

"Evaluación del contenido de flavonoides, carotenoides, antocianinas y polifenoles totales en granada (*Punica granatum L.*) en relación a su potencial antioxidante"

Silvia Klinar Barbuza¹, Jorge Chanllio Lavarello² y Artemio Chang Canales³.

1 Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNICA

2 Facultad de Medicina Humana - UNICA

3 Laboratorio de Investigación y Desarrollo – Yamano del Perú.

RESUMEN

La tradición y la evidencia científica muestran, entre otras propiedades, actividad antioxidante en los frutos de "granada" (*Punica granatum L.*). El contenido de flavonoides, carotenoides, antocianinas y en general de polifenoles en diferentes especies vegetales, está directamente relacionado con su actividad antioxidante.

Hemos evaluado la pulpa de granada, habiendo determinado los siguientes contenidos:

La pulpa del fruto contiene: polifenoles totales = 78.50 mg/100g de pulpa, antocianinas totales = 117.40 mg / Kg de pulpa y carotenoides totales = 95 ug/100 g de pulpa.

1. silviaklinarb@hotmail.com

ABSTRACT

Tradition and scientific evidence shows, among other properties, antioxidant activity in the fruits of "pomegranate" (*Punica granatum L.*). The content of flavonoids, carotenoids, anthocyanins and polyphenols in general, in different plant species, is directly related to its antioxidant activity.

We evaluated the pomegranate, having determined the following contents:

The pulp of the fruit containing: polyphenols = 78.50 mg/100 g pulp, anthocyanins = 117.40 mg / Kg of pulp and total carotenoids = 95 ug/100 g of pulp.

Introducción

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contribuye significativamente a la salud humana. La relación que existe entre la concentración de especies reactivas del oxígeno (EROs) y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado. Vocablos nuevos, tales como estrés oxidativo, actividad antioxidante, actividad prooxidante y producto antioxidante, son cada vez más comunes y la gran cantidad de artículos que aparecen tanto en revistas científicas como de divulgación popular, indican el interés cada vez más creciente sobre este tema. Esta avalancha informativa ha conducido a la aparición de miles de productos, de origen natural o sintético, que se expenden por lo general como “productos de salud” con el calificativo de “antioxidantes”, con lo cual se quiere significar la capacidad de disminuir la concentración de radicales libres y otros agentes oxidantes, en el organismo humano y por tanto, mejorar el estado de salud de quien lo consume.^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11, 12,13,14,15,16}

El contenido de carotenoides, antocianinas y en general de polifenoles en diferentes especies vegetales, está directamente relacionado con su actividad antioxidante.^{2,3,4,5,6} A los frutos de, “granada” (*Punica granatum* L.) se les atribuye, entre otras propiedades, actividad antioxidante^{17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28}. La determinación del contenido de carotenoides, antocianinas y polifenoles totales, nos permite desarrollar evidencias científicas que sustenten las propiedades atribuidas.

En la evaluación de la pulpa de encontramos 78.50 mg de polifenoles totales en 100 g de pulpa, expresados como ácido gálico. En cuanto a los carotenoides totales, 95 ug en 100 g de pulpa y 117.40 mg de antocianinas totales en 1 Kg de pulpa.

Generalidades

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contribuye significativamente a la salud humana. La relación que existe entre la concentración de especies reactivas del oxígeno (EROs) y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado en la actualidad por la comunidad científica y médica.

Un ejemplo para ilustrar lo anterior: **la paradoja francesa**²⁹, que revela la aparente compatibilidad de una dieta elevada en grasas con una reducida incidencia de la aterosclerosis coronaria, lo cual se atribuye al consumo regular de vino tinto y/o jugo de uvas, productos con un elevado contenido de flavonoides y otros polifenoles³⁰. A estos flavonoides y otras sustancias fenólicas que contiene el vino tinto se le atribuyen propiedades antioxidantes² que reducen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y con ello la disminución del riesgo de enfermedades aterogénicas.^{3,31}

Otros ejemplos son: el proceso de envejecimiento del organismo humano³² y las correlaciones halladas entre los procesos de iniciación, promoción y progresión del cáncer^{4,33,34,35} con el incremento de especies reactivas del oxígeno (EROs), lo que ha inducido el consumo de productos antioxidantes como agentes quimiopreventivos.

No obstante todas las evidencias de la literatura científica sobre la relación entre estrés oxidativo y la progresión de enfermedades, sobre todo crónicas, la administración de productos antioxidantes a los pacientes se considera, de forma muy frecuente, como suplementaria o de segunda importancia en la metodología terapéutica. Uno de los factores que puede contribuir a ello es el ambiente regulatorio actual, donde los antioxidantes no se consideran medicamentos, sino *suplementos nutricionales o productos naturales para la salud*, ya que el estrés oxidativo no se considera una categoría terapéutica.

Un número cada vez más creciente de ensayos clínicos demuestran la importancia de la terapia antioxidante en diversas enfermedades; es decir, la **realidad** se va imponiendo sobre el **mito** de la terapia antioxidante. Sin embargo, otra realidad es la falta de ensayos clínicos con productos naturales antioxidantes que surgen de la medicina tradicional o práctica etnomédica, donde los recursos financieros para una adecuada investigación preclínica y clínica son escasos o inexistentes; mientras que el flujo de los recursos financieros, que genera su comercialización, se destina a la

publicidad y promoción; la mayor parte de las veces con absoluta falta de ética. No menos importante, es la actitud generalizada de sólo considerar como válidos aquellos metabolitos aislados de fuentes naturales, con una identidad y pureza similares a los productos de síntesis química.⁵

Desde hace varios años se ha incrementado el consumo de vegetales, atribuyéndoles la disminución de la incidencia de enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis. La creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y de la medicina verde como alternativa, está acompañada de muchas ideas erróneas, una de las más frecuentes es atribuirles a las vitaminas todos los beneficios de los vegetales y el desconocimiento de otros agentes presentes en ellos, que contribuyen con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades, un ejemplo de estos son los polifenoles.^{2,5,6,7,8,9}

Los compuestos fenólicos o polifenoles, los diferentes tipos de flavonoides (entre ellos las antocianinas) y los carotenoides (carotenos y xantofilas) provienen del metabolismo secundario de las plantas. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, y se clasifican en flavonoideos, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado y que dependiendo del grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo son, flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianinas, proantocianidinas, flavanonas, etc. y se encuentran generalmente en forma de glicósidos, y los no flavonoideos, compuestos benzoicos y cinámicos, llamados comúnmente ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales, y que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos. Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estilbenos, taninos, ligninas y lignanos.

A los frutos de “granada” (*Punica granatum L.*), se les atribuye, entre otras propiedades, actividad antioxidante^{17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28}



Experimental

MUESTRAS

- Pulpa de fruto de *Punica granatum* L. "granada"



DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

1. Técnica para determinar Polifenoles Totales

Se utilizó el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu³⁶, para la determinación de fenoles totales. El reactivo es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en % de polifenoles totales expresados como ácido gálico y en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos.

Preparación de la muestra.-

Tomar 1 gramo de la muestra, licuar y diluir con un volumen entre 200 a 400 mL. Filtrar. Enrasar a volumen exacto.

Preparación de la muestra para la Lectura

Tomar 0.5 mL de la solución muestra, agregar 0.2 mL de Reactivo de Folin Ciocalteu y 1 mL de solución de carbonato de sodio 7.5%. Dejar reaccionar durante 20 minutos.

Lectura

Leer la absorbancia a 765 nm.



Cálculos

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L.

Se elige la absorbancia de la curva de ácido gálico, más próxima a la absorbancia obtenida de la muestra y se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Polifenoles expresados como ácido gálico} = \frac{\text{Cest.} \times \text{Am} \times \text{Vdm} \times 0.1}{\text{Aest.} \times \text{Pdm}}$$

Donde:

- Cest .- concentración de ácido gálico en mg/L, en la A elegida
- Am .- lectura de la absorbancia de la muestra (promedio de 3 ensayos)
- Vdm .- volumen de dilución de la muestra, en mL.
- Aest.- Absorbancia elegida del ácido gálico.
- Pdm.- mg de muestra, utilizados en la dilución.

2. Técnica para determinar Carotenoides Totales

Preparación de la muestra.-

Tomar 1 gramo de la muestra, extraer por agitación con 2 porciones de 20 mL de acetona, por 20 minutos cada vez, filtrar y diluir hasta 50 mL.

Leer a 540 nm.

Repetir 2 veces más.

La Absorbancia será el promedio de las 3 lecturas.



Cálculos

Aplicar la fórmula:

$$\text{mg/L antocianinas totales} = \frac{A \times V}{250}$$

A = Absorbancia (Promedio de 3 lecturas)

V = Volumen en mL.

3. Técnica para determinar Antocianinas Totales

Preparación de la Muestra

Tomar 1 mL ó 1 g de la muestra y agregar 9 mL de agua destilada (Factor de dilución = 10)

Leer a 510 nm.

Repetir 2 veces más.

La Absorbancia será el promedio de las 3 lecturas.

Se utiliza la cianidina 3-glicósido como patrón de referencia.

Cálculos

Aplicar la fórmula:

$$\text{mg/L antocianinas totales} = \frac{A \times P.M. \times F \text{ dil.} \times 1000}{E_{\text{max.}}}$$

Donde:

A = Absorbancia (Promedio de 3 lecturas)

P.M. = Peso molecular del patrón de referencia: Cianidina 3-glicósido (449.2)

F dil. = Factor de dilución

E_{max} = Constante de extinción molar del patrón de referencia: Cianidina 3-glicósido (26,900)



Resultados

Resultados de la Curva de calibración del ácido gálico

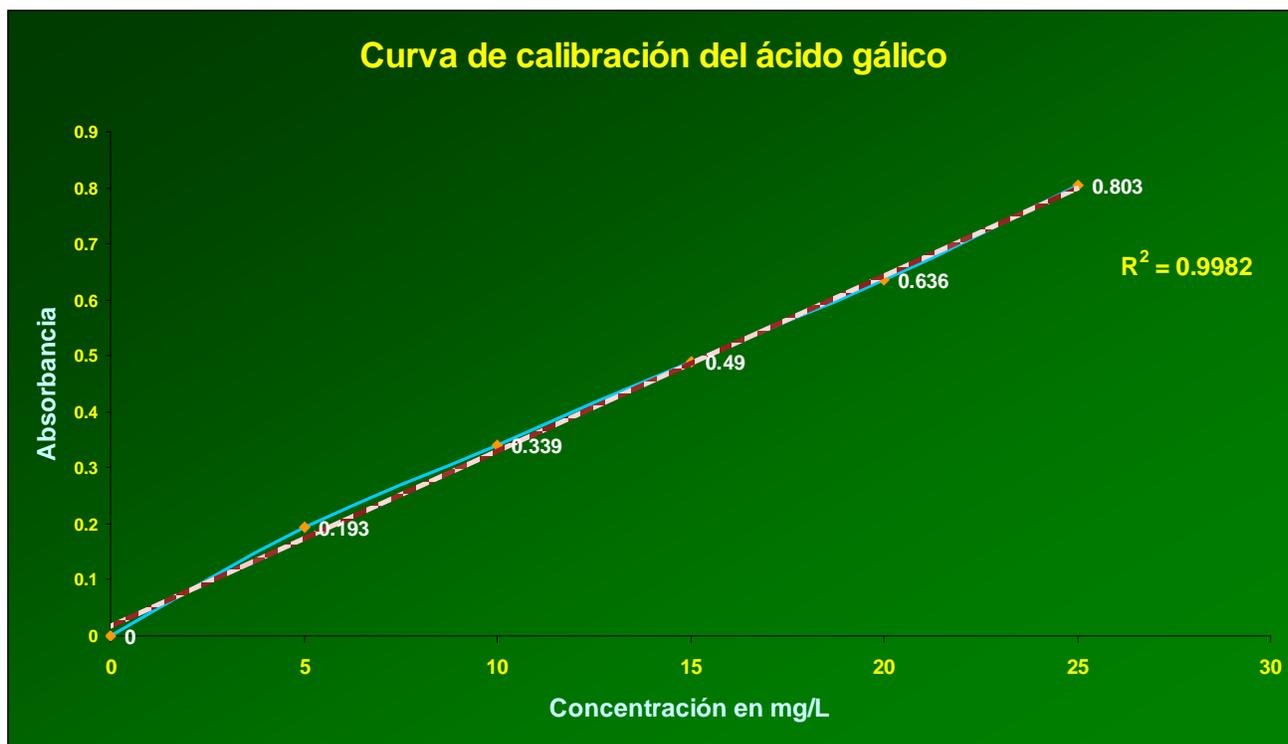
Para elaborar la curva de calibración, se utilizó el ácido gálico a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, la lectura a 765 nm, dio los resultados mostrados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados en la elaboración de la curva de calibración del ácido gálico

Resultados en la elaboración de la curva de calibración del ácido gálico					
Ácido gálico (mg/L)	5	10	15	20	25
Absorbancia a 765 nm	0.193	0.339	0.49	0.636	0.803

En el gráfico 1, se observa la linealidad de la curva de calibración del ácido gálico, presentando $R^2 = 0.9982$

Gráfico 1. Curva de calibración del ácido gálico



Resultados de la determinación cuantitativa de Polifenoles totales, expresados como ácido gálico

Los resultados de la determinación cuantitativa del contenido de polifenoles en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum* L.), expresados como ácido gálico, en mg/100 g, se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Resultados de la determinación cuantitativa de polifenoles totales, expresados ácido gálico.

Especie vegetal	Parte utilizada	Contenido de polifenoles totales (como ácido gálico)
		mg/100 g
<i>Punica granatum</i> L. "granada"	Pulpa del fruto	78.50

Los resultados de la determinación cuantitativa del contenido de carotenoides en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum* L.), se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3.- Resultados de la determinación cuantitativa de Carotenoides totales

Especie vegetal	Parte utilizada	Contenido de carotenoides totales
		ug/100 g
<i>Punica granatum</i> L. "granada"	Pulpa del fruto	95

Los resultados de la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum* L.), se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4.- Resultados de la determinación cuantitativa de Antocianinas totales

Especie vegetal	Parte utilizada	Contenido de antocianinas totales
		mg/Kg
Punica granatum L. "granada"	Pulpa del fruto	117.40

Interpretación de resultados y Conclusiones

- El contenido de polifenoles (expresados como ácido gálico) en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum L.*) = 78,50 mg/100 g de pulpa
- El contenido de carotenoides totales en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum L.*) = 95 ug/100 g de pulpa
- El contenido de antocianinas totales en la pulpa del fruto de **granada** (*Punica granatum L.*) = 117.40 mg/L.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con las referencias bibliográficas, los testimonios y la información popular y tradicional que atribuyen a la **granada** (*Punica granatum L.*) una actividad antioxidante.

7. Referencias Bibliográficas

1. G. Martínez Sánchez et al. 2003. "Mitos y realidades de la terapia antioxidante". Centro de Química Farmacéutica. Ciudad de la Habana, 2003. Segunda edición.
2. S.V. Jovanovic et al. 1994. "Flavonoids as antioxidants". *J. Am. Chem. Soc.* 116:4846.
3. E.N. Frankel, J. Kanner, J.B. German, E. Parks, J.E. Kinsella, "Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in red wine", *Lancet* 341: 454.1993.
4. G.L. Michael et al. 1995. "Flavonoid intake and long-term risk of coronary hearth disease and cancer in the seven countries study" *Arch. Intern. Med.*155:381.
5. M. Hernández y E. Prieto. 1999. "Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida". *Rev Cubana Invest. Biomed.*; 18(1):12-4
6. E. M. Kuskoski et al. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(4): 691-693.
7. Orlando Muñoz et al. 2007. "Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante" *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 848-851
8. Ritva Repo de Carrasco y Christian Rene Encina Zelada. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) *Rev Soc Quím Perú.*, 74, N° 2 (85-99)
9. Wei Zheng, and Shiow Y. Wang. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11), 5165-5170
10. Leslie Wada and Boxin Ou. 2002. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Oregon Caneberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3495-3500
11. Marja P. Kahkonen et al. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962
12. Hung-Chi Chang et al. 2007. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as "Gusuibu". *Botanical Studies* 48: 397-406
13. W. Kalt, J.E. McDonald, and H. Donne. 2000. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. *Journal Of Food Science* - Vol. 65, No. 3

14. Mark K. Ehlenfeldt, and Ronald L. Prior. 2001. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concentrations in Fruit and Leaf Tissues of Highbush Blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 49 (5), 2222-2227
15. George J. Soleas et al. 1997. Relative Contributions of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines: Development of a Predictive Model. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3995-4003
16. S. Klinar, J. Chanllio y A. Chang. 2011. Contenido de polifenoles totales en frutos de camu camu (*Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh), guanábana (*Anona muricata* L.) y mango (*Mangifera indica* L.). Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNICA
17. Ephraim P. Lansky and Robert A. Newman. 2006, *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. En prensa
18. Schubert, S.Y., Lansky, E.P., Neeman, I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 11–17.
19. Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4581–4589
20. Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 81–86.
21. Plumb, G.W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. Rivas-Gonzalo, J.C., Williamson, G., 2002. Antioxidant properties of gallic catechin and prodelphinidins from pomegranate peel. *Redox Report* 7, 41–46.
22. Noda, Y., Kaneyuka, T., Mori, A., Packer, L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 166–171.
23. Schubert, S.Y., Neeman, I., Resnick, N. 2002. A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* 16, 1931–1933.

24. De Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Lerman, L.O., Crimi, E., Botti, C., Mansueto, G., D'Armiento, F.P., De Rosa, G., Sica, V., Ignarro, L.J., Napoli, C. 2005. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 4896–4901.
25. De Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Botti, C., Sica, V., Ignarro, L.J., Napoli, C. 2006. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide* [Epub ahead of print].
26. Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 1062–1076.
27. C. García-Viguera, A. Pérez Vicente. 2004. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *ALIM. NUTRI. SALUD* Vol. 11, N.º 4, pp. 113-120, 2004
28. Fernanda Archilla Jardim*, Jorge Mancini Filho. 2007. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007
29. S. Reanaud, M De Lorgeril. 1992. "Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease". *Lancet* 339:1523.
30. H.S. Demrow, P.R. Slane, J.D. Folts. 1994. "Administration of wine and grape juice inhibits *in vivo* platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries", *Circulation* 91:1182
31. B. Fuhrman, A. Lavi, M. Aviram. 1995. "Consumption of red wine and meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to lipid peroxidation" *Am. J. Clin. Nutr.* 61:549
32. R.G. Cutler, (1991) "Antioxidants and aging" *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 373S
33. H.C. Pitot, Y.P. Dragan. 1996. "Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis" *FASEB J.* 5:2280.
34. J.P. Kehrer. 1993. "Free radicals as mediators of tissue injury and disease", *Crit. Rev. Toxicol.* 23:21.

35. B. Halliwell. 1996. "Oxidative stresses, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans". *Free Rad. Res.* 25:57.
36. Cita: Folin, C.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-650, 1927. En: E. Marta Kuskoski et al. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 726-732.