



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

TESIS

**EVALUACIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE
GRANADA COMO ANTIOXIDANTE EN RATONES
CD-1 SOMETIDOS A EJERCICIO**

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

PRESENTA

Hiram Alberto Solis Hernández

Director (a)

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Codirector (a)

Dr. Carlos Olvera Sandoval

Comité tutorial

Dra. Miroslava Porta Lezama

Dr. José Alberto Ariza Ortega

Mtra. Martha Teresa Acosta Mejía

Pachuca de Soto, Hidalgo., febrero, 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Medical Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

19/05/2025

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada "**Evaluación del aceite de semilla de granada como antioxidante en ratones macho CD-1 sometidos a ejercicio**", realizado por el sustentante **Hiram Alberto Solís Hernández**, con número de cuenta 233748 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Pachuca, Hidalgo a 19 de mayo de 2025

El Comité Tutorial

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera
Director

Dr. Carlos Olvera Sandoval
Co director

Dra. Miroslava Porta Lezama
Miembro del comité



Dr. José Alberto Ariza Ortega
Miembro del comité

Mtra. Martha Teresa Acosta Mejía
Miembro del comité

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n
Carretera Pachuca Actopan, San Agustín
Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 41557 y
41556
medicina@uaeh.edu.mx



uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, a DIOS quién me dio la oportunidad de traer a mi vida este momento y que día a día me da la vida y la fuerza para seguir adelante.

A mis padres por su amor incondicional quienes a pesar de todos mis fallos siempre han estado apoyándome y preocupándose por cada paso que doy, pues me enseñaron a siempre luchar sin darme por vencido entendiendo que ellos estarán detrás de mi para ayudar si en algún momento caigo y darme la mano para levantarme y seguir, en verdad GRACIAS Y LOS AMO CON TODO MI SER.

A mi amada esposa quien me hizo ser el hombre más feliz del mundo desde el primer día que la conocí y siempre creyó en mi cuando yo quería tirar todo, eres mi complemento, mi grano de sal, tu me convenciste de terminar este largo camino que comenzamos siendo dos y ahora gracias a DIOS y a ti ya somos cuatro, TE AMO COTY.

A mi director de tesis el Doctor Gabriel Betanzos Cabrera que sobre todo su paciencia, enseñanza me llevaron a terminar este proyecto estaré agradecido con usted y le puedo decir que el agradecimiento es la memoria del corazón y mi agradecimiento es para siempre.

A mis hijos Angel Alberto e Hibana Sofia, que son mi motor para día a día levantarme y decir “ánimo que esto es por ellos”, se que ustedes llegarán mas lejos que yo pero debo de comenzar a enseñarles que deben luchar contra todo y contra todos para ser quienes ustedes decidan ser, LOS AMO MIS BEBÉS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención con número de beca 448596.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
I. Introducción	3
II. Antecedentes.....	5
2.1 Antecedentes del problema	5
2.1.1 <i>Daño oxidativo provocado por ejercicio exhaustivo</i>	5
2.1.2 <i>Función antioxidante de la granada y estrés oxidativo</i>	6
2.2 Marco Teórico	7
2.2.1 <i>Ejercicio físico</i>	7
2.2.2 <i>Tipos de ejercicio físico</i>	7
2.2.3 <i>Daño Oxidativo en el ejercicio</i>	9
2.2.4 <i>Lesiones por ejercicio</i>	10
2.3 Estrés oxidativo	12
2.3.1 <i>Definición de estrés oxidativo</i>	12
2.3.2 <i>Radicales libres y ejercicio físico</i>	13
2.3.3 <i>Adaptación del organismo al ejercicio</i>	15
2.3.4 <i>Generación del estrés oxidativo durante el ejercicio</i>	16
2.4 Antioxidantes	17
2.4.1 <i>Generalidades de los antioxidantes</i>	17
2.4.2 <i>Tipos de antioxidantes</i>	17
2.4.3 <i>Relación del consumo de antioxidantes con el ejercicio físico</i>	18
2.5 La granada	19
2.5.1 <i>Características del fruto</i>	19
2.5.3 <i>Actividad antioxidante</i>	22
2.6 Aceite de semilla de granada	23
2.6.1 <i>Generalidades del aceite</i>	23
2.6.2 <i>Composición nutrimental</i>	23
2.6.3 <i>Beneficios para la salud</i>	23
III. Justificación.....	25
IV. Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26

V. Hipótesis.....	26
VI. Material y métodos.....	27
6.1 Diseño	27
6.2 Extracción del aceite de semilla de granada	27
6.3 Determinación de fenoles totales en ASG	28
6.4 Evaluación de la actividad antirradical por método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)	29
6.5 Evaluación de la actividad antirradical por método 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt) ABTS⁺	30
6.6 Inducción de estrés oxidativo en ratones macho CD-1	31
6.8 Determinación de lipoperoxidación por método del Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	31
6.9 Determinación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)	33
6.10 Análisis estadístico	34
VII. Resultados.....	35
7.1 Evaluación del contenido total de fenoles y actividad antirradical del aceite de semilla de granada	35
7.1.1 <i>Determinación del contenido total de polifenoles de diferentes variedades de ASG</i>	35
7.1.2 <i>Actividad antirradical mediante prueba ABTS⁺ en ASG</i>	35
7.1.3 <i>Actividad antirradical mediante método DPPH[·] en ASG</i>	36
7.2 Efecto de la capacidad antioxidante del ASG en órganos mediante pruebas ABTS ⁺ , DPPH [·] , SOD y Ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	37
7.2.1 <i>Determinación de la actividad antirradical del ASG en órganos por método ABTS⁺</i>	37
7.2.2 <i>Determinación de la actividad antirradical del ASG en órganos por método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[·])</i>	40
7.2.3 <i>Capacidad antioxidante del ASG en órganos mediante análisis de la actividad de la enzima SOD</i>	42
7.2.4 <i>Determinación de daño oxidativo en membranas del ASG por el método de TBARS</i>	44
VIII. Discusión.....	46
8.1 Aceite de semilla de granada	46
8.1.1 <i>Los diferentes tipos de ASG presentan diferentes cantidades de contenidos totales de fenoles</i>	47
8.1.2 <i>El ASG rojiverde y el conjunto presentaron mejor actividad antioxidante mediante la prueba ABTS⁺</i>	47
8.1.3 <i>El ASG dulce y roja mostraron el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH[·]</i> ..	48
8.2 Determinación de la actividad antioxidante del ASG en órganos mediante diferentes métodos	49

8.2.1 El ASG favoreció la disminución de la actividad radical $ABTS^{\cdot+}$ en diferentes órganos tratados con ejercicio.....	49
8.2.2 El potencial antioxidante del ASG redujo la actividad del radical $DPPH^{\cdot}$ en órganos de ratones sometidos a nado forzado.....	49
8.2.3 El ASG mostró efectos preventivos de lipoperoxidación de los diferentes órganos analizados mediante MDA	50
8.2.4 El porcentaje de la actividad de la enzima SOD en los diferentes órganos disminuyó ...	51
IX. Conclusiones	52
X. Perspectivas.....	53
XI Bibliografía	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grandas pertenecientes al estado de Hidalgo	20
Figura 2. Componentes de la Granada. A. Arilos; B. Semillas; C. Aceite de semilla de granada; D. Jugo de variedades de granadas encontradas en el estado de Hidalgo.	21
Figura 3 Contenido total de polifenoles en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada.....	35
Figura 4. Capacidad antioxidante mediante prueba de radical ABTS ^{•+} en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada.....	36
Figura 5. Capacidad antioxidante mediante prueba de DPPH [•] en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada.....	37
Figura 6. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba ABTS ^{•+}	39
Figura 7. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba DPPH [•]	41
Figura 8. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba SOD.....	44
Figura 9. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba TBARS.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación del ejercicio físico	9
Tabla 2 Tipos de lesiones en el ejercicio.....	11
Tabla 3 Clasificación y abreviatura de los radicales libres	14
Tabla 4 Clasificación de los antioxidantes	18
Tabla 5. Composición nutrimental de la granada.....	22
Tabla 6 Diluciones para preparación de estándares de prueba TBARS	32
Tabla 7. Preparación de tubos para el análisis de actividad de SOD.....	34
Tabla 8. Porcentajes de inhibición del ASG en tejidos mediante método ABTS ^{•+}	40
Tabla 9. Porcentajes de inhibición del ASG en tejidos mediante método DPPH [•]	42
Tabla 10 Porcentaje de inhibición de enzima SOD al termino de 30 y 60 días de tratamiento.....	43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
ASG	Aceite de semilla de granada
EO	Estrés oxidativo
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GSH/GSSG	Relación de glutatión reducido/oxidado
INT	2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)- cloruro de 5-feniltetrazolium
K₂S₂O₈	Persulfato de potasio
MDA	Malondialdehido
NADHP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
RL	Radicales libres
SNC	Sistema nervioso central
SRIT-1	Sirutina-1
VO₂ max	Volumen de oxígeno máximo

Resumen

El aceite de semilla de granada (ASG) es una fuente importante de compuestos polifenólicos y rico en ácidos grasos, que confieren propiedades antioxidantes, considerando esto, el ASG puede ser usado como suplemento alimenticio en personas que realizan ejercicio tanto del tipo aeróbico como anaeróbico de manera constante. En el presente estudio, se evaluó la actividad antioxidante del ASG sobre el estrés oxidativo generado por ejercicio de nado forzado. El ASG fue extraído por método de Soxhlet, se analizó su actividad antirradical, así como contenido total de fenoles. La actividad antirradical fue analizada por los métodos DPPH[·] y ABTS^{·+}, el contenido total de fenoles fue realizado por el método de Folin Ciocalteu. Posterior a la evaluación del ASG se analizó la actividad antioxidante del ASG por modelo de estrés oxidativo inducido por nado forzado en órganos de ratones CD-1. Se utilizaron 72 ratones macho CD-1 de seis semanas de edad se formaron, 12 grupos (n=6), 2 grupos basales, 2 control consumo de aceite sin ejercicio, 2 control con ejercicio sin consumo de aceite y 6 experimentales con 3 diferentes dosis, cada ratón fue administrado mediante cánula. Posteriormente cada ratón fue sometido a prueba de nado forzado por método Porsolt durante diez minutos al día. Al finalizar el ejercicio se sacrificaron mediante decapitación y se obtuvieron órganos por disección para ser homogeneizados con solución salina para determinar los marcadores de estrés oxidativo en cerebro, corazón, pulmón, hígado, músculo y plasma mediante ABTS^{·+} y DPPH[·] determinando el porcentaje de inhibición del radical, lipoperoxidación mediante TBARS y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Los resultados mostraron en ABTS^{·+} el mayor porcentaje de inhibición en tejido pulmonar de 30 días con 35.89%, para pulmón de 30 días con 21.08%. Para TBARS pulmón presentó la mayor protección 0.058 μ M MDA para 30 días y por último para SOD el mayor porcentaje de inhibición en corazón de 30 días con 66.56% y músculo de 60 días con 66.56%. Se concluyó que el ASG posee importante actividad antioxidante y potencialmente puede ser empleado en la prevención y tratamiento de lesiones causadas por actividad deportiva. ASG tuvo actividad antioxidante por lo que podría emplearse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de lesiones deportivas.

Palabras clave: Granada, actividad antioxidante, aceite de semilla de granada, ejercicio físico, lesiones deportivas.

Abstract

Pomegranate seed oil (PSO), is an oil with an important source of polyphenolic compounds and rich in fatty acids, which give antioxidant properties of great interest. ASG can be used as a nutritional supplement in people who exercise constantly. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the antioxidant activity of the ASG on the oxidative stress generated by forced swimming exercise. The ASG was extracted by the SOXHLET method. The oil obtained was analyzed to evaluate the anti-radical activity and analyze the total content of phenols. The anti-radical activity was analyzed by the DPPH[·] and ABTS^{·+} methods, while the total phenol content was performed by the Folin Ciocalteu method. After the evaluation of the ASG, the antioxidant activity of the ASG was analyzed in oxidative stress produced by forced swimming in different organs of CD-1 mice. 72 male CD-1 mice of 6 weeks of age were used. Twelve groups were formed with n = 6, 2 basal groups, 2 control oil consumption without exercise, 2 control with exercise without oil consumption and 6 experimental with 3 different doses, each mouse was administered by cannula. Subsequently, each mouse was subjected to a forced swimming test by Porsolt method for ten minutes a day. Once the experimental days were over, they were sacrificed by decapitation and the organs were extracted to be homogenized with saline to determine the markers of oxidative stress in brain, heart, lung, liver, muscle and plasma by means of ABTS^{·+} and DPPH[·], determining the percentage of inhibition of the radical, lipoperoxidation by TBARS test and enzyme activity superoxide dismutase (SOD). The results showed that for ABTS^{·+} the highest percentage of inhibition was lung of 30 days with 35.89%, for DPPH[·] lung of 30 days with 21.08%. For TBARS lung presented the highest protection 0.058 μM MDA for 30 days to and finally for SOD the highest percentage of inhibition in heart of 30 days with 66.56% and muscle of 60 days with 66.56%. In general, the results showed that the ASG had antioxidant activity so it could be used as a nutraceutical product in the prevention and treatment of bacterial infections.

Key words: Pomegranate, antioxidant activity, pomegranate seed oil, physical exercise, sports injuries.

I. Introducción

El ejercicio físico es una subcategoría de actividad física que ha sido programada, es estructurada y repetitiva, y responde a un fin, en el sentido de mejorar o mantener uno o más componentes de la forma física. Los términos «ejercicio» y «entrenamiento mediante ejercicios» suelen utilizarse como sinónimos, y hacen referencia a la actividad física realizada durante el tiempo de ocio, principalmente con el fin de mejorar o mantener la forma física, el rendimiento físico o la salud. (1)

El estrés oxidativo (EO) es provocado por radicales libres (RL), la mayoría de los RL producidos son oxidantes, capaces de deteriorar una gama de moléculas biológicas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (3). Prácticamente todas las células con un importante metabolismo aerobio, están expuestas a estrés oxidativo, sin embargo, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, diseñados para protegerse de la acción de los RL (4).

Al incrementarse los niveles celulares de las especies reactivas de oxígeno EROs, se produce un desbalance entre estas moléculas y los antioxidantes dando lugar a un fenómeno conocido como estrés oxidativo (EO), el cual modifica la estructura de las diferentes biomoléculas. Las EROs actúan oxidando a los aminoácidos, produciendo, diferentes modificaciones sobre la estructura de las proteínas, afectando la actividad y función de las enzimas, hormonas y proteínas de transporte, haciéndolas sensibles a la proteólisis. La oxidación de los ácidos grasos provoca la lipoperoxidación, que produce una pérdida de permeabilidad en la membrana celular además de que esta se vuelve frágil, lo que incrementa la lisis celular (2)

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran dentro de alimentos de consumo en la vida diaria, la función principal de estas sustancias radica en la prevención de efectos dañinos provocados por especies reactivas de oxígeno (EROs) en el organismo, una dieta equilibrada con alimentos con un buen aporte de antioxidantes ayudará a disminuir daños provenientes del estrés oxidativo (5,6).

Se ha observado que el ejercicio físico aumenta la producción de EROs. La presencia de las EROs es algo natural en los seres vivos y no solo la presencia o no de estos radicales libres

resulta relevante, sino que es de especial interés la cantidad en la que se producen. Cualquier situación de estrés que requiera un proceso metabólico en el que haya reacciones redox es, per se, una posible fuente continua de producción de radicales libres. El ejercicio físico, que se encuentra dentro de estas situaciones de estrés metabólico, implica la posibilidad de una excesiva producción de radicales libres. (7)

En el ejercicio físico intenso o extenuante se aumenta de manera drástica la tasa metabólica del músculo esquelético, incrementando con mayor potencia el consumo de oxígeno así como la producción de las EROs y RL (8), el mantenimiento de altos niveles de EROs durante largos periodos de tiempo de como resultado la activación crónica de las vías que promueven la muerte celular (9,10) y de ésta manera se inducen daños moleculares sobre lípidos, proteínas y ADN desencadenando el EO a la disfunción transitoria, inflamación, daño y dolor muscular (11). El EO crónico o persistente se asocia con la práctica del ejercicio intenso o extenuante y afecta de manera negativa distintos órganos, sistemas y tejidos (7,12,13), incrementando el riesgo a lesiones, infecciones o desencadenar enfermedades crónico-degenerativas en los atletas (14,15).

El incremento del consumo de oxígeno, la liberación de catecolaminas, el exceso de ácido láctico, la actividad de enzimas como la xantina oxidasa o la generación de radicales libres por las mitocondrias son fuentes que pueden aumentar la producción de EROs durante el ejercicio (2). En la naturaleza existen diversas fuentes vegetales que pueden brindar protección antioxidante, tal es el caso de las frutas y en particular, resulta de interés la granada, que en años recientes ha tomado interés por sus propiedades bioactivas y dentro de ellas, la capacidad antioxidante que ésta fruta puede conferir. Se ha demostrado que el jugo fresco del fruto posee hasta un 20% de mayor efectividad antioxidante comparado con extractos comerciales envasados como el jugo de manzana, cereza, arándano, jugo de uva, jugo de naranja, vino tinto y té (16). Además del extracto fresco obtenido de la granada, es posible aislar el aceite contenido en sus semillas (ácido punícico), del cual se han descrito propiedades bioactivas de interés como capacidad antioxidante, actividad antiinflamatoria y la regeneración tisular (17).

II. Antecedentes

2.1 Antecedentes del problema

2.1.1 Daño oxidativo provocado por ejercicio exhaustivo

El oxígeno representa para la vida un doble efecto dentro del organismo pues su papel es esencial para la vida y el desarrollo de células, pero también posee efectos tóxicos al generar productos reactivos que en la producción elevada de estos lleva al inicio del estrés oxidativo (18).

El realizar ejercicio físico incrementa el consumo de oxígeno principalmente en corazón y musculo esquelético, gracias a este requerimiento de consumo máximo de oxígeno (VO_2) y la mayor exigencia de producción de energía se crean cambios metabólicos a nivel celular usando mayor cantidad de oxígeno molecular en la mitocondria. Aproximadamente del 80% de consumo de oxígeno celular es utilizado en la cadena respiratoria para producir energía, del 2-5% de este oxígeno transforma en RL superóxidos e hidroxilos, al mismo tiempo se presenta incremento en la creación de EROs de oxígeno, mostrando en este punto las principales consecuencias que son (19,20):

- Daño a membranas celulares y mitocondriales.
- Deterioro del sistema inmune
- Envejecimiento celular
- Desarrollo de cáncer
- Desarrollo de aterosclerosis
- Afección estructural del corazón
- Daño en funcionamiento cerebrovascular(19,20).

Para hacer frente al estrés oxidativo el organismo tiene diferentes mecanismos de defensa, de los cuales son dos sistemas de defensa, los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, los cuales actúan previniendo la formación de EROs, atrapando los metabolitos reactivos y transformándolos en moléculas menos reactivas, aumentando la resistencia a estas. El momento en el cual las EROs sobrepasan la capacidad de los sistemas antioxidantes del organismo se hace presente el estrés oxidativo dañando tejidos, principalmente lípidos donde se produce la lipoperoxidación de los ácidos grasos llevando a la mala función en las membranas celulares. El producto final de la lipoperoxidación es el malondialdehído (MDA).

El cerebro es considerado como un órgano altamente sensible al daño oxidativo ya que contiene una gran cantidad de fosfolípidos y de ácidos grasos polinsaturados, ya que estos son muy susceptibles a los elementos de oxidación, consumen una alta cantidad de oxígeno y por último presenta bajos niveles de enzimas antioxidantes. (21)

Está demostrado que el ejercicio físico regular tiene beneficios directos sobre el sistema nervioso central (SNC) a través de diversos estudios enfocados en esta relación. La práctica del ejercicio lleva al incremento, activación y expresión del RNAm de los sistemas de antioxidantes endógenos propios del cerebro y de igual manera proporciona una disminución del daño oxidativo. (22–25)

El efecto a producir en el cerebro será con base al tipo de ejercicio y la intensidad, pues el ejercicio aeróbico de mediana intensidad promueve la protección antioxidante (26,27), mientras que el realizar ejercicio del tipo anaeróbico incrementa de manera general el estrés oxidativo producido (24,28).

En cuanto al daño provocado en pulmones por ejercicio, estudios han confirmado la existencia del daño por estrés oxidativo ya que durante la práctica el cuerpo se expone al consumo de ozono, que provoca la liberación de factores proinflamatorios desde las células del epitelio respiratorio que presentan una respuesta de inflamación neutrofílica por la inhalación del ozono, el cual provoca permeabilidad vascular favoreciendo el paso que el líquido plasmático pase al intersticio pulmonar y finalmente llegue a los espacios aéreos (29).

2.1.2 Función antioxidante de la granada y estrés oxidativo

La granada desde la antigüedad se ha usado como producto medicinal o “alimento de curación” pues ha mostrado una gran cantidad de beneficios para mejorar aspectos de la salud o beneficios para mejorar la salud o bien como auxiliar terapéutico, es por eso que en la actualidad se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran sus propiedades bioactivas como lo es su respuesta antioxidante en situaciones fisiopatológicas (16).

Se ha demostrado que la granada posee una importante actividad antioxidante por encima de otros frutos con potencial para disminuir estrés oxidativo y reducción de lipoperoxidación evidenciado por los resultados obtenidos en estudios de intervención y experimentales. El uso de fuentes antioxidantes en practicantes de actividades deportivas ha despertado gran interés por la capacidad ergogénica que estas pueden brindar tanto en la prevención de

lesiones o bien para acelerar los periodos de recuperación que ambos escenarios son resultado de una exposición importante con agentes oxidantes (16,19,20).

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Ejercicio físico

El ejercicio físico es una subcategoría de actividad física que ha sido programada, es estructurada y repetitiva, y responde a un fin, en el sentido de mejorar o mantener uno o más componentes de la forma física. Los términos «ejercicio» y «entrenamiento mediante ejercicios» suelen utilizarse como sinónimos, y hacen referencia a la actividad física realizada durante el tiempo de ocio, principalmente con el fin de mejorar o mantener la forma física, el rendimiento físico o la salud. (1)

El ejercicio físico se caracteriza por cinco componentes los cuales son: tipo (aeróbico o anaeróbico), intensidad con la cual el individuo realiza el ejercicio, duración del ejercicio por día, repeticiones que realiza el individuo por cada rutina y por último la frecuencia con la que realiza el ejercicio por semana y es considerado como un tratamiento no farmacológico para el bienestar físico, mental y funcional (30,31).

2.2.2 Tipos de ejercicio físico

El ejercicio físico se clasifica en función a los sistemas energéticos utilizados en el mismo en dos grupos, aeróbico y anaeróbico (2).

El ejercicio aeróbico hace referencia a aquel que usa el oxígeno para la producción de energía muscular, siendo cualquier tipo de ejercicio que se practique a intensidad moderada, en el que se eleve la frecuencia cardiaca (60- 70% de la capacidad máxima) y la respiratoria para aumentar el aporte de oxígeno a los músculos, por ejemplo: caminar, nadar, trotar, jugar tenis y practicar ciclismo.(20)

Este tipo de ejercicio esta unido a la capacidad que presenta el organismo a resistir la fatiga que produce el esfuerzo y que limita y afecta al rendimiento del deportista. El realizar este tipo de ejercicio físico de manera habitual permite mejorar dos de los cuatro elementos fundamentales presentes en una buena condición física los cuales son tanto la resistencia cardiovascular como la muscular (32,33).

El sistema anaeróbico produce energía a partir de procesos metabólicos que no requieren de la reducción del oxígeno, así mismo, se debe identificar que la capacidad anaeróbica se divide en dos tipos: el metabolismo anaeróbico láctico y aláctico. De acuerdo con Bompa & Buzzichelli (2017) el sistema anaeróbico aláctico o sistema inmediato se emplea cuando se requieren movimientos repentinos, explosivos o inmediatos, este no emplea oxígeno, ni obtiene como desecho el ácido láctico, y es alimentado por ATP almacenado y otra sustancia de alta energía, como el fosfato de creatina. (34)

En cuanto al sistema anaeróbico láctico o sistema a corto plazo no emplea el oxígeno como combustible, por otra parte, emplea la glucosa de la sangre y el glucógeno almacenado en el músculo, y a partir de esto forma energía o ATP, del cual el ácido láctico se produce como subproducto. (35)

Tabla 1 Clasificación del ejercicio físico

Clasificación	Características
Según el sustrato energético	<ul style="list-style-type: none">• El organismo obtendrá el ATP necesario para llevar a cabo la contracción muscular a través de diferentes vías metabólicas, desde la cadena respiratoria de la mitocondria por la vía de la glucólisis anaeróbica.
Por las contracciones musculares	<ul style="list-style-type: none">• Contracción isotónica, en la que el músculo se alarga o se acorta• Contracción concéntrica, en la que el músculo se activa y se acorta• Contracción excéntrica, en la que el músculo se activa, pero la resistencia le vence• Contracción isométrica, en la que el músculo se activa y no puede vencer la resistencia que tiene, con lo que su longitud no cambia.• Contracción auxotónica: es una combinación de Isotónica e isométrica• Contracción Isocinética: Se podría entender como una contracción máxima a velocidad constante, debido a la resistencia
Tipo de ejercicio según su intensidad	<ul style="list-style-type: none">• La intensidad se mantiene durante el ejercicio se denomina de intensidad constante, si va cambiando, de intensidad variable, si va aumentando progresivamente creciente o incremental y si va disminuyendo se denomina decreciente
Tipos de ejercicio según el grado de agotamiento	<ul style="list-style-type: none">• Extenuante: El ejercicio se realiza hasta el agotamiento del sujeto.• No extenuante: El ejercicio no se realiza hasta el agotamiento del sujeto.
Tipos de ejercicio según su continuidad	<ul style="list-style-type: none">• Continuo: si el ejercicio se realiza sin efectuar pausas.• Intermitente o interválico: Si el ejercicio se realiza simultaneando periodos de pausa y actividad.

Fuentes (36)

2.2.3 Daño Oxidativo en el ejercicio

Estudios anteriores han demostrado los beneficios que produce el realizar ejercicio en la vida diaria y así mismo otros estudios han explicado que durante el ejercicio las capacidades de los sistemas antioxidantes se ven superados por la alta generación de RL y estrés oxidativo, pueden sobrepasar el sistema de enzimas protectoras, alteran las funciones celulares, oxidan lípidos de membrana, proteínas celulares, y enzimas lo que puede llevar a daño o lesión de tejidos. (37,38) El EO durante el ejercicio afecta a diversos órganos del cuerpo humano como

musculo, corazón, hígado, cerebro y sangre(39,40). El EO puede jugar un rol protagonista en la patogénesis de enfermedades severas tomando en cuenta e incluyendo enfermedades cardiovasculares, inflamación muscular, y enfermedades neurodegenerativas (41,42). Durante el ejercicio físico de alta intensidad se presenta el aumento de pentano el cual es un producto derivado de la lipoperoxidación, de igual manera aumenta la concentración de MDA con esto se demuestra que existe una insuficiencia del sistema de defensa antioxidante. En lípidos se produce el mayor daño pues afecta las estructuras constituidas por ácidos grasos poliinsaturados afectando la permeabilidad de la membrana llevando a edema y posteriormente muerte celular, en proteínas se produce el daño en aminoácidos y se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, ruptura de enlaces peptídicos y formación de grupos carboxilos y existen afecciones en ADN pues se forman radicales peroxilo gracias a la presencia de oxígeno y su unión a las bases del ADN y posteriormente pueden desarrollarse fenómenos de mutaciones y carcinogénesis. Lo anterior dependerá de la intensidad y la cantidad de tiempo que se realiza el ejercicio (39,40).

2.2.4 Lesiones por ejercicio

La lesión por ejercicio se define como cualquier tipo de dolor o daño físico producido por deporte, actividad física o ejercicio físico. Las lesiones por ejercicio físico son afecciones generalmente del sistema musculoesquelético (músculos, huesos, tendones, cartílagos y tejidos asociados), pueden llegar a ser lesiones graves como son los traumatismos en cabeza, cuello o columna vertebral (43).Las lesiones por ejercicio pueden ser clasificadas como aguda cuando se producen en el momento de estar realizando el ejercicio como ejemplo sería fractura de huesos, estas normalmente producen dolor, inflamación e impide que se pueda ejercitar la zona afectada, otra clasificación sería la lesión crónica y este tipo de lesión se mantiene durante un tiempo largo afectando la zona de la lesión como ejemplo sería la tendinitis y a su vez de igual manera que las lesiones agudas producen dolor, inflamación e impide que se pueda ejercitar la zona afectada. Otra manera de clasificar las lesiones es en tres grados y son definidas de la siguiente manera:

- **Lesión Leve:** Lesión con niveles de dolor e inflamación bajos, el rendimiento dentro del ejercicio no se ve afectado y el área de lesión no será sensible no se verá deformación alguna.

- **Lesión Moderada:** Lesión con niveles de dolor moderado e hinchazón, este tipo de lesión afectara el rendimiento dentro del ejercicio y la zona de lesión presenta cambios de coloración.
- **Lesión Grave:** Lesión con niveles de dolor altos e hinchazón, este tipo de lesión afectará de manera notable el rendimiento en el ejercicio además de también de afectar las actividades de la vida diaria y la zona de lesión será muy sensible y con notable cambio de coloración y algunas deformidades en la misma (43,44).

El 80% de las lesiones por ejercicio se dan en tejidos blandos como lo son los músculos, ligamentos, tendones y las articulaciones, donde se presentan esguinces, calambres, desgarros y contusiones y el restante 20% se presentan en órganos internos (45).

Tabla 2 Tipos de lesiones en el ejercicio

Tipo de lesión	Características
Agudas	<ul style="list-style-type: none"> • Se producen durante la práctica del ejercicio. Y pueden clasificarse como autolesión o autotraumatismo y por contacto.
Crónicas	<ul style="list-style-type: none"> • Por sobrecarga, aquellas que inciden sobre el aparato locomotor con una intensidad de leve a moderada, actuando de forma repetitiva y acumulativa • Lesiones musculares: dentro de ellas están las provocadas por factores externos (contusiones y heridas) y las producidas por factores internos (distensiones, desgarros, tirones o roturas musculares). • Lesiones en los tendones: suelen producirse bien por el uso de material o calzado inadecuado o por culpa de un terreno irregular o demasiado duro para practicar ejercicio (tendinitis) o bien como consecuencia de una contusión (tendosinovitis). • Lesiones de ligamentos: un mal movimiento o incluso un golpe pueden provocar un esguince, una distensión o una rotura de los ligamentos del tobillo, de la rodilla, etcétera. Hay distintos grados que marcan la gravedad de la lesión y el periodo de recuperación. • Lesiones de huesos: un fuerte traumatismo puede causar una fractura del hueso de mayor o menor grado (fisuras) cuyo periodo de curación suele ser más extenso que el resto de lesiones.

Fuentes (43–45)

2.3 Estrés oxidativo

2.3.1 Definición de estrés oxidativo

El EO es un proceso el cual se lleva a cabo en cuerpo humano, en cada individuo se genera estrés oxidativo cuando se presenta el aumento de RL mediante la misma respiración y por ende la disminución de antioxidantes en grandes cantidades los cuales crean un desequilibrio importante en las células que componen a al organismo, con el pasar del tiempo y el descuido en que se mantiene en el organismo hace que se produzca un daño importante y a esto se le conoce como estrés oxidativo (19,46,47).

En los sistemas biológicos se puede observar bajo la medición del aumento o la disminución del potencial sensitivo-redox de una molécula la cual responderá al estrés oxidativo. De manera general los marcadores de estrés oxidativo confiables presentan una serie de cualidades que son: 1.- Química única y detectable, 2.- Durante periodos de estrés oxidativo presentan una disminución o amento, 3.- El tiempo de vida es relativamente largo y 4.- No son afectados por otros procesos celulares (48).

Durante periodos de estrés oxidativo, los pro-oxidantes vencen a las defensas de la célula produciendo de esta manera el daño celular. Dentro del sistema biológico el estrés oxidativo se ve caracterizado por distintos parámetros, a continuación, se describen: 1.- Incrementa la creación de RL y otros oxidantes, 2.- Disminuye el peso molecular, además de disminuir los antioxidantes liposolubles, 3.- Lleva a la alteración del equilibrio redox celular y por último 4.- Provoca daño oxidativo a lípidos, proteínas y al ADN celular. Los biomarcadores del estrés oxidativo son divididos en cuatro categorías. La primera categoría implica los biomarcadores que detectan a los oxidantes (49,50).

La segunda categoría de biomarcadores del estrés oxidativo implementa la medición de antioxidantes en tejidos, ya que la disminución de antioxidantes es común durante el proceso de oxidación y es por eso que se ha utilizado este tipo de biomarcadores para identificar los niveles de antioxidantes en los propios tejidos (48).

La tercera categoría de biomarcadores comprende de la evaluación de las moléculas modificadas por oxidación, teniendo en cuenta que las EROs de oxígeno atacan a los lípidos, proteínas y el ADN de las células generando moléculas oxidadas que son usadas para detectar el EO en la célula. Esta categoría es usada como uno de los biomarcadores más importantes del EO, pero presenta una dificultad ya que la cantidad de moléculas oxidadas es baja en las

células durante el periodo del EO (49,50). La cuarta categoría de biomarcadores se basa en la medición del balance redox celular. Este es uno de los métodos de medición más utilizados y comunes para determinar el balance redox celular pues al incrementa la producción de oxidante resulta en la disminución de la relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), indicando bajos niveles de GSH reducido en favor del incremento del GSH oxidado (48,49).

Todo esto no es solo generado por los hábitos alimenticios, también por cuestiones del ambiente, como el aire que es respirado lo cual afecta de manera significativa ya que se sabe que se generan RL, estos generan una mayor oxidación de células. El EO es un factor importante para la aparición de enfermedades que día a día afecta cada vez más a la población tal es el caso del cáncer. La relación que existe entre el EO con las EROs es el punto de equilibrio donde se presentan daños a nivel celular dentro del organismo pues comienza la presencia de patologías tales como enfermedades cardiovasculares, infecciosas, cáncer, diabetes y trastornos neurodegenerativos (51–54).

2.3.2 Radicales libres y ejercicio físico

Los RL son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Estos tienen su origen en las mitocondrias por reacciones diversas redox, realizadas por enzimas como Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADHP) oxidasa, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y peroxidadas, poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forma (6).

Tabla 3 Clasificación y abreviatura de los radicales libres

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
	Ión superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$
	Radical hidroxilo	OH^{\cdot}
	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Radicales alcoxi y proxi	RO^{\cdot} y ROO^{\cdot}
	Radical hidroperoxilo	ROOH^{\cdot}
Especies reactivas de nitrógeno	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
	Dióxido nítrico	NO_2^{\cdot}
	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^{\cdot-}$
Especies radicales del azufre	Radical tiilo	RS^{\cdot}
Especies reactivas del cloro	Ácido hipocloroso	HClO

Fuente: (51,55,56)

Otras fuentes endógenas que producen RL son las oxidaciones microsomales, los fagosomas, la auto oxidación de sustratos y los neutrófilos, que son producidos en el organismo, estos juegan un importante papel en la defensa contra infecciones, bacterias y virus. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (57,58).

Estos pueden causar daño a los lípidos y las proteínas de la membrana celular, lo cual no les permite realizar sus funciones vitales, atacan también al ADN impidiendo que tengan replicación celular y contribuyen al envejecimiento celular. Los procesos normales del

organismo producen RL como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, aunque o todos los RL son peligrosos pues, por ejemplo, las células del sistema inmune crean RL para matar bacterias y virus, pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas (6,57,58).

2.3.3 Adaptación del organismo al ejercicio

Durante la realización de ejercicio el organismo humano lleva a cabo procesos de adaptación en diferentes sistemas para obtener el mayor rendimiento dentro de la actividad a realizar, desde activación y adaptación de musculatura hasta un proceso de gasto energético elevado (59).

Adaptación muscular: La adaptación va a ser adecuada al tipo de ejercicio que se pretende realizar, a esto se le conoce como respuesta adaptativa y puede ser de diferentes maneras:

- **Hipertrofia:** Las fibras musculares aumentan de tamaño manteniendo la estructura basal y propiedades fisicoquímicas.
- **Remodelación sin hipertrofia:** Las miofibras no tendrán algún aumento en cuanto al tamaño, cambiarán su estructura, cambiarán sus características enzimáticas y por lo regular existe un cambio en la microvascularización.
- **Respuesta mixta:** En esta adaptación se presenta una remodelación con hipertrofia

La energía utilizada por el musculo va a derivar de diversas vías metabólicas pues se integran los metabolismos tanto aeróbico como anaeróbico y de los sustratos energéticos metabolizados. Los ejercicios de resistencia utilizan glucógeno, glucosa y los ácidos grasos de forma mayoritaria como forma de energía (59,60).

Adaptación Cardiovascular: La adaptación cardiovascular durante el ejercicio es necesaria ya que gracias a ella las demandas de oxígeno y nutrientes necesarias para el musculo por el organismo son llevadas a cabo de manera satisfactoria (61,62). El consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx.) se utiliza para determinar la capacidad funcional aeróbica y se ha demostrado que a mayor VO_2 máx. la fatiga es menos durante el ejercicio. Todas estas adaptaciones se presentan gracias a la activación del sistema nervioso simpático y la inhibición del sistema parasimpático. Las adaptaciones cardiovasculares principales son: disminución de la frecuencia cardiaca, aumento de volumen de cámaras cardiacas, aumento

de volumen sistólico y mejora de la perfusión cardiaca. Todas estas adaptaciones afectan a la estructura y funcionamiento del corazón, pero mejora el rendimiento físico (62,63).

Adaptaciones pulmonares: El sistema respiratorio durante el ejercicio físico comprende de tres funciones básicas que son proveer oxígeno y llevar a la disminución de la acidosis metabólica de la sangre venosa, permitir un mantenimiento bajo de la resistencia vascular pulmonar y reduce el paso del agua al espacio intersticial (19,20). Las adaptaciones se presentan desde la ventilación pulmonar, la difusión y transporte de gases. La ventilación pulmonar se ve aumentada, la capacidad de difusión de oxígeno se ve triplicado por el aumento que se presenta en la superficie de intercambio. En el transporte de gases la hemoglobina se ve aumentada de un 5-10% gracias a la pérdida de líquidos y la mioglobina aumenta las concentraciones (19,20,64).

2.3.4 Generación del estrés oxidativo durante el ejercicio

Una gran cantidad de estudios han mostrado que la práctica de ejercicio lleva a la producción de EO, pero para la generación de este se deben de cumplir ciertas condiciones, rutinas y tiempos de ejercicio. El realizar ejercicio lleva a la necesidad de aumentar el consumo de oxígeno de cada tejido del cuerpo aumentando la cantidad de RL producidos hasta la creación de EROs que sobrepasan los niveles de defensa antioxidante propia del organismo para así producir el EO (19,65–67).

Diversos mecanismos de adaptación al ejercicio físico llevan a la generación de RL de tal magnitud que se compara con el EO que se genera en el fenómeno isquemia-reperusión, así mismo la intensidad del ejercicio lleva a la formación de ácido láctico, esto provoca la creación de EROs, que convierte el radical superóxido en perhidroxilo (radical con alto nivel de daño) gracias la interacción que presentan los protones derivados de la producción de ácido láctico (20,65,68).

El EO producido en el ejercicio presenta sus afecciones en diversos tejidos, pero principalmente llama la atención el daño que provoca en lípidos, siendo la peroxidación de los ácidos grasos el mayor efecto producido por éste, dañando las membranas celulares disminuyendo la fluidez en ellas (65). El ADN de igual manera se ve afectado por el EO adicionando a las bases del ADN oxígeno formando el radical peróxido. Otro daño producido en el ejercicio por el EO se da en los polisacáridos, estos reaccionan con los radicales hidroxilo generando su despolimerización que generalmente conducen a procesos

degenerativos(66,67). A mayor intensidad del ejercicio se incrementan las concentraciones de MDA a consecuencia de un EO mayor, pero este no solamente se puede observar por la intensidad del ejercicio, pues también por la duración del mismo (68).

2.4 Antioxidantes

2.4.1 Generalidades de los antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran dentro de alimentos de consumo en la vida diaria, la función principal de estas sustancias radica en la prevención de efectos dañinos provocados por especies reactivas en el organismo, una dieta equilibrada con alimentos con un buen aporte de antioxidantes ayudara a disminuir daños provenientes del EO (5,6).

La función de los antioxidantes dentro del organismo va desde el aspecto genético, disminuyendo el daño de proteínas (deterioro y muerte celular) mostrándose la afectación en el proceso de envejecimiento. Los antioxidantes son sustancias de gran importancia para prevenir y parar el avance de enfermedades cardiovasculares, tumores y enfermedades neurodegenerativas, de igual manera tienen la importante función de impedir que las EROs, se conviertan en RL evitando así la oxidación (69,70).

2.4.2 Tipos de antioxidantes

Los antioxidantes se clasifican en endógenos o enzimas, fabricados por la propia célula, y exógenos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes Existen antioxidantes llamados exógenos, que actúan como moléculas suicidas, ya que estas se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de estos debe ser de manera continua, por medio de la ingesta de nutrientes que lo contienen (71). Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (70,71).

Los antioxidantes endógenos se encuentran en los tejidos y pueden eliminar RL, estas son superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y el glutatión (72,73). Los antioxidantes exógenos son aquellos que se obtienen a través de la dieta, provienen de los alimentos que

han sido estudiados demostrando propiedades antioxidantes, estos antioxidantes pueden ser la vitamina E, vitamina C y los carotenoides (57).

Las vitaminas tienen un gran potencial antioxidante, mostrando disminución en riesgos cerebrovasculares isquémicos, principalmente pueden ser encontrados en frutas y verduras. Principalmente son la vitamina A, vitamina C, vitamina E y en los carotenoides. (74,75) La vitamina C es necesaria para el mantenimiento y formación adecuada del material intracelular además de disminuir el potencial de daño de los RL (76). La vitamina E proporciona diversas funciones como antioxidante pues es capaz de neutralizar oxígeno simple, logra capturar los RL hidroxilo, tiene la capacidad de capturar anión superóxido y logra neutralizar peróxidos (77).

Tabla 4 Clasificación de los antioxidantes

Endógenos	Exógenos
Superóxido Dismutasa	Vitamina E
Catalasa	Vitamina C
Glutación Peroxidasa	Betacarotenos
Coenzima Q	Flavonoides
Ácido Tiótico	Licopeno
Glutación	Carotenoides

Fuente: (72–76,78)

2.4.3 Relación del consumo de antioxidantes con el ejercicio físico

Una dieta rica en antioxidantes dentro del ejercicio físico puede dar lugar a una mejor protección del organismo ante el EO (51). Diversos estudios realizados han demostrado que deportistas consumen una dieta rica en antioxidantes para brindar protección necesaria e incluso obtener un mejor rendimiento físico, pero principalmente para la protección muscular ante lesiones. Los antioxidantes dentro de la dieta del ejercicio ayudan a neutralizar RL llevan un papel importante, por lo tanto, es recomendado consumirlos en el periodo inicial del ejercicio físico siendo este momento el cual se incrementa el estrés del entrenamiento (19,73).

La protección en contra del EO es gracias a un sistema antioxidantes organizado de buena manera ya que trabaja en conjunto para otorgar una resistencia hacia alteraciones redox en la célula. Los antioxidantes por si mismos cuentan con diversas maneras de minimizar la disponibilidad de prooxidantes, como por ejemplo las moléculas sintetizadas de manera endógena como el glutatión, ácido úrico y la bilirrubina con agentes que pueden ser encontrados en la dieta como el ácido ascórbico y la vitamina E. La vitamina E puede ser encontrada de manera fácil pues está distribuida en una gran cantidad de alimentos (49).

2.5 La granada

2.5.1 Características del fruto

La granada (*Lythraceae*) es un fruto proveniente del árbol granado perteneciente a la familia de las *Punicaceae* el cual está distribuido alrededor de todo el mundo, es un árbol pequeño cuya fruta es redonda y de color amarillo-rojizo, llena de numerosos “arilos” que contienen un zumo de color rojo intenso (79). La granada es un fruto hortícola y comercial que se adapta generalmente de buena manera al clima mediterráneo (80).

El nombre del género *Punica*, fue generado por el nombre Romano Cartago, lugar donde eran conocidas las mejores granadas por su gran crecimiento (81).

En México la granada fue introducida por españoles después de la época de la conquista en conjunto con el durazno, la manzana, el higo y la vid. El cultivo de la granada fue llevada a hortalizas familiares por los frailes quienes fueron lo que evangelizaron a los indígenas. Este tipo de huertas permitían proveer de fruta fresca a hogares y al mercado local, esto aún en la actualidad sigue sucediendo (82).

El fruto es una baya de color rojizo, mide aproximadamente entre 7 y 12 centímetros y su maduración se da en un tiempo aproximado entre 6 y 7 meses después de haber sido la floración sin que el fruto pueda llevar la maduración fuera del árbol (16,83)

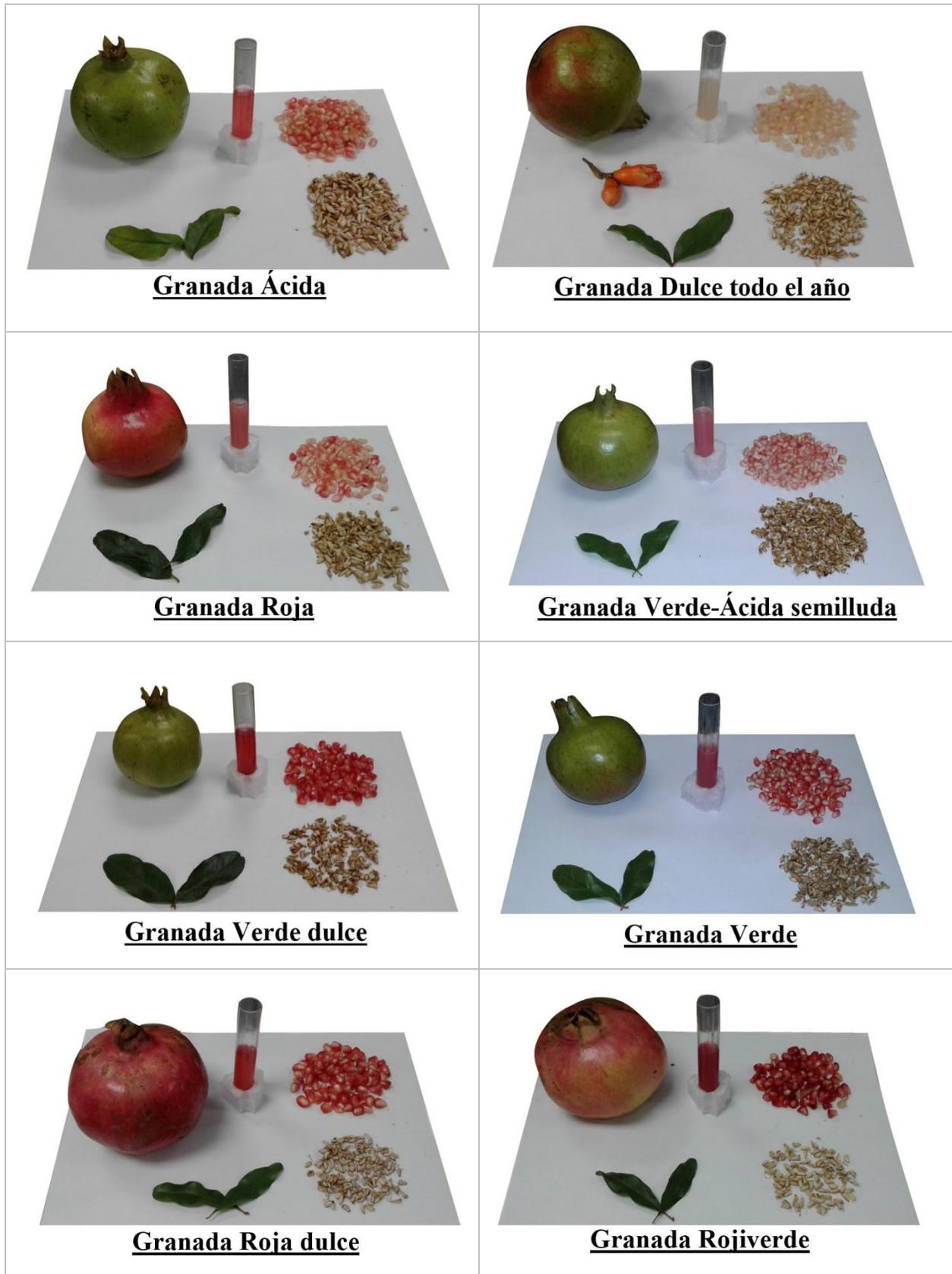


Figura 1. Grandas pertenecientes al estado de Hidalgo

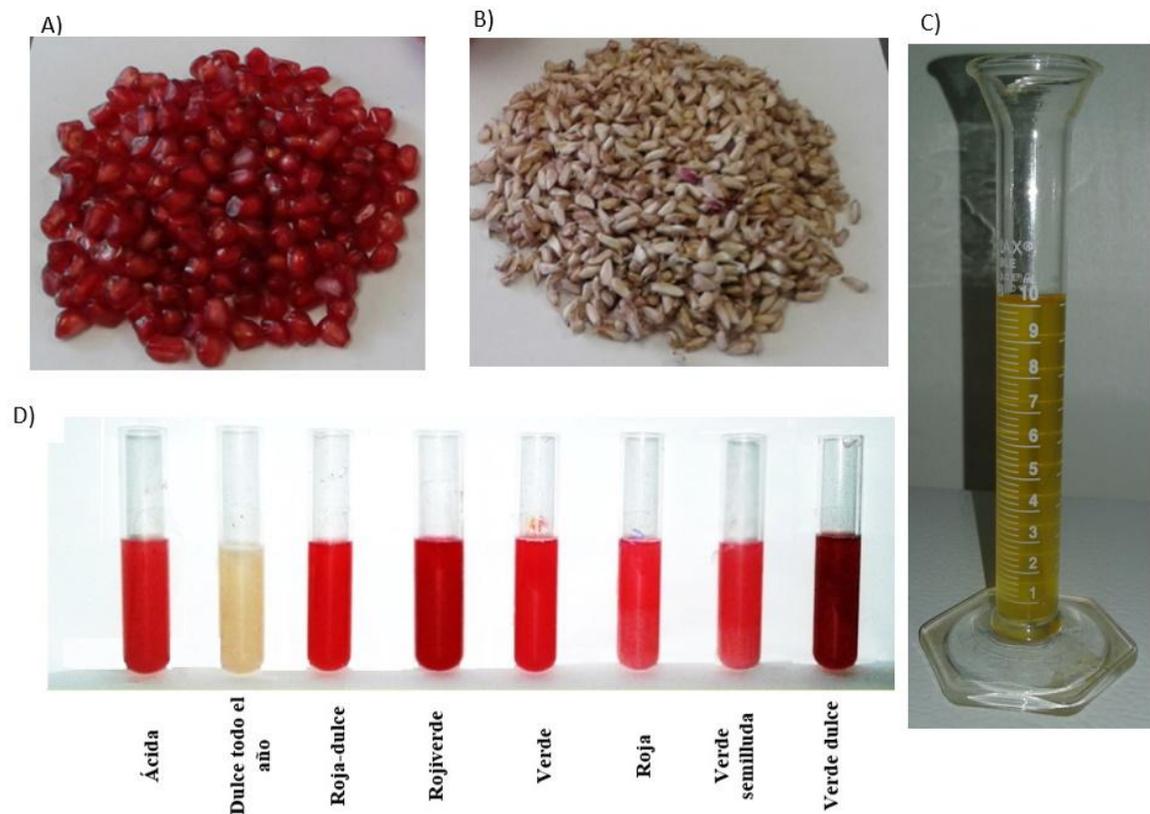


Figura 2. Componentes de la Granada. A. Arilos; B. Semillas; C. Aceite de semilla de granada; D. Jugo de variedades de granadas encontradas en el estado de Hidalgo.

2.5.2 Composición nutrimental de la granada

La granada es un fruto nutricionalmente rico en elementos, está compuesto de agua y azúcares, es un fruto con contenido bajo en grasas, bajo contenido de proteínas, esto habla de un fruto bajo en contenido calórico, contenido en fibra alimentaria, rica en contenido de potasio, calcio, magnesio, fosforo, hierro, sodio, vitamina B, vitamina C y niacina (84). Dentro de los ácidos orgánicos se componen de ácido málico y cítrico (16). Los fenoles totales se encuentran en una concentración de 250 mg/100 mL de jugo, comparable a la del vino tinto (valores medios de 203 mg/100 mL) y muy superior a la del té verde (103 mg/100 mL) (85). En últimos años la granada ha sido estudiada gracias a sus mecanismos farmacológicos y a sus beneficios terapéuticos los cuales se derivan de los compuestos polifenólicos de la granada, entre los que se encuentran el ácido elágico, ácido gálico, elagitaninos (punicalina y punicalagina), flavonoides, antocianidinas, antocianos, flavonoles, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, catequinas y lignanos (86–88).

Tabla 5. Composición nutrimental de la granada	
Componente	Cantidad
Energía(kcal)	63-78
Agua (g)	82.5
Fibra (g)	0.3 – 0.9
Proteínas (g)	0.7
Lípidos (g)	0.6
Hidratos de carbono (g)	16.7
Glucosa	7.2
Fructosa	7.9
Sacarosa	1.0
Cenizas (g)	0.5
Minerales (mg)	
Sodio	7.0
Potasio	290,0
Calcio	8.0
Vitaminas (mg)	
Tiamina (Vitamina B1)	0.05
Riboflavina (Vitamina B2)	0.02
Ácido ascórbico (Vitamina C)	7.0
Nicotinamida	0.3
Ácido pantoténico	0.59
Ácidos orgánicos (g)	0.77
Ácido málico	0.1
Ácido cítrico	0.5

A pesar de sus grandes propiedades funcionales, en México la granada no figura dentro del mercado ya que es un fruto que se consume solo por temporadas, se consume como fruta fresca o bien como guarnición de platillos típicos, pero un punto importante es que el consumo de la granada no es común debido a la dificultad con la que representa su mondado (82,89).

2.5.3 Actividad antioxidante

Diversos estudios han identificado las propiedades de la granada identificando como principal aporte el contenido polifenólico, demostrando que la capacidad antioxidante de la granada es de 2 a 3 veces mayor que el vino tinto o el té verde (81,86).

En estudios realizados con ratones han mostrado reducción del EO y reducción de la lipoperoxidación gracias al consumo de extractos del fruto entero. De igual manera estudios realizados en humanos reportaron que un consumo de 250 ml. De jugo fresco de granada al

día durante cuatro semanas incrementan la capacidad antioxidante del organismo con beneficios para la salud (90).

La granada ha demostrado tener mayor capacidad antioxidante en comparación con otros frutos, legumbres y hortalizas, todo esto dependiendo de la cantidad de polifenoles, en comparación con bebidas comerciales se demostró que el jugo de la granada contiene por lo menos 20% más de capacidad antioxidante a diferencia de bebidas hechas a base de manzana, cereza, arándano, jugo de uva, jugo de naranja, vino tinto y té (16).

2.6 Aceite de semilla de granada

2.6.1 Generalidades del aceite

El aceite de semilla de granada (ASG) ha presentado en los últimos años un gran interés por parte de investigadores gracias a su rica composición fitoquímica. El ASG representa del 12% al 20% del peso total de la semilla y está compuesto por un conjugado de ácidos grasos. El ácido punícico es también conocido como ácido omega 5 y este es un ácido graso de proveniente de la familia de los ácidos grasos poliinsaturados, su nombre se deriva del nombre científico de la granada y se encuentra en la semilla de este fruto (91).

2.6.2 Composición nutrimental

El aceite de las semillas de la granada, es fuente de ácidos grasos conjugados, poliinsaturado con un elevado contenido en ácido punícico también denominado omega 5. El 99% del componente del ASG son triacilgliceroles, este a su vez es el 80% de ácido octadecatrienoico. Los componentes que se pueden encontrar en el ASG son esteroides, esteroides y cerebrósidos. De igual manera contiene ligninas y ácidos hidroxinámicos y algunos derivados de ligninas los cuales proporcionan un alto poder antioxidante (83,92).

2.6.3 Beneficios para la salud

El ASG ha sido estudiado con el paso del tiempo gracias a sus grandes beneficios que aporta a la salud como el potencial antioxidante, actividad antiinflamatoria, regeneración de tejido epidérmico y participa dentro de la prevención de diferentes tipos de cáncer. El ácido punícico es un poderoso antioxidante natural y al consumirlo funciona como protector contra los RL. Aumenta significativamente el enzima Sirutina-1 (SRIT-1), esta enzima es uno de los mejores protectores celulares naturales frente al EO (17).

El ASG ayuda a dar un buen mantenimiento de la piel, ya que el consumo de este previene de la pérdida de elasticidad y de firmeza (93). El ASG es un gran protector natural, si se consume de manera continua por ejemplo en jugo de granada, ayudara de buena manera al sistema cardiovascular, contribuyendo a la eliminación de la placa que se genera en arterias. También existe evidencia de efectos moduladores de la presión arterial (94).

Se ha demostrado que el consumo de AG omega 5 tiene efectos inmunomoduladores, propiedad que podría ser probada en enfermedades comunes como resfriados. El ASG tiene efectos antiinflamatorio, por lo cual, su consumo habitual, disminuye de buena manera la producción de leucotrienos y prostaglandinas, reduciendo las respuestas antiinflamatorias (93,94).

III. Justificación

Realizar ejercicio de forma constante promueve mejoras en la salud, sin embargo, un aspecto importante a considerar, es el daño celular que viene acompañado de la práctica regular del mismo, esto, debido al efecto del estrés oxidativo celular. Está ampliamente reconocido, que la constante ejecución del ejercicio, promueve la formación de radicales libres, los cuales, a través de mecanismos en particular, producen daño celular que repercute en la funcionalidad tisular. Así mismo, se ha demostrado que una importante carga de radicales libres, agudiza la fatiga muscular, por ende, una alta predisposición a sufrir lesiones. Las especies reactivas de oxígeno responden al ejercicio incrementando de manera acelerada, la cantidad de especies reactivas de oxígeno van acorde a la cantidad, al tipo e intensidad del ejercicio realizado, llevando todo esto a un estado de estrés oxidativo y posteriormente a lesiones(128).

Los agentes encargados de disminuir o hacer frente a los radicales libres se les conoce como antioxidantes. El aporte de antioxidantes dentro del ejercicio puede ayudar a un mejor rendimiento físico, esto demostrado durante los últimos años donde se han generado investigaciones mostrando el uso de los mismos mejorando el rendimiento y en cierto punto disminuyendo las lesiones durante la práctica física(5,8). Los antioxidantes pueden ser obtenidos de la dieta, existen ciertos alimentos que cuentan con un potencial antioxidante importante, es en este punto donde la granada toma su lugar dentro de esta investigación, este fruto ha demostrado tener gran potencial antioxidante, además de muchos más beneficios para la salud misma(6). Está ampliamente reconocido, que los aceites vegetales significan, no sólo una buena fuente de vitaminas y ácidos grasos de importancia biológica, sino también de compuestos antioxidantes dependiendo de la fuente de obtención. Como resultado de la investigación en torno a la granada (*P. Granatum L.*), se ha establecido que es una buena fuente de nutrientes y compuestos bioactivos que han sido utilizados con diferentes fines terapéuticos(93,94) La importancia de evaluar la capacidad antioxidante del aceite de semilla de granada bajo un modelo de estrés oxidativo por actividad física, radica en la alta viabilidad de ser utilizado como un suplemento nutricional con alto potencial antioxidante y además como un factor determinante en la prevención de lesiones que se verá reflejado en el rendimiento y desempeño de la actividad física(83,92).

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad antioxidante de aceite de la semilla de granada en el rendimiento físico y en lesiones de tejidos inducidas por nado exhaustivo en ratones macho CD-1.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del aceite de semilla de granada por los métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] y ABTS^{•+}.
- Evaluar el rendimiento físico en un modelo de nado exhaustivo en ratones macho suplementados con aceite de semilla de granada durante 30 y 60 días con diferentes dosis (50µL, 100µL y 200µL por día).
- Evaluar el nivel de estrés oxidativo de corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, músculo y sangre mediante pruebas marcadores de estrés oxidativo (DPPH[•], ABTS^{•+}, SOD y MDA), en ratones suplementados con aceite de semilla de granada durante 30 y 60 días.

V. Hipótesis

El empleo de aceite de semilla de granada como suplemento, previene y reduce el daño tisular generado por estrés oxidativo en un modelo de ejercicio físico de resistencia

VI. Material y métodos

6.1 Diseño

El presente estudio es de tipo experimental y en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana: Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062-ZOO-1999, además del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud dentro de los artículos 121-126 del título séptimo de la Investigación que incluye a la utilización de animales de experimentación.

Material

La materia prima empleada para la extracción de aceite fue la semilla del fruto de la granada obtenida del municipio de Tasquillo en el estado de Hidalgo, mientras que el modelo animal de ratones macho CD-1 fue proporcionado por el Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) ubicado en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa).

Métodos

6.2 Extracción del aceite de semilla de granada

La función es recircular los vapores del disolvente condensados, arrastrando los elementos grasos de la materia prima contenido dentro de un cartucho poroso, se fundamenta en determinar las características de la solubilidad de la fracción lipídica perteneciente a la biología de la materia prima en estudio (95,96).

Para comenzar fueron colocados 50 mg. De muestra sólida finamente pulverizada de semilla de granada en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet, posteriormente se calentaron 400 ml. De disolvente etanol, situado en el matraz, se condensaron sus vapores cayendo gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra extrayendo los lípidos. Este proceso fue repetido hasta que se completó la extracción de los lípidos de la muestra y se concentran en el disolvente en un tiempo aproximado de 4 horas. Por último, la extracción final obtenida en el matraz fue sometida a extracción del disolvente mediante Rotavapor.

6.3 Determinación de fenoles totales en ASG

Se realizó la determinación total de fenoles en ASG de semillas de 5 variedades de granada provenientes del estado de Hidalgo: ácida(A), dulce(D), roja©, verde(V), rojiverde (RV) y se hizo una mezcla de todas(C) por método de Follin-Ciocalteu, haciendo una curva estándar de ácido gálico. El método de Folin-Ciocalteu que tiene base en la capacidad de los fenoles contenidos en el aceite de semilla de granada para reaccionar con los agentes oxidantes. El reactivo contiene dos sustancias que reaccionan con cualquier tipo de fenol las cuales son el molibdato y el tungstato sódico. El reactivo Folin es de color amarillo el cual cuando oxida los fenolatos da lugar a un complejo de color azul (97). Los aceites fueron analizados por triplicado.

Se comenzó con la preparación de muestras por medio de dilución 1:25 colocando 40 μ L. de muestra y 960 μ L. de etanol o agua, según sea el tipo de muestra para analizar, posteriormente se preparó carbonato de sodio (NaCO_3) al 7.5% en 10 ml. De agua desionizada en matraz aforado, como siguiente se preparó la curva de ácido gálico usando 2mg de ácido gálico en 5ml de agua en matraz aforado, posteriormente se colocaron 6 tubos Eppendorf con diluciones diferentes de ácido gálico con etanol y agua desionizada según fuera la muestra concentración de 0 a 1ml con concentraciones diferentes de ácido gálico (0, 80, 160, 240, 320 y 400 μ L), se realizó la preparación del reactivo Folin-Ciocalteu colocando 1ml de Folin en 9 ml. De agua en matraz aforado, una vez ya preparado todo se colocó en tubos eppendorf 500 μ L. de preparación de Folin, 400 μ L. de NaCO_3 y 100 μ L. de muestra, así como también la curva colocando los mismos elementos tomando el lugar la curva de la muestra y llevarlos a vortex y después se llevaron a oscuridad durante 30 minutos, para finalizar se colocó en una micro placa de lectura de 96 pozos 200 μ L. de cada muestra por triplicado y se determinó su absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido (mgEAG/g).

6.4 Evaluación de la actividad antirradical por método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH')

El método fue propuesto por Blois en 1958, demostrando la capacidad que tiene el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH') para poder aceptar un átomo de hidrógeno. En el momento de la reacción del DPPH' con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno el color violeta puede disminuir o desaparecer determinando los parámetros de las propiedades antioxidantes (98,99).

Este método funcionó para determinación en aceite y en tejido, realizando la preparación de muestras por medio de dilución 1:25, siendo que para la determinación en aceite se colocaron 40 µL. de muestra y 960 µL. de etanol y para el tejido se realizó primero el homogenizado colocando 20 mg. De tejido en 1 ml de buffer de lisis, posteriormente se tomaron 40 µL. de muestra y 960 µL. de agua y se colocaron en tubos Eppendorf.

Fue realizada la preparación del radical DPPH' colocando 0.8 gr. De radical por cada 10 ml. De etanol o agua según sea la muestra, para la preparación de la curva de Trolox se usó 1mg de Trolox en 10 ml. De agua o etanol según sea la muestra en matraz aforado, posteriormente se colocó en 6 tubos Eppendorf diluciones diferentes de Trolox con etanol o agua desionizada según sea la muestra siendo la concentración de 0 a 1ml con concentraciones diferentes de Trolox (0, 80, 160, 240, 320 y 400 µL.), posteriormente se colocó en tubos Eppendorf 100 µL. de muestra y 900 µL. de preparación de DPPH', así como también la curva colocando los mismos elementos tomando el lugar la curva de la muestra y llevarlos a vortex, al término del mismo se llevaron a oscuridad durante 60 minutos. Para finalizar se colocó en una microplaca de lectura de 96 pozos 200 µL. de cada muestra por triplicado y se llevó a espectrofotómetro a lectura de 520 nm. Y los resultados fueron expresados en miligramos de capacidad antioxidante equivalente al trolox por gramo (mgTEAC/g).

6.5 Evaluación de la actividad antirradical por método 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt) ABTS^{•+}

El ensayo con radical ABTS^{•+} se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm. Y se genera por una reacción de oxidación del ABTS^{•+} con persulfato de potasio. (100,101) Los resultados obtenidos en esta prueba muestran la comparación de la actividad antioxidante del ASG de los distintos tipos de aceite para atrapar el radical catiónico, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 15 minutos de reacción, a una longitud de onda de 734 nm. El valor de absorbancia se comparó con la curva de referencia construida con Trolox como estándar y los resultados se expresan como valores TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Para comenzar se preparó el radical ABTS^{•+} 12 horas antes del inicio de los análisis colocando 0.003gr de Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) en 5ml de agua desionizada, posteriormente se tomó 1 ml de la preparación y se colocó en un tubo Eppendorf y se agregó 4 mg. De radical ABTS^{•+} e inmediatamente se agitó para guardarlo en oscuridad durante 12 horas. Este método de igual manera el DPPH[•] funcionó para determinación en aceite, realizando la preparación de muestras de la misma manera y en mismas cantidades que las realizadas para DPPH[•] por medio de dilución 1:2. Al término de las 12 horas de reposo se preparó el radical para lectura agregando agua o etanol dependiendo de la muestra y llevándolo a lectura en espectrofotómetro en micro placa de lectura hasta obtener una absorbancia entre .690 y .710nm., se realizó la preparación de la curva Trolox usando 1mg de Trolox en 10ml de agua o etanol en matraz aforado, posteriormente se colocó en 6 tubos Eppendorf diluciones diferentes de Trolox con etanol o agua desionizada según sea la muestra siendo la concentración de 0 a 1 ml. Con concentraciones diferentes de Trolox (0, 80, 160, 240, 320 y 400 μ L.), después se colocó en tubos Eppendorf 100 μ L. de muestra y 900 μ L. de preparación de ABTS^{•+}, así como también la curva colocando los mismos elementos tomando el lugar la curva de la muestra y llevarlos a vortex y llevados a oscuridad inmediatamente durante 15 minutos y al finalizar se colocaron en una micro placa de lectura

de 96 pozos 200 μL . de cada muestra por triplicado y se llevó a espectrofotómetro a lectura de 734 nm. Y los resultados fueron expresados en miligramos de capacidad antioxidante equivalente al trolox por gramo (mgTEAC/g).

6.6 Inducción de estrés oxidativo en ratones macho CD-1

La inducción de la diabetes se realizó a través de la prueba de nado forzado haciendo uso del método Porsolt (102,103), siendo aplicada la prueba de manera diaria con una duración de 10 minutos por ratón durante los 30 y 60 días que duró el experimento.

El tanque utilizado para la prueba de nado forzado, consistió en un cilindro de acrílico de 45 cm de altura; con un diámetro de 30 cm conteniendo agua a una temperatura de 21°C hasta un nivel de 32 cm para que el animal no alcance a tocar con la cola el fondo del tanque (102).

Dos minutos antes del inicio del test se administró oralmente a cada uno de los ratones con alguno de los tratamientos señalados. Se ubicó individualmente a cada ratón en el centro del tanque y se registró su conducta durante diez minutos. Una vez terminada la prueba cada ratón fue retirado del tanque y colocado en recipiente donde se encontraban toallas y calentamiento con luz para su pronto secado.

6.8 Determinación de lipoperoxidación por método del Ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El malondialdehído (MDA), uno de los productos de ruptura de los hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, se utiliza como un indicador conveniente para la determinación de la reacción de peroxidación de lípidos (104). La reacción de MDA con el ácido tiobarbitúrico produce un compuesto de coloración roja a cuya absorbancia se determina a 532 nm.

El ensayo se realizó mediante kit QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100), Fueron preparadas las muestras de tejidos mediante el homogenizado colocando 20 mg. De tejido en 200 μL . de buffer fosfato salino (PBS), una vez ya preparadas se tomó 100 μL . de tejido homogenizado de cada muestra en un tubo eppendorf y para plasma se utilizó 100 μL . de cada muestra, después se adiciono 200 μL . de TCA al 10% a cada muestra, posteriormente fueron incubados durante 5 minutos en hielo. Cada muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 14,000 rpm., al término de la centrifugación fueron transferidos 200 μL . de sobrenadante de cada muestra a nuevos eppendorf. Para la prueba colorimétrica se usó un

termoblock ajustando la temperatura a 100°C. Fueron creados los estándares primero, centrifugando brevemente el tubo estándar para sedimentar cualquier residuo de MDA que pudo estar atascado en la tapa o en los lados del tubo. Posteriormente se usaron 4 µL. De MDA a 6M con 2396 µL. De agua, obteniendo finalmente MDA al 10 mM.. Luego, se preparó 30 µM. De MDA mezclando 3µL. De MDA 10 mM. Con 997 µL. De agua. Las diluciones de los estándares fueron establecidas de la siguiente manera:

Tabla 6 Diluciones para preparación de estándares de prueba TBARS

No.	30µM MDA(µL) + H ₂ O(µL)	Volumen final (µL)	Concentración final de MDA (µM)
1	300 + 0	300	30.0
2	180 + 120	300	18.0
3	90 + 210	300	9.0
4	0 + 300	300	0.0

Fueron transferidos 200 µL. de cada estándar en tubos eppendorf diferentes. Para la reacción colorimétrica, a cada muestra y estándar fue agregado 200µL de reactivo TBA llevándolo a vortex e inmediatamente fueron incubados los tubos en termoblock a 100°C durante 60 minutos, al término de la incubación los tubos se colocaron a temperatura normal y llevados a vortex brevemente. Finalmente se cargó 100 µL de cada muestra por duplicado desde cada tubo hasta los pozos de una micro placa de 96 pozos llevándola a lectura de espectrofotómetro de 535 nm. Para el cálculo de los resultados fue restado el valor de intensidad de fluorescencia en blanco de todos los estándares y valores de muestra. Se calculo la concentración de TBARS de la muestra de la siguiente manera:

$$TBARS = \frac{R_{muestra} - R_{blanco}}{Curva (\mu M - 1)} = (\mu M \text{ de MDA})$$

6.9 Determinación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

La enzima SOD, cataliza la dismutación del anión superóxido (O₂⁻) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, esta una de las enzimas antioxidantes más importantes. La tasa de reducción con O₂ está relacionada linealmente con la actividad xantina oxidasa (XO), y es inhibida por SOD, por lo que la IC₅₀ (50% de actividad inhibidora de SOD o materiales similares a SOD) puede ser determinada por un método colorimétrico(105,106).

Se agregó 20 µL. De solución de muestra a cada pozo de microplaca de lectura previamente homogenizada, así como también en el blanco 2, después fue agregado 20 µL. De agua destilada al blanco 1 y al blanco 3 y se colocó 200 µL. De solución de trabajo WST a cada pozo, posteriormente se llevó a proceso de agitación mediante vortex brevemente, inmediatamente fue agregado 20 µL. De buffer de dilución a cada espacio del blanco 2 y del blanco 3. Se adiciona 20µL. De solución de trabajo enzimática a cada muestra también en el blanco 1 y después llevado a vortex, una vez ya lista la placa de lectura se lleva a incubación a 37 ° C durante 20 min.,

Pasados los 20 minutos de incubación se llevó a lectura mediante espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad de SOD usando la siguiente ecuación:

Actividad SOD (tasa de inhibición%)

$$\frac{\{[(\text{Blanco 1} - \text{Blanco 3}) - (\text{Muestra} - \text{Blanco 2})] / (\text{Blanco 1} - \text{Blanco 3})\} \times 100}{}$$

En la siguiente tabla se muestra la manera en la cual deben de ser cargados los pozos de la micro placa de lectura de cada muestra y cada blanco:

Tabla 7. Preparación de tubos para el análisis de actividad de SOD

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
	μL	μL	μL	μL
Muestra	20		20	
Agua		20		20
Solución de trabajo WST	200	200	200	200
Solución de enzima de trabajo	20	20		
Buffer de dilución			20	20

6.10 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Para el análisis estadístico de los datos, las medias de los grupos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de prueba de Bonferroni post hoc para la comparación múltiple, empleando un paquete estadístico (GraphPad software, 2012, versión 6.0, San Diego California, U.S.A.). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VII. Resultados

7.1 Evaluación del contenido total de fenoles y actividad antirradical del aceite de semilla de granada

Se obtuvo un rendimiento de 10 ml de aceite por cada 20 mg de semilla pulverizada.

7.1.1 Determinación del contenido total de polifenoles de diferentes variedades de ASG

En la **Figura 5** se puede observar que el mayor contenido de polifenoles fue encontrado en R(8340.3 μ gEAG/mL) y V(8306.2 μ gEAG/mL) y en cuanto a C el cual fue el aceite usado para la administración de los grupos de experimentación presento un contenido total de 6914.2053 μ gEAG/mL.

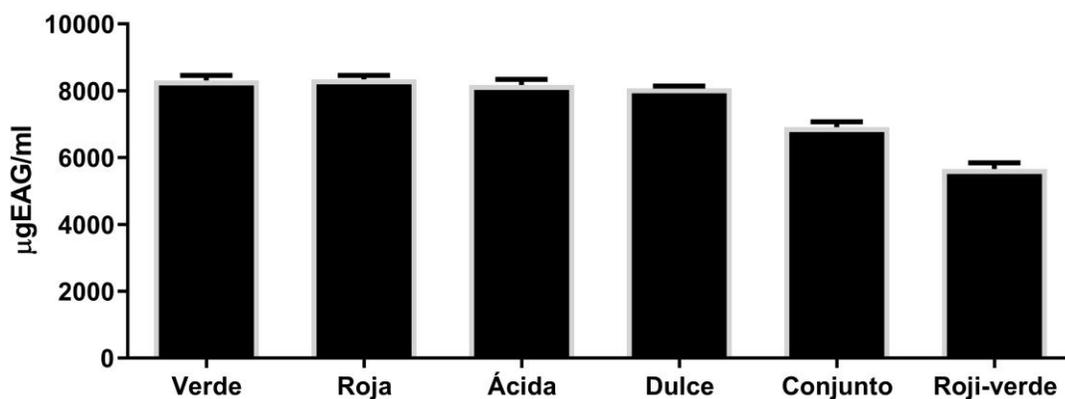


Figura 3 Contenido total de polifenoles en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada.

7.1.2 Actividad antirradical mediante prueba ABTS^{•+} en ASG

El mayor porcentaje de inhibición fue la semilla rojiverde con un total de 68.32% seguido por el aceite del conjunto de semillas con un 65%, después el aceite de semilla de granada verde con 49.57%, seguida del ASG ácida con 46.68%, en los últimos 2 se encontró el ASG roja y dulce con 27.23% y 22.77% respectivamente.

En la **Figura 6** se pueden observar los resultados de los diferentes tipos de aceites mostrando que los aceites de dulce y roja tuvieron la mayor capacidad antioxidante mediante la prueba ABTS^{•+}, con 4366.8 μ gTEAC/mL y 4113.8 μ gTEAC/mL respectivamente mientras que el conjunto presento el valor de 1968.827 μ gTEAC/mL siendo este último el usado para tratamiento experimental.

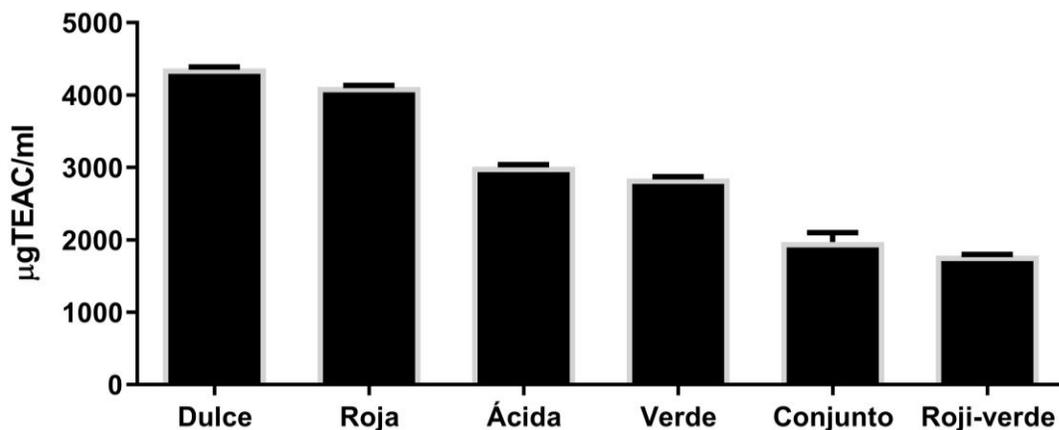


Figura 4. Capacidad antioxidante mediante prueba de radical ABTS^{•+} en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada

7.1.3 Actividad antirradical mediante método DPPH[•] en ASG.

Fue evaluada la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH[•], por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 60 minutos de reacción a una longitud de onda de 517nm. El valor de absorbancia se comparó con la curva de referencia construida con Trolox como estándar y los resultados se expresaron como valores TEAC.

De igual manera para la evaluación de este método fue usada un ANOVA de dos vías con test de comparación múltiple con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados finales de la evaluación dieron como resultado que el ASG dulce produjo el mayor porcentaje de inhibición con un total de 77.65%, el siguiente aceite con mayor porcentaje fue el de la granada roja con 68.69%, posteriormente el ASG ácida con 56.60%, ASG verde con 56.09%, el siguiente fue el ASG roji-verde con el 30.05% y por último el ASG del conjunto de semillas con el 28.09%.

En la **Figura 7** se pueden observar los resultados de los diferentes tipos de aceites mostrando que los aceites dulce y roja tuvieron la mayor capacidad antioxidante 7132.37µgTEAC/mL y 6000.9µgTEAC/mL, respectivamente mientras que el conjunto obtuvo un total de 2042.628 µgTEAC/mL siendo este último el usado para tratamiento de animales.

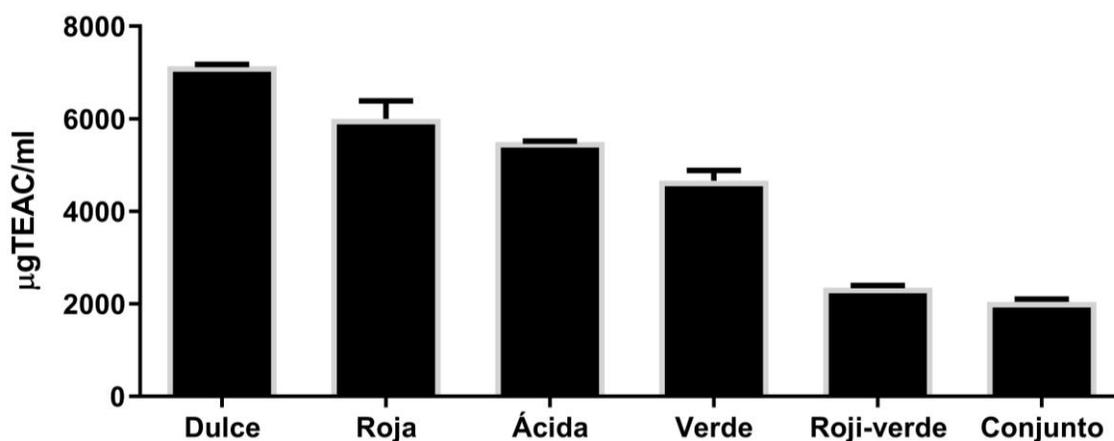


Figura 5. Capacidad antioxidante mediante prueba de DPPH[•] en los diferentes tipos de aceite de semilla de granada

7.2 Efecto de la capacidad antioxidante del ASG en órganos mediante pruebas ABTS^{•+}, DPPH[•], SOD y Ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se determinó actividad antioxidante del ASG por los métodos ABTS^{•+}, DPPH[•], SOD y MDA mediante la extracción de órganos (cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón, músculo) y en plasma, de los grupos basal, Control 1 (consumo de aceite sin ejercicio), Control 2 (aplicación de ejercicio sin consumo de aceite), grupos experimentales A (dosis de 347.71 µgEAG/ml/día/30 o 60 días), B (dosis de 691.42 µg EAG/ml/30 o 60 días) y C (dosis de 1,382 µgEAG/ml/día/30 o 60 días).

7.2.1 Determinación de la actividad antirradical del ASG en órganos por método ABTS^{•+}

Los resultados obtenidos en esta prueba muestran la comparación de la actividad antioxidante del ASG en los distintos órganos con un tiempo de 30 y 60 días de tratamiento para atrapar el radical catiónico, por medio de la disminución en la absorbancia.

El valor de absorbancia se comparó con la curva de referencia construida con Trolox como estándar y los resultados se expresan como valores TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), así como también mediante el porcentaje de inhibición.

Para la evaluación de este método se utilizó un ANOVA de dos vías con test de comparación múltiple con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de cada órgano en comparación con los demás grupos de trabajo.

En la **Figura 8** se puede observar los diferentes órganos y la actividad antioxidante del ASG aumento en los grupos con tratamiento de ASG en comparación con el grupo basal y el grupo control 2 de ejercicio sin consumo de aceite donde no se observó una diferencia estadísticamente significativa, así mismo los diferentes grupos experimentales mostraron una diferencia estadísticamente significativa siendo los grupos con tratamiento de 1,382 μ gEAG/ml/día durante 30 y 60 días los que mostraron mayor aumento de la actividad antioxidante para el primer mes el órgano que mostró mayor actividad fue pulmón con un total de 1935.119 μ gTEAC/mL y para los 60 días fue corazón con 1646.425 μ gTEAC/ml, mientras que la actividad antioxidante más baja para los grupos experimentales se presentó en pulmón de dosis de 345.71 μ gEAG/ml con un total de 202.976 μ gTEAC/ml presentando cada uno diferencia significativa con respecto al grupo basal y control 2 de ejercicio sin consumo de aceite.

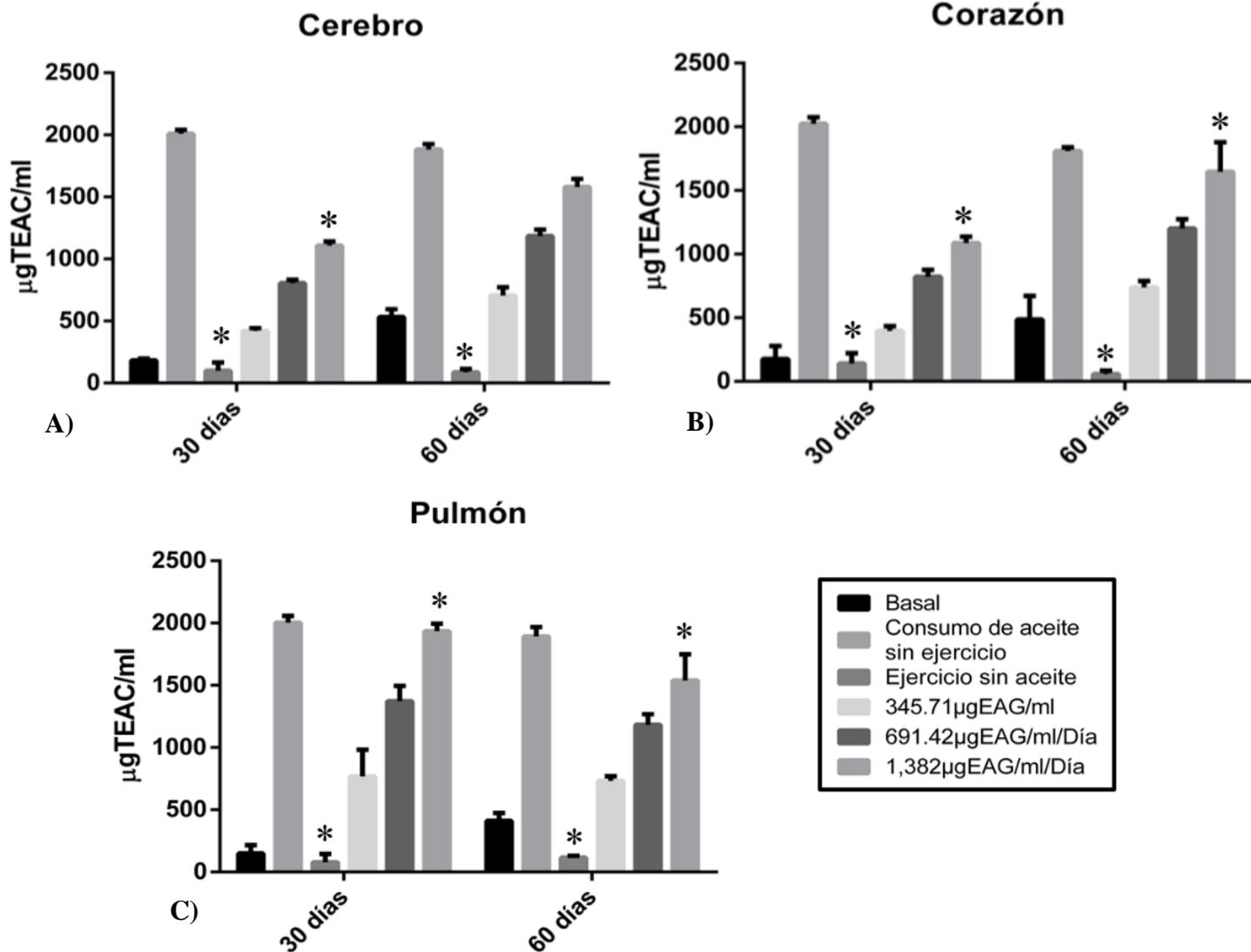


Figura 6. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba ABTS⁺

A) Resultados de inhibición del ABTS⁺ por ASG en cerebro, B) Resultados de inhibición del ABTS⁺ por ASG en corazón y C) Resultados de inhibición del ABTS⁺ por ASG en pulmón. En la **Tabla 8** se muestra el resultado final fue expresado como el porcentaje de inhibición, mostrando de esta manera que el tratamiento con mayor actividad antirradical fue el establecido en pulmón de 30 días de tratamiento con el tratamiento de 1,382 µgEAG/ml/día con un 35.89% y también músculo del mismo tratamiento con 34.08%, para el tratamiento de 691.42 µgEAG/ml/día el mayor porcentaje lo presentó músculo de 30 días con un total de 25.55% y por último en el tratamiento de 345.71 µgEAG/ml.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición del ASG en tejidos mediante método ABTS⁺⁺

	% de inhibición											
	Cerebro		Corazón		Pulmón		Hígado		Músculo		Plasma	
	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días
Basal	4.48	10.77	4.37	9.92	3.89	8.59	3.95	9.39	3.68	10.99	4.16	13.07
Consumo de aceite sin ejercicio	37.23	34.93	37.49	33.65	37.12	35.15	35.68	34.99	37.07	33.87	37.44	35.25
Ejercicio sin aceite	2.99	2.77	3.73	2.24	2.61	3.31	2.88	2.61	2.61	2.45	3.36	3.15
345.71 µgEAG/ml/día	8.75	13.87	8.32	14.45	14.99	14.35	4.85	14.03	10.77	13.33	5.28	13.44
691.42µgEAG/ml/día	15.63	22.45	15.95	22.72	25.81	22.40	9.65	23.09	25.55	22.51	9.60	22.03
1,382µgEAG/ml/día	21.07	29.55	20.69	30.72	35.89	28.80	16.75	26.67	34.08	25.07	17.97	26.67

7.2.2 Determinación de la actividad antirradical del ASG en órganos por método

2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•])

Fue evaluada la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH[•], por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 60 minutos de reacción a una longitud de onda de 517 nm El valor de absorbancia se comparó con la curva de referencia construida con Trolox como estándar y los resultados se expresan como valores TEAC.

Los resultados obtenidos en esta prueba muestran la comparación de la actividad antioxidante del ASG en los distintos órganos con un tiempo de 30 y 60 días de tratamiento. De igual manera para la evaluación de este método se utilizó un ANOVA de dos vías con test de comparación múltiple con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9** donde se observa la actividad antioxidante que en esta prueba son menores que los obtenidos en la prueba de ABTS⁺⁺, pero se muestra el aumento de la capacidad antioxidante de los grupos experimentales y grupo control 1 Consumo de aceite sin ejercicio mientras que en el grupo Control 2 Ejercicio sin consumo de aceite simplemente se observa que el radical DPPH[•] presentó niveles elevados, hablando entre los órganos y los grupos de tratamiento, se mostró diferencia significativa de $p < 0.05$ entre los grupos basales y los tres grupos experimentales de cada tratamiento, siendo así el mayor resultado de actividad antioxidante en el grupo de 30 días por pulmón con un total de 2049.038µgTEAC/mL y para los 60 días el órganos que presento una mayor actividad antioxidante fue el corazón con un total de 1789.423µgTEAC/mL,

En este sentido se entiende que el tratamiento con ASG ayuda a la protección con el estrés oxidativo producido en el ejercicio, en las siguientes figuras se muestran de manera más detallada las maneras en las cuales actuó el ASG dentro de la protección de estrés en los diferentes órganos.

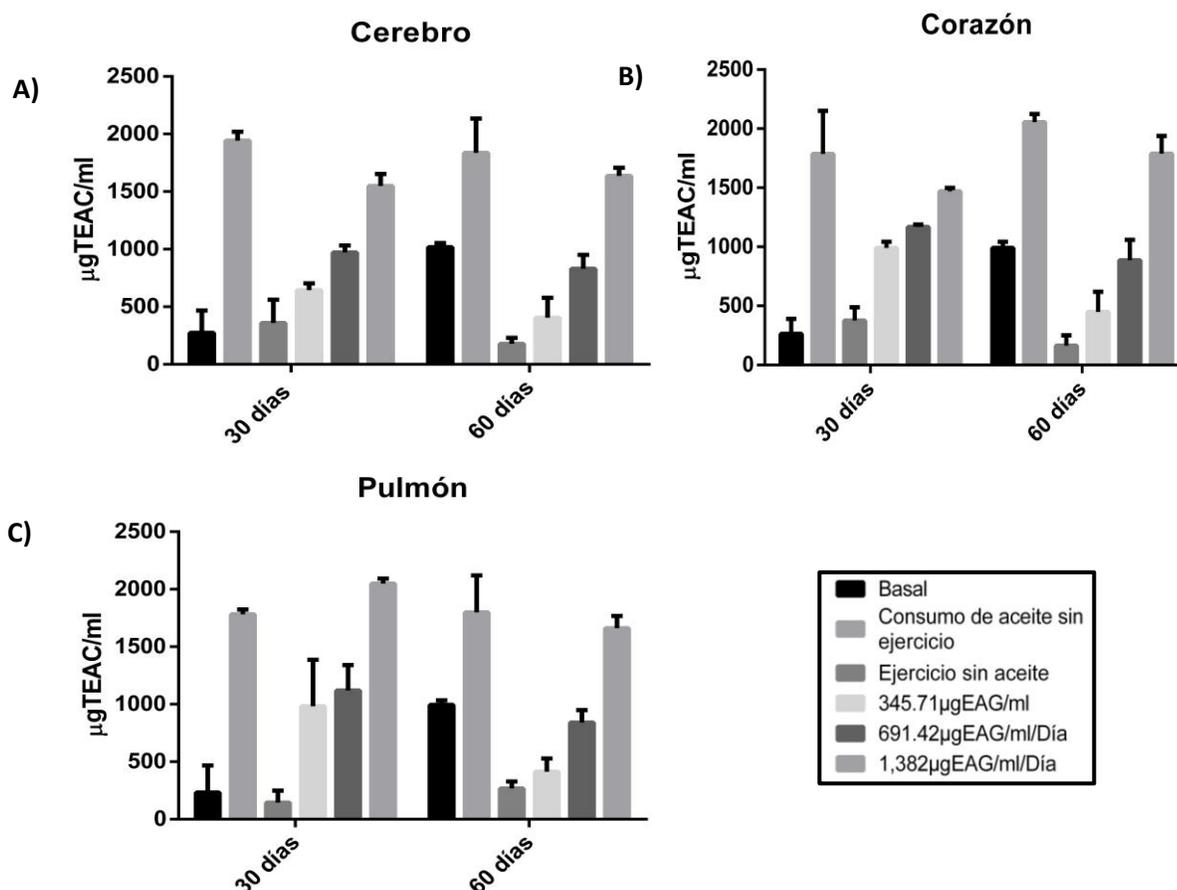


Figura 7. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba DPPH'

A) Resultados de inhibición del DPPH' por ASG en cerebro; B) Resultados de inhibición del DPPH' por ASG en corazón, C) Resultados de la inhibición del DPPH' por ASG en pulmón.

La interpretación final de los resultados de la prueba es mediante el porcentaje de inhibición, como resultado final los mayores porcentajes lo presentó el pulmón de tratamiento de 1,382 μgEAG/ml/día de 30 días con 21.08% de inhibición, para el tratamiento de

691.42µgEAG/ml/día el corazón presentó el mayor porcentaje con 11.94% y finalmente para el tratamiento de 345.71µgEAG/ml/día tanto corazón como el músculo obtuvieron los mayores porcentajes con 10.11%, en la Tabla 10 se muestran los valores finales del porcentaje de inhibición.

Tabla 9. Porcentajes de inhibición del ASG en tejidos mediante método DPPH´

	% de inhibición											
	Cerebro		Corazón		Pulmón		Hígado		Músculo		Plasma	
	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días
Basal	2.66	10.38	2.56	10.11	2.23	10.14	2.89	12.20	2.79	10.11	2.29	10.34
Consumo de aceite sin ejercicio	19.99	18.99	18.36	21.15	18.32	18.49	19.45	18.82	16.86	17.43	19.62	16.59
Ejercicio sin aceite	3.56	1.66	3.72	1.53	1.33	2.59	1.06	2.19	2.89	3.23	1.73	2.86
345.71 µgEAG/ml/día	6.52	4.02	10.11	4.49	10.01	4.12	1.20	3.69	10.11	4.06	5.02	5.09
691.42µgEAG/ml/día	9.91	8.45	11.94	9.01	11.44	8.55	3.06	7.52	10.58	8.65	7.42	10.48
1,382µgEAG/ml/día	15.90	16.79	15.06	18.39	21.08	17.06	4.06	18.06	15.23	16.69	11.03	16.79

7.2.3 Capacidad antioxidante del ASG en órganos mediante análisis de la actividad de la enzima SOD

La actividad de SOD fue medida a través de la utilización del kit 19160 SOD determination de la empresa SIGMA-ALDRICH. El fundamento del método se basa en la utilización de xantina y xantina oxidasa para generar anión superóxido ($O_2 \cdot^-$), el cual reacciona con el reactivo 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-cloruro de 5-feniltetrazolium (INT) y forma un complejo rojo detectable a 420 nm. La actividad de SOD fue medida a través del porcentaje de inhibición de esta reacción.

De igual manera para la evaluación de este método se utilizó un ANOVA de dos vías con test de comparación múltiple con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los niveles de inhibición de la SOD al término del experimento de 30 y 60 días mostraron un cambio significativo entre cada uno de los grupos de acuerdo al órgano que se analizó, mostrando de manera general que conforme a los días de experimentación pasaron los porcentajes de actividad de la SOD en los diferentes grupos experimentales, de acuerdo a cada órgano.

Los niveles de inhibición de la SOD de cada uno de los grupos tratados con ASG durante 30 y 60 días, se muestran en la tabla 10.

Tabla 10 Porcentaje de inhibición de enzima SOD al termino de 30 y 60 días de tratamiento.

	% de inhibición											
	Cerebro		Corazón		Pulmón		Hígado		Músculo		Plasma	
	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días
Basal	92.24	87.99	90.49	89.91	92.99	85.99	88.24	88.16	90.41	88.66	86.49	87.49
Consumo de aceite sin ejercicio	79.90	79.90	83.40	77.06	77.15	81.82	74.89	66.47	82.15	86.24	77.81	70.73
Ejercicio sin aceite	39.20	35.03	38.87	32.19	36.36	33.86	36.61	33.03	39.78	34.28	38.20	34.61
345.71 µgEAG/ml/día	43.04	37.20	48.87	45.37	38.78	36.11	37.70	35.61	47.71	37.78	40.95	38.45
691.42µgEAG/ml/día	56.63	42.45	56.96	51.46	43.20	40.53	40.62	38.12	55.46	48.79	45.20	52.96
1,382µgEAG/ml/día	64.47	47.21	66.56	58.22	64.05	45.04	42.62	41.12	63.39	66.56	48.29	50.69

Se muestran los valores de inhibición por cada órgano comparado con cada una de las pruebas.

Los resultados obtenidos muestran que el consumo de ASG con la dosis de 1,382µgEAG/ml/día ayuda a disminuir la inhibición de SOD muestra diferencia significativa sobre los valores basales y control.

En la figura 10 se muestran en forma de gráficos la manera en la cual se presentó la inhibición de SOD al termino de 30 días de tratamiento.

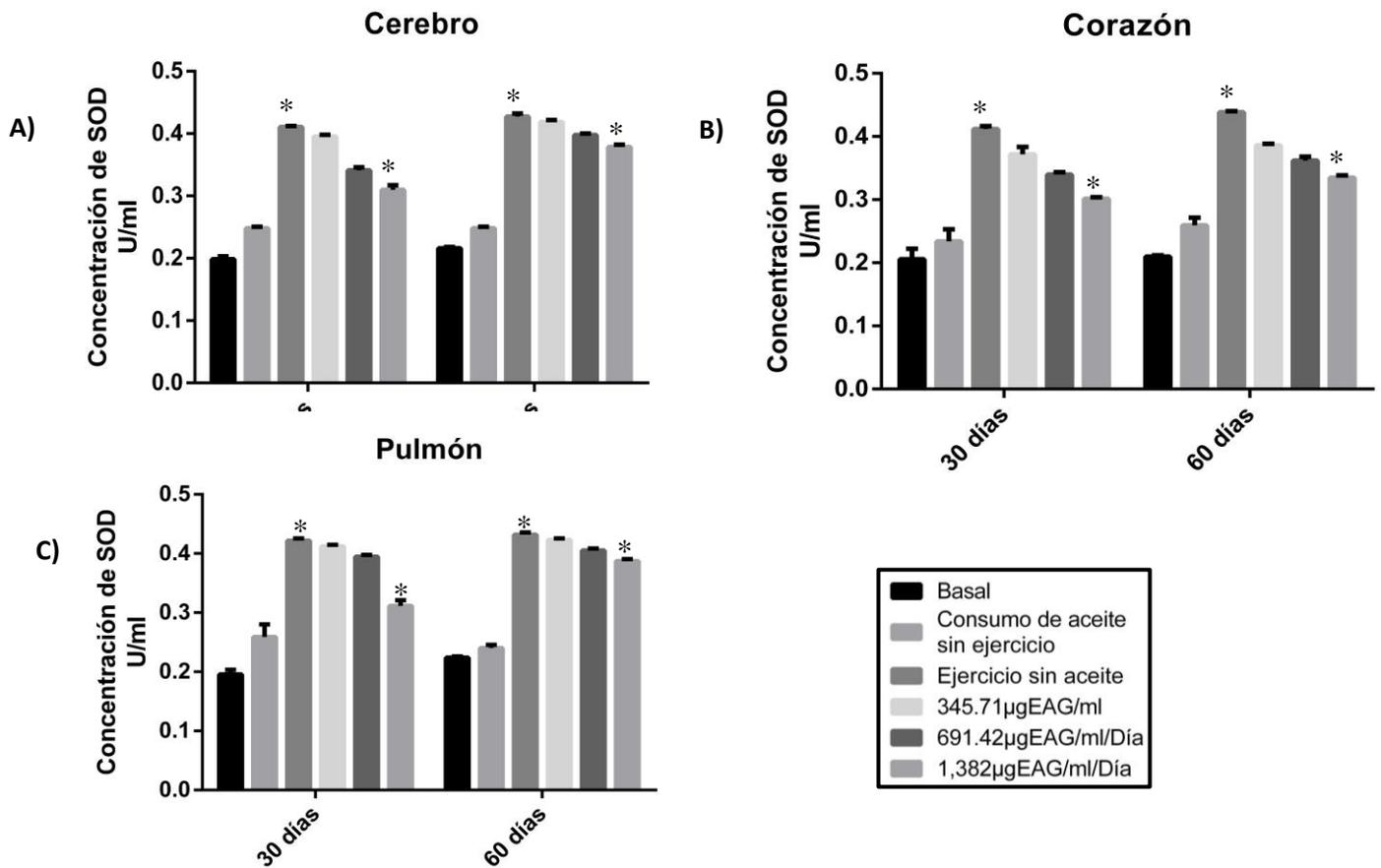


Figura 8. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba SOD.

A) Porcentaje de inhibición de la SOD del ASG en cerebro, **B** Porcentaje de inhibición de la SOD del ASG en corazón y **C)** Porcentaje de inhibición de la SOD del ASG en pulmón,

7.2.4 Determinación de daño oxidativo en membranas del ASG por el método de TBARS

La peroxidación de lípidos es un marcador de daño oxidativo.

En la Figura 12, se presentan las concentraciones de malondialdehído (MDA) en los grupos de durante 30 y 60 días de tratamiento. Para la evaluación de este método se utilizó un ANOVA de dos vías con test de comparación múltiple con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados mostrados por la prueba muestran en todos los órganos una disminución del MDA conforme al aumento aumentando las dosis los resultados muestran diferencia

significativa entre los grupos basal y experimentales, siendo pulmón el órgano que presentó la mayor protección contra la lipoperoxidación obteniendo un valor de $0.058\mu\text{M}$ MDA para los 30 días al igual que para el tratamiento de 60 días obteniendo el mismo resultado de $0.058\mu\text{M}$ MDA, mostrando que relativamente no existe diferencia entre tratamiento de 30 y 60 días pues la protección sigue siendo la misma, mientras que la relación entre los grupos basales y control 2 ejercicio sin aceite no muestran diferencia significativa. En la figura 11 se muestran de manera general los resultados por medio de gráficos.

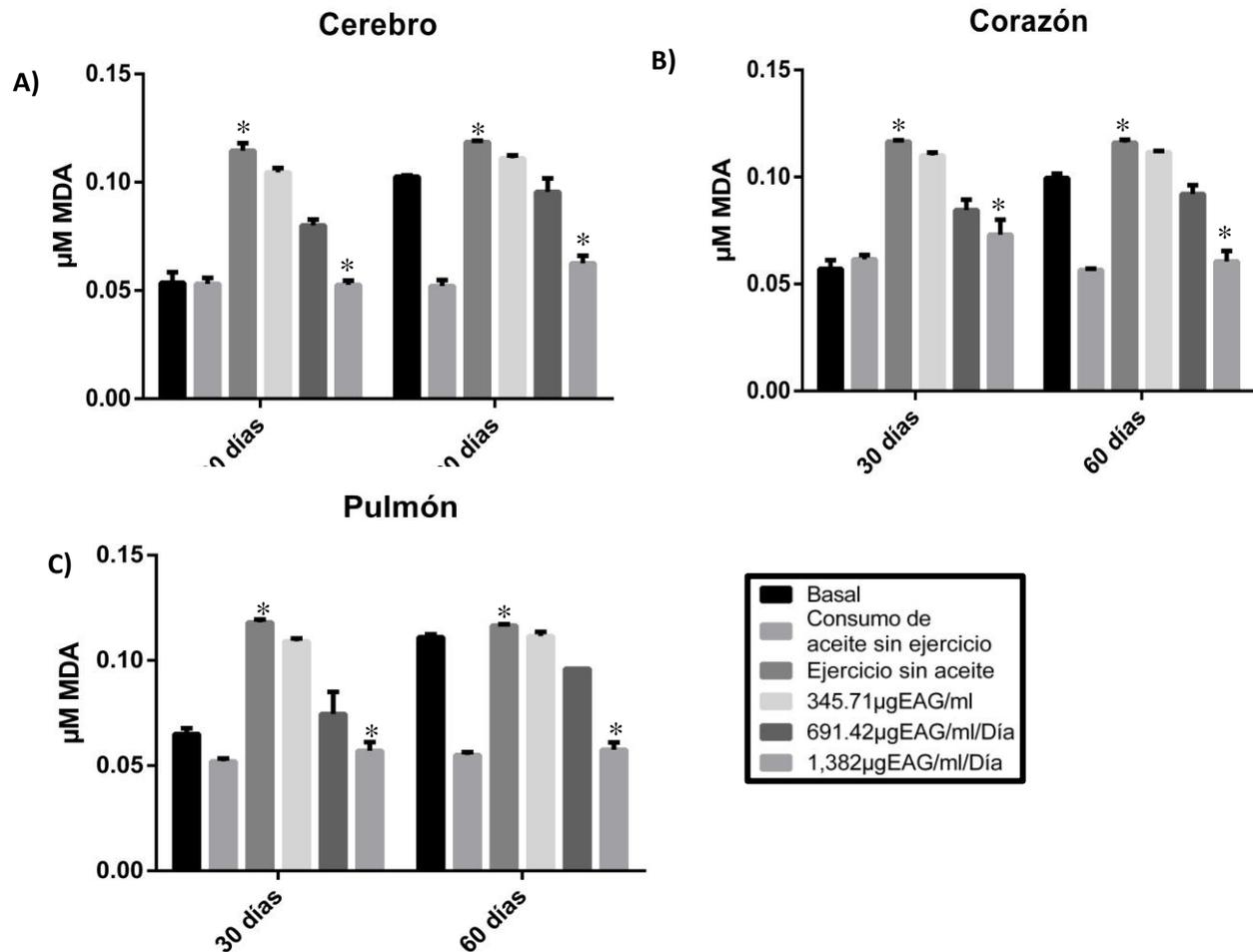


Figura 9. Resultados obtenidos por órganos al final de los 30 y 60 días de tratamiento en prueba TBARS.

A) Contenido de MDA en cerebro, B) Contenido de MDA en corazón y C) Contenido de MDA en pulmón.

VIII. Discusión

El estrés oxidativo es un suceso que se encuentra presente cuando se habla de realizar actividad física, ejercicio físico y deporte. El cuerpo humano al realizar ejercicio genera estrés oxidativo debido al aumento del consumo de oxígeno, el cual en cierto nivel es necesario para la adaptación del organismo al ejercicio, pero la alta generación lleva a sobrepasar las barreras antioxidantes y producir lesiones a nivel celular en distintos órganos. Con base en lo anterior, dentro de la dieta diaria existen alimentos que aportan antioxidantes como parte de sus propiedades nutricionales, la nutrición es un componente muy importante para el correcto desarrollo de la actividad física es por eso que se buscan los alimentos o suplementos con mayor aporte de antioxidantes cuando se decide comenzar a realizar ejercicio para prevenir complicaciones producidas por el estrés oxidativo.(107) En esta investigación se extrajo el aceite de semilla de granada, donde los resultados mostraron una buena efectividad por parte del ASG frente a las EROS en diferentes tejidos, en diversos estudios se han mostrado resultados beneficiosos por parte de diferentes tipos de aceites ante las mismas EROS tal como lo describe Yang y cols (108), donde evaluaron la capacidad antioxidante del aceite de tortuga chino de caparazón blando en el rendimiento deportivo de ratas tomando en cuenta como parámetro la evaluación de la enzima SOD mostrando que al consumo del aceite se elevaron los niveles de SOD, de igual manera Lee y cols.(109) llevaron a cabo la evaluación del estrés oxidativo usando como biomarcador del mismo la evaluación del MDA usando un aceite de pescado y como resultado los niveles se vieron reducidos promoviendo mayor protección a los tejidos, todo lo anterior hace notar el alto valor biológico que poseen los aceites para una protección en contra del estrés oxidativo.

8.1 Aceite de semilla de granada.

El aceite obtenido de la semilla de granada está considerado como un poderoso agente de beneficio para la salud gracias a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antihipertensivo, antiinflamatorio y también con cualidades antimicrobianas, todo esto gracias a sus componentes de ácidos grasos que son aproximadamente de 65-85% contenido del aceite y el contenido restante lo conforman el contenido de fenoles y lípidos polares.(110)

8.1.1 Los diferentes tipos de ASG presentan diferentes cantidades de contenidos totales de fenoles.

El objetivo de este estudio fue la evaluación del contenido total de fenoles totales de los seis diferentes tipos de granada producidas en el municipio de Tasquillo en el estado de Hidalgo. Los diferentes tipos de aceites de semilla de granada mostraron contenido total de fenoles diferentes siendo la granada roja la que mostró el mayor contenido en segundo lugar la granada verde, en tercer lugar, la granada ácida, en cuarto lugar, la granada dulce, en quinto lugar, el conjunto de granadas y por último la granada rojiverde. Resultados similares de Amri y cols.(111) evaluaron el contenido total de fenoles de aceite de semilla de granada procedentes de Túnez donde los resultados mostraron que el contenido de fenoles en el ASG que concuerda con los resultados de esta investigación, de igual manera un estudio realizado por Díaz (112) quien realizó la evaluación del contenido de fenoles de 3 tipos de granadas (dulce, ácida y wonderful) obteniendo resultados que se asemejan a los obtenidos en este estudio pues para la granada dulce se obtuvo un total de 7714.0µg EAG/mL y la granada ácida un total de 6123.10µg EAG/mL. Como comparación de contenido de fenoles en distintos aceites está el aceite de semilla de uva donde Juárez y cols.(113) obtuvo como resultado total de fenoles 8890µg EAG/mL, como otra comparación González(114) en su investigación realizó la evaluación del aceite de semilla de chía mostrando en sus resultados concentraciones mucho más bajas que el aceite de semilla de granada,

8.1.2 El ASG rojiverde y el conjunto presentaron mejor actividad antioxidante mediante la prueba ABTS^{•+}

Uno de los métodos para determinar la actividad antioxidante del aceite de semilla de granada fue el método del radical ABTS^{•+} el cual es uno de los más usados para la determinación de capacidad antioxidante por su sensibilidad, practicidad, rapidez y estabilidad. Los resultados obtenidos en esta prueba dan como resultado el porcentaje de inhibición del radical, los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el mayor porcentaje de inhibición fue la semilla rojiverde, posteriormente el aceite del conjunto de semillas, después el ASG verde, seguida del ASG, en quinto lugar, el ASG roja y por último el ASG dulce. En la investigación realizada por Mekni y cols.(115) analizó la actividad antioxidante de tres diferentes tipos de aceite de semilla de granada provenientes de diferentes lugares (Tounsi, Nabli y Gabsi) mostrando que los porcentajes de inhibición fueron para la proveniente de

Tounsi de 58.09%, para la proveniente de Nabli fue de 64.22% y por último para la proveniente de Gabsi fue del 66.4% siendo los resultados parecidos a los obtenidos en esta investigación. Otra investigación llevada a cabo por He y cols.(116) quienes analizaron el aceite de semilla de granada proveniente de la compañía Huiyuan Fruit Juice (Xinjiang, China) donde la extracción del aceite fue realizada con cuatro diferentes solventes(éter etílico, acetato de etilo y butanol) demostrando que dependiendo el solvente la actividad antirradical cambiara pues sus resultados mostraron que el extracto de butanol presento el mayor porcentaje de inhibición con un total de 99.80% mientras que el extracto con éter etílico presento el menor porcentaje de inhibición con 11.27%, mostrando que el solvente con el cual fue realizada esta investigación se encuentra en un punto medio de acuerdo al porcentaje de inhibición.

8.1.3 El ASG dulce y roja mostraron el mayor porcentaje de inhibición del radical

DPPH[•]

El segundo método para analizar la actividad antioxidante del ASG fue la prueba del radical DPPH[•], el cual se basa en la reducción de la absorbancia del radical donde el resultado se expresa por el porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el mayor porcentaje de inhibición lo obtuvo el ASG dulce con un total de 77.65%, posteriormente el ASG el siguiente aceite con mayor porcentaje fue el de la granada roja con 68.69%, el ASG ácida con 56.60%, ASG verde con 56.09%, el siguiente fue el ASG roji-verde con el 30.05% y por último el ASG del conjunto de semillas con el 28.09%. Tal y como fue demostrado en la investigación llevada a cabo por *Melo y cols* (117) quien realizo la caracterización y constituyentes del aceite de semilla de granada comprobando la actividad antioxidante mediante el método DPPH[•] obteniendo un porcentaje de inhibición del radical de 52.02%, concordando en otro resultado con *Díaz y cols.*(112) donde evaluó el ASG de dos variedades de granada siendo dulce y ácida y obteniendo como porcentaje de inhibición para el ASG dulce de 61.47% y ácida con 43.61%

8.2 Determinación de la actividad antioxidante del ASG en órganos mediante diferentes métodos

8.2.1 El ASG favoreció la disminución de la actividad radical ABTS^{•+} en diferentes órganos tratados con ejercicio

El tercer objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antirradical del ASG mediante el método ABTS^{•+} sobre cada uno de los tejidos analizados, los resultados obtenidos demostraron que el ASG pudo inhibir el radical en los tejidos siendo el pulmón de 30 días de tratamiento quien mostró el mayor porcentaje de inhibición con un 35.89%, pero de igual manera músculo obtuvo un porcentaje parecido con un total de 34.08%, en comparación con el potencial antioxidante del ASG Peng y cols.(118) quienes realizaron el análisis en diferentes tejidos en ratones sometidos a ejercicio de nado forzado durante 14 semanas 10 minutos por día usando Estigma de Maydis como dosis pre-ejercicio obteniendo como mayor resultado la inhibición del radical ABTS^{•+} en plasma con un total de 22.75%. Berzosa (119) llevo a cabo un estudio del daño oxidativo provocado por ejercicio físico agudo con dosis de melatonina evaluando el mismo método ABTS^{•+} en ratas de la raza Sprague-Dawley, obteniendo como resultado que la melatonina tuvo efecto antirradical principalmente en plasma con un total de 16% siendo este resultado menor a lo obtenido por el ASG evaluado en esta investigación y Katalinic y cols. (120) llevaron a cabo una investigación evaluando la capacidad antioxidante en tejidos de ratas mediante dos métodos siendo uno de ellos ABTS^{•+} en ratas Wistar tanto macho como hembras provocando estrés oxidativo mediante nado forzado mostrando que para ABTS^{•+} corazón e hígado obtuvieron los mejores resultados como porcentaje de inhibición con un total de 24.5% y 18.9% respectivamente

8.2.2 El potencial antioxidante del ASG redujo la actividad del radical DPPH[•] en órganos de ratones sometidos a nado forzado

Otra prueba llevada a cabo en la investigación fue la de identificar la actividad antirradical del ASG sobre los tejidos analizados mediante la prueba DPPH[•] obteniendo resultados que muestran dicha actividad dando como el mayor porcentaje de inhibición el pulmón de tratamiento de 1,382µgEAG/ml/día de 30 días con 21.08%. Una investigación llevada a cabo

por *Hao y cols.* (121) donde analizó los efectos sobre la capacidad de resistencia al ejercicio y antioxidante propiedades del astrágalo membranaceus polisacáridos usando ratones machos Kunming provocando estrés oxidativo por método de nado forzado y utilizando como método para determinar la actividad antirradical DPPH[•] obteniendo como resultado que en plasma el porcentaje de inhibición fue de 20.36% siendo este resultado el mayor porcentaje alcanzado, por otra partes una investigación realizada por *Peng y cols.*(122) donde el objetivo fue realizar la evaluación de seguridad, antioxidante *in vitro* e *in vivo* Actividad del extracto rico en flavonoides de Estigma de Maydis en ratones sometidos a prueba de nado forzado obteniendo como el mejor porcentaje de inhibición un total de 25.72% siendo esto mayor que el porcentaje obtenido en la investigación realizada con el ASG y por ultimo *Guo y cols.*(123) analizó el efecto protector de los polisacáridos de Cortex Eucommiae sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio exhaustivo en ratones mediante nado forzado analizando mediante DPPH[•] en plasma obteniendo un porcentaje de inhibición del 19.85% siendo un resultado menor en comparación obtenido por el ASG.

8.2.3 El ASG mostró efectos preventivos de lipoperoxidación de los diferentes órganos analizados mediante MDA

Un objetivo más de esta investigación fue evaluar la prevención del daño oxidativo en membranas por el ASG tejidos por el método de TBARs observando la disminución de lipoperoxidación en los diversos órganos principalmente en el tratamiento de 30 días y aun siendo más precisos en el grupo de consumo de 1,382μgEAG/ml/día mostrando que pulmón presentó el nivel más bajo de MDA con un total de 0.058μM MDA y corazón con un total de 0.061μM MDA, resultados que concordaron con la investigación realizada con *Korivi y cols.*(124) quienes realizaron una investigación que pretendía evaluar el Ginsenoside-Rg1 y mostrar la protección al hígado contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio exhaustivo en ratas usando como marcador de la lipoperoxidación el análisis del MDA obteniendo un total de 0.094 μM MDA siendo un valor mayor de contenido de MDA, por otra parte *Matheus y cols.* (125) observaron como el entrenamiento aeróbico tenía un efecto sobre el estrés oxidativo hepático analizando mediante TBARs la lipoperoxidación por el estrés oxidativo obteniendo un total de 0.051 μM MDA en hígado que comparado a nuestra investigación mediante ASG el valor fue mayor para la protección contra la lipoperoxidación y una

investigación más realizada por *Qi y cols.* (126) que determinaron los efectos de ginsenósidos-Rb1 sobre el ejercicio oxidativo en ratones de natación forzada, analizando la lipoperoxidación de las células obteniendo un total de 0.120 μ M MDA en hígado que en comparación con el ASG existió mayor lipoperoxidación.

8.2.4 El porcentaje de la actividad de la enzima SOD en los diferentes órganos disminuyó

Un método más para analizar la actividad antioxidante del ASG fue en análisis del porcentaje de inhibición de la enzima SOD gracias al ASG en los distintos tejidos analizados obteniendo como el mejor porcentaje de inhibición a corazón y músculo con el tratamiento de 1,382 μ gEAG/ml/día con un total de 66.56%, comparado con los resultados obtenidos por *Guo y cols.*(123) que analizaron la inhibición de esta enzima mediante el estrés oxidativo generado en ratones mediante el ejercicio de nado forzado evaluando el efecto protector de polisacáridos de *Cortex Eucommiae* en plasma e hígado obteniendo un total de 35.65% de porcentaje de inhibición de la SOD, en otro estudio *yan y cols.*(127) investigaron los efectos de *Laminaria japónica* polisacáridos en la resistencia al ejercicio y estrés oxidativo en ratones que nadan forzados haciendo uso del análisis de la inhibición de la SOD siendo en plasma donde se encontró el mayor porcentaje de inhibición de la enzima con un total de 45.68% y en un estudio más por parte de *Qi y cols.* (126) quienes evaluando los efectos del Ginsenosides-R evaluaron la actividad de la SOD en tejidos de ratones sometidos a nado forzado donde el porcentaje de inhibición de la enzima fue un total del 63.3% que al ser comparado con el resultado del ASG fue similar.

IX. Conclusiones

El trabajo de investigación tuvo las siguientes conclusiones:

1. Se obtuvo ASG de diferentes variedades de granadas provenientes del municipio de Tasquillo perteneciente al estado de Hidalgo mostrando un rendimiento del 50% de aceite en cada una de ellas.
2. Los ASG de granada presentaron contenidos de fenoles diferentes demostrando que la granada verde y roja son quienes contiene el mayor contenido.
3. Los ASG tuvieron actividad anti-radical contra las pruebas ABTS^{•+} y DPPH[•] Demostrando tener potencial de protección ante estrés oxidativo protegiendo de cierta manera los tejidos de órganos principalmente en pulmón.
4. Se mostró que conforme la dosis de ASG aumentaba la lipoperoxidación de membranas disminuían siendo el pulmón y corazón quienes mostraron la mayor protección.
5. La actividad de la enzima SOD disminuyó gradualmente en los tejidos de órganos mientras se aumentaba la dosis de ASG comparado con el grupo que no fue suplementado con ASG.
6. El órgano que mostró el mejor efecto inhibitorio del estrés oxidativo en la mayor parte de los análisis del ASG fue pulmón.
7. El ASG podría emplearse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico.
6. Se demostró que el método de extracción del ASG extrajo los compuestos bioactivos de la semilla de granada y protegiendo propiedades antioxidantes, por lo que el ASG podría emplearse como un producto nutracéutico en la prevención de lesiones en el ejercicio físico provocadas por el estrés oxidativo.

X. Perspectivas

La extracción de aceites de diferentes de semillas provenientes de diferentes frutos han presentado variada actividad antioxidante ante estrés oxidativo generado por ejercicio físico exhaustivo, así como también rendimientos de extracción diferentes, quizá con el ASG esto puede cambiar, por lo que será conveniente evaluar ciertas características del ASG como: rendimiento de producción, etc.

No obstante, los resultados que se dieron a conocer en este estudio se formalizaron tanto *in vitro* como *in vivo*, por tanto, sería interesante realizar pruebas comparativas con el mismo modelo animal, pero con diferentes variedades de aceites que permitan evaluar la cinética de liberación de polifenoles, para determinar la dosis óptima de ingesta en humanos que garanticen su funcionalidad.

Además, resulta necesario caracterizar los compuestos bioactivos de las diferentes variedades de granada provenientes del estado de Hidalgo, mostrando que sustentan propiedades terapéuticas hacia la salud y a partir de ello, poder llevarlo al modelo humano para su evaluación de beneficios. De tal forma que el ASG sea probado sobre otras propiedades demostradas y que tiene el aceite de semilla como son: propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, hipoglucemiantes y antiaterogénicas, etc.

Finalmente, una vez realizados estudios previos, sería de interés la elaboración de un producto alimenticio que pueda ser usado como suplemento para la dieta de todos aquellos que realicen o decidan realizar ejercicio para mantener un equilibrio entre el estrés oxidativo generado y antioxidantes para la prevención de posibles lesiones y a partir de lo anterior dar a conocer la propiedades no sólo de la actividad antioxidante sino de las propiedades ya señaladas y con ello fomentar y promover su consumo en la dieta habitual de toda la población tanto deportiva como población en general, sin tener que esperar a la temporada de producción de la granada para poder consumirlo.

XI Bibliografía

1. Villanego F, Naranjo J, Vigará Luis Alberto, Cazorla JM, Montero ME, García T, et al. Impacto del ejercicio físico en pacientes con enfermedad renal crónica: revisión sistemática y metaanálisis. *Revista de la Sociedad Española de Nefrología*. 2020;40(03):237–52.
2. Bautista-Leon MR, Alanís-García E, Cruz Cansino N del S, Delgado L. Papel del estrés oxidativo en la infección por SAR-coV-2, y uso de antioxidantes como mecanismo de prevención. *ICSA* [Internet]. 5 de junio de 2021 [citado 20 de enero de 2024];9(18):232-7. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/article/view/6605>
3. Ortiz JM, Medina M. Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación Química*. 2020;3(1):1–11.
4. Zhu H, Tian G, Jin Y, Zhuang J, Zhao J, Gao B. Effects of a 4-week micro-hyperbaric oxygen Intervention on oxidation-antioxidation System function. *Rev Bras Med Esporte*. 2023;29:e2021-0330.
5. Olivares D, Cabrera B, Martínez S, Teresa M. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investig Cienc*. 2010;10–5.
6. Guija-Guerra H, Guija-Poma E. Radicales libres y sistema antioxidante. *Horiz Med*. 2023;23(2):e2158.
7. Vieira-Souza L, Marçal A, Lopes J, Aida F, dos Santos B, Santana A, et al. High-Intensity Resistance Exercise and Schinus terenbinthifolius Supplementation Attenuate Oxidative Stress and Muscle Damage Biomarkers. *Int J Morphol*. 2022;40(3):781–8.
8. Rodríguez-Nuñez I. Efectos biológicos protectores del ejercicio en modelos experimentales de tabaquismo: Más allá de la cesación y la abstinencia. *Rev Chil Enferm Respir*. 2020;36:33–40.
9. Souza A, Delwing-de Lima D, Werlang-Coelho C, Delwing-Dal Magro D, Donat B, Ramos M, et al. Effects of aerobic exercise training on oxidative stress in the skeletal muscles of obese rats. *Rev Bras Med Esporte*. 2019;25(5):404–8.

10. Coll JS, Marín DM, Grijota Pérez FJ, Sánchez IB, Concepción M, Gil R, et al. Nutrición Hospitalaria Trabajo Original Otros Influence of soccer training on parameters of oxidative stress in erythrocytes. *Nutr Hosp.* 2019;36(4):626–30.
11. Palma-Jacinto J, Santiago-Roque I, Coutiño-Rodríguez R, Arroyo-Helguera O. Efecto de un multivitamínico sobre la resistencia a la insulina, inflamación y estrés oxidante en un modelo de obesidad inducida en ratas Wistar. *Nutr Hosp.* 2023;40(6):1183–91.
12. Navarro M, Hernández J, Caire G. Diet, physical activity and telomere length in adults. *Nutr Hosp.* 2019;36(6):1406–17.
13. Donadio P, Muñoz C, Flores-Lucero F, Garcia-Diaz D, Farias-Valenzuela C, Quezada E, et al. Effectiveness of nutritional supplementations with polyphenols on muscle damage and biomarkers of oxidative stress in different types of physical exercises: A review of the literature. *SPORT TK-EuroAmerican.* 2022;11(4):1–26.
14. Meléndez E. Efecto de un programa de ejercicio combinado de fuerza y resistencia aeróbica sobre biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo en pacientes en hemodíalisis [Tesis Doctoral]. [Valencia]: Universidad CEU Cardenal Herrera; 2020.
15. Godoy M. Ejercicio físico, radicales libres y estrés oxidativo. Suplementación con antioxidantes naturales derivados del consumo de arándanos. [Andalucía]: Universidad Internacional de Andalucía; 2023.
16. Montes P, Fabela H, Sánchez G, Betanzos G. La granada como una alternativa en el tratamiento de la diabetes. *Diabetes tercera edición.* Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2013; 637-650.
17. Melo I, Carvalho E, Mancini-Filho J. Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum L.*): A Source of Punicic Acid (Conjugated α -Linolenic Acid). *J Hum Nutr Food Sci.* 2014;2(1):1024.
18. Constanza L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nov - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 2012;10(18):213–25.

19. Peniche C, Boullosa B. *Nutrición aplicada al deporte*. Distrito Federal, México: Mc Graw Hill; 2011.
20. Pizano A, Echeverri D, Félix Móntes. Efecto del ejercicio aeróbico en la rigidez vascular en una población sana. *Revista Colombiana de Cardiología* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 23];24(3):308–15. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-efecto-del-ejercicio-aerobico-rigidez-S012056331630242X>
21. Tuon T, Valvassori SS, LOPES-BORGES J, Luciano T, Trom CB, Silva LA, et al. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson’s disease. *Neuroscience*. 2012 Dec;227:305–12.
22. Um H, Kang E, Leem Y, Cho I, Yang C, Chae K, et al. Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer’s disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med*. 2008 Jan 1;22(4).
23. Aguiar AS, Speck AE, Prediger RDS, Kapczinski F, Pinho RA. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm*. 2008 Sep 16;115(9):1251–5.
24. Aguiar AS, Boemer G, Rial D, Cordova FM, Mancini G, Walz R, et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience*. 2010 Dec;171(4):1216–27.
25. Aguiar AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos ARS, Tasca CI, et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mech Ageing Dev*. 2011 Nov;132(11–12):560–7.
26. Falone S, D’Alessandro A, Mirabilio A, Petrucci G, Cacchio M, Di-Ilio C, et al. Long Term Running Biphasically Improves Methylglyoxal-Related Metabolism, Redox Homeostasis and Neurotrophic Support within Adult Mouse Brain Cortex. *PLoS ONE*. 2012;7(2):1–11.

27. Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* 2006 Sep;49(4):387–92.
28. Aydin C, Sonat F, Sahin SK, Cangul IT, Ozkaya G. Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat. *Indian J Exp Biol.* 2009;47:24–31.
29. Oyarzún MG, Dussaubat ND, Eugenia Miller MA, López MA, Méndez GL, Miranda JG. El ejercicio físico aumenta el daño pulmonar inducido por la exposición aguda e intermitente a 0,5 ppm de ozono en ratas juveniles. *Rev Chil Enf Respir.* 2013;29:141–8.
30. Rodriguez N, Di-Marco N, Langley S. Nutrition and Athletic Performance. *Med Sci Sport Exerc.* 2009 Mar;41(3):709–31.
31. Meneses-Echávez J, González-Jiménez E, Correa-Bautista J, Schmidt-Río J, Ramírez-Vélez R. Efectividad del ejercicio físico en la fatiga de pacientes con cáncer durante el tratamiento activo: revisión sistemática y metaanálisis. *Cad Saúde Pública.* 2015;31(4):667–81.
32. Soto F, Toledano J. Manual de ejercicio para adultos. Almería, España: Francisco Soto Mas; 2010.
33. Ledezma A, Millán J, Maseda A, Fernández A. Kinesiología Revista oficial del Colegio de Kinesiólogos de Chile. In: Efecto del ejercicio aeróbico sobre el deterioro cognitivo leve (dcl) y estadios tempranos de demencia en adultos mayores. Chile; 2012. p. 20.
34. Bompa, T. O., & Buzzichelli, C. A. Entrenamiento De Fuerza, 387. 2017
35. Wilmore, J. H., & Costill, D. L. Fisiología del Esfuerzo y del Deporte 6a Edición Revisada y Aumentada. Laboratorio de Rendimiento Humano, 2014. 1–775.
36. Kenney L, Wilmore J, Costill D. Fisiología del deporte y el ejercicio. Quinta Edi.

Madrid, España; 2012.

37. Neto JMFA, Nader BB, Ornellas TCF de, Siviero IMPS, Padovani RM. Oxidative stress and muscle cell damage biomarkers monitoring in male volleyball athletes during a competitive season. *Brazilian J Biomotricity*. 2013;7(4):208–18.
38. Spielvogeli H. El lado oscuro del oxígeno. *Rev Sci*. 2008;6(1):57.
39. Benítez J. Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en dos grupos de varones prepuberales y puberales Departamento de Educación Artística y Corporal. Universidad de Córdoba; 2008.
40. Aymard A, Aranda C, Di-Carlo M. Estudio de parámetros bioquímicos en jugadores de fútbol de élite. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2013;47(1):101–11.
41. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012 May;70(5):257–65.
42. Kerksick C, Zuhl M. Mechanisms of Oxidative Damage and Their Impact on Contracting Muscle. In: *Antioxidants in Sport Nutrition*. CRC Press; 2014. p. 1–16.
43. Walker B. La anatomía de las lesiones deportivas. México: Editorial Paidotribo; 2010.
44. Romero D, Tous J. Prevención de lesiones en el deporte. Claves para un rendimiento óptimo. Madrid, España: Médica Panamericana; 2010.
45. Osorio J, Clavijo M, Arango E, Patiño S, Gallego I. Lesiones deportivas. *Red Rev Científicas América Lat el Caribe, España y Port*. 2007;20(2):167–77.
46. Tetteh M. ¿Qué es el Estrés Oxidativo? *Environ Heal Fact Sheet* . 2012;
47. Galano A. Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational Chemistry Based Protocols. *Chem Soc*. 2015;59(4):231–62.
48. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. UK: UK: Oxford Univ. Press; 2007.
49. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms

- and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1243–1276.
50. Hwang E-S, Kim G-H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology.* 2007 Jan;229(1–2):1–10.
 51. Fernández E, Silva-Grigoletto D, ; Túnez-Fiñana ME, Fernández JM. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deport Rev Andal Med Deport.* 2009;222(111):19–3419.
 52. Díaz G, Escobar W, Pizarro E. Estrés Oxidativo; Cuando el equilibrio se pierde. *Mot y Pers.* 2013;(13):45–60.
 53. Galván T, Guisado R, García MC, Ochoa J, Ocaña J. Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Rev Andal Med Deport Rev Andal Med Deport.* 2008;11(22):61–7261.
 54. Romero Á, Amores L. El envejecimiento oxidativo inflamatorio: una nueva teoría con implicaciones prácticas. *MediSur.* 2016;14(5):1–9.
 55. Del Pilar Urbina-Bonilla A. Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja? *Colomb Med.* 2008;39(3).
 56. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Physiol.* 2008 Oct;295(4):849–68.
 57. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción).* 2006;(494):161–72.
 58. Gutiérrez-Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres? *Rev Mex Ciencias Farm.* 2006;37(4):69–73.
 59. Peniche, Cecilia; Boullosa B. *Nutrición aplicada al deporte.* Primera Ed. Distrito Federal, México: Mc Graw Hill; 2011.
 60. Boffi F. Entrenamiento y adaptación muscular. sustratos y vías metabólicas para la producción de energía. *Rev Bras Zootec.* 2008;37:197–201.
 61. Rivera-Brown AM, Frontera WR. *Principles of Exercise Physiology: Responses to Acute Exercise and Long-term Adaptations to Training.* PM&R. 2012

Nov;4(11):797–804.

62. Vela D. Adaptaciones cardiovasculares al ejercicio físico en personas sanas. Universidad de Valladolid; 2014.
63. Serratosa L, Fernández A. Adaptaciones cardiacas al ejercicio. In: Fisiología del ejercicio. 3rd ed. Madrid, España: Médica Panamericana; 2006. p. 331–9.
64. Benito P, Calvo S, Gómez C, Iglesias C. Alimentación y nutrición en la vidaactiv: Ejercicio físico y deporte. Madrid, España: UNED; 2014.
65. Muñoz D, Olcina G, Timón R, Brazo F, Robles M, Maynar M. Ejercicio físico y estrés oxidativo. Rev Española Educ Física y Deport. 2010;(14):93–107.
66. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dyn Med. 2009;8(1):1.
67. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. Diabetes, Obes Metab. 2007 Nov;9(6):813–39.
68. Palacios G, Pedrero-Chamizo R, Palacios N, Maroto-Sánchez B, Aznar S, González-Gross M. Biomarcadores de la actividad física y del deporte. Nutr Hosp. 2015;31(3):237–44.
69. Nuñez A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. Rev Cuba Salud Pública. 2011;37:644–60.
70. Mahan K, Escott-Stump. Krause Dietoterapia. 12th ed. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2009.
71. Dabrowska CC, Mir MSM. Vitaminas y antioxidantes. Saned. 2009;23–7.
72. Martin E. La batalla contra el cancer. Estados Unidos; 2014.
73. dela-Cruz E, Pino J, Moreno M, Cañadas M, Ruiz-Risueño J. Micronutrientes antioxidantes y actividad física: evidencias de las necesidades de ingesta a partir de las nuevas tecnologías de evaluación y estudio del estrés oxidativo en el deporte. RETOS Nuevas Tendencias en Educ Física, Deport y Recreación. 2008;13(13):11–4.

74. Gil N, Camilo Gómez J, Gómez A, libres lesión cerebral R. Radicales libres y lesión cerebral Title. Univ Méd Bogotá. 2008;49(2):231–42.
75. Verdú Soriano J, Segovia Gómez T, Bermejo Martínez M, López Casanova P, Arboledas Bellón J, M^a Carrasco Herrero J, et al. Efecto de un suplemento nutricional específico (Balnimax®) en la cicatrización de úlceras de la extremidad inferior de etiología venosa y úlceras por presión. Gerokomos. 2015;27(1):27–32.
76. Bastías J, Cepero Y. La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. Rev Chil Nutr. 2016;43(1):81–6.
77. Montier A, Ramos A, Gómez M, Pérez J, Quintana Q. Estrés oxidativo en la diabetes mellitus papel de la vitamina E y antioxidantes endógenos. Rev Ciencias Médicas Septiembre-octubre. 2015;19(195):973–85.
78. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 2006;II(494):161–72.
79. Dipak G, Axay P, Manodeep C, Jagdish K. Phytochemical and pharmacological profile of punica granatum: an overview. Int Res J Pharm. 2012;3(2).
80. Akbarpour V, Hemmati K, Sharifani M. Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit in Maturation Stage. Am J Agric Environ Sci. 2009;6(4):411–6.
81. Jurenka M. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. Altern Med Rev. 2008;13(2):128–44.
82. Mondragón C, Juárez S, Para Productores F. Guía para la producción de granada roja en Guanajuato. Inst Nac Investig For agrícolas y Pecu. 2008;
83. López-Mejía O, López Malo E, Palou E. Granada (*Punica granatum L.*): una fuente de antioxidantes de interes actual. Temas Sel Ing Aliment. 2010;1(4):64–73.
84. FAO. Fichas técnicas productos frescos y procesados. 2009.
85. Gil MI, Tomás BFA, Hess PB, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem. 2000;48(15):4581–9.

86. Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer a mini review. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(2):139–44.
87. Nishigaki I, Rajendran P, Venugopal R, Ekambaram, G. Sakthisekaran D, Nishigaki Y. Effect of extract of pomegranate (*Punica granatum L.*) on glycated protein-iron chelate-induced toxicity: an in vitro study on human umbilical-vein endothelial cells. *J Heal Sci.* 2008;54(4):441–9.
88. Miguel M, Neves M, Antunes M. Pomegranate (*Punica granatum L.*): a medicinal plant with myriad biological properties a short review. *J Med Plants Res.* 2010;4(25):2836–47.
89. Mercado S, Mondragón C, Rocha L, Álvarez B. Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja* effects of fruit condition and storage temperature on pomegranate quality. *Rev Mex Ciencias Agrícolas.* 2011;2(3):449–59.
90. Guo S, Deng O, Xiao J, Xie B, Sun Z. Evaluation of Antioxidant Activity and Preventing DNA Damage Effect of Pomegranate Extracts by Chemiluminescence Method. *J Agric Food Chem.* 2007;55:3134–40.
91. de Melo I, De Carvalho T, Silva A, Yoshime L, Sattler J, Pavan R, et al. Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum L.*). *Food Sci Technol.* 2016;
92. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jan;109(2):177–206.
93. Sassano G, Sanderson P, Franx J, Groot P, Straalen J, BASSAGANYA-RIERA J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *J Sci Food Agric.* 2009;89:1046–52.
94. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirilini M, Bruni R. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65:277–283.

95. Hammond EG, Pan WP, Mora-Upí J. Fatty acid composition and glyceride structure of the mesocarp and kernel oils of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Rev Biol Trop J Trop Biol Conserv.* 1982;30(1):91–3.
96. Restrepo J, Estupiñan J, Colmenares A. Estudio comparativo de las fracciones lipídicas de *Bactris gasipaes* Kunth (chontaduro) obtenidas por extracción soxhlet y por extracción con CO₂ supercrítico. *Rev Colomb Quim.* 2016;45(1):5–9.
97. García E, Fernández I, Fuentes A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Universitat Politècnica de Valencia. Valencia, España; 2010.
98. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J Agric Food Chem.* 2002 Jan;50(1):81–6.
99. Nossa L, Talero Y, Rozo W. Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale* L). *Rev Cuba Plantas Med.* 2016;21(2):125–32.
100. Orojuela A. Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.; 2015.
101. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci.* 1993 Apr 1;84(4):407–12.
102. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978 Feb;47(4):379–91.
103. Porsolt RD, Le-Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977 Apr 21;266(5604):730–2.
104. Pomar IGM, Erquicia EB, Colmena LT, Barrera SQ, Vargas PLS. Concentración de malondialdehído en sujetos que residen a gran altitud: estudio exploratorio. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2017;34:677–81.

105. Radox. RANSOD, Manual de Superóxido Dismutasa. County Antrim; p. 1–3.
106. Muniz JJ, Leite LN, De Martinis BS, Carneiro FS, Tirapelli CR. Chronic ethanol consumption induces erectile dysfunction: Role of oxidative stress. *Life Sci.* 2015 Nov;141:44–53.
107. Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition.* 2015 Jul;31(7–8):916–22.
108. Yang CE, Yeh TM, Chang CD, Shih WL. Chinese Soft-Shelled Turtle Oil in Combination With Swimming Training Improves Spatial Memory and Sports Performance of Aging Rats. *Front Physiol.* el 28 de mayo de 2021;12.
109. Lee SR, Directo D. Fish Oil Supplementation with Resistance Exercise Training Enhances Physical Function and Cardiometabolic Health in Postmenopausal Women. *Nutrients.* el 1 de noviembre de 2023;15(21).
110. Melo ILP, Carvalho EBT, Silva AMO, ManciniFilho J. Effects of pomegranate seed oil on lipoperoxidation and activity of antioxidant enzymes in liver and brain of rats. *Free Radic Biol Med.* 2010 Jan;49:S189.
111. Amri Z, Lazreg-Aref H, Mekni M, El-Gharbi S, El-Gharbi O, Mechri B, et al. Oil Characterization and Lipids Class Composition of Pomegranate Seeds. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–8.
112. Díaz A. Calidad nutracéutica de extractos de granada dulce y ácida y bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo in vivo. Universidad Autónoma de Querétaro; 2014.
113. Juárez N, Jiménez V, Guerrero J, Monribot J, Jiménez M. Caracterización del aceite y harina obtenido de la semilla de uva silvestre (*Vitis tiliifolia*). *Rev Mex Ciencias Agrícolas.* 2017;8(5):1113–26.
114. González F. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. Instituto Politécnico Nacional; 2010.

115. Mekni M, Dhibi M, Kharroubi W, Hmida RB, Cheraif I, Hammami M. Natural conjugated and trans fatty acids in seed oils and phytochemicals in seed extracts issued from three Tunisian pomegranate (*Punica granatum*. L) cultivars. *IntJCurrMicrobiolAppSci*. 2014;3(8):778–92.
116. He L, Xu H, Liu X, He W, Yuan F, Hou Z, et al. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC– ABTS^{•+} assay. *Food Res Int*. 2011 Jun;44(5):1161–7.
117. Pereira De Melo IL, Bonifácio E, De Carvalho T, Mancini-Filho J. Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum* L.): A Source of Punicic Acid (Conjugated α -Linolenic Acid). *J Hum Nutr Food Sci*. 2014;2(1).
118. Peng K-Z, Yang X, Zhou H-L, Pan S-X, Lam CWK. Safety Evaluation, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of the Flavonoid-Rich Extract from *Maydis stigma*. *Molecules*. 2015;20:22102–22112.
119. Berzosa C. Estudio del daño oxidativo, niveles de defensas antioxidantes y efecto ergogénico de la melatonina en pruebas de esfuerzo físico agudo. Universidad de Zaragoza; 2011.
120. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS^{•+}) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2005 Jan;140(1):47–52.
121. Hao S, Zhaobao W. Effects on exercise endurance capacity and antioxidant properties of astragalus membranaceus polysaccharides (APS). *J Med Plants Res*. 2010;4(10):982–6.
122. Peng K-Z, Yang X, Zhou H-L, Pan S-X. Safety Evaluation, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of the Flavonoid-Rich Extract from *Maydis stigma*. *Molecules*. 2015 Dec 10;20(12):22102–12.
123. Guo R, Qi B. Protective effect of polysaccharides from *Cortex Eucommiae* on exhaus- tive exercise-induced oxidative stress in mice. *Biomed Res-India Biomed*

Res. 2015;26(262):375–9.

124. Korivi M, Hou C-W, Huang C-Y, Lee S-D, Hsu M-F, Yu S-H, et al. Ginsenoside-Rg1 Protects the Liver against Exhaustive Exercise-Induced Oxidative Stress in Rats. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2012;2012:1–8.
125. Matheus N, Mendoza C, Meléndez C, Flores C, Corro A, Medina I, et al. Entrenamiento Aeróbico: Efecto Sobre el Estado Oxidativo Hepático. *RICYDE Rev Int Ciencias del Deport.* 2016;12(45):309–23.
126. Qi B, Zhang L, Zhang Z, Ouyang J, Huang H. Effects of ginsenosides-Rb1 on exercise-induced oxidative stress in forced swimming mice. *Pharmacogn Mag.* 2014 Oct;10(40):458–63.
127. Yan F, Hao H. Effects of Laminaria japonica polysaccharides on exercise endurance and oxidative stress in forced swimming mouse model. *J Biol Res.* 2016;23.
128. Nova D. Caracterización química y biológica de extractos de hojas y fruto de calafate para la evaluación de su efecto sobre estrés oxidativo, y en modelo animal sometido a una pauta de ejercicio aeróbico. [Concepción, Chile]: Universidad de Concepción; 2023.