

## Aislamiento e identificación del ácido punícico como compuesto bioactivo presente en la semilla de granada (*Punica granatum*, L.)

M. Alonso-de Jesús<sup>1,2</sup>, J.M. Talamantes-Gómez<sup>2</sup> y J.C. Ramírez-Orejuel<sup>2</sup>

**1** Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **2** Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Nutrición animal y Bioquímica. [jose.talamantes@comunidad.unam.mx](mailto:jose.talamantes@comunidad.unam.mx)

**RESUMEN:** El aceite proveniente de la semilla (PSO, por sus siglas en inglés) de granada (*Punica granatum* L.), es rico en ácidos grasos insaturados, el más abundante es el ácido punícico (PUA, por sus siglas en inglés), un ácido graso trieno conjugado (omega-5), con diversos efectos benéficos a la salud. Se extrajo el aceite de la semilla por medio del método más eficiente (Soxhlet) con éter de petróleo, se identificó mediante cromatografía de capa fina (CCF) y se cuantificó los ácidos grasos presentes por cromatografía de gases (CG). El objetivo de este estudio fue encontrar el método más eficiente de extracción del ácido punícico así como, aislarlo, aportar mayor información sobre este ácido graso y observar sus propiedades benéficas en la salud. Los resultados por cromatografía de gases mostraron como ácido graso mayoritario al ácido docosadienoico. La CCF mostró diversas manchas y se obtuvo el valor de factor de retardo (Rf) del ácido punícico, se purificó y aisló para caracterizarlo con ayuda del espectro infrarrojo (FT-IR).

**Palabras clave:** Ácido punícico, bioactivo, PSO.

**ABSTRACT:** The oil from the pomegranate seed PSO, (*Punica granatum* L.), is rich in unsaturated fatty compounds, the most abundant is the punicic acid (PUA), a conjugated triene fatty acid ( $\omega$ -5), with beneficial effects on health. The oil of the seed was extracted with the most efficient method (Soxhlet) with petroleum ether the present fatty acids were identified by Thin Layer Chromatography (TLC) and quantified, by Gas Chromatography (GC). The objective of this study was to find the most efficient method of extraction of punicic acid as well as to isolate it, provide more information about this fatty acid and observe its beneficial properties in health. The results by gas chromatography showed as docosadienoic acid as the major fatty acid. The CCF showed different spots and the delay factor value (Rf) of the punic acid was obtained, it was purified and isolated to characterize it with the help of the infrared spectrum (FT-IR).

**Key words:** Punicic acid, bioactive, PSO.

**Área:** Aprovechamiento y valorización de subproductos

### INTRODUCCIÓN

La granada, *Punica granatum* L., pertenece a la familia *Punicaceae* y es una de las frutas comestibles más antiguas. Dentro de sus compuestos bioactivos y de mayor presencia en la semilla se encuentran los ácidos grasos insaturados con un 95%, siendo el más abundante el ácido punícico (PUA, por sus siglas en inglés), es un ácido graso trieno conjugado (omega-5).

El aceite de semilla de granada (PSO, por sus siglas en inglés) también contiene en cantidades menores otros isómeros de ácido linolénico conjugado (CLnA). También se ha encontrado que la acción sinérgica de los constituyentes de la granada suele ser superior a la de los constituyentes individuales (Lansky *et al.*, 2007; Vroegrijk *et al.*, 2011).

El PSO presenta diversas propiedades biológicas, como antioxidante, refuerzo en la función inmune y favorece el metabolismo de los lípidos, efecto en la inhibición del fotoenvejecimiento de la piel y lipoperoxidación (Goula & Adamopoulos, 2012). Entre otros efectos benéficos que se le ha atribuido la prevención y el tratamiento de diabetes, así como la hipertensión y la colesterolemia (Vroegrijk *et al.*, 2011; Banihani *et al.*, 2013).

Dichas enfermedades tienen un elevado riesgo en la salud; por lo que en el presente trabajo plantea el problema en tres fases; la fase inicial, que consistió en aislar, identificar y caracterizar de manera individual o conjunta el (los) compuesto(s) bioactivo(s) presente(s) en la semilla de la granada, con la finalidad de aportar mayor información sobre este ácido graso y reducir los problemas de síndrome metabólico.

Dentro del proyecto se plantearon los siguientes objetivos: Seleccionar el método de extracción más eficiente, para la obtención del ácido punícico en frutos con diversas etapas de maduración; así mismo, emplear diversas técnicas de extracción que no comprometan la estabilidad del ácido graso; determinar la presencia de dicho ácido por cromatografía de capa fina; cuantificar la cantidad presente del analito por cromatografía de gases y finalmente aislar el ácido punícico como compuesto bioactivo de la semilla de granada, para posteriormente observar sus propiedades benéficas en la salud.

El mejor rendimiento (10.85 %) en la extracción de los ácidos grasos se obtuvo con el disolvente éter de petróleo y por la técnica de Soxhlet, los ácidos grasos presentes se identificaron por cromatografía de capa fina resolviendo con un  $R_f = 0.45$  para ácido punícico y  $0.52$  para linoléico; mediante cromatografía de gases de acuerdo a la técnica del AOAC 963.22 (2014), se obtuvieron en intervalos mayormente el ácido docosadienoico (C22:2) desde 57-84%, linoléico (C18:2 n6c) con 4-22%, oleico (C18:1 n6c) con 4-10%, esteárico (C18:0) con 1-3% y palmítico (C16:0) con 2-8%. Se aisló el ácido punícico y para caracterizarlo definitivamente se realizó IR, CG como pruebas confirmatorias. La cromatografía de capa fina y el espectro de infrarrojo permitieron identificar la presencia del ácido punícico, así como la cromatografía de gases permitió la cuantificación del mismo.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se recolectó granada en cuatro diferentes estados de maduración y se realizó una limpieza externa de la granada, posteriormente se separaron los arilos de la cáscara y del pericarpio blanco de la granada. Se llevó a cabo el proceso de extracción según las metodologías propuestas por Abbasi *et al.* (2008), y Fadavi y cols.(2006). El aceite obtenido de las semillas se sometió a metilación como lo indica el método oficial AOAC 969.33 (2000), para posteriormente inyectarse y caracterizarse por cromatografía de gases. Se realizó una Cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) con dos finalidades; la primera identificación del ácido punícico y la segunda el aislamiento del mismo ácido y verificar su pureza, esa misma fracción purificada se identificó por Radiación Infrarroja (FT-IR) para observar las bandas características del ácido punícico.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El rendimiento de los diferentes métodos de extracción se puede ver en la Tabla I, observando que el método más eficiente, para la separación de los ácidos grasos presentes, en la semilla de granada, fue Soxhlet y como disolvente éter de petróleo, ya que tuvo un rendimiento del 10.85 % en comparación con los otros métodos propuestos. De acuerdo con la literatura, la mayor eficiencia de los disolventes para la extracción del aceite en la semilla de granada propuesta por Shabbir *et al.*, en 2017, son: éter de petróleo > n-hexano > éter etílico. Con base en lo anterior, como se observa en la Tabla I, y lo mencionado por Shabbir cumple lo propuesto.

| <b>Tabla I.</b> Rendimiento obtenido del aceite en la semilla por diferentes métodos de extracción. |        |              |                  |
|---|--------|--------------|------------------|
| Método / Disolvente   | Hexano | Éter etílico | Éter de petróleo |
| Sonicación (10 min)   | 5.40%  | 1.55%        | 6.40%            |
| Agitación (20 min)  | 5.30%  | 2.86%        | 8.15%            |
| Soxhlet (4 h)   | -      | -            | 10.85%           |

El rendimiento de extracción es variable debido a las técnicas y el tipo de disolvente; esto fue comparado con el método de agitación y sonicación usando el mismo disolvente, cabe destacar que al sonicar, las vibraciones producidas por las microondas no son lo suficiente para la extracción ya que es un método rápido y no se logró controlar la temperatura.

Respecto a la agitación, se incrementa el porcentaje de extracción debido a que la superficie de contacto del analito se ve inmersa en el disolvente con un tiempo mayor de extracción y se logró regular la temperatura permitiendo extraer mayormente al analito de interés.

Finalmente comparando ambos métodos con Soxhlet que es un método semicontinuo y con aplicación de temperatura controlada con un tiempo de 4 h este último permite la extracción de los compuestos en una mayor proporción.

Una vez identificado el método adecuado para la extracción, se utilizó para extraer el PSO de otras muestras con diferentes grados de maduración. Como se observa en la Tabla II, el grado de maduración en la granada se vincula con la cantidad de aceite presente; en el fruto verde, el porcentaje de extracción fue muy baja debido a que este fruto era pequeño y predominaba más la cantidad de cáscara o pectina, por lo que las semillas eran de tamaño pequeño e incoloras en comparación de un fruto maduro.

| <b>Tabla II.</b> Rendimiento de extracción de aceite en semilla de granada. |                |
|---|----------------|
| Muestra   | Extracción (%) |
| Muestra 1. Fruto medio maduro   | 10.85          |
| Muestra 2. Fruto maduro   | 14.28          |
| Muestra 3. Fruto medio maduro   | 11.70          |
| Muestra 4. Fruto verde  | 3.47           |

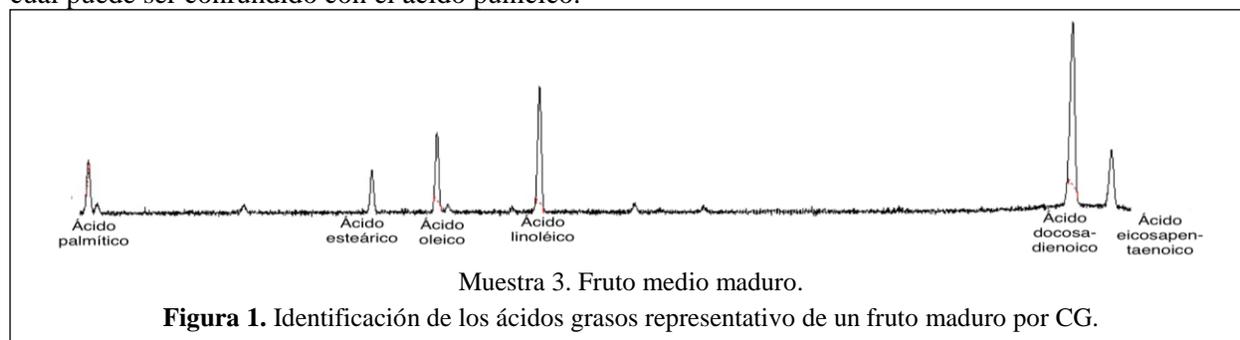
La identificación de los ácidos grasos presentes en la semilla de granada extraída el método de Soxhlet y con base en la AOAC 963.22, con las mismas condiciones que el estándar, se identificaron todos los ácidos grasos, sin embargo se tuvieron dificultades para demostrar la presencia del ácido punícico, ya que la columna utilizada (CP-7420: Select FAME 100 m X 0.25 mm X 0.25 µm) para la caracterización no diferencia entre el ácido punícico y el ácido linolénico

conjugado (CLnA), además que en los artículos de referencia, no se especifica el nombre o proveedor del estándar ni tiempos de retención. Asimismo no anexan cromatogramas.

En la Tabla III, se compara el porcentaje de ácidos grasos obtenidos en el aceite metilado, como se puede observar el ácido docosadienoico se presentó en un 57-86% siendo el mayoritario en cualquier estado de maduración de la granada, seguido del linoléico. En el caso de la muestra 4, el ácido linoleico se encontró en mayor proporción a comparación de los otros tres estados de maduración, alcanzando estar presente en un 22%, cuando en estado maduro se tiene valores del 14% y en estado medio maduro apenas del 4-6%. Cabe destacar que solo en la muestra 2 y 3 se encontró en bajo porcentaje (1.6-3.4%) la presencia del ácido eicosapentaenoico, un ácido graso poliinsaturado esencial y que se conoce como omega-3.

| Tabla III. Concentración (%) de ácidos grasos en las diferentes muestras de granada. |                               |                         |                               |                        |
|--|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------|
|  | %Ácido graso                  |                         |                               |                        |
| Ácido Graso  | Muestra 1. Fruto medio maduro | Muestra 2. Fruto maduro | Muestra 3. Fruto medio maduro | Muestra 4. Fruto verde |
| Palmítico C16  | 2.33                          | 4.23                    | 2.45                          | 8.64                   |
| Esteárico C18  | 1.97                          | 3.08                    | 2.02                          | 3.52                   |
| Oleico C18:1   | 4.64                          | 10.89                   | 3.34                          | 7.52                   |
| Linoléico C18:2  | 4.88                          | 14.62                   | 6.21                          | 22.49                  |
| Docosadienoico C22:2   | 86.18                         | 62.83                   | 84.38                         | 57.82                  |
| Eicosapentaenoico C20:5  | -                             | 3.35                    | 1.59                          | -                      |

En el cromatograma para cada muestra, se puede observar en la Figura 1, el ácido predominante para los cuatro casos es el ácido docosadienoico (C22:2), de fórmula molecular  $C_{22}H_{40}O_2$ , es un ácido graso poliinsaturado PU-6 natural (PUFA). Es un antagonista del receptor 4 de ácido graso libre (FFAR4, también conocido como GPR120) e inhibe fuertemente la secreción de ghrelina por células gástricas de ratón aisladas. Este PUFA ha sido identificado en mamíferos, peces, plantas y hongos anaeróbicos (Cayman Chemica, 2019). También se observa la presencia de linoleico en una cantidad representativa el cual puede ser confundido con el ácido púnicico.

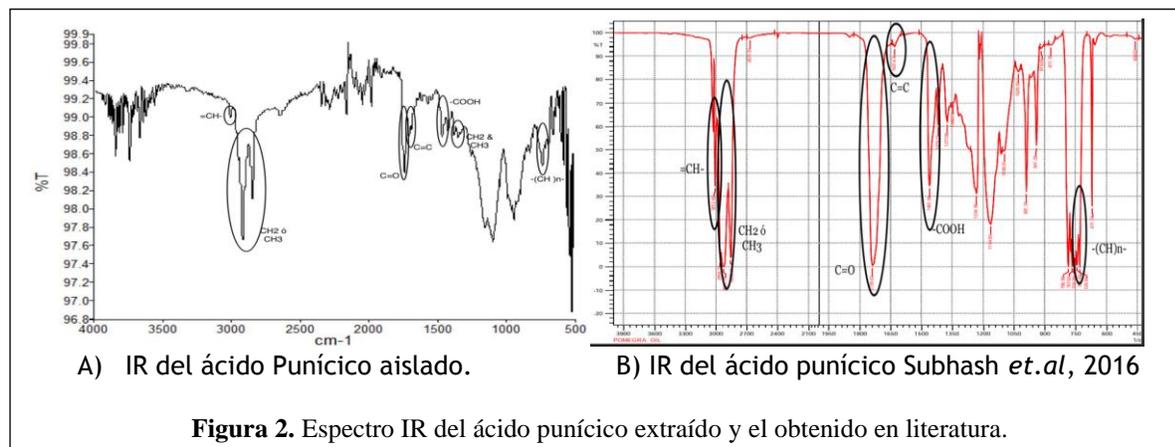


Se realizó cromatografía en capa fina (CCF), con las muestras de aceite de semilla sin metilar, metilada y al no contar con un estándar de comparación, se metiló una muestra comercial, llamada Granagard®, el cual en su etiqueta resalta como componentes mayoritario el ácido púnicico (76.56%), con el fin de comparar los rangos de frente (Rf) e identificar la presencia de ácido púnicico extraído de la semilla. Para determinar la presencia del ácido púnicico, se encontró de acuerdo a Subhash *et al.* (2016), el Rf de este compuesto es de 0.45, mientras que el ácido linoléico, de acuerdo Plourde *et al.*, (2007) tiene una Rf de 0.52. Por lo anterior, se volvió a realizar una CCF únicamente del aceite de semilla sin metilar para poder realizar el aislamiento de los compuestos presentes. Se usó para ello una placa con factor de fluorescencia y se reveló con luz ultravioleta, esto con el fin de poder aislar sin interferencias de un revelador químico. La fracción correspondiente al Rf de 0.45, se aisló en hexano y se empleó para la determinación por IR.

Cómo se observa en la Figura 2, se identificaron las bandas representativas de IR que confirman la presencia de un ácido graso de cadena larga con insaturaciones. De acuerdo a Subhash *et.al* (2016) el IR

que obtuvo, presentó las mismas bandas representativas que se obtuvieron con el IR realizado al compuesto aislado, es decir, presencia de carbonilo (C=O), insaturaciones (C=C), ácido carboxílico (CHO) y la confirmación de ser un compuesto de cadena larga.

Por lo anterior, a pesar de que el ácido predominante fue el docosadienoico, se sospecha que pueda ser el ácido punicico, ya que comparando con lo que Subhash *et al.* (2016) presenta, se encontraron las mismas bandas para las 4 muestras a comparación con lo reportado por estos autores.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, H., Rezaei, K., & Rashidi, L. (2008). Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1), 83-89.
- AOAC Official Method 963.22 (2014). Methyl Esters of Fatty Acids in Oils and Fats Gas Chromatographic Method.
- AOAC Official Method 969.33 (2000). Fatty Acids in Oils and Fats Preparation of Methyl Esters Boron Trifluoride Method.
- Banihani S., Swedan S., Alguraan Z. (2013) Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), 341-348.
- Cayman Chemical (2019). 13Z,16Z-Docosadienoic Acid. Recuperado de: <https://www.caymanchem.com/product/20749/>
- Fadavi, A., Barzegar, M., Hossein, M. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 676-680.
- Goula, A., Adamopoulos, K. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Technology*, 90(4), 639-652.
- Lansky, E., Newman, R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 177-206.
- Plourde, M., Destailats, F., Chouinard, P. Y., & Angers, P. (2007). Conjugated  $\alpha$ -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5269-5275.
- Shabbir, M. A., Khan, M. R., Saeed, M., Pasha, I., Khalil, A. A., & Siraj, N. (2017). Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. *Lipids in health and disease*, 16(1), 99.
- Subhash R., Ramesh A., Jaysingrao A., Gopal M. (2016). Isolation of punicic acid from Pomegranate seed oil, its characterization and evaluation for antiatherosclerosis activity. *International Journal of Advanced Research*, 4 (12), 2493-2498.
- Vroegrijk, I., Diepen, J., Berg, S., Westbroek, I., Keizer, H., Gambelli, L., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Zondag, G., Havekes, L., Voshol, P. (2011). Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 49(6), 1426-1430.