



---

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Maestría en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
CIRUELA (*Prunus domestica*) VARIEDAD  
SANTA ROSA

T e s i s

para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas  
P r e s e n t a

Lic. Nut. María de Lourdes Meza Jiménez

Director de tesis  
Dr. Daniel Méndez Iturbide

Tlaxcala, Tlax.

Mayo 2010



---

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Maestría en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
DE CIRUELA (*Prunus domestica*) VARIEDAD  
SANTA ROSA

T e s i s

para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas  
P r e s e n t a

Lic. Nut. María de Lourdes Meza Jiménez

Comité tutorial

Dr. Daniel Méndez Iturbide  
Dr. Gerardo Díaz Godinez  
Dr. Raúl René Robles de la Torre  
Dr. Arturo Navarro Ocaña  
Dra. Mariana Domínguez López  
Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Tlaxcala, Tlax.

Mayo 2010

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis de **María de Lourdes Meza Jiménez** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Evaluación de la actividad antioxidante de ciruela (*Prunus domestica*) variedad Santa Rosa”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A tentamente  
Tlaxcala, Tlax., mayo 18 de 2010

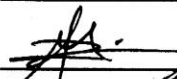
Dr. Daniel Méndez Iturbide



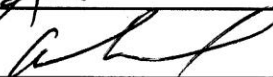
Dr. Raúl René Robles de la Torre



Dr. Gerardo Díaz Godínez



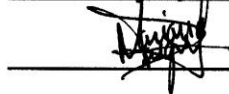
Dr. Arturo Navarro Ocaña



Dra. María del Carmen Sánchez Hernández



Dra. Mariana Domínguez López



## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por el proyecto financiado de ciencia básica 2008, número 105663.

# ÍNDICE

TEMA	PAGINA
RESUMEN .....	i
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Ciruela.....	2
1.2 Antioxidantes.....	3
1.3 Radicales libres .....	8
1.4 Estrés oxidativo .....	15
1.5 Metabolitos secundarios.....	15
1.6 Propiedades biológicas de flavonoides y antocianinas .....	19
1.7 Técnicas para la evaluación de la actividad antioxidante .....	22
2.0 ANTECEDENTES .....	23
2.1 Actividad antioxidante en epidermis .....	23
2.2 Análisis cuantitativo de compuestos fenólicos.....	23
2.3 Análisis cuantitativo de carotenoides .....	25
2.4 Actividad antioxidante por la técnica de DPPH.....	26
2.5 Actividad antioxidante por la técnica de TBARS .....	28
3.0 JUSTIFICACIÓN .....	30
4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
5.0 OBJETIVOS.....	32
6.0 METODOLOGÍA.....	33
6.1 Recolección de la muestra biológica .....	34
6.2 Obtención de los extractos .....	34
6.3 Determinación cuantitativa de fenoles totales.....	35
6.4 Determinación de carotenoides .....	36
6.5 Reducción del radical libre 2,2-difenil1-picrilhidracil (DPPH) .....	36
6.6 Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS).....	38
6.7 Material .....	41
6.7 Análisis estadístico .....	42
6.8 Cálculo de la CI <sub>50</sub> .....	42

7.0 RESULTADOS .....	43
7.1 Obtención de la muestra biológica .....	43
7.2 Extractos.....	43
7.3 Cantidad de polifenoles totales.....	43
7.4 Cantidad de carotenoides .....	43
7.5 Porcentaje de reducción del radical libre DPPH .....	44
7.6 $CI_{50}$ de los extractos etanol, metanol y ácido .....	47
7.7 $CI_{50}$ de antioxidantes de referencia .....	48
7.8 Porcentaje de inhibición en el ensayo TBARS .....	51
7.9 $CI_{50}$ de los extractos etanol, metanol y ácido .....	54
8.0 $CI_{50}$ de antioxidantes de referencia .....	55
9.0 DISCUSIÓN.....	57
10.0 CONCLUSIONES .....	63
11.0 PERSPECTIVAS.....	64
12.0 REFERENCIAS .....	65
ANEXOS .....	71

## RESUMEN

La tendencia mundial sobre la investigación de antioxidantes en frutos se encuentra en aumento. Lo anterior se debe a los efectos potenciales que los metabolitos con actividad antioxidante (AA) ejercen a la salud. Existen datos que presentan la AA de diversos frutos, entre ellos se encuentran los pertenecientes a la familia de las *Rosaceae*. Sin embargo, aún existe deficit de información respecto a la AA de diferentes variedades de frutos pertenecientes a las *Rosacéas*, dentro de éstas la ciruela *Prunus domestica*. Por tanto, el propósito del presente proyecto fue evaluar la AA en epidermis del fruto de ciruela. Para ello, se cuantifico el contenido de polifenoles totales, carotenoides y se emplearon metodos colorimetricos, para determinar la AA, como 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para determinar polifenoles totales y carotenos se utilizó la epidermis del fruto. En DPPH y TBARS se trabajó con siete extractos (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol y ácido) provenientes de la epidermis. Durante la evaluación de la AA se compararon los extractos obtenidos de la epidermis del fruto de ciruela que presentaron mayor AA contra antioxidantes de referencia (quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico). Los resultados para polifenoles fueron 1.62 mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra en peso seco. En cuanto a carotenos la ciruela contiene 5.73  $\mu\text{g/g}$  en epidermis. En los resultados de DPPH y TBARS para ambos ensayos los extractos con mayor actividad fueron etanol, metanol y ácido. Finalmente, al comparar contra antioxidantes de referencia en todos los casos los extractos más activos tuvieron una AA inferior.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eficientes para sintetizar compuestos a través de la fotosíntesis. Dentro de los compuestos que las plantas producen se encuentran los metabolitos primarios y secundarios. Por un lado, los metabolitos primarios (hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) se caracterizan por su amplia distribución con la finalidad de garantizar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por otro lado, los metabolitos secundarios (MS) tienen una distribución limitada, se presentan en grupos específicos de organismos y, por tanto, expresan individualidad de especies. Regularmente se observan niveles de 1-3% de MS en plantas, en peso seco.

Los MS han sido empleados como pigmentos, saborizantes, fragancias, estimulantes, alucinógenos, antiinflamatorios y antioxidantes, entre otros, sin embargo, sus funciones putativas aún son tema de controversia (Schwab, 2003). Uno de los principales grupos de MS que presentan AA lo constituyen los compuestos fenólicos, entre éstos los flavonoides. Ésta actividad se debe a diferentes mecanismos: atrapar a radicales libres, quelar metales, inhibir enzimas responsables de la generación de radicales libres, también para activar mecanismos de defensa y proteger a sustratos oxidables.

Algunos compuestos fenólicos han sido identificados en plantas de la familia *Rosaceae*, en ésta se encuentra el género *Prunus*. En el cual no existen evidencias suficientes respecto a los metabolitos existentes con actividad biológica, específicamente AA (Deineka, 2005). En la exploración para identificar MS existe interés concreto por aquellos con actividad biológica. La literatura describe diversas pruebas biológicas, *in vitro* e *in vivo*, que son utilizadas para evaluar la actividad biológica en extractos de plantas (Phillipson, 2007).



## 1.1 Ciruela

La ciruela corresponde al género *Prunus*, perteneciente a la familia *Rosaceae*. Ésta incluye numerosas especies de árboles frutales conocidas como "frutos piedra" (debido a que la semilla se encajona dentro de un endocarpo duro). La mayoría de las ciruelas cultivadas comercialmente pertenecen a dos grupos: Japonesa y Europea. Dentro de éstas, nectarina (*P. persica* L.), ciruela japonesa (*P. salicina* Lindl.) ciruela europea (*P. domestica* L.), etc. (Pua y Davey 2007). El origen de *Prunus domestica* de acuerdo a Crane y Lawrence (1956) fue en Asia Menor como un híbrido entre *P. cerasifera* (ciruela Mirobalán) y *P. spinosa* L. Sin embargo, nuevos trabajos citológicos indican que *P. domestica* puede ser descendiente de *P. Cerasifera* (Hancock, 2008).

La clasificación taxonómica para *P. domestica* es la siguiente:

Reino *Plantae*

Subreino *Tracheobionta*

División *Magnoliophyta*

Clase *Magnoliopsida*

Subclase *Rosidae*

Orden *Rosales*

Familia *Rosaceae*

Género *Prunus*

Subespecies *Prunus domestica* ssp. *Domestica* (SIIT<sup>\*mx</sup>), Figura 1



Figura 1. *Prunus domestica*

La parte comestible de la fruta es el mesocarpo jugoso. Su floración se determina por la temperatura durante el invierno y la primavera. Además, resulta importante considerar la diversidad de factores clave en la aceptación de ciruelas por los consumidores, incluidas el

atractivo, tamaño, firmeza, buen sabor y textura (Hancock, 2008). Otros rasgos importantes del fruto son sus propiedades nutrimentales: fibra, minerales (Na y K), vitaminas (por ejemplo A y C), compuestos fenólicos, etc. Por un lado, los compuestos fenólicos en ciruela pueden retrasar la absorción de glucosa e inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad *in vitro*, y por lo tanto sirven como agentes preventivos contra enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad cardíaca y cáncer. Por otro lado, entre los efectos generales a la salud que la ciruela proporciona se encuentra: actúa contra el estreñimiento, mantiene saludables a los huesos, auxilia contra el estrés oxidativo, efecto antitumoral y antimicrobiano (Stacewicz- Sapuntzakis y cols., 2001; Lee y cols., 2008).

## **1.2 Antioxidantes**

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que en bajas concentraciones, comparadas a las de algún sustrato oxidable (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos), retrasa o previene significativamente la oxidación de éste (Carr y Frei, 1999). Igualmente, los antioxidantes se definen como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Posada-Jaramillo y cols., 2003). La capacidad de los antioxidantes naturales para reaccionar con los radicales libres los hace de interés especial (Miller y cols., 2000). Los antioxidantes efectúan las siguientes funciones

- Disminuir la concentración de oxidantes.
- Evitar la iniciación de la reacción en cadena de formación de radicales libres.
- Unirse a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
- Transformar peróxidos en productos menos reactivos (Dorado y cols., 2003).

Los antioxidantes de acuerdo a su origen se clasifican en endógenos (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobulina, hemopexina, ácido úrico y bilirrubina), y exógenos, obtenidos a través de la alimentación (vitamina E, C, carotenoides y compuestos fenólicos) (Fitó y cols., 2003). A continuación se proporciona información acerca de cada uno de los tipos de antioxidantes.

**Antioxidantes endógenos:**

**Superoxidos dismutasas:** Se encuentran a nivel citoplasmático y mitocondrial, requieren cobre, zinc y manganeso para catalizar la remoción de los radicales superóxido.

**Catalasas:** Remueven el peróxido de hidrógeno, actuando junto con hierro.

**Glutación peroxidadas:** Se encargan de remover hidroperóxidos lipídicos y dependen de selenio (Duthie GG y Bellizzi 1999).

**Albúmina:** Vehículo para el transporte de iones metálicos y ácidos grasos libres. Se considera como un antioxidante indirecto debido a su capacidad para enlazarse de forma específica a radicales libres. Las funciones que ejerce son: inhibir la peroxidación de lípidos ion-dependiente, inhibir la formación del radical hidróxido. Además, puede ayudar a detener iones de cobre provenientes de la acelerada peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (Delimaris y cols., 2007).

**Transferrina:** Constituye una de las principales proteínas antioxidantes, se sintetiza por diversos tejidos incluyendo el cerebro. Este antioxidante se encuentra principalmente en el suero sanguíneo, pero también se sitúa a bajas concentraciones en otros fluidos del organismo. Su principal función es el transporte de hierro a las células de proliferación. (Chauhan y cols., 2004).

**Ceruloplasmina:** Es una  $\alpha$ 2-glicoproteína del suero que transporta el 95% de cobre en sangre. Ésta actúa como ferroxidasa, superóxido dismutasa y protege de los radicales libres de oxígeno a los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares de la sangre (Chauhan y cols., 2004).

**Haptoglobinas:** Son glicoproteínas encontradas en la fracción  $\alpha$ 1-globulina del suero sanguíneo, las cuales corresponden a la fase aguda de las proteínas (Gutteridge, 1987). Tienen una crucial importancia contra la inducción del estrés oxidativo ocasionado por hemoglobina y previene el desprendimiento del hierro de la misma (Tseng y cols., 2004).

**Hemopexina:** Considerada antioxidante por su alta afinidad por la hemoglobina y el grupo hemo. Ejerce su acción antioxidante al prevenir la catálisis del grupo hemo y evita la producción de radicales libres.

**Ácido úrico:** Es un poderoso atrapador del oxígeno singulete, radical peroxilo e hidroxilo, también es un eficaz eliminador del ozono y del ácido hipocloroso (Amez y cols., 1981).

**Bilirrubina:** Se demostró que en presencia de estrés oxidativo la bilirrubina supera al  $\alpha$ -tocoferol como protector contra la peroxidación de lípidos. Además, en el plasma la bilirrubina puede actuar sinérgicamente con la vitamina E, para proteger la membrana lipídica de la peroxidación (Berrahal y cols., 2007).

### Antioxidantes exógenos

**Vitamina E:** Antioxidante liposoluble más importante, detiene la acción de radicales libres y finaliza la peroxidación lipídica. La molécula de vitamina E incluye cuatro tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Específicamente, el  $\alpha$ -tocoferol (precursor de la vitamina E), Figura 2, presenta elevada actividad antioxidante y se considera de mayor abundancia en la naturaleza. Los tocoferoles y tocotrienoles reaccionan con radicales libres como el radical peroxilo y oxígeno singulete molecular (Thakur y Srivastava, 1996, Brigelius-Flohe y Traber, 1999).

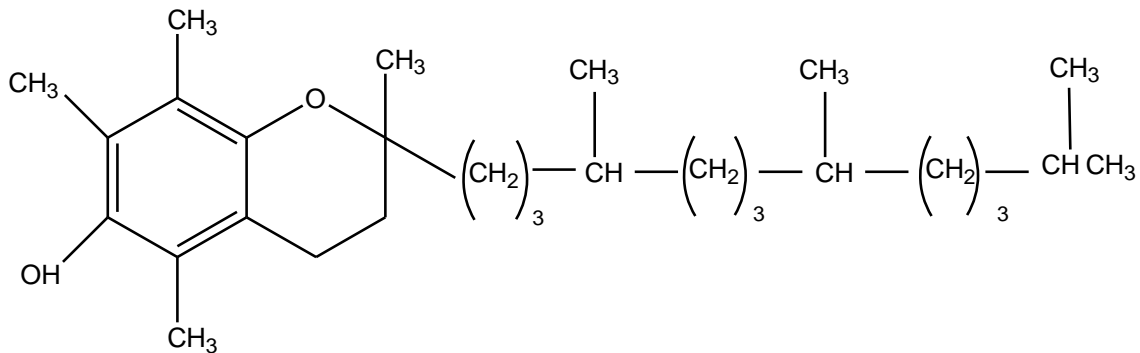


Figura 2. Estructura de la vitamina E.

**Ácido ascórbico** (Figura 3): Es un donador de electrones y agente reductor. Dona dos electrones de su doble enlace entre el segundo y tercer carbono. Al donar estos electrones previene la oxidación de otros compuestos. Por tanto, el ácido ascórbico se convierte en radical libre (RL), sin embargo, se encuentra en una forma estable y ausente de reactividad con un tiempo medio de vida de  $10^{-5}$  segundos (Sebastian y cols., 2003).

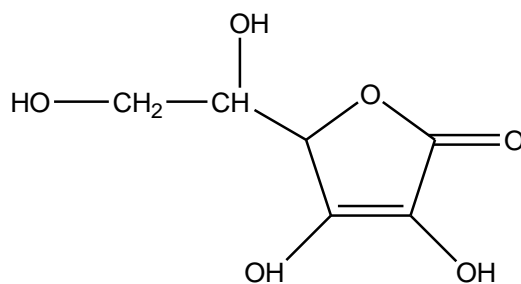


Figura 3. Estructura de la vitamina C

**Carotenoides:** Son los pigmentos responsables de la coloración (desde amarillos a rojos) de frutas y vegetales. Estos compuestos son los principales y mas efectivos inhibidores naturales de radicales libres (Figura 4), específicamente del oxígeno singlete (Voutilainen y cols., 2006, Marinova y cols., 2007).

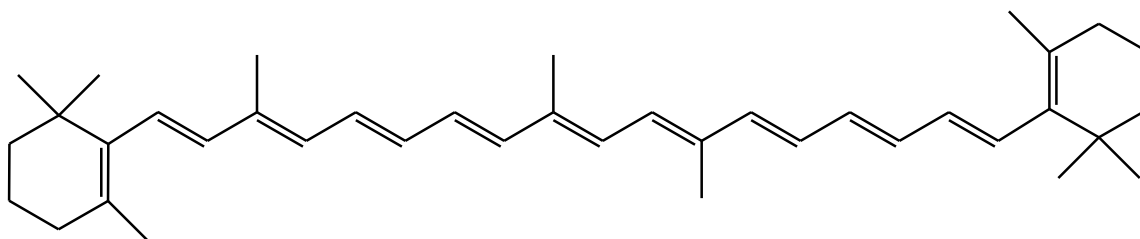


Figura 4. Estructura del  $\beta$ -caroteno

**Compuestos fenólicos:** Son un grupo de compuestos de naturaleza química heterogénea, cuya principal característica es la de poseer al menos un grupo hidroxilo. El modo de acción respecto a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con una o más de las siguientes funciones. Capturar radicales libres, agentes reductores, formación de complejos con metales y extinguidores de la formación de oxígeno singlete. La mezcla de compuestos fenólicos puede actuar en forma sinérgica con las vitaminas funcionando como protectores y regeneradores de antioxidantes.

La ingestión diaria de flavonoides en países occidentales se estima en el orden de 0.5 y 1 g, puede ser menor afectando su actividad antioxidante, debido a que la cantidad absorbida y metabolizada es mucho menor a la ingerida (Ross, 1999).

## **Antioxidantes en la industria**

La presencia de oxígeno puede ocasionar rancidez en alimentos, esto genera la formación de productos tóxicos, degradación del color, sabor y valor nutritivo de alimentos. Por ello los antioxidantes finalizan las reacciones de oxidación. Por ejemplo, los antioxidantes previenen o limitan el enranciamiento de grasas y alimentos que las contengan. Los estabilizan mediante la prevención o inhibición de oxidación de grasas no saturadas y aceites, colores y sabores. Los más utilizados son los antioxidantes sintéticos BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (hidroxiquinona de butilo), y galato de propilo. Estos pueden ser utilizados solos o en combinación con uno u otro aditivo para el control de la oxidación. También, evitan la oxidación de grasa contenida en alimentos (hasta el 0,02% de la grasa) al adicionarlos en envases de alimentos, por ejemplo en cajas de cereales de grano entero. Otro grupo de antioxidantes se producen de forma natural, como el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), ácido cítrico, y algunos compuestos fenólicos.

Ejemplo de la adición de antioxidantes en alimentos son aceites y grasas, cuya estabilidad oxidativa puede ser influenciada por muchos factores, como luz, iones metálicos, oxígeno, temperatura y enzimas. La adición de antioxidantes a aceites previene o disminuye la oxidación de los mismos. Tradicionalmente, antioxidantes como BHA y BHT, se utilizan como antioxidantes en aceites comestibles. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que estos compuestos son tóxicos para animales experimentales.

De igual manera, los procesadores de carne añaden ascorbato de sodio o eritrobato sódico para curar la carne, mantener su color e inhibir la producción de nitrosaminas a partir de nitritos. El ácido etilendiamino tetracético (EDTA) puede utilizarse como un antioxidante debido a sus propiedades.

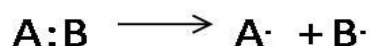
Por lo tanto, el uso de antioxidantes naturales actualmente se traduce en una tendencia respecto a su investigación y aplicación industrial. Varios compuestos, incluyendo palmitato de ascorbilo, tocoferol, catequina, extracto de romero, y fosfolípidos se han investigado y la mayoría de ellos

fueron más efectivos que BHA y BHT en la disminución de la oxidación de lípidos (Yan-Hwa y Hsia-Fen, 1999, Vaclavik y Christian, 2008, Xiu-Quin y cols., 2009).

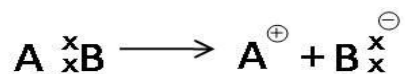
### 1.3 Radicales libres

Un radical libre (RL) se define como aquella molécula que en su estructura presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. Los RL son generados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula en condiciones fisiológicas. Se inactivan por mecanismos enzimáticos y de atrapamiento (Auroma, 1999).

La presencia de uno o más electrones desapareados ocasiona que la especie sea atraída por un campo magnético, y ocasiona alta reactividad. Los RL pueden formarse por la pérdida de un solo electrón de una especie no-radical, o por el incremento de un solo electrón por un no-radical. Estos pueden ser formados cuando se rompe un enlace covalente y uno de los átomos de cada par se queda con un electrón, un proceso conocido como *fisión homolítica*. Si A y B se consideran dos átomos covalentemente enlazados (representando un par de electrones), la fisión homolítica puede expresarse como:



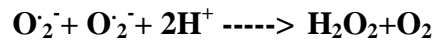
Otro proceso para la formación de RL es la *fisión heterolítica* en la cual un átomo recibe ambos electrones, cuando un enlace covalente se rompe. La energía requerida para dissociar el enlace covalente puede ser originada por calor ó radiación electromagnética. La fisión heterolítica se expresa en el siguiente ejemplo: (Halliwell y cols., 1989).



Ejemplos para ilustrar la formación de radicales libres son aquellos en los que interviene el oxígeno, especies reactivas del oxígeno (ERO). Éste solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno (Rodríguez y cols., 2001). Cuando un electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) mediante:



Éste radical constituye una especie química altamente reactiva, es inestable en soluciones acuosas, reacciona con ella misma y mediante una reacción simultánea produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ).



El  $\text{H}_2\text{O}_2$  constituye un peligro potencial para las células, debido a que atraviesa con facilidad las membranas biológicas y es a partir de éste que se origina el radical hidroxilo. Éste radical se forma por la reducción del oxígeno molecular por tres electrones y se considera una de las especies más reactivas conocidas con una vida y acción corta (Parker y cols., 1999). Las especies reactivas pueden ser generadas por sistemas biológicos, por ejemplo autoxidación de moléculas pequeñas (citoplasmáticas), oxidación de hemoglobina y mioglobina, entre otros.

### **Generación de especies reactivas por sistemas biológicos**

Los sistemas biológicos producen especies reactivas, muchas de las cuales son productos intermedios de diversas reacciones enzimáticas que resultan beneficiosas para el organismo. A continuación se describen los principales sistemas biológicos capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ERO):

#### **Fuentes endógenas o sistemas intracelulares**

- Autoxidación de moléculas pequeñas: El producto final de la autoxidación de moléculas citoplasmáticas es el  $\text{O}_2^-$  que por otras reacciones de dismutación espontánea o enzimática pueden dar lugar a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Entre estas moléculas están los iones divalentes, tioles, quinonas, catecolaminas y flavinas.



- Oxidación de hemoglobina y mioglobina: Produce radicales libres de oxígeno. La molécula de hemoglobina oxigenada se puede descomponer y dar lugar al  $O_2^-$  y hemo- $Fe^{3+}$ ; de esta forma la hemoglobina ya no puede transportar oxígeno.
- Actividad enzimática: En su proceso catalítico algunas enzimas como la dihidroorato deshidrogenasa, triptófano deshidrogenasa, xantina oxidasa y óxido nítrico sintetasa. En algunos casos los RL que se forman regulan las vías metabólicas en las que participan.
- Peroxisomas: Estos organelos del citosol contienen gran cantidad de oxidasa que genera  $H_2O_2$ , éste es depurado por las catalasas y finalmente se transforma en agua.
- Leucocitos polimorfonucleares: Constituyen una fuente muy importante, pues en sus membranas tienen la enzima NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa implicadas en la destrucción fagocítica de bacterias mediante la producción de  $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$  y oxígeno singulete.
- Transporte mitocondrial: Representa la mayor fuente de  $O_2^-$  en este proceso la acción de la citocromo oxidasa impide la liberación de ERO al catalizar la reducción del oxígeno molecular con cuatro electrones y cuatro protones para dar dos moléculas de agua (Figura 5).

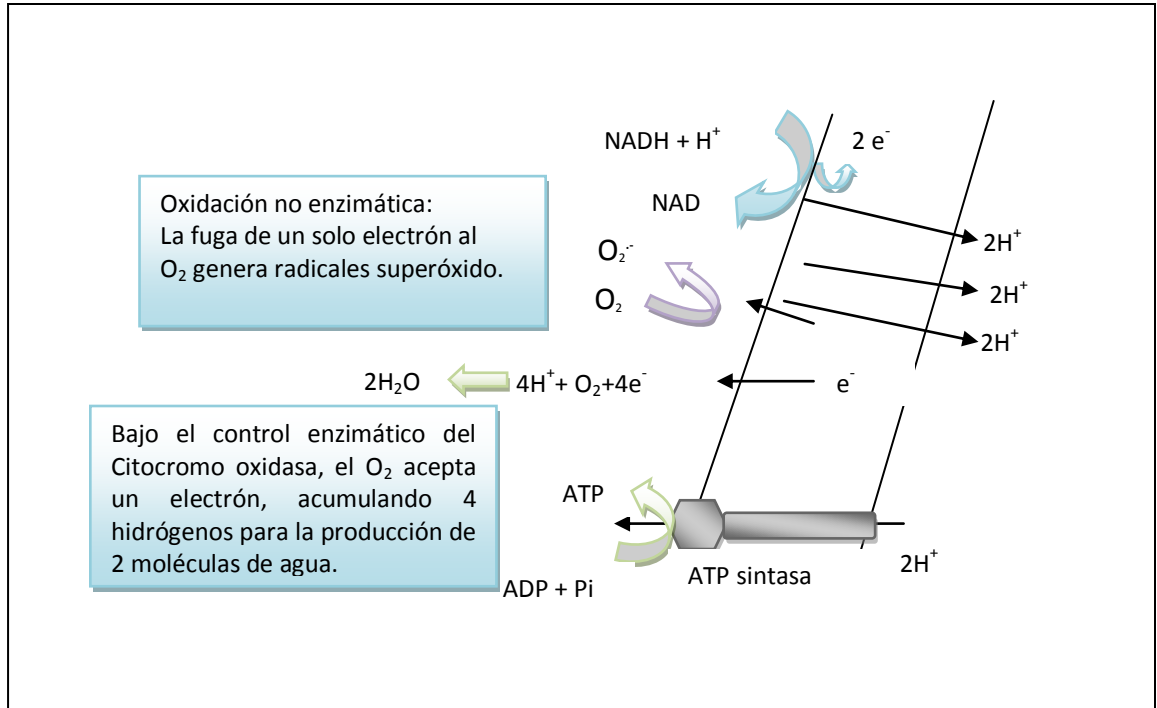


Figura 5. Generación de superóxido en la cadena de transporte de electrones

### Fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno

- Radiación ionizante.
- Radiación ultravioleta.
- Toxicidad por xenobióticos: tabaco, antimicrobianos, alimentos (lípidos oxidados y otros productos del ahumado) fármacos anticancerígenos y otros medicamentos.

En la Figura 6 se muestra la generación de radicales libres.

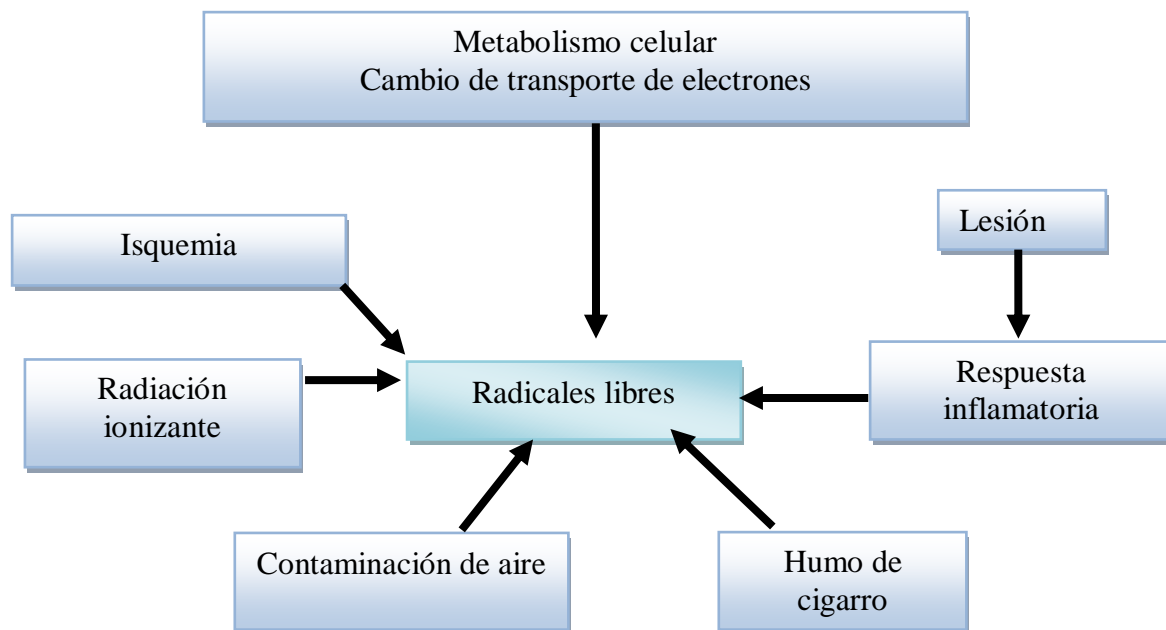


Figura 6. Fuente de radicales libres

### Efecto de radicales libres (RL) a biomoléculas

Numerosos estudios han mostrado la relación de los RL en la etiología de diversas patologías. Dada su alta inestabilidad atómica los RL reaccionan con biomoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos), desestabilizando los sistemas biológicos. De igual manera provocan la oxidación de la biomolécula en cuestión y provocan la pérdida de su función específica en la célula.

**Proteínas:** La oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina da lugar a la formación de entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y producción de grupos carbonilos que impiden el cumplimiento de algunas funciones específicas de cada proteína como transporte iónico de membranas, receptores, mensajeros celulares y enzimas reguladoras del metabolismo. De igual manera los enlaces peptídicos son susceptibles de daño por estas sustancias, lo cual genera su rompimiento.

**Carbohidratos:** Estas moléculas son menos sensibles al ataque de los RL. Aun así, los monosacáridos pueden reaccionar con el radical hidroxilo y producir sustancias reactivas. Por su parte, los polisacáridos cuando son atacados por las ERO pueden fragmentarse para producir moléculas más pequeñas; este es el caso del ácido hialurónico que es un glicosaminoglicano

(constituido por aminoazúcares) que al sufrir el ataque de radicales hidroxilo da como resultado una disminución del líquido sinovial de las articulaciones.

**Lípidos:** Los RL hidroxilo, perhidroxilo y el oxígeno singulete reaccionan con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de la membrana celular, para formar finalmente hidroperóxidos lipídicos. El proceso se inicia cuando la especie reactiva toma un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metílenos de cadena hidrocarbonada, dando origen a un RL lipídico. La oxidación lipídica tiene característica de ser una reacción en cadena, en la que, el ácido graso oxidado se transforma en un radical de ácido graso capaz de oxidar a otra molécula cercana al mismo (Figura 7). Los productos finales de la peroxidación lipídica como alcohol o aldehídos pueden difundirse a sitios diferentes de donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis.

**Ácidos nucleicos:** El daño sobre el ADN genera cambios en la secuencia normal de las bases. Dichas modificaciones producen reacciones de entrecruzamiento y ruptura de la hebra del ADN. Cuando el daño es muy grande y no puede ser reparado por los sistemas biológicos, se produce una mutación o la muerte celular espontánea (apoptosis). Es más susceptible el ADN mitocondrial a los radicales libres que el ADN nuclear por no tener en su estructura histonas unidas (Posada-Jaramillo y cols., 2003).



## **1.4 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las moléculas de alto potencial oxidante denominadas especies reactivas de oxígeno, (en su mayoría radicales libres) y el sistema de defensa antioxidante. El estrés oxidativo está relacionado con el envejecimiento y la patogénesis de más de cien padecimientos crónico degenerativos relacionados con la edad, tales como la diabetes mellitus II, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, enfermedad de Parkinson, cataratas y cáncer, entre otros, de ahí la importancia de su estudio (Ada y cols., 2003). Se ha determinado que los metabolitos secundarios contribuyen a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo.

## **1.5 Metabolitos secundarios**

En las plantas el metabolismo secundario tiene una participación primordial en la supervivencia de éstas en su ambiente. Algunos ejemplos de la importancia de los metabolitos secundarios son la atracción de polinizadores, defensa contra depredadores y enfermedades, entre otros. Numerosos metabolitos secundarios tales como alcaloides, antocianinas, flavonoides, quinonas, lignanos, esteroides, y terpenoides, tienen aplicación comercial como drogas, pigmentos, saborizantes, fragancias, insecticidas, etc. (Verpoorte y cols., 2002). En la Figura ocho se observa la ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios (Nakanishi, 1974). Uno de los principales grupos de metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos.

### **Compuestos fenólicos**

Estos metabolitos se caracterizan por tener un anillo aromático y uno o más sustituyentes hidroxilo (Robards y cols., 1999). Se encuentran comúnmente en plantas comestibles y no comestibles. Los compuestos fenólicos son importantes para el crecimiento, desarrollo normal de las plantas y como defensa contra infecciones y lesiones. En plantas dañadas los compuestos fenólicos pueden tener un efecto importante sobre la estabilidad oxidativa y la seguridad microbiana (Karakaya y cols., 2001).

Entre los alimentos que contienen compuestos fenólicos se encuentran las bayas (*Rubus*), ciruela (*Prunus domestica*), manzana (*Malus pumila*), durazno (*Prunus persica*), pera (*Pyrus comunis*) y uva (*Vitis spp.*), solo por mencionar algunos (Robards y cols., 1999). En la Tabla 1 se presentan otros alimentos que contienen compuestos fenólicos.

Tabla 1. Compuestos fenólicos presentes en frutos y cereales.

<b>Compuesto fenólico</b>	<b>Fuente alimenticia</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>	
Ácidos hidroxinámicos	Chabacano, arándanos, peras, cerezas, cítricos, durazno, ciruelas
Ácidos hidroxibenzoicos	Arándanos
<b>Flavonoides</b>	
Antocianinas	Arándanos, grosellas rojas y negras, cerezas, uvas y fresas, solo por mencionar algunas
Chalconas	Manzanas
Flavanoles	Manzanas, arándanos, uvas
Flavanonas	Frutas cítricas
Flavonoles	Manzanas, judías, arándanos
Flavonas	Cítricos
Isoflavonas	Soya
Taninos	Uva
Condensados	Manzana, uvas, durazno, ciruelas y peras
Hidrolizables	Granada, frambuesa

Fuente: Naczki y Shahidi, 2006

## **Flavonoides**

Los flavonoides son uno de los grupos más amplios de compuestos fenólicos. Están ampliamente distribuidos en frutas y vegetales, por ejemplo té negro, café, cocoa, cerveza, vino rojo, fresa, cereza, frambuesa, arándanos, etc. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados. Existen doce subclases de flavonoides (Figura 9) con un total de

5000 compuestos, todos presentan un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difenílpropano) derivado del ácido shikímico y restos de acetato. Entre las doce subclases de flavonoides se encuentran las antocianinas (Pérez-Trueba, 2003).

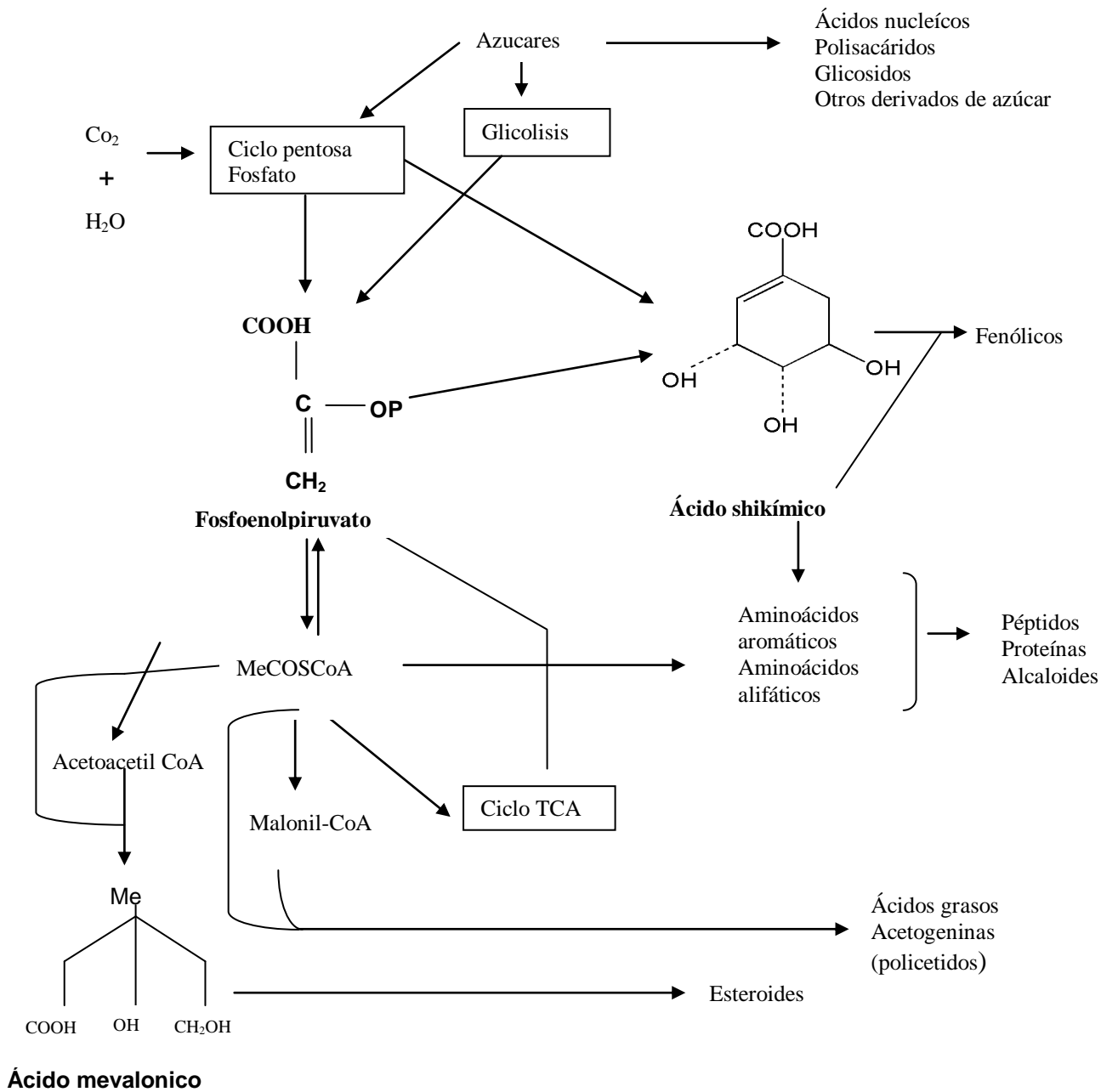


Figura 8. Biosíntesis de metabolitos secundarios (Nakanishi, 1974).



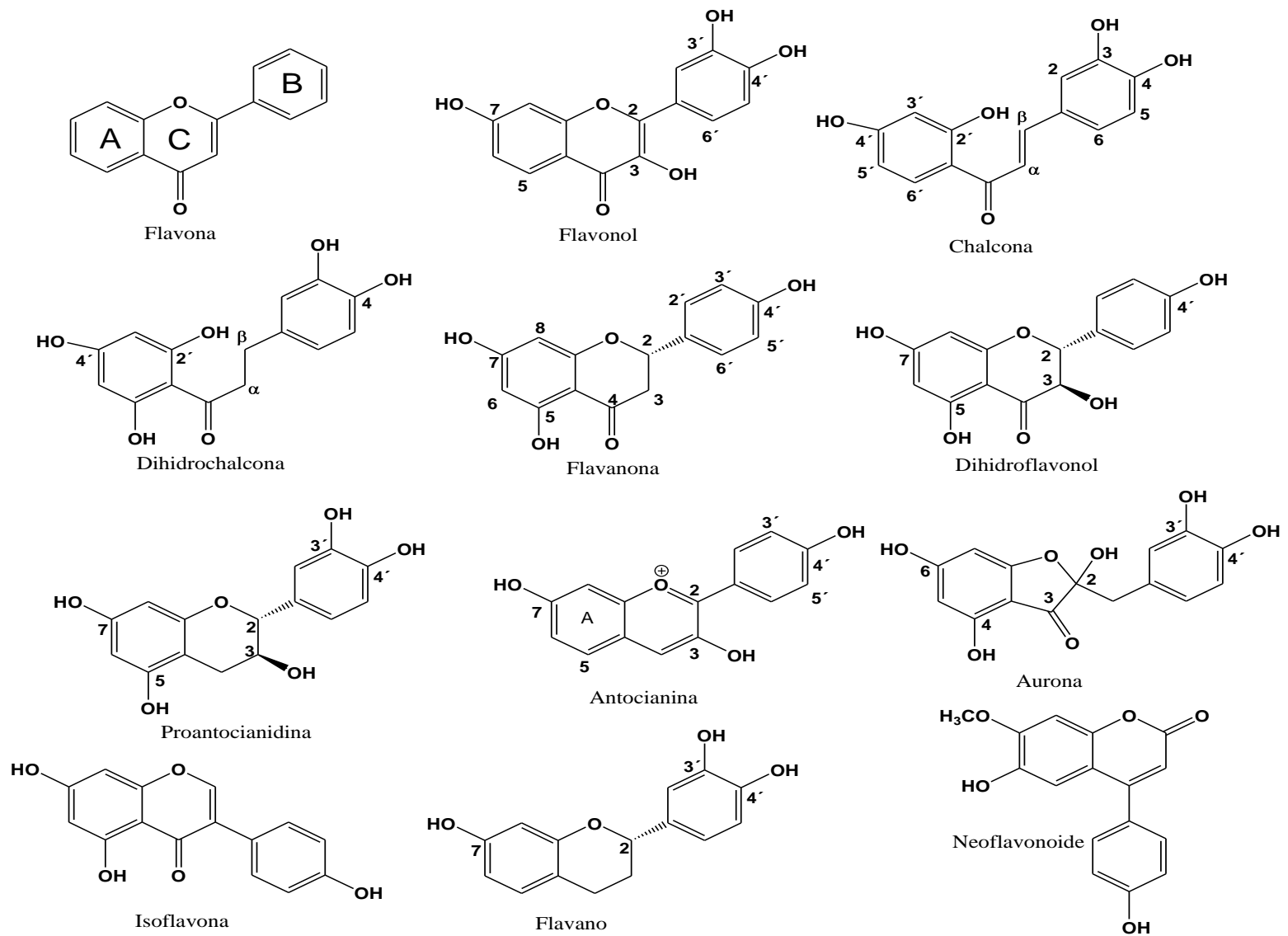


Figura 9. Subclases de flavonoide (Pérez-Trueba, 2003).

Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las antocianinas que se comportan como indicadores ácido-base debido al proceso que se muestra en la Figura 10.

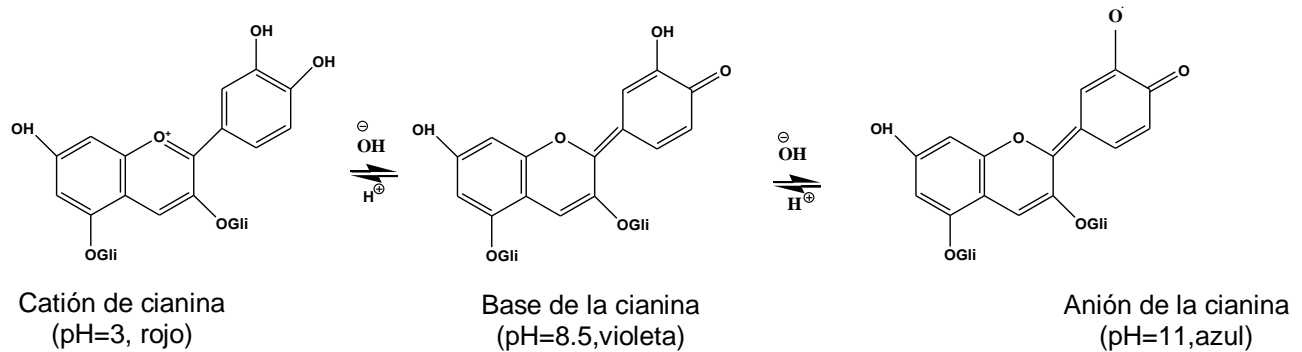


Figura 10. Cambio de coloración de antocianinas respecto al pH. A pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes o azules (Martínez, 2005).

### 1.6 Propiedades biológicas de flavonoides y antocianinas

Dentro de las propiedades biológicas de los flavonoides está su función como agentes hepatoprotectores. En *Smilax glabra* (Liliaceae) fue identificado el flavanonol (Figura 11), dihidroquercetina 3-ramnosida.

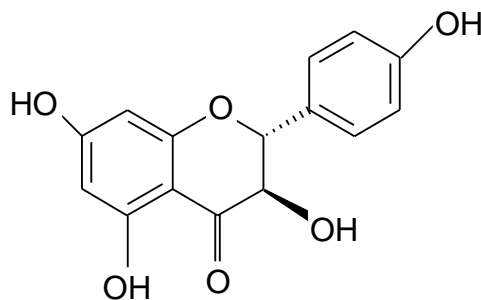


Figura 11. Estructura química del flavanonol

En China, *Artemisia annua* (Compositae) es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria. El principio activo ha sido identificado como sesquiterpeno lactona, artemisina (Harborne y Williams, 2000).

Las antocianinas ostentan al igual que los flavonoides diversas propiedades biológicas. La estructura química general de las antocianinas se muestra en la Figura 12, además poseen conocidas propiedades farmacológicas y son utilizadas por los seres humanos para diversos propósitos terapéuticos, un ejemplo es su propiedad antimutagenica.

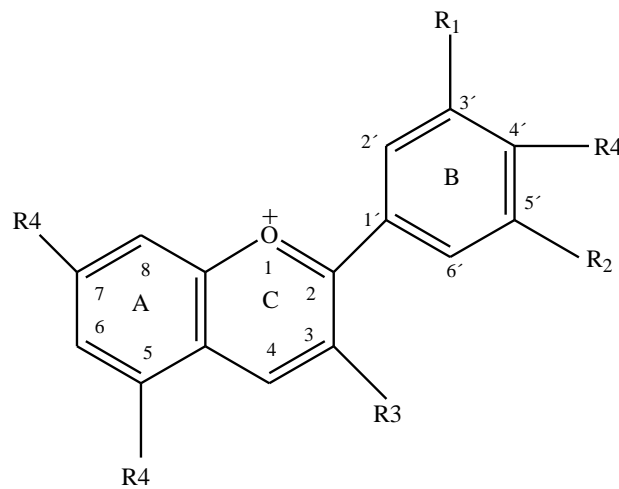


Figura 12. Cation flavilio. Los sustituyentes R1 y R2 son H, OH, o OCH<sub>3</sub>; R3 es un glicosil o H; y R4 es un glicosil.

Un ejemplo lo constituye *Vaccinium myrtillus* que ha sido administrado vía oral y por inyección intramuscular o intravenosa para reducir la permeabilidad y fragilidad vascular. De igual manera, existen datos acerca de la actividad antioxidante de fracciones provenientes de vino rojo Italiano (mostro efectividad al inhibir la oxidación de lipoproteínas y agregación plaquetaria) (Kong y cols., 2003).

Existen datos disponibles para *Prunus salicina*, en la cual, han sido identificadas diversas antocianinas como cianidina-3 glucósido, cianidina 3-rutinosida, cianidina 3-galactosido y cianidina 3-acetil-glucosido (Figura 13). De igual manera, en dos cultivos de ciruela Azúcar y Presidente se identificaron cianidina 3-glucosido, cianidina 3-rutinosida y un compuesto de

antocianina sin identificar. Así mismo, cinco antocianinas (cianidina 3-galactosidasa, cianidina 3-glucosido, cianidina 3-rutinosida, cianidina 3-xilosida y cianidina 3-(6'-acetoil) glucósido)) fueron identificadas en una muestra de ciruelas proveniente de un mercado de Estados Unidos (Usenik y cols., 2008, Piga y cols., 2003).

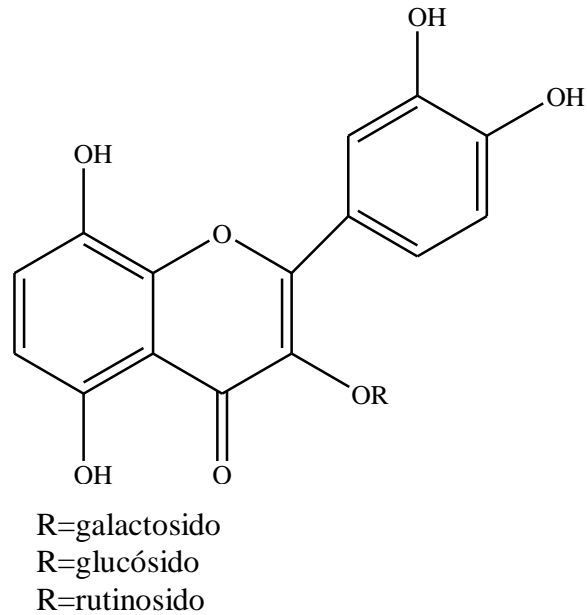


Figura 13. Estructura de antocianinas identificadas en *Prunus salicina*

Todos los efectos que ejercen las antocianinas listadas arriba pueden ser explicados por diversos mecanismos antioxidantes, incluyendo la donación de hidrógeno y quelatación de metales.

## 1.7 Técnicas para la evaluación de la actividad antioxidante

- Determinación de carotenoides: Es un método espectrofotométrico que se basa en la disolución de carotenoides en un volumen exactamente conocido de una mezcla de disolventes (hexano/acetona/etanol), para posteriormente determinar cuantitativamente el contenido de carotenoides, por razón de la medición de la absorbancia a 450 nm. El cálculo de carotenos se realiza usando el coeficiente de extinción del  $\beta$ -caroteno y se expresa en  $\mu\text{g/g}$ .
- Determinación de fenoles totales (FT): El método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN y CIOCALTEAU, para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La absorbancia del color azul se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos (Folin y Ciocalteau, 1927).
- Método 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH): Este método, desarrollado por Brand-Williams y cols. (1995), se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm radical DPPH $\bullet$ , por antioxidantes. Con modificaciones el método descrito por Kim y cols. (2002), se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH $\bullet$  disuelto en etanol.
- Método de la sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS): Durante la peroxidación de lípidos los peróxidos lipídicos son formados con una subsecuente producción de radicales peróxido, seguidos por una fase de descomposición a la producción de aldehídos tales como hexanal, malondialdehído y 4-hidroxinonenal. Este método es basado en la detección de productos estables que se forman entre aldehídos y ácido tiobarbitúrico (TBA) en la fase acuosa. La producción de TBARS es medida espectrofotométricamente a 535 nm. (Tsao y Deng, 2004).

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 Actividad antioxidante en epidermis

La epidermis de frutos a menudo constituye la parte de residuos. En general, éstos no han recibido atención con fin a ser utilizados o reciclados en lugar de desecharlos. Esto se debe a la falta de alguna aplicación comercial. Fracciones de cáscara y semillas de algunos frutos tienen mayor AA que pulpa. Por ejemplo, la cáscara de granada tiene una mayor AA que su pulpa. Se informó que la cáscara de manzana ayuda a disipar el exceso en el flujo de fotones absorbidos y especies reactivas del oxígeno (Okonogi y cols., 2007). Además la epidermis de manzana en las variedades Idared, belleza de Roma, Cortland y Golden Delicious contiene mayor AA que pulpa y epidermis con pulpa (Wolfe y cols., 2003).

### 2.2 Análisis cuantitativo de Compuestos fenólicos

Kim y col. (2003), analizaron once variedades de ciruela. El rango de polifenoles totales (PT) fue de 125 a 372.6 mg de ácido gálico/ 100 g de muestra. Siendo el promedio de polifenoles reportado de 192.1 mg de ácido gálico/100 g de muestra (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de fenoles en diferentes variedades de ciruela

Cultivo/variedad	Fenoles totales en mg de equivalentes
Autumn Sweet	229.5 ± 3.9
Beltsville Elite B70197	372.6 ± 7.5
Castleton	176.4 ± 1.8
Early Magic	143.1 ± 2.0
Empress	187.0 ± 2.1
Longjohn	216.2 ± 1.8
Mirabellier	136.8 ± 2.3
NY 6	162.8 ± 1.6
NY 9	125.0 ± 2.3
NY 101	181.9 ± 2.2
Stanley	181.3 ± 4.6

Los diferentes niveles de PT de las variedades en la Tabla 3 posiblemente son resultado del origen geográfico de los cultivos, temporada y otras prácticas de agricultura.

Proteggente y cols. (2002), evaluaron la cantidad de polifenoles por el método de Folin en naranja, pomelo (ambos con cáscara) y plátanos (sin cáscara). El contenido de polifenoles se expresó como equivalentes de ácido gálico en 100 gramos de muestra en peso fresco (Tabla 4).

Tabla 4. Frutas y contenido de polifenoles

<b>Fruta</b>	<b>Polifenoles totales (mg de de ácido gálico/100g peso fresco)</b>
Fresa	330±4
Frambuesa	228±6
Ciruela roja	320±12
Naranja	126±6
Uva verde	80±4
Pera	60±3
Manzana	48±1
Durazno	38±1
Plátano	38±4

En 2006 Peschel y cols. midieron contenido de PT en residuos de la producción de jugo de manzana. De la cual se obtuvieron dos extractos; acetona y butanona. Con un contenido de PT de  $31.60 \pm 0.71$  y  $51.52 \pm 0.83$  respectivamente para cada extracto. Finalmente el contenido de PT se expresó como mg de ácido gálico/100g de peso fresco.

En 2006 Thaipong y cols. evaluaron cuatro genotipos de guayaba: allahabad, safeda, fan retief y ruby supreme (en todos los casos se evaluó cáscara y fruto). A estos frutos se les determinó la cantidad de polifenoles totales.

Tabla 5. Fenoles totales de diversos genotipos de guayaba

<b>Genotipo</b>	<b>Fenoles totales</b>
Allahabad Safeda <sup>b</sup>	344.9±33.6
Fan retief <sup>a</sup>	300.8±12.7
Ruby supreme <sup>a</sup>	170±5.6
Advanced selection <sup>a</sup>	270.6±2.9

Fan Retief, Ruby Supreme, y Advanced Selection son de pulpa roja (a), y Allahabad Safeda (b) es de pulpa blanca.

En 2008, Barreira y cols. cuantificaron el contenido de PT en el extracto acuoso del fruto de castaña. El contenido de PT fue de  $19.6 \pm 0.87$  equivalentes en miligramos de ácido gálico por gramo de extracto.

Su y cols. (2008), obtuvieron extractos de metanol en polvos de productos cítricos: *Citri Reticulatae Pericarpium* (CRP), *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* (CRVP), *Aurantii Immaturus Fructus* (AIF) y *Aurantii Fructus* (AF) con la finalidad de cuantificar antioxidantes en los mismos. El contenido de PT se expresó como equivalentes en mg de ácido gálico/gramo de muestra (mg/g). En los extractos el contenido de polifenoles fue para CRPV ( $44.6 \pm 3.12$ ), CRP ( $38.8 \pm 3.32$ ), AF ( $8.8 \pm 1.11$ ), y AAF ( $9.62 \pm 0.84$ ).

### 2.3 Análisis cuantitativo de carotenoides

En 2006 Thaipong y cols. evaluaron cuatro genotipos de guayaba: allahabad, safeda, fan retief y ruby supreme (en todos los casos se evaluó cáscara y fruto). A estos frutos se les determinó la cantidad de carotenos totales.



Tabla 6. Carotenos totales de diversos genotipos de guayaba

Genotipo	Carotenos Totales
Allahabad Safeda <sup>b</sup>	Nd
Fan retief <sup>a</sup>	1.59±0.12
Ruby supreme <sup>a</sup>	2.93±0.35
Advanced selection <sup>a</sup>	0.78±0.16

Nd, no disponible

Fan Retief, Ruby Supreme, y Advanced Selection son de pulpa roja (a), y Allahabad Safeda (b) es de pulpa blanca. El contenido de carotenoides totales fue expresado como equivalentes en mg de β-caroteno/100g de peso fresco.

Ajila y Cols en 2007 cuantificaron el contenido de carotenos en dos variedades de mango. Se enfocaron en el análisis de la epidermis, subproducto importante. Por tanto, la cáscara no es utilizada actualmente para fines comerciales. La epidermis fue la parte evaluada en las variedades Raspuri inmaduro (73.5 μg/g), maduro (436 μg/g) y Badami inmaduro (81.0 μg/g) y maduro (194μg/g).

#### 2.4 Actividad antioxidante por la técnica de DPPH

En 2002 Murthy y cols. evaluaron la pulpa de uva, obtenida de industrias de procesamiento de jugo. El análisis se realizó por medio de la técnica DPPH a una concentración de 50 ppm. Se obtuvieron extractos de acetato de etilo, metanol y agua. Los resultados mostraron un 42.1, 67,3 y 9.1 % de reducción del radical libre DPPH respectivamente.

Kumarasamy y cols. (2004), determinaron la actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de diclorometano y metanol de *Prunus padus* y *Prunus spinosa*. La CI<sub>50</sub> para *P. padus* fue de 2.52 μg /mL y 6.40 μg /mL respectivamente para cada extracto. En *P. spinosa* la CI<sub>50</sub> fue de 5.0.0 μg /mL y 4.80 μg /mL.

En 2004 Wangenstein y cols. determinaron el contenido de antioxidantes en semillas y hojas de cilantro por la técnica de DPPH. Los resultados del extracto de etanol tuvieron una CI<sub>50</sub> de 389±5 y 510±12 μg/mL respectivamente. El extracto de acetato de etilo en hojas tuvo la CI<sub>50</sub> mas baja

( $147 \pm 3$   $\mu\text{g/mL}$ ) lo anterior se traduce como una mejor actividad para inhibir al RL DPPH. Por último, el extracto de diclorometano fue inactivo en éste ensayo.

En 2006 Amin y cols. evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH de cuatro variedades de espinacas crudas, sanas y frescas bayam putih (*Amaranthus paniculatus*) (BP), bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) (BM), bayam itik (*Amaranthus blitum*) (BI) y bayam panjang (*Amaranthus viridis*) (BPG). La concentración final empleada en la técnica DPPH fue de 20 mg/mL (20,000 partes por millón). Entre las especies de espinacas estudiadas BI exhibió la mayor actividad de reducción de DPPH seguido de BPG, BM y BP ( $83 \pm 1\%$ ,  $63 \pm 1\%$ ,  $61 \pm 2\%$  y  $39 \pm 4\%$ , respectivamente).

Peschel y cols. en 2006 evaluaron la actividad antioxidante en residuos de la producción de jugo de manzana, en extractos de acetona y butanona. Los cuales presentaron un porcentaje de reducción del radical DPPH de  $77.63 \pm 0.42$  y  $27.41 \pm 0.55\%$ .

En 2007, Okonogi y cols. evaluaron la actividad antioxidante del extracto de etanol proveniente de la epidermis de la fruta de plátano (*Musa sapientum*), maracuyá (*Passiflora foetida*) y granada (*Punica granatum*) por el método de DPPH a una concentración de 0.1-1.0 mg/mL. Se calculó la  $CI_{50}$  (mg/mL) y fue  $0.03 \pm 0.002$ ,  $0.104 \pm 0.014$  y  $0.003 \pm 0.002$  respectivamente.

Por la técnica de DPPH Roussis y cols. en 2008 evaluaron ocho vinos de origen griego y se determinaron la  $CI_{50}$  de las variedades de la tabla siete.

Tabla 7. CI<sub>50</sub> de las variedades de vino

Vino	CI <sub>50</sub> (mg/mL)
Agiorgitiko	3.1±0.0
Limnio	4.0±0.1
Syrah	3.5±0.1
Debina	6.1±0.4
Athiri	5.6±0.8
Robola	4.4±0.3
Sauvignon blanc	4.2±0.1
Traminer	5.8±0.5

## 2.5 Actividad antioxidante por la técnica de TBARS

En 2002 Murthy y cols. evaluaron la pulpa de uva, obtenida de industrias de procesamiento de jugo. El análisis se realizó por medio de la técnica TBARS a una concentración de 200 ppm. Se analizó el extracto de metanol y se mostró una actividad de 71.74%.

Los resultados de la actividad antioxidante empleando la prueba de TBARS, expresada como CI<sub>50</sub>, obtenidos por García-Alonso y cols. (2004), en la evaluación de frutos fue mayor para la fresa con una CI<sub>50</sub> de 50 µg/mL, frambuesa (55 µg/mL), cereza (74 µg/mL), arándanos 78 (µg/mL), y la más baja en el plátano (1281 µg/mL), uva blanca (2216 µg/mL), kiwi (4,487 µg/mL) y aguacate (> 5000 µg/mL).

Mediante el ensayo de TBARS Lo y Cheung, en 2005, cuantificaron la actividad antioxidante del cuerpo fructífero de *Agrocybe aegerita* var. *Alba*. En el análisis se calculó la CI<sub>50</sub> en mg/mL, de los extractos obtenidos. Los resultados fueron los siguientes extracto crudo de metanol 0.378, fracción de diclorometano 0.478, fracción de acetato de etilo 0.0502 y fracción de agua >2. Ardestani y Yazdanparasr 2007 obtuvieron un extracto con etanol-agua de *Achillea santolina*, para efectuar el análisis de actividad antioxidante mediante el ensayo TBARS, empleando homogenizado de hígado de rata. Las concentraciones de los extractos fueron 100, 250, 500 y 1000 µg/ mL y tuvieron un porcentaje de inhibición de 14.86%, 32.55%, 54.78% y 73.33 % respectivamente.

En 2006 Peschel y cols. evaluaron la actividad antioxidante de dos extractos de manzana, acetona y butanona, por medio de la inhibición del  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  estimulado por la peroxidación de ácido linoleico (ensayo TBA). El porcentaje de inhibición para el extracto de acetona fue de  $76.72 \pm 1.95$  y para el extracto de butanona fue de  $82.53 \pm 1.88$ .

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe interés por el análisis en plantas que presentan actividad biológica, especialmente AA. La AA de las plantas, puede medirse empleando diversos métodos colorimétricos, además, está dada por una variedad de metabolitos secundarios. Entre éstos los compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides. Existe información que expresa su inocuidad, pruebas realizadas a dichos metabolitos señalan la utilidad de su aplicación para prevenir y controlar una diversidad de eventos patológicos debido a su contenido de antioxidantes.

Tales metabolitos (compuestos fenolicos, antocianinas y flavonoides) se presentan en grandes cantidades en epidermis y no en pulpa de frutos. Estos residuos no han recibido mucha atención para ser utilizados o reciclados en lugar de desperdiciarlos. Por ello es importante analizar la AA en epidermis del fruto de ciruela para contribuir a la información al respecto de la familia *Rosaceae*. Pues a pesar de la basta literatura respecto a los metabolitos que le proporcionan propiedades antioxidantes se carece de información respecto a la variedad *Prunus domestica*, variedad Santa Rosa. Por ello, resulta importante aportar información al respecto. Finalmente, es relevante considerar la tendencia mundial al consumo de alimentos nutracéuticos, quimioprotectores, entre otros, por sus efectos benéficos sobre la salud. Aunado a las ventajas, respecto a su inocuidad, comparado con los fármacos sintéticos.

#### **4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La actividad antioxidante se debe a los compuestos fenólicos en *Prunus domestica*?

## 5.0 OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante en epidermis de ciruela por diversos métodos colorimétricos.

### Objetivos particulares

- Cuantificar el contenido de metabolitos (polifenoles y carotenos) totales, en la epidermis del fruto.
- Obtener siete extractos provenientes de la epidermis de *Prunus domestica*, variedad Santa Rosa.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por los métodos de reducción del RL 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) e identificar cuales de los siete extractos ostentan mayor actividad antioxidante.
- Comparar la actividad antioxidante de los extractos con mayor actividad antioxidante con antioxidantes de referencia (quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol, y ácido ascórbico).

## 6.0 METODOLOGÍA

En general, la metodología consta de cuatro secciones:

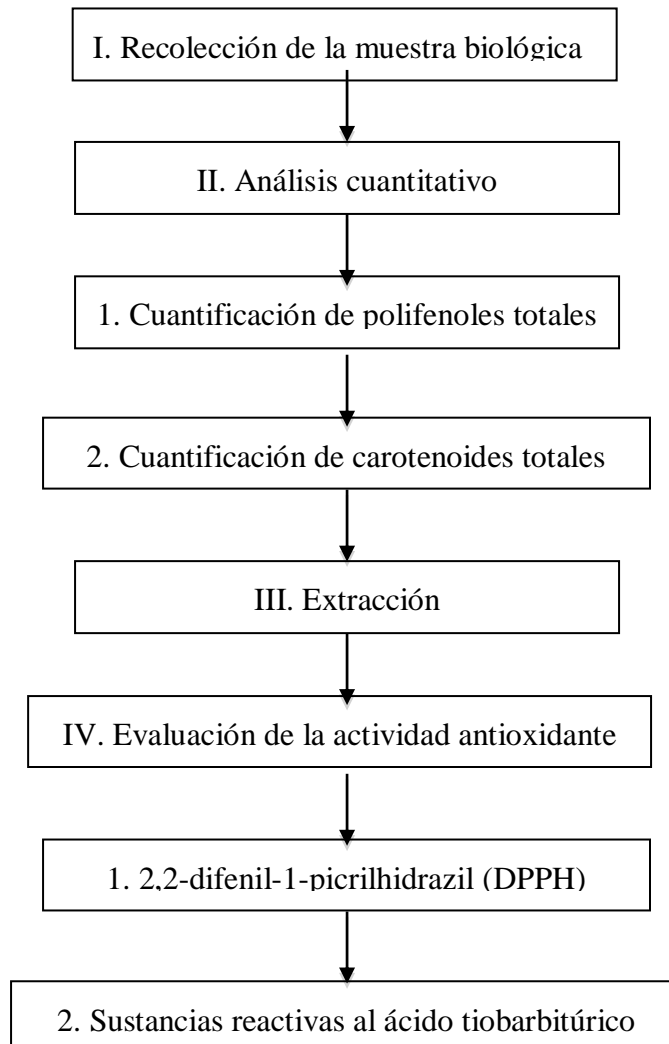


Figura 14. Diagrama de metodología



## **6.1 Recolección de la muestra biológica**

La muestra biológica se obtuvo en el municipio de Huejotzingo Puebla, México. El fruto se seleccionó mediante apariencia visual, eligiendo aquellos libres de defectos físicos. Posteriormente, se separó la epidermis de la pulpa de forma manual. La epidermis obtenida se mantuvo a temperatura ambiente a la sombra con la finalidad de deshidratarla. Posteriormente, la epidermis se pesó y almacenó en ausencia de luz.

## **6.2 Obtención de los extractos**

Los extractos de epidermis se obtuvieron por medio de una extracción sólido-líquido, con relación de 250 g epidermis deshidratada con 3 litros de disolvente, la operación se llevó a cabo a temperatura ambiente, en la oscuridad y por 48 horas. Después de ese tiempo la mezcla se filtró y el filtrado se sometió a evaporación en un equipo de rotaevaporador hasta sequedad. Posteriormente, se inició otra extracción utilizando la misma epidermis pero con disolvente diferente. En total la epidermis se extrajo durante seis ocasiones y por separado con cada uno de los disolventes de menor a mayor polaridad (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol).

Para obtener el extracto ácido se utilizaron 191.62 g de epidermis. Ésta se sometió a molienda y a continuación se extrajo en tres ocasiones con metanol:ácido acético:agua (7:1:6). Se conservó en ausencia de luz durante cuarenta y ocho horas, después se filtró y se concentró en un rotaevaporador para obtener el extracto (el procedimiento de filtrado y concentrado fue el mismo para extracciones posteriores). La segunda extracción se mantuvo durante veinticuatro horas y la tercera ocho horas.

En términos generales, en la presente investigación se realizó conteo de polifenoles totales y carotenos totales, además, la actividad antioxidante de los extractos fue evaluada por dos técnicas. La primera una técnica colorimétrica basada en la reducción del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Figura 13), y la segunda técnica llamada sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), una prueba semi-biológica basada en la cuantificación de la

lipoperoxidación del cerebro de rata para generar malondialdehído, el cual se cuantifica con ácido tiobarbitúrico. Finalmente, se aplicaron ambas pruebas, DPPH y TBARS en diversos antioxidantes de referencia (quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico) a diversas concentraciones para compararlos con la actividad que presenten los extractos del fruto.

### **6.3 Determinación cuantitativa de fenoles totales**

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu descrito por Matthaues (2002). Para la extracción de polifenoles se empleó el método descrito por Saura Calixto (1998).

1. 500 mg de la muestra de epidermis se extraen con 40 mL de metanol/agua (50:50 v/v) durante una hora a temperatura ambiente.
2. Se filtra, el filtrado se guarda y nuevamente extraer el residuo con 40 mL de acetona/agua (70/30 v/v) durante una hora a temperatura ambiente,
3. Filtrar, y juntar ambos filtrados, concentrar en un rotaevaporador y se redisuelven en 10 mL de etanol.
4. Redisolver la fracción que no solubiliza en etanol con 10 mL de agua destilada, hasta estar en completa disolución.
5. Determinar el contenido de polifenoles totales, para ello, tomar 1 mL de la solución del extracto alcohólico concentrado y llevarla a un volumen de 2.5 mL con ácido clorhídrico (HCl) al 0.3 %.
6. Tomar una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución anterior, y agregarla en 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , después de 2 minutos añadir 100  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua (1:1).
7. Una vez transcurridos treinta minutos medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro.
8. Para calcular la concentración de polifenoles elaborar una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. Expresar los resultados como mg de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco (Tabla 1 de anexos).

## 6.4 Determinación de carotenoides

La extracción y determinación de carotenoides en la epidermis de *Prunus* fue determinada de acuerdo al método descrito por Rodríguez Amaya (1999), de la siguiente manera:

1. Extraer dos gramos de muestra con 10 mL de hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v), durante una hora.
2. Centrifugar por 5 min a 6500 rpm a 5 °C. Recuperar la capa superior de *n-hexano* que contiene el color y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL.
3. Ajustar el volumen que se recupera a 25 mL con hexano.
4. Cuantificar carotenos totales: extraer una alícuota y medir su absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro. Usar el coeficiente de extinción del  $\beta$ -caroteno,  $E^{1\%} = 2505$  para calcular el contenido de carotenoides.

## 6.5 Reducción del radical libre 2,2-difenil1-picrilhidracil (DPPH) (Figura 15)

Para DPPH se efectuaron barridos gruesos (10, 100 y 1000 ppm) y barridos finos (entre 100 y 1000 ppm). Los primeros proporcionan un panorama general acerca de las concentraciones en las que se encuentra la mayor actividad antioxidante de los extractos a evaluar. Los segundos (barridos finos) se realizaron con la finalidad de determinar la cantidad mínima de extracto que se requiere para reducir a la mitad al RL DPPH ( $CI_{50}$ ).

La técnica consiste en lo siguiente:

1. Preparar la concentración inicial de 20 mg/mL (20,000 ppm) para cada uno de los extractos.
2. De la concentración inicial tomar la alícuota necesaria para preparar disoluciones por duplicado a 1000, 100 y 10 ppm (con un volumen de 1 mL) de cada uno de los extractos.
3. Adicionar 150  $\mu$ L de una solución etanólica de DPPH a una concentración de 133.33  $\mu$ M.
4. Se prepara un control, que contiene la solución etanólica de DPPH (1 mL).
5. Las mezclas se protegen de la luz y se someten a agitación en una incubadora a 37°C durante 30 minutos.
6. Determinar la densidad óptica de cada una de las mezclas a 515 nm.

7. Calcular la actividad de cada uno de los extractos en relación a la reducción de DPPH, para determinar el porcentaje de reducción del RL se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) 100$$

En donde:

C: Densidad óptica del control

E: Densidad óptica del experimento (DPPH + compuesto a evaluar)

8. Para cada extracto la prueba se realizó por triplicado, en tres sesiones diferentes.

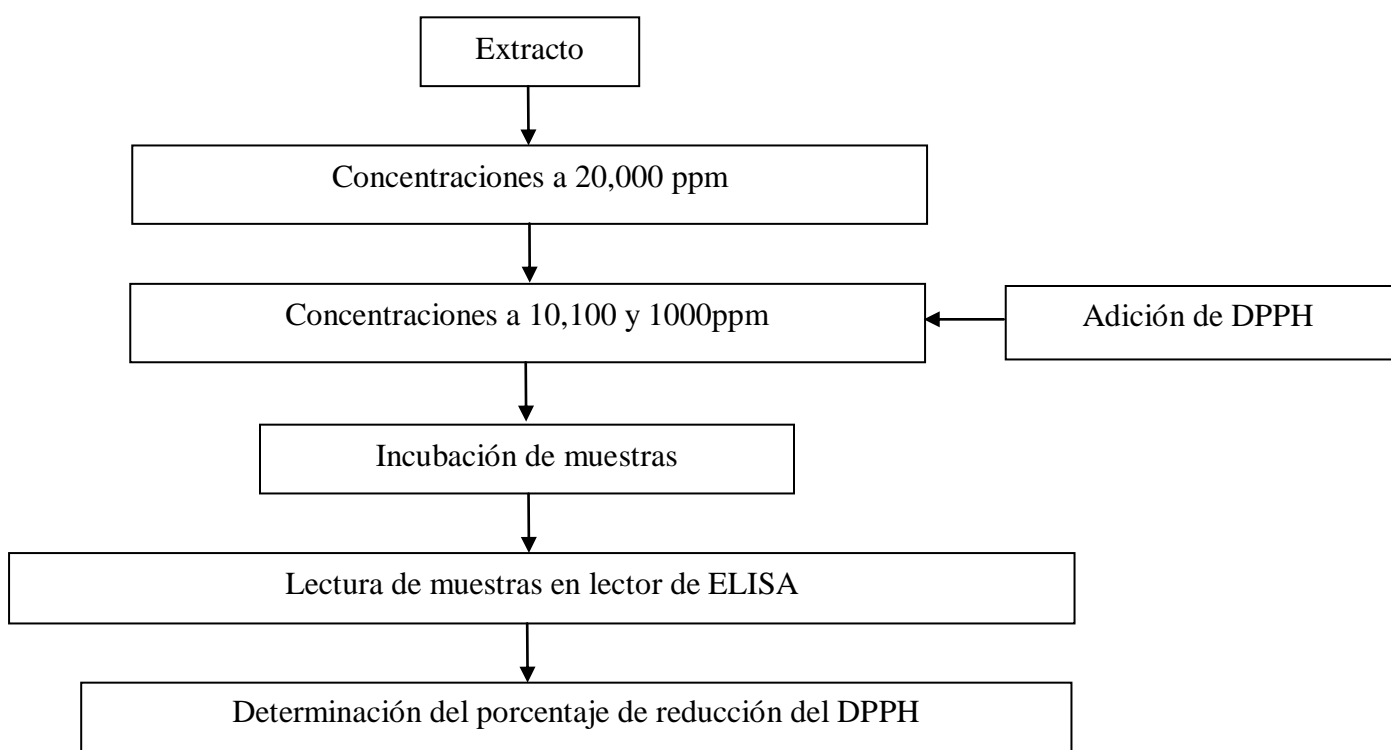


Figura 15. Diagrama de la realización de la prueba de actividad antioxidante, reducción del RL 2,2-difenil1-picrilhidracil (DPPH).

## 6.6 Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS)

El ensayo de TBARS (Figura 16) consiste en los siguientes procesos:

### I. Disección y homogenizado del cerebro de rata

Emplear ratas cepa Wistar, sexo indistinto. Para obtener el cerebro: anestesiarse a la rata con éter y sacrificar por dislocación cervical. A continuación extraer el cerebro y lavarlo con agua destilada, para eliminar restos de sangre, obtener el peso del cerebro y agregar 7.5 mL de buffer de fosfatos por cada gramo de cerebro. Éste se homogeniza por 60 segundos. Finalmente se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm y se recupera el sobrenadante.

### II. Cuantificar proteínas por el método de Lowry y ajustar a la concentración deseada.

Durante la realización de la cuenta de proteínas: tomar por duplicado 5  $\mu$ L de homogenizado y colocarlo en un pozo de la placa de 96, adicionar 20  $\mu$ L de agua destilada y a continuación 150  $\mu$ L de la mezcla (49 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en NaOH 0.1 N, 0.5 mL de tartrato de Na/K 2% y 0.5 mL de  $\text{CuSO}_4$  1%). Posteriormente, incubar la mezcla por diez minutos a temperatura ambiente. A continuación adicionar 25  $\mu$ L del reactivo de Folin disuelto en agua, en proporción 1:1. Incubar nuevamente las mezclas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, medir la absorbancia a 540 nm y sustituir los valores en la fórmula correspondiente, obtenida de la ecuación de la recta, en la curva de calibración de albúmina bovina (Figura 2 de anexo), para obtener el contenido de proteína en el homogenizado.

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = [(A_{540 \text{ nm}} - 0.05012) / 0.028]40$$

Es necesario ajustar el contenido de proteínas a 2.666 mg/mL con buffer de fosfatos (PBS) (9.5 mM, pH=7.4), lo anterior se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$V_2 = (C_1 V_1) / C_2$$

### III. Inducción del estrés oxidativo con sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>)

1. Colocar por duplicado 375  $\mu$ L de homogenizado en tubos eppendorf con capacidad de 1.5 mL.
2. Agregar 50  $\mu$ L de EDTA 100  $\mu$ M.
3. Adicionar 25  $\mu$ L de la muestra (20 veces más concentrada). Incubar 30 minutos a 37 °C con agitación.
4. Agregar 50  $\mu$ L de FeSO<sub>4</sub> incubar una hora a 37°C con agitación orbital.
5. Agregar 500  $\mu$ L del reactivo ácido tiobarbitúrico (TBA), e incubar 10 minutos en baño de hielo.
6. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente.
7. Incubar 30 min en baño de agua a 90°C.
8. Tomar por duplicado 200  $\mu$ L de cada tubo y colocarlos en un pozo de la placa de 96 pozos.
9. Medir la absorbancia a 540 nm e interpolar los valores en la curva estándar de malondialdehído para obtener la concentración de TBARS en solución, para ello se requiere de la siguiente fórmula, obtenida de la ecuación de la recta en la curva de calibración de malondialdehído.

$$TBARS (\mu M) = [(A_{540 \text{ nm}} + 1.26096E-4) / 0.07927]$$

Durante el ensayo sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se requieren de las siguientes soluciones:

1. Solución de EDTA 100  $\mu$ M disuelto en PBS
  - a) Solución A, EDTA 342.2 mM para ello se necesitan 50 mg de EDTA anhidro disuelto con 200  $\mu$ L de NaOH 3M.
  - b) Solución B, EDTA 100  $\mu$ M, se toman 29.22  $\mu$ L de la solución A y se afora a 100 mL con solución salina 0.9 %.
2. Solución de FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M.
  - a) Pesar 6.95 mg de FeSO<sub>4</sub> y aforar a 25 mL con agua destilada o desionizada (FeSO<sub>4</sub> 1 mM).

- b) Diluir diez veces: tomar 1 mL de la solución anterior y agregar 9 mL de agua destilada o desionizada ( $\text{FeSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ ).
3. Reactivo TBA, se elabora con una mezcla en proporción 1:1 de ácido tiobarbitúrico (0.5 % disuelto en NaOH 0.05 N) y ácido tricloroacético al 30%.

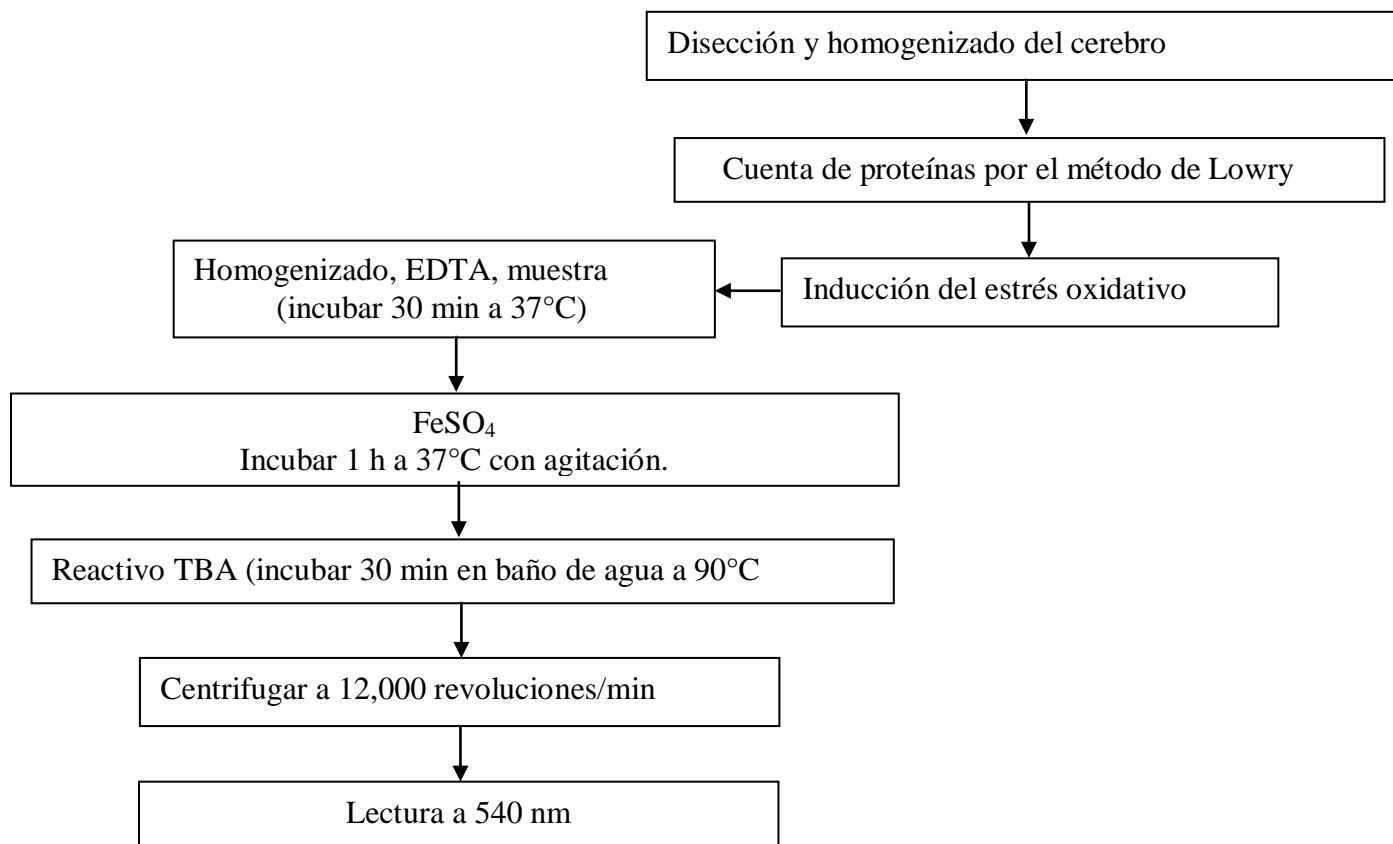


Figura 16. Diagrama de la realización del ensayo Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS).

## **6.7 Material**

### **DISOLVENTES**

Los disolventes utilizados respecto a su pureza son grado técnico

- Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>)
- Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)
- Metanol (MeOH)
- Acetona
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Hexano
- Agua
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Ácido acético
- Acido clorhídrico
- *n*-butanol

### **REACTIVOS PARA PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

#### **Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)**

- 2,2-difenil-1-picrilhidracil

#### **Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS)**

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Tartrato de Na/K
- Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)
- Reactivo de Folin
- Acido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Ácido tricloroacético (TCA)



- Tetrametoxipropano (TMP)

## 6.7 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANDEVA), las diferencias significativas entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnet utilizando  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ . Para la determinación de la  $CI_{50}$  se realizó el análisis estadístico anterior, además de una regresión lineal. Cada ensayo se realizó por triplicado y se emplearon los programas estadísticos Origin pro 7.5 y SigmaStat 3.5.

## 6.8 Cálculo de la $CI_{50}$

1. Realizar como mínimo tres experimentos independientes.
2. Tener al menos tres puntos con diferencia significativa con respecto al control, de acuerdo a los resultados arrojados por ANDEVA y Dunnett
3. Al tener los puntos significativos es necesario verificar que la concentración que de el 50 % de inhibición este dentro de ese rango de concentraciones.
4. Graficar el porcentaje de inhibición de los puntos significativos contra el logaritmo de la concentración. A estos se les aplica una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta que mejor se ajuste a esos puntos y finalmente se despeja Y (=50%) para calcular cuanto vale X.
- 5.0 El procedimiento se realiza por triplicado para sacar el promedio y error estándar.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Obtención de la muestra biológica

Del total del fruto colectado (37.875 kg de fruto fresco), se obtuvieron 365.72 g de epidermis deshidratada.

### 7.2 Extractos

La cantidad de extracto que se obtuvo en la epidermis de ciruela tiene un rango de 0.94-103.07 g y se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Peso de los extractos de epidermis de ciruela

<b>Extracto</b>	<b>Peso en gramos</b>	<b>Apariencia física</b>
<i>n</i> -hexano	0.94	Solido amarillo canario
Diclorometano	1.39	Solido amarillo claro
Acetato de etilo	1.84	Solido naranja-rojizo
Acetona	9.45	Aceite rojo
Etanol	78.84	Aceite rojo-guinda
Metanol	82.31	Aceite rojo-guinda
Total de extractos	165.33	
Extracto ácido	103.07	Aceite guinda

### 7.3 Cantidad de polifenoles totales

Posterior a la obtención de los extractos se inició con la determinación de polifenoles totales y carotenos en la epidermis deshidratada. El contenido de polifenoles en la ciruela fue de 1.62 mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra en peso seco.

## 7.4 Cantidad de carotenoides

El contenido de carotenoides en la ciruela fue de 5.73  $\mu\text{g/g}$  en epidermis.

## 7.5 Porcentaje de reducción del radical libre DPPH

Los resultados de la actividad antioxidante en los barridos gruesos de los extractos de epidermis de ciruela se muestran en la Tabla 9, se observa la densidad óptica y el porcentaje de reducción del DPPH.

Tabla 9. Barrido grueso de los extractos por la técnica de DPPH

Muestra	Concentración (ppm)	D. O. 515 nm	% de reducción
<i>n</i> -hexano	0	0.53±0.02	-
	10	0.52±0.03	2.96±1.81
	100	0.49±0.03	7.53±1.89
	1000	0.35±0.02**	34.03±0.62
Diclorometano	0	0.53±0.02	-
	10	0.51±0.04	4.53±2.82
	100	0.49±0.04	8.76±2.76
	1000	0.34±0.03**	36.13±3.80
Acetato de etilo	0	0.53±0.02	-
	10	0.48±0.04	10.63±3.18
	100	0.34±0.00**	36.76±5.23
	1000	0.05±0.00**	90.80±2.00

Acetona	0	0.57±0.02	-
	10	0.51±0.01**	10.73±3.09
	100	0.34±0.00**	40.86±0.63
	1000	0.04±0.00**	93.1±0.85
Etanol	0	0.55±0.04	-
	10	0.46±0.03	16.66±1.08
	100	0.24±0.03	56.76±2.97
	1000	0.01±0.00**	97.4±1.56
Metanol	0	0.57±0.02	-
	10	0.49±0.02**	13.73±1.44
	100	0.25±0.00**	57.2±0.90
	1000	0.02±0.00**	97.26±0.43
Ácido	0	0.57±0.02	-
	10	0.49±0.01**	14.96±1.47
	100	0.22±0.01**	61.96±2.62
	1000	0.02±0.00**	96.13±0.62

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

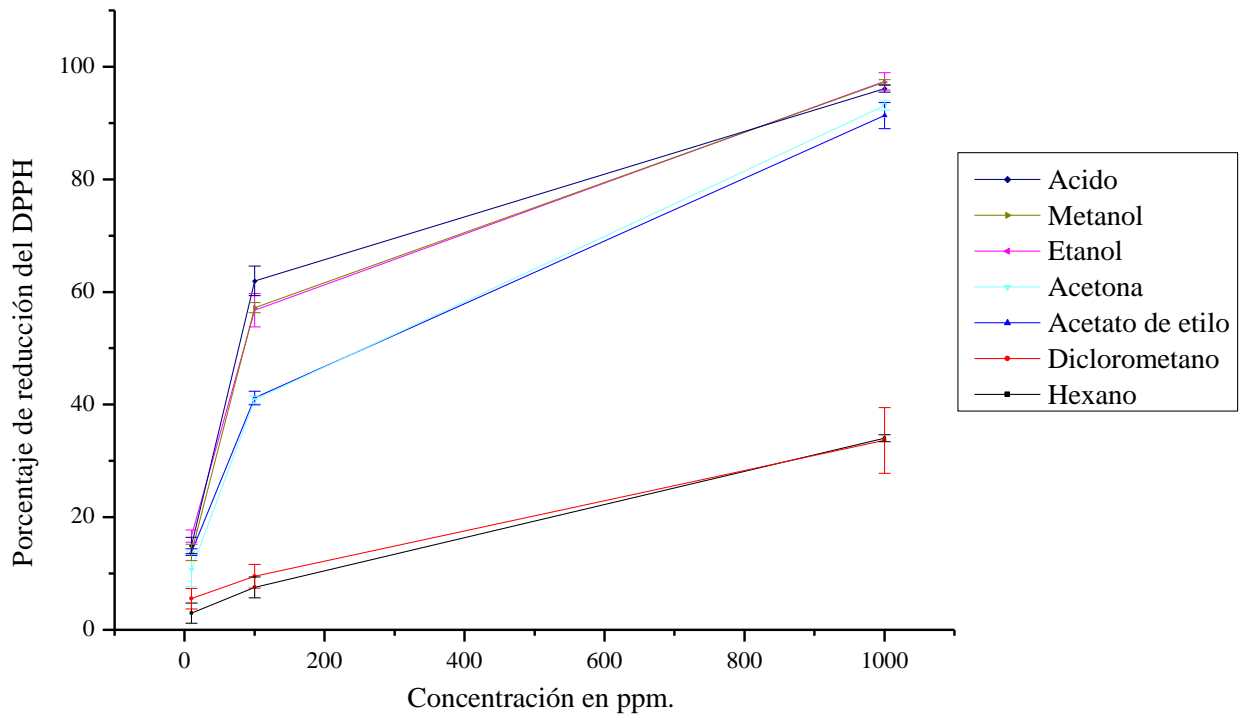


Figura 17. Barridos gruesos de los extractos por la técnica de DPPH

## 7.6 CI<sub>50</sub> de los extractos etanol, metanol y ácido

Una vez concluidos los barridos gruesos se continuo con los barridos finos para los extractos mas activos (etanol, metanol y ácido) con la finalidad de calcular la CI<sub>50</sub>, en la tabla 10 se muestran los resultados.

Tabla 10. CI<sub>50</sub> de los extractos con mayor actividad antioxidante, mediante la técnica DPPH.

Muestra	Concentración (ppm)	D. O. 515 nm	% de reducción	CI <sub>50</sub> (ppm)
Etanol	0	0.57±0.03	-	85.60±6.23
	17.78	0.47±0.03**	14.93±2.16	
	36.62	0.43±0.02**	20.4±1.60	
	56.23	0.37±0.02**	31.80±2.36	
	100	0.27±0.01**	48.00±2.87	
	177.83	0.15±0.00**	68.60±2.62	
Metanol	0	0.57±0.03	-	79.73±2.82
	17.78	0.48±0.03**	15.50±0.30	
	36.62	0.44±0.02**	22.73±0.03	
	56.23	0.37±0.02**	34.53±0.75	
	100	0.26±0.01**	53.66±1.56	
	177.83	0.12± 0.00**	79.26±1.53	
Ácido	0	0.56±0.03	-	70.77±1.34
	17.78	0.46±0.03**	17.46±0.69	
	36.62	0.42±0.03**	24.83±0.84	
	56.23	0.34±0.02**	38.43±0.52	
	100	0.23±0.02**	58.8±0.43	
	177.83	0.10±0.00**	81.73±0.94	

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

## 7.7 CI<sub>50</sub> de antioxidantes de referencia

Fue importante realizar la comparación para determinar el comportamiento de los extractos contra tales referencias. Considerando que estos presentan una actividad antioxidante alta para contrarrestar los efectos que generan los radicales libres.

Los resultados de los extractos mas activos se compararon contra antioxidantes de referencia (quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico) empleando la misma metodología (DPPH) a diferentes concentraciones (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. CI<sub>50</sub> de antioxidantes de referencia por la técnica de DPPH

Muestra	Concentración		D. O. 515 nm	% de reducción	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)/ ppm
	$\mu$ M	Ppm			
Quercetina	0	0	0.62 $\pm$ 0.00	-	5.37 $\pm$ 0.14 1.62 $\pm$ 0.04
	2.37	0.80	0.48 $\pm$ 0.00**	21.47 $\pm$ 0.98	
	3.16	1.07	0.44 $\pm$ 0.00**	28.50 $\pm$ 1.18	
	4.22	1.43	0.39 $\pm$ 0.00**	37.20 $\pm$ 1.24	
	5.62	1.90	0.31 $\pm$ 0.00**	49.27 $\pm$ 1.16	
	7.50	2.54	0.23 $\pm$ 0.00**	63.20 $\pm$ 1.30	
	10	3.38	0.12 $\pm$ 0.00**	81.27 $\pm$ 1.57	
	13.34	4.51	0.05 $\pm$ 0.00**	91.40 $\pm$ 0.06	
	17.78	6.01	0.050 $\pm$ 0.00**	91.97 $\pm$ 0.35	
	23.71	8.02	0.049 $\pm$ 0.00**	92.00 $\pm$ 0.67	

$\alpha$ -tocoferol	0	0	0.62±0.00	-	23.15±0.67 9.97±0.28
	13.34	5.75	0.45±0.00**	26.50±1.48	
	17.78	7.66	0.40±0.00**	35.70±1.46	
	23.71	10.21	0.31±0.00**	49.80±0.84	
	31.62	13.62	0.24±0.01**	63.20±2.24	
	42.17	18.16	0.09±0.00**	84.50±1.13	
	56.23	24.22	0.06±0.00**	90.70±0.38	
	74.13	31.9	0.06±0.00**	90.50±0.17	
Acido caféico	0	0	0.62±0.00	-	18.65±0.73 3.4±0.13
	5.62	1.01	0.53±0.01**	15.20±1.97	
	10	1.80	0.45±0.00**	27.10±0.72	
	17.78	3.20	0.35±0.00**	43.30±1.40	
	31.62	5.70	0.17±0.01**	72.10±1.70	
	56.23	10.13	0.05±0.00**	92.47±0.39	
100	18.02	0.04±0.00**	93.83±0.41		
Ácido ascórbico	0	-	0.62±0.00	-	15.93±0.37 2.81±0.07
	5	28.38	0.54±0.00**	12.80±0.8	
	10	56.78	0.45±0.01**	26.50±0.9	
	15	85.14	0.37±0.01**	40.50±1.39	
	31	175.96	0.09±0.01**	86.10±2.88	
	60	340.56	0.03±0.00**	95.60±0.12	

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).



Tabla 12. Comparación de los antioxidantes de referencia contra los extractos de la epidermis de ciruela.

Antioxidante	CI <sub>50</sub> (ppm)	Extracto	CI <sub>50</sub> (ppm)	Diferencias (menor actividad)
Quercetina	1.62	Etanol	85.61	52.83
		Metanol	79.73	49.21
		Ácido	70.77	43.68
Ácido ascórbico	2.81	Etanol	85.61	30.46
		Metanol	79.73	28.37
		Ácido	70.77	25.19
Ácido caféico	3.4	Etanol	85.61	25.17
		Metanol	79.73	23.45
		Ácido	70.77	20.81
$\alpha$ -tocoferol	9.97	Etanol	85.61	8.58
		Metanol	79.73	7.99
		Ácido	70.77	7.09

## 7.8 Porcentaje de inhibición en el ensayo TBARS

Los resultados de la segunda prueba de actividad antioxidante (TBARS) en barridos gruesos para los extractos de *n*-hexano y diclorometano se presentan en la Tabla 13, Figura 18.

Tabla 13. Barrido grueso por la técnica de TBARS.

Muestra	Concentración (ppm)	D. O. 515 nm	% de inhibición
<i>n</i> -hexano	0	0.95±0.00	-
	10	0.93±0.00	1.26±0.28
	100	0.77±0.00**	18.90±0.69
	1000	0.60±0.00**	35.70±1.13
Diclorometano	0	0.95±0.00	-
	10	0.91±0.00**	3.53±0.36
	100	0.81±0.00**	14.60±0.11
	1000	0.63±0.00**	34.20±0.34
Acetato de etilo	0	0.95±0.00	-
	10	0.90±0.00**	5.73±0.16
	100	0.61±0.00**	34.70±0.32
	1000	0.49±0.00**	47.50±0.10
Acetona	0	0.95±0.00	-
	10	0.84±0.00**	11.30±0.52
	100	0.61±0.00**	34.80±0.14
	1000	0.32±0.00**	65.50±0.21
	0	0.95±0.00	-

Etanol	10	0.87±0.00**	8.04±0.38
	100	0.62±0.00**	33.93±0.15
	1000	0.19±0.00**	79.47±0.30
Metanol	0	0.95±0.00	-
	10	0.80±0.00**	15.00±0.38
	100	0.61±0.00**	34.80±0.34
	1000	0.23±0.00**	74.90±0.28
Ácido	0	0.95±0.00	-
	10	0.84±0.00**	10.80±0.87
	100	0.61±0.00**	34.90±0.47
	1000	0.18±0.00**	80.30±0.20

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

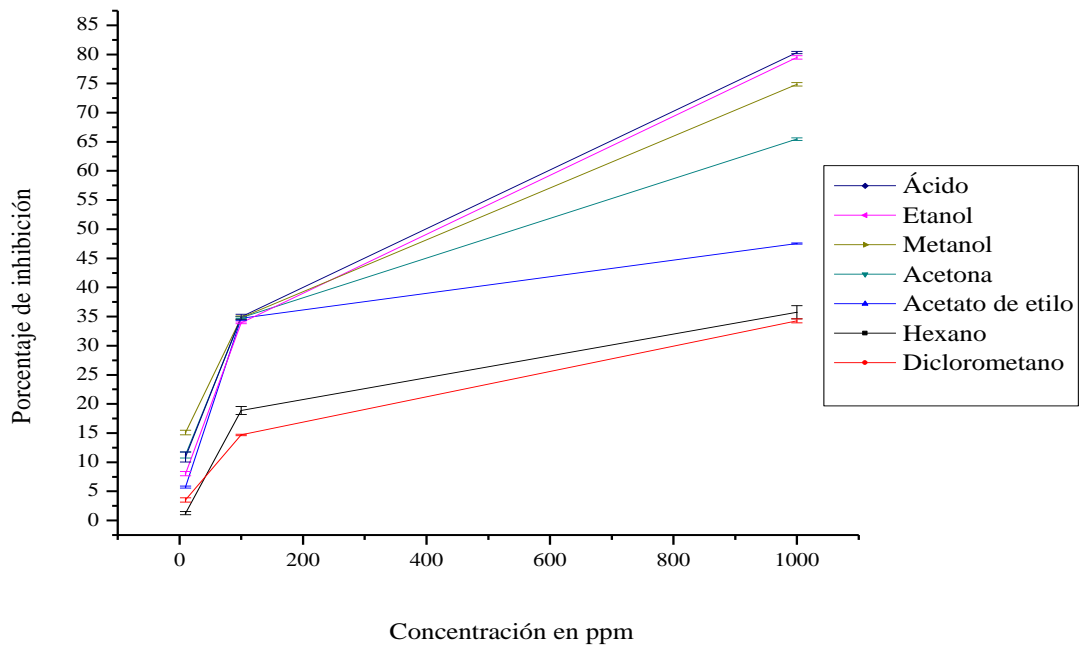


Figura 18. Barridos gruesos de los extractos por la técnica de TBARS

## 7.9 CI<sub>50</sub> de los extractos etanol, metanol y ácido

Los resultados de los barridos finos y el cálculo de la CI<sub>50</sub> para TBARS se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. CI<sub>50</sub> de los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante

Muestra	Concentración ppm	D. O. 515 nm	% de reducción	CI <sub>50</sub> (ppm)
Etanol	0	0.91±0.00	-	228.67±7.6901
	100	0.59±0.00	35.50±0.87	
	177.83	0.55±0.00**	39.00±1.30	
	316.23	0.41±0.00**	54.90±0.57	
	562.34	0.21±0.00**	76.20±0.32	
	1000	0.18±0.00**	79.90±0.40	
Metanol	0	0.91±0.00	-	231.14±7.798
	100	0.59±0.00**	35.60±0.93	
	177.83	0.49±0.00**	46.40±1.02	
	316.23	0.42±0.00**	53.70 ±0.11	
	562.34	0.29±0.00**	67.50±0.53	
	1000	0.24±0.00**	72.90±0.39	
Ácido	0	0.92±0.00	-	164.50±7.38
	100	0.59±0.00**	35.60±0.20	
	177.83	0.42±0.00**	53.30±1.04	
	316.23	0.28±0.00**	68.80±0.43	
	562.34	0.22±0.00**	75.30±0.27	
	1000	0.17±0.00**	80.20±0.26	

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

## 8.0 CI<sub>50</sub> de antioxidantes de referencia

Los resultados obtenidos de los extractos se compararon contra antioxidantes de referencia (quercetina,  $\alpha$ -tocoferol, ácido caféico y ácido ascórbico empleando la misma metodología (TBARS) a diferentes concentraciones (tabla 15 y 16).

Tabla 15. CI<sub>50</sub> de antioxidantes de referencia por la técnica de TBARS

Muestra	Concentración		TBARS (nmol/mg prot)	Inhibición %	CI <sub>50</sub> $\mu\text{m/ppm}$
	$\mu\text{m}$	ppm			
Quercetina	-	-	12.18±0.16	-	10.51±0.19/3.18±0.06
	1	0.34	11.16±0.21	8.42±0.60**	
	1.78	0.60	10.51±0.08	13.68±0.60**	
	3.16	1.07	9.31±0.09	23.50±0.62**	
	5.62	1.90	7.96±0.13	34.62±0.48**	
	10	3.38	5.65±0.17	53.62±0.81**	
$\alpha$ -tocoferol	-	-	12.18±0.16	-	81.15±2.13/34.95±0.9
	100	43.07	5.83±0.06	52.14±0.57**	
	177.83	76.59	4.18±0.03	65.69±0.45**	
	316.23	136.2	3.45±0.06	71.67±0.43**	
	562	242.05	1.20±0.12	90.20±0.82**	
	1000	430.7	0.93±0.09	92.36±0.67**	
Acido caféico	0	0	12.18±0.16	0	74.75±0.03/13.46±0.005
	42.17	7.59	10.71±0.09	12.04±0.56**	
	56.23	10.13	9.71±0.05	20.22±0.65**	
	74.13	13.35	5.67±0.09	53.53±0.20**	
	100	18.02	2.08±0.10	82.94±0.59**	
	133.35	24.02	1.05±0.10	91.42±0.78**	
	177.83	32.03	0.82±0.08	93.30±0.61**	
	0	-	12.18±0.16	-	-
	7.50	42.58	10.47±0.12	14.03±1.06**	
	10	56.78	8.91±0.10	26.83±0.35**	

Ácido ascórbico	13.34	75.74	7.60±0.23	37.70±1.82	12.95±0.11/2.28±0.02
	17.78	100.95	1.13±0.08	90.73±0.52	
	23.71	134.62	0.99±0.09	91.89±0.61	

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

Tabla 16. Tabla 12. Comparación de los antioxidantes de referencia contra los extractos de la epidermis de ciruela.

Antioxidante	CI <sub>50</sub>	Extracto	CI <sub>50</sub>	Diferencias (menor actividad)
$\alpha$ -tocoferol	34.95	Etanol	228.67	6.54
		Metanol	231.14	6.61
		Ácido	164.50	4.70
Ácido caféico	13.46	Etanol	228.67	16.99
		Metanol	231.14	17.17
		Ácido	164.50	12.22
Quercetina	3.18	Etanol	228.67	71.90
		Metanol	231.14	72.69
		Ácido	164.50	51.72
Ácido ascórbico	2.28	Etanol	228.67	100.29
		Metanol	231.14	101.38
		Ácido	164.50	72.14

## 9.0 DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante de la epidermis del fruto de ciruela, el cual está clasificado en el género *Prunus* de la familia *Rosaceae*. Dicho trabajo contribuye a conocer el contenido de metabolitos secundarios (polifenoles totales y carotenoides), y las propiedades del fruto como antioxidante.

En esta investigación se trabajó únicamente con la epidermis del fruto pues existe información revelada por Ordaz y cols. (1999) acerca de que los metabolitos con actividad antioxidante se encuentran en mayor cantidad en la epidermis de frutos y no en la pulpa. Para determinar el contenido de metabolitos secundarios con posible actividad antioxidante se emplearon las técnicas de cuantificación de polifenoles totales (PT) y carotenos.

### **Contenido de polifenoles totales y carotenoides en *Prunus domestica***

El screening para determinar el contenido de polifenoles totales (PT) y carotenoides se realizó con la finalidad de valorar cuantitativamente los principios activos de la epidermis del fruto y de esta manera tener un panorama acerca de que metabolitos confieren en su mayoría la actividad antioxidante de la epidermis de ciruela.

Al respecto de PT en ciruelas existe información reportada por Kim y cols. (2003) en donde el promedio de PT fue 192.1 mg de equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra en peso fresco (mg eq. AG/100g PF). Al comparar los resultados con la cantidad de estos metabolitos en el fruto evaluado (*Prunus domestica*), en éste último el contenido es relativamente menor. Sin embargo *Prunus domestica* observó un mayor contenido de PT al respecto de dos variedades de ciruela analizadas en el mismo estudio (early magic con un  $143.1 \pm 2.0$  mg eq. AG/100g PF y NY9,  $125 \pm 2.3$ ).

Si comparamos los PT de *Prunus domestica* con los frutos evaluados por Proteggente y cols. (2002), empleando el método de Folin- Ciocalteu, tenemos que la ciruela (162 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g de muestra en peso seco) evaluada en la presente



investigación tiene mayor contenido de polifenoles que naranja (126), uva verde (80), pera (60), manzana (48), durazno (38) y plátano (38), sin embargo, ostenta un menor contenido que fresa (330), frambuesa (228) y ciruela roja (320). Para la cuantificación de PT se empleó el fruto completo excepto en naranja y plátano (sin cascara). Las diferencias en el contenido de polifenoles posiblemente es resultado de los cultivos, origen geográfico, temporada y otras prácticas de agricultura. El contenido de polifenoles se expresó como equivalentes de ácido gálico en 100 gramos de muestra en peso fresco.

En lo concerniente al contenido de carotenoides en epidermis deshidratada de ciruela (*Prunus domestica*), 5.73  $\mu\text{g/g}$  Los resultados son comparables con los identificados por Speek y cols., 1987, en pulpa fresca y madura de papaya y mango. Por una lado la papaya tuvo un contenido de carotenoides de 6.4  $\mu\text{g/g}$ , por otro lado, el mango presenta 3.33  $\mu\text{g/g}$ . La papaya contiene mayor cantidad de carotenoides al respecto de la epidermis de ciruela y mango un menor contenido.

En 2006 Thaipong y cols. determinaron el contenido de carotenos en tres variedades de guayaba (pulpa y epidermis): *fan retief* (1590  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), *ruby supreme* (2930  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y *advanced selection* (780  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). Al comparar esos resultados con los carotenos de la epidermis de ciruela, en ésta fue menor (573  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) respecto al de las variedades de guayaba.

En cuanto a la comparación de la epidermis del fruto evaluado respecto al contenido de carotenoides en otras variedades de epidermis de ciruela analizadas por Gil y cols. 2002. Se encontraron para Wickson (3380  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Black Beaut (4100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), red baut (2170  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y angeleno, (4080  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). La epidermis del fruto de ciruela tuvo 5730  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de carotenoides, por tanto, tuvo un mayor contenido de carotenoides respecto a las variedades evaluadas por Gil y cols.

## **Extractos**

Se observó un incremento progresivo en la cantidad de extracto obtenido, conforme al aumento de la polaridad del disolvente empleado. Existe una clasificación de disolventes al respecto de su polaridad. Por ejemplo, *n*-hexano es un disolvente de baja polaridad, acetato de etilo es uno de los

disolventes de polaridad intermedia y metanol se considera de alta polaridad. De esta manera al incrementar la polaridad se extraen diferentes grupos de moléculas. *n*-hexano extrae metabolitos hidrofóbicos, acetato de etilo es afín a triterpenos, y metanol a flavonoides, alcaloides, antocianinas y otros compuestos mas polares.

### **Evaluación de la actividad antioxidante**

En los resultados de la prueba de DPPH en barridos gruesos se observó un incremento proporcional a la concentración del extracto, así como el incremento en la polaridad. La actividad antioxidante es baja en los primeros dos extractos (*n*-hexano y diclorometano) comparado con sus análogos. Esto se debe a que los disolventes, con los que se obtuvieron ambos extractos disuelven metabolitos, como ceras, que presentan escasa actividad antioxidante.

Considerando la decoloración del radical DPPH al ser reducido por antioxidantes. Es importante mencionar que los extractos de etanol, metanol y ácido son los que presentaron mayor porcentaje de reducción del DPPH. Lo anterior indica que los extractos de la epidermis de ciruela son buenos donadores de hidrógeno para actuar como antioxidantes (Abdille y cols, 2005). Finalmente, el extracto ácido presentó mayor actividad antioxidante debido a que en éste se encuentran disueltos la mayor proporción de metabolitos con actividad antioxidante respecto a los otros dos extractos.

En base a los resultados obtenidos en los barridos gruesos se determinó que los extractos que presentaron mayor actividad fueron etanol, metanol y ácido (éste ultimo se empleo para estabilizar a las posibles antocianinas presentes en la epidermis de ciruela). Por consiguiente, a esos extractos fue a los que se les realizaron barridos finos, para calcular la  $CI_{50}$ . Lo anterior se deduce a causa de que los metabolitos que presentan actividad antioxidante (por ejemplo antocianinas) son arrastrados por disolventes polares como los empleados en las extracciones que presentaron mayor actividad, (etanol, metanol y ácido) (Fan G y cols., 2007).

El extracto ácido ( $70.77 \pm 1.34$ ) presentó una  $CI_{50}$  menor, esto corresponde a una mayor actividad antioxidante. En cuanto a los extractos obtenidos con polaridad secuencial, el extracto de etanol fue el que presentó mayor  $CI_{50}$ , lo cual indica que el extracto es efectivo para evitar la oxidación.

La actividad antioxidante incrementa respecto a la polaridad empleada para obtener los extractos. Por consiguiente los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante en ambos ensayos fueron los extractos de etanol, metanol y ácido respectivamente. Por tanto, es posible que la actividad antioxidante de la ciruela esté dada por la presencia de antocianinas al realizar analogía como las identificadas por Piga y cols. (2003) en ciruelas de las variedades Azucar y Presidente.

Sin embargo, al comparar la  $CI_{50}$  de los extractos de ciruela (etanol 0.086 mg/mL, metanol 0.0807 mg/mL y ácido 0.070 mg/mL) en extractos de diclorometano y metanol de *Prunus padus* y *Prunus spinosa*. La  $CI_{50}$  para *P. padus* fue de  $25.2 \times 10^{-3}$  mg/mL y  $64.0 \times 10^{-3}$  mg/mL respectivamente para cada extracto. En *P. spinosa* la  $CI_{50}$  fue de  $50.0 \times 10^{-3}$  mg/mL y  $48.0 \times 10^{-3}$  mg/mL identificados por Kumarasamy y cols. (2004), la ciruela tiene una baja  $CI_{50}$  al respecto de estos frutos.

En 2004 Wangensteen y cols. determinaron el contenido de antioxidantes en semillas y hojas de cilantro por la técnica de DPPH. Los resultados del extracto de etanol tuvieron una  $CI_{50}$  de  $389 \pm 5$  y  $510 \pm 12$   $\mu$ g/mL respectivamente. El extracto hojas de acetato de etilo tuvo la  $CI_{50}$  mas baja ( $147 \pm 3$   $\mu$ g/mL) lo cual se traduce como una mejor actividad para inhibir al RL DPPH. Por último, el extracto de diclorometano fue inactivo en éste ensayo. Al realizar la comparación de éstos extractos con los de epidermis de ciruela, el extracto de etanol ( $CI_{50}$  85,600  $\mu$ g/mL) tuvo un mejor porcentaje de reducción del DPPH. Lo cual indica que los metabolitos que confieren dicha actividad son de polaridad alta. En cuanto a la comparación del extracto de acetato de etilo, éste no tuvo actividad alta en la epidermis de ciruela, sin embargo fue el mejor en hojas de cilantro. Para ambas investigaciones, el extracto de diclorometano no presentó una buena reducción del DPPH, esto puede explicarse por la deficiente capacidad de donación de hidrógeno.

Finalmente, en la comparación de los extractos más activos con antioxidantes de referencia, el fruto no presentó la actividad esperada. En cuanto a quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido

ascórbico el extracto de etanol fue 52.83, 25.17, 8.58 y 30.46 veces menos activo respectivamente, que los antioxidantes de referencia.

El extracto de metanol tuvo diferencias de 49.21, 23.45, 7.99 y 28.37 veces menos activo respecto a quercetina, ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico. Finalmente el extracto ácido también tuvo menor actividad que los antioxidantes de referencia. Para quercetina se tuvo una actividad inferior del extracto ácido de 43.68 veces, en ácido caféico, el extracto evaluado fue 20.81 veces menos activo, en  $\alpha$ -tocoferol la actividad fue menor en 7.09 veces y para ácido ascórbico fue 25.19 veces menor.

En lo concerniente a la segunda prueba de actividad antioxidante TBARS es un análisis comúnmente utilizado para la detección de la peroxidación lipídica. El malondialdehído se forma como resultado de la lipoperoxidación y reacciona con el ácido tiobarbitúrico para formar un pigmento de color rosa. Los resultados de esta prueba indican que la  $CI_{50}$  de los extractos de ciruela (etanol 228 ppm, metanol 231 ppm y ácido 164.5 ppm) fueron activos en comparación con los de hojas y semillas de cilantro, pues en éste último los extractos no mostraron actividad inhibidora a la peroxidación (Wangensteen y cols. (2004).

De igual manera, García-Alonso y cols 2004, en la evaluación de frutos utilizando la técnica de TBARS fue mayor para fresa con una IC% de (0.05 mg), frambuesa 0.055 mg/mL, cereza 0.074mg/mL, arándanos (0.78 mg/mL), y la más baja en el plátano (1.281 mg/mL), uva blanca (2.216 mg/mL), kiwi (4.487 mg/mL ) y aguacate (> 5 mg/mL). Al comparar estos resultados con los extractos de ciruela en la misma técnica, éstos mostraron valores mayores de  $CI_{50}$ .

Ahora bien, respecto a la comparación de la  $CI_{50}$  por TBARS de los extractos de epidermis de ciruela: etanol ( $85.60 \pm 6.23$  ppm), metanol ( $79.73 \pm 2.62$  ppm) y ácido ( $70.77 \pm 1.34$  ppm) con antioxidantes de referencia,  $\alpha$ -tocoferol 34.59, ácido caféico 13.46, quercetina 3.18 y ácido ascórbico 2.28 ppm. Los extracto de epidermis presentaron menor actividad.

Al comparar los extractos (etanol, metanol y ácido) con el  $\alpha$ -tocoferol estos fueron 6.54, 6.61 y 4.70 respectivamente veces menos activos. Ahora bien, para ácido caféico las diferencias de menor actividad en los extractos mas activos de epidermis de ciruela fueron 16.99, 17.17 y 12.22

para etanol, metanol y ácido. Para quercetina los extractos fueron 71.90, 72.69 y 51.72 veces menos activos. Finalmente, los extractos fueron 100.29, 101.38 y 72.14 veces menos eficaces para inhibir lipoperoxidación al respecto del ácido ascórbico. Lo anterior se traduce como una menor actividad antioxidante, por parte del fruto, en procesos de lipoperoxidación.

## 10.0 CONCLUSIONES

- La epidermis de ciruela tiene una buena proporción de compuestos fenólicos sin embargo el contenido de carotenos es bajo respecto a otros frutos
- Los extractos mas polares fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante, y se sospecha que esta actividad la proporcionan las antocianinas, de acuerdo a las pruebas ácido-base, por el cambio de coloración que tuvieron estos extractos.
- En la comparación de los antioxidantes de referencia con los extractos con mayor actividad antioxidante, estos últimos presentaron una actividad baja respecto a los primeros, sin embargo la actividad de la epidermis es buena comparada con otros extractos de frutas.

## 11.0 PERSPECTIVAS

Dentro de las frutas que contienen fitoquímicos, específicamente antioxidantes, se encuentra la ciruela. Por un lado, es importante continuar con la investigación al respecto del fruto de ciruela por el potencial efecto antioxidante que presentó en las pruebas *in vitro*. Además, se sugiere indagar en este aspecto empleando métodos *in vivo*, con la finalidad de determinar el efecto de este fruto en sistemas biológicos. Uno de los métodos a emplear puede consistir en la suplementación del extracto a ratas con padecimientos relacionados al estrés oxidativo (o algún tipo de patología relacionada con la sobreproducción de radicales libres).

Por otro lado, se debe de inquirir acerca de la identificación de los metabolitos presentes en los extractos obtenidos a partir del fruto de ciruela. Para posteriormente, evaluar al metabolito aislado como posible antioxidante. En esta fase de aislamiento de compuestos se puede recurrir a técnicas sofisticadas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Otra posible línea para continuar con la investigación acerca de las propiedades antioxidantes de la ciruela sería su aplicación como auxiliares en la conservación de alimentos. Las propuestas anteriores van enfocadas a la actual tendencia en el incremento en la prevalencia de enfermedades crónico degenerativas a nivel nacional. Pues se ha demostrado que el consumo de frutas (debido a los fitoquímicos que contienen) actúan como auxiliares para evitar o retrasar la aparición de dichas patologías.

## 12.0 REFERENCIAS

**Ada** BP, Martha SR, Mirna RR y Víctor MN. 2003. ¿Como evaluar la eficiencia del sistema antioxidante en el estrés oxidativo? propuesta de un constructo. Arch Geriátrico 64: 100-104.

**Abdille** MH, Singh RP, Jayaprakasha GK y Jena BS. 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. Food Chem 90: 891-986.

**Ajila** CM, Naidu KA, Bhat SG y Prasada -Rao UJS. 2007. Bioactive compounds and antioxidante potencial of mango peel extract. Food Chem 105: 982-988.

**Amez** BN. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). J Agric Food Chem 46: 1247-1252.

**Amin** I, Norazaidah Y y Hainida EKI. 2006. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. Food Chem 94: 47-52.

**Anderson** OM y Jordehim M. 2006. Flavonoids chemistry biochemistry and applications. Editorial Taylor& Francis.

**Ardestani** A y Yazdanparast R. 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem 104: 21-29.

**Aruoma** OI. 1999. Free radicals, antioxidant and internacional nutrition. Asia Pacific. J Clin Nutr 8(1): 53-63.

**Barreira** JCM, Ferreira I, Oliveira I y Pereira JA. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chem 107: 1106-1113.

**Brand-Williams** W, Cuvelier ME y Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss Technol 22: 25-30.

**Berrahal** A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N y El-Fazâa S. 2007. Antioxidant Berries. J of Food Comp and Anal 20: 370-374.

**Brigelius-Flohe** R y Traber GM. 1999. Vitamin E: function and metabolism. The FASEB J 13: 1145-1155.

**Carr** CA y Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. Am J Clin Nutr 69: 1086-1107.

**Chauhan** A, Chauhan V, Brown TW y Cohen I. 2004. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins. Life Sci 75: 2539-2549.



- Deineka** VI, Deineka AI y Sirotin AA. 2005. Anthocyanins from fruit of certain plants of the genus *Prunus*. *Chem of Nat Comp* 41(2): 230-231.
- Delimaris** I, Georgopolus S, Kroupis C, Zachari A, Liberi M, Bastounis E y Dionyssiou-Asteriou A. 2007. Serum oxidizability, total antioxidant status and albumin serum levels in patients with aneurysmal or arterial occlusive disease. *J Clin Biochem* 1-20.
- Duthie** GG y Bellizzi MC. 1999. Effects of antioxidants on vascular health. *Br Med Bull* 55(3): 568-577.
- Dorado** Martinez C, Rugerio Vargaz C y Arancibia Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración, Depto fisiología, UNAM 46(6): 229-235.
- Fan** G, Han Y, Gu Z y Chen D. 2007. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Food Sci and Tech* 1-6.
- Fitó** Colomer M. 2003. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Tesis Doctoral. Depto de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- Fogliano** V, Verde V, Randazzo G y Ritieni A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem* 47: 1035-1040.
- Folin** C y Ciocalteau V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J Biol Chem* 73: 627-650.
- García-Alonso** M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C y Rivas-Gonzalo JC. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem* 84: 13-18.
- Gil** MI, Barberán FAT, Pierce BH y Kader AA. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from california. *J Agric Food Chem* 50: 4976-4982.
- Giusti** MM, Wrolstad RE. 2001. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Anal Chem Unit*. F1 2-13.
- Gutteridge** J. 1987. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biophys Acta* 917: 219-222.
- Halliwell** B y Gutteridge J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Second Ed. Clarendon press Oxford 11.
- Hancock** JF. 2008. Temperature fruit crop breeding germplasm to genomics . *Springer* 11: 337-355.

- Harborne** JB y **Williams** CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Karakaya** S, **El SN** y **Tac AA**. 2001. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *Int J Food Sci Nutr* 52: 501-508.
- Kim** D-O, **Lee KW**, **Lee HJ** y **Lee CY**. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50: 3713-3717.
- Kim** D-O, **Chun OK**, **Kim JY**, **Moon HY** y **Lee CY**. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51: 6509-6515.
- Kong** JM, **Chia LS**, **Goh NK**, **Chia TF** y **Brouillard R**. 2003. Review, Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Kumarasamy** Y, **Cox PJ**, **Jaspars M**, **Nahar L** y **Sarker SD**. 2004. Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia* 75: 77-80.
- Kuskoski** EM, **Asuero AG**, **Troncoso AM** y **Garcia-Parilla MC**. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev Bras Ciênc Tecnol Alim* (24)4: 691-693.
- Lee** S-H, **Lillehoj**, **Cho S.-M**, **Chun H-K**, **Park H-J**, **Lim C-I** y **Lillehoj EP**. 2008. Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina Lindl.*), *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.
- Lo** KM y **Cheung PCK**. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Arocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chem* 89: 533-539.
- Martínez** A. 2005. Flavonoides, Medellín. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Matthaus** B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oil seeds. *J of Agric Food Chem* 50(12): 3444-3452.
- Miller** EH, **Rigelhof F**, **Marquart L**, **Prakash A** y **Kanter M**. 2000. Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals. *J Am Coll Nutr* 19(3): 312-319.
- Murthy** KC, **Singh RP** y **Jayaprakasha**. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis Vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50: 5909-5914.
- Naczki** M y **Shahidi F**. 2006. Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1523-1542.
- Nakanishi** K, **Goto T**, **Ito S**, **Natori S** y **Nozoe S**. 1974. *Nat Prod Chem*. Academic Press, INC 10.

**Okonogi S**, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S y Chowwanapoonpohn S. 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem* 103: 839-846.

**Ordaz -Galindo A**, Wesche -Ebeling P, Wrolstad R, Rodríguez-Saona L y Argaiz-Jamet A. 1999. Purification of capulin (*Prunus serotina Ehrh*) anthocyanins. *Food Chem* 65: 201-206.

**Parker DV**. 1999. Nutrition antioxidants and disease prevention: Mecanismos of action in antioxidant in human health and disease. Eds.T.K Canada 1-13.

**Peschel W**, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzía I, Jiménez D, Lamuela-aventós R, Buxaderas S y Codina C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem* 97: 137-150.

**Pérez Trueba H**. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 22(1): 48-57.

**Phillipson JD**. 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68: 2960-72.

**Piga A**, del Caro A y Corda G. 2003. From plums to prunes: Influence of drying parameters on polyphenols and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 51: 3675-3681.

**Posada Jaramillo M**, Pineda-Salinas V, Agudelo Ochoa GM y Velásquez CM. 2003. Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas. El chocolate y su contenido de antioxidantes. UNAM 8-11.

**Proteggente AR**, Pannala AS, Paganga G, Buren LV, Wagner E, Wiselman S, Van de Put F, Dacombe C y Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad Res* 36(2): 217-233.

**Pua EC y Davey MR**. 2007. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 60. Transgenic Crops V. Editorial Springer.

**Robards K**, Prenzler P, Tucker G y Swatsitang GW. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.

**Rodríguez P**, Menéndez JR y Trujillo LY. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 30(1): 36-44.

**Ross R**.1999. Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2): 115-126.

**Roussis IG**, Lambropoulos I, Tzimas P, Gkoulioti A, Marinos V, Tsoupeis D y Boutaris I. 2008. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *J Food compos anal* 21: 614-621.

- Saura** CF. 1998. Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carbo pods. *J Food Chem* 46: 4303-4306.
- Schwab** W. 2003. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry* 62: 837-849.
- Schwartz** RS. 2001. Estrés oxidativo y defensa antioxidante. Implicaciones en nutrición clínica: Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales. 1a Ed. Editorial McGraw-Hill. Madrid.
- Sebastian** J, Padayatty KA, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S y Levine M. 2003. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* 22(1): 18-35.
- SIIT**<sup>\*mx</sup> Sistema integral de información taxonomica, Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. <http://siit.conabio.gob.mx>
- Speek** AJ, Speek-Saichua S y Schreurs HP. 1987. Total carotenoid and  $\beta$ -carotene Contents of Thai Vegetables and the effect of processing. *Food Chem* 27:245-257.
- Su** MS, Shyu YT y Chlen PJ. 2008. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem* 111: 892-896.
- Stacewicz**-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, y Farnsworth N. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit Rev Food Sci* 41: 251-86.
- Thaipong** K, Boonprakoba U, Crosbyb K, Cisneros-Zevallos L y Byrnc DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Comp Anal* 19: 669-675.
- Thakur** MI, Srivastava SU. 1996. Vitamin-E metabolism and its application. *Nutr Research* 16(10): 1767-1809.
- Tsao** R, y Deng Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatography* 812: 85-99.
- Tseng** CF, Lin CC, Huang HY, Liu CH y Mao S. 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 4: 2221-2228.
- Usenik** V, Kastelec D, Veberic R y Stampar F. 2008. Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). *Food Chem* 111: 830-836.

- Vaclavik** A y Christian EW. 2008. Essentials of food science. Third edition. Editorial Springer. Capitulo 18.
- Verpoorte** R, Contin A y Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Rev* 1: 13-25.
- Voutilainen** S, Nurmi T, Mursu J y Rissanen H. 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83:1265-1271.
- Wangensteen** H, Samuelsen AB y Karl Egil Malterud. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem* 88: 293-297.
- Wolfe** K, Wu X y Liu AR. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51: 609-614.
- Xi** S y Chen L. 2000. Effects of dietary fish oil on tissue glutathione and antioxidant defense enzymes in mice with murine AIDS. *Nutr Research* 20(9): 1287-129.
- Xiu-Quin** L, Chao J, Yan-Yan S, Min-Li Y y Xiao-Gang Chu. 2009. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chem* 113: 692-700.
- Yan-Hwa** C y Hsia-Fen H. 1999. Effects of antioxidants of peanut oil stability. *Food Chem* 66: 29-34.

## ANEXOS

### 1. 0 Curva de estándar de ácido gálico

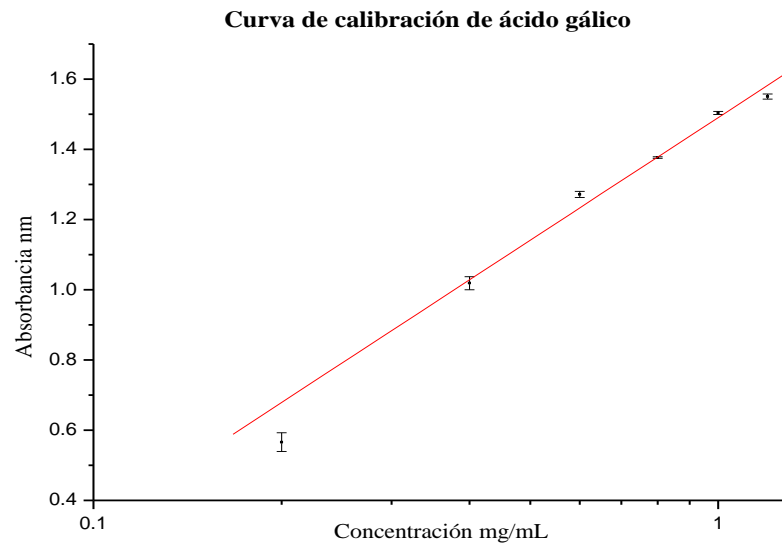


Figura 1. Curva de calibración de ácido gálico ( $R=0.99\pm 4.10$ ,  $B=1.49\pm 0.00$ ,  $m=1.16$ ).

## 2.0 Curva estándar de albúmina

La curva de calibración fue necesaria para ajustar el contenido de proteínas en el homogenizado de cerebro. Para la realización de la curva estándar de albúmina se debe realizó el siguiente procedimiento:

1. Solución stock de albúmina 1.5 mg/mL.
2. Preparación por duplicado de 400  $\mu$ L de las diluciones de albúmina (Tabla 1)

Tabla 1. Diluciones de albúmina para la elaboración de la curva estándar

Concentración en 400 $\mu$ L ( $\mu$ g/mL)	Alícuota del stock 1.5 mg/mL	Agua desionizada	Concentración final en 3 mL ( $\mu$ g/mL)
0	0 $\mu$ L	400 $\mu$ L	0
75	20 $\mu$ L	380 $\mu$ L	10
No 150	40 $\mu$ L	360 $\mu$ L	20
225	60 $\mu$ L	340 $\mu$ L	30
300	80 $\mu$ L	320 $\mu$ L	40
375	100 $\mu$ L	300 $\mu$ L	50
450	120 $\mu$ L	280 $\mu$ L	60
524	140 $\mu$ L	260 $\mu$ L	70
600	160 $\mu$ L	240 $\mu$ L	80

3. En el caso de la muestra problema tomar la alícuota deseada (5, 10, 20 o 40  $\mu$ L) y llevar a 400  $\mu$ L con agua desionizada.
4. Agregar 2.3 mL de la siguiente mezcla :  
49 mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N  
0.5 mL de tartrato de Na/K 2%  
0.5 mL de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )
5. Después de diez minutos agregar 0.3 mL de reactivo de Folin disuelto en agua (1:1).
6. A los treinta minutos medir la absorbancia a 550 y 750 nm.

7. Finalmente se ajustan los resultados experimentales a un modelo lineal por medio de un análisis de regresión.

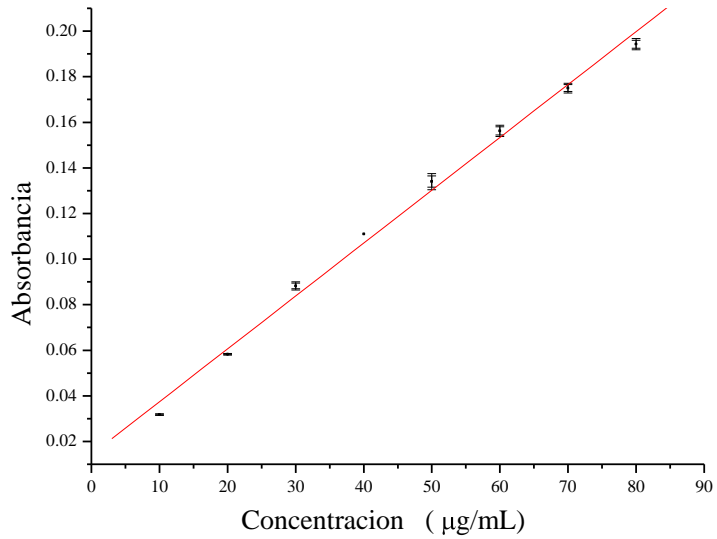


Figura 2. Curva estándar de albúmina ( $R=0.99\pm 0.004$ ),  $B=0.01422\pm 0.0036$ ,  $m=0.00232\pm 7.15948E-5$ ).



### 3.0. Curva estándar de malondialdehído usando como precursor tetrametoxipropano (TMP)

Esta curva de calibración se realizó con la finalidad de cuantificar la cantidad de malondialdehído generado en el ensayo. Para la realización de la curva estándar se desempeña el siguiente procedimiento:

1. Preparar solución stock (10 mM, 25 mL). Tomar 41.173  $\mu\text{L}$  de TMP directo del frasco contenedor y se afora a 25 mL con ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1% en agua desionizada. Hidrolizar durante dos horas a temperatura ambiente.
2. Preparar la solución de trabajo (0.1 mM, 5 mL), tomar 50  $\mu\text{L}$  de la solución anterior y agregar 4.95 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%.
3. Tomar por duplicado el volumen de la solución de trabajo señalado en la Tabla 2 y llevar a 1.5 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, esto se realiza para obtener las soluciones para la curva.
4. En la reacción con TBA agregar a todos los tubos 1.5 mL de TBA 0.67% disuelto en NaOH 0.05 N y calentar 30 min en baño de agua a ebullición.
5. Finalmente, enfriar los tubos a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 532 nm. Graficar la concentración final de malondialdehído contra la densidad óptica, para construir la curva y obtener la ecuación de la recta, para ajustar los resultados experimentales a un modelo lineal.

Tabla 2. Volúmenes para la curva estándar de malondialdehído a partir de tetrametoxipropano 0.1 mM.

Concentración final ( $\mu\text{M}$ )	TMP 0.1 mM	$\text{H}_2\text{O}$ desionizada	TBA 0.67 %
0	0 $\mu\text{L}$	1.5 mL	1.5 mL
1	30 $\mu\text{L}$	1.470 mL	1.5 mL
2	60 $\mu\text{L}$	1.440 mL	1.5 mL
3	90 $\mu\text{L}$	1.410 mL	1.5 mL
4	120 $\mu\text{L}$	1.380 mL	1.5 mL

5	150 $\mu$ L	1.350 mL	1.5 mL
6	180 $\mu$ L	1.320 mL	1.5 mL
7	210 $\mu$ L	1.290 mL	1.5 mL
8	240 $\mu$ L	1.260 mL	1.5 mL
9	270 $\mu$ L	1.230 mL	1.5 mL
10	300 $\mu$ L	1.2 mL	1.5 mL

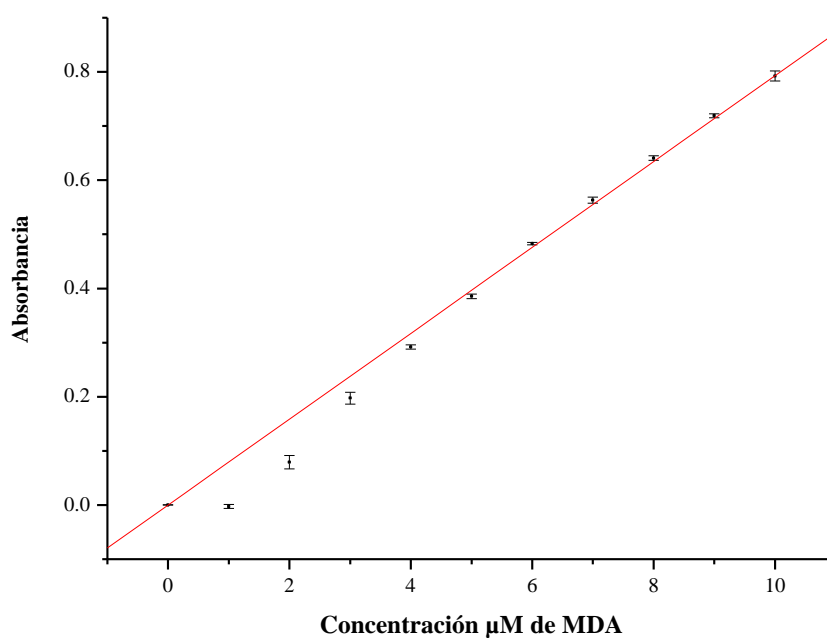


Figura 3. Curva estándar de malondialdehído usando como precursor tetrametoxipropano (TMP),  $R=0.99\pm 0.00$ ),  $B=1.26096E-4\pm 1.00031E-4$ ,  $m=0.07927\pm 2.08762E-4$ .

#### 4.0 Aislamiento e identificación de metabolitos

Se realizó una prueba preliminar con el propósito de aislar metabolitos de los extractos mas activos del total de los siete extractos evaluados (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol y ácido), los de etanol, metanol y ácido fueron los que presentaron mayor AA, en las pruebas realizadas, se trabajó con estos extractos para efectuar la purificación de metabolitos.

Para ello fue necesario identificar el número de compuestos presentes en cada extracto, se recurrió a la técnica de cromatografía en capa fina (CCF). Durante la CCF se utilizó como soporte sílice, celulosa y papel sin obtener separación de compuestos. Se determinó que los extractos etanólico y metanólico contenían los mismos componentes y el ácido fue diferente. Por consiguiente, se enviaron 10 mg del extracto etanol y ácido a resonancia magnética nuclear, para realizar la prueba de  $H^1$ , y determinar la presencia de anillos aromáticos. Posteriormente, se realizó un cambio de pH a los extractos utilizando NaOH (99%), Considerando la modificación de antocianinas respecto a la coloración y pH.

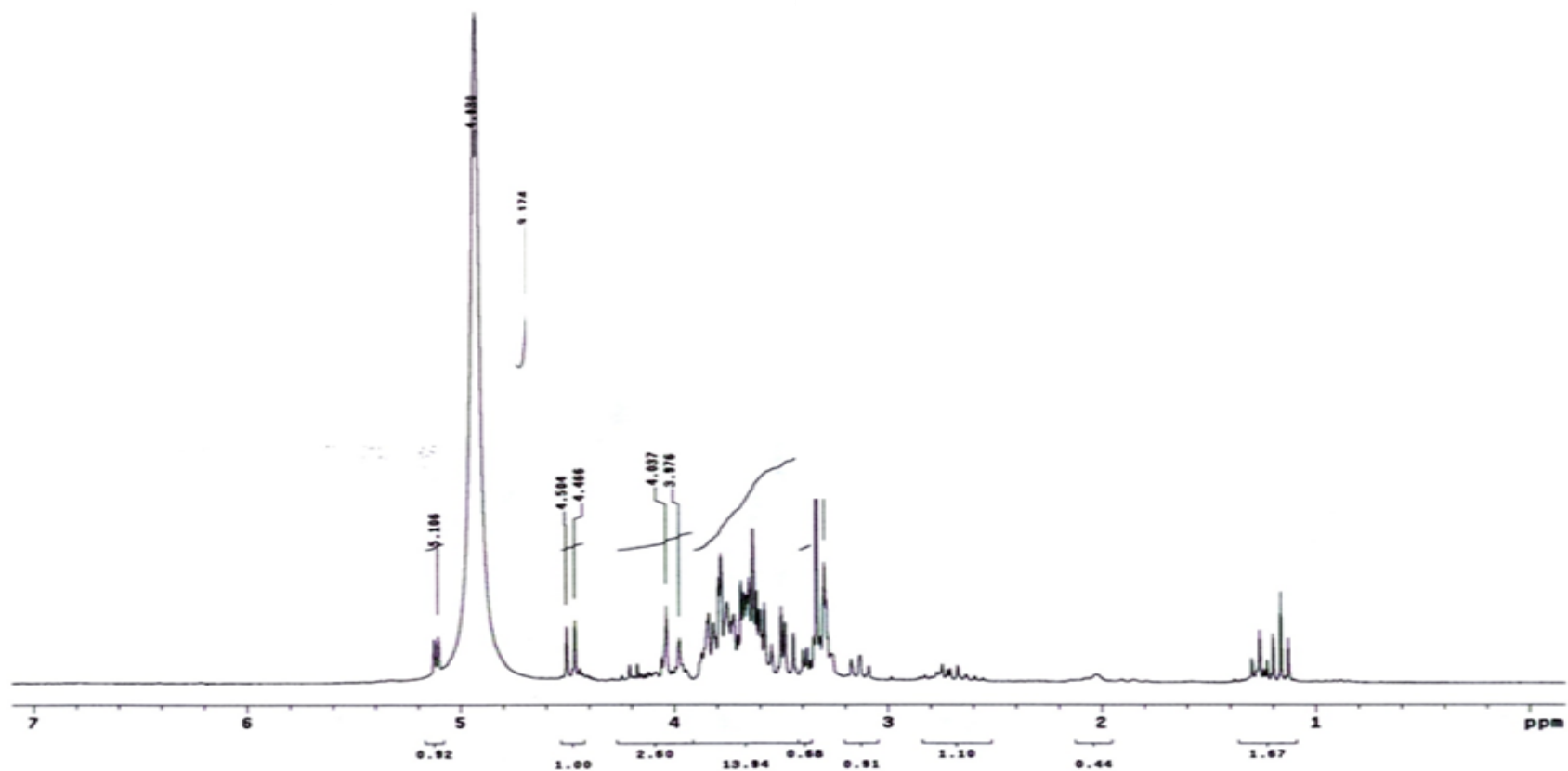
A continuación, se montó una columna con soporte de sílice, se utilizaron cuatro gramos del extracto de etanol. Por un lado, se monto una columna con soporte de sephadex LH-20 con el extracto ácido. Al disolver el extracto se obtuvo un precipitado por consiguiente se filtro la mezcla y la columna se empacó con las aguas madres. Las fracciones colectadas fueron 36 de 25 mL cada una. Las fracciones cinco y diez se concentraron por separado y se enviaron a resonancia magnética nuclear (RMN) (espectro tres y cuatro de anexos) para observar si se encontraban puras. Otro soporte utilizado para la separación por cromatografía fue polivinilpirrolidona (PVP). Se empaco columna con éste soporte con 15 g de extracto ácido, disuelto en 0.25 N de HCl en  $H_2O$ .

Respecto a los resultados de esta sección, se buscaba la identificación de antocianinas en los extractos de epidermis, de acuerdo a los antecedentes existentes sobre estos compuestos en otras variedades de ciruela. Sin embargo, no se logro separar alguno empleando técnicas de cromatografía, en columna, capa fina y placa preparativa. Lo anterior debido a la mezcla de

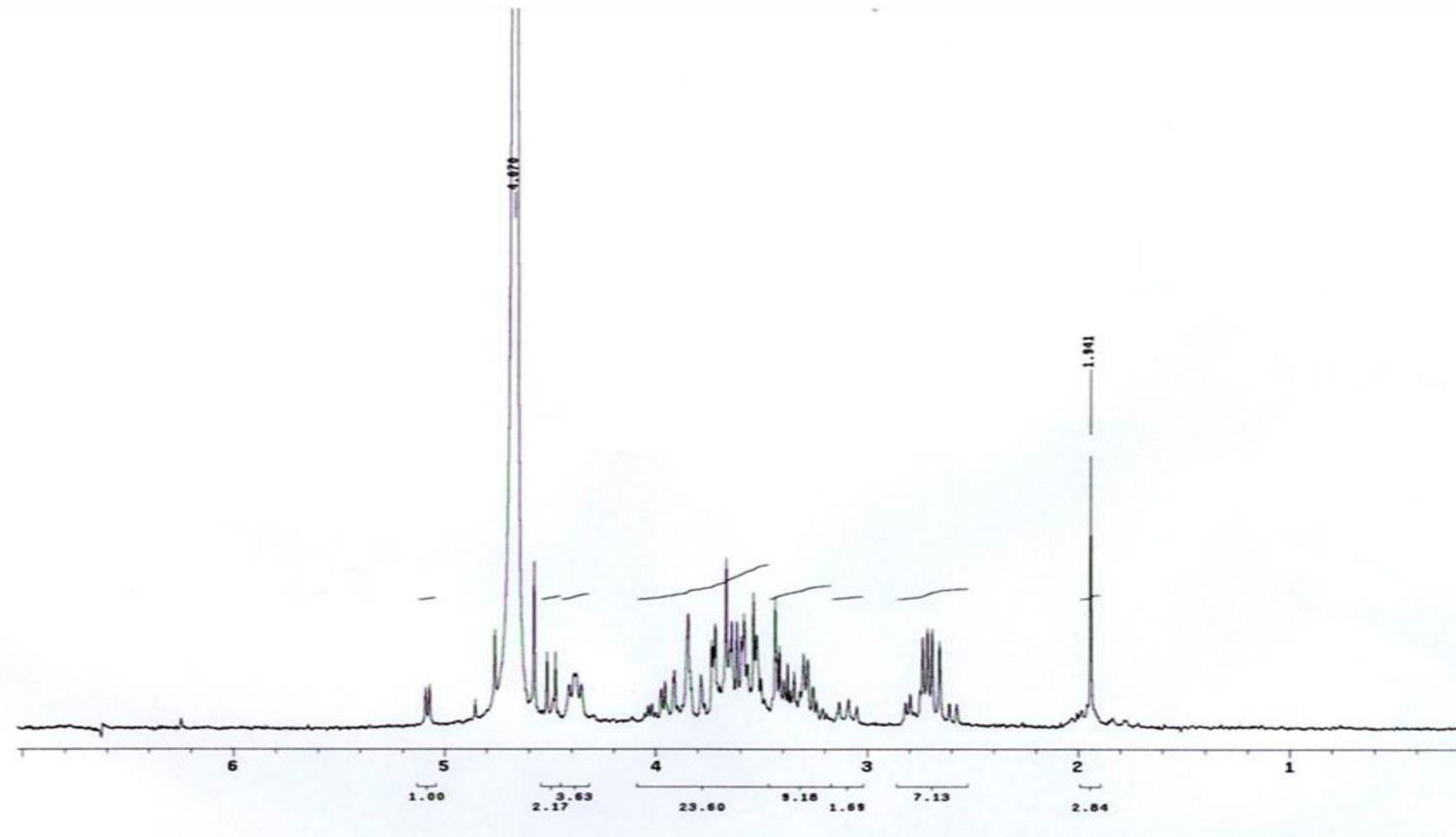
compuestos presentes en los extractos. Otra probable causa fue el tipo de metodología empleada en la extracción. En este caso sería conveniente realizar un acoplamiento de diferentes técnicas de análisis para mejorar la separación así como la sensibilidad de la detección de las antocianinas.

## 4.1 Espectros

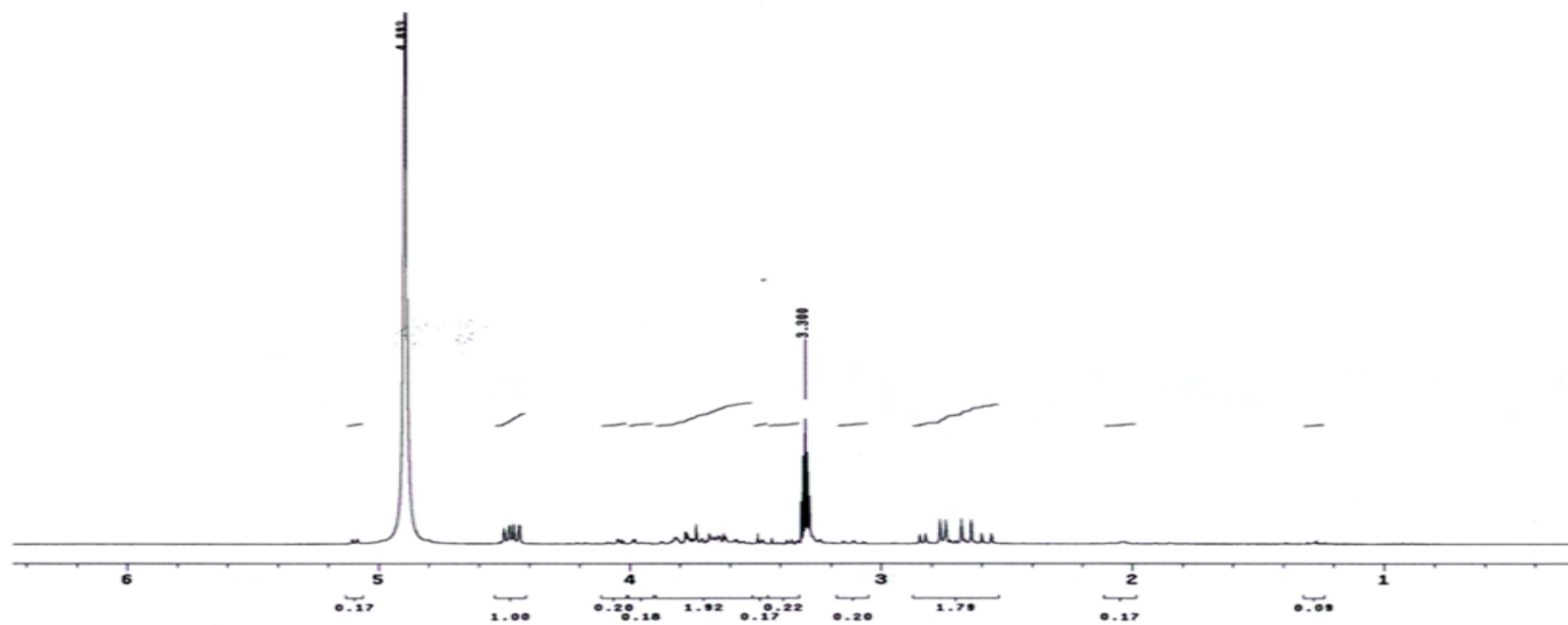
Espectro 1. Extracto de etanol



Espectro 2. Extracto ácido



Espectro 3. Fracción 5



Espectro 4. Fracción 1

