: extracción asistida por ultrasonido, mg EAG/g cs: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de cáscara seca. % CPT: porcentaje del contenido de polifenoles totales. Letras diferentes en cada etapa de extracción indican diferencia significativa a un nivel de 0.05 *Valor determinado por la suma del CPT de las 3 etapas de extracción (100%). En ambos tipos de extracción se utilizaron 0.2 g de muestra en 10 mL de etanol al 70%. Condiciones EC: T = 22 ± 2 °C, t = 24 h; EAU: potencia 280 W, T = 20 ± 3 °C, t = 10 min.

Como se puede observar, el valor más alto del CPT se obtuvo en la primera etapa de extracción, siendo mayor para EAU, lo cual se observó en ambos orígenes. En las etapas posteriores el CPT fue menor para EAU comparado con el de la EC, mostrando que la EAU permitió extraer una mayor cantidad de compuestos polifenólicos desde la primera extracción, siendo esto uno de los beneficios que tiene el uso de la EAU. Comparando las ventajas del uso de la EAU sobre la EC, en el presente trabajo se logró incrementar hasta un 33% el CPT para la cáscara de Oaxaca y un 18% el CPT para Guanajuato en la primera etapa de extracción, en un menor tiempo; contribuyendo de este modo en el proceso de extracción de polifenoles a partir de la cáscara de *P. granatum*. El CPT de la cáscara de granada de ambos orígenes en la primera etapa (Tabla 7) de EAU fue mayor a lo reportado (70.95 mg EAG/g) por Tabaraki et al. (2012), quienes realizaron EAU empleando también cáscara de *P. granatum*, etanol al 70%, a 30 °C, 140 W y 10 min. Este incremento en el CPT se puede atribuir a que en el presente trabajo la EAU se realizó a 10 °C menos que Tabaraki; lo cual pudo haber influido de manera positiva para incrementar la extracción debido a que los compuestos polifenólicos son moléculas termolábiles.

Para este trabajo, un aspecto importante a establecer fue la relación entre el rendimiento de extracto de la cáscara de *P. granatum* y su CPT (Tabla 8), debido a que es del interés del grupo de investigación tener las bases para llevar a cabo el escalamiento del proceso.

Tabla 8. Rendimientos de la obtención de extractos etanólicos y del contenido de polifenoles totales obtenidos a partir de polvo de cáscara de *P. granatum*.

Rendimientos	Oaxaca		Guanajuato	
	EC	EAU	EC	EAU
Extracto (g/100 g cs)	69.07 ± 11.5 a	69.48 ± 3.5 a	40.70 ± 10.6 b	53.60 ± 4.7 c
CPT (mg EAG/g cs)	193.7 ± 1.8 a	202.1 ± 1.0 b	298.9 ± 5.4 c	297.3 ± 0.9 c

Valores cuantificados en los extractos colectados en las 3 etapas de extracción, CPT: contenido de polifenoles totales, EC: extracción convencional, EAU: extracción asistida por ultrasonido. n=3. Letras iguales por fila indican que no existe diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.05, de acuerdo a prueba *t* de student para dos muestras.

Como se pudo observar en la Tabla 8, los rendimientos de los extractos obtenidos tanto por EC y EAU fueron mayores para la muestra de Oaxaca no obstante, presentaron un menor CPT; a pesar de esto dichos valores se encuentra dentro de lo reportado para otros residuos agroindustriales (Babbar y Oberoi, 2014); por tal razón, sigue siendo una buena opción como fuente de polifenoles aunado a la actividad antiviral que presentan dichos extractos, lo cual es del interés del grupo de trabajo. Sin embargo, de acuerdo al análisis de varianza realizado, se observó que estadísticamente no hubo diferencia significativa tanto en los rendimientos de los extractos como para el CPT obtenidos de cada tipo de extracción, y por el contrario en los orígenes sí, a un nivel de significancia de 0.05, lo cual se pudo confirmar mediante la prueba de Tukey.

La diferencia en la concentración del CPT puede atribuirse a la capacidad de solubilidad de las estructuras moleculares contenidas en la cáscara, así como a la difusión de dichos compuestos hacia el disolvente. Por otro lado, el CPT también está determinado por las características propias del clima y suelo (Anexo I) de los orígenes de cada uno de los frutos de donde se obtuvieron las cáscaras, como ha sido reportado para este tipo de compuestos (Romeo et al., 2015; Zhang et al., 2011).

8.2 Compuestos polifenólicos identificados

Una vez obtenido el rendimiento de polifenoles en los extractos de cáscara de *P. granatum*, se analizó la composición de estos para cada tipo de extracción y origen. Primeramente, se obtuvieron los cromatogramas (Figuras 13 y 14) de los extractos estudiados en este trabajo de tesis. Se observaron picos cromatográficos a diferentes tiempos de retención, encontrándose similitud para la mayoría de las señales entre los 4 extractos analizados, pero con diferente intensidad, lo que puede sugerir que tienen la misma composición, pero difieren en cuanto a su concentración. Las señales correspondientes a los tiempos de retención (t_R) 3.10 y 3.17 (Figura 13 a y b) se observaron únicamente en el extracto de la cáscara de Guanajuato obtenido tanto por EC como por EAU.

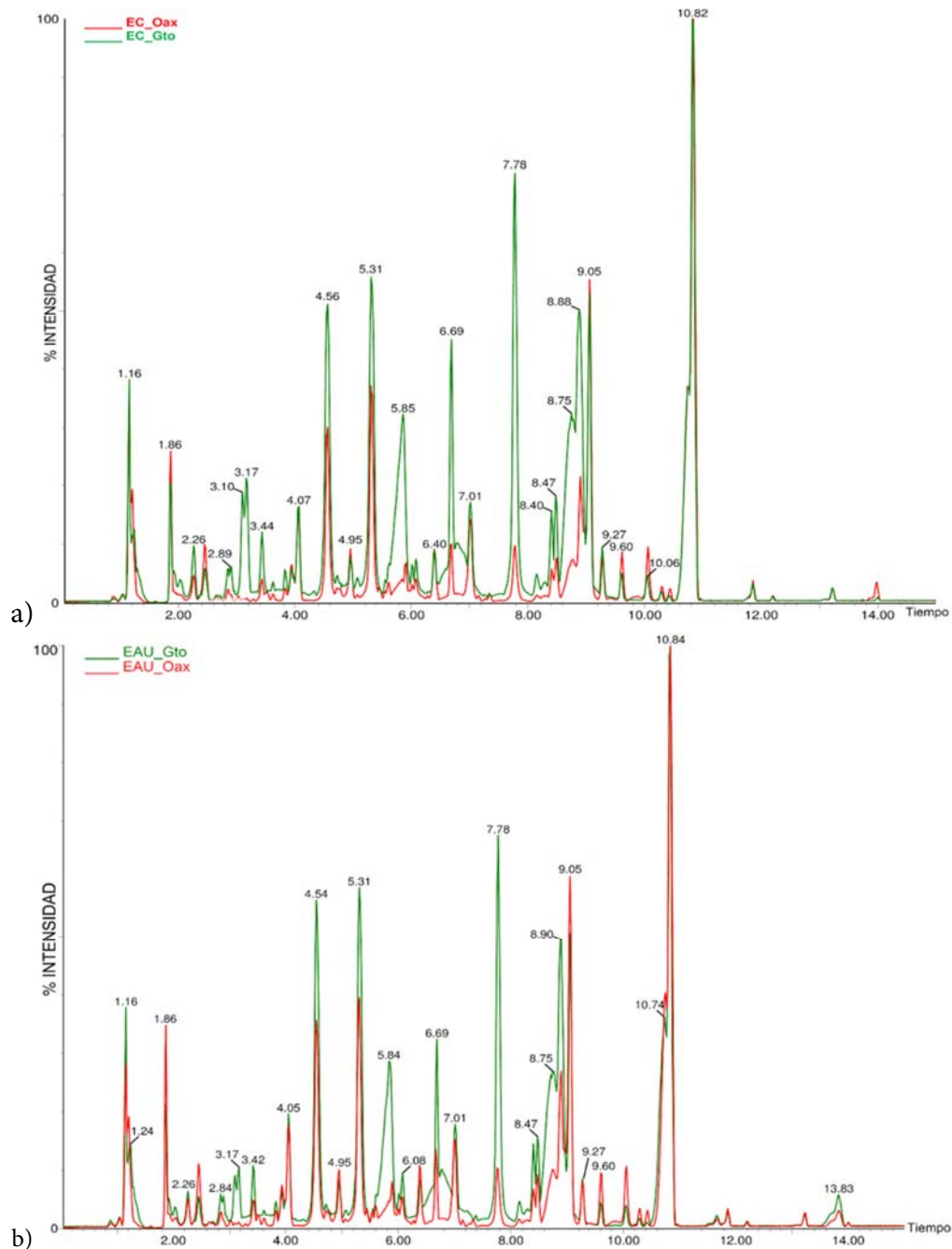


Figura 13. Cromatogramas comparativos por método de extracción, generados a partir de los extractos de cáscara de *P. granatum* de Guanajuato y Oaxaca. a) Extracción convencional, b) Extracción asistida por ultrasonido. Adquiridos por UHPLC-QToF, modo negativo, con MS en modo barrido, flujo de 0.2 mL/min, eluyentes A: 0.1% ácido acético y B: acetonitrilo. EC_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción convencional, EC_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción convencional, EAU_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción asistida por ultrasonido, EAU_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción asistida por ultrasonido.

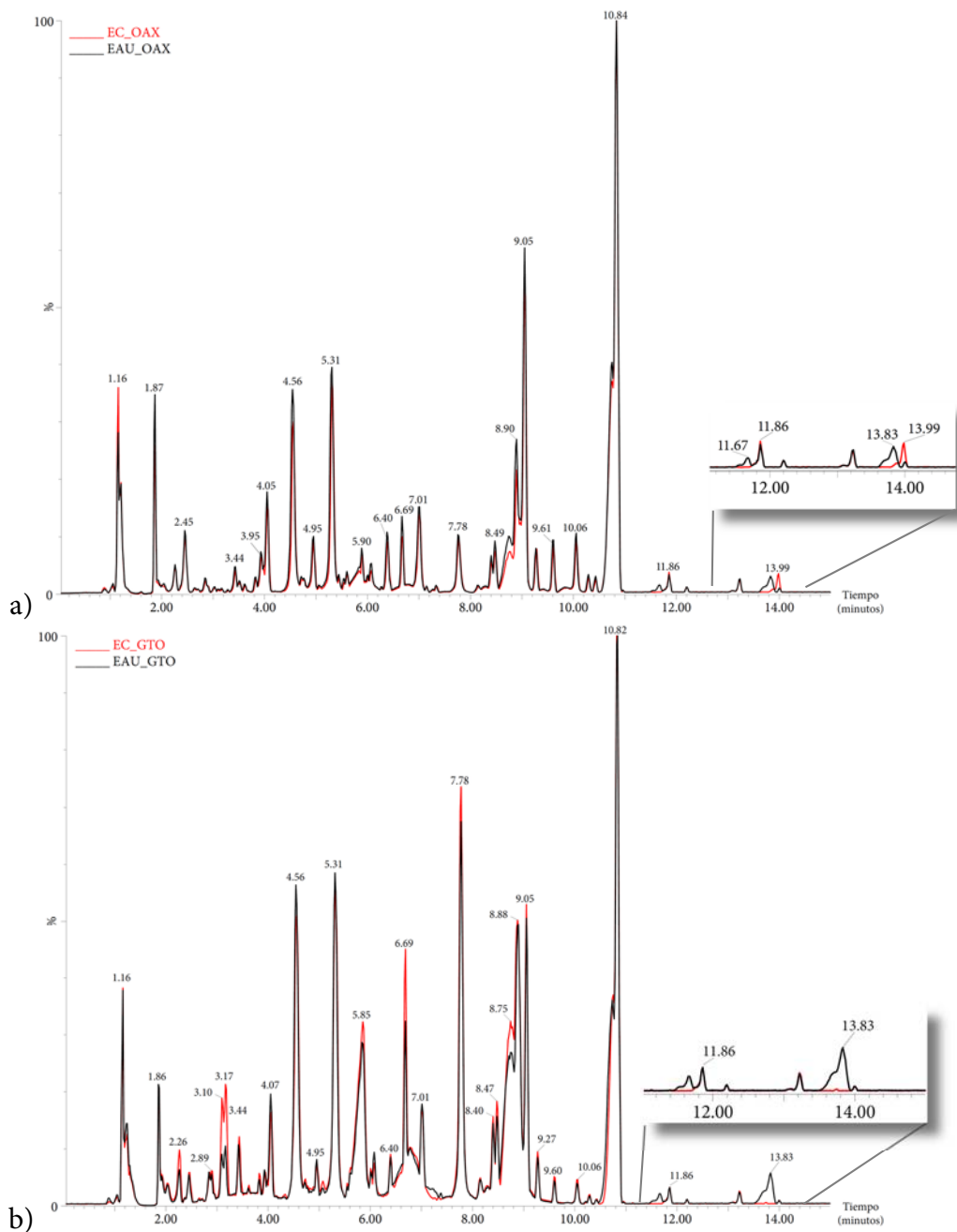


Figura 14. Cromatogramas comparativos por origen, generados a partir de los extractos de cáscara de *P. granatum* de Guanajuato y Oaxaca. a) Oaxaca, b) Guanajuato. Adquiridos por UHPLC-QToF, modo negativo, con MS modo barrido, flujo de 0.2 mL/min. Eluyentes A: 0.1% ácido acético y B: acetonitrilo. EC_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción convencional, EC_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción convencional, EAU_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción asistida por ultrasonido, EAU_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción asistida por ultrasonido.

En el comparativo de los cromatogramas por origen de los frutos (Figura 14, a y b), las señales a los t_R de 11.67 y 13.83 min, se observaron únicamente en los extractos obtenidos por EAU de ambos orígenes. Lo anterior, sugiere que el ultrasonido permitió la liberación de un mayor número de metabolitos contenidos en la cáscara. De manera general, se observó que la intensidad de las señales de los cromatogramas de los extractos de la cáscara de Guanajuato fue mayor con respecto a la observada para la muestra de Oaxaca, lo que puede asociarse a la mayor concentración de los compuestos. Lo anterior se debe probablemente, a la composición del suelo y clima de donde provienen los frutos utilizados en este trabajo, como ya se mencionó previamente.

En la Tabla A2 (Anexo II) se presentan de manera comparativa los compuestos que fueron asignados a las señales de masas identificadas en los 4 extractos analizados. Dichos compuestos fueron agrupados con base a su clasificación por estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y taninos. Se observó que una mayor cantidad de compuestos están presentes en los 2 extractos obtenidos de la cáscara de Oaxaca por ambos métodos de extracción.

Se identificaron hasta el momento 47 compuestos que ya han sido reportados en cáscara de granada a partir del análisis de las masas de los 4 cromatogramas, en donde se comparó la m/z con los compuestos reportados en literatura, considerando un error de 5 mDa entre los valores experimentales con los obtenidos con la herramienta *elemental composition* del UHPLC-QToF. Para EC_Oax, EC_Gto, EAU_Oax y EAU_Gto se registraron 39, 36, 25 y 21 compuestos respectivamente. Además se identificó un compuesto que únicamente ha sido reportado en el jugo de granada (Mena et al., 2012), y tentativamente otro que no ha sido reportado en granada hasta el momento (Foo y Karchesy, 1989) (Tabla 9). Estos compuestos fueron analizados por MS/MS con perfil de colisión (10, 20 y 30 V) obteniéndose los patrones de fragmentación correspondientes. Cabe señalar que esta forma de identificación también fue realizada con algunos de los compuestos polifenólicos más estudiados para la cáscara de granada, y su patrón de fragmentación concordó con lo reportado en literatura (Tabla A3, Anexo III).

Tabla 9. Compuestos identificados y confirmados en extractos de cáscara de *P. granatum*.

No.	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	% INTENSIDAD			Fórmula molecular	Fragmentos	Nombre	Referencia
			EC_OAX	EC_GTO	EAU_GTO				
1	435	11.07	20.8	24.2	20.0	19.6	301, 273, 167, 125 297, 273, 167 273, 167, 125	Hexóxido de floretina (floridzina)	Este trabajo Mena et al. (2012) BDM, a 20 V.
2	659	10.96	0.1	0.5	0.2	0.4	641, 629, 601, 451, 433, 357, 327, 225, 169, 125	Pseudotsuganol (tentativamente)	Este trabajo Obtenido por simulación http://cfmid.wishartlab.com a 20 V.

m/z: relación masa/carga *t_R*: tiempo de retención, BDM: base de datos Metlin. EC_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción convencional, EC_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción convencional, EAU_OAX: extracto de cáscara de Oaxaca obtenido por extracción asistida por ultrasonido, EAU_GTO: extracto de cáscara de Guanajuato obtenido por extracción asistida por ultrasonido. ESI (-), MS/MS con perfil de colisión (10, 20 y 30 V).

Respecto al compuesto 1 (Tabla 9), el porcentaje de intensidad para los 4 extractos se encontró entre 19.6 y 24.2. En el patrón de fragmentación (Figura 15) obtenido en este trabajo se observaron dos iones fragmento reportados por Mena et al. (2012) para el hexósido de floretina, además coincidieron tres iones fragmento para este mismo compuesto registrado en la base de datos Metlin (BDM) (<https://metlin.scripps.edu/>), cuando se selecciona la energía de colisión de 20 V. En la Figura 16 se describe la posible ruta de fragmentación de este compuesto; donde se observa que el ión molecular (m/z 435) pierde primeramente el hexósido para quedar en su forma aglicona (m/z 273), que a su vez se fragmenta en el enlace 1-2 produciendo un fragmento con una m/z 167, el cual nuevamente se fragmenta perdiendo un grupo metóxilo para generar el ión fragmento de m/z 125, que es característico de la fragmentación de flavonoides (Schmidt, 2016). Se sabe que el hexósido de floretina es una dihidrochalcona, compuesto característico de las Rosaceae, y de familias de plantas como las Limiaceae: *Rosmarinus officinalis*, *Thymus*, y otras (Zielińska, Kolniak-Ostek, Dziadas, Oszmiański, y Matkowski, 2016).

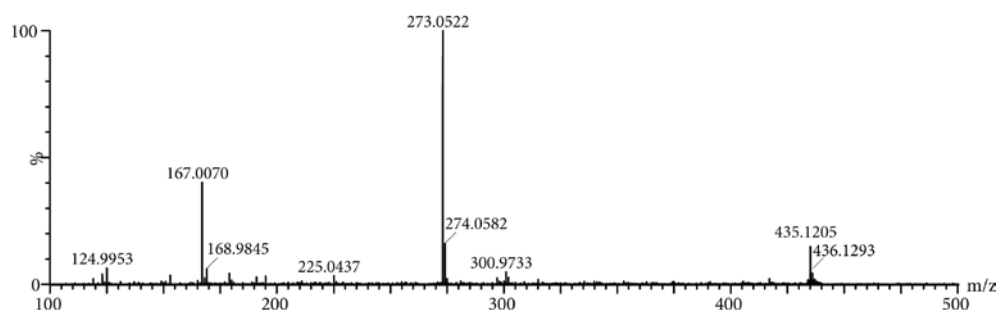


Figura 15. Patrón de fragmentación para la m/z 435, obtenido con el UHPLC-QToF empleando MS/MS-ESI (-) y perfil de colisión con 10, 20 y 30 V.

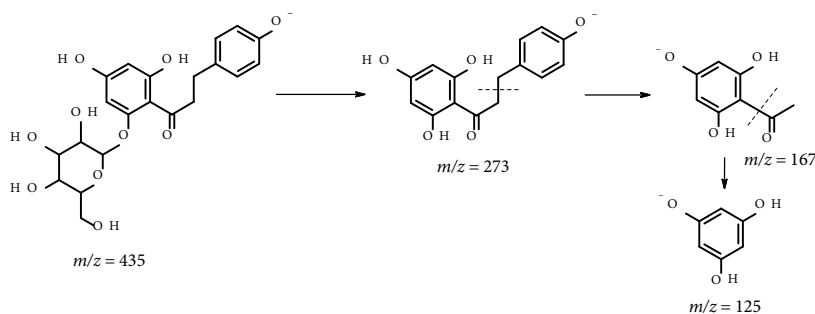


Figura 16. Estructura y posible ruta de fragmentación del hexósido de floretina (m/z 435).

Por otra parte, el porcentaje de intensidad del compuesto 2 (Tabla 9) fue menor al 1% en todos los extractos analizados. Para el análisis de este compuesto, inicialmente se comparó con el derivado de hexósido de ácido vanílico el cual tiene la misma m/z y que ha sido reportado en el jugo de granada (Brighenti et al., 2017). Sin embargo, no se encontró similitud entre los fragmentos obtenidos en el presente trabajo. Con la masa experimental se realizó una nueva búsqueda en bases de datos (Metlin y PubChem). De los compuestos encontrados se realizó la simulación de fragmentación (<http://cfmid.wishartlab.com/>) y se encontró que 6 fragmentos (641, 629, 601, 357, 301 y 125) obtenidos experimentalmente (Figura 17) tuvieron similitud con los del pseudotsuganol. Este compuesto es una molécula formada por un flavonoide (quercetina) enlazado a un lignano (pinoresinol) mediante un enlace difenilo, cuya presencia se ha reportado en la corteza de abeto (Figura 18) (Foo y Karchesy, 1989). El análisis de los fragmentos sugiere que los iones de m/z 641 y 629 resultan de la pérdida de agua y un grupo metoxilo, respectivamente; además, 357 correspondió a pinoresinol, 301 a quercetina y 125 a un fragmento característico de flavonoides.

Por otro lado, la variación de iones fragmento e intensidades de los mismos, entre lo obtenido experimentalmente y los generados con el programa de predicción de espectros. Además, compuestos con el mismo peso molecular pueden ser fragmentados durante el proceso de ionización por lo que las señales observadas presentaron con respecto a la simulación, ya que esta se realizó considerando un compuesto puro. La complejidad química de las moléculas, es decir, mayor número de sustituyentes, presencia o no de dobles enlaces y heterociclos, combinado con las interacciones entre los compuestos presentes en los extractos de material vegetal, provocan los incrementos o decrementos en las intensidades de las señales registradas en un espectro de masas de los experimentos de MS/MS.

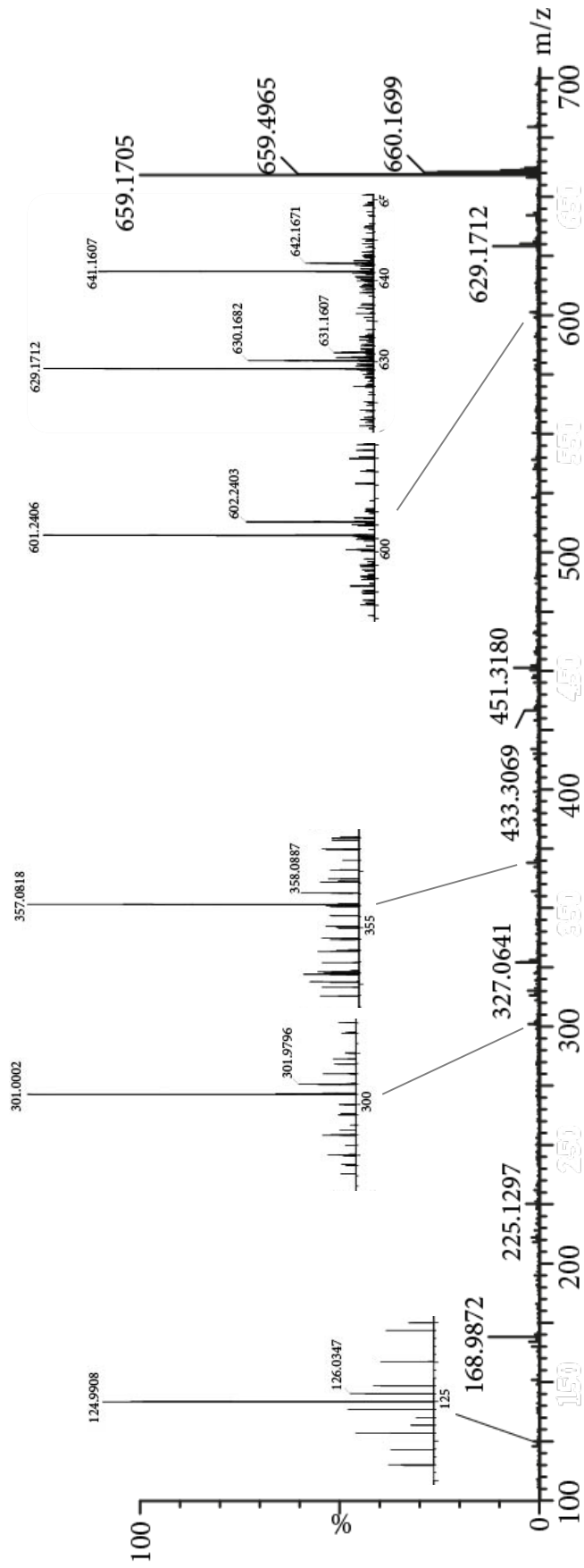


Figura 17. Perfil de fragmentación del compuesto 2.

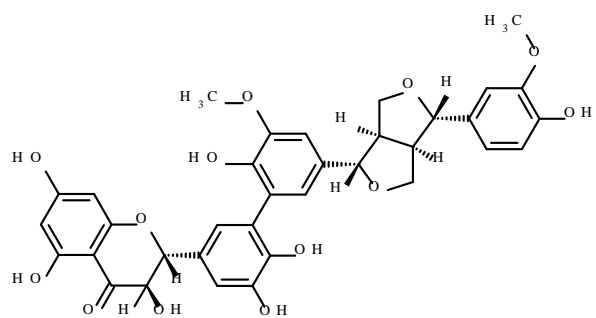


Figura 18. Estructura de la molécula del pseudotsuganol.

9. CONCLUSIONES

1. Se estableció que se requieren 3 extracciones sucesivas para reducir a menos del 10% el contenido de polifenoles totales en el polvo de la cáscara de *Punica granatum*, para ambos métodos de extracción empleados en el presente trabajo. El extracto obtenido a partir de muestra de Guanajuato presentó el mayor rendimiento en el contenido de polifenoles totales (298.9 y 297.3 mg EAG/g cs) después de las 3 etapas por ambos métodos de extracción.
2. En los 4 extractos estudiados se identificaron 47 compuestos distribuidos de la siguiente manera: Para EC_Oax, EC_Gto, EAU_Oax y EAU_Gto se registraron 39, 36, 25 y 21 compuestos respectivamente.
3. Adicionalmente en estas 4 muestras se identificaron 2 compuestos, uno de los cuales solo ha sido reportado para jugo de granada (hexósido de floretina) y otro fue asignado tentativamente como pseudotsuganol, mediante experimentos de MS/MS con perfil de colisión (10, 20, 30 V).

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar la extracción convencional de ambas muestras, empleando el mismo tiempo utilizado en la extracción asistida por ultrasonido para evaluar los rendimientos de extracto y contenido de polifenoles totales, y analizar por UHPLC-QToF la composición de dicho extracto.
2. Evaluar el efecto de la temperatura en el rendimiento de extracto, contenido de polifenoles totales y la composición de los extractos obtenidos empleando extracción asistida por ultrasonido a 30 y 40 °C, a las mismas condiciones de tiempo y potencia, utilizadas en el presente trabajo de tesis.
3. Aislar y elucidar la estructura del compuesto de $m/z = 659$, para de este modo poder confirmar el compuesto del que se trata.
4. Identificar antocianinas, las cuales son compuestos importantes presentes en la cáscara de granada, empleando el método cromatográfico y del espectrómetro de masas establecido en el presente trabajo de tesis, modificando únicamente la ESI a modo (+). A la fecha se tienen resultados preliminares de la identificación de 4 antocianinas empleando el extracto de la muestra de Oaxaca por extracción convencional, que se muestran en la siguiente tabla.

Antocianinas identificadas en el extracto de cáscara de *P. granatum* cultivada en Oaxaca, por extracción convencional.

No.	Compuesto	Fórmula	m/z	t_R	% Intensidad
1.	Cianidina O-pentósido	$C_{20}H_{19}O_{10}$	419	1.22 10.93	6.04 4.68
2.	Pelargonidina 3-O-glucósido	$C_{21}H_{21}O_{10}$	433	1.22	0.87
3.	Delfinidina 3-O-glucósido	$C_{21}H_{21}O_{12}$	465	8.14 10.32	2.53 1.24
4.	Pelargonidina 3,5-O-diglucósido	$C_{27}H_{31}O_{15}$	595	1.88	0.56

m/z = relación masa carga, t_R : tiempo de retención.

11. REFERENCIAS

- Agbor, G. A., Vinson, J. A., y Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu Reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 147–156.
DOI: 10.19070/2326-3350-1400028
- Aguilar, C. N., Aguilera-carbo, A., y Robledo, A. (2008). Production of antioxidant-nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves, 46(2), 216–220.
- Aizpurua-Olaizola, O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., y Usobiaga, A. (2015). Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Journal of Food Science*, 80(1), E101–E107.
DOI: 10.1111/1750-3841.12715
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., y Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417–425.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.035
- Al-maiman, S. A., y Ahmad, D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76, 437–441.
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., y Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295–315.
DOI: 10.1111/1541-4337.12253
- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., y Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216–222.
DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.011
- Asprón-Moncada V., Morales-Jiménez M., Tirado R., Robles-González V., González-Mondragón E. (2014). *Punica granatum* has an antiviral response over respiratory syncytial virus infectivity. 33rd Annual meeting of the American society for virology, Colorado State University, Fort Collins, June 21 to 25.
- Ayala-Zavala, J. F. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., y González-Aguilar, G. A. A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175–R181.
DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., y Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Babbar, N., y Oberoi, H. S. (2014). Potential of agro-residues as source of bioactive compounds. En: Brar, S., Dhillon, G., Soccol, C. (eds) *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*.

Springer, New York, NY.

DOI: 10.1007/978-1-4614-8005-1

Basiri, S., Shekarforoush, S. S., Aminlari, M., y Akbari, S. (2015). The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1025–1033.

DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.043

Boggia, R., Turrini, F., Villa, C., Lacapra, C., Zunin, P., y Parodi, B. (2016). Green extraction from pomegranate marcs for the production of functional foods and cosmetics. *Pharmaceuticals*, 9(4), 63–74.

DOI: 10.3390/ph9040063

Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429–452.

DOI: 10.1111/nure.12114

Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Tripler, E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer, I., y Holland, D. (2009). Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(3), 189–195.

DOI: 10.1016/j.jfca.2008.10.011

Castro, L. C., Ventura, S. J. M., González, H. M. D., Rojas, R., Ascacio, V. J. A., Aguilar, C. N., y Martínez, A. G. C. G. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237, 1139–1148.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.032

Chawla, G., y Ranjan, C. (2016). Principle, instrumentation, and applications of UPLC: a novel technique of liquid chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1–16.

DOI: 10.2174/1874842201603010001

Crisosto, C. H., Mitcham, E. J., y Kader, A. A. (2013). Pomegranate: recommendations for maintaining postharvest quality. University of California, Davis, CA, USA.

<http://postharvest.ucdavis.edu/PFFruits/Pomegranate>.

Çam, M., y Hişil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878–885.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.011

Demarque, D. P., Crotti, A. E. M., Vessicchi, R., Lopes, J. L. C., y Lopes, N. P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Products Reports*, 33(3), 432–455.

DOI: 10.1039/C5NP00073D

Ecosphere Technologies Inc. (2018). Acoustic Cavitation. [imagen] Disponible en: <https://d1io3yog0oux5.cloudfront.net/esph2/files/img/acoustic-cavitation.jpg> [Visitado 12 Mar. 2018].

El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications: a review. *International*

- Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512–2518.
DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
- FAO (2006). World reference base for soil resources 2006, 2nd ed. *World Soil Resources Reports*. IUSS Working Gro. WRB. FAO, Rome, 145 pp. ISBN: 92-5-1055-11-4. <http://www.fao.org/3/a-a0510e.pdf>
- Fischer, U. A., Carle, R., y Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Food Chemistry*, 127(2), 807–821.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156
- Foo, L. Y., y Karchesy, J. (1989). Pseudotsuganol, a biphenyl-linked pinoresinol-dihydroquercetin from Douglas-fir bark: isolation of the first true flavonolignan. *Journal of the Chemical Society*, 28, 217–219.
- Galaz, P., Valdenegro, M., Ramírez, C., Nuñez, H., Almonacid, S., y Simpson, R. (2017). Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *Journal of Food Engineering*, 208, 19–27.
DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.04.002
- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826.
DOI: 10.3390/molecules15128813
- Geankoplis, C. J. (2009). *Procesos de transporte y principios de procesos de separación, incluye operaciones unitarias* (4a. edición). México: Grupo Editorial Patria.
- Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., y Caboni, M. F. (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5328–5337.
DOI: 10.1021/jf400684n
- Goula, A. M., y Lazarides, H. N. (2015). Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: the cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering*, 167, 45–50.
DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.01.003
- Gözlekçi, S., Saraçoğlu, O., Onursal, E., y Ozgen, M. (2011). Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy magazine*, 7(26), 161–164.
DOI: 10.4103/0973-1296.80681
- GmbH (2018). Schematic Extraction. [imagen] Disponible en:
http://www.gunt.de/images/download/extraction_english.pdf [Visitado 12 Mar. 2018].
- He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., y Gao, Y. (2011). Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC-ABTS+ assay. *Food Research International*, 44(5), 1161–1167.
DOI: 10.1016/j.foodres.2010.05.023

- Herbert, C., y Johnstone, R. (2002). *Mass spectrometry basics*. Boca Raton: CRC Press.
- Hooft, J. J. J. van der, Vervoort, J., Bino, R. J., Beekwilder, J., y De Vos, R. C. H. (2011). Polyphenol identification based on systematic and robust high-resolution accurate mass spectrometry fragmentation. *Analytical Chemistry*, 83(1), 409–416.
DOI: 10.1021/ac102546x
- Huck, C. W., y Bonn, G. K. (2001). Evaluation of detection methods for the reversed-phase HPLC determination of 3',4',5'-trimethoxyflavone in different phytopharmaceutical products and in human serum. *Phytochemical analysis*, 12(2), 104–109.
DOI: 10.1002/pca.547
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026
- Ismail B., y Nielsen S.S. (2010) *Basic Principles of Chromatography*. En: Food Analysis. Food Analysis. Springer, Boston, MA
DOI: 10.1007/978-1-4419-1478-1_27
- Kaderides, K., Goula, A. M., y Adamopoulos, K. G. (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 204–215.
DOI: 10.1016/j.ifset.2015.08.006
- Kalamara, E., Goula, A. M., y Adamopoulos, K. G. (2015). An integrated process for utilization of pomegranate wastes—seeds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 144–153.
DOI: 10.1016/j.ifset.2014.12.001
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Bilen, F. D., Gonzales, G. B., Grootaert, C., Van De Wiele, T., y Van Camp, J. (2016). Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2450–2458.
DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02640
- Kantappa, Q., Birajdar, M., y Lee, J. (2016). Structural implications of polyphenolic antioxidants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 35, 1–7.
DOI: 10.1016/j.jiec.2016.01.003
- Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O., y Heinz, V. (2002). Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2), 311–8.
DOI: 10.1079/PNS2002162
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G. G., Wirth, J. J., Masson, G., Cheynier, V., et al. (2015). A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules*, 20(5), 7890–7914.
DOI: 10.3390/molecules20057890
- Li, J., He, X., Li, M., Zhao, W., Liu, L., y Kong, X. (2015). Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food chemistry*, 176,

7–11.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.040

López-Hernández, A. (2017). *Desarrollo de una bebida funcional híbrida adicionada con extracto polifenólico obtenido a partir de cáscara de granada (Punica granatum), y la evaluación de sus propiedades antioxidante y antiviral* (tesis de maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca, México.

Materska, M., y Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750–1756.

DOI: 10.1021/jf035331k

McCabe, W., Smith, J., y Harriott, P. (2004). *Unit Operations of Chemical Engineering* (Septima Ed). McGraw Hill.

Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., et al. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821–14840.

DOI: 10.3390/molecules171214821

Mercado, S. E., Mondragón, J. C., Rocha, P. L., y Álvarez, M. B. (2011). Effects of fruit condition and storage temperature. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(3), 449–459.

Mirabella, N., Castellani, V., y Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41.

DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051

Nuncio-Jáuregui, N., Nowicka, P., Munera-Picazo, S., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., y Wojdyło, A. (2015). Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe spanish pomegranates. *Journal of Functional Foods*, 12, 354–364.

DOI: 10.1016/j.jff.2014.11.007

Orak, H. H., Yagar, H., y Isbilir, S. S. (2012). Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 373–387.

DOI: 10.1007/s10068-012-0049-6

Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., y McHugh, T. H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365–372.

DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.05.015

Pimenta, Barros, Z., Salgado, J., Melo, P., y Biazotto, F. (2014). Enrichment of commercially-prepared juice with pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a source of antioxidants. *Journal of Food Research*, 3(6), 179–187.

DOI: 10.5539/jfr.v3n6p179

- Pinheiro, P., y Justino, G. (2012). Structural analysis of flavonoids and related compounds-a review of spectroscopic applications, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51 -0296-0, InTech.
- Qu, W., Breksa, A. P., Pan, Z., y Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132(3), 1585–1591.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.106
- Rauha, J. P., Vuorela, H., y Kostianen, R. (2001). Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(12), 1269–1280.
DOI: 10.1002/jms.231
- Romeo, F. V., Ballistreri, G., Fabroni, S., Pangallo, S., Li Destri Nicosia, M. G., Schena, L., y Rapisarda, P. (2015). Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. *Molecules*, 20(7), 11941–11958.
DOI: 10.3390/molecules200711941
- Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Remón, A., M'Hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D.S., y Scalbert, A. (2013). Phenol-explorer 3.0: a major update of the phenol-explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, 1–8.
DOI: 10.1093/database/bat070
- Satterfield, M., y Brodbelt, J. S. (2000). Enhanced detection of flavonoids by metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(691), 5898–5906.
DOI: 10.1021/ac0007985
- Schmidt, J. (2016). Negative ion electrospray high-resolution tandem mass spectrometry of polyphenols. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(1), 33–43.
DOI: 10.1002/jms.3712
- Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., y Al-Zoreky, N. S. (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, 3(7), 991–996.
DOI: 10.4236/fns.2012.37131
- Sood, A., y Gupta, M. (2015). Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*, 12, 100–106.
DOI: 10.1016/j.fbio.2015.09.004
- Taamalli, A., Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., y Zarrouk, M. (2014). UPLC-QTOF/MS for a rapid characterisation of phenolic compounds from leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochemical Analysis*, 25(1), 89–96.
DOI: 10.1002/pca.2475
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., y Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16–23.

- DOI: 10.1016/j.seppur.2012.06.038
- Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., y Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523–1527.
- DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.05.007
- Teixeira da Silva, J. A., Rana, T. S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D. T., y Ranade, S. A. (2013). Pomegranate biology and biotechnology: a review. *Scientia Horticulturae*, 160, 85–107.
- DOI: /10.1016/j.scienta.2013.05.017
- Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, E. M., Maróstica, M. R., Leal, P. F., and Meireles, M. A. (2009). Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. En Meireles, M. A. A. (Ed.), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products Theory and Applications* (pp. 137–218). Florida, Estados Unidos: Taylor and Francis Group.
- DOI: 10.1201/9781420062397.ch4
- Treybal, R. E. (1990). *Operaciones de transferencia de masa* (2a. edición). México: McGraw-Hill.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- DOI: 10.3390/nu2121231
- Ventura, J., Alarcón-Aguilar, F., Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega, M. L., Boone-Villa, V. D., Jasso-Villagómez E. I., y Aguilar, C. N. (2013). Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136(1), 109–115.
- DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.039
- Vukics, V., y Guttman, A. (2010). Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(1), 1–12.
- DOI: 10.1002/mas.20212
- Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., y Ma, C. (2013). Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 587–594.
- DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.031
- Watson, D. G., Atsriku, C., y Oliveira, E. J. (2003). Review role of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in biological systems. *Analytica Chimica Acta*, 492(1,2), 17–47.
- DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00467-7
- Westman-Brinkmalm, A., y Brinkmalm, G. (2009). *Mass Spectrometry Instrumentation, Interpretation, and Applications*. (R. Ekman, J. Silberring, A. Westman-Brinkmalm, y A. Kraj, Eds.). Hoboken, New Jersey.: John Wiley and Sons, Inc.
- Zhang, L., Yang, X., Zhang, Y., Wang, L., y Zhang, R. (2011). In vitro antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. *Food and Bioprocess Processing*, 89(3), 234–240.

DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.007

Zhao, X., Yuan, Z., Fang, Y., Yin, Y., y Feng, L. (2013). Characterization and evaluation of major anthocyanins in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel of different cultivars and their development phases. *European Food Research and Technology*, 236(1), 109–1170.

DOI: 10.1007/s00217-012-1869-6

Zielińska, S., Kolniak-Ostek, J., Dziadas, M., Oszmiański, J., y Matkowski, A. (2016). Characterization of polyphenols in *Agastache rugosa* leaves and inflorescences by UPLC–qTOF–MS following FCPC separation. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39(4), 209–219.

DOI: 10.1080/10826076.2016.1147461

Páginas electrónicas visitadas

CFM-ID, 2018. Consultado en: <http://cfmid.wishartlab.com>.

Ecosphere Technologies, Inc, 2018. Consultado en: <https://www.ecospheretechnologies.com/environmental-engineering-technologies/ozonix>.

Gerätebau GmbH, 2018. Consultado en: <http://www.gunt.de/en/products/process-engineering/thermal-process-engineering/extraction/solid-liquid-extraction/083.63000/ce630/glct-1:pa-148:ca-244:pr-68>.

INEGI, 2017. Consultado en <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mapas/edafologia/>

Metlin, 2018. Consultado en: https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage.

SIAP, 2018. Consultado en: http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/

ANEXOS

Anexo I

Tabla A1. Características de clima y suelo del lugar de origen de los frutos utilizados en este trabajo.

	San Juan Bautista Cuicatlán, Oaxaca.	Santiago Maravatío, Guanajuato.	Referencia
Clima	Seco <ul style="list-style-type: none"> • Cálido seco 	Templado <ul style="list-style-type: none"> • Semicálido subhúmedo 	+INEGI, 2017a.
Suelo	Agrícola dependiente del comportamiento de las lluvias	Agrícola bastante fértil	+INEGI, 2017b.
	Tipo Phaeozem	Tipo Vertisol	
Localización	17.801764,-96.9612122	20.1723032,-100.9991591	*Google Maps®.

+ INEGI, 2017a: <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mapas/climatologia/>

+ INEGI, 2017b: <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mapas/edafologia/>

*Datos obtenidos de <http://www.maps.google.com.mx>

Definiciones

Clima. Se refiere al conjunto de fenómenos meteorológicos de una región que está controlado por una serie de elementos como: temperatura, humedad, presión, vientos y precipitaciones, principalmente. Estos valores se obtienen a partir de la recopilación en forma sistemática y homogénea de la información meteorológica, durante períodos que se consideran suficientemente representativos, de 30 años o más (INEGI, 2017).

Tipo de suelo Phaeozem. Incluyen suelos de pastizales relativamente húmedos y regiones forestales de climas moderadamente continentales. Tienen superficies oscuras, ricos en humus y menor contenido de bases en comparación con los suelos de tipo Chernozem y Kastanozem. Pueden o no tener carbonatos y de la superficie hasta un metro de profundidad presentan una alta saturación de bases (FAO, 2006).

Tipo de suelo Vertisol. Son barro, suelos de arcilla pesada con gran proporción de arcillas hinchadas. Estos suelos forman grietas profundas de la superficie hacia abajo cuando se secan. El nombre vertisol proviene del latín *vertere* que se significa cambio, hace referencia a la renovación interna constante del material del suelo (FAO, 2006).

Anexo II

Tabla A2. Compuestos identificados en cáscara de granada de frutos cultivados en Oaxaca y Guanajuato obtenidos por extracción convencional y asistida por ultrasonido.

No.	Compuesto	Fórmula	m/z	t _R	EC		EAU	
					Oaxaca	Guanajuato	Oaxaca	Guanajuato
<i>Ácidos fenólicos</i>								
1.	Ácido protocatecúico	C ₇ H ₆ O ₄	153	1.226		x	x	x
2.	Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	167	4.991	x		x	x
3.	Pentósido de ácido protocatecúico	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	285	1.226	x	x	x	x
				4.440	x	x	x	x
4.	Hexósido de ácido protocatecúico	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315	1.209	x	x	x	x
5.	Hexósido de ácido cumárico	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325	6.11	x	x	x	x
				6.89	x	x	x	x
6.	Hexósido de ácido vanílico	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329	13.253	x	x		
7.	Galoil hexósido	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331	7.400	x	x	x	
8.	Glucósido de ácido caféico	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341	1.551	x	x	x	x
				12.472		x		x
9.	Ácido 5-O-cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353	2.433	x			
10.	Hexósido de ácido ferúlico	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355	1.973	x			
11.	Dihexósido de ácido vanílico	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₄	491	13.320	x	x	x	x
12.	Dímero de glicósido de ácido caféico	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₈	683	9.596		x		
13.	Dímero de diglucósido de ácido caféico	C ₃₆ H ₄₆ O ₂₃	845	1.243		x		
<i>Flavonoides</i>								
14.	Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255	12.557		x		
15.	Trihidroxiflavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269	5.599		x		
16.	Tipo naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271	5.325	x		x	
17.	Floretina	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	273	1.243	x	x	x	x
18.	Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285	4.220	x	x		
				4.595	x	x		
19.	Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289	1.243		x		
20.	Hexósido de floretina	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435	11.070	x	x	x	x

No.	Compuesto	Fórmula	m/z	t _R	EC		EAU		
					Oaxaca	Guanajuato	Oaxaca	Guanajuato	
21.	Eriodictiol-7-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449	1.243		x			
22.	Taxifolin 7-glucósido	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	465	11.519	x	x	x	x	
23.	Hexósido de siringetina	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507	9.732	x	x	x	x	
24.	Rutinósido de quercetina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609	8.77	x	x	x	x	
<i>Taninos</i>									
25.	Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	301	8.934	x	x	x	x	
26.	Pentósido de ácido elágico	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433	3.048	x				
27.	Deoxihexósido de ácido elágico	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447	5.836	x				
28.	Dímero de procianidina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561	6.025	x	x			
29.	Dímero de procianidina tipo B	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577	4.987	x	x			
30.	Galoil hexósido de ácido elágico	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₇	615	2.450	x	x			
31.	Dihexósido de ácido elágico	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₈	625	8.218	x				
				4.950	x				
				5.173	x	x			
				13.884	x	x			
32.	Lagerstanina C	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	649	0.902		x			
33.	Punicalina	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	781	3.3	x	x	x	x	
34.	Pedunculagina I	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783	5.1	x	x	x	x	
35.	Pedunculagina II	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	785	6.5	x	x	x	x	
36.	Trímero de procianidina tipo C	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865	5.376	x	x			
37.	Granatina B	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951	7.9	x	x	x	x	
38.	Derivado de lagerstanina B	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₈	967	4.561	x				
39.	Punicalagina	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	1083	4.7	x	x	x	x	
40.	Tetra galoil glucopiranososa	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787	4.950	x				
<i>Lignanos</i>									
41.	Conidendrina	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	355	1.142	x	x			
				12.948	x		x		
42.	Pinoresinol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	357	1.889	x	x			
				1.226	x			x	
				9.120	x		x		
43.	Secoisolariciresinol	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361	10.975	x		x	x	

No.	Compuesto	Fórmula	m/z	t _R	EC		EAU	
					Oaxaca	Guanajuato	Oaxaca	Guanajuato
44.	Filigenina	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	371	1.226	x			
45.	Isómero de hdroximatairesinol	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373	10.414		x		
46.	Siringaresinol	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	417	6.924	x			
				4.494		x		
				6.295	x	x	x	
				7.147	x		x	
47.	Hexósido de isolariciresinol	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	521	10.57	x	x	x	x
				9.478	x	x	x	x
				11.127	x	x	x	x
48.	Hexósido de cicloisolariciresinol	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	523	9.478	x	x	x	x
49.	<i>Pseudotsuganol</i>	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₈	659	10.96	x	x	x	x

m/z = relación masa carga, *t_R*: tiempo de retención en minutos.

Anexo III

Tabla A3. Elagitaninos identificados con MS/MS (energía de colisión: 40 V) en ambos extractos.

Compuesto	Fórmula	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	iones fragmento	Referencia
Punicalagina	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	4.7	1083	781, 601, 301	Este trabajo
		5.4		781, 601, 301, 152	
				781, 601, 575, 302	Fischer et al., 2011
				781, 601, 603	
Granatina B	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	7.9	951	933, 765, 613, 463, 301	Este trabajo
				933, 613, 301	Calani et al., 2013
Pedunculagina I	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	5.1	783	783, 451, 301, 275, 249	Este trabajo
Pedunculagina II	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	6.5	785	785, 615, 463, 315, 301, 249	Este trabajo
				463, 301	Fischer et al., 2011
Punicalina	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	3.3	781	781, 721, 601, 575, 448, 301, 273	Este trabajo
				721, 601, 575	Calani et al., 2013
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	8.9	301	301, 300, 284, 216, 200, 172, 145, 117	Este trabajo
				284, 257, 229, 185	Calani et al., 2013

NOTA: Se identificaron las señales características de los anómeros α y β de punicalagina (t_R 4.56 y 5.31), además de la del ácido elágico (t_R 8.97), dos compuestos característicos del fruto y cáscara de *P. granatum*.

Anexo IV

Resultados del ANOVA de dos vías, sobre contenido de extracto de cada una de las extracciones.

ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
EXTRACCION	1	88.445	88.445	1.267	0.3233
MUESTRA	1	979.03125	979.03125	14.02485	0.02003
Interaction	1	78.125	78.125	1.11916	0.34976
Model	3	1145.60125	381.86708	5.47034	0.06712
Error	4	279.2275	69.80687	--	--
Corrected Total	7	1424.82875	--	--	--

At the 0.05 level, the population means of **EXTRACCION** are **not significantly** different.

At the 0.05 level, the population means of **MUESTRA** are **significantly** different.

At the 0.05 level, the interaction between **EXTRACCION** and **MUESTRA** is **not significant**.

Means Comparisons

Tukey Test

EXTRACCION

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
EAU EC	6.65	5.90791	1.59185	0.3233	0.05	0	-9.75282	23.05282

MUESTRA

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
GTO OAX	-22.125	5.90791	5.2962	0.02003	0.05	1	-38.52782	-5.72218

Interactions

EXTRACCION	MUESTRA	EXTRACCION	MUESTRA	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
EC	GTO	EC	OAX	-28.375	8.35505	4.80288	0.08743	0.05	0	-62.3874	5.6374
EAU	OAX	EC	OAX	0.4	8.35505	0.06771	0.99995	0.05	0	-33.6124	34.4124
EAU	OAX	EC	GTO	28.775	8.35505	4.87059	0.08388	0.05	0	-5.2374	62.7874
EAU	GTO	EC	OAX	-15.475	8.35505	2.61937	0.37084	0.05	0	-49.4874	18.5374
EAU	GTO	EC	GTO	12.9	8.35505	2.18351	0.49344	0.05	0	-21.1124	46.9124
EAU	GTO	EAU	OAX	-15.875	8.35505	2.68707	0.3543	0.05	0	-49.8874	18.1374

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.05 level.

Resultados del ANOVA de dos vías, sobre contenido de polifenoles totales de cada una de las extracciones.

ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
EXTRACCION	1	35.27157	35.27157	4.12857	0.07663
ORIGEN	1	30146.69678	30146.69678	3528.7	7.16505E-12
Interaction	1	76.27935	76.27935	8.92857	0.01739
Model	3	30258.2477	10086.08257	1180.58571	6.3427E-11
Error	8	68.3463	8.54329	--	--
Corrected Total	11	30326.594	--	--	--

At the 0.05 level, the population means of **EXTRACCION** are **not significantly** different.

At the 0.05 level, the population means of **ORIGEN** are **significantly** different.

At the 0.05 level, the interaction between **EXTRACCION** and **ORIGEN** is **significant**.

Means Comparisons

Tukey Test

EXTRACCION

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
ULTRASONIDO CONVENCIONAL	3.42888	1.68753	2.87352	0.07663	0.05	0	-0.46258	7.32033

ORIGEN

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
GUANAJUATO OAXACA	100.2442	1.68753	84.00833	9.66794E-8	0.05	1	96.35274	104.13565

Interactions

EXTRACCION	ORIGEN	EXTRACCION	ORIGEN	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
CONVENCIONAL	GUANAJUATO	CONVENCIONAL	OAXACA	105.28666	2.38653	62.39093	0	0.05	1	97.64415	112.92917
ULTRASONIDO	OAXACA	CONVENCIONAL	OAXACA	8.47134	2.38653	5.01996	0.03078	0.05	1	0.82883	16.11385
ULTRASONIDO	OAXACA	CONVENCIONAL	GUANAJUATO	-96.81532	2.38653	57.37097	0	0.05	1	-104.45783	-89.17281
ULTRASONIDO	GUANAJUATO	CONVENCIONAL	OAXACA	103.67307	2.38653	61.43475	0	0.05	1	96.03056	111.31558
ULTRASONIDO	GUANAJUATO	CONVENCIONAL	GUANAJUATO	-1.61359	2.38653	0.95618	0.90326	0.05	0	-9.2561	6.02892
ULTRASONIDO	GUANAJUATO	ULTRASONIDO	OAXACA	95.20173	2.38653	56.41479	0	0.05	1	87.55922	102.84424

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.05 level.