

## Efecto de la ingesta subcrónica de un microencapsulado de granada sobre conductas asociadas a ansiedad en la rata adulta

Javier Ivan Hernández Monzón<sup>1,2</sup>, Alejandra Mercado Mosqueda<sup>1,4</sup>, Brígida Estefanía Ruiz Hernández<sup>5</sup>, Ángel Ricardo Casanova Cocom<sup>6</sup>, Esther Juárez Cortes<sup>1,3</sup>, José Vicente Negrete Díaz<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Programa de Licenciatura en Psicología Clínica, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

<sup>3</sup>Programa de Licenciatura en Fisioterapia, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato,

<sup>4</sup>Programa de Licenciatura en Nutrición, Departamento de Enfermería y Obstetricia, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías,

<sup>5</sup>Programa de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías

<sup>6</sup>Programa de Licenciatura en Médico Cirujano, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán.

[jv.negrete@ugto.mx](mailto:jv.negrete@ugto.mx), [esther.juarez@ugto.mx](mailto:esther.juarez@ugto.mx)

### Resumen

Actualmente hay un interés creciente en investigar estrategias alternativas al tratamiento farmacológico convencional de los trastornos mentales, como el consumo de alimentos con potencial efecto neuroprotector gracias a su contenido de compuestos antioxidantes. En el presente estudio se evaluó en ratas el efecto de la ingesta subcrónica de un microencapsulado de granada (MEG) sobre las conductas asociadas a funciones cerebrales superiores. Se aplicaron dos pruebas comportamentales para evaluar procesos afectivos: 1) a nivel basal y 2) durante la inducción de estrés por restricción y 3) posterior al estrés. Se integraron tres grupos: a) control, b) estrés y c) estrés con MEG en la dieta. La evaluación comportamental comprendió las pruebas: Campo abierto (*Open Field*) y Laberinto en Cruz de Brazos Elevados (*Elevated Plus Maze*), para medir conductas asociadas a ansiedad en la rata. El protocolo de inducción de estrés fue el de restricción del movimiento/desplazamiento. El análisis de la conducta videograbada se hizo empleando el software Ethovision XT v17. Existen pocos estudios sobre el efecto del MEG sobre la ansiedad, por lo que los resultados del presente estudio ayudarán a incrementar nuestra comprensión sobre el potencial efecto neuroprotector de MEG, con implicaciones para el tratamiento de la enfermedad mental.

**Palabras clave:** salud mental, antioxidantes, ansiedad.

### Antecedentes

La granada (*Punica granatum*) es un fruto de la familia *Punicaceae*, y se cultiva desde hace varios miles de años (Galaz P., et al. 2017; Pirzadeh, M., et al. 2021), su origen se ubica en el Himalaya y regiones mediterráneas, también en climas cálidos de la India, Irán, China y Estados Unidos (Gao, L., et al. 2023; Paul, A., & Radhakrishnan, M. 2020; Venkatasamy, C., et al. 2019). Su estructura se compone de la cáscara, semilla y arilo, el cual envuelve a la semilla (Cheng, J., et al. 2023), y presenta un color rojo o morado con un alto contenido de polifenoles (Viuda-Martos, M., et al. 2010; Vučić, V., et al. 2019). Este fruto ofrece diversos beneficios al organismo (Jurenka J. S. 2008; Saeed, M., et al. 2018); por ejemplo, se le atribuyen propiedades anticancerígenas (Maphetu, N., et al. 2022; Seidi, K., et al. 2016) y antiinflamatoria (Sun, HY., et al. 2019; Melgarejo-Sánchez, P., et al. 2021; Maphetu, N., et al. 2022), antidepresiva (Romeo, I., et al. 2021) y cardioprotectoras (Zuraini, N. Z. A., et al. 2021), así como antidiarreicas (Adiga, S., et al. 2010; Maphetu, N., et al. 2022) y antioxidantes (Jalali, A., et al. 2021; Zhao, X., & Yuan, Z. 2021), inclusive de antiobesidad (Maphetu, N., et al. 2022; Mphahlele, R. R., et al. 2016), así como su efecto sobre la composición y función de lipoproteínas de alta densidad en mujeres (Estrada, L.D., et al. 2019) y conejos (Dorantes, M. A., et al. 2020) y efectos antidiabéticos (Maphetu, N., et al. 2022; Mayasankaravalli, C., et al. 2020), entre otros.

Dependiendo de las condiciones ambientales en las que se cultiva, el tipo y concentración de sus componentes bioactivos pueden variar significativamente (Liu, X., et al. 2023; Loukhamas, S., et al. 2020; Passafiume, R., et al. 2019), igual dependen de las técnicas de extracción aplicadas (Pirzadeh, M., et al. 2021). Recientemente, estudios han demostrado que el extracto de la granada y sus fitoquímicos son posibles inhibidores de la proteína S (*spike protein*) del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-

CoV-2) y del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (Maphetu, N., et al. 2022; Suručić, R., et al. 2021a; Suručić, R., et al. 2021b; Tito, A., et al. 2021), además de reducir los síntomas de la COVID-19 (Forouzanfar, F., et al. 2022). El jugo de granada ha demostrado modificar la farmacocinética de medicamentos metabolizados por CYP3A4 y CYP2C9, alterando su biodisponibilidad (Mansoor, K., et al. 2023). En relación al presente estudio, se ha reportado que ejerce efectos positivos en el comportamiento debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, neutralizando radicales libres y mejorando el flujo sanguíneo cerebral. Estos beneficios pueden influir en neurotransmisores y la disfunción celular, regulando emociones y habilidades cognitivas, lo que sugiere un impacto en la salud cerebral y el bienestar mental (Cervantes-Anaya, N., et al. 2022; Ciccone, L., et al. 2023; Dulcich, M. S., & Hartman, R. E. 2013; Emami Kazemabad, M. J., et al. 2022; Estrada-Camarena, E. M., et al. 2020; Romeo, I., et al. 2021), cabe mencionar que una de sus ventajas es la baja toxicidad reportada (Álvarez, C.P., et al., 2021). Por lo anterior, es importante incrementar nuestra comprensión de sus efectos benéficos sobre la salud mental.

## Material y Métodos

### Organismos

Se emplearon ratas adultas macho Sprague Dawley (n=19) con peso de 400 g en promedio y 10 meses de edad, se mantuvieron en un ciclo de oscuridad 12/12 (8:00 a.m - 8:00 p.m.) con libre acceso a agua y alimento, a temperatura 23-25°C y humedad 50-60%, en el Bioterio del Campus Celaya Salvatierra de la Universidad de Guanajuato. Fueron divididas en tres grupos: a) control (n= 6), b) estresado (E, n= 6) y c) estresado + arilo (E+A, n= 7).

### Preparación de la solución de arilo de granada y administración

El arilo de granada se obtuvo en presentación de microencapsulado, soluble en agua y sensible a la luz, se administró vía oral, en el bebedero, en una dosis de 1.777 g/kg de peso, se hizo el cálculo según el peso y número de ratas en cada caja (3-4 ratas por caja), cada día se preparaba una solución fresca, y al siguiente día se medía el volumen del líquido restante, a fin de conocer el consumo diario promedio por rata (Fig. 1). El tratamiento se realizó por 14 días, durante los cuales se implementó de manera simultánea el protocolo de restricción para inducción de estrés.



Fig. 1 Preparación y administración del extracto de arilo de granada.

### *Protocolo de inducción de estrés*

El estrés (E) se indujo a través de mantener limitado el desplazamiento del animal, restringiéndolo en un contenedor de 15x20x8 cm, durante tres horas al día y por 14 días, entre las 8:00-11:00 horas. Los animales fueron videograbados para un análisis futuro del movimiento durante este protocolo (Fig. 2).



Figura 2. Protocolo de inducción de estrés por restricción y videograbación.

### *Prueba de campo abierto*

Prueba de campo abierto. La actividad locomotora de las ratas fue evaluada en un cuarto sonoamortiguado, con luz controlada a 100 LX, la arena es una caja de forma cúbica de 60 x 60 x 50 cm, de acrílico y de color negro (Fig. 3). La zona de interés es configurada con el software con una cuadrícula denominada centro vs. borde. El animal es colocado orientado hacia la pared, se deja explorar libremente por espacio de 10 minutos y se videografa desde la parte superior, transcurrido el tiempo se retira y se limpia la arena con alcohol al 70%. El video posteriormente se analiza con el programa Ethovisión XT v17 para obtener principalmente la distancia total y por periodos de 2 minutos, además del tiempo y frecuencia de entradas en cada una de las zonas (centro vs. bordes), así como la trayectoria recorrida y preferencia de lugar mediante un mapa de calor generado por el programa. Dado que la n es baja, por ahora sólo se realizó estadística descriptiva.



Figura 3. Arena para la prueba de campo abierto en roedores.

### *Prueba de laberinto en cruz de brazos elevados*

Prueba del laberinto en cruz de brazos elevados. La ansiedad de las ratas se valoró empleando la prueba de laberinto en cruz, consiste en cuatro brazos en forma de cruz, de 10 x 50 cm, dos de ellos son opuestos y poseen paredes de 40 cm de altura (brazos cerrados), los otros dos no tienen paredes (brazos abiertos), (Fig. 4), colocado dentro de un cuarto sonoamortiguado, con luz controlada a 100 lumens. La rata se coloca en el

centro de la arena, de 10x10 cm, orientado hacia uno de los brazos abiertos, por espacio de 10 minutos y se videografa, luego de este tiempo se retira el animal y la arena se limpia con alcohol al 70%. Empleando Ethovision XT v16 se midió el número de entradas (frecuencia, preferencia de lugar) a cada par de brazos abiertos o cerrados, así como el tiempo total que permanecen en ellos, principalmente, la distancia recorrida. Los brazos abiertos representan un estímulo estresante por lo que el animal tiende a entrar en ellos con menor frecuencia y tiempo, por lo que suele ser mayor la frecuencia de entradas y el tiempo invertido en los brazos cerrados.



Figura 4. Arena para la realización de la prueba del laberinto en cruz de brazos elevados o Plus Maze, al interior del cuarto de conducta, con luz controlada y sonoamortiguado.

#### *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism 5.0. Considerando el número de animales por grupo sólo se realizó estadística descriptiva, los datos están expresados en medias  $\pm$  EEM.

#### *Consideraciones éticas*

Todos los procedimientos experimentales se harán conforme a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a las regulaciones internacionales, a saber: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition, National Research Council (US), del Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, National Academies Press, 2011). El proyecto fue aprobado por el CICUAL, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con el número de aprobación CICUAL/002/2022. El personal fue capacitado para el manejo y uso de roedores para experimentación. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

## Resultados

**Consumo de líquido.** El consumo de líquido en los animales control y estresados fue similar; sin embargo, hubo un notorio incremento en el consumo en los animales estresados que recibieron el extracto de arilo, lo cual se sugiere se debe al contenido de carbohidratos y puede resultar palatable para el roedor. Aquí se reporta sólo el consumo diario de las semanas 2 y 3 de tratamiento (Fig. 1 A), así como la ingesta total promedio diario durante esos 14 días (Fig. 1 B).

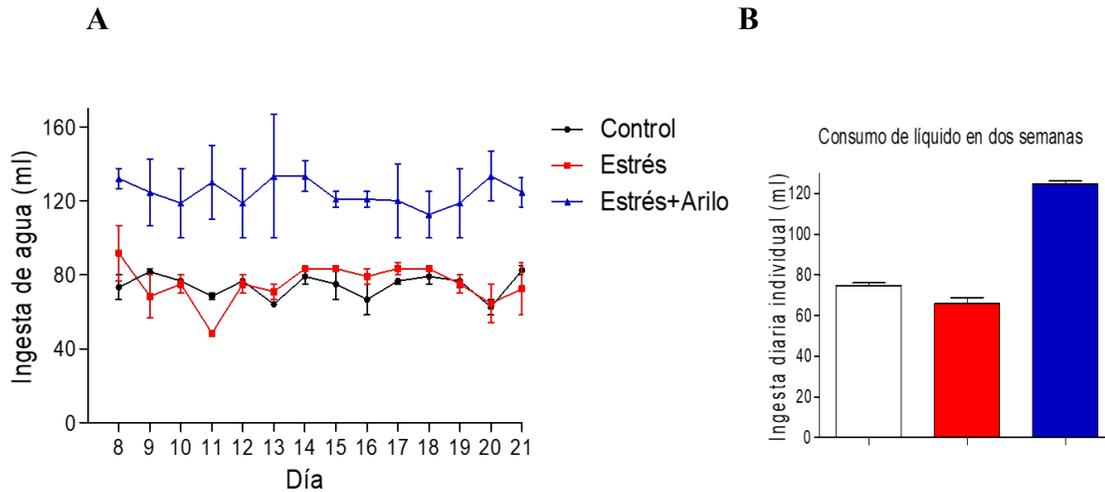


Fig. 5. Perfil temporal del consumo de líquido y consumo total por grupo de estudio.

**Actividad locomotora en campo abierto.** Los resultados de la evaluación de la actividad locomotora en la prueba de campo abierto no son concluyentes. Puede apreciarse el incremento en la locomoción debida al protocolo de inducción de estrés por restricción, sin embargo, no se aprecia un efecto del arilo sobre la hiperactividad inducida por dicho estrés (Figs. 6 y 7).

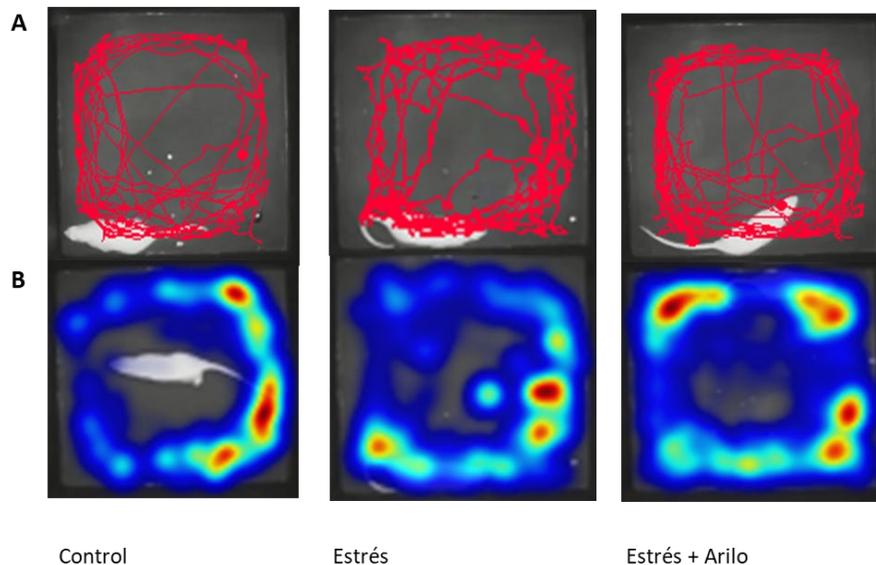


Figura 6. Trayectoria o tracking del recorrido en la arena de campo abierto (A), y mapas de calor (B).

Asimismo, el comportamiento fue conforme a lo predicho, desplazándose preferentemente por los laterales y esquina (bordes) vs. el centro de la arena, donde hay un aparente incremento en la permanencia en el centro en los animales que consumieron el arilo, sugiriendo una disminución en la ansiedad (Fig. 7 A).

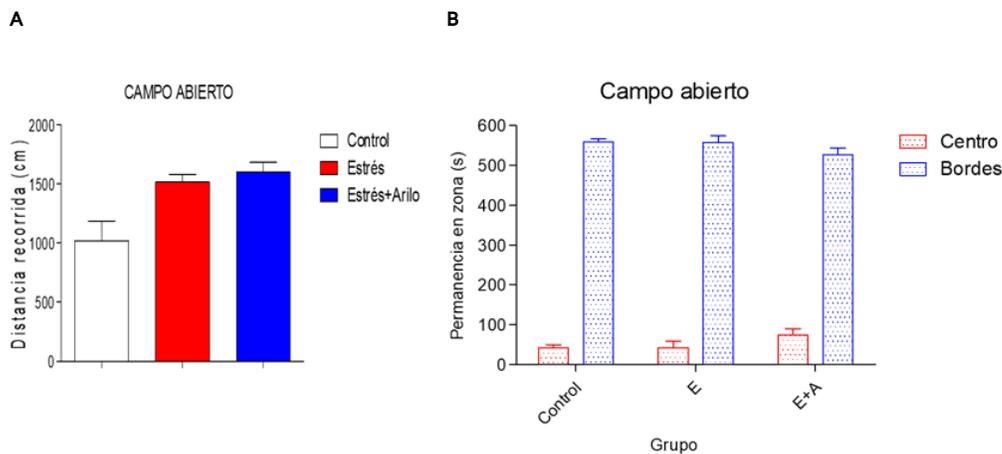


Fig. 7. Cuantificación del total de distancia recorrida (A) y tiempo de permanencia en los bordes (laterales y esquinas) vs. Centro (B), por grupo de estudio.

**Conducta en la prueba Plus maze.** Con el tratamiento de dos semanas no se observó un efecto del consumo del extracto de granada sobre el nivel de ansiedad, siendo semejante en los diferentes grupos de estudio (figura 9). En la figura 8 A puede apreciarse la trayectoria o tracking del roedor en la arena, observándose la conducta predicha de preferencia a permanecer en los brazos cerrados, lo mismo se aprecia en la figura 8 B, que muestra tonos más cálidos en la zona de brazos cerrados.

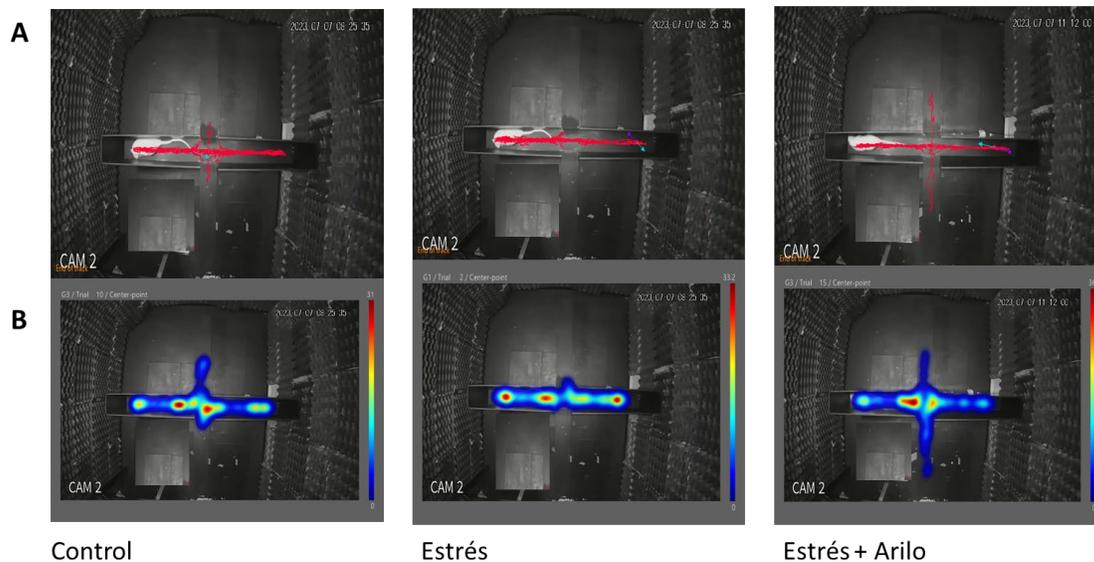


Fig. 8. Trayectoria o tracking del recorrido en la arena de la prueba Plus Maze (A), y mapas de calor (B).

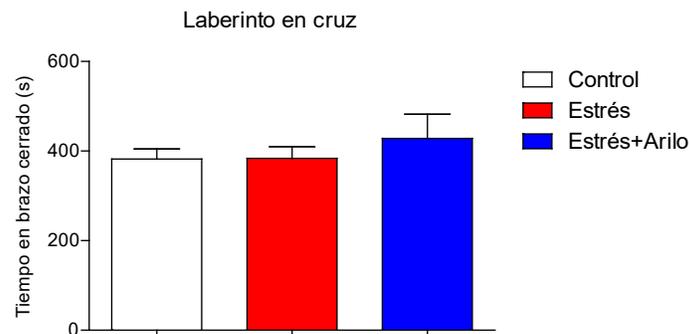


Fig. 9. Cuantificación del tiempo de permanencia en los brazos cerrados de la arena de la prueba Plus Maze, por grupo de estudio.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren una preferencia por el consumo de arilo de granada, a tenerse en cuenta en futuras investigaciones; también, el consumo del extracto de arilo de granada durante 14 días, a la dosis empleada, no mostró un efecto sobre la actividad dopaminérgica incrementada por el estrés inducido, reflejada en el incremento de la locomoción; además, estos datos preliminares muestran que la ingesta de arilo motiva la exploración en zonas usualmente estresantes. Finalmente, es necesario conocer el efecto del consumo de arilo de granada por un tiempo más prolongado.

## Agradecimientos

Agradecemos la generosa donación del extracto de arilo de granada al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera y a la Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez, del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; a la Universidad de Guanajuato, que a través de la Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2023, proyecto 246/2023 se destinaron recursos para el mantenimiento y cuidado de los animales empleados; a la misma Universidad de Guanajuato que a través del XXVIII Verano de la Ciencia otorgó apoyos sociales a los alumnos participantes; a la pasante en medicina Nicté Anaya Benítez, de la Benemérita Universidad Nacional Autónoma de Puebla, participante el Programa Nacional de Servicio Social Profesional en Investigación en Salud, adscrita a nuestro laboratorio, por la asesoría y acompañamiento a los estudiantes participantes. También todos los miembros del Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia integrativa que de diferentes formas apoyaron y acompañaron al equipo de trabajo. Y por supuesto, a la Rectoría de Campus Celaya-Salvatierra por las facilidades y apoyos económicos para la habilitación del área de trabajo del laboratorio.

## Referencias

- Abu-Taweel, G.M., Al-Mutary, M.G. (2021). Pomegranate juice moderates anxiety- and depression-like behaviors in AICl<sub>3</sub>-treated male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 68;126842
- Adiga, S., Trivedi, P., Ravichandra, V., Deb, D., Mehta, F. (2010). Effect of Punica granatum peel extract on learning and memory in rats, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3 (9). 687–690, [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60166-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60166-6).

- Alam, M. S., Alam, M. A., Ahmad, S., Najmi, A. K., Asif, M., & Jahangir, T. (2010). Protective effects of *Punica granatum* in experimentally-induced gastric ulcers. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(9), 572–578. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.508079>
- Álvarez-Cervantes, P., Izquierdo-Vega, J.A., Moran-León, J., Guerrero-Solano, J.A., García-Pérez, L.A., Cancino-díaz, J.C.,... Betanzos-Cabrera, G. (2021). Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. *Toxicology Research*. 00;1-8 doi: 10.1093/toxres/tfab013
- Cervantes-Anaya, N., Azpilcueta-Morales, G., Estrada-Camarena, E., Ramírez Ortega, D., Pérez de la Cruz, V., González-Trujano, M. E., & López-Rubalcava, C. (2022). Pomegranate and Its Components, Punicalagin and Ellagic Acid, Promote Antidepressant, Antioxidant, and Free Radical-Scavenging Activity in Ovariectomized Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 836681. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.836681>
- Cheng, J., Li, J., Xiong, RG., Wu, SX., Huang, SY., Zhou, DD., Saimaiti, A., Shang, A., Feng, Y., Gan, RY., Li, HB. (2023). Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. *Food Bioscience*. Volume 53, 102629. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102629>
- Ciccone, L., Nencetti, S., Rossello, A., Orlandini, E. (2023). Pomegranate: A Source of Multifunctional Bioactive Compounds Potentially Beneficial in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, 16, no.7: 1036. <https://doi.org/10.3390/ph16071036>
- Dorantes-Morales, A., Estrada-Luna, D., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Luna-Luna, M., Flores-Castillo, C.,... Carreón-Torres, E., (2020). Microencapsulated Pomegranate Modifies the Composition and Function of High-Density Lipoproteins (HDL) in New Zealand Rabbits. *Molecules*. 25;3297.
- Dulcich, M. S., & Hartman, R. E. (2013). Pomegranate supplementation improves affective and motor behavior in mice after radiation exposure. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 940830. <https://doi.org/10.1155/2013/940830>
- Emami Kazemabad, M. J., Asgari Toni, S., Tizro, N., Dadkhah, P. A., Amani, H., Akhavan Rezayat, S., Sheikh, Z., Mohammadi, M., Alijanzadeh, D., Alimohammadi, F., Shahrokhi, M., Erabi, G., Noroozi, M., Karimi, M. A., Honari, S., & Deravi, N. (2022). Pharmacotherapeutic potential of pomegranate in age-related neurological disorders. *Frontiers in aging neuroscience*, 14, 955735. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.955735>
- Estrada-Camarena, E. M., López-Rubalcava, C., Ramírez-Rodríguez, G. B., Pulido, D., Cervantes-Anaya, N., Azpilcueta-Morales, G., Granados-Juárez, A., Vega-Rivera, N. M., Islas-Preciado, D., Treviño, S., de Gortari, P., González-Trujano, M. E., & García-Viguera, C. (2020). Aqueous extract of pomegranate enriched in ellagitannins prevents anxiety-like behavior and metabolic changes induced by cafeteria diet in an animal model of menopause. *Neurochemistry international*, 141, 104876. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104876>
- Estrada-Luna, D., Carreón-Torres, E., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Dorantes-Morales, A., Luna-Luna, M.,... Pérez-Mendez, O. (2019). Microencapsulated Pomegranate Reverts High-Density Lipoprotein (HDL)-Induced Endothelial Dysfunction and Reduces Postprandial Triglyceridemia in Women with Acute Coronary Syndrome. *Nutrients*. 11;1710; doi:10.3390/nu11081710
- Flores-Zarate, G. M., Contreras-Vázquez, M. G., García-Miranda, L. Y., Delgado-Bautista, E. de J., Juárez-Cortes, E., & Negrete Díaz, J. V. (2022). Efecto de la alteración glutamatergica por activación del receptor de kainato sobre la memoria y conducta social en ratones juveniles. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenenciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenenciencia/article/view/3691>
- Forouzanfar, F., Ahmadpoor, M., Farahi, M. M., Hadianfar, A., Sahebkar, A., Esmaily, H., Nematy, M., & Rakhshandeh, H. (2022). The Effect of Pomegranate Juice and Sumac Consumption

- in the Treatment of Outpatients with COVID-19. Mediators of inflammation, 2022, 6850342. <https://doi.org/10.1155/2022/6850342>
- Galaz, P., M. Valdenegro, C. Ramirez, H. Nunez, S. Almonacid, & R. Simpson. (2017). Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *Journal of Food Engineering* 208:19–27. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.04.002.
- Gao, L., Zhang, L., Liu, J., Zhang, X., & Lu, Y. (2023). Analysis of the Volatile Flavor Compounds of Pomegranate Seeds at Different Processing Temperatures by GC-IMS. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(6), 2717. <https://doi.org/10.3390/molecules28062717>
- Hernández-Monzón, J. I., García-Miranda, L. Y., Silva-Campos, B. M., Juárez-Cortes, E., & Negrete Díaz, J. V. (2022). Efecto de la alteración glutamatérgica por activación del receptor de kainato sobre la respuesta de ansiedad en ratones juveniles. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3695>
- Jalali, A., Kiafar, M., Seddigh, M., & Zarshenas, M. M. (2021). Punica granatum as a Source of Natural Antioxidant and Antimicrobial Agent: A Comprehensive Review on Related Investigations. *Current drug discovery technologies*, 18(2), 207–224. <https://doi.org/10.2174/1570163817666200430001822>
- Jurenka J. S. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 13(2), 128–144.
- Liu, X., Du, L., Yang, X., Yin, B., Wang, L., & Wang, Y. (2023). Physicochemical properties of Tunisian pomegranate fruits *Punica granatum* L. grown at different climatic zones of Yunnan, China. *Heliyon*, 9(4), e14791. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14791>
- Loukhamas, S., Kerak, E., Outaki, M., Belaqziz, M., Harrak, H., (2020). Assessment of minerals, bioactive compounds, and antioxidant activity of ten Moroccan pomegranate cultivars, *J. Food Qual*, vol. 2020, Article ID 8844538, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/8844538>
- Mansoor, K., Bardees, R., Alkhawaja, B., Mallah, E., AbuQatouseh, L., Schmidt, M., & Matalka, K. (2023). Impact of Pomegranate Juice on the Pharmacokinetics of CYP3A4- and CYP2C9-Mediated Drugs Metabolism: A Preclinical and Clinical Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(5), 2117. <https://doi.org/10.3390/molecules28052117>
- Maphetu, N., Unuofin, J. O., Masuku, N. P., Olisah, C., & Lebelo, S. L. (2022). Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L. (pomegranate) plant extracts: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 153, 113256. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113256>
- Mayasankaravalli, C., Deepika, K., Esther Lydia, D., Agada, R., Thagriki, D., Govindasamy, C., Chinnadurai, V., Othman Gatar, O. M., Khusro, A., Kim, Y. O., & Kim, H. J. (2020).
- Melgarejo-Sánchez, P., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J.J. *et al.* (2021). Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 8, 2. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00351-5>
- Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Makunga, N. P., & Opara, U. L. (2016). Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 143. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1132-y>
- Nirumand, M. C., Hajjalyani, M., Rahimi, R., Farzaei, M. H., Zingue, S., Nabavi, S. M., & Bishayee, A. (2018). Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones: Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 765. <https://doi.org/10.3390/ijms19030765>
- Passafiume, R., Perrone, A., Sortino, G., Gianguzzi, G., Saletta, F., Gentile, C., Farina, V. (2019). Chemical–physical characteristics, polyphenolic content and total antioxidant activity of

three Italian-grown pomegranate cultivars. NFS Journal 16; 9–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.06.001>

- Paul, A., & Radhakrishnan, M. (2020). Pomegranate seed oil in food industry: Extraction, characterization, and applications. *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2020.09.014
- Pirzadeh, M., Caporaso, N., Rauf, A., Shariati, M. A., Yessimbekov, Z., Khan, M. U., Imran, M., & Mubarak, M. S. (2021). Pomegranate as a source of bioactive constituents: a review on their characterization, properties and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(6), 982–999. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1749825>
- Profiling the phyto-constituents of Punica granatum fruits peel extract and accessing its in-vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties. *Saudi journal of biological sciences*, 27(12), 3228–3234. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.046>
- Romeo, I., Vallarino, G., Turrini, F., Roggeri, A., Olivero, G., Boggia, R., Alcaro, S., Costa, G., & Pittaluga, A. (2021). Presynaptic Release-Regulating Alpha2 Autoreceptors: Potential Molecular Target for Ellagic Acid Nutraceutical Properties. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1759. <https://doi.org/10.3390/antiox10111759>
- Saeed, M., Naveed, M., BiBi, J., Kamboh, A. A., Arain, M. A., Shah, Q. A., Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., Abdel-Latif, M. A., Yattoo, M. I., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2018). The Promising Pharmacological Effects and Therapeutic/Medicinal Applications of Punica Granatum L. (Pomegranate) as a Functional Food in Humans and Animals. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 12(1), 24–38. <https://doi.org/10.2174/1872213X12666180221154713>
- Seidi, K., Jahanban-Esfahlan, R., Abasi, M., & Abbasi, M. M. (2016). Anti Tumoral Properties of Punica granatum (Pomegranate) Seed Extract in Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 17(3), 1119–1122. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.3.1119>
- Shahkoomahally, S., Khadivi, A., Brecht, J. K., & Sarkhosh, A. (2021). Chemical and physical attributes of fruit juice and peel of pomegranate genotypes grown in Florida, USA. *Food chemistry*, 342, 128302. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128302>
- Sun HY, Ma N, Pan T, Du Cl, Sun JY. (2019). Punicagranine, a new pyrrolizine alkaloid with anti-inflammatory activity from the peels of Punica granatum. *Tetrahedron Lett.* 60 (18). 1231–1233, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.03.056>.
- Suručić, R., Travar, M., Petković, M., Tubić, B., Stojiljković, M. P., Grabež, M., Šavikin, K., Zdunić, G., & Škrbić, R. (2021a). Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor: In silico and in vitro studies. *Bioorganic chemistry*, 114, 105145. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105145>
- Suručić, R., Tubić, B., Stojiljković, M. P., Djuric, D. M., Travar, M., Grabež, M., Šavikin, K., & Škrbić, R. (2021b). Computational study of pomegranate peel extract polyphenols as potential inhibitors of SARS-CoV-2 virus internalization. *Molecular and cellular biochemistry*, 476(2), 1179–1193. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03981-7>
- Tito, A., Colantuono, A., Pirone, L., Pedone, E., Intartaglia, D., Giamundo, G., Conte, I., Vitaglione, P., & Apone, F. (2021). Pomegranate Peel Extract as an Inhibitor of SARS-CoV-2 Spike Binding to Human ACE2 Receptor (in vitro): A Promising Source of Novel Antiviral Drugs. *Frontiers in chemistry*, 9, 638187. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.638187>
- Venkatasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Pomegranate. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, 181–216. doi:10.1016/b978-0-12-814138-0.00008-3
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive reviews*

in food science and food safety, 9(6), 635–654. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>

Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., & Arsić, A. (2019). Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. *Current pharmaceutical design*, 25(16), 1817–1827. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708183941>

Zhao, X., & Yuan, Z. (2021). Anthocyanins from Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Their Role in Antioxidant Capacities in Vitro. *Chemistry & biodiversity*, 18(10), e2100399. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100399>

Zuraini, N. Z. A., Sekar, M., Wu, Y. S., Gan, S. H., Bonam, S. R., Mat Rani, N. N. I., Begum, M. Y., Lum, P. T., Subramaniyan, V., Fuloria, N. K., & Fuloria, S. (2021). Promising Nutritional Fruits Against Cardiovascular Diseases: An Overview of Experimental Evidence and Understanding Their Mechanisms of Action. *Vascular health and risk management*, 17, 739–769. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S328096>