



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

TESIS

**“Identificación de polifenoles en el
microencapsulado de granada y su evaluación
protectora en hepatocitos con estrés oxidativo
inducido”**

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

PRESENTA

Nidia Hernández Ramírez

Director (a)

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Codirector (a)

Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez

Comité tutorial

Dra. María del Carmen Valadez Vega

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Pachuca de Soto, Hidalgo., julio, 2023



14/06/2023

Asunto: Autorización de impresión

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

El Comité Tutorial de la TESIS del programa educativo de posgrado titulada **"Identificación de polifenoles en el microencapsulado de granada y su evaluación protectora en hepatocitos con estrés oxidativo inducido"**, realizado por la sustentante **Nidia Hernández Ramírez** con número de cuenta 450526 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 14 de junio de 2023

El Comité Tutorial

Gabriel Betanzos Cabrera
 Director



Yareli Shantal Castrejón Jiménez
 Co-directora

María del Carmen Valdez Vega
 Miembro del comité

Juan Carlos Cancino Díaz
 Miembro del comité

Tomás Eduardo Fernández Martínez
 Miembro del comité

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
 Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
 México, C.P. 42160
 Teléfono: 02 (771) 71 720 00 Ext. 4300, 2301, 4346, 4010
 medicina@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 771927 y número de CVU 1077202.

Durante el periodo 13 de julio al 30 de julio de 2021 se realizó una estancia nacional de investigación en la Facultad de Química del Instituto Tecnológico de Tepic, en Nayarit, apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, así como al posgrado en Ciencias Biomédicas y de la salud por darme la oportunidad de realizar mis estudios y por todo el apoyo recibido durante mi estancia.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias especialmente al laboratorio de virología e inmunología por las instalaciones prestadas para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Blanca Estela García Pérez perteneciente al Instituto Politécnico Nacional por la donación de la línea celular, así como reactivos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Nayeli Castrejón Jiménez perteneciente al Instituto de Ciencias Agropecuarias, laboratorio de Virología e Inmunología por el apoyo y guiarme en el desarrollo de las técnicas.

A la Dra. Efigenia Montalvo perteneciente al Instituto Tecnológico de Tepic por el apoyo en este proyecto.

A la Dra. María del Carmen Valadez Vega perteneciente al Instituto de Ciencias de la Salud por guiarme en el manejo de cultivo celular, por sus consejos y apoyo.

Al Dr. Juan Carlos Hernández González perteneciente al Instituto de Ciencias Agropecuarias, laboratorio de Virología e Inmunología por todos sus consejos y apoyo.

A la Dra. Raquel Cariño Cortés perteneciente al área de Medicina por su valioso tiempo, apoyo y aportaciones a este proyecto.

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación, en especial a la Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez por la confianza y paciencia que me ha tenido, por todos los consejos y por compartir su sabiduría y experiencia dentro y fuera del laboratorio.

A los miembros del Comité tutorial por su valioso tiempo, su paciencia, consejos y apoyo en este proyecto.

Dra. María del Carmen Valadez Vega

Dr. Eduardo Fernández Martínez

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

A mis compañeros de laboratorio en especial a Belinda por compartir sus conocimientos y por sus consejos a Heidi, Brandon, Yolanda, Gabriela, Perfecta, y Diana por su apoyo, por compartir sus experiencias y por su compañerismo.

A mi madre que ahora es mi ángel y sigue guiando cada paso que doy, a mi padre y hermanos Karen y Emmanuel por creer en mí, por su cariño y apoyo para lograr este proyecto.

A quien me alentó a seguir, por su cariño, por el apoyo y por todas las porras.

Y a todas aquellas personas que han participado tanto en mi desarrollo personal como en el ámbito profesional y que de una u otra manera hicieron posible que este proyecto concluyera.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Estrés oxidativo	3
1.2 Especies reactivas	3
1.3 Radicales libres	6
1.4 Antioxidantes	7
1.5 Vitaminas antioxidantes	7
1.6 Polifenoles	8
1.7 Enzimas detoxificantes	8
1.8 Granada (<i>Punica granatum</i> L.)	9
1.8.1 Características anatómicas del fruto de granada	9
1.8.2 Producción de granada	10
1.8.3 Composición nutricional de la granada	11
1.8.4 Compuestos bioactivos de la granada	12
1.8.5 Granada como antioxidante natural	15
1.9 Microencapsulación de compuestos biológicos	16
1.9.1 Métodos y usos de microencapsulación	17
1.9.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión	18
II. ANTECEDENTES	19
2.1 La granada y su relación con el estrés oxidativo	19
III. Justificación	24
IV. Hipótesis	24
V. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25

VI.	Materiales y métodos-----	25
6.1	Tipo y diseño de estudio.....	25
6.2	Diseño experimental de variables	26
	Diagrama de diseño experimental	27
6.3	Materiales y métodos	28
6.3.1	Material biológico-----	28
6.3.2	Cultivo celular-----	28
6.3.3	Microencapsulado de granada-----	28
6.3.4	Identificación de compuestos fenólicos en microencapsulado de granada por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) -----	28
6.3.5	Viabilidad celular por el método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para determinar citotoxicidad de microencapsulado de granada en hepatocitos HuH-7 -----	29
6.3.7	Medición de la formación de ROS empleando el método azul de nitrato-tetrazolio (NBT) en células Huh-7 -----	30
6.4	Análisis estadístico.....	30
VII	Resultados-----	31
7.1	Identificación de compuestos fenólicos en jugo y microencapsulado de granada.....	31
7.2	Citotoxicidad de microencapsulado de granada.....	32
7.3	Generación de especies reactivas de oxígeno por microencapsulado de granada.....	33
7.4	Determinación de la concentración letal de Asc/Cu ⁺⁺ en células Huh-7.....	34
7.5	Determinación del IC ₅₀ en células Huh-7 incubadas con Asc/Cu ⁺⁺ en células Huh-7...35	
7.6	Especies reactivas de oxígeno en células HuH-7 posterior a incubación con Asc/Cu ⁺⁺ 36	
7.7	Ensayo de protección del microencapsulado en hepatocitos HuH-7 tratados con concentraciones letales Asc/Cu ⁺⁺ (12.5/25µM)	39
VIII	Discusión -----	42
IX	Conclusiones-----	45
X	Recomendaciones-----	45
XI	Referencias -----	46

Índice de figuras

FIGURA 1. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	4
FIGURA 2. REACCIÓN DE FENTON	6
FIGURA 3. PARTES DEL FRUTO DE GRANADA	10
FIGURA 4. PRINCIPALES PROPIEDADES DE LA GRANADA	14
FIGURA 5. OBTENCIÓN DE MICRO PARTÍCULAS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN	18
FIGURA 6. DIAGRAMA DE DISEÑO EXPERIMENTAL	27
FIGURA 7. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE POLIFENOLES SOLUBLES DE MICROENCAPSULADO DE GRANADA	31
FIGURA 8. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS HUH-7 TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MICROENCAPSULADO DE GRANADA	33
FIGURA 9. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS HUH-7 INCUBADAS CON MICROENCAPSULADO	34
FIGURA 10. CONCENTRACIÓN DE ASC/CU ⁺⁺ PARA DETERMINAR EL IC ₅₀ EN LAS CÉLULAS HUH-7	35
FIGURA 11. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA EN CÉLULAS HUH-7 TRATADAS CON ASC/CU ⁺⁺	36
FIGURA 12. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POSTERIOR A INCUBACIÓN CON ASC/CU ⁺⁺	37
FIGURA 13. PORCENTAJE DE CÉLULAS NO VIABLES HUH-7 TRATADAS CON ASC/CU ⁺⁺	38
FIGURA 14. PORCENTAJE DE CÉLULAS NO VIABLES HUH-7 ESTIMULADAS CON ASC, CU ⁺⁺ Y ASC/CU ⁺⁺	39
FIGURA 15. PORCENTAJE DE CÉLULAS NO VIABLES ESTIMULADAS CON MICROENCAPSULADO DE GRANADA Y POSTERIORMENTE INCUBADAS CON ASC/CU ⁺⁺	40
FIGURA 16. PORCENTAJE DE CÉLULAS NO VIABLES ESTIMULADAS CON JUGO DE GRANADA, TROLOX Y ÁCIDO GÁLICO Y POSTERIORMENTE INCUBADAS CON ASC/CU ⁺⁺	41

ABREVIATURAS

EO	Estrés oxidativo
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
PON	Paraoxonasa

RESUMEN

La granada es un fruto originario de la República Islámica de Irán al norte de la India, su principal forma de consumo es como fruto fresco. Es un fruto con un alto contenido en compuestos fenólicos, con alta capacidad antioxidante, lo que resulta de interés en salud y en la industria alimentaria. Sin embargo, la granada es un fruto de temporada, por lo que su consumo se limita a un corto periodo en el año. Previo a este trabajo, se elaboró un microencapsulado de jugo de granada, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar los compuestos fenólicos del microencapsulado y su evaluación como un agente protector contra el daño celular producida por los radicales libres $\bullet\text{OH}$ generados por ácido ascórbico/Cobre ($\text{Asc}/\text{Cu}^{++}$) en cultivo de hepatocitos Huh-7. Se realizó HPLC para identificar los compuestos fenólicos en el microencapsulado, así como las técnicas de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y azul tripano para determinar viabilidad celular. Se identificaron 14 compuestos fenólicos de muestras de jugo fresco de granada y de microencapsulado, 11 de ellos se encontraron en el microencapsulado de granada en altas concentraciones. Se encontró que el microencapsulado no fue citotóxico a concentraciones 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se determinó que concentraciones de Asc 12.5 μM y Cu^{++} 25 μM incubadas a 1, 2, 3 y 4 h, tuvieron un 50, 80, 91, y 100% de letalidad respectivamente. No se logró establecer un esquema de protección por el microencapsulado, incluso utilizando los controles antioxidantes (trolox, ácido gálico y jugo fresco) no se observó una respuesta. Por lo que no fue posible establecer si el microencapsulado protege contra radicales $\bullet\text{OH}$. Por lo tanto, se buscará otro modelo de estrés oxidativo establecido que permita evaluar el efecto protector del microencapsulado.

Palabras clave: Microencapsulado, jugo de granada, estrés oxidativo, protección.

ABSTRACT

The pomegranate is a fruit native to the Islamic Republic of Iran, north of India; and is usually consumed as a fresh fruit. It is a fruit with a high content of phenolic compounds with high antioxidant capacity, of interest in the health and food industry. However, pomegranate is a seasonal fruit, so its consumption is limited to a short period of the year. Previously to this work, a microencapsulation of pomegranate juice was prepared, so this study aimed to identify the phenolic compounds of the microencapsulation and their evaluation as a protective agent against cellular damage produced by free radicals $\bullet\text{OH}$ generated by ascorbic acid/Copper (Asc/ Cu^{++}) in Huh-7 hepatocyte culture. HPLC was used to identify phenolic compounds in the microencapsulated juice; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT) and trypan blue techniques were used to determine cell viability. We identified 14 phenolic compounds were identified in fresh pomegranate juice and microencapsulated pomegranate juice, and 11 were founded in microencapsulated pomegranate juice at high concentrations. Microencapsulated pomegranate juice was non-toxic at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 12.5 μM Asc and 25 μM Cu^{++} were incubated at 1, 2, 3, and 4 h, yielding 44, 81, 91, and 100% lethality, respectively. It was not possible to establish a protection scheme by the microencapsulation, even using the antioxidant controls (trolox, gallic acid and fresh juice) no response was observed. Therefore, it was not possible to establish whether microencapsulated pomegranate juice protects against $\bullet\text{OH}$ radicals. Thus, other oxidative stress models should be sought to evaluate microencapsulated pomegranate juice as a protective agent.

Keywords: Microencapsulated, pomegranate juice, oxidative stress, protection.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es un estado de desequilibrio entre la producción y neutralización de especies reactivas por los sistemas antioxidantes endógenos (1). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas de manera normal en condiciones fisiológicas y eliminadas por varios mecanismos de defensa antioxidantes y normalmente se generan como subproductos del metabolismo del oxígeno. Los factores ambientales, estresantes y los xenobióticos contribuyen a aumentar la producción de ROS lo que provoca el desequilibrio que conduce al daño tisular y celular (2). El EO suele estar presente en enfermedades crónicas y degenerativas como diabetes, artritis, envejecimiento, trastornos autoinmunes, cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, y cáncer (3–6)

1.2 Especies reactivas

Las ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (NOS) se producen en todas las células eucariotas (1). Las ROS son un grupo de moléculas altamente reactivas a base de oxígeno, las cuales se forman en la mayor parte de los procesos oxidativos celulares, son especies químicas de bajo peso molecular (2) estas moléculas regulan diferentes procesos fisiológicos que incluyen la proliferación, hipertrofia, diferenciación, dinámica citoesquelética y metabolismo, sin embargo, cuando se producen en exceso reaccionan con diversas moléculas alterando las propiedades estructurales y funcionales de las moléculas diana (1,2); siendo las mitocondrias son la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (7). Durante la fosforilación oxidativa, existe un flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial interna, donde el oxígeno molecular es el último aceptor de electrones, dando como resultado la producción de agua y la obtención de energía con la formación de ATP (**Figura 1**) (8).

ONOO, existen condiciones en las que generan desequilibrios entre la producción y neutralización de NOS; cuando ocurre este desequilibrio se conoce como estrés nitrosativo (9).

Las fuentes endógenas de ROS y NOS incluyen nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, mieloperoxidasa, lipoxigenasa y angiotensina II (10). La NADPH oxidasa es la fuente predominante del anión radical superóxido (O_2^-) que se forma por la reducción de un electrón de oxígeno molecular con electrones aportados por NADPH, Una gran parte del O_2^- se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la superóxido dismutasa (SOD); H_2O_2 es capaz de formar el ion hidroxilo ($\bullet OH$) a través de la reacción de Fenton (11) $\bullet OH$ son extremadamente reactivas y reaccionan especialmente con los fosfolípidos de las membranas celulares y las proteínas.

El oxígeno molecular en estado fundamental es inactivo, su reducción parcial genera ROS, incluidos el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar O_2^- , este se puede protonar a pH bajo ($pK_a = 4.8$) para formar radicales perhidroxi (HO_2); O_2^- y HO_2 se desproporcionan espontáneamente para formar H_2O_2 , siendo el H_2O_2 es más estable y menos reactivo que el O_2^- . Sin embargo, en presencia de metales de transición reductores como el Fe^{2+} (que puede estar libre o complejado con agentes quelantes o proteínas), se produce la formación de $\bullet OH$ dependiente de H_2O_2 , mientras que el O_2^- sirve como agente reductor inicial para el metal. (Figura 2). $\bullet OH$ es un agente oxidante muy fuerte que puede iniciar reacciones en cadena de radicales libres con una variedad de moléculas orgánicas, lo que da como resultado la peroxidación de lípidos, la inactivación de enzimas y la degradación de ácidos nucleicos (12).

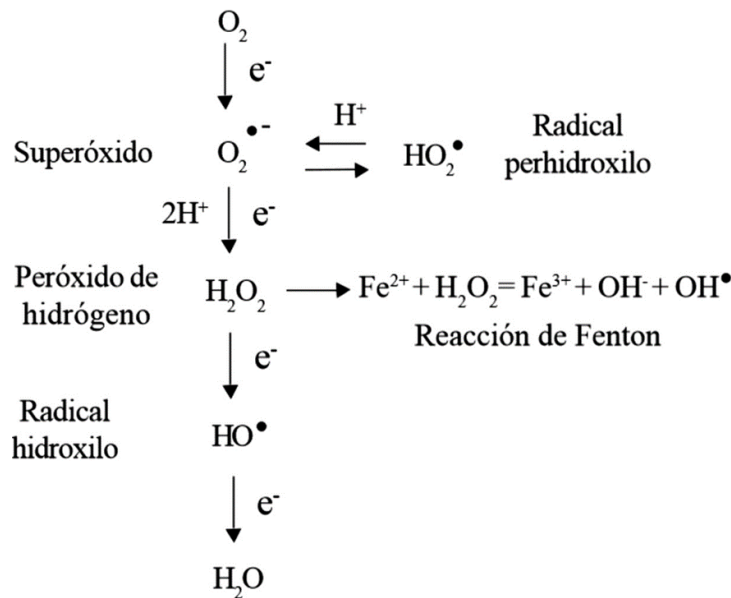


Figura 2. Reacción de Fenton. El oxígeno molecular en estado fundamental es inactivo, sin embargo, su reducción parcial genera ROS, incluidos el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). El H_2O_2 es más estable y menos reactivo que el O_2^- . Sin embargo, en presencia de metales de transición reductores como el Fe^{2+} se produce la formación de $\bullet\text{OH}$ dependiente de H_2O_2 , mientras que el O_2^- sirve como agente reductor inicial para el metal. **Tomado y modificado de Desikan et al 2007 (13).**

Tanto ROS como NOS provocan la modificación oxidativa de cada una de las principales macromoléculas. La oxidación de LDL es un proceso en cual las proteínas como los lípidos sufren cambios oxidativos que pueden provocar la acumulación de colesterol. Los ácidos grasos poliinsaturados son objetivos importantes de la peroxidación lipídica mediada por $\bullet\text{OH}$ y peroxilo (9).

1.3 Radicales libres

Los radicales libres son moléculas inestables, ya que tienen un electrón desapareado en uno de sus orbitales, estos se pueden generar a partir de fuentes endógenas o exógenas; la activación de las células inmunes, la inflamación, la isquemia, infecciones, cáncer, ejercicio excesivo, estrés mental y envejecimiento son responsables de la producción endógena de radicales libres (14,15). La formación de radicales libres en el organismo es un proceso continuo a través de reacciones enzimáticas (mitocondrias, peroxisomas y orgánulos,

fagocíticos) y no enzimáticas (radiación ionizante y reacciones no enzimáticas del oxígeno con compuestos orgánicos) (9). En las células normalmente existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante, cuando se presenta un desequilibrio afecta a una gran variedad de especies moleculares como los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos (1).

1.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas estables que son capaces de neutralizar a los radicales libres, evitando que dañen componentes celulares vitales como el DNA, las proteínas y los lípidos (16). Son compuestos que reaccionan con los radicales libres para neutralizarlos o produciendo a su vez, radicales libres menos reactivos. Una buena fuente de antioxidantes se puede encontrar en frutas, verduras, cereales y flores, estos antioxidantes son comúnmente polifenoles, carotenoides y vitaminas, los cuales presentan diversos efectos biológicos como antiinflamatorios, antienvjecimiento, anti-aterosclerosis y anti-cáncer, todos éstos ayudan al organismo a contrarrestar el efecto de los radicales libres evitando el estado de estrés oxidativo (17,18).

1.5 Vitaminas antioxidantes

El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C es un micronutriente indispensable para los seres humanos. Esta vitamina es soluble en agua, se encuentra en algunos alimentos de forma natural y es un potente antioxidante ya que tiene la capacidad de donar electrones fácilmente; además contribuye a la defensa del sistema inmunológico, promueve la actividad de eliminación de oxidantes de la piel, protegiendo contra el estrés oxidativo ambiental (19), por lo que se recomienda una ingesta para mujeres es de 75 mg y para hombres es de 90 mg. La deficiencia de esta vitamina genera una inmunidad deteriorada, puede producir la enfermedad de escorbuto, la cual es tratada con administración de esta vitamina; sin embargo, este antioxidante en presencia de metales como el hierro y el cobre aumenta la producción de radicales libres debido a su capacidad para reducir Fe^{3+} y Cu^{++} en Fe^{++} y Cu^{+} (20).

La vitamina E es un antioxidante soluble en grasa, desempeña funciones fundamentales en diferentes enfermedades, la forma biológicamente activa de la vitamina E es α -tocoferol; las principales fuentes son aceites vegetales y frutos secos; la deficiencia de esta vitamina también puede afectar la interacción de las proteínas de membrana, regulando la transducción de señales, la proliferación celular, y la expresión genética (19).

1.6 Polifenoles

Los polifenoles son sustancias químicas orgánicas que contienen grupos fenólicos en su estructura, son abundantes en diversas frutas y verduras, los polifenoles pueden contrarrestar los efectos del estrés oxidativo neutralizando los radicales libres, suelen ser abundantes en frutas y verduras, dentro de los polifenoles los más comunes son los flavonoides y los ácidos fenólicos (21,22).

Los grupos fenólicos reaccionan con los electrones desapareados de las ROS generando especies menos reactivas; en el caso de los flavonoides actúan como tampones y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, el cual es mucho menos reactivo, los flavonoides pueden prevenir las lesiones causadas por los radicales libres mediante diferentes mecanismos: Eliminación directa de ROS, activación de enzimas antioxidantes, actividad quelante de metales, reducción de radicales α .tocoferol, inhibición de oxidasas, mitigación del estrés oxidativo causado por el NO, aumento de los niveles de ácido úrico, y por el aumento de las propiedades antioxidantes de los antioxidantes de bajo peso molecular; además, algunos flavonoides pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro y el cobre impidiendo así la formación de ROS producidas por la reacción de Fenton (21,23–25).

1.7 Enzimas detoxificantes

Las enzimas detoxificantes son un grupo de enzimas que ayudan al cuerpo a eliminar sustancias tóxicas. Estas enzimas se encuentran en varios organismos, incluyendo el hígado, los riñones, y los pulmones (26,27), las cuales se encuentran separadas en tres fases diferentes (I, II y III). La fase I implica la oxidación, reducción, e hidrólisis de las moléculas tóxicas como son la familia de citocromos P450 (28,29). Las enzimas detoxificantes de fase II del metabolismo implican la conjugación de moléculas modificadas en la fase I con compuestos

no tóxicos dentro de estas se encuentran: NADPH-quinona oxidoreductasa, glutatión S-transferasa, y UDP-glucuronosil transferasa, son las principales enzimas de defensa contra tóxicos electrofílicos y el estrés oxidativo y por último la fase III los compuestos menos tóxicos se eliminan del cuerpo a través de la orina, las heces o el sudor (26). La expresión génica protectora se refiere a la capacidad de las células para producir enzimas de la fase II que pueden desintoxicar compuestos tóxicos y reducir el daño celular. La regulación de esta expresión se puede lograr mediante un elemento en el ADN llamado EpRE, el cual se encuentra en varios genes asociados con estas enzimas de la fase II. El EpRE hace que estos genes se activen y produzcan más enzimas para mejorar la capacidad de la célula para eliminar sustancias tóxicas y prevenir enfermedades (30).

1.8 Granada (Punica granatum L.)

El fruto de granada, se encuentra dentro de las primeras cinco posiciones en la lista de las frutas cultivadas más antiguas junto con la aceituna, uva, palmera datilera, y el higo (31), este fruto es originario de lo que hoy se conoce como la República Islámica de Irán en el continente asiático (32), sus hojas son lisas y de aspecto brillante, la fruta madura entre los 5 y 8 meses. Estudios diversos han demostrado que la granada puede usarse como alternativa natural para el tratamiento o manejo de diversas patologías como diabetes, hipertensión, obesidad y aterosclerosis (33–35). Sus compuestos antioxidantes se han asociado con la capacidad de disminuir los efectos producidos por distintos patógenos (16,20,36)

1.8.1 Características anatómicas del fruto de granada

La granada es el fruto de un árbol llamado granado, normalmente crece entre 5 a 10 metros (37), dentro de la cáscara se encuentra la parte comestible la cual está envuelta en un epicarpio coriáceo, en la parte interior las semillas se encuentran cubiertas por el mesocarpio y endocarpio fibrosos (32), la parte comestible de la granada está compuesta por dos partes el arilo y las semillas (**Figura 3**). Es una rica fuente de compuestos bioactivos y minerales repartidos en diferentes partes del fruto, como el exocarpo, semillas, y arilos (38,39). La cáscara comprende el 50% del fruto completo, la parte comestible constituye el 10% de

semillas y 40% de arilos, su color intenso se debe a los compuestos bioactivos especialmente las antocianinas, por lo que las diferentes concentraciones de estos compuestos en el fruto pueden variar su color entre diferentes variedades (39).

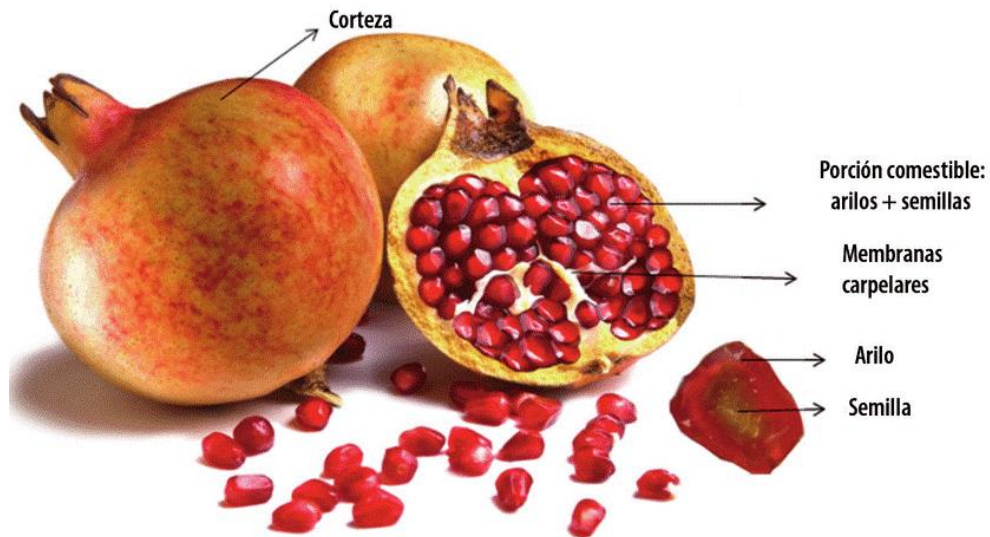


Figura 3. Partes del fruto de granada. La granada en el exterior cuenta con un epicarpio coriáceo, un cáliz en forma de corona en la parte superior. En su interior cuenta con un mesocarpio y endocarpio fibrosos en donde están acomodadas los arilos, los cuales en su interior tienen una semilla. **Tomado y modificado de Álvarez Mayorga et al. 2011 (40).**

1.8.2 Producción de granada

A nivel mundial, la India, Irán y Afganistán son los principales productores y consumidores de granada a nivel mundial, otros países con producción importante son Estados Unidos de Norteamérica y Turquía (41) En México, los principales estados productores de granada son: Morelos, Hidalgo; y Oaxaca aportando aproximadamente el 70% de la producción nacional en el año 2020 (Tabla 1 y Tabla 2) (32,41).

Tabla 1 Producción de granada en los estados de la República Mexicana.

Orden	Estado	Producción obtenida (toneladas)
1	Morelos	1,515
2	Hidalgo	1,361
3	Oaxaca	1,298
4	Guanajuato	1,083
5	Jalisco	569
6	Puebla	337
7	Chihuahua	274
8	México	178
9	Durango	172
10	Coahuila	110

Obtenido de SIAP 2020. Melgarejo P. 2011.

Tabla 2 Municipios del estado de Hidalgo productores de granada.

Orden	Estado	Producción obtenida (toneladas)
1	Tasquillo	550
2	Chilcuautla	368
3	Ixmiquilpan	255

Obtenido de SIAP 2020.

1.8.3 Composición nutricional de la granada

Como se observa en la Tabla 3, la granada es de bajo contenido calórico y posee un considerable valor nutricional, aportando vitamina C, vitaminas del complejo B, alto contenido de potasio, alto contenido en agua y minerales los cuales se han reportado en diferentes partes del fruto como el exocarpo, semillas y arilos (42,43).

Tabla 3 Composición nutrimental del fruto de granada por 100 g de porción comestible cruda

Nutrimento	Valor por 100 g
Agua	77.9
Energía (kcal)	35.0
Proteína (g)	01.6
Lípidos totales (g)	01.1
Carbohidratos (g)	18.7
Fibra (g)	07.0
Azúcar total (g)	13.6
Calcio (mg)	10.0
Magnesio (mg)	12.0
Fósforo (mg)	36.0
Potasio (mg)	236
Sodio (mg)	03.0
Ácido ascórbico total (mg)	10.2

Modificado de: Aida Zarfeshany (*et al.*) Advanced Biomedical Research (2014).

1.8.4 Compuestos bioactivos de la granada

Dentro de los principales componentes bioactivos de la granada están los taninos hidrolizables como el elagitanino y punicalagina, otros componentes como ácido elágico, ácido gálico, antocianidinas, antocianinas, flavonoides, vitaminas hidrosolubles y liposolubles, esteroides, lignanos, sacáridos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, terpenos y terpenoides entre otros (39,44,45). Los elagitaninos y los galotaninos, así como el ácido elágico son compuestos bioactivos importantes del fruto, siendo este último compuesto, el producto final del catabolismo de los compuestos polifenólicos del fruto (46); además, la granada es fuente de diversos compuestos polifenólicos, alguna de las antocianinas presentes en la granada son las derivadas de las delfinidina, generalmente conocido como un antioxidante y pigmento natural de las plantas, y que en la granada se encuentran la delfinidina-3-glucósido, delfinidina 3,5-diglucósido, pelargonidina 3-glucosido, pelarginidina 3, 5-diglucosido, cianidina 3-glucosido y cianidina 3,5 diglucosido, estos compuestos son responsables de la coloración característica de la granada (47). Parashuram y colaboradores (2022), realizaron la caracterización morfológica y química de 40 cultivares

de granada analizando: Actividad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas totales y ácido ascórbico (48), los cuales se muestran en la **Tabla 4**, siendo el parámetro menos variable en la población la actividad antioxidante total que fue el único rasgo bioquímico que se correlacionó significativamente con otro, a saber, el contenido de ácido ascórbico; esto implica que las propiedades antioxidantes del jugo fresco se ven fuertemente afectadas por esta vitamina soluble en agua.

Tabla 4 Capacidad antioxidante de los bioactivos en el jugo de granada

Parámetro	Mínimo	Máximo	DE	CV %
Actividad antioxidante total (mg/100 mL AA eq)	10.74	34.70	5.51	18.86
Fenoles totales (mg/mL GA eq)	875.00	2919.00	333.31	21.87
Antocianinas totales (mg/100 mL eq)	0.15	21.75	4.68	165.59
Ácido ascórbico (mg/100 mL)	5.00	20.00	3.01	24.60

Dentro de los polifenoles se encuentran los elagitaninos los cuales se consideran los polifenoles más abundantes de la granada, siendo el más abundante la punicalagina (49).

Un estudio *in vitro* realizado por Lansky y colaboradores (2005), demostraron que las células de carcinoma de próstata humano DU 145 tratadas con extracto de cáscara, jugo de granada durante 96 h, mostraron que el extracto de la cáscara de granada inhibió significativamente la proliferación de las células del carcinoma de próstata, además, el extracto también indujo la apoptosis de estas células cancerosas. Un estudio *in vitro* realizado por Jianjun Xu y colaboradores (2017) mostraron que macrófagos de ratón obtenidos por estimulación con lipopolisacáridos (LPS) tratados con el extracto de flor de granada suprimen la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, e IL-1 β (50). Al ser una buena fuente de antioxidantes naturales, se cree que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de granada son útiles para el cuidado de la piel debido a sus efectos protectores contra las ROS,

y, por ende, en los queratinocitos (51). También se estudió la actividad antidiabética de la cáscara de granada y los extractos de arilo, se ha demostrado que el jugo/extracto de granada reduce la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo al eliminar directamente los radicales libres o mejorar la actividad inhibidora de la α -glucosidasa, lo que controla la diabetes tipo 2 y las complicaciones relacionadas (52).

Los compuestos polifenólicos derivados de la granada reducen el colesterol sérico y el grosor de la capa íntima-media, reducen los niveles de peroxidación lipídica y la presión arterial, y reducen las concentraciones de óxido nítrico (53). La eficacia antibacteriana de varios subproductos de la granada (cáscara y pulpa) se demostró mediante estudios *in vitro* utilizando cultivos bacterianos con la ayuda de ensayos de difusión en gel de agarosa o ensayos de concentración mínima inhibitoria (54).

La granada se considera un alimento funcional, por sus propiedades: Anticancerígena, antidiabética, antialérgica, antiinflamatoria, así como efectos positivos en salud de la piel, cardiovascular y salud bucal (28–30). **(Figura 4).**

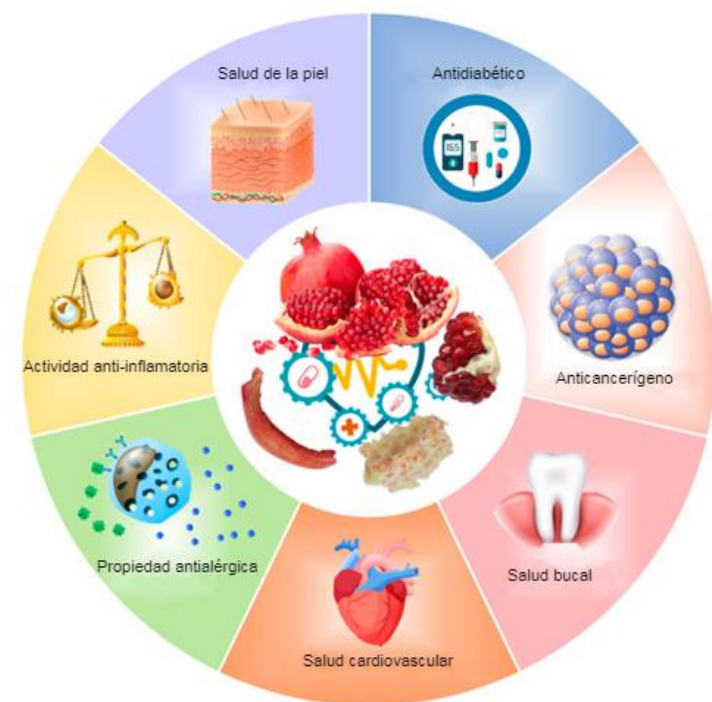


Figura 4. Principales propiedades de la granada. Diversos estudios han demostrado que la granada tiene diversos efectos en la salud, entre ellos antialérgica, anticancerígeno y propiedades antiinflamatorias entre otras. Tomado y modificado de Arun Das et al 2021 (55).

1.8.5 Granada como antioxidante natural

Los antioxidantes naturales se han estudiado ampliamente, ya que tienen la capacidad de proteger al organismo y a las células del daño inducido por radicales mediante la neutralización de estos, se ha demostrado que los radicales libres están involucrados en el desarrollo de enfermedades crónicas y en el envejecimiento (56). Las propiedades funcionales de la granada en diversas patologías se han atribuido principalmente a su contenido de polifenoles (57).

Los polifenoles de la dieta se han asociado con beneficios para la salud en la prevención de enfermedades degenerativas, los polifenoles se encuentran presentes en diferentes partes de la granada; los arilos contienen grandes cantidades de ácidos orgánicos, azúcares, minerales, vitaminas y polifenoles que muestran una elevada actividad antioxidante (57).

La propiedad más relevante de los flavonoides es su capacidad de capturar radicales libres y actuar como un antioxidante, dicha capacidad antioxidante varía según el tipo de grupo funcional y su disposición alrededor de la estructura nuclear. La capacidad antioxidante de los flavonoides está relacionada con la presencia de grupos hidroxilo en su estructura, los cuales pueden neutralizar radicales libres (36,58).

En un estudio realizado por Fischer y colaboradores (2010), se extrajeron compuestos fenólicos de la cáscara, mesocarpio y arilos de la granada; las muestras se caracterizaron por HPLC identificando 9 antocianinas, 2 galotaninos, 22 elagitaninos, 2 ésteres de gallagilo, 4 ácidos hidroxibenzoicos, 7 ácidos hidroxicinámicos y 1 dihidroflavonol (57).

Mira Rosenblat y colaboradores (2005), evaluaron el efecto del consumo de jugo de granada en pacientes diabéticos. Durante el tratamiento, los pacientes consumieron 50 mL. de jugo de granada diariamente durante 3 meses, se observó un incremento en la concentración de antioxidantes en suero y modificaciones importantes en la concentración de macrófagos, así como un aumento significativo de la actividad de la paraoxonasa en los pacientes tratados. Estos valores fueron similares a los de las personas sin diabetes. Además, el consumo de jugo de granada no afectó los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos; el estudio concluyó que el consumo del jugo de granada contribuye a disminuir el desarrollo de la aterosclerosis en estos pacientes (59).

En otro estudio realizado por Gil y colaboradores (2000), se comparó la actividad antioxidante del jugo de granada comercial con la del vino tinto y té verde. Los investigadores evaluaron la actividad antioxidante utilizando diversos métodos, incluyendo ABTS, DPPH, DMPD y FRAP. El estudio demostró que la actividad del jugo de granada comercial fue de $482.23 \pm 0,20$ mg TE / 100 ML. lo que fue mayor que la del vino tinto 354.89 mg TE / 100 mL. y el té verde 276.02 mg TE / 100 mL. observándose que el ácido gálico era el principal compuesto fenólico presente en la granada (60).

1.9 Microencapsulación de compuestos biológicos

La microencapsulación es una tecnología por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas son cubiertas por una película que contiene una sustancia activa, logrando una alternativa factible para la protección de compuestos bioactivos aumentando la vida del producto (61). La técnica de microencapsulación se basa en la formación de una estructura protectora llamada “material de pared” la cual recubre a la sustancia de interés llamada “material de núcleo” para ser protegido y liberado en el momento exacto, la microencapsulación de los polifenoles ayuda a que los compuestos tengan una mejor adhesión a los alimentos procesados, promoviendo un aumento en la ingesta de los compuestos fenólicos (38).

La microencapsulación tiene numerosas aplicaciones en áreas como farmacéutica, agrícola, médica y alimentaria, se utiliza frecuentemente en la encapsulación de aceites esenciales, colorantes, edulcorantes, microorganismos, entre otros (Azeredo y colaboradores, 2005). En la industria alimentaria se utiliza ampliamente en la adición de vitaminas, probióticos, ácidos grasos poliinsaturados susceptibles de autooxidación en la leche, los yogures o helados y el uso de compuestos flavorizantes que son altamente volátiles en los alimentos instantáneos (Khan y colaboradores, 2011; Gharsallaoui y colaboradores, 2012). La microencapsulación consiste en una técnica que permite envasar diversos materiales sólidos, líquidos y gaseosos en membranas de polímeros. Esta técnica permite aislar el núcleo del entorno externo hasta que se dé su liberación y existen diversos factores que influyen en dicha liberación, tales como la relación de concentración entre el núcleo y el material de pared, el tamaño de partícula, el grado de viscosidad de la pared y la volatilidad del núcleo (62–64).

1.9.1 Métodos y usos de microencapsulación

El desarrollo de cápsulas o bolsas herméticas favorecen el manejo y almacenamiento, mejoran el sabor, aroma y color de una gran variedad de productos alimenticios. Los métodos de encapsulación más comúnmente utilizados en la industria son el secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, extrusión, coacervación y emulsificación, los cuales buscan reducir el costo de producción en muchas áreas (65).

La microencapsulación ha tenido un gran éxito al ser una técnica confiable para evitar la degradación de bioactivos compuestos, mejorando la protección y estabilidad de estos compuestos; esta técnica se utiliza para atrapar y proteger un agente activo dentro de otra sustancia que actúa como vehículo o agente estabilizado (38).

Cutrim y colaboradores (2019), realizaron un estudio en donde se elaboró un microencapsulado de polifenoles de té verde utilizando dos métodos, el método de enfriamiento por aspersión en microcápsulas lipídicas (LMP) y el método de gelificación iónica en micropartículas de polisacáridos (IGMP), teniendo como resultado $83.5 \pm 2,8$ % de eficiencia de encapsulación para LMP y 72.6 ± 0.4 % para IGMP, y actividad antioxidante (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$.) de $33.169. 4 \pm 12.8$ (IGMP) y 2099.7 ± 35.3 (LMP), el estudio concluyó que las muestras de microcápsulas se consideraron adecuadas como ingredientes para agregar polifenoles en los alimentos (65).

Jeyakumari y colaboradores (2016), llevaron a cabo un estudio sobre galletas fortificadas con aceite de pescado microencapsulado. Utilizando la técnica de secado por aspersión usando gelatina de pescado y maltodextrina como material de pared. El aceite de pescado se añadió en tres formas diferentes (aceite de pescado, emulsión de aceite de pescado en agua y microencapsulado) para la preparación de las galletas, se evaluaron los atributos físicos, químicos y sensoriales. Las galletas suplementadas con microencapsulado de aceite de pescado tenían un mayor contenido de grasas, proteínas y cenizas en comparación con las otras dos galletas, se concluyó que las galletas adicionadas con microencapsulado mostraron una mejor estabilidad oxidativa y un mejor sabor y aroma en comparación con las galletas adicionadas con aceite de pescado (66).

1.9.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión

Esta técnica consiste en crear una solución que contenga el material del núcleo y de la pared, luego, se nebuliza en una cámara de secado con circulación de aire caliente, lo que causa que el agua se evapore de inmediato al entrar en contacto con el aire caliente, finalmente el material encapsula al núcleo. **(Figura 5)** (67). Esta técnica es la más común de la microencapsulación y ha sido utilizada por décadas para encapsular lípidos, aromas, y pigmentos (68); durante el proceso se reduce la densidad empacada y el tamaño del sólido mediante deshidratación, este proceso preserva el producto por la reducción de la actividad de agua y el contenido de humedad a niveles bajos para detener el crecimiento microbiano (69).

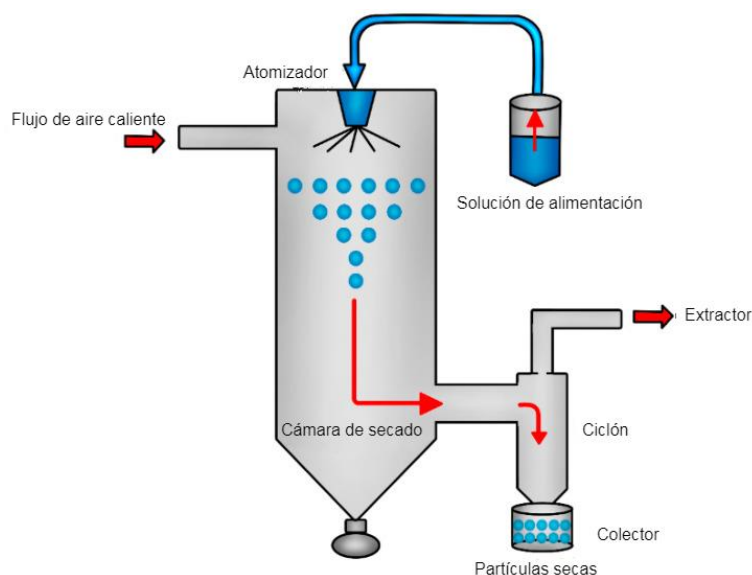


Figura 5. Obtención de micro partículas mediante secado por aspersión. El proceso de secado por aspersión se lleva a cabo en varias etapas. Primero, el líquido es ingresado al equipo, este entra en contacto con un flujo de aire caliente para ser evaporado, eliminando el exceso de agua, se elimina la humedad del producto. Finalmente, mide el contenido de humedad del producto para asegurarse de que se haya secado correctamente. **Tomado de Sosnik A et al 2015 (67).**

II. ANTECEDENTES

2.1 La granada y su relación con el estrés oxidativo.

Como se mencionó anteriormente, los radicales libres pueden causar daño a través de la oxidación de moléculas biológicas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (10). El estrés oxidativo suele estar presente en diversas enfermedades crónicas (1,3,70,71); se ha demostrado que una dieta alta en glucosa y rica en grasa propicia una inflamación, lo que sugiere que el estrés oxidativo puede alterar los procesos fisiológicos celulares (72).

La granada es un fruto con alto contenido de compuestos fenólicos solubles, con alta capacidad antioxidante (73), estos antioxidantes se encuentran principalmente en el jugo, sin embargo, se ha visto que también están presentes en otras partes del árbol de granada como la corteza, la flor, así como en semillas; incluso la cáscara (32). Se han realizado diversos estudios *in vitro* en donde se ha probado que los compuestos de la granada tienen un efecto positivo en la disminución de estrés oxidativo. Un estudio reciente realizado por Farhan y colaboradores (2022), analizaron las antocianidinas presentes en el jugo de granada, se trataron diversas líneas celulares de cáncer (próstata, mama y páncreas) evaluándose la inhibición de la proliferación de células cancerosas por parte de las antocianidinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina); todas las antocianidinas inhibieron el crecimiento de células cancerosas de una manera dependiente de la concentración, sin embargo se demostró que la inhibición es significativamente más fuerte en la delfinidina (74).

Tina Kostka y colaboradores (2020) realizó un estudio en donde se extrajeron los polifenoles del jugo de granada y fueron separados en una fracción de antocianina mediante cromatografía de absorción en membrana, la actividad de captación de radicales libres del extracto de granada XAD-7 y sus fracciones se evaluó mediante el ensayo de capacidad antioxidante equivalente Trolox y la espectroscopia de resonancia de espín electrónico; el extracto XAD-7 enriquecido y sus fracciones fueron capaces de proteger las células hepatocelulares humanas contra el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno (75).

Chang Liu y colaboradores (2021), realizaron un estudio utilizando extracto de polifenoles de jugo de granada. El extracto se eluyó con metanol (1.25-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para evaluar su efecto sobre el estado oxidativo e inflamatorio en queratinocitos de piel humana. Se observó que el jugo de granada inhibió significativamente la liberación de especies reactivas de oxígeno y aumentó la respuesta antioxidante celular. Además, en células HaCaT tratadas con 5-FU, el jugo de granada redujo significativamente los niveles de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; 2.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $p < 0.001$), interleucina-6 (IL-6; $p < 0.001$) e interleucina-1 β (IL-1 β ; $p < 0.001$) (51). Li y colaboradores (2022), evaluaron el efecto de un extracto de granada comercial estandarizado (PE; Pomella) y sus compuestos fenólicos punicalagina (PA), ácido elágico (EA) y urolitina A (UA) en la protección contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el estrés oxidativo y la citotoxicidad en células HaCaT de queratinocitos humanos; se observó que tanto el extracto de granada como los compuestos fenólicos redujeron la producción de ROS inducida por H_2O_2 con concentraciones de 50, 100, 200, 400 y 800 μM . El PE presentó una reducción de 1.03 veces, mientras que PA y EA presentó una reducción de 1.37 y 2.67 veces, respectivamente (76).

Benchagra y colaboradores (2021), realizó un estudio en el cual tuvo como propósito caracterizar la composición fenólica y el contenido de flavonoides y antocianinas en la cáscara y en el arilo de granada, además de la obtención de extracto fenólico de cáscara de granada (EFC) y extracto fenólico de arilo de granada (EFA); los resultados mostraron que el extracto de cáscara (EFC) es más rico en compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas que el extracto de arilo de granada (EFA). Esto sugiere que el extracto de cáscara de granada puede ser una fuente más potencial de compuestos antioxidantes que el extracto de arilo de granada.

De igual forma se han realizado estudios *in vivo* para probar los efectos de la granada. Un estudio realizado por Young-Eun Cho y colaboradores (2018) evaluaron si la granada protege contra la fuga inducida por el alcohol, la endotoxemia y el daño hepático inflamatorio, el estudio se realizó en ratas, las cuales tuvieron un tratamiento de 10 días con granada (600 mg/kg), se expusieron a 3 dosis orales de alcohol en exceso (5g/kg/dosis) utilizando dextrosa como control en intervalos de 12 h, los resultados mostraron que el tratamiento con extracto de granada redujo significativamente la inflamación hepática, además se observó una mejoría

en la función antioxidante en los ratones expuestos a estas condiciones. Lo que indica que puede ser beneficioso para la prevención y tratamiento de enfermedades hepáticas relacionadas con el consumo de alcohol (77).

Un estudio realizado por Yujue Wang y colaboradores (2018) mostraron los efectos de la suplementación con punicalagina (25, 50 o 100 mg/kg administrado los días 14 a 21 del embarazo) sobre la angiogénesis y el estrés oxidativo en ratas preñadas con hipertensión inducida (preeclamsia) con una dosis oral de éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME 50 mg/kg/día). Los resultados sugieren que la suplementación con punicalagina mejoró la angiogénesis fetal y disminuyó el estrés oxidativo en las ratas tratadas. Se concluyó que la punicalagina puede ser una opción terapéutica potencial para prevenir trastornos relacionados con la hipertensión en el embarazo (34).

Se han realizado estudios utilizando un microencapsulado de jugo de granada el cual se realizó mediante secado por aspersión, Álvarez y colaboradores (2021) utilizaron un microencapsulado de jugo de granada para evaluar los posibles efectos tóxicos en ratas Wistar y ratones CD-1. El estudio tuvo como objetivo evaluar la seguridad toxicológica del consumo de este microencapsulado y comprobar si su consumo pudiera tener algún impacto en la salud de los animales de prueba. Los resultados mostraron que la administración de este microencapsulado de jugo de granada en ratas y ratones no produjo efectos adversos en la salud. Se concluyó que el consumo de este microencapsulado es seguro y puede ser una opción potencialmente beneficiosa para mejorar la salud (78).

Dorantes y colaboradores (2020) realizó un estudio en donde se suplemento con 1g de microencapsulado de granada a 30 conejos Nueva Zelanda durante 30 días, posterior a la suplementación se tomaron datos bioquímicos de los grupos experimentales placebo (1g maltodextrina) y microencapsulado, se observó que el colesterol total y los triglicéridos disminuyeron significativamente 20.8% y 27.0% respectivamente en el grupo de microencapsulado, mientras que en el grupo placebo se mostró un aumento del 13.3% de las concentraciones de triglicéridos. También se observó una disminución del 26.5% en los niveles plasmáticos de triglicéridos HDL y aumento del 15.3 y 7.3% para el colesterol HDL y fosfolípidos HDL, respectivamente en el grupo de microencapsulado. Se midió la actividad

de PON1, los resultados mostraron que la suplementación con microencapsulado aumento el 13,5% la actividad de PON1 (79).

Estrada y colaboradores (2019), llevó a cabo un estudio el cual se realizó en 11 mujeres con síndrome coronario agudo, los pacientes se sometieron a una carga de lípidos que consistió en un almuerzo de 100 kcal que contenía 75 g de grasa para ser ingerido dentro de 20 minutos para inducir hipertrigliceridemia posprandial, posteriormente los pacientes consumieron 20 g de microencapsulado en 250 mL de agua diariamente, durante 30 días, posteriormente se tomaron muestras de sangre a las 4 y 8 h después de la comida para medir concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol, antes de la suplementación previa con microencapsulado las concentraciones de triglicéridos aumentaron significativamente en comparación con las condiciones de ayuno, los valores post-microencapsulado de trigliceridemia y colesterol fueron significativamente más bajos con tratamiento con microencapsulado. La actividad de PON1 su observó un aumento del 20% al 29% en la actividad de PON1 en ayunas a las 4 y 8 h respectivamente, en comparación con las condiciones previas al tratamiento (80).

2.2 Planteamiento del problema

Las terapias nutricionales se han enfocado en incrementar el consumo de alimentos ricos en antioxidantes para reducir los efectos del estrés oxidativo y disminuir, por consiguiente, los factores de riesgo metabólico. En años recientes, se ha investigado la relación entre el consumo de antioxidantes provenientes de fuentes naturales(81). El jugo de granada es rico en compuestos antioxidantes, particularmente en elagitaninos (32,41). El consumo diario de esta fruta es interrumpido por ser un fruto de temporada. Para remediar esto, se ha desarrollado un método para elaborar microcápsulas de jugo de granada mediante secado por aspersión, que encapsulan sus compuestos. Hasta ahora, las microcápsulas han mostrado ser un polvo estable con una larga vida útil y han demostrado tener efectos benéficos para la salud (78–80,82–84). Sin embargo, es necesario comprobar que las microcápsulas de granada contienen los mismos compuestos fenólicos que la fruta fresca. En este estudio se identificaron los compuestos fenólicos tanto en las microcápsulas como en el jugo fresco de granada para poder compararlos. Posteriormente, se indujo el estrés oxidativo mediante el compuesto químico de Asc-Cu⁺⁺ en cultivo de hepatocitos con el objetivo de probar diferentes concentraciones de microencapsulado y evaluar su capacidad de protección frente al estrés oxidativo.

III. Justificación

El estrés oxidativo es común en enfermedades crónicas, por lo que es necesario tener una actividad antioxidante que neutralice este efecto, ya que por alguna razón el sistema antioxidante endógeno se ve superado. En la actualidad existe un auge por el uso de antioxidantes provenientes de fuentes naturales como plantas, vegetales, raíces, hojas, frutos, etc. El tener antioxidantes naturales con alta capacidad antioxidante representa una forma paralela de contrarrestar los efectos o progreso de las enfermedades crónicas.

En recientes años el interés del estudio de la granada se ha incrementado gracias a sus compuestos antioxidantes. Sin embargo, por ser fruto de temporada su consumo es limitado. Es por ello que se elaboró un microencapsulado de jugo de granada, lo que significa que se podría consumir en cualquier época del año, al ser un polvo estable. El poder demostrar que el microencapsulado tiene propiedades antioxidantes, éste se podría incluir en la dieta cotidiana de manera constante y con ello tener una barrera antioxidante extra, además de la barrera antioxidante endógena. Esto no solo ayudaría a contrarrestar los efectos de las enfermedades crónicas, sino que sería un abordaje preventivo y coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades con la finalidad de retrasar el desarrollo de las enfermedades.

IV. Hipótesis

El microencapsulado de jugo de granada protege contra el daño celular en hepatocitos provocado por los radicales libres producidos por Asc/Cu⁺⁺.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar los compuestos fenólicos del microencapsulado de granada y evaluarlo como un agente protector contra el daño celular de hepatocitos Huh-7 producido por la generación de radicales libres a partir de Asc/Cu⁺⁺ en cultivo de hepatocitos.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar los compuestos fenólicos presentes en el microencapsulado de granada por la técnica HPLC para compararlos con los compuestos del jugo fresco.
2. Evaluar la citotoxicidad del microencapsulado de granada en hepatocitos por el método de MTT para establecer concentraciones.
3. Realizar cinéticas de daño celular en hepatocitos por Asc/Cu⁺⁺ para establecer concentraciones letales.
4. Realizar ensayos de protección con diferentes concentraciones de microencapsulado de jugo de granada contra el daño celular en hepatocitos ocasionado por Asc/Cu⁺⁺ para evaluar si existe una protección.

VI. Materiales y métodos

6.1 Tipo y diseño de estudio

La presente investigación es de tipo experimental longitudinal.

6.2 Diseño experimental de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Independientes			
Microencapsulado de granada	Baya globular con una corteza coriácea, de color rojo.	Componente principal de microencapsulado	g
Dependientes			
Viabilidad celular	Mide la proporción de células vivas luego un procedimiento.	Porcentaje de células vivas después de estar sometidas a ciertos tratamientos.	%
Toxicidad de microencapsulado	Capacidad de una sustancia química de producir daños en el ser humano.	Determinación de toxicidad del microencapsulado por el método de azul tripano	Grado de toxicidad

Diagrama de diseño experimental

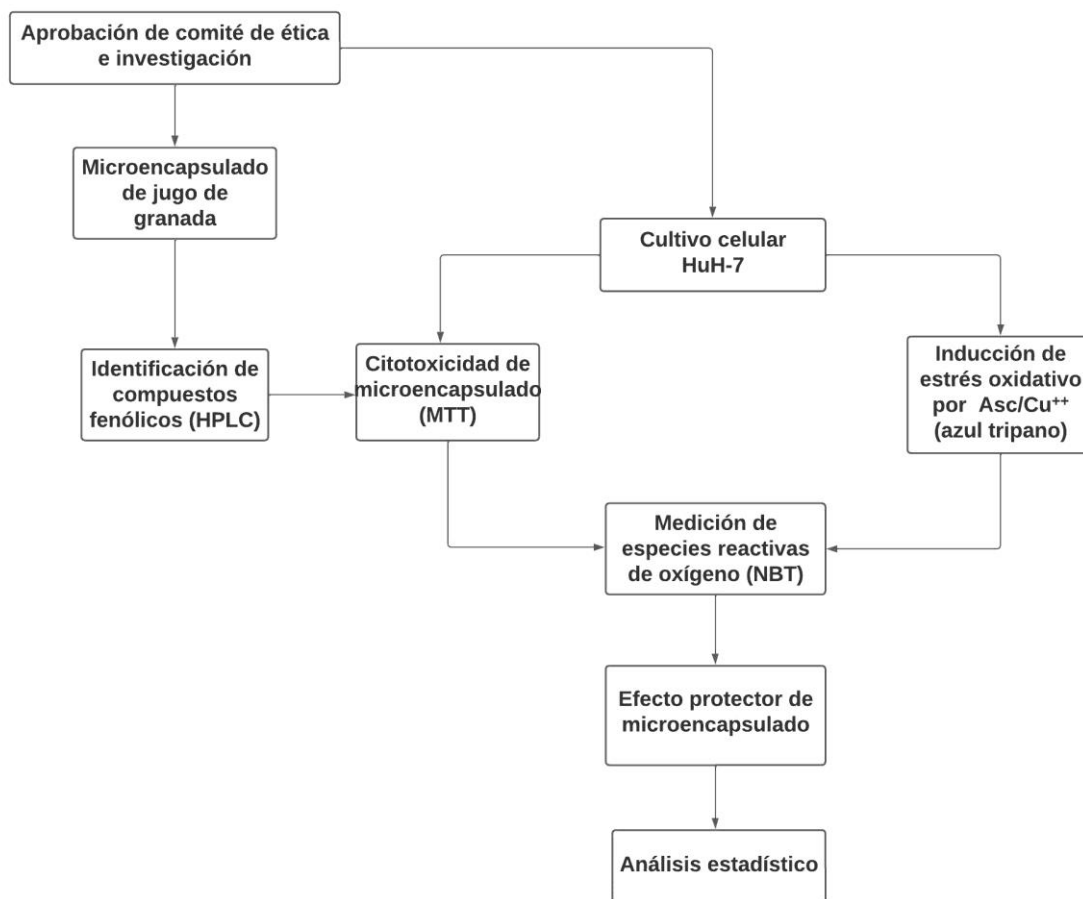


Figura 6. Diagrama de diseño experimental

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Material biológico

Se utilizó la línea celular de hepatocitos Huh-7 que corresponden a células tumorigénicas tipo epitelial, donada por la Dra. Blanca Estela García Pérez. La línea celular HuH7 se cultivó en medio Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium- high glucosa Sigma (DMEM) suplementado con 5% de Suero fetal bovino GIBCO (SFB) en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

6.3.2 Cultivo celular

La línea celular de hepatocitos HuH-7, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 5% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), a 37°C en un incubador humidificado (5% de CO₂, 95% de aire), todas las manipulaciones fueron realizadas en un gabinete de seguridad biológica (marca Ecoshel, clase IIA2).

6.3.3 Microencapsulado de granada

Las granadas fueron recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México, fueron seleccionadas, lavadas y peladas. El proceso de elaboración se describe en Estrada Luna y colaboradores (2018), la producción a escala y apto para consumo humano lo realizó la compañía Granding International, S.A. de C.V., Jiutepec Morelos, México (82).

6.3.4 Identificación de compuestos fenólicos en microencapsulado de granada por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La identificación de ácidos fenólicos se llevó a cabo por HPLC, las muestras se resuspendieron en 1 mL de eluyente A (agua acidificada 1%), y fueron inyectadas (20 µL) en un sistema de HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de matriz de fotodiodos y una columna de fase inversa C18 (tamaño

de partícula 5 μm , 4.6 mm de diámetro, 250 mm de largo; Thermo Scientific Sunnyvale, CA, EE. UU). Las fases móviles utilizadas fueron agua acidificada con ácido trifluoroacético al 1% (eluyente A) y agua acidificada (ácido acético al 0.5%), etanol (10:90, eluyente B). Los estándares y las muestras se analizaron usando un programa de gradiente: 0% B, a un caudal de 0.4 mL/min. Los compuestos fenólicos totales se determinaron como la suma de ácido siríngico (SP), ácido p-hidroxibenzoico (HP) y catequina (CT) (85).

6.3.5 Viabilidad celular por el método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para determinar citotoxicidad de microencapsulado de granada en hepatocitos HuH-7

Se preparó una monocapa con 25,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos, las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de microencapsulado de granada, posteriormente se retiró el medio con el tratamiento, se lavaron con 100 μL de Hank's (solución salina de equilibrio), se agregaron 100 μL de MTT a cada pozo, se incubaron 2 h a 37°C en un incubador humidificado (5% de CO_2 , 95% de aire). Pasado el tiempo se lavaron con Hank's y se añadieron 50 μL de DMSO para disolver las sales de formazán, se homogeneizó y se leyó en un lector de microplaca a 540 nm.

6.3.6 Viabilidad celular por exclusión de azul tripano

En cuanto a las concentraciones de Asc/ Cu^{++} (6.25/25 μM , 12.5/25 μM , 25/25 μM 50/25 μM) se empleó el método azul tripano. Empleando una placa de 48 pozos estéril se sembraron 10,000 células en 200 μL de medio, las células se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 h, para permitir que las células se adhieran a la placa, una vez transcurridas las 24 h se retiró el estímulo y se realizó un lavado con Hank's. Se agregó medio y Asc/ Cu^{++} (12.5/25 μM), posteriormente se agregaron 100 μL de azul tripano al cultivo celular. La placa se observó al microscopio contando 100 células en tres zonas distintas de cada pozo, de las cuales se deben diferenciar el número de células viables y no viables (estas se diferencian ya que las células viables no estarán teñidas, por el contrario, las células no viables se verán azules) obteniéndose así un porcentaje de viabilidad celular. Se utilizó este mismo método para determinación del efecto protector de microencapsulado en células Huh-7, se agregó el

microencapsulado (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para una pre-incubación de 10 minutos, se retiró el microencapsulado y se incubaron las células durante 1 y 2 h respectivamente con medio y Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μM), se retiró el medio y posteriormente se agregaron 100 μL de azul tripano al cultivo celular, la placa se observó al microscopio siguiendo el mismo procedimiento para el conteo de las células.

6.3.7 Medición de la formación de ROS empleando el método azul de nitrato-tetrazolio (NBT) en células Huh-7

En una placa de 48 pozos con aproximadamente 40,000 células cada pozo, se retiró el medio de cultivo, se agregó Asc/Cu⁺⁺ (2/25 μM , 2/40 μM , 2/80 μM) y se incubó 4, 24, 48 y 72 h, posteriormente, se realizaron 3 lavados con 100 μL de Hank`s. Se añadieron 100 μL de NBT, posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una incubadora (5% de CO₂, 95% de aire), se retiró el NBT y se realizaron 3 lavados con Hank`s, se agregaron 54 μL de KOH más 46 μL de DMSO a cada pozo, este precipitado se leyó en espectrofotómetro a 630 nm.

6.4 Análisis estadístico

Para encontrar diferencias estadísticamente significativas, la prueba de ANOVA de una vía fue aplicada para los ensayos de IC₅₀, especies reactivas de oxígeno y toxicidad de Asc-Cu⁺⁺. Mientras que la prueba de ANOVA de dos vías fue aplicada para los ensayos de citotoxicidad, NBT, concentración letal y de protección. Para ello, se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.0.1. (GraphPad Software, San Diego, CA).

VII Resultados

7.1 Identificación de compuestos fenólicos en jugo y microencapsulado de granada

Se identificaron por HPLC 14 compuestos fenólicos a partir de muestras de microencapsulado y jugo de granada de diferentes variedades (**Figura 7 y Tabla 5**). Para el caso del jugo, se analizaron tres variedades de granada: roji-verde, verde y roja. En general, el jugo de granada roji-verde fue el jugo que tuvo valores más altos de compuestos fenólicos excepto para el compuesto ácido 2-5 dihidroxibenzoico. En el caso del microencapsulado se observa que tuvo valores más altos en algunos compuestos tales como: ácido protocateico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido elágico y ácido sinápico.

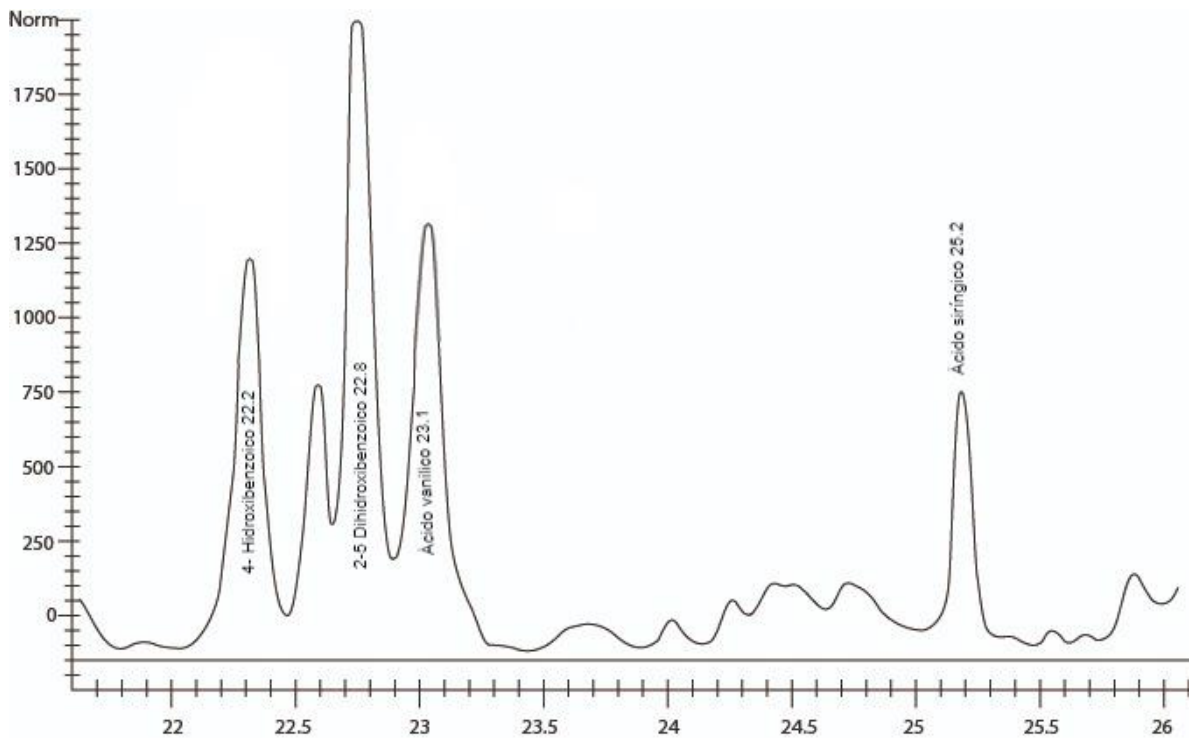


Figura 7. Perfil cromatográfico de polifenoles solubles de microencapsulado de granada. Se muestran algunos compuestos fenólicos identificados en el microencapsulado de granada.

Tabla 5. Identificación de compuestos fenólicos en jugo y microencapsulado de granada.

Nombre	Microencapsulado (mg/100 g)	Granada roji-verde (mg/100 ml jugo)	Granada verde (mg/100 ml jugo)	Granada roja (mg/100 ml jugo)
Ácido gálico	3.16	3.21	2.46	2.09
Ácido protocateico	0.28	ND	0.06	0.14
Ácido 4-Hidroxibenzoico	1.90	1.63	0.99	0.24
Ácido 2-5-Dihidroxibenzoico	13.16	8.35	16.24	13.43
Ácido vanílico	2.12	2.41	0.06	0.44
Ácido sirínico	0.13	0.10	ND	ND
Ácido p-cumárico	0.07	0.26	ND	ND
Ácido elágico	0.58	ND	ND	0.13
Ácido sinápico	4.13	0.60	0.53	ND
Quercetina	0.67	ND	ND	ND
Ácido trans-cinámico	0.20	ND	ND	ND
Ácido cafeico	ND	1.13	ND	ND
Ácido clorogénico	ND	2.29	1.00	0.72

ND: No detectable

7.2 Citotoxicidad de microencapsulado de granada

Se probaron concentraciones crecientes de microencapsulado de granada (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos 4, 24, 48, y 72 h para establecer toxicidad. En la **Figura 8** se observa que, probando las diferentes concentraciones a los diferentes tiempos, no hay citotoxicidad, ya que existe 100% de sobrevivencia en todas las concentraciones de microencapsulado comparado con el grupo de células control.

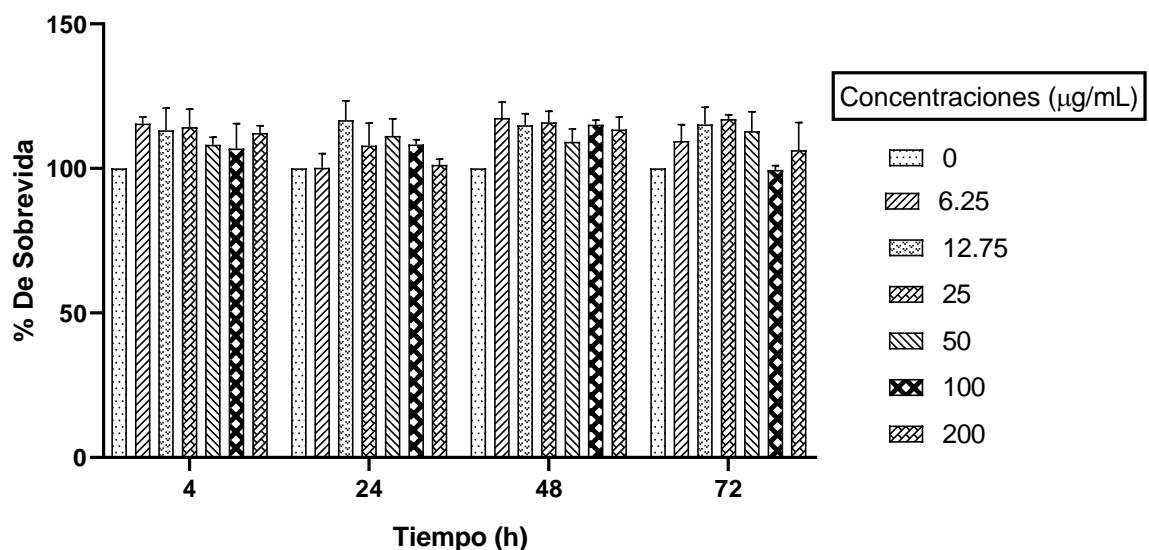


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de células Huh7 tratadas con diferentes concentraciones de microencapsulado de granada. Efecto del microencapsulado de granada sobre la viabilidad de células Huh-7. Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de microencapsulado de granada (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) y por el método de MTT se determinó la viabilidad celular. Los ensayos se realizaron por triplicados y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías. No se obtuvieron diferencias significativas.

7.3 Generación de especies reactivas de oxígeno por microencapsulado de granada

Para demostrar que el microencapsulado de granada no produce especies reactivas de oxígeno, las células fueron incubadas con microencapsulado de granada (12.5, 50 y 100 µg/mL). Como se observa en la **Figura 9**, las células incubadas con las diferentes concentraciones de microencapsulado no mostraron generación de especies reactivas de oxígeno. Las concentraciones de microencapsulado 50 y 100 µg/mL incubadas durante 4 y 72 h mostraron diferencias significativamente más bajas en comparación con el control.

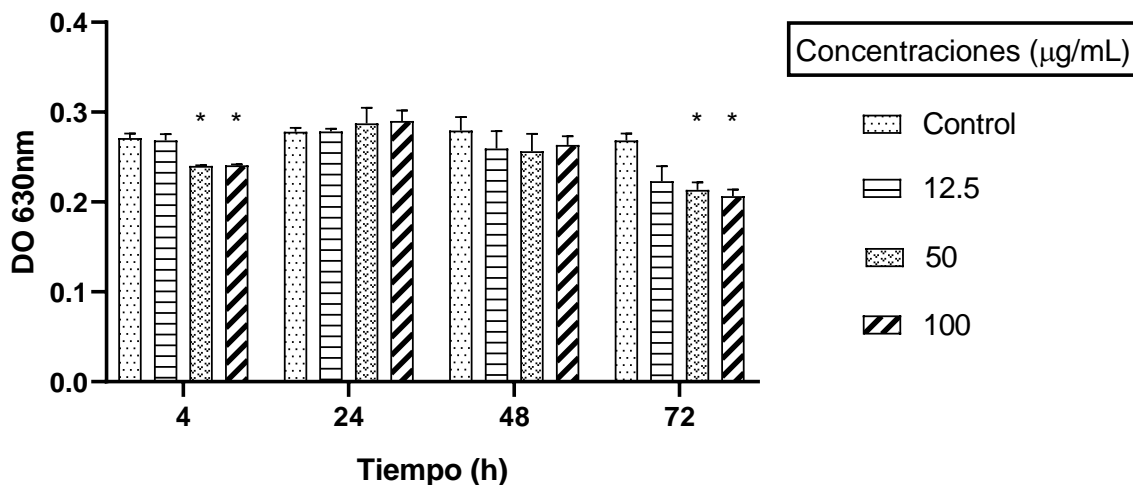


Figura 9. Generación de especies reactivas de oxígeno en células Huh-7 incubadas con microencapsulado. Efecto de microencapsulado de granada sobre generación de ROS en células Huh-7. Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de microencapsulado (12.5, 50 y 100 µg/mL), y utilizando el método NBT para determinar ROS. Los ensayos se realizaron por triplicados y un análisis estadístico ANOVA de dos vías comparando el control contra las diferentes concentraciones de microencapsulado y el tiempo fue realizado. Las concentraciones de microencapsulado tuvieron los mismos valores que los controles, en el caso de la concentración de 50 y 100 µg/mL. incubadas durante 4 y 72 h mostraron diferencias significativamente más bajas en comparación con el control. (* p<0.05).

7.4 Determinación de la concentración letal de Asc/Cu⁺⁺ en células Huh-7

Para encontrar el IC₅₀ se probaron diferentes concentraciones de Asc (.5, 1 y 2 µM) y Cu⁺⁺ (25, 50 y 100 µM) a diferentes tiempos. Se observa que a concentraciones de 1-100, 2-25, 2-50, 2-100 µM disminuyeron de forma significativa la sobrevivencia celular, aunque la IC₅₀ se encontró a la concentración de 2/25 de Asc/Cu⁺⁺ y a 4 h de incubación (**Figura 10**).

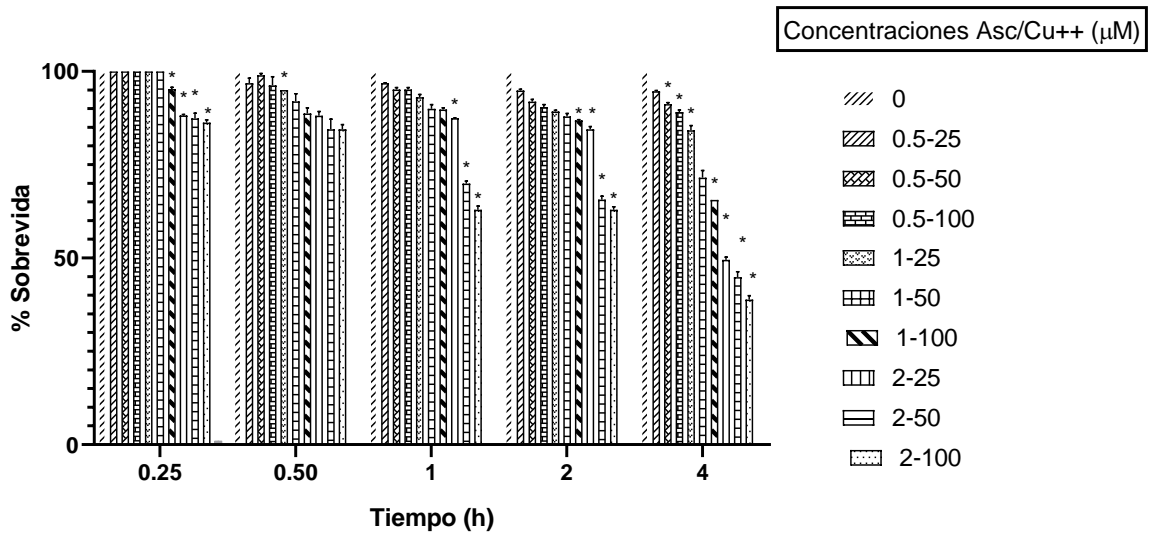


Figura 10. Concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ para determinar el IC₅₀ en células Huh-7. Efecto de la combinación de Asc/Cu⁺⁺ a diferentes concentraciones. Monocapas celulares fueron incubadas con diferentes concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ (0.5/25, 0.5/50, 0.5/100, 1/25, 1/50, 1/100, 2/25, 2/50, 2/100 µM) durante 0.25, 0.50, 1, 2 y 4 h, alcanzando el IC₅₀ en la concentración de 2/25 µM por una incubación de 4 h. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías comparando el control con las diferentes concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ (* p<0.05).

7.5 Determinación del IC₅₀ en células Huh-7 incubadas con Asc/Cu⁺⁺ en células Huh-7

Para corroborar el resultado anterior, las células Huh-7 fueron incubadas durante 1,2,3, y 4 h con una concentración de Asc/Cu⁺⁺ (2/25µM). Como se puede observar (**Figura 11**) el porcentaje de sobrevivencia disminuyó de manera significativa comparado con el grupo control, se observó 87.2, 85.0, 75 y 50% a las 1, 2 3 y 4 h respectivamente de sobrevida. De esta forma la IC₅₀ se encontró en la concentración de 2/25 µM Asc/Cu⁺⁺ a las 4 h (p<0.0001).

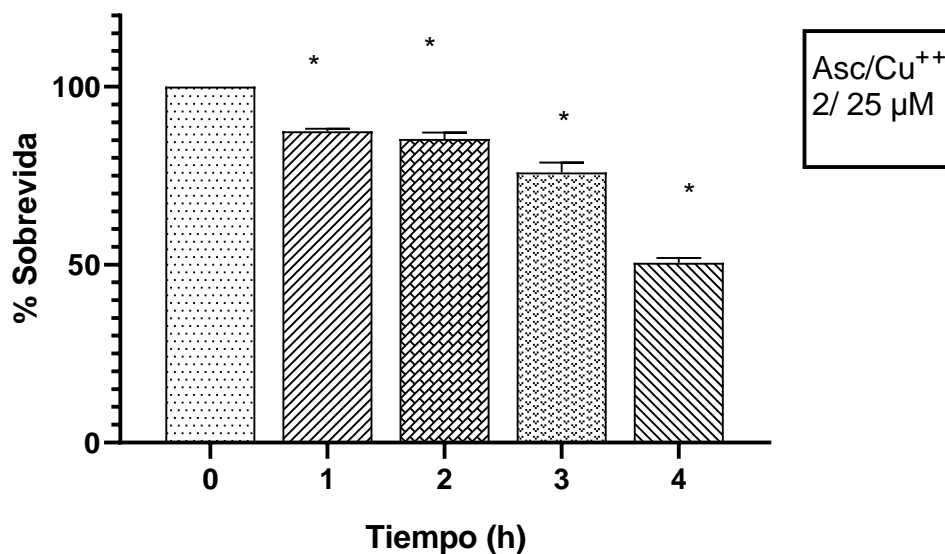


Figura 11. Porcentaje de sobrevida en células Huh-7 incubadas con Asc/Cu⁺⁺. Efecto de la incubación de Asc/Cu⁺⁺ en células Huh-7. Monocapas celulares fueron estimuladas con ASC/Cu⁺⁺ (2/25μM) durante 1, 2, 3 y 4 h. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de una vía. (p<0.0001)

7.6 Especies reactivas de oxígeno en células HuH-7 posterior a incubación con Asc/Cu⁺⁺

Para demostrar que la mezcla Asc/Cu⁺⁺ causa daño a las células, se incubaron células HuH-7 con (2/25μM, 2/50μM, 2/100μM). En la **Figura 12** se observa que la concentración de Asc/Cu⁺⁺ 2/25 μM generó menor sobrevivencia de acuerdo con el método que se utilizó.

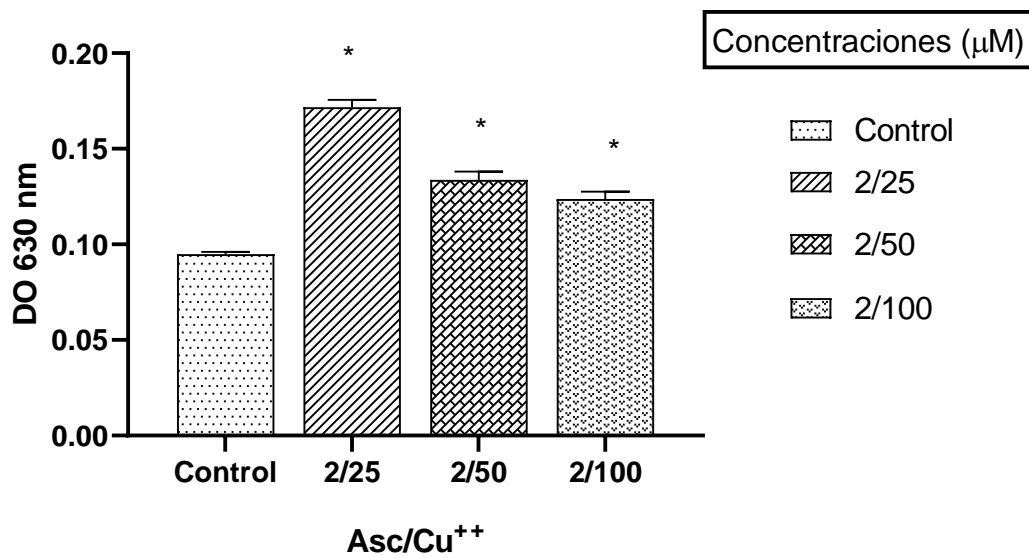


Figura 12. Generación de especies reactivas de oxígeno posterior a incubación con Asc/Cu⁺⁺. Efecto de Asc/Cu⁺⁺ sobre la generación de ROS en células HuH7. Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ 2/25 μM. se midió la generación de ROS por el método NBT. Los ensayos se realizaron por triplicados y se realizó análisis estadístico ANOVA de una vía. (*p<0.0001).

A fin de alcanzar mayor porcentaje de células no viables, se utilizaron concentraciones más altas de Asc/Cu⁺⁺ (6.25/25μM, 12.5/25μM, 25/25μM 50/25μM), sin embargo, no se utilizó el método MTT ya que al momento de hacer la lectura había interferencia entre Asc/Cu⁺⁺ y MTT, por lo que se empleó el método de azul tripano. Para este caso, en la **Figura 13** se observa las concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ (6.25, 12.5, 25, 50 μM/25 μM) incubadas 1 h se tuvo el 11, 50, 83 y 97% de células no viables, respectivamente; a 2 h: 20, 80, 97 y 100%, respectivamente; a 3 h: 32, 91, 100, y 100% respectivamente y finalmente a las 4 h: 48, 100, 100, y 100% de células no viables. Encontrando nuevamente el IC₅₀ en la concentración de 12.5/25 μM incubadas a 1 h, 80 a 2 h y 91% de células no viables con una incubación de 3 h respectivamente, por lo que se decidió seguir trabajando con la concentración de Asc/Cu⁺⁺ 12.5/25 μM.

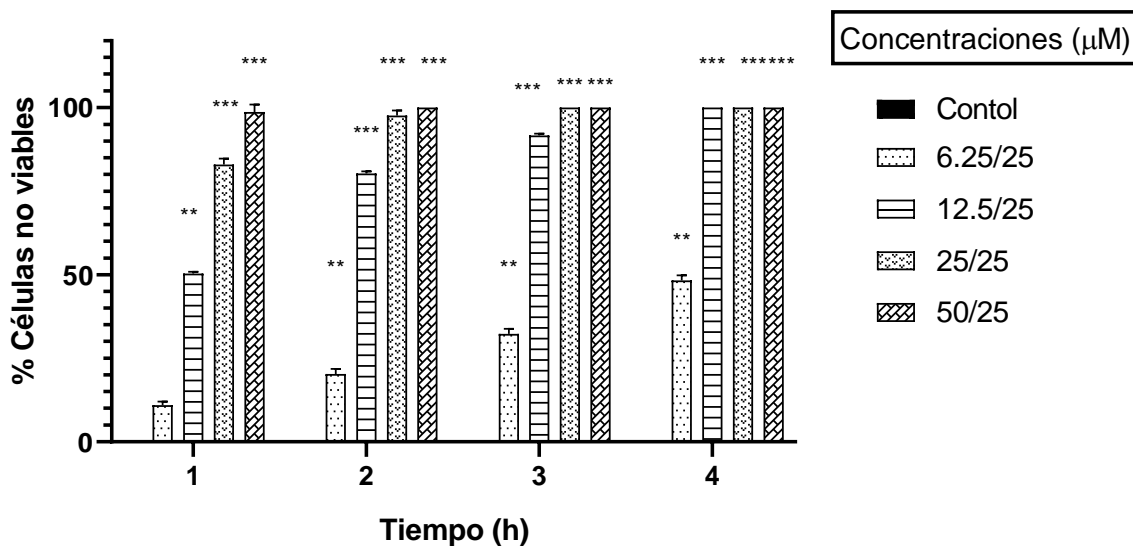


Figura 13. Porcentaje de células no viables HuH-7 tratadas con Asc/Cu⁺⁺. Efecto de Asc/Cu⁺⁺ sobre la viabilidad de células Huh-7. Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ (6.25, 12.5, 25, 50 μ M/50 μ M) durante 1,2,3 y 4 h empleando el método de azultripano. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías comparando el control con las diferentes concentraciones de Asc/Cu⁺⁺ y tiempo. Mostrando diferencias significativas (* $p < 0.005$), (** $p < 0.001$), (***) $p < 0.0001$).

Para evaluar el efecto de Asc y Cu⁺⁺ por separado, las células se incubaron con 12.5 μ M Asc y Cu⁺⁺ 25 μ M, como se muestra en la **Figura 14**, se observó que el Asc causó mayor porcentaje de células no viables que el Cu⁺⁺ alcanzó alrededor de 20% de células no viables, mientras que la mezcla Asc/Cu⁺⁺ tuvieron % de células no viables de 50, 80, 91, y 100% respectivamente.

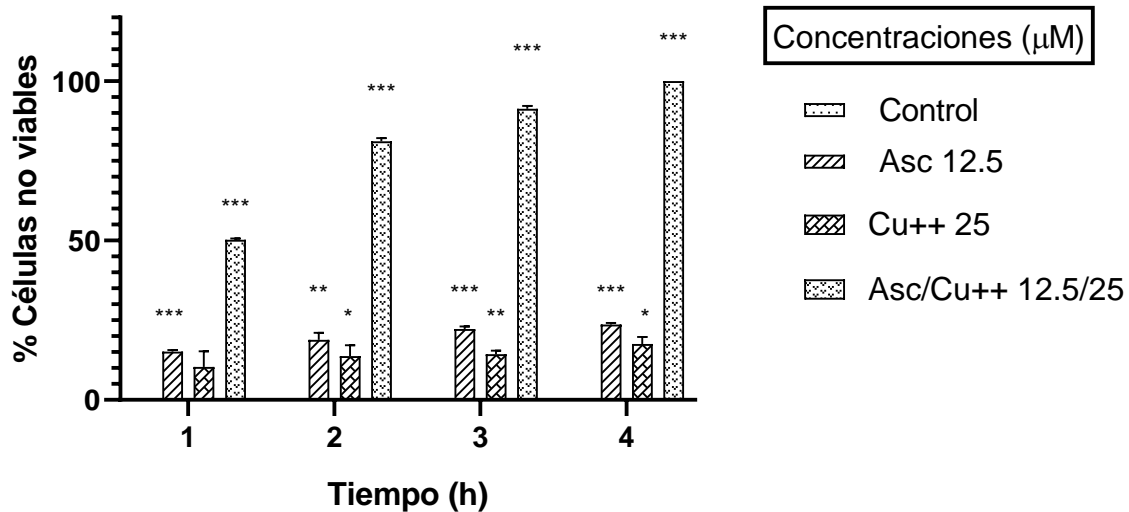


Figura 14. Porcentaje de células no viables Huh-7 estimuladas con Asc, Cu⁺⁺ y Asc/Cu⁺⁺. Efecto de Asc y Cu⁺⁺ sobre la viabilidad de células epiteliales. Monocapas celulares fueron estimuladas con Asc 12.5 μ M y Cu⁺⁺ 25 μ M por separada y la mezcla de Asc/Cu⁺⁺ 12.5/25 μ M incubadas durante 1,2,3, y 4 h. Utilizando el método azul tripano. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías (* p<0.005), (** p<0.001), (***)p<0.0001).

7.7 Ensayo de protección del microencapsulado en hepatocitos HuH-7 tratados con concentraciones letales Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μ M)

Células que se incubaron con diferentes concentraciones de microencapsulado de granada (12.5, 50, 100 y 200 μ g/mL) durante 2, 4 y 24 h, fueron posteriormente tratadas con la concentración letal de Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μ M) durante 1h (**Figura 15 A**), 2h (**Figura 15 B**), y 3h (**Figura 15 C**). En las tres diferentes horas probadas, el microencapsulado de granada no logró disminuir el porcentaje de células no viables a las diferentes concentraciones de microencapsulado con respecto a las células tratadas con las concentraciones letal.

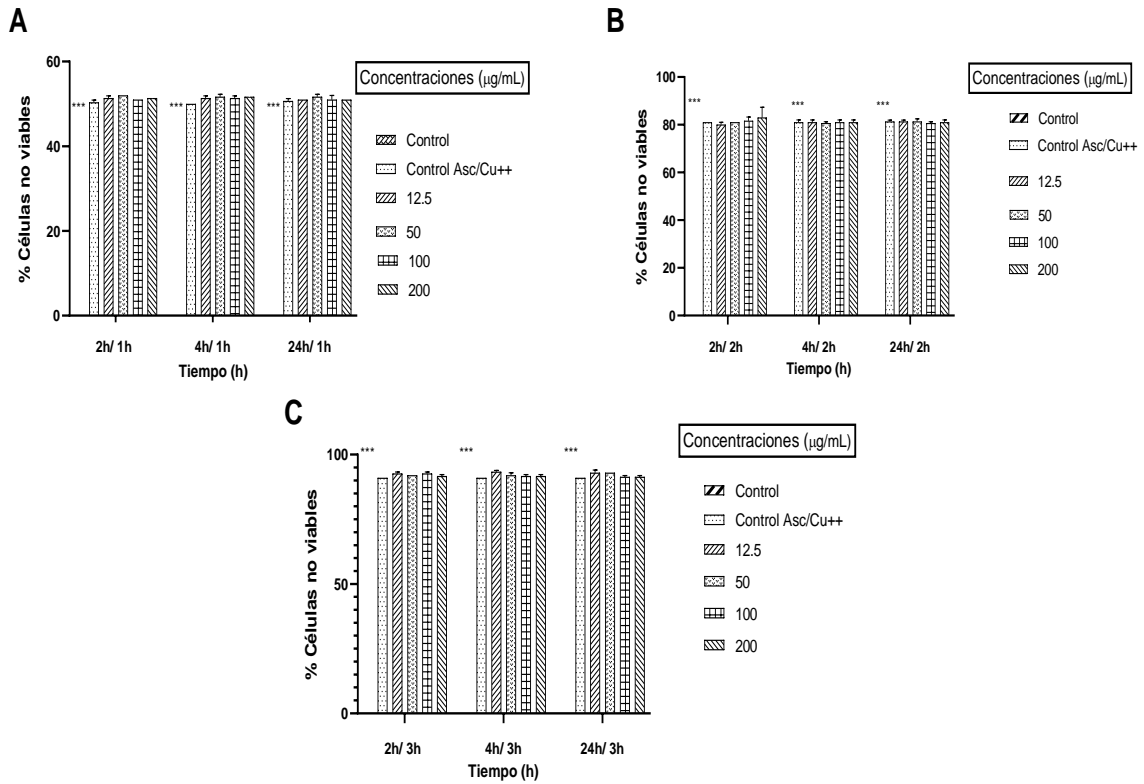


Figura 15. Porcentaje de células no viables estimuladas con microencapsulado de granada y posteriormente incubadas con Asc/Cu⁺⁺. Efecto de estimulación con microencapsulado de granada y posterior incubación con Asc/Cu⁺⁺. Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de microencapsulado de granada (12.5, 50, 100 y 200 µg/mL) durante 2, 4 y 24 h respectivamente, posteriormente se incubaron con Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 µM) durante 1 h (A), 2 h (B), y 3 h (C), se utilizó el método azul tripano. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías (p<0.0001).

El mismo experimento se realizó, pero ahora utilizando como controles con antioxidantes jugo de granada (**Figura 16 A**), trolox (**Figura 16 B**) y ácido gálico (**Figura 16 C**).

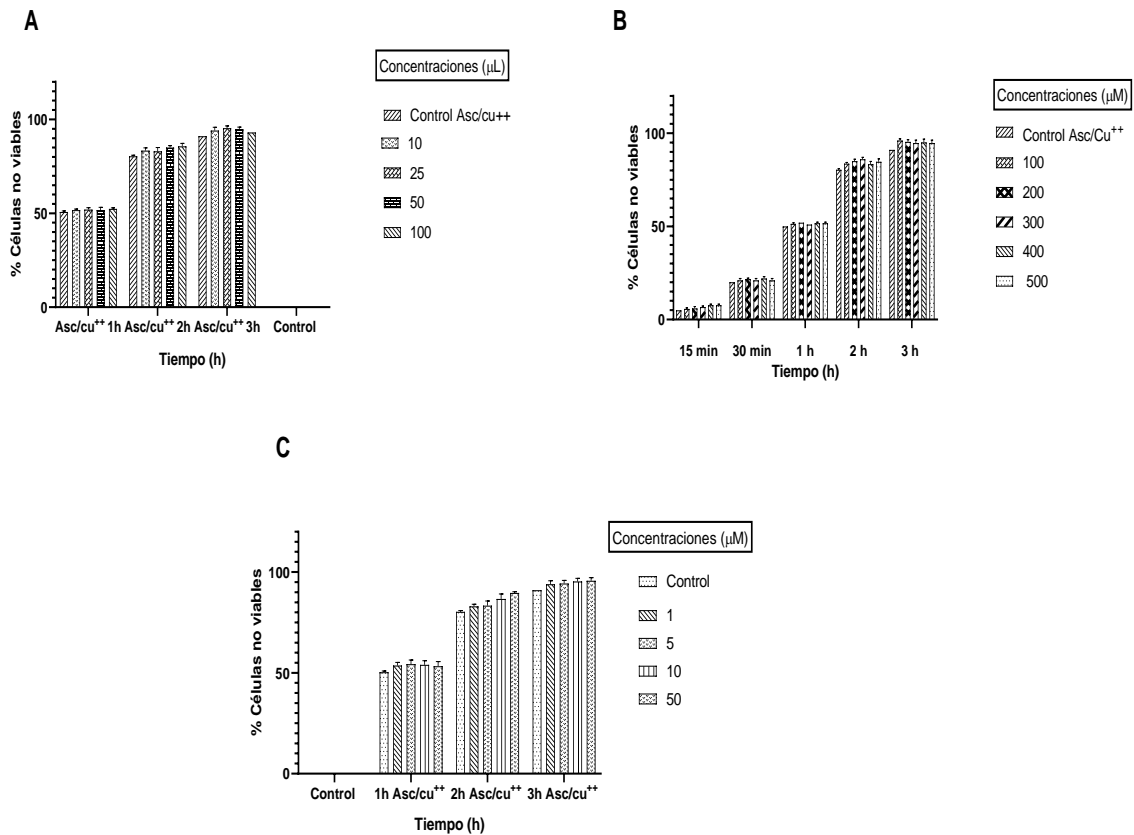


Figura 16. Porcentaje de células no viables estimuladas con jugo de granada, trolox y ácido gálico y posteriormente incubadas con Asc/Cu⁺⁺. Efecto del microencapsulado de jugo de granada, trolox y ácido gálico sobre células Huh-7 incubadas con Asc/Cu⁺⁺. **(A)** Monocapas celulares fueron estimuladas con diferentes concentraciones de jugo de granada (10, 25, 50 y 100 μL) y posteriormente con Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μM). **(B)** Monocapas celulares estimuladas con diferentes concentraciones de trolox (100, 200, 300, 400, y 500 μM), y posteriormente con Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μM). **(C)** Monocapas celulares estimuladas con diferentes concentraciones de ácido gálico (1, 5, 10, y 50 μM) y Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μM). Se utilizó el método azul tripano. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías. No se encontraron diferencias significativas.

VIII Discusión

Los efectos de los antioxidantes son actualmente motivo de estudio por su capacidad para disminuir el impacto de los daños oxidativos en diversas moléculas de la célula (40). La ingesta de antioxidantes dietarios presentes en diversos alimentos, especialmente frutas y verduras, puede reducir los efectos nocivos del estrés oxidativo en la salud humana. Además, esto puede mejorar la esperanza y calidad de vida de las personas (81). El jugo de granada posee alta capacidad antioxidante incluso superando a otros frutos, como la uva, naranja, toronja e incluso al mismo arándano (36,43,53,86–88). En el presente estudio, se trabajó con un microencapsulado de jugo de granada previamente elaborado por el grupo de investigación y que ha tenido diversas aplicaciones (78–80,82–84).

Se identificaron 11 compuestos tanto en las variedades del fruto y en el microencapsulado (**Tabla 5**). Los resultados coinciden con lo reportado por Ostberg y colaboradores (2011), en donde identificaron compuestos de jugo de granada peruana por HPLC utilizando una columna C18, identificando 14 compuestos ácido protocateico, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, quercetina, ácido feruloiquínico, punicalina, punicalagina, ácido elágico, ácido gálico, ácido protocateico, y quercetina (89).

Como se han descrito, algunos compuestos fenólicos fueron identificados en el microencapsulado (**Figura 7**), lo que confirma que se encapsularon fenoles y que la encapsulación permite concentrarlos ya que se encontraron mayor concentración de compuestos en el microencapsulado de granada como por ejemplo ácido 4 hidroxibenzoico, ácido 2-5 dihidroxibenzoico, ácido siríngico, y ácido sinápico al compararse con el jugo; como se sabe, la microencapsulación es un proceso que permite que los compuestos encapsulados sean más estables (38,61,64), esto se evidencia en el aumento de la actividad biológica de estos; tomando en cuenta los resultados y las evidencias previas, se ha demostrado que el proceso de microencapsulado de granada conserva los compuestos presentes en el jugo fresco. Esto garantiza que dichos compuestos permanezcan intactos y tenga una vida útil más amplia, lo que permite obtener el microencapsulado de granada incluso cuando el fruto no está en temporada.

Los ensayos de citotoxicidad de microencapsulado en células Huh-7, demostraron que el microencapsulado de granada no fue citotóxico, este resultado fue similar al obtenido por

Álvarez y colaboradores (2021), en donde utilizó diferentes concentraciones de microencapsulado en cultivo de células pulmonares A549 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$.); adicionalmente, también realizó ensayos de dosis letal media (DL_{50}) en ratones CD_1 y ratas Wistar alimentados con dosis altas de microencapsulado de granada (3,000 mg/kg de peso) y no causó la muerte ni daños en hígado, ni riñón (78).

El ensayo NBT es un ensayo colorimétrico el cual en su estado reducido se produce formazán es cual es de color azul, pero su oxidación por radicales libres de oxígeno produce un producto incoloro, ya que los radicales libres actúan como agente oxidante aceptando electrones del NBT y reduciendo su estado de oxidación; este método mostró que el microencapsulado de granada a diferentes concentraciones no genera ROS en células Huh-7. Lo cual indica que el microencapsulado no es dañino para la salud.

En 1894 Henry Fenton explica como la combinación de sales de hierro y peróxido de hidrógeno tiene un efecto catalítico a lo que se le conoce como reacción de Fenton.(27,90). Está bien establecido que el ácido ascórbico en presencia de metales como el Fe^{+++} y el Cu^{++} tiene la capacidad de producir radicales libres debido a su capacidad para reducir Fe^{+++} y Cu^{++} en Fe^{++} y Cu^+ (9,11,27,90).

En este trabajo, se empleó un modelo de estrés oxidativo provocado por la mezcla de ácido Asc/ Cu^{++} que como se mencionó, se generan radicales $\cdot\text{OH}$ (91,92). Como se muestra en la **Figura 10**, se probaron diferentes concentraciones de Asc/ Cu^{++} , alcanzando el IC_{50} en la concentración de 2/25 μM por una incubación de 4 h. Con la finalidad de comprobar que la mezcla de Asc/ Cu^{++} genera radicales libres se utilizó la prueba de NBT incubando células con Asc/ Cu^{++} (2/25, 2/50, 2/100 μM). Se observó una mayor generación de especies reactivas de oxígeno en la concentración de Asc/ Cu^{++} 2/25 μM ., por lo que se confirma lo previamente reportado por Barry Halliwell y colaboradores (2012) sobre la reacción de Fenton (11,90).

Demostramos que la viabilidad disminuye al aumentar concentraciones de Asc/ Cu^{++} . Debido a la interferencia del Asc/ Cu^{++} con el reactivo MTT en la lectura, esto puede comprobarse con un estudio realizado por Bruggisser R y colaboradores (2002), en el cual observaron que la presencia de antioxidantes puede interferir con el ensayo de MTT, dando resultados falsos positivos, demostraron que los antioxidantes como el ácido ascórbico y kaempferol reducen directamente el MTT a formazán en ausencia de células viables produciendo una señal que

indica falsamente la viabilidad celular, se encontró que esta interferencia depende de la dosis, con concentraciones más altas de antioxidantes que conduce a una mayor interferencia.(93), por lo tanto, se utilizó el método azul tripano para realizar los análisis correspondientes, en la **Figura 13** muestra que las concentraciones letales fueron (12.5/25 μ M), logrando niveles de 50, 80 y 91% de células no viables. Se probaron diferentes concentraciones de microencapsulado y Asc/Cu⁺⁺ (12.5/25 μ M) con la finalidad de encontrar protección contra el daño celular generado por los radicales del oxígeno, sin embargo, se puede observar que en ningún caso el porcentaje de células no viables disminuyó en los tiempos señalados, aun cuando se probaron antioxidantes reconocidos como el trolox, ácido gálico y jugo fresco de granada; esto pudo deberse al nivel de daño generado en las células; por lo que no es posible establecer si el microencapsulado protege, ya que los controles con antioxidantes no tuvieron ningún efecto sobre las células. Por otra parte, Halliwell et al.en 2011 (90) menciona que, en los cultivos celulares puede haber un estrés oxidativo no fisiológico debido a condiciones subóptimas de cultivo como la falta de nutrientes esenciales, sin embargo, los cultivos celulares pueden ser capaces de adaptarse y cambiar sus propiedades, un ejemplo de esto es la tendencia de las células madre embrionarias a mutar en cultivo celular; así mismo menciona que muchos antioxidantes son inestables en los medios de cultivo pudiendo generar datos engañosos(94). De igual manera el medio de cultivo al ser un medio rico que contiene vitaminas antioxidantes podría contrarrestar el efecto del Asc-Cu⁺⁺, por lo que con el modelo utilizado en este proyecto no se logró evaluar el efecto protector del microencapsulado.

IX Conclusiones

- El microencapsulado de jugo de granada encapsuló compuestos fenólicos presentes en el jugo fresco de granada.
- El jugo de granada de la variedad roji-verde del Valle de Mezquital de Hidalgo tuvo mayor contenido de polifenoles con respecto a las otras dos variedades.
- El microencapsulado no es citotóxico en células HuH-7.
- Las concentraciones que causaron 91% de células no viables con Asc/Cu⁺⁺ fueron 12.5 y 25µM respectivamente a 3 h de incubación.
- Bajo las condiciones del presente estudio no se logró evaluar el microencapsulado como apagador de radicales libres, ya que incluso con otros antioxidantes no se observó una respuesta.
-

X Recomendaciones

- Probar otra línea celular más susceptible a estrés oxidativo u otro modelo de estrés oxidativo.
- Usar concentraciones más bajas de Asc/Cu⁺⁺
- Medir daño oxidativo producido por Asc/Cu⁺⁺

XI Referencias

1. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13: 757–72.
2. G P, N I, M C, G P, F M, V A, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
3. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, Vol 12, Pages 3117-3132. 2011;12(5):3117–32.
4. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. Vol. 57, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2017. p. 1105–21.
5. Saha SK, Lee S Bin, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
6. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
7. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757.
8. Sharma DrA. *Nutrition in Inflammatory Lung Diseases*. Springer. 2019 Jan 1.
9. Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chem Soc Rev*. 2021;50(15):8355.
10. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
11. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70(5):257–65.

12. Desikan R, Hancock J, Neill S. Reactive Oxygen Species as Signalling Molecules. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. 2007;169–96.
13. Pajares M, Cuadrado A, Engedal N, Jirsova Z, Cahova M. The role of free radicals in autophagy regulation: Implications for ageing. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018.
14. Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018.
15. Borges Bubols G, da Rocha Vianna D, Medina-Remon A, von Poser G, Maria Lamuela-Raventos R, Lucia Eifler-Lima V, et al. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini Rev Med Chem*. 2013;13(3):318–34.
16. Delgado Olivares L. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, ISSN-e 1665-4412, N°. 50, 2010, págs. 10-15. Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2010.
17. Barboza GD de, Guizzardi S, Moine L, Talamoni NT de. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol*. 2017 28;23(16):2841.
18. Lee GY, Han SN. The role of vitamin E in immunity. Vol. 10, *Nutrients*. MDPI AG; 2018.
19. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70(5):257–65.
20. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. Vol. 21, *Molecules* (Basel, Switzerland). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016.
21. CI OS, S CM, BO MO, MM GB, J RE. [Strawberry polyphenols decrease oxidative stress in chronic diseases]. *Gac Med Mex*. 2018 1;154(1):80–6.

22. Trigueros L, Wojdyło A, Sendra E. Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum L.*) yogurt. *J Agric Food Chem.* 2014 9;62(27):6417–25.
23. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2020.1;129.
24. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
25. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018 Jan 1;13:757–72.
26. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol.* 2006;141(2):312.
27. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician.* 2007 1;76(3):391–6.
28. Jefferson JW. Drug interactions - Friend or foe? *Journal of Clinical Psychiatry.* 1998;59(SUPPL.4):37–47.
29. Nagata H, Takekoshi S, Takeyama R, Homma T, Osamura RY. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2004;17(1):66–73.
30. Sukumar MR, König B. Pomegranate extract specifically inhibits *Clostridium difficile* growth and toxin production without disturbing the beneficial bacteria in vitro. *Infect Drug Resist.* 2018;11 :2357–62.
31. Langley P. Why a pomegranate? *BMJ.* 2000;321(7269):1153.
32. Wu D, Wu C, Zhong Y. The association between paraoxonase 1 activity and the susceptibilities of diabetes mellitus, diabetic macroangiopathy and diabetic microangiopathy. *J Cell Mol Med.* 2018;22(9).
33. Wang Y, Huang M, Yang X, Yang Z, Li L, Mei J. Supplementing punicalagin reduces oxidative stress markers and restores angiogenic balance in a rat model

- of pregnancy-induced hypertension. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018 1;22(4):409–17.
34. Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. Vol. 2, *Nutrients*. MDPI AG; 2010. p. 890–902.
 35. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
 36. Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. Vol. 2014, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
 37. Hussain SA, Hameed A, Nazir Y, Naz T, Wu Y, Suleria HAR, et al. Microencapsulation and the characterization of polyherbal formulation (PHF) rich in natural polyphenolic compounds. *Nutrients*. 2018;10(7).
 38. Wu S, Tian L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). Vol. 22, *Molecules*. MDPI AG; 2017.
 39. Álvarez Mayorga B. Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja. *Rev Mex De Cienc Agric*. 2011;2(3):449–59.
 40. D Holland KHIBY. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Horticu Rev*. 2009;35: 127–91.
 41. Miklavčič Višnjevec A, Ota A, Skrt M, Butinar B, Smole Možina S, Gunde Cimerman N, et al. The Genetic, Biochemical, Nutritional and Antimicrobial Characteristics of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Grown in Istria. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(2):151.
 42. El Kar C, Ferchichi A, Attia F, Bouajila J. Pomegranate (*Punica granatum*) juices: Chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *J Food Sci*. 2011;76(6):795–800.
 43. Krueger DA. Composition of pomegranate juice. *J AOAC Int*. 2012;95(1):163–8.

44. Longtin R. The pomegranate: Nature's power fruit?. Vol. 95, Journal of the National Cancer Institute. Oxford University Press; 2003. p. 346–8.
45. U Sibel AJ. Hydrolytic properties of ellagic acid in commercial pomegranate juices. World Acad Sci Eng Technol. 2012;6(7):717–20.
46. Legua P, Melgarejo P, Martínez JJ, Martínez R, Hernández F. Evaluation of spanish pomegranate juices: Organic acids, sugars, and anthocyanins. Int J Food Prop. 2012 1;15(3):481–94.
47. Parashuram S, Singh NV, Gaikwad NN, Corrado G, Roopa Sowjanya P, Basile B, et al. Morphological, Biochemical, and Molecular Diversity of an Indian Ex Situ Collection of Pomegranate (*Punica granatum L.*). Plants (Basel). 2022 1;11(24).
48. Qin G, Xu C, Ming R, Tang H, Guyot R, Kramer EM, et al. The pomegranate (*Punica granatum L.*) genome and the genomics of punicalagin biosynthesis. The Plant Journal. 2017 1;91(6):1108–28.
49. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol. 1999;66(1):11–7.
50. Liu C, Guo H, DaSilva NA, Li D, Zhang K, Wan Y, et al. Pomegranate (*Punica granatum*) phenolics ameliorate hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cytotoxicity in human keratinocytes. J Funct Foods. 2019 1;54: 559–67.
51. Banihani S, Swedan S, Alguraan Z. Pomegranate and type 2 diabetes. Nutrition Research. 2013 1;33(5):341–8.
52. Lopes De Oliveira F, Yanka T, Arruda P, Da R, Lima S, Casarotti SN, et al. Pomegranate as a natural source of phenolic antioxidants: a review. Journal of Food Bioactives. 2020 31;9: 10–22.
53. Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Antimicrobial potential of pomegranate peel: a review. Int J Food Sci Technol. 2019 1;54(4):959–65.
54. Das AK, Nanda PK, Chowdhury NR, Dandapat P, Gagaoua M, Chauhan P, et al. Application of Pomegranate by- Products in Muscle Foods: Oxidative

- Indices, Colour Stability, Shelf Life and Health Benefits. *Molecules*. 2021 2;26(2).
55. Asgary S, Javanmard S, Zarfeshany A. Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*. 2014;3(1):100.
 56. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem*. 2011 15;127(2):807–21.
 57. Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*. 2021 1;26(17).
 58. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):363–71.
 59. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 2000;48(10):4581–9.
 60. Calderón-Oliver M, Ponce-Alquicira E. The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules*. 2022 1;27(5).
 61. Schwan A; Luisa C, Wigmann F, De Oliveira Bastos É, De Bona Da Silva J; *Ciência Rural*. *Ciência Rural*. 2014;44: 1304–11.
 62. Barra PA, Márquez K, Gil-Castell O, Mujica J, Ribes-Greus A, Faccini M. Spray-drying performance and thermal stability of L-ascorbic acid microencapsulated with sodium alginate and gum Arabic. *Molecules*. 2019 7;24(16).
 63. Lourenço SC, Fraqueza MJ, Fernandes MH, Moldão-Martins M, Alves VD. Application of Edible Alginate Films with Pineapple Peel Active Compounds on Beef Meat Preservation. *Antioxidants (Basel)*. 2020 26;9(8):1–15.
 64. Cutrim CS, Alvim ID, Cortez MAS. Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. *J Food Sci Technol*. 2019 1;56(8):3561.

65. Jeyakumari A, Janarthanan G, Chouksey MK, Venkateshwarlu G. Effect of fish oil encapsulates incorporation on the physico-chemical and sensory properties of cookies. *J Food Sci Technol*. 2016 1;53(1):856.
66. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015 11;223: 40–54.
67. Salama AH. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Deliv Transl Res*. 2020 1;10(1).
68. Pellicer JA, Fortea MI, Trabal J, Rodríguez-López MI, Gabaldón JA, Núñez-Delicado E. Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. *Powder Technol*. 2019 1;347: 179–85.
69. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020 10;38(2):167–97.
70. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. Vol. 19, *Current Atherosclerosis Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2017.
71. Tan BL, Norhaizan ME. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*. 2019;11(11).
72. Betanzos-Cabrera G, Montes-Rubio PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Food Nutr Res*. 2015 20;59.
73. Farhan M, Rizvi A, Ali F, Ahmad A, Aatif M, Malik A, et al. Pomegranate juice anthocyanidins induce cell death in human cancer cells by mobilizing intracellular copper ions and producing reactive oxygen species. *Front Oncol*. 2022 6;12.
74. Kostka T, Ostberg-Potthoff JJ, Briviba K, Matsugo S, Winterhalter P, Esatbeyoglu T. Pomegranate (*Punica granatum L.*) Extract and Its Anthocyanin and Copigment Fractions-Free Radical Scavenging Activity and Influence on Cellular Oxidative Stress. *Foods*. 2020 6;9(11).

75. Li H, Roy T, Boateng ST, He H, Liu C, Liu W, et al. Standardized Pomegranate (Pomella®) and Red Maple (Maplifa®) Extracts and Their Phenolics Protect Type I Collagen by the Inhibition of Matrix Metalloproteinases, Collagenase, and Collagen Cross-Linking. *Molecules*. 2022 1;27(22).
76. Cho YE, Song BJ. Pomegranate prevents binge alcohol-induced gut leakiness and hepatic inflammation by suppressing oxidative and nitrate stress. *Redox Biol*. 2018 1;18: 266–78.
77. Alvarez-Cervantes P, Izquierdo-Vega JA, Moran-Leon J, Guerrero-Solano JA, Garcia-Perez BE, Cancino-Diaz JC, et al. Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. *Toxicol Res (Camb)*. 2021;10(2):284–91.
78. Dorantes-Morales A, Estrada-Luna D, Bautista-Pérez R, Betanzos-Cabrera G, Luna-Luna M, Flores-Castillo C, et al. Microencapsulated Pomegranate Modifies the Composition and Function of High-Density Lipoproteins (HDL) in New Zealand Rabbits. *Molecules*. 2020 21;25(14).
79. Estrada-Luna D, Carreón-Torres E, Bautista-Pérez R, Betanzos-Cabrera G, Dorantes-Morales A, Luna-Luna M, et al. Microencapsulated pomegranate reverts high-density lipoprotein (HDL)-induced endothelial dysfunction and reduces postprandial triglyceridemia in women with acute coronary syndrome. *Nutrients*. 2019;11(8).
80. Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2021 2;22(4):1–26.
81. Estrada-Luna D, Martínez-Hinojosa E, Cancino-Diaz JC, Belefant-Miller H, López-Rodríguez G, Betanzos-Cabrera G. Microencapsulated Pomegranate Modifies the Composition and Function of High-Density Lipoproteins (HDL) in New Zealand Rabbits. *Eur J Nutr*. 2018 1;57(1):383–9.
82. Estrada-Luna D, Martínez-Hinojosa E, Cancino-Diaz JC, Belefant-Miller H, López-Rodríguez G, Betanzos-Cabrera G. Daily supplementation with fresh

- pomegranate juice increases paraoxonase 1 expression and activity in mice fed a high-fat diet. *Eur J Nutr.* 2018 1;57(1):383–9.
83. Betanzos-Cabrera G, Guerrero-Solano JA, Martínez-Pérez MM, Calderón-Ramos ZG, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. *FRIN.* 2011.
 84. Aguilar-Hernández G, De Lourdes García-Magaña M, De los Ángeles Vivar-Vera M, Sáyago-Ayerdi SG, Sánchez-Burgos JA, Morales-Castro J, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Annona muricata* By-Products and Pulp. *Molecules.* 2019;24(5).
 85. Sinha N, Dabla P. Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension—A Current Review. *Curr Hypertens Rev.* 2015 5;11(2):132–42.
 86. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011 1;82(4):513–23.
 87. Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI. Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. *J Agric Food Chem.* 1998;46(1):25–31.
 88. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food Chem.* 2011 15;127(2):807–21.
 89. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(3):125–30.
 90. Betanzos-Cabrera G, Ramírez FJ, Muñoz JL, Barrón BL, Maldonado R. Inactivation of HSV-2 by ascorbate-Cu (II) and its protecting evaluation in CF-1 mice against encephalitis. *J Virol Methods.* 2004 15;120(2):161–5.
 91. Santos-Buelga C. Polyphenols and Human Beings: From Epidemiology to Molecular Targets. *Molecules.* 2021 2;26(14).
 92. Bruggisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002;68(5):445–8.

93. Aps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* 2011;29(12):1132–44.