



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Evaluación de actividad antioxidante del fruto de
tejocote (*Crataegus mexicana*) obtenido de dos formas
de cultivo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Araceli Meneses Corona

Comité Tutorial

D. en C. Daniel Méndez Iturbide

D. en C. Arturo Navarro Ocaña

D. en C. Gerardo Díaz Godínez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Evaluación de actividad antioxidante del fruto de
tejocote (*Crataegus mexicana*) obtenido de dos formas
de cultivo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Araceli Meneses Corona

Comité tutorial

D. en C. Daniel Méndez Iturbide

D. en C. Arturo Navarro Ocaña

D. en C. Gerardo Díaz Godínez

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Mariana Domínguez López

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas



**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 que **Araceli Meneses Corona** realiza para la obtención del grado de Maestra 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 en el fruto de tejocote *Crataegus mexicana*) obtenido de dos formas de cultivo".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 17 DE 2011



Dr. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



Dr. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ



DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA



DRA. MARIANA DOMÍNGUEZ LÓPEZ



DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradocbtbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Al CTBC y a la UAT por todo el apoyo académico brindado durante la maestría A CONACYT por el proyecto financiado de ciencia básica 2008, número 105663. A los miembros del comité tutorial y del jurado por las revisiones y el tiempo que dedicaron al proyecto

TEMA	PAGINA
RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tejocote	2
1.2 Antioxidantes.....	5
1.3 Métodos para la extracción de metabolitos	20
1.4 Cuantificación de carotenoides y polifenoles totales	25
II. ANTECEDENTES.....	26
2.1 Evaluación de actividad antioxidante en frutos (pulpa y epidermis).....	26
2.2 Comparación de actividad antioxidante por métodos de extracción	27
2.3 Evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH	31
2.4 Evaluación de actividad antioxidante por el método ABTS	33
2.5 Cuantificación de carotenos totales en frutos	35
2.6 Cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	35
III. JUSTIFICACIÓN	38
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	39
V. HIPÓTESIS	40
VI. OBJETIVOS	41
VII. METODOLOGÍA.....	42
7.1 Ubicación de zonas de colecta	42
7.2 Métodos de extracción.....	43
7.3 Métodos de evaluación antioxidante.....	45
7.4 Cuantificación de carotenoides y polifenoles totales	47
VIII. RESULTADOS.....	49
8.1 Peso de fruto fresco y deshidratado	49
8.2 Peso de extractos	50
8.3 Prueba DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	51
8.4 Barridos gruesos	51

8.5 Barridos finos.....	54
8.6 Comparación de Cl_{50} contra antioxidantes de referencia por DPPH.....	55
8.7 Prueba ABTS ⁺ (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico))	56
8.8 Contenido de carotenoides y polifenoles totales	58
IX. DISCUSIÓN	63
X. CONCLUSIONES.....	70
XI. PERSPECTIVAS.....	71
XII. REFERENCIAS	72

RESÚMEN

En el presente estudio, se evaluó la actividad antioxidante en pulpa y epidermis de los frutos de tejocote criollo y de injerto, provenientes del municipio de Huejotzingo Puebla. Para realizar dicha evaluación, se obtuvieron diferentes fracciones a partir de cada fruto por extracciones sucesivas, con seis solventes orgánicos de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol). Lo anterior se llevo a cabo mediante tres métodos de extracción (en frío, por Soxhlet y asistido por ultrasonido). La evaluación de la actividad antioxidante se realizó en las fracciones obtenidas, empleando el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)). Asimismo, en el fruto deshidratado (pulpa y epidermis), se cuantificaron polifenoles y carotenos totales. Se observó que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la actividad antioxidante entre frutos, fracciones obtenidas y métodos de extracción. Los resultados sugieren una fuerte actividad antioxidante en la fracción de acetona obtenida a partir de tejocote criollo por extracción en frío, con una CI_{50} de 11.41 ± 0.15 ppm, para DPPH, siendo menor que en tres de los cuatro antioxidantes comerciales probados (-tocoferol, ác. caféico y ác. ascórbico pero no para quercetina). Para ABTS, el TEAC (actividad antioxidante equivalente a μ M de Trolox)/g de muestra fue de 1.77. Del mismo modo, el contenido de metabolitos de tipo polifenoles y carotenoides fue mayor en tejocote criollo que en tejocote de injerto. Asimismo, el método de extracción por Soxhlet fue el mejor, ya que a partir de acetato de etilo se observó un porcentaje de reducción mayor al 50%, que a diferencia de los métodos en frío y asistida por ultrasonido lo fue en la fracción de acetona.

I. INTRODUCCIÓN

En frutas, vegetales y legumbres se encuentran diversas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando con ello la defensa antioxidante del organismo humano. Además, se ha reportado que estas sustancias son capaces de detener o prevenir el desarrollo de tumores y ciertas patologías de tipo crónico degenerativas, así como los efectos bioquímicos asociados con la progresión de las mismas, este potencial se atribuye principalmente a sus propiedades antioxidantes.

Por lo anterior, en la actualidad, se han realizado diversos estudios en extractos de plantas y frutos de ellas a fin de evaluar su actividad antioxidante. También se cuenta con una gran variedad de productos agrícolas y alimenticios que incluyen frutas, cereales, vegetales y semillas de oleaginosas, cuyos compuestos de tipo carotenoides, polifenoles y sus productos bioactivos han sido las principales áreas de estudio.

Dicha evaluación se ha realizado a través de métodos en los que se somete el extracto de estudio a un medio oxidante, desencadenado por la presencia de un radical libre conocido y presentan como indicador la presencia o ausencia de color. La capacidad antioxidante del extracto evaluado depende de factores importantes: tipo de especie, cultivo y grado de madurez.

1.1. Tejocote (*Crataegus mexicana*)

El tejocote es el nombre con el que se le conoce a los frutos del género *Crataegus* y pertenece a la familia de las *Rosáceas*, en 1997, Phipps reportó 13 especies de tejocote para la zona norte y centro de México, de éstas 9 son endémicas, 3 son compartidas con Estados Unidos y una con Perú y Ecuador (Instituto de horticultura UACH). En México se distribuye entre los 1000 y 2800 msnm, con una precipitación pluvial de 500 y 1500 mm anuales (Nieto-Ángel y cols. 2009).

Se cultiva como planta de sombra y ornato por sus frutos de color naranja, su altura va de 4 a 10 m y vive aproximadamente de 30 a 40 años. La madera es muy dura y compacta, los frutos se consumen crudos o preparados en dulces y mermeladas. Una de las características del fruto es su alto contenido de pectina, misma que se utiliza en la industria farmacéutica, textil y siderúrgica, para la elaboración de cosméticos y como coagulante de mermeladas y jaleas. Se ha reportado que los frutos que pertenecen al género *Crataegus* presentan usos medicinales contra enfermedades diarreicas y como diurético, el fruto es empleado para tratar congestión de pecho y padecimientos del corazón (Ljubuncic y cols. 2005, Long y cols. 2006).

En cuanto a su fenología, propiamente el árbol inicia su floración entre los meses de febrero y marzo, los primeros brotes se presentan en los meses de marzo y abril, el desarrollo de los frutos se da a finales de septiembre, la maduración del fruto es entre octubre y noviembre, el periodo de cosecha inicia a mediados de noviembre y culmina en el mes de diciembre (Aguilera 2001).

Formas de reproducción del fruto

El fruto de tejocote presenta dos tipos de reproducción, una es de tipo sexual o por semilla y el segundo es asexual o vegetativo. La primera involucra semillas (secas) o plántulas, el periodo de germinación va de 30 a 40 días en semillas tratadas a una temperatura de 21 ° C y las no tratadas tardan en germinar 2 o 3 años (Aguilera 2001).

La segunda, conocida como asexual o de injerto consiste en unir o insertar dos o más piezas de tejidos de plantas vivientes que son forzados a desarrollar una conexión vascular y crecer como una planta única. De este modo, el injerto y portainjertos, constituyen un individuo combinado donde ambas partes tienen una influencia bien definida. Así, la raíz de uno, debe

tomar el agua y las sustancias minerales del suelo para llevarlas al tallo y hojas del otro tejido y, por su parte, las hojas de la variedad injertada, deben producir hidratos de carbono y en general todos los nutrientes orgánicos que requiere la raíz sobre la que están injertados (Savvas y cols. 2010).

Tejocote criollo

- Tamaño: 2 a 3 cm diámetro
- Semillas: 4 a 6
- Floración: Enero-abril
- Reproducción: sexual
- Colecta: noviembre y diciembre
- Coloración: naranja (Aguilera 2001)



Tejocote de injerto

- Tamaño: 4 a 5 cm diámetro
- Semillas: 4 a 6
- Floración: Enero-abril
- Reproducción: asexual

- Árbol de injerto: *Rosaceae*
- Portainjerto: árbol de manzana
- Propagación: Febrero-marzo
- Colecta: noviembre y diciembre
- Coloración: amarillo opaco (Aguilera 2001)



Clasificación taxonómica de los frutos de estudio

Los frutos empleados pertenecen a la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Rosales*
- Familia: *Rosaceae*
- Género: *Crataegus*
- Serie: *Mexicaneae*
- Especie: *Crataegus mexicana*

1.2. Antioxidantes

Desde el punto de vista químico, un antioxidante es una sustancia que evita o retrasa la oxidación de otra. Esta reacción se realiza mediante la reducción del agente oxidante, para ello los antioxidantes deben tener una estructura química que permita la donación de hidrogeniones o la deslocalización de electrones (Fig. 1). Asimismo, Halliwell en 1995 definió a los antioxidantes como una sustancia que hallándose presentes a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable (lípidos, proteínas y ADN), detienen significativamente, inhiben o impiden la oxidación del sustrato, al inhibir la iniciación o propagación de reacciones de oxidación en cadena. (Halliwell y cols. 1995, Vit y cols. 2008, Niki 2010).

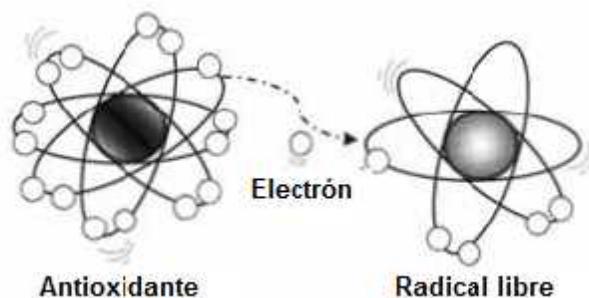


Figura 1. Interacción antioxidante-radical libre

Existen dos categorías de antioxidantes que los dividen en sintéticos y naturales. Dentro de los primeros, se encuentran el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), ambos se han utilizado desde inicios del siglo pasado. Estos al igual que los antioxidantes naturales (compuestos polifenólicos), presentan estructuras fenólicas con diversos grados de sustitución alquilo. Sin embargo, las restricciones sobre el uso de estos compuestos han sido impuestas debido a su carcinogenicidad (Vit y cols., 2008).

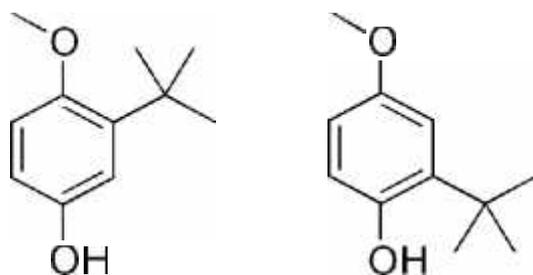


Figura 2. Estructura química del antioxidante sintético Butilhidroxianisol (BHA)

Los segundos se producen en todas las partes de las plantas, frutos, vegetales y animales como el salmón estos incluyen compuestos fenolicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenolicos), compuestos nitrogenados y (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) carotenoides como el β -caroteno (Fig. 3). A su vez los antioxidantes han mostrado funciones como: queladores de oxígeno singulete, neutralizadores de peróxido, inhibidores de enzimas y sinergismo (Wang y cols. 2000).

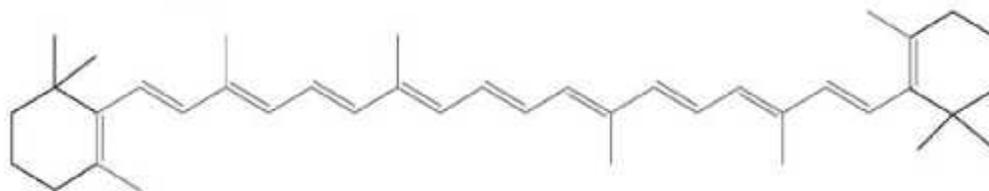


Figura 3. Estructura del β -caroteno

Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante (Fig. 4) tiene la capacidad de actuar a tres niveles: primario, secundario y terciario que dependen de su función. En el primario se encuentran sustancias que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres (Niki 2010):

- Superóxido dismutasa (SOD): transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno.

- Glutación peroxidasa (GPX): convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.
- Proteínas de unión a metales (GR): frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH.

En el secundario se hallan inmersos dos subgrupos:

- Antioxidantes hidrofílicos: vitamina C (ascorbato), ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- Antioxidantes lipofílicos: vitamina E (alfa-tocoferol), carotenoides y las ubiquinonas.

Los terciarios son los encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres e incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa. Las enzimas antioxidantes y glutación (GSH) forman la primera línea de defensa contra el daño inducido por los RL (Sumanth y cols. 2006, Niki 2010).

SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

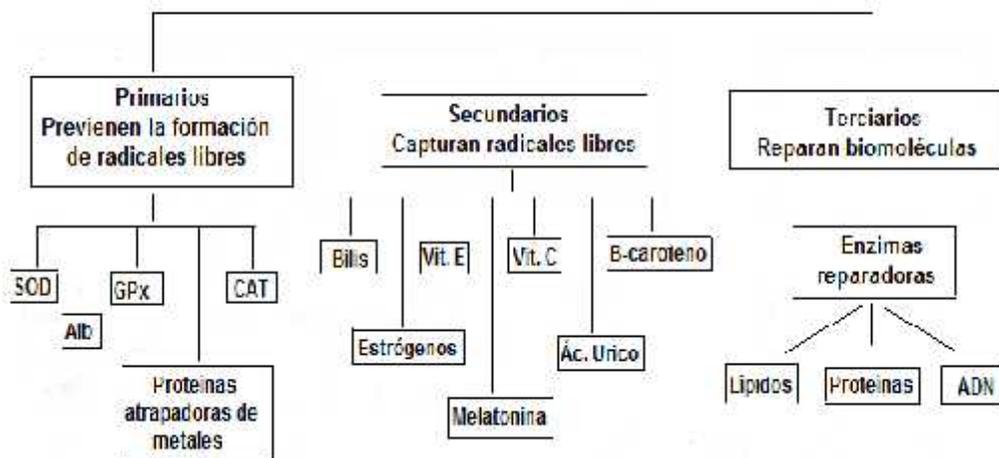


Figura 4. Sistema de defensa antioxidante

Fuentes endógenas en el ser humano

Las fuentes endógenas de antioxidantes involucran una serie de enzimas capaces de reparar el daño ocasionado por sustancias oxidantes, dentro de las más importantes se encuentran la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión (Gutiérrez y cols. 2004). Un ejemplo de la acción de estas enzimas se presenta en el tejido cerebral que está protegido del daño de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno por enzimas antioxidantes, como la SOD que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, que a su vez puede ser eliminado por enzimas como la CAT y GPX (Casado y cols. 2004).

Asimismo, la GPX y la catalasa protegen a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno por catalizar su formación en agua sin la producción de radicales libres (Margaill y cols. 2005). La catalasa representa una enzima altamente inhibidora de H_2O_2 con una actividad óptima a altas concentraciones de este radical. Se sugiere que esta puede estar relacionada a una alta resistencia de tumores invasores (Kinnula y cols. 2004).

La GPX es la principal enzima involucrada en la eliminación de peróxido de hidrogeno e hidroperoxido de lípidos (Tanguy y cols. 2003). La glutatión (GHS) es un potente antioxidante endógeno envuelto en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Batesols 2007). Para ejercer su función, las enzimas antioxidantes requieren la presencia de metales, dentro de las más importantes encontramos a la catalasa que requiere de hierro, la superóxido dismutasa que requiere zinc, cobre y manganeso según su localización celular y la glutatión peroxidasa dependiente de manganeso y selenio.

La Coenzima Q_{10} (Co Q_{10}) es un cofactor enzimático endógeno que se considera esencial en la cadena de transporte de electrones. Los únicos que la sintetizan de manera endógena son los antioxidantes lipofílicos como la vitamina E, carotenoides y otros, también es obtenida de la dieta, se encuentra principalmente en carnes rojas y pescado, el tejido más rico en esta coenzima es el corazón de ternera, cuyo contenido es de 50 mg/kg (Molineux y cols. 2007). Entre sus funciones están la de proteger a la mitocondria del daño por los radicales libres, juega un papel en la transición de permeabilidad en el interior de la membrana mitocondrial y es capaz de prevenir la muerte celular programada o apoptosis.

Fuentes exógenas de antioxidantes

Dentro del sistema no enzimático o exógeno, las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes que incluyen las vitaminas E, C, compuestos de tipo carotenoides (β -caroteno, licopeno) y flavonoides como los más representativos e importantes, estos últimos son de especial interés debido a que son extraídos de alimentos (Valls y cols. 2003), y por el papel protector que juegan frente al daño tisular causado por especies reactivas de oxígeno.

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C (Fig. 5) es el mayor antioxidante esencial soluble en agua, se obtiene principalmente de frutas cítricas y se encuentra en altas concentraciones en el plasma humano. Asimismo, puede funcionar como un antioxidante e inhibir al radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxígeno singulete (O_2) e hidroxilo ($\bullet OH$). Neutraliza al ácido hipocloroso y previene la peroxidación lipídica, sin embargo, no puede neutralizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero puede potenciar su toxicidad por inhibición de la actividad de la catalasa (Bulger y cols. 1998, Elsayed y cols. 2001).

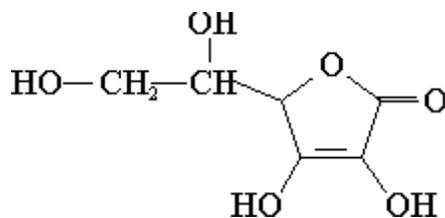


Figura 5. Estructura química del ácido ascórbico

γ -tocoferol

El término vitamina E, incluye diversos tocoferoles y tocotrienoles que presentan actividad biológica similar, el α -tocoferol es la forma biológica activa de esta vitamina liposoluble, se

considera el principal antioxidante en las membranas celulares y en las LDL (lipoproteínas de baja densidad). En su estructura química (Fig. 6), existe un grupo OH unido a una porción hidrofóbica del α -tocoferol cuyo hidrógeno puede removerse y funcionar como donador de electrones. Los radicales peroxilos generados durante la peroxidación lipídica extraen el OH de la molécula de tocoferol generando un radical poco reactivo, lo que detiene la reacción en cadena. Al hallarse como radical, migra hacia la superficie y se regenera en α -tocoferol por una reacción con el ácido ascórbico (Bulger y cols. 1998, Olguin y cols. 2004).

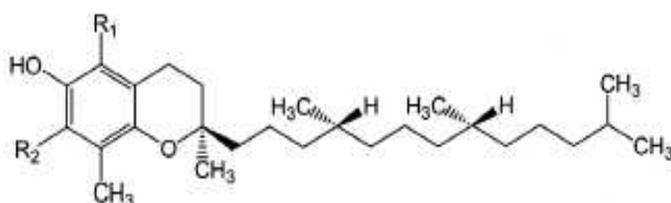


Figura 6. Estructura química de α -tocoferol

Carotenoides

El término carotenoide, se utiliza para designar moléculas de 40 átomos de carbono y un extenso sistema de dobles enlaces conjugados (Fig. 7) (Handelman y cols. 1995). Son pigmentos naturales, responsables de colores amarillos, rojos y naranjas (β -carotenos, α -carotenos, licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina), se encuentran en plantas, frutos y flores, algunos pájaros, insectos, pescados y crustáceos (Liu y cols. 2008). De todos ellos, el carotenoide prototipo es el β -caroteno, por considerarse el mejor compuesto provitamina A (Álvarez-Sala y cols. 1996).

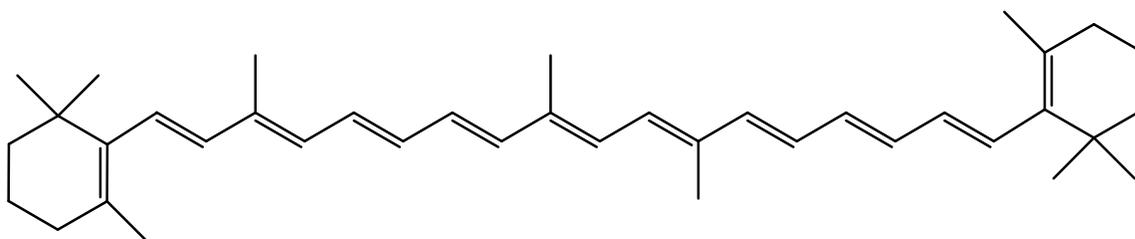


Figura 7. Estructura química de un carotenoide

Evidencia reciente ha demostrado que los carotenoides pueden ser antioxidantes efectivos para inhibir el desarrollo de enfermedades coronarias. Los principales carotenoides en el plasma humano son α - y β -caroteno, licopeno, criptoxantina y luteína, por estar asociados con lipoproteínas (de baja densidad un 75% y cerca del 25% en lipoproteínas de alta densidad).

Asimismo, del total de carotenoides presentes en el cuerpo humano, los principales órganos dónde se encuentran almacenados incluyen hígado y tejido adiposo. Además, las concentraciones séricas de éstos varían entre individuos, así como la ingesta dietética diaria, que involucra factores como: género, regiones geográficas, edad y consumo de alcohol (Palace y cols. 1999). En la actualidad se conocen más de 600 carotenoides, de éstos, el β -caroteno es el mejor estudiado (Olguín y cols. 2004).

S-Caroteno

Este pigmento, se considera uno de los compuestos más importantes dentro del grupo de los carotenoides, debido a que, al igual que el licopeno se ha encontrado en diversos alimentos de coloración amarilla y naranja. Es un importante precursor de la vitamina A y protege a los lípidos de la oxidación por los radicales libres (Giuntini y cols. 2005). Además, se ha reportado que tanto este como otros carotenoides tienen la habilidad para inhibir el crecimiento de células tumorales en estudios realizados *in vivo* e *in vitro*. El β -caroteno (Fig. 8) fue capaz de inhibir la incidencia y progresión tumoral en modelos animales y disminuir el crecimiento de células tumorales en colon, melanoma, próstata, boca y células cancerígenas de pecho. Lo anterior se debe a sus propiedades antioxidantes capaces de quelar radicales libres como el oxígeno singulete (O_2) (Elsayed y cols. 2001, Palozza y cols. 2001).

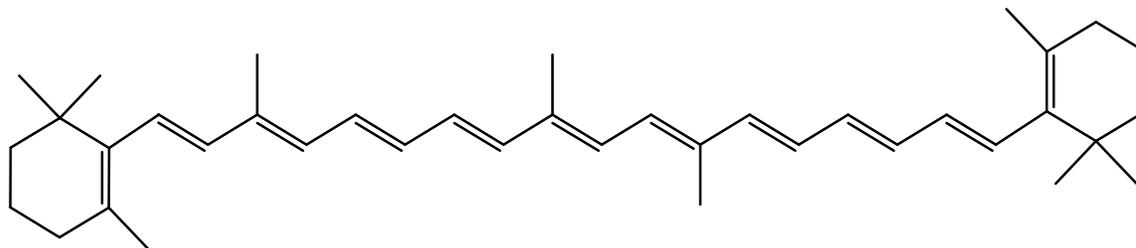


Figura 8. Estructura química del β -caroteno

Licopeno

El licopeno es un carotenoide lipofílico que se caracteriza por carecer de anillos cíclicos y poseer un gran número de dobles enlaces conjugados (Fig. 9). Se encuentra en el tomate y productos derivados de la dieta occidental, así como otras frutas de color rojo. Sus características químicas le confieren un alto poder antioxidante y ha demostrado ser el carotenoide con mayor capacidad para neutralizar radicales de oxígeno singulete (O_2^{\cdot}). La absorción intestinal de este compuesto incrementa cuando los alimentos que lo contienen se calientan antes de la ingestión o al acompañarlos con una comida grasa (Mendivil y cols. 2002).



Figura 9. Estructura química del licopeno

Polifenoles

Este grupo de compuestos comprenden un amplio rango de sustancias con uno o más anillos aromáticos (Fig. 10) y por lo menos un grupo hidroxilo e incluyen: flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas, xantonas, ácidos fenólicos y fenoles simples, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, ligninas, etc. Se han reportado trabajos que atribuyen su acción antioxidante a la inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa (Decker y cols. 1995). Además de su habilidad para reducir la producción de radicales libres, ya sea por inhibición de enzimas oxidantes o por quelación con los metales de transición responsables de la generación de radicales libres.

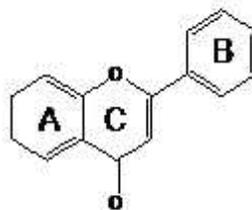


Figura 10. Estructura química de un polifenol

Flavonoides

Los flavonoides involucran una amplia familia de compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas, son componentes de la dieta humana (Lebeau y cols. 2000) y presentan una estructura química común de difenilpropanos (C6-C3-C6) que comprende dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos (Fig. 11) (Ross y cols. 2002).

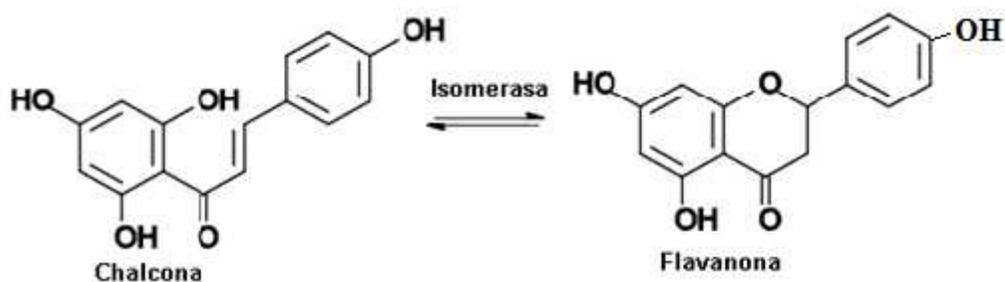


Figura 11. Estructura básica de flavonoides

De acuerdo a Halliwell y Gutteridge (Kim y cols. 2002), los flavonoides incluyen los siguientes mecanismos de acción antioxidante:

1. Supresión de la formación de ROS, ya sea por inhibición de enzimas o por quelatación de elementos traza envueltos en la producción de radicales libres.
2. Barredores de ROS.
3. Protección del sistema de defensa antioxidante.

Asimismo, diversos estudios epidemiológicos han mostrado una correlación directa entre el alto contenido de flavonoides en la dieta y un bajo riesgo de cáncer y enfermedad coronaria, por ello, es posible inquirir acerca de un papel *in vivo* de los flavonoides como antioxidantes, al presentar actividad de este tipo, y prevenir enfermedades relacionadas con los radicales libres (Lotito y cols. 1998, Passamonti y cols. 2005).

Isoflavonas

Estos compuestos polifenólicos incluyen a la genisteína y a daidzeína, presente en frijol de soya y legumbres (Ross y cols. 2002).

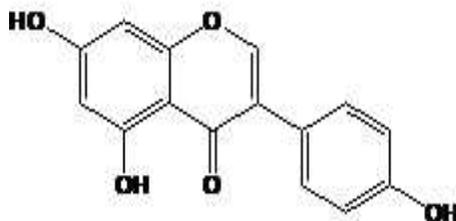


Figura 12. Estructura química de isoflavonas

Flavanonas

Dentro de este grupo de compuestos polifenólicos se encuentran la naringenina y hesperidina que se encuentran en alimentos cítricos y ciruela (Ross y cols. 2002).

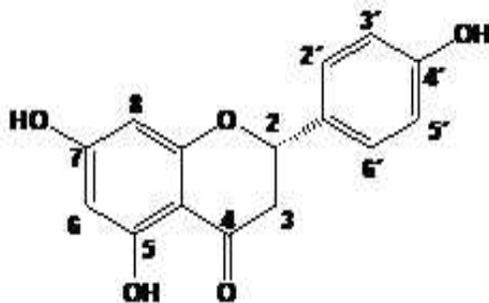


Figura 13. Estructura química de flavononas

Flavanoles (catequinas)

Las catequinas se consideran unos flavonoides importantes, debido a su alta capacidad antioxidante y a su abundancia en la dieta humana. El té negro y blanco contienen cantidades considerables de catequinas, que contiene poderosos antioxidantes donadores de hidrógeno e inhibidores de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, demostrado en numerosos sistemas *in vitro*. Asimismo, inhiben la peroxidación de lípidos inducida por

ascorbato de hierro en homogenizados de membranas mitocondriales en cerebro y sinaptosomas cerebrales (Lotito y cols. 1998, Mandel y cols. 2004).

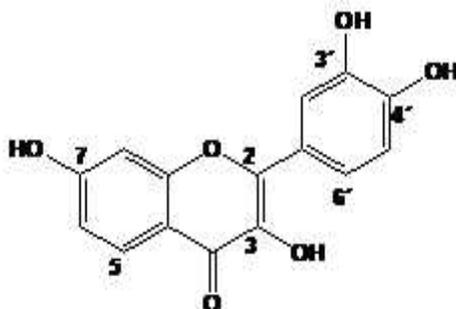


Figura 14. Estructura química de flavanoles

Antocianinas

Las antocianinas, son pigmentos naturales que pertenecen a la familia de los flavonoides, responsables de los colores rojo, azul y morado de muchas frutas y flores. Presentan inestabilidad y solubilidad en agua, lo que facilita su incorporación en alimentos acuosos (Longo y cols. 2005, Passamonti y cols. 2005). Están particularmente asociadas con frutas pero también se encuentran en vegetales, raíces, tubérculos, legumbres y cereales. En determinadas partes del mundo se consumen hojas con un contenido considerable de antocianinas (Soriano y cols. 2006)

Estos pigmentos presentan colores intensos con un pH bajo, por consiguiente, los productos alimenticios con pH cuyos valores son arriba de tres, contienen antocianinas, inmersas en un amplio rango de actividades biológicas antioxidantes, antiinflamatorias, anticarcinogénicas y neuroprotectoras. Asimismo, debido a su enorme rango de efectos benéficos sobre el organismo como actividades vasoprotectoras, efectos sobre la vasomoción e inhibición de la agregación plaquetaria, son capaces de reducir los riesgos de enfermedad coronaria (Talavera y cols. 2004, Stintzing y cols. 2005).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas pertenecientes a la familia de los flavonoides, formados por dos anillos aromáticos A, B y unidos por una cadena de 3C (Fig. 15). Las variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas.

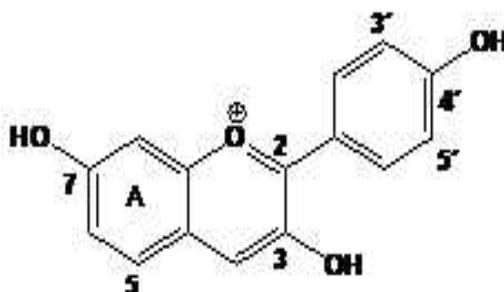


Figura 15. Estructura general de antocianinas

Tabla 1. Tipo de antocianinas

Aglicona	Sustitución		λ_{\max} (nm)
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidróxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen tonalidades azules, mientras que mayores metoxilaciones producen coloraciones rojas. La estabilidad del color se debe fundamentalmente a los cambios de pH (producto de la fermentación), que inducen transformaciones estructurales en estos colorantes.

En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a 2, el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 que da lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemiacetal y la forma chalcona (ambas incoloras e inestables). A valores de pH superiores a 7 presentan las formas quinodiales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire.

Todas las antocianinas son solubles en agua y pueden precipitarse de una solución acuosa-alcohólica con sales de plomo, con las que producen un precipitado de color azul intenso, que es soluble en ácido acético glacial y origina soluciones de color rojo oscuro. Como método general de extracción, se emplea ácido clorhídrico 1-2% en metanol y se precipitan de esta solución con el triple de volumen de éter.

Las antocianinas y antocianidinas, han mostrado una actividad antioxidante más alta que las vitaminas C y E. Han demostrado ser viables para capturar radicales libres por la donación de átomos de hidrógeno fenólicos, siendo esta la razón de su actividad anticarcinogénica. Se ha reportado una correlación significativa entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas en cerezas, fresas, zarzamora roja y blanca. (Castañeda-Ovando y cols. 2009).

Para su aislamiento se usa cromatografía en columna de poliamida que las retiene y permite obtenerlas libres de otras sustancias orgánicas solubles en agua que no son adsorbidas, como azúcares, ácidos orgánicos y otros. También se emplea la cromatografía por HPLC (columnas en fase reversa, con mezclas de agua-metanol o acetonitrilo-metanol) y los componentes se detectan a 250 nm. Este método que no precisa de tratamiento previo de la muestra, se usa preferentemente en su variante analítica.

Antioxidantes presentes en alimentos

Existen estudios acerca del tipo de antioxidantes naturales presentes en diversos alimentos (tabla 2) que incluyen compuestos de tipo α -tocoferol, ácido ascórbico, flavonoides y carotenoides. En el 2000, Wang y cols., evaluaron la capacidad antioxidante en diferentes genotipos y estados de desarrollo de las frutas y hojas de plantas de zarzamora, fresas y frambuesa. Los resultados mostraron una influencia significativa de las especies, cultivos y grados de madurez sobre la capacidad antioxidante, antocianina total y contenido de fenolicos totales (Wang y cols. 2000).

Tabla 2. Antioxidantes encontrados en algunos alimentos

Alimentos	Fitoquímicos y carotenoides	Vitaminas y otros compuestos
Manzanas	Flavonoides	
Bayas, todas las de coloración oscura	Ácido eleágico	Vitamina C, minerales
Zanahorias y otros vegetales de color amarillo intenso	Luteína, β -caroteno y otros carotenoide provitamina A	Vitamina A (convertida a carotenoides) y vitamina C
Chocolate negro	Flavonoides	
Uvas, incluyendo jugo de uva morada y vino tinto	Flavonoides (catequina y quercentina)	
Naranjas	Monoterpenos	Vitamina C, folato, potasio
Soya. Los mejores productos son el tofu, leche de soya, o proteína entera de soya	Isoflavonas (fitoestrógenos), flavonoides, fitosterol, fitato, saponinas.	
Tomates	Licopeno, flavonoides	Vitamina C, biotina y minerales

Antioxidantes en plantas

La síntesis de este tipo de compuestos se activa como parte del mecanismo de las plantas que deriva del metabolismo primario. Se denominan metabolitos secundarios e incluyen una amplia variedad de compuestos fenólicos simples y complejos derivados de la vía primaria de la ruta del fenilpropanoide (López-Gómez y cols. 2008, Myung-Min y cols. 2009). Dentro de los principales grupos de metabolitos secundarios se encuentran los terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides (Long y cols. 2006). Proviene de una cadena de reducciones y

oxidaciones del metabolismo primario de la célula e incluyen diversas estructuras debido a reacciones químicas de hidroxilación, metilación, glucosilación, malonilación, epoxidación y esterificación.

Dentro de sus funciones se encuentran la protección contra herbívoros (artrópodos y vertebrados), atracción de polinizadores, ataque contra microorganismos (virus, bacterias, hongos), competencia (por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas), actividad antimicrobiana y dispersión de semillas (Errea y cols. 1998, Ryan y cols. 2002, López-Gómez y cols. 2008).

En la célula, presentan sitios específicos de almacenamiento (Fig. 16) acorde al tipo de compuestos que se trate, así los compuestos antipatógenos se alojan en el exterior de los tejidos y órganos, o en el interior de las vacuolas. (Vivanco y cols. 2005). Asimismo, los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, mientras que los solubles en lípidos son secuestrados a distintas estructuras especializadas como los ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink y cols. 1999).

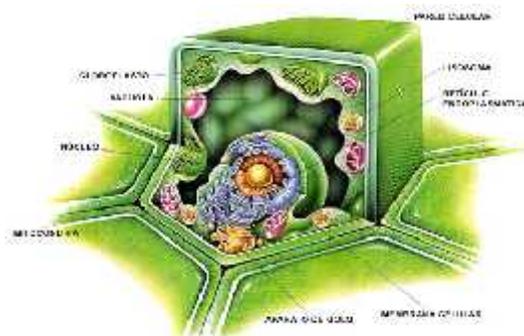


Figura 16. Sitio de almacenamiento de compuestos en la célula vegetal

Desde el punto de vista antropocéntrico, estos metabolitos se han utilizado como saborizantes, esencias, colorantes y como fármacos tradicionales. También se les ha atribuido un significativo poder antioxidante, efectivo para la protección contra radicales libres (Errea y cols. 1998, Ryan y cols. 2002, Verpoorte y cols. 2002).

1. 3. Métodos para la extracción de metabolitos en alimentos

Los frutos y plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos tales como lípidos, grasas, fotoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, farmacéutica y cosmética. Para separar los compuestos (solutos) de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto y el (los) soluto (s) se difunde (n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original.

Este proceso se conoce como lixiviación y para realizarlo existen varios métodos de extracción en los que se emplean grandes cantidades de disolventes orgánicos y se basan en la selección del mismo, que está asociado con el uso del calor y/o agitación. De un tiempo a esta parte se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos de matrices sólidas. De todas, el método llamado Soxhlet, se emplea como una técnica estándar y es la principal referencia para evaluar el rendimiento de otros métodos de extracción sólido-líquido como la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente y la extracción con fluidos supercríticos, con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto.

Métodos tradicionales

- a) Extracción por solventes: Se basan en la selección de solventes, temperatura o agitación con la finalidad de incrementar la solubilidad de materiales y la tasa de transferencia de masa. Se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos miscibles, usualmente agua y un solvente orgánico. En la industria, este proceso se realiza continuamente bombeando una corriente orgánica y otra acuosa dentro de una mezcladora, donde se mezclan ambos componentes y se permite el intercambio iónico hasta que se logra el equilibrio. La introducción de un transductor ultrasónico dentro de la unidad de extracción, puede incrementar la eficiencia del método, debido a que por lo general se emplean solventes fríos.
- b) Soxhlet: La técnica de extracción por Soxhlet fue inventada en 1879 por Franz von Soxhlet para la determinación de grasa en leche. Posteriormente se generalizó para la

extracción en química agrícola, antes de convertirse en la herramienta más utilizada para la extracción sólido-líquido en muchos campos como el medio ambiente, productos alimenticios y también farmacéuticos. Hoy en día todavía es común en laboratorios y ha sido el método estándar y de referencia para la extracción sólido-líquido en muchos casos (Virost y cols. 2007).

El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz. Funciona cíclicamente, cuando se evapora el solvente sube hasta el área donde es condensado, es aquí donde al caer y regresar a la cámara de solvente, va separando los compuestos hasta que llega a una concentración deseada.

Métodos no tradicionales

De acuerdo a Gao & Liu (2005), los métodos de extracción modernos se basan en la mejora de la eficiencia de los métodos tradicionales por acción física sobre el medio, como los siguientes:

- a) Extracción asistida por microondas: La extracción asistida por microondas ha sido ampliamente usada como una técnica de preparación de muestras en diferentes campos de análisis, tales como el medio ambiente, la alimentación y agricultura (Wang y cols. 2008). En este tipo de extracción, la energía del microondas penetra en los materiales y produce una fuente de calor distribuida volumétricamente. Además, la presión y temperatura muy localizada pueden causar la migración selectiva de los compuestos del material para la extracción con solventes a un ritmo y recuperación más rápida. Numerosos compuestos biológicamente activos de una amplia variedad de muestras se han extraído con la aplicación de extracción por microondas (Zhou y cols. 2006).
- b) Extracción por fluidos supercríticos: un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan principalmente dióxido de carbono y agua. Se puede realizar una

extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando varias presiones de fluido supercrítico.

- c) Extracción turbo: utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de la extracción, ya que se aumenta el contacto con el material y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa.
- d) Extracción eléctrica. Aplica descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25%, al formarse burbujas de cavitación.
- e) Extracción asistida por ultrasonido. Utiliza sonidos de baja frecuencia y mayor potencia (18-100 kHz), con la finalidad de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Mulet y cols. 2003). El proceso de sonicación reduce el tamaño de las partículas presentes en el material vegetal, lo cual incrementa el área de exposición al solvente y a la cavitación producida. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, que a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Yan y cols. 2010).

1. 4. Métodos de evaluación antioxidante

En numerosas investigaciones, se han empleado técnicas (*in vitro* e *in vivo*) con la finalidad de evaluar la capacidad antioxidante total o actividad antioxidante total de diferentes compuestos, mezclas o alimentos. La anterior, implica la medición analítica de la captación, neutralización y quelación de radicales libres de diferente naturaleza en un sistema oxidativo controlado e involucra los siguientes compuestos (solo por mencionar algunos):

- AAPH generador de radicales libres 2,2 azo-bis-(amidino-propano) dihidrocloruro
- ABTS^{•+} catión radical 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
- DMPD[•] radical N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina
- DPPH[•] radical (2,2-difenil 1-picrilhidrazil) (Vit y cols. 2008).

Estas técnicas han sido utilizadas para evaluar distintos metabolitos secundarios, presentes en estructuras celulares de frutos que poseen diferentes propiedades antioxidantes dependiendo de su contenido de moléculas de este tipo. A su vez este carácter es afectado por el tipo de fruta (especies y variedad dentro de las especies) y las manipulaciones (por medio de métodos tradicionales, tecnología avanzada o manipulación genética) que se realicen en el mismo (Chang y cols. 2000, Scalzo y cols. 2005).

Métodos colorimétricos de evaluación antioxidante

DPPH (2,2-difenil 1-picrilhidrazil)

El DPPH es un radical libre sintético (Fig. 17) que se ha empleado para determinar la habilidad de los antioxidantes para reducirlo por atrapamiento (Min-Sheng y cols. 2008). Absorbe a 517 nm, cuando sufre la reducción por un antioxidante, este disminuye la coloración y esto proporciona un índice para estimar la capacidad del extracto para atrapar radicales libres donde actúa como donador de protones radical (Álvarez y cols. 2008, Bolling y cols. 2009).

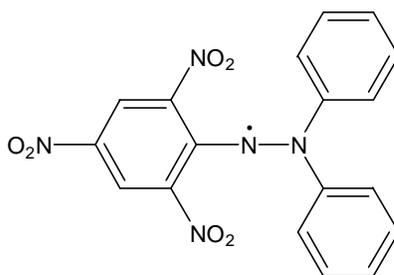


Figura 17. Estructura química del DPPH

ABTS⁺ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico))

El método ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante, de compuestos puros o extractos de plantas así como de alimentos. Involucra un compuesto colorido de naturaleza radical catiónico (radical ABTS^{•+}).

El radical ABTS^{•+} debe ser generado mediante reacciones químicas (persulfato de potasio, dióxido de manganeso, persulfato de sodio ...) o enzimáticas (peroxidasa, mioglobina ...). Dicho radical tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y orgánicos. El radical ABTS^{•+} es el método más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, por presentar una absorbencia máxima próxima a la región infrarroja (754 nm) y reducir posibles interferencias de compuestos coloridos que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias. Asimismo, el método ABTS^{•+} ha sido validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa económica respecto a otros métodos de evaluación antioxidante (Kuskoski y cols. 2004).

Método de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico)

Para este método se emplea tejido cerebral de rata y se mide la cantidad de malondialdehído (MDA) generado durante la reacción, este último se considera un producto final de la oxidación de los ácidos grasos y se ha utilizado como un biomarcador viable de la peroxidación de lípidos (Gunes y cols. 2006). El principio de este método es la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA), con dos moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico) (Fig. 18) para generar un colorido rosa del complejo MDA-TBA.

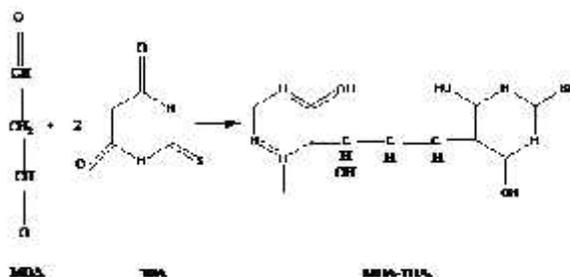


Figura 18. Reacción del complejo MDA-TBA

1. 5. Cuantificación de carotenoides y polifenoles totales

Cuantificación de carotenos totales

Los carotenoides totales, y en especial el β -caroteno, se han obtenido utilizando solventes orgánicos para su extracción, así como y métodos espectrofotométricos y cromatográficos para su cuantificación.

Determinación de fenoles totales (FT)

El método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN - CIOCALTEU 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 fosfotungstáico y fosfomolibdico en medio básico, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}).

Métodos para aislamiento e identificación de compuestos antioxidantes en frutos

El estudio de la composición de frutas, hojas, tallos, raíces y cualquier otro tipo de alimento con propiedades antioxidantes se realizan a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación de sus componentes, entre los que destacan los siguientes:

- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía en columna (obtención de fracciones)
- Cromatografía líquida de alta resolución HPLC (fraccionamiento)
- Cromatografía de gases CG (separación de componentes y su cuantificación)

II. ANTECEDENTES

2.1. Evaluación de actividad antioxidante en frutos (pulpa y epidermis)

La actividad antioxidante de la parte comestible de frutos (pulpa y epidermis) se debe principalmente a la actividad combinada de diversos antioxidantes, incluyendo vitamina C, compuestos fenolicos, entre otros, características que se atribuyen a un antioxidante en particular, del mismo modo, investigaciones acerca de la capacidad antioxidante en frutas pueden considerar las diversas concentraciones y composiciones de diversos antioxidantes. Sin embargo, la distribución y composición de sustancias antioxidantes son afectados por la madurez, cultivo, prácticas de horticultura, origen geográfico, tiempo de crecimiento, duración y condiciones de almacenamiento, postcosecha y procedimientos de procesamiento (Yoo y cols. 2004). Asimismo, la actividad antioxidante total, da una buena medida acerca del valor nutricional de las frutas.

De igual modo, diversos estudios han mostrado que frutas cítricas como limones, limas y naranjas así como manzanas, fresas, cerezas, frambuesas y ciruelas, entre otras, exhiben una actividad antioxidante que se atribuye principalmente a sustancias antioxidantes de tipo fenolicas, vitamina C, carotenoides y otros, pero las variaciones en las cantidades de los principales antioxidantes y la actividad antioxidante total en frutos de tejocote no se ha investigado (Yoo y cols. 2004, Kevers y cols. 2007, Keutgen y Pawelzik 2007).

Drogoudi y Tsipouridis (2007), evaluaron al fruto de durazno *Prunus pérsica* L., para determinar la variabilidad en el contenido antioxidante y características físicas en frutos de nueve cultivos de durazno/genotipos (*Prunus persica* L.) injertados en tres portainjertos. Los resultados fueron que los efectos del portainjerto sobre el contenido antioxidante de frutos no fueron pronunciados. Sin embargo, se encontró un marcado efecto del cultivo sobre el contenido antioxidante en frutos, la actividad antioxidante equivalente al ascorbato (AEAC) y el contenido de fenoles totales varió entre 6.3 y 5.3, respectivamente.

2.2. Comparación de actividad antioxidante por diversos métodos de extracción

Uno de los aspectos que puede influir en la actividad antioxidante de frutos y plantas, es el tipo de extracción empleado, por ello, el ideal debe ser capaz de producir altas cantidades de la sustancia requerida y no debe ser destructiva y eficiente en el tiempo (Qadir y cols. 2009).

Tabla 3. Comparación de diferentes trabajos acerca de la extracción de antioxidantes en fuentes naturales (NR=No reportado, EA=acetato de etilo, MetOH=Metanol, EtOH=Etanol) (Spingo y De Faveri 2007).

Materia prima	Procedimiento de extracción	Rendimiento de polifenoles	Pureza del extracto	Referencias
Orujo de uva roja	50 g de polvo (desgrasado o no), a 28/60°, por 5/24 h, con 200 mL: EtOH EA:agua (9:1)	GAE 0.27 0.15	6.00 9.01	Spingo y De Faveri 2007
Tallo de uva roja	EA:agua (9:1)	0.33	22.34	Spingo y De Faveri 2007
Semillas de uva roja	50 g de polvo desgrasado, 5 h a 60/70°, dos veces con 150 mL EA:agua (9:1), EA:agua (17:3), EA:agua (4:1)	(Catequinas) 0.86 1.35 1.56	43 54.00 50.5	Jayaprakasha y cols. 2009
Semillas de uva roja	100 g de polvo desgrasado, 8 h con 150 mL caliente (T NR) Acetona:agua:ácido acético (90: 9.5:0.5)	(Catequinas) 2.5	46	Jayaprakasha y cols. 2003
Semillas de uva blanca	10 g, 8 h con 40 mL EA:agua (9:1) T NR	(Catequinas) 0.5	47	Peki y cols. 1998

Semillas de uva fresca	100 g de polvo desgrasado/200 mL acetona:agua:ácido acético (90:9.5:0.5), 60 °C, 8 h o EA:MetOH:agua (60:30:10)	(GAE) 9.6 10.8	62.8 66.8	Baydar y cols. 2004
Semillas de uva fresca	240 mg de semilla estrujada/10 mL MetOH:agua (4:1), 16 h, T_{amb} 1h, $T < 30$ °C, con ultrasonicación 30 mg y CO ₂	(Catequinas) 0.066 0.063 0.078		Palma y Taylor 1999
Semillas de uva	100 g de polvo con 100 mL 100% EtOH, 24 h T_{amb}	(Taninos)	0.53	Ahn y cols. 2002
Piel de uva roja fresca	Piel de 100 uvas/60 mL de solvente: MetOH 16h/-25 °C + 80% MetOH 4h/ T_{amb} + 50% MetOH 4 h/ T_{amb} + agua desionizada 16 h/-25 °C + 75% acetona 1h/ T_{amb} MetOH/12 N HCl (99:1) 4h/25 °C + MetOH/12 N HCl (99:1) 12h/25 °C + MetOH/12 N HCl (99:1) 4h/25 °C	(GAE) 0.25 0.24		Revilla y cols. 1998
Uvas frescas	100 uvas/60 mL de solvente (como el anterior)	0.43-0.51		
Orujo de uva roja	250 g (50 g d.m.)/1 L EA:agua (1:1) 5-30', T_{NR}	0.11 (HPLC)	0.011	Bonilla y cols. 1999

Orujo de uva roja	1g/3 mL 80% EtOH con 0.5% 0.1 N HCl,	(GAE) 0.59	0.14		
Orujo de semillas	<i>T</i> y tiempo NR	2.4	0.28		Negro y cols. 2003
Orujo de piel		0.37	0.11		
Orujo de uva	50 g/100 mL de agua o 70% EtOH o 70% MetOH, 1-12-24 h, <i>T</i> _{amb}	(GAE) 0.035-1.36			Lapornik y cols. 2005
Orujo de uva destilado	5 g de liofilizado + NR mL MetOH 75%, 15' en baño ultrasonico (TNR), dos veces.	0.06			
Semillas de uva	Concentrado de liquido, agua destilada y extraída 3 veces con EA 2g de liofilizado para las semillas	0.08-0.14	0.15	Flavan-3-ols	González-Paramás y cols. 2004
Semillas destiladas		0.15-0.18			
Orujo de uva destilada	1 kg lavado y secado/8 kg de solvente en autoclave: Agua, 4%, H ₂ SO ₄ , 130° C, 90' Agua, 100 °C 5h Agua, 130 °C 90' Seguido siempre por extracción EA de licores y liofilizado	(GAE) 0.20	12.5		
		0.10	13.3		Cruz y cols. 2004
		0.22	18.3		
Lechuga, Productos de escarola	1 kg de extracto fresco por reflujo con MetOH o agua hirviendo (3 L) 1h. Liofilizado. Purificación con resina de Amberlita y liofilizado	Fenoles totales 0.16 (fw) 0.015	5.02		Llorach y cols. 2004
			15.20		

Grosellas negras	60% EtOH, 60 h, 20 °C	3.679-3.956	(HPLC)	Cacace y Mazza 2003
	80% EtOH, 8 min, 20 °C	3.55-3.802		
Cerezas (diferentes partes)	10 g de polvo/20 mL de acetona, ultrasonido 10', 10 mL acetona:agua (7:3) dos veces, 80 mL de cloroformo, T NR, 15 g de polvo/900 mL de acetona, 6 h en aparato Soxhlet	(GAE)	(GAE) 0.05-05 1.86 4.77	Chaovanalikit & Wrolstad 2004, Bandoniené y cols. 2004
Semillas de hinojo	25 g/500 mL de agua hirviendo 15', 25g/100 mL EtOH 5 veces	2.12 (GAE)	13.09	Oktay y cols. 2003
		9.0	82.19	
Escaramujos	100 mg de polvo liofilizado/2 mL EtOH 50%, 4 °C, 24 h	(GAE)	6-12	Gao y cols. 2000
Frutos de uva	50 mg de liofilizado/5 mL	(fw)	0.13-0.17	Gorinstein y cols. 2004
Pulpa	80% MetOH/agua, 90 °C, 3h	0.15-0-0.26		
Piel	5 mL 1.2 M HCl en 80% MetOH/agua, 90 °C, 3h			
Hierbas aromáticas	6-10 g molido/50 mL (dos veces) MetOH 99.5%, 2 h, T NR	(GAE)	0.4-3.8	Miliauskas y cols. 2004
Alubias rojas	100 g de polvo/500 mL 50% EtOH, 75 °C x 3 h	(GAE)	1.6	Chou, Chao & Chung 2004

	Filtración y liofilizado			
Hojas de boldo	20 g de polvo desgrasado /MetOH (en Soxhlet), secado, extraído con agua/60 °C/48 h, fase acuosa extraída con CHCl ₃ y EA	(Flavonoides) 1.4		Quezada y cols. 2004
Bayas negras	20 g de bayas congeladas/20 mL de MetOH:HCl 2% (95:5 v/v), 60 min (dos veces)	0.14-0.88	(GAE/peso fresco)	Benvenuti y cols. 2004
Zarzamora	25 g de muestra pulverizada en nitrógeno líquido/25 mL Acetona:agua (7:3) + acetona:	0.82-0.84	(GAE)	Siriwoharn y Wrolstad 2004
Entero	cloroformo (1:2)	0.80-0.96		
Solo pulpa		1.46-1.75		
Solo semillas				

2.3. Evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH

En 2008, Drogoudi y cols. evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en manzanas (Familia: *Rosaceae*) (piel y pulpa) de los cultivos Fuji, Golden delicious, Granny Smith, Jonagored, Mutsu, Starkrimson y Fyriki. Reportaron que para tejido de piel, la actividad antioxidante más alta ($35.7 \pm 0.9 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ media \pm S.E.) y el contenido de fenolicos totales ($19.9 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) se encontró en Starkinson, seguido por Jonagored, Mutsu, Fyriky y Fuji (valores de media $19.9 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ y $12.9 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, respectivamente) mientras que los valores menores se encontraron en Golden Delicious y Granny Smith (3.7 ± 0.1 y $3.5 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, respectivamente).

Turkem y cols. 2006, evaluaron el efecto del uso de agua y diferentes solventes orgánicos como acetona, N,N dimetilformamida (DMF), etanol o metanol a tres concentraciones diferentes (50%, 80% y 100%) sobre el contenido de fenoles totales en té negro (*Camellia sinensis* L.) y té negro de mate (*Ilex paraguariensis*), por el método de Folin y Ciocalteu. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Efecto de diferentes solventes sobre la actividad antioxidante en extractos de te

Solventes	Té negro Actividad antioxidante (%)	Té de mate Actividad antioxidante (%)
Agua	29.1 ± 0.68	61.2 ± 0.89
Acetona		
50%	83.1 ± 0.22	93.7 ± 0.18
80%	80.4 ± 0.97	94.2 ± 0.30
100%	1.2 ± 0.16	Nd
DMF		
50%	82.5 ± 0.94	91.1 ± 0.42
80%	78.8 ± 0.78	92.4 ± 0.66
100%	39.0 ± 0.44	51.7 ± 0.94
Etanol		
50%	68.7 ± 1.93	94.3 ± 0.53
80%	49.6 ± 1.04	78.7 ± 1.13
100%	Nd	4.7 ± 0.75

Metanol		
50%	53.8 ± 1.21	89.6 ± 0.17
80%	47.1 ± 0.65	82.0 ± 1.20
100%	11.0 ± 0.50	40.0 ± 1.73

2.4. Evaluación de actividad antioxidante por el método ABTS

García-Alonso y cols. 2004, evaluaron la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), un análogo de la vitamina E soluble en agua, a través del catión radical ABTS, en extractos de un total de 28 diferentes frutas. Los resultados y valores de TEAC fueron positivos, la muestra con la menor actividad antioxidante fue el aguacate (1 μmol/g), seguidos por higo verde y pera (c.v. blanquilla), que tuvieron valores de 4 y 3 μmol/g, respectivamente. Las muestras con una gran capacidad antioxidante en esta evaluación fueron caqui (406 μmol/g), zarzamora (192 μmol/g), arándano (187 μmol/g), y frutos de árboles de fresas (163 μmol/g).

En 2006, Spigno y cols. investigaron la cinética de extracción (de 1 a 24 h) a 45 y 60 °C, y el efecto del solvente (etanol con diferentes contenidos de agua) sobre la calidad y rendimiento del extracto (poder antioxidante). El poder antioxidante (prueba de ABTS) estuvo fuertemente correlacionado con la concentración de fenoles totales, y estuvo influenciado por el contenido de agua en etanol, se sugiere que esta variable influye solo en la cantidad pero no en la naturaleza de los compuestos extraídos.

Rop y cols. 2009, evaluaron la actividad antioxidante en 12 cultivos de frutos selectos de ciruela (*Prunus domestica* L.), esta actividad se evaluó a través del método ABTS y los resultados se reportaron como equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/g de muestra. Se reporto que la variabilidad de la actividad antioxidante entre los 12 cultivos evaluados fue alta (2.58 a 6.04 mg de AAE g⁻¹). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Actividad antioxidante en extractos de frutas de diferentes cultivos de *Prunus domestica*

Actividad antioxidante total	
Cultivo	(mg AAE g ⁻¹ FM)
1. Bluma	3.24 ± 0.25
2. Durancie	4.68 ± 0.21
3. Kulovacka	4.01 ± 0.19
4. Augustinka	3.51 ± 0.24
5. Brysca	3.42 ± 0.14
6. Kirkeha	3.19 ± 0.17
7. Pavlůvka	5.85 ± 0.20
8. Svestka domaci	6.04 ± 0.21
9. Wangenheimova	3.59 ± 0.19
10. Hamanova svestka	2.85 ± 0.14
11. Stanley	3.07 ± 0.17
12. Vlaska	2.58 ± 0.18

Hayouni y cols. 2007 evaluaron la actividad antioxidante en extractos de los frutos *Quercus coccifera* L. y *Juniperus phoenicea* L., mediante el método ABTS por dos sistemas de extracción. En el primer método (método #1), los polvos (100 g) fueron extraídos en un extractor Soxhlet con hexano por 6 h a 65 °C para remover los materiales grasos. En el segundo método de extracción (#2), la maceración del polvo crudo fue llevada a cabo en un solo paso. Se usaron solventes orgánicos individualmente, como acetona y cloroformo, o en mezclas: acetona/agua/ácido acético (90/9.5/0.5) y acetato de etilo/metanol/agua (60/30/10). Los resultados de la prueba ABTS (expresados como mg equivalentes de vitamina C/g de peso seco) mostraron que los solventes con diferentes polaridades tienen efectos significativos sobre la capacidad antioxidante, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6. Efecto de diferentes solventes sobre la capacidad antioxidante en extractos de los frutos *J. phoenicea* L. y *Q. coccifera* L., obtenidos por ambos métodos de extracción.

	<i>Juniperus phoenicea</i>		<i>Quercus coccifera</i>	
	Método#1	Método #2	Método #1	Método #2
Agua	14.4 ± 0.44	15.2 ± 1.01	10.8 ± 0.67	8.34 ± 1.21
Cloroformo	6.01 ± 1.34	3.03 ± 0.21	4.21 ± 0.29	2.22 ± 0.22
Acetona	16.4 ± 0.15	14.1 ± 0.4	13.2 ± 0.81	11.2 ± 0.81
Mezcla 1	28.2 ± 0.32	26.7 ± 0.94	22.2 ± 0.57	18.2 ± 1.01
Mezcla 2	9.9 ± 0.55	7.24 ± 0.94	7.13 ± 0.79	6.41 ± 0.15

2.5. Cuantificación de carotenos totales en frutos

En el 2010, Verna y cols. evaluaron la cantidad de carotenos totales en frutas verdes de *Ficus glomerata* (Familia: *Moraceae*), por ser frutos ricos en antioxidantes y un adecuado contenido nutricional. En el estudio, los frutos de *F. glomerata* mostraron un contenido de 32.7 mg/100 g de carotenoides.

2.6. Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

En 2007, Kevers y cols. evaluaron la cantidad de Fenoles totales (expresados como equivalentes de ácido clorogénico (CAE)/100 g de muestra) por el método Folin y Ciocalteu en diversas frutas y vegetales selectos, respecto a la cantidad de fenoles totales en frutas frescas, la uva negra fue la que tuvo el contenido fenolico mas alto (582 mg de CAE por 100 g), seguido por bananas, uva verde, limón, fresa y ciruela, mientras que el melón, pera y nectarina tuvieron el menor contenido de fenolicos.

Respecto a los vegetales, las papas roja y amarilla fueron los vegetales con el contenido de fenolicos mas alto (296 y 284 mg de CAE/100 g respectivamente), seguidas por papas verdes,

espinacas y brócoli. El contenido fenólico de los otros vegetales evaluados fue menor, especialmente en pepino y zanahorias.

Jayaprakasha y Patil (2007), evaluaron el contenido de fenoles totales en frutos de dos diferentes especies de cítricos: cidra (*Citrus medica*) y naranja (*C. sinensis*). Las fracciones de antioxidantes fueron extraídas de frutos maduros, usando cinco diferentes solventes con extractor Soxhlet. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento y contenido fenólico presente en frutos cítricos

Variedades	Solventes usados para la extracción	Rendimiento (g/100 g de fruto)	Fenolicos como equivalentes de catequinas (mg/g de extracto)
Cidra	Hexano	1.50	0.00
	EtOAc	20.01	12.77
	Acetona	1.30	29.64
	Metanol	40.60	39.28
	MeOH:agua (80:20)	7.31	71.81
Naranja roja	Hexano	0.83	0.00
	EtOAc	7.19	29.6
	Acetona	2.76	48.8
	Metanol	68.01	8.0
	MeOH:agua (80:20)	20.01	2.0

En el 2007 Çelik y cols. evaluaron el contenido de fenolicos totales en frutos de arándano agrio, *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Familia:Ericaceae) en diferentes estados de madurez (verde brillante, enrojecido, rojo brillannte y rojo oscuro). Los resultados fueron que durante la maduración de verde a estado rojo obscuro, el contenido de fenólicos totales disminuyó de 7990 a 4745 mg GAE/kg de peso fresco, asimismo, el contenido de fenolicos totales de baya roja madura fue de 5200 mg GAE/kg de peso fresco. Con lo anterior, demostraron

claramente que algunas de las propiedades químicas y capacidades antioxidantes son afectadas por los estados de maduración del fruto.

Turkem y cols. (2006), evaluaron el efecto del uso de agua y diferentes solventes orgánicos como acetona, N, N dimetilformamida (DMF), etanol o metanol a tres concentraciones diferentes (50%, 80% y 100%) sobre el contenido de fenoles totales en té negro (*Camellia sinensis* L.) y té negro de mate (*Ilex paraguariensis*), por el método de Folin y Ciocalteu. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. Efecto de diferentes solventes sobre el contenido de polifenoles en extractos de te

Solventes	Té negro Contenido de polifenoles mg/g	Té de mate Contenido de polifenoles mg/g
Agua	30.5 ± 0.62	64.2 ± 1.36
Acetona		
50%	92.4 ± 0.83	120.4 ± 1.49
80%	87.2 ± 1.21	113.4 ± 1.00
100%	1.8 ± 0.09	2.6 ± 0.44
DMF		
50%	99.8 ± 1.24	108.8 ± 2.28
80%	96.8 ± 1.02	113.4 ± 1.09
100%	35.6 ± 0.34	54.4 ± 0.42
Etanol		
50%	74.0 ± 0.94	106.1 ± 3.24
80%	53.7 ± 0.91	83.5 ± 2.66
100%	2.1 ± 0.01	4.8 ± 0.06
Metanol		
50%	62.6 ± 0.62	96.6 ± 2.63
80%	56.0 ± 1.70	85.6 ± 1.60
100%	13.5 ± 0.72	35.5 ± 0.36

III. JUSTIFICACIÓN

Los extractos de frutos u otras fuentes naturales constituyen una mezcla de compuestos con diversa actividad biológica y tienen la función de ayudar a la sobrevivencia del sistema biológico. Estas propiedades de los metabolitos se han aprovechado para resolver diversos problemas en beneficio del ser humano. Pero es necesario evaluar la capacidad fitoquímica de estos frutos utilizando técnicas analíticas bien establecidas. Es conocido que los frutos bajo condiciones climáticas extremas desarrollan mecanismos de defensa y supervivencia incrementando la concentración de metabolitos con actividad biológica. Por ello se han desarrollado técnicas de extracción específicas y su posterior caracterización.

Además, los extractos provenientes de frutos y vegetales, poseen una enorme variedad de compuestos químicos que actúan como agentes antioxidantes, inhibiendo la formación y el daño producido por los radicales libres, que no solo son la causa principal de rancidez y pérdida de valor nutricional de los alimentos, sino que también se asocian con enfermedades crónicas como cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares cuyo factor común es el proceso de envejecimiento.

Por lo tanto, resulta importante investigar frutos oriundos de México, debido a la enorme riqueza con que se cuenta y el elevado potencial nutritivo de estos. El tejocote, además de contar con las características antes descritas, no ha sido estudiado en cuanto a su capacidad antioxidante y se considera un fruto cuya producción nacional es importante, siendo Huejotzingo uno de los principales productores del mismo.

También resulta trascendental estudiar a los frutos en relación al tipo de cultivo (criollo y/o de injerto) empleado, debido a que pueden estar sujetos a modificaciones como composición química, tamaño, coloración, contenido de nutrientes y compuestos antioxidantes además de las diferencias físicas y químicas. Lo anterior, debido a que durante su desarrollo están sometidos a condiciones de estrés hídrico, condiciones de pH del suelo, hervíborismo, deficiencia de nutrientes y otros que modifican las características del fruto final para consumo humano.

V. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante frente a los radicales libres ABTS y DPPH entre los frutos de tejocote *Crataegus mexicana* criollo y de injerto, es diferente, siendo superior el de injerto, debido a la mayor adaptación del portainjerto al medio ambiente.

VI. OBJETIVOS

General

Comparar la actividad antioxidante entre dos tipos de cultivo (criollo y de injerto) del fruto de tejocote *Crataegus mexicana*.

Específicos

- Utilizar tres métodos de extracción para la obtención de metabolitos con actividad antioxidante.
- Emplear los radicales sintéticos DPPH y ABTS para evaluación de la actividad antioxidante.
- Cuantificar polifenoles y carotenoides totales en ambos frutos.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Ubicación de zonas de colecta

La colecta de frutos se realizó durante el mes de diciembre de 2008 en tres zonas pertenecientes al municipio de Huejotzingo.

Tabla 9. Zonas de colecta de los frutos de estudio

Árbol	Fruto	Población
R. Sexual	Criollo	Domingo Arenas
R. Asexual	Injerto	Domingo Arenas
R. Sexual	Criollo	Huejotzingo
R. Asexual	Injerto	Huejotzingo
R. Sexual	Criollo	Sta. Ma. Atexcac
R. Asexual	Injerto	Sta. Ma. Atexcac

Los frutos colectados en la zona 1 se encontraban en un terreno donde se siembra maíz desde hace varios años, no son campos fertilizados y se considera que provee los nutrientes necesarios a las especies cultivadas en la zona. La zona de colecta número 2, a diferencia de la anterior, presenta un crecimiento abundante de maleza, en el se siembra maíz, calabaza y frijón. En la zona 3, solo se siembra maíz y difiere de las dos anteriores en la presencia de diversos árboles frutales.

Una vez ubicadas las zonas de colecta, se procedió a cortar el fruto para transportarlo al laboratorio. Cuando se tuvieron los frutos para estudiarlos, primero se seleccionaron por apariencia física (libres de abolladuras, plagas y coloración intensa como señal de madurez), después se lavaron con agua destilada y por último se deshidrataron durante 24 horas a 40 °C, a fin de evitar su descomposición y poder almacenarlos por más tiempo para disponer de ellos cuando se realice el estudio.

Después del deshidratado de los frutos, se procedió a realizar extracciones sucesivas, utilizando disolventes de polaridad creciente en el siguiente orden: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol.

7.2. Métodos de extracción

- Extracción en frío (48 horas).
- Extracción asistida por ultrasonido (1 hora).
- Extracción Soxhlet (8 horas) (Sousa y cols. 2008).

Extracción en frío

- Deshidratado de frutos (pulpa y epidermis) a 40 °C durante 24 horas.
- Peso de fruto deshidratado (30 g)
- Envasar el fruto en frascos ámbar y agregar los distintos tipos de solventes (300 mL) al mismo fruto.
- Solventes empleados: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol.
- Pasadas 48 horas, se filtra el solvente y se evapora a sequedad en un rota evaporador.

Extracción asistida por ultrasonido

- Deshidratado de frutos (pulpa y epidermis) a 40 °C durante 24 horas.
- Peso de fruto deshidratado (30 g)
- Se coloca el fruto en un matraz bola de 500 mL
- Se adicionan 300 mL de solvente
- Solventes empleados: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol.
- Se lleva a un baño de ultrasonido, previamente equipado con un refrigerante en posición de reflujo.
- Se ajusta el tiempo a media hora a temperatura ambiente (25 °C)
- Pasada la media hora, se realiza un cambio de solvente para la misma fracción (sin cambiar de polaridad) y se ajusta nuevamente el tiempo a media hora.

- Pasada esta media hora se cambia de polaridad al solvente y se procede a la misma operación para las siguientes fracciones.
- Al finalizar el tiempo necesario se concentra el solvente de ambos tiempos (misma polaridad) en un matraz bola y se concentra en un rota evaporador para eliminar las trazas del solvente empleado.

Extracción por Soxhlet

- Empleo de frutos (pulpa y epidermis) deshidratados a 40 °C durante 24 horas.
- Peso de fruto deshidratado (30 g)
- Se coloca la muestra (fruto deshidratado) en un cartucho (de papel filtro)
- Introducción de cartucho en el sifón de la trampa y un refrigerante, acoplado en forma vertical.
- Colocar 300 mL de solvente en un matraz
- El refrigerante se conecta en posición de reflujo.
- Se sujeta el montaje en posición vertical con pinzas.
- Una vez montado el aparato, se extraen los metabolitos de la muestra por reflujo durante ocho horas.
- Pasadas las 8 horas (Sousa y cols. 2008) se concentra el extracto en un rota evaporador para eliminar trazas de solvente

Después de obtener todas las fracciones para cada método de extracción, se procedió a evaluar la capacidad antioxidante de éstas mediante métodos colorimétricos y cuantificar el contenido de polifenoles y carotenoides totales.

7.3. Métodos de evaluación de actividad antioxidante

Método de evaluación antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Los extractos obtenidos a partir los frutos de *Crataegus mexicana*, se analizaron cuantitativamente con el método DPPH como sigue:

- Preparar una solución con los extractos a una concentración de 20 mg/mL, equivalente a una concentración de 20000 ppm disueltos en DMSO (dimetil sulfóxido) grado RA (reactivo analítico).
- A partir de estas soluciones, se preparan diluciones a 10, 100 y 1000 ppm (barrido grueso) diluidas en etanol.
- En pozos para lector de ELISA se adicionan 50 μ L de las diluciones anteriores y 150 μ L del radical DPPH a una concentración de 133.33 μ M.
- Incubar durante 30 minutos a 37 °C con agitación orbital
- Medir absorbancia a 517 nm en lector de ELISA
- Calcular el porcentaje de reducción.
- A partir de los barridos gruesos, se realizan barridos finos a concentraciones que van de 3.1 a 100 y de 100 a 1000 ppm para calcular la CI_{50} .

Método de evaluación antioxidante ABTS⁺ (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)).

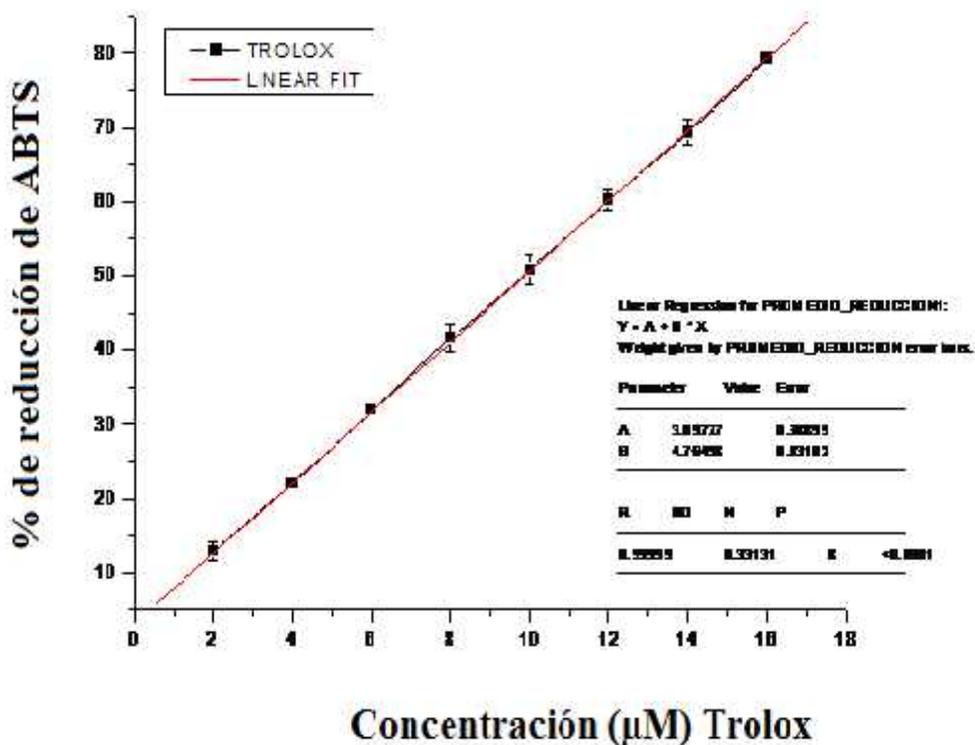
Cada una de las fracciones obtenidas en ambos frutos, se evaluaron por el método ABTS como sigue:

- El radical libre ABTS⁺ se obtiene tras la reacción del ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.6 mM concentración final).
- La solución de trabajo se preparó mediante la mezcla de las dos soluciones stock en cantidades equitativas, seguidas de una reacción por 12 a 16 horas a temperatura ambiente (25 °C), en la oscuridad.
- Una vez formado el radical ABTS⁺, se toman 1000 μ L de este y se diluyen con etanol hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.701 a 0.702 nm.

- Una vez ajustado, en la misma celda de cuarzo se agregan 10 μL de la muestra (a 100 ppm) y se toma lectura cada minuto hasta llegar a seis minutos.

La disminución de la coloración se expresa como el porcentaje de inhibición del $\text{ABTS}^{\cdot+}$, comparada con una curva estándar del antioxidante sintético de referencia Trolox (20-200 $\mu\text{mol/L}$). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a μM de Trolox) por gramo de muestra.

Curva patrón de Trolox a 436 nm



7.4. Cuantificación de carotenoides y polifenoles totales

Cuantificación de carotenos totales

Para la determinación de carotenoides, se realizó una extracción por una hora a partir de 2 gramos de tejocote deshidratado y molido y una solución de *n*-hexano/acetona/etanol 10 mL (50:25:25, v/v), posteriormente se centrifugo por cinco min a 6500 rpm a 5 °C. Una vez centrifugado, se recupero el sobrenadante (*n*-hexano) que presentó coloración amarilla intensa y se trasvaso a un matraz de 25 mL. El sobrenadante se ajustó a 25 mL con *n*-hexano. La cuantificación de carotenoides totales se realizó mediante extracción de la alícuota y posterior medición espectrofotométrica a 450 nm. La cantidad de carotenoides totales se calculó mediante el coeficiente de extinción de β -caroteno que es igual a 2505%.

Determinación de polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales, se preparó una solución metanol/agua y se agregaron al fruto de tejocote deshidratado y molido (500 mg), de esta solución se tomaron dos mL y se llevaron a un volumen de cinco mL con HCl al 0.3%, de esta se tomaron 100 μ L y se adicionaron en dos mL de Na₂CO₃ al 2%. Pasados dos minutos, a la mezcla anterior se adicionaron 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu disuelto en agua (1:1). Después de 30 minutos se midió la absorbencia mediante un espectrofotómetro a 750 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruto y son interpolados en una curva estándar de ácido gálico.

Determinación de polifenoles por fracción

La cuantificación de polifenoles fraccionados se realizó como sigue: se pesa de 1-1.5 g de extracto y se prepara a 100 ppm con etanol. De la dilución anterior se tomó un mL y se aforó a 2.5 mL con ácido clorhídrico (0.3 %) y se agitó*. Posteriormente se procedió a preparar la muestra para leer en espectrofotómetro, para ello se tomaron 1000 μ L de carbonato de sodio, 50 μ L de la solución anterior* y 50 μ L del reactivo de Folin (1.1). Una vez hecho esto, se homogenizó la solución preparada y se llevó a un agitador orbital a 600 rpm durante 30 minutos.

Después de media hora de agitación, se procedió a tomar lectura en el espectrofotómetro a 750 nm y a calcular el contenido de polifenoles por fracción (desde *n*-hexano hasta metanol). Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruto y son interpolados en una curva estándar de ácido gálico.

VIII. RESULTADOS

8.1. Peso de fruto fresco y deshidratado

Tabla 10. Peso de tejocote fresco y deshidratado

Árbol	Fruto	Población	Fresco (g)	Deshidratado (g)
R. Sexual	Criollo	Domingo Arenas	6500	890
R. Asexual	Injerto	Domingo Arenas	5200	735
R. Sexual	Criollo	Huejotzingo	6500	875
R. Asexual	Injerto	Huejotzingo	5200	775
R. Sexual	Criollo	Sta. Ma. Atexcac	6800	900
R. Asexual	Injerto	Sta. Ma. Atexcac	5200	785

Se obtuvo un total de 108 extractos, a partir de los frutos de tejocote criollo y de injerto deshidratado por los tres métodos de extracción, cuyas características físicas son diferentes en cada uno de ellos.



8.2. Peso de extractos

Se verificó que cada uno de los extractos estuviera libre de trazas de solventes, con la finalidad de evitar una posible interferencia en los resultados obtenidos. En la tabla 11, se indica el rendimiento (%) de cada uno de los extractos obtenidos por los tres métodos de extracción.

Tabla 11. Rendimiento (%) de los extractos obtenidos de tejocote criollo y de injerto por extracción en frío (EF), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción Soxhlet (ES).

Fruto	Sitio	Extracción	<i>n</i> -hexano	Dicloro	A. de etilo	Acetona	Etanol	Metanol
Criollo	1	EF	1.123	0.463	1.380	1.663	15.763	26.277
Criollo	2	EF	9.607	8.230	3.997	5.150	18.510	31.227
Criollo	3	EF	0.793	0.430	1.180	1.343	5.030	19.410
Criollo	1	EAU	2.977	1.607	0.823	0.857	10.797	14.013
Criollo	2	EAU	3.430	9.553	2.617	0.910	28.853	30.630
Criollo	3	EAU	1.793	2.867	0.023	3.203	5.973	17.163
Criollo	1	ES	2.513	0.927	1.523	5.223	25.230	16.263
Criollo	2	ES	0.753	0.043	0.043	2.153	14.417	9.777
Criollo	3	ES	2.023	1.097	1.013	4.357	23.507	13.997
Injerto	1	EF	1.053	0.810	0.630	2.233	14.710	25.933
Injerto	2	EF	4.997	4.077	2.463	6.160	29.837	26.433
Injerto	3	EF	1.433	1.863	1.307	2.847	17.920	26.873
Injerto	1	EAU	1.033	0.990	0.220	0.047	5.197	14.327
Injerto	2	EAU	3.887	4.447	1.377	2.857	17.570	32.937
Injerto	3	EAU	0.663	1.820	0.420	0.810	13.507	16.587
Injerto	1	ES	1.680	0.763	0.600	0.613	33.243	6.930
Injerto	2	ES	1.230	0.120	0.103	2.260	22.480	7.063
Injerto	3	ES	0.897	3.330	0.623	7.497	27.413	15.390

El rendimiento (%) de los extractos obtenidos durante las primeras fracciones, contando desde *n*-hexano hasta acetato de etilo fue menor, en comparación a las últimas, que son las más polares (etanol y metanol). La fracción en la que se obtuvo un mayor rendimiento fue la de metanol por

extracción en frío y asistida por ultrasonido, para la extracción por Soxhlet, la fracción en la que se obtuvo un mayor rendimiento fue la de etanol, seguida de metanol y acetona.

Las características físicas de cada fracción difieren una de otra respecto al método de extracción empleado. Para la extracción en frío, las fracciones de *n*-hexano y diclorometano presentaron características similares a una cera, mientras que en acetato de etilo y acetona se observaron polvos, para etanol y metanol se observó un extracto semilíquido viscoso, lo anterior debido a un elevado contenido de azúcares.

La extracción asistida por ultrasonido modificó las características observadas durante la extracción anterior (EF), en esta, la fracción de *n*-hexano mostró además de ceras, pequeños fragmentos en polvo, mientras que a partir de diclorometano y acetato de etilo, se pudieron observar extractos en polvo y con mayor volumen, las fracciones de acetona, etanol y metanol se tornaron viscosas y con menor coloración.

Las características físicas de los extractos obtenidos por Soxhlet fueron diferentes respecto a los dos métodos de extracción anteriores (EF y EAU). La fracción de *n*-hexano perdió su aspecto ceroso, se observó espeso y con una coloración marrón intensa, los extractos de diclorometano y acetato de etilo fueron en forma de polvo, en las fracciones de acetona y etanol se obtuvo una mayor cantidad de extracto, lo anterior redujo a su vez la cantidad y coloración del extracto obtenido en la fracción de metanol.

Después de obtener todas las fracciones por los diferentes métodos de extracción, se procedió a evaluar la capacidad antioxidante de cada fracción y esta se promedió en cada fruto de acuerdo a la zona de colecta (zona1, 2 y 3), la evaluación se realizó mediante métodos colorimétricos. Asimismo se cuantificó la cantidad de carotenoides y polifenoles totales y también se promedió para cada fruto respecto a la zona de colecta (1,2 y 3).

8.3. Prueba DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Los extractos obtenidos se evaluaron con el método DPPH por barridos gruesos y barridos finos, estos últimos para calcular el parámetro CI_{50} (concentración de extracto necesaria para reducir un 50% al radical libre empleado)

8.4. Barridos gruesos

Los extractos se evaluaron por el método DPPH a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm (barridos gruesos), los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 12. Porcentaje de reducción de DPPH en barridos gruesos \pm error estándar, de los extractos obtenidos por extracción en frío (EF), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción Soxhlet (ESX).

Fracción	[] en ppm	Criollo EF	Injerto EF	Criollo EAU	Injerto EAU	Criollo ES	Injerto ES
n-hexano	10	0.625 \pm 0.08 ^a	1.324 \pm 0.608 ^b	2.961 \pm 0.661 ^a	1.307 \pm 0.277 ^b	1.994 \pm 0.819 ^a	2.7 \pm 0.944 ^a
	100	8.57 \pm 0.797 ^a	5.335 \pm 0.250 ^b	13.427 \pm 0.679 ^a	7.431 \pm 1.634 ^b	13.528 \pm 1.553 ^a	18.323 \pm 1.739 ^b
	1000	70.158 \pm 0.958 ^a	45.545 \pm 0.598 ^b	74.934 \pm 2.003 ^a	46.31 \pm 0.881 ^b	76.857 \pm 1.756 ^a	86.579 \pm 2.460 ^b
Diclorometano	10	1.154 \pm 0.227 ^a	2.614 \pm 0.220 ^b	5.132 \pm 0.298 ^a	2.841 \pm 0.481 ^b	5.205 \pm 0.962 ^a	5.791 \pm 0.553 ^a
	100	13.383 \pm 0.839 ^a	18.011 \pm 3.143 ^a	23.132 \pm 1.479 ^a	22.479 \pm 3.376 ^a	27.416 \pm 0.817 ^a	23.922 \pm 0.675 ^b
	1000	77.308 \pm 1.945 ^a	86.101 \pm 2.120 ^b	90.966 \pm 2.058 ^a	85.684 \pm 2.388 ^a	93.255 \pm 1.135 ^a	87.195 \pm 2.077 ^b
A. de etilo	10	8.135 \pm 0.797 ^a	16.525 \pm 1.642 ^b	6.242 \pm 0.263 ^a	8.011 \pm 0.326 ^b	36.184 \pm 3.362 ^a	24.667 \pm 2.050 ^b
	100	33.508 \pm 1.791 ^a	55.475 \pm 1.192 ^b	33.811 \pm 0.771 ^a	40.939 \pm 2.482 ^b	91.623 \pm 2.450^a	82.425 \pm 0.513^b
	1000	86.414 \pm 1.078 ^a	96.054 \pm 0.3 ^b	94.366 \pm 0.605 ^a	95.062 \pm 0.521 ^a	95.056 \pm 0.475 ^a	95.119 \pm 0.197 ^a
Acetona	10	24.047 \pm 0.864 ^a	20.916 \pm 1.527 ^a	16.313 \pm 2.081 ^a	14.118 \pm 1.153 ^a	22.73 \pm 1.313 ^a	20.667 \pm 0.641 ^a
	100	83.52 \pm 0.822^a	82.847 \pm 0.754^a	77.434 \pm 1.534^a	67.154 \pm 1.674^b	81.526 \pm 0.806 ^a	63.794 \pm 0.491 ^b
	1000	95.871 \pm 0.472 ^a	95.893 \pm 0.275 ^a	95.97 \pm 0.451 ^a	96.217 \pm 0.467 ^a	95.308 \pm 0.2 ^a	94.844 \pm 0.193 ^a
Etanol	10	16.937 \pm 1.772 ^a	18.603 \pm 1.059 ^a	9.526 \pm 0.696 ^a	12.932 \pm 0.715 ^b	6.090 \pm 0.597 ^a	11.397 \pm 0.510 ^b
	100	72.038 \pm 0.840 ^a	73.727 \pm 0.258 ^a	54.142 \pm 0.593 ^a	56.142 \pm 1.066 ^a	41.961 \pm 0.763 ^a	58.959 \pm 0.121 ^b
	1000	95.677 \pm 0.268 ^a	92.728 \pm 1.363 ^b	95.577 \pm 0.273 ^a	95.471 \pm 0.273 ^a	94.452 \pm 0.474 ^a	94.717 \pm 0.186 ^a
Metanol	10	8.496 \pm 0.315 ^a	11.446 \pm 0.668 ^b	7.18 \pm 0.827 ^a	8.895 \pm 0.873 ^a	5.872 \pm 0.541 ^a	4.846 \pm 0.416 ^a
	100	59.582 \pm 0.942 ^a	59.111 \pm 2.723 ^a	44.466 \pm 0.554 ^a	46.078 \pm 1.053 ^a	32.86 \pm 2.432 ^a	21.622 \pm 2.707 ^b
	1000	95.651 \pm 0.191 ^a	95.615 \pm 0.173 ^a	95.481 \pm 0.13 ^a	92.554 \pm 0.927 ^a	94.493 \pm 0.194 ^a	93.903 \pm 0.486 ^a

La tabla 12 indica el porcentaje de reducción de los extractos obtenidos a partir de tejocote criollo y de injerto por los métodos de extracción en frío (EF), asistida por ultrasonido (EAU) y Soxhlet (ES). Los extractos cuyos números están remarcados en negro, fueron los que mostraron una mayor actividad antioxidante a 100 ppm. Las letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$), aquellas que presentan la misma letra (a, a) no presentaron diferencias significativas, por una prueba de Mann Withney. La prueba estadística muestra que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tejocote criollo y de injerto, entre métodos de extracción y entre fracciones obtenidas. Las comparaciones se hicieron entre columnas y se comparó por filas.

En este método de evaluación antioxidante es el tejocote criollo, seguido de tejocote injertado donde se observa la mayor actividad antioxidante, ambos en la fracción de acetato de etilo por extracción Soxhlet a 100 ppm. Siendo además este método en el que se observa el mayor porcentaje de reducción en casi todas las fracciones obtenidas. Lo anterior se debe a que el uso de temperatura incrementa la solubilidad de los compuestos presentes en el fruto. Lo anterior incrementa la cantidad y tipo de metabolitos en cada fracción, misma que llega a ser menor en las fracciones más polares donde ya no hay muchos metabolitos por haber sido arrastrados en polaridades anteriores.

El porcentaje de reducción a una concentración de 10 ppm, no alcanzó más del 40% de reducción, en ninguna de las fracciones. La fracción con mayor porcentaje de reducción fue la de acetato de etilo obtenida por extracción Soxhlet, a partir de tejocote criollo. La fracción con menor porcentaje de reducción fue la de *n*-hexano en ambos frutos.

El porcentaje de reducción a 100 ppm presenta una mayor variación entre cada una de las fracciones evaluadas. El mayor porcentaje de reducción de DPPH se presentó en la fracción de metanol por extracción en frío a partir de tejocote criollo, seguida de la fracción acetato de etilo obtenida a partir de tejocote criollo y la misma fracción obtenida de tejocote criollo, por extracción Soxhlet en los dos últimos casos. Siendo una vez más la fracción de *n*-hexano, la que presentó el menor porcentaje de reducción en todos los casos.

El porcentaje de reducción de DPPH a 1000 ppm fue similar a partir de la fracción acetato de etilo en ambos frutos y por todos los métodos de extracción. Una vez más, la fracción de *n*-hexano fue la que presentó el menor porcentaje de reducción de DPPH a esta concentración.

La diferencia respecto a la actividad antioxidante por DPPH entre ambos frutos, se debe principalmente a la cantidad de metabolitos presentes en este, así como el tipo de metabolitos arrastrados en cada fracción por los diferentes métodos de extracción. De este modo, las fracciones de polaridad media a alta fueron las que presentaron la mayor actividad antioxidante, siendo compuestos de tipo carotenoides y polifenoles los responsables de dicha actividad.

8.5. Barridos finos

Una vez obtenido el porcentaje de reducción de DPPH por barridos gruesos, se procedió a realizar barridos finos, con la finalidad de calcular el parámetro CI_{50} , que se refiere a la concentración mínima de extracto necesaria para reducir un 50% al radical libre DPPH. Los resultados de las fracciones a las que se les realizó barridos finos y cuyo porcentaje de reducción (por barridos gruesos) fue mayor al 50%, se muestran en la tabla 4.

Tabla 13. CI_{50} en ppm \pm error estándar de los extractos más activos de tejocote criollo y de injerto por extracción en frío (EF), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción Soxhlet (ES).

Fracción	Criollo EF	Injerto EF	Criollo EAU	Injerto EAU	Criollo ES	Injerto ES
n-hexano	317.07 \pm 1.05 ppm		495.31 \pm 1.69 ppm		338.28 \pm 0.95 ppm ^a	287.91 \pm 1.01 ppm ^b
Diclorometano	128.89 \pm 0.70 ppm ^a	492.47 \pm 0.52 ppm ^b	332.94 \pm 0.70 ppm ^a	184.42 \pm 1.01 ppm ^b	235.19 \pm 2.34 ppm ^a	250.65 \pm 1.69 ppm ^a
A. de etilo	56.14 \pm 1.67 ppm ^a	21.86 \pm 0.09 ppm^b	133.81 \pm 0.35 ppm ^a	122.75 \pm 0.68 ppm ^b	12.86 \pm 0.70 ppm^a	25.43 \pm 2.13 ppm^b
Acetona	11.41 \pm 0.15 ppm^a	22.16 \pm 1.06 ppm^b	23.28 \pm 0.98 ppm^a	24.05 \pm 0.80 ppm^a	22.85 \pm 1.35 ppm^a	23.15 \pm 1.53 ppm^a
Etanol	36.37 \pm 1.14 ppm ^a	39.73 \pm 0.84 ppm ^a	149.56 \pm 0.74 ppm ^a	51.56 \pm 0.82 ppm ^b	125.37 \pm 1.55 ppm ^a	41.26 \pm 1.04 ppm ^b
Metanol	53.42 \pm 2.84 ppm ^a	155.56 \pm 1.32 ppm ^b	32.15 \pm 0.67 ppm ^a	66.79 \pm 1.50 ppm ^b	304.14 \pm 2.84 ppm ^a	331.76 \pm 1.43 ppm ^b

Nota: Los números remarcados en negro indican la menor CI_{50} en ppm para cada fruto por método de extracción.

La tabla 13, indica la CI_{50} de los extractos más activos por DPPH (barridos gruesos) cuyo porcentaje de reducción fue mayor al 50%. Los extractos más activos fueron los de acetona por

extracción en frío y acetato de etilo por extracción Soxhlet (este podría reemplazar a los métodos de EF y EAU), lo anterior se debe a un contenido considerable de polifenoles, ya que se tiene reportado que este tipo de compuestos se extraen en estas fracciones. Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), marcadas con letras diferentes (a, b) en cada una de las CI_{50} , comparadas por Mann Withney. Las comparaciones se hicieron por columnas y en cada una de las filas. El fruto con la menor CI_{50} fue el tejocote criollo, siendo este mejor que tejocote de injerto.

8.6. Comparación de CI_{50} contra antioxidantes de referencia por DPPH

Tabla 14. Tabla comparativa de $CI_{50} \pm$ error estándar entre antioxidantes comerciales y extractos más activos de tejocote criollo y de injerto, por extracción en frío (EF), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción Soxhlet (ES).

Antioxidante	CI_{50} (ppm)	Criollo	CI_{50} (ppm)	Injerto	CI_{50} (ppm)
-tocoferol	23.15 ± 0.67	Acetona EF	11.41 ± 0.15	A. de etilo EF	21.86 ± 0.09
Ác. Caféico	18.65 ± 0.63	Acetona EAU	23.28 ± 0.98	Acetona EF	22.16 ± 1.06
Ác. Ascórbico	15.93 ± 0.37	A. de etilo ES	12.86 ± 0.70	Acetona EAU	24.05 ± 0.08
Quercetina	5.37 ± 0.14	Acetona ES	22.85 ± 1.35	A. de etilo ES	25.43 ± 2.13
				Acetona ES	23.15 ± 1.53

Nota: Las letras remarcadas en color negro indican los valores más bajos de CI_{50} en ppm por la prueba DPPH

En la tabla 14, se presenta una comparación entre las CI_{50} de los extractos de tejocote (criollo y de injerto) y antioxidantes comerciales. La mejor CI_{50} se obtuvo en la fracción de acetona (EF) y acetato de etilo (ES), obtenidas a partir de tejocote criollo, cuyos valores son menores a los antioxidantes -tocoferol, ácido caféico y ácido ascórbico. Los mismos extractos presentan solo el doble del valor de CI_{50} del antioxidante quercetina. En tejocote de injerto, las fracciones

acetato de etilo (EF) y acetona (EF y ES) tuvieron una CI_{50} igual o menor al antioxidante - tocoferol.

8.7. Prueba ABTS⁺ (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)).

La actividad antioxidante de los extractos evaluados por ABTS se expreso como TEAC (actividad antioxidante equivalente a μM de Trolox)/g de muestra.

Tabla 15. Valores obtenidos a partir de los extractos de tejocote criollo y de injerto expresados como TEAC (actividad antioxidante equivalente a μM de Trolox)/g de muestra.

TEAC $\mu\text{M/g}$	Criollo EF	Injerto EF	Criollo EAU	Injerto EAU	Criollo ES	Injerto ES
<i>n</i> -hexano	0.222 \pm 0.01 ^a	0.571 \pm 0.01 ^b	0.068 \pm 0.03 ^a	0.078 \pm 0.02 ^b	0.039 \pm 0.05 ^a	0.118 \pm 0.04 ^b
Diclorometano	0.162 \pm 0.02 ^a	0.217 \pm 0.01 ^b	0.236 \pm 0.04 ^a	0.099 \pm 0.03 ^b	0.111 \pm 0.03 ^a	0.173 \pm 0.03 ^a
A. de etilo	0.305 \pm 0.01 ^a	0.907 \pm 0.03 ^b	0.053 \pm 0.03 ^a	0.177 \pm 0.01 ^b	2.146 \pm 0.02^a	0.968 \pm 0.01 ^b
Acetona	1.768 \pm 0.03^a	1.183 \pm 0.07 ^b	0.698 \pm 0.02 ^a	0.422 \pm 0.04 ^b	0.934 \pm 0.01 ^a	1.058 \pm 0.02 ^b
Etanol	0.669 \pm 0.06 ^a	0.525 \pm 0.03 ^b	0.361 \pm 0.03 ^a	0.393 \pm 0.02 ^a	0.149 \pm 0.01 ^a	0.263 \pm 0.02 ^b
Metanol	0.362 \pm 0.01 ^a	0.398 \pm 0.02 ^a	0.093 \pm 0.02 ^a	0.123 \pm 0.01 ^b	0.166 \pm 0.01 ^a	0.111 \pm 0.01 ^b

Nota: Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por Mann Withney.

En la tabla 15, se muestran los valores de TEAC $\mu\text{M/g}$ de muestra (actividad antioxidante equivalente a de Trolox) de las fracciones obtenidas en tejocote criollo y de injerto donde las fracciones con la mayor TEAC fueron acetato de etilo (tejocote criollo EF) y acetona (tejocote criollo y de injerto EF). La actividad antioxidante de la fracción acetato de etilo está dada por compuestos de tipo polifenoles, por ser esta quién presentó el mayor contenido de estos compuestos. Además, el método de extracción por Soxhlet fue el que presentó la mejor actividad antioxidante en ABTS. Por lo anterior, el método antes mencionado, minimizaría el costo, tiempo y cantidad de solvente costos para la obtención de compuestos con actividad antioxidante, debido a que fue en este donde se observo actividad antioxidante importante en fracciones de polaridad baja a media. Las fracciones más activas se muestran remarcadas en color negro.

Las comparaciones estadísticas se hicieron por la prueba de Mann Withney, se comparó al tejocote criollo y de injerto por columnas.

8.8. Contenido de carotenoides y polifenoles totales

Tabla 16. Contenido de carotenoides y polifenoles totales \pm error estándar en tejocote criollo y de injerto.

Tejocote	Criollo	Injerto
Carotenos totales	0.232 ± 0.026^a	0.219 ± 0.039^a
Polifenoles totales	0.412 ± 0.088^a	0.35 ± 0.05^b

Nota: Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por t de student.

La prueba de t de student indica que existen diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales entre tejocote criollo y de injerto. En base a lo anterior, se puede decir que el método de cultivo modifica la cantidad de polifenoles presentes en los frutos de tejocote.

La tabla 16 muestra el contenido de carotenos totales, dónde es el tejocote criollo el fruto en el que se obtuvo la mayor cantidad de éstos fitoquímicos, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos frutos.

El contenido de polifenoles totales es mayor en tejocote criollo, respecto al tejocote de injerto y existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos frutos.

Tabla 17. Contenido de polifenoles por fracción \pm error estándar en tejocote criollo y de injerto.

Fracción	Criollo (EF)	Injerto (EF)	Criollo (EAU)	Injerto (EAU)	Criollo (ES)	Injerto (ES)
----------	--------------	--------------	---------------	---------------	--------------	--------------

n-hexano	0.054 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.002 ^a	0.054 ± 0.003 ^a	0.053 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.002 ^a
Diclorometano	0.054 ± 0.002 ^a	0.054 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.002 ^a	0.054 ± 0.001 ^a	0.054 ± 0.001 ^a
A. de etilo	0.055 ± 0.001 ^a	0.062 ± 0.006 ^b	0.055 ± 0.002 ^a	0.057 ± 0.001 ^a	0.074 ± 0.006^a	0.063 ± 0.003 ^b
Acetona	0.068 ± 0.004^a	0.072 ± 0.003^b	0.063 ± 0.003 ^a	0.062 ± 0.002 ^a	0.062 ± 0.002 ^a	0.060 ± 0.004 ^a
Etanol	0.063 ± 0.003 ^a	0.063 ± 0.001 ^a	0.059 ± 0.001 ^a	0.060 ± 0.003 ^b	0.056 ± 0.001 ^a	0.057 ± 0.001 ^a
Metanol	0.073 ± 0.001^a	0.058 ± 0.002 ^b	0.056 ± 0.001 ^a	0.055 ± 0.001 ^a	0.053 ± 0.001 ^a	0.053 ± 0.001 ^a

La presente tabla muestra el contenido de polifenoles por fracción, dónde se observa que es la fracción de acetato de etilo (extracción Soxhlet a partir de tejocote criollo) y la fracción de metanol (extracción en frío a partir de tejocote criollo), las que presentan el mayor contenido de polifenoles (remarcadas en color negro), seguidas de acetona (extracción en frío a partir de tejocote de injerto y de tejocote criollo), cuyas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las comparaciones para la prueba estadística se hicieron por columna y por fila.

Las fracciones con mayor contenido de polifenoles fueron también las que presentaron la mayor actividad antioxidante en las pruebas de actividad antioxidante DPPH y ABTS por lo que, son estos compuestos los principales responsables de la actividad antioxidante en ambos frutos.

IX. DISCUSIÓN

Durante la presente investigación, se evaluó la parte comestible (pulpa y epidermis) en dos formas de cultivo (criollo y de injerto) del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*), este pertenece al género *Crataegus*, de la familia *Rosaceae*. Los resultados del estudio arrojaron datos acerca de la actividad antioxidante, evaluada por los métodos colorimétricos DPPH, ABTS, y contenido de antioxidantes, mediante la cuantificación de carotenoides y polifenoles totales.

Es importante evaluar la capacidad antioxidante en tejidos de frutas (pulpa y epidermis) y plantas, ya que esta se encuentra estrechamente asociada con la actividad de “enzimas barredoras de radicales libres” (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa) y con el contenido de sustancias antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferol y ácido ascórbico (Leja y cols. 2003).

Asimismo, se tienen reportes acerca de la actividad antioxidante evaluada en diversas partes de frutos y plantas como: *Gardenia jasminoides* (fruto), *Panax ginseng* (raíz), *Pachyma hoelen* (cuerpo frutal), *Atractylodes chinensis* (rizoma), *Carthamus tinctorius* (flor), *Coptis chinensis* (rizoma), *Cinnamomum cassia* (corteza), *Zizyphus jujuba* (fruto), *Rehmannia glutinosa* (bulbo), *Scrophularia buergeriana* (raíz), *Pinellia ternata* (raíz), *Scutellaria baicalensis* (raíz), *Zingiber officinale* (rizoma), *Bupleurum chinense* (raíz), *Angelica acutiloba* (raíz), *Rheum officinale* (rizoma), *Cocculus trilobus* (rizoma), *Prunus armeniaca* (semilla), *Crataegus cuneate* (fruto), *Prunus persica* (semilla), *Paeonia lactiflora* (raíz), *Paeonia suffruticosa* (corteza de raíz), *Ephedra equisetina* (tallo), *Astragalus membranaceus* (raíz), *Pueraria lobata* (raíz), *Glycyrrhiza glabra* (raíz), and *Dioscorea batatas* (tubérculo), en todos ellos se ha encontrado una importante actividad antioxidante (Nishioka y cols. 1998).

Extractos

Respecto a los extractos obtenidos, se observaron características físicas (coloración, textura y aroma) diferentes entre cada uno de ellos, de acuerdo a la variedad del fruto, tipo de extracción,

y polaridad del solvente empleado: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol. Esta última representa la suma de todas las propiedades moleculares responsables de las fuerzas de interacción entre el solvente y las moléculas del soluto y es esta interacción intermolecular entre el solvente y las moléculas del soluto la que determina la solubilidad mutua (Lin y Giusti 2005). Por ende, de acuerdo a la polaridad del solvente utilizado, se extraen diferentes grupos de moléculas, en *n*-hexano se extraen metabolitos hidrofóbicos (carotenoides, xantofilas, terpenos y otros), acetato de etilo es afín a triterpenos, y metanol a flavonoides, alcaloides, antocianinas y otros compuestos más polares.

En primer lugar, los extractos presentaron una coloración en tonalidades de amarillo a marrón, siendo más intensa en los extractos de tejocote criollo que en tejocote de injerto, por proceder de cultivos diferentes.

En segundo lugar, las características físicas de cada extracto obtenido fueron diferentes en los tres métodos de extracción y se observó un cambio en la consistencia de los extractos. Durante la extracción en frío, los polvos se obtenían en las fracciones intermedias (acetato de etilo y acetona), mientras que por ultrasonido, los extractos en polvo se obtuvieron desde la fracción de *n*-hexano hasta acetato de etilo y por Soxhlet los polvos se obtuvieron en las fracciones de diclorometano y acetato de etilo. En todos los métodos de extracción las fracciones de etanol y metanol mostraron un aspecto viscoso y de color marrón, de igual modo, por extracción en frío y por Soxhlet, la fracción de acetona mostró una apariencia similar a las anteriores.

En tercer lugar, la cantidad de extracto obtenido incremento respecto a la polaridad del solvente empleado, lo anterior se debe a que el cambio de polaridad del solvente, altera su habilidad para disolver un grupo selecto de compuestos antioxidantes, por ello a mayor polaridad se obtuvo una mayor cantidad de extracto, con diferentes metabolitos arrastrados en cada una (Turkem y cols. 2007). Por lo tanto, se obtuvo una menor cantidad de extracto en las primeras fracciones (*n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo), y este aumento considerablemente conforme aumentaba la polaridad del solvente empleado (acetona, etanol y metanol). Lo anterior se observó por extracción en frío y por Soxhlet, si bien no lo fue así para la extracción por

ultrasonido, ya que el comportamiento respecto a la cantidad del extracto obtenido fue el mismo hasta la fracción de etanol, y al llegar a metanol, se obtuvo una cantidad de extracto menor en comparación con los otros dos métodos.

Método de extracción

En este estudio, se evaluaron varios métodos de extracción, en frío, asistida por ultrasonido y Soxhlet para la extracción eficiente de compuestos antioxidantes de los frutos (pulpa y epidermis) de tejocote (*C. mexicana*) criollo y de injerto.

Durante la extracción se observó que la extracción por Soxhlet fue la mejor, respecto a la actividad antioxidante de los extractos evaluados, comparada con extracción en frío y por ultrasonido, aunque esta última incrementa el rendimiento del extracto, minimiza el tiempo, cantidad de solvente empleado y con ello también reduce los costos del proceso (Londoño y cols. 2009). Si comparamos este resultado con los reportados por Sharma y cols. 2007, en los que observaron que la mejor actividad antioxidante en hojas, semillas, pulpa y frutos de *Hippophae rhamnoides* y el máximo rendimiento del extracto fue obtenido con extracción Soxhlet, seguido por extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido y maceración.

Lo anterior contribuye a la búsqueda de métodos ideales para la extracción de compuestos bioactivos en frutos o materiales vegetales, a fin de obtener un máximo de constituyentes bioactivos en un tiempo de procesamiento corto y a un bajo costo (Londoño y cols. 2010).

Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos por medio del método DPPH y ABTS (Tabart y cols. 2007) varían de acuerdo a la polaridad del extracto evaluado, se observó que la actividad antioxidante incrementa en medida que aumenta la polaridad del extracto. En las fracciones *n*-hexano y diclorometano se mostró una escasa actividad antioxidante, siendo más alta en polaridades intermedias (acetato de etilo y acetona). La actividad antioxidante de los extractos *n*-hexano y

dicloroemtano puede deberse a la presencia de carotenoides en los frutos de tejocote. Las variaciones en la capacidad antioxidante de diferentes extractos puede ser atribuida a diferencias en su composición química: compuestos fenolicos, ácido ascórbico y carotenoides (Jayaprakasha y cols. 2007).

En el 2004 García-Alonso y cols. determinaron la actividad antioxidante de 28 frutas por ABTS, de estas, las que presentaron menor actividad antioxidante (expresada como μmol equivalentes de Trolox g^{-1}) fueron el aguacate ($1 \mu\text{mol/g}$), seguido de higo verde y pera (v. blanquilla), que tuvieron valores de TEAC de 4 y 3 $\mu\text{mol/g}$ respectivamente. Las muestras con una gran capacidad antioxidante en la prueba fueron caqui ($406 \mu\text{mol/g}$), zarzamora ($192 \mu\text{mol/g}$), arándano ($187 \mu\text{mol/g}$) y frutos del árbol de fresa ($163 \mu\text{mol/g}$).

En un estudio realizado por Jayaprakasha y cols. 2007, cuyos resultados obtenidos acerca del potencial barredor de radicales libres de los extractos de cidra, naranja y ácido cítrico por el método DPPH, a 1000 ppm, el extracto MeOH:agua (80:20) de cidra y ácido ascórbico exhibieron 92.06% y 97.0% de actividad barredora del radical libre, respectivamente y el extracto de hexano mostró una actividad mínima a las mismas concentraciones probadas. De manera similar, los extractos EtOAc Y MeOH de naranja roja mostraron una actividad máxima (87.6%) y mínima (60.9%) respectivamente, a 1000 ppm.

En lo referente a la concentración de la muestra evaluada, todos los extractos mostraron un incremento en la capacidad antioxidante con un incremento en la concentración de la muestra.

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS fue mejor en el extracto de acetato de etilo, obtenido por extracción Soxhlet a partir de tejocote criollo, misma que se atribuye a su habilidad para donar hidrógenos y al contenido de metabolitos de tipo carotenoides, ácidos epicatequino y clorogénico (Jayaprakasha y cols. 2007, Tabart y cols. 2007). Asimismo, estos antioxidantes naturales han sido aislados de materiales de plantas, así como aceites de semillas, cereales, vegetales, frutas, hojas, raíces, especies e hierbas y se han identificado en semillas de cítricos, uvas y granada (Jayaprakasha y cols.2007)

En 2008, Sharma y cols. evaluaron diferentes procedimientos de extracción (microondas, maceración, Soxhlet y ultrasonido) y su actividad antioxidante en semillas, hojas, pulpa y frutos de *Hippopae ramnhoides*, el métodos de extracción con la mayor actividad antioxidante, al igual que en el presente estudio fue por Soxhlet en las partes evaluadas por los métodos DPPH y ABTS (expresados como mg equivalentes de Trolox/g de material de planta), respectivamente. Asimismo se puede observar que el fruto completo presentó mayor actividad que solo la pulpa y esta es más baja que la obtenida en el fruto completo.

Tabla 17. Comparación de actividad antioxidante por ABTS¹ y DPPH²

	Maceración	Ultrasonido	Microondas	Soxhlet
Semillas	44.5 ± 0.09 ¹	93.74 ± 0.80 ¹	182.13 ± 0.10 ¹	166.16 ± 0.48 ¹
	128.03 ± 0.63 ²	131.29 ± 0.12 ²	282.75 ± 0.12 ²	235.12 ± 1.13 ²
Hojas	9.80 ± 0.40 ¹	13.72 ± 0.41 ¹	41.14 ± 0.40 ¹	37.16 ± 0.46 ¹
	17.52 ± 0.12 ²	18.91 ± 0.25 ²	56.82 ± 0.19 ²	39.55 ± 0.43 ²
Pulpa	2.03 ± 0.60 ¹	4.86 ± 0.60 ¹	16.82 ± 0.70 ¹	6.24 ± 0.64 ¹
	6.97 ± 0.16 ²	7.07 ± 0.12 ²	10.11 ± 0.63 ²	8.73 ± 0.44 ²
Fruto	2.13 ± 0.50 ¹	6.13 ± 0.30 ¹	18.81 ± 0.19 ¹	8.33 ± 0.28 ¹
	14.28 ± 0.31 ²	16.72 ± 0.70 ²	28.40 ± 0.19 ²	21.37 ± 0.24 ²

Finalmente, los extractos con mayor actividad antioxidante en tejocote criollo (Acetona EF, acetona EAU, acetato de etilo ES y acetona ES) y de injerto (acetato de etilo EF, acetona EF, acetona EAU, acetato de etilo ES Y acetona ES), en la mayoría de los casos presentaron una menor CI₅₀ que antioxidantes de referencia (-tocoferol, ácido cafeico, ácido ascórbico y quercetina), lo que los convierte en frutos con importancia antioxidante.

Polifenoles y carotenoides totales

En un estudio realizado por Gancel y cols. 2007 en naranjilla o lulo (*Solanum quitoense* Lam.), el contenido de carotenoides fue mucho más alto en piel de naranjilla (2.3 mg) que en tejidos placentales (5.0 mg) o pulpa (7.4 mg), comparado con otros frutos tropicales, respecto al contenido en las partes comestibles de manzana de marañón (5.3 mg) y la naranja “pera” (5.4 mg), este fue más alto, pero más bajo que el mango (18.0-25.0 mg) y la papaya (44.0-46.4 mg). Respecto a los frutos de estudio evaluados, estos presentaron menor cantidad de carotenoides que los reportados por Gancel y cols. 2007, en tejocote criollo ($0.219 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$) y de injerto ($0.232 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$).

En un estudio realizado por Dias y cols. 2009, se cuantificó la cantidad de carotenoides totales en la parte comestible de frutos Portugueses tradicionales, se encontró para durazno (0.86 mg/100 g), cereza (0.020 mg/100 g), naranja (var. lane late) (0.0018 mg/100 g) y manzana (0.010 mg/g). Del mismo modo, el contenido de carotenoides para tejocote criollo ($0.219 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$) y de injerto ($0.232 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$), fue menor al reportado en los frutos evaluados por Dias y cols. 2009.

Termentzi y cols en el 2006, evaluaron distintas fracciones de frutos del árbol (*Sorbus domestica*, fam. *Rosaceae*), reportaron que en general el contenido de fenoles totales en un rango de 2.27 a 324 μg de ácido gálico/mg de extracto seco en seis tipos de extractos disminuyó en el siguiente orden: fracciones de acetato de etilo, fracciones de dietil éter, fracciones de diclorometano, fracciones de butanol, residuos, extractos metanólicos y extractos acuosos.

Wang y cols. 1996, evaluaron diversos grupos de frutas con diferencias. Las frutas contienen un grupo de antioxidantes naturales que pueden tener no solo una elevada actividad antioxidante, también una buena combinación o mezcla de antioxidantes. Por ejemplo, 1 lb de fresas (454 g) tuvo una actividad ORAC (6973/mol de equiv Trolox), que equivale a 1.7 g de Trolox.

Asimismo, el contenido de carotenoides y polifenoles totales entre tejocote criollo y de injerto también fue diferente, por ende, el contenido de carotenoides y polifenoles en frutas y vegetales, puede variar entre especies, variedades (biodiversidad), sitio geográfico de producción (sitio, región), y tiempo de almacenamiento (Dias y cols. 2009).

X. CONCLUSIONES

El tejocote criollo mostró la mayor actividad antioxidante por los métodos de evaluación empleados, así como el mayor contenido de polifenoles y carotenoides totales.

La fracción de acetona por EF fue la de mayor AAO, seguida de acetato de etilo por ES con una CI_{50} de 11.41 y 12.86 respectivamente.

Las fracciones más activas mostraron una CI_{50} menor que los AOX de referencia α -tocoferol, ácido caféico y ácido ascórbico, pero mayor que quercetina.

Respecto al método de extracción, la mayor actividad antioxidante se obtuvo por ES en la fracción acetato de etilo, seguido de EF y EAU en la fracción de acetona.

Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre frutos, fracciones obtenidas y métodos de extracción.

Se rechaza hipótesis de estudio.

XI. PERSPECTIVAS

Durante el presente proyecto de investigación se busco el fruto de tejocote (criollo y de injerto) con la mejor actividad antioxidante, los resultados del mismo, proponen al tejocote criollo como un fruto con propiedades antioxidantes importantes, mismas que podrían evaluarse mediante estudios *in vivo*, relacionadas al efecto del compuesto sobre el nivel de biomarcadores de estrés oxidativo después de su ingesta.

Asimismo, los resultados obtenidos en ambos frutos de estudio, nos llevan a considerar el uso de aparatos más especializados como HPLC, para fines de aislamiento y posterior caracterización de los metabolitos presentes en las fracciones de acetato de etilo y acetona, por ser estas las que presentaron mayor actividad antioxidante.

De igual forma, es necesario realizar estudios acerca de la actividad antioxidante respecto a la zona donde se encuentran ubicados los frutos de estudio, debido a que existen estudios en otro tipo de frutos en los que se han encontrado diferencias respecto a la zona donde fueron cultivados.

Otro punto de estudio importante es el seguimiento del método de extracción por Soxhlet, al ser este el que arrojo los mejores resultados, con la finalidad de minimizar aún más el costo (utilización de menos solvente) y tiempo de extracción (desde 8 hasta un mínimo de 6 o 4 horas) e incrementar la optimización del mismo, así como para observar si la actividad antioxidante se mantiene o cambia respecto al tiempo empleado.

Por último, los resultados obtenidos hasta el momento, demuestran que los extractos evaluados exhiben mejores propiedades antioxidantes, que algunos antioxidantes de referencia. Sin embargo, es necesario el aislamiento y caracterización de compuestos individuales, a fin de elucidar sus diferentes mecanismos antioxidantes y la posible existencia de sinergismo entre ellos.

XII. REFERENCIAS

- Aguilera R. M., 2001.** Archivo Personal
- Álvarez E., Jiménez o., Posada C. M. Rojano R. A., Gil H. J., Garaña C. M., Durango D. L., 2008,** Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of rismia genus (*Guttiferae*). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 1, 165-172
- Álvarez –Sala L., Millán J., Oya M., 1996,** La dieta mediterránea en España. ¿Leyenda o realidad? (II). Otros elementos de la dieta mediterránea: verdura y fruta, el pescado. Evolución de la dieta y las enfermedades cardiovasculares en España en las últimas décadas. *Rev. Clin. Esp.*, 196, 78-88
- Ballester M., Honorem V., 1996,** Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med. Clin.*, 107, 509-517
- Bates A. K., Martins N. R., Harvey R. A., 2007,** Oxidative stress in a rat model of chronic gliosis. *Neurobiology of Aging*, 28, 995–1008
- Bolling B. W., Blumberg J. B., Chen O., 2009,** Extraction methods determine the antioxidant capacity and induction of quinone reductase by soy products in vitro. *Food Chemistry*, 116, 351–355
- Borevis A., Chance B., 1973,** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hiperbaric oxygen. *Biochem Journal*, 134, 707-716
- Borevis A., Cadenas E., 1975,** Mitochondrial production of superoxide anions and its relationships to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett*, 54, 311-314
- Bulger M. E., Scott-Helton W., 1998,** Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Clinical nutrition*, 27(2), 403-418
- Casado A., de la Torre R., López-Fernández M. E., Gil P., Egado J. A., 2004,** Enzimas antioxidantes en el infarto cerebral agudo. *Neurología*, 19(1), 5-9
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. L., Páez-Hernández M. E., Rodríguez A. J., Galán-Vidal C. A., 2009,** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871
- Çelik H., Ozgen M., Serc S., Kaya C., 2008,** Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117, 345–348

- Chang S., 2000**, Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenols oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 48:147
- Cheeseman K. H., Slater T. F., 1993**, An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin.* 49 (3), 481-493
- Decker, E. A. (1995)**.The Role of Phenolics, Conjugated Linoleic Acid, Carnosine, and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants. *Nutrition Reviews.* 53 (3): 49-58.
- Dias M. G., Camões M., Oliveira L., 2009**, Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 113, 808–815
- Drogoudi P. D y Tsipouridis C., 2007**, Effects of cultivar and rootstock on the antioxidant content and physical characters of clingstone peaches. *Scientia Horticulturae*, 115, 34–39
- Drogoudi P. D., Michailidis Z., Pantelidis G., 2008**, Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 115, 149–153
- Elsayed M. N., Bendich A., 2001**, Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research*, 21, 551–567
- Errea P., 1998**, Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae*, 7,195–205
- Garcia-Alonso M., Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C., 2004**, Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84, 13–18
- Giuntini D., Graziani G., Lercari B., Fogliano V., Soldatini G. F., Ranieri Annamaria., 2005**. Changes in Carotenoid and Ascorbic Acid Contents in Fruits of Different Tomato Genotypes Related to the Depletion of UV-B Radiation. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3174-3181
- Goldman G., Welbowan R., 1992**. Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B4 diapedesis. *Surgery*, 3, 287-93
- Gunes A., Soylemezoglu G., Linal A., Bagci E. G., Coban S., Sahin A., 2006**, Antioxidant and stomal responses of grapevine (*Vitis vinífera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae*, 110, 279-284
- Gutiérrez-Salinas J., Morales-González J. A., 2004**, Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex*, 20(4), 287-295

- Halliwell, B.**, R. Aeschbach, J. Löliger and O. I. Aruoma., **1995**, The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33, 601–617.
- Handelman G. J.**, **1995**, Carotenoids as scavenger of active oxygen species, *Handboock of antioxidants*, 259-313
- Hassas-Roudsari M**, Chang P.R., Ronald B., Robert T. Tyler T., **2009**, Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry* 114, 717–726
- Hayouni E. A.**, Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., **2007**, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126–1134
- Herbert V.**, Shaw S., Jayatilleke E., Stopler-Kasdan T., **1994**, Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and Vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin. *Stem Cells*, 12, 289-303.
- Jayaprakasha G. K.**, Singh R. P., Sakariah K. K., **2001**. Antioxidant activity of grape seed (*Vitifera vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285–290.
- Johkan M.**, Oda M., Mori M., **2008**, Ascorbic acid promotes graft-take in sweet pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 116, 343-347
- Kevers C.**, Falkowski M., Tabart J., Defraigne J., Dommes J., Pincemail J., **2007**, Evolution of Antioxidant Capacity during Storage of Selected Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8596–8603
- Kevers C.**, Falkowski M., Tabart J., Defraigne J., Dommes J., Pincemail J., Keutgen A. J., Pawelzik E., **2007**, Modifications of Strawberry Fruit Antioxidant Pools and Fruit Quality under NaCl Stress Evolution of Antioxidant Capacity during Storage of Selected Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4066-4072
- Kim Y S.**, Markelonis J. G., Kim Y C., **2002**, Flavonoids of *inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(7), 596–604
- Kinnula L. V.**, Paako P, Soini Y., **2004**, Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung, *FEBS letters*, 569, 1-6

- Lebeau J.**, Furman C., Bernier J-L., Duriez P., Teissier E., Cotelle N., **2000**, Antioxidant properties of di-*tert*-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(9), 900–912
- Lejaa M.**, Mareczeka A., Benb J., **2003**, Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chemistry*, 80, 303–307
- Lin F.** y Giusti M., **2005**, Effects of Solvent Polarity and Acidity on the Extraction Efficiency of Isoflavones from Soybeans (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3795-3800
- Liu D.**, Shi J., Ibarra C. A., Kakuda Y., Jun X. S., **2008**, The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and b-carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT*, 41, 1344–1349
- Ljubuncic P.**, Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H., Bomzon A., **2005**, Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 153–161.
- Lombardi L.**, Sebastiani L., 2004, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168, 797–802
- Londoño-Londoño J.**, Rodrigues de Lima V., Lara O., Gil A., Crecsynski P. T. B., Arango G. J., Ramirez P. J. R., **2010**, Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119, 81–87
- Long S.R.**, Carey R.A., Crofoot K.M, Proteau P.J, Filtz T.M., **2006**, Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*, 13, 643–650
- Long M.**, Millar J. D., Kimura Y., Donovan G., Rees J., **2006**, Metabolite profiling of carotenoid and phenolic pathways in mutant and transgenic lines of tomato: identification of a high antioxidant fruit line. *Phytochemistry*, 67, 1750–1757
- Longo L.**, Vasapollo G., **2005**, Determination of Anthocyanins in *Ruscus aculeatus L.* *Berries. J. Agric. Food Chem.*, 53, 475-479
- López-Gómez E.**, San Juan M. A., Díaz-Vivancos P., Mataix B. J., García- Legaz M. F., Hernández J. A., **2008**, Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidants systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica Lindl*). *Environmental and Experimental Botany*, 60, 151-158

- Lotito B. S., Fraga B. C., 1998,** (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, 24(3), 435–441
- Margaill I., Plotkine M., Lerouet D., 2005,** Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 429 – 443
- Mandel S., Youdim B. Y. M., 2004,** Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(3), 304 – 317
- Mendivil C. O., Sierra I. D., Pérez C.E., Hernández-Abad B., 2002,** Antioxidantes y enfermedad vascular. *Clin Invest Arterioscl*, 14(1), 26-40
- Myung-Min O., Harold N. T., Rajashekara T. B., 2009,** Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, 180-191
- Nieto-Ángel R., Pérez-Ortega S. A., Núñez-Colín C. A., Martínez-Solís J., González-Andrés F., 2009,** Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from Central and Southern Mexico. *Scientia Horticulturae*, 121, 166-170
- Niki E., 2010,** Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503–515
- Nishioka T., Kawabata J., Aoyama Y., 1998,** Baicalein, an r-Glucosidase Inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. *J. Nat. Prod*, 61, 1413-1415
- Olguín C. G., Meléndez M. G., Zúñiga R. A., Pasquetti C. A., 2004,** Antioxidantes y aterosclerosis. *Endocrinología y Nutrición*, 12(4), 199-206
- Palace P. V., Khaper N, Gin G., Singal K. P., 1999,** Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 746–761
- Palozza P., Calviello G., Serini S., Maggiano N., Lanza P., Ranelletti O. F., Bartoli G M., 2001,** β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free radical biology & medicine*, 30 (9), 1000–1007
- Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F., 2005,** Fast Access of Some Grape Pigments to the Brain. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7029-7034
- Pietta P. G., 2000,** Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035 - 1042

- Powis G.**, P Southorn. **1988**, Free radicals in medicine I: chemical nature and biological reactions. *Clinic Proceedings*, 63, 381-389.
- Qadir S. A.**, Kwon M. C., Han J. G., Ha J. H., Chung J. S., Ahn J., Lee H. Y., **2009**, Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 331–338
- Rivero R. M.**, Ruiz J. M., Romero L., **2003**, Can grafting in tomato plants strengthen resistance to thermal stress?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1315-1319
- Rodríguez J.**, Menéndez J. Trujillo Y., **2001**, Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30 (1), 36-44.
- Rop O.**, Jurikova T., Mlcek J., Kramarova D., Senge Z., **2009**, Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains. *Scientia Horticulturae*, 122, 545–549
- Ross A. J.**, Kasum M. C., **2002**, Dietary flavonoids: Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 19–34
- Ryan D.**, Antolovich D., Prenzler P., Robards K., Lavee S., **2002**, Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92, 147-176
- Scalzo J.**, Politi A., Pellegrini A., Battino M., **2005**, Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruits. *Nutrition*, 21, 207-213
- Savvas D.**, Colla G., Roupael Y., Schwarz D., **2010**, Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia Horticulturae*, 127, 156–161
- Sepúlveda J. G.**, Porta D. H., Rocha S. M., **2003**, La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(03), 355-363
- Sharma U. K.**, Sharma K., Sharma N., Sharma A., Singh H. P., Sinha A. K., **2008**, Microwave-Assisted Efficient Extraction of Different Parts of *Hippophae rhamnoides* for the Comparative Evaluation of Antioxidant Activity and Quantification of Its Phenolic Constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *J. Agric. Food Chem*, 56, 374–379
- Soriano A.**, Pérez P. M. J., Vicario A., González J. M., Pérez-Coello M. S., **2006**, Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 10, 1-9

- Sousa A.**, Ferreira I.C.F.R., Barros L., Bento A., Pereira J. A., **2008**, Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ‘‘alcaparras’’. *LWT*, 41, 739–745
- Spigno G.**, Tramelli L., De Faveri D. M., **2007**, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200–208
- Stintzing C. F.**, Trichterborn J., Carle R., **2005**, Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 01, 1-14
- Sumanth M.**, Rana A. C., **2006**, *In vivo* antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats. *Indian J Pharmacol*, 38(1), 54-55
- Talavera S.**, Felgines C., Texier O., Besson C., Manach C., Lamaison J. L., Rémésy C., **2004**, Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Small Intestine in Rats. *J. Nutr.*, 134, 2275–2279.
- Tanguy S.**, Besse S., Ducros V., de Leiris J., Boucher F., **2003**, Effect of increased dietary selenium intake on blood and cardiac selenium status during aging in rats. *Nutrition Research*, 23, 239–243
- Termentzi A.**, Kefalas P., Kokkalou E., **2006**, Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98, 599–608
- Turkmen N.**, Sari F., Velioglu Y. S., **2006**, Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 835–841
- Valls-Belles V.**, **2003**, El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y polifenoles. *Adam*, 1-9
- Verma A. R.**, Vijayakumar M., Rao C. V., Mathela C. S., **2010**, In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 704–709
- Verpoorte R.**, Contin A, Memelink J., **2002** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1, 13-25.

- Viro** M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F., **2007**, New microwave-integrated Soxhlet extraction an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography*, 1174, 138–144
- Vit** P., Gutierrez M. G., Titera D., Bednar M., Rodríguez-Malaver A. J., **2008**, Czech Honey categorized according to their antioxidant activity. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam*, 42 (2), 237-244
- Vivanco** M. J., Cosio E., Loyola-Vargas V. M., Flores E. H., **2005**, Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 68-75
- Wang** H., Nair G. M., Strasburg M. G., Yu-Chen C., Booren M. A., Gray J. I., DeWitt L. D., **1998**, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. *Journal of Natural Products*, 62(2), 294-296
- Wang** S. Y., Lin H. S., **2000**, Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 140-146
- Wang** J., Xiao X., Li G., **2008**, Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography*, 1198–1199, 45–53
- Wu** L., Hsu H., Chen Y, Chiu C., Lin Y., Ho J. A., **2006**, Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, 319–327
- Yajun** Y., Abhijeet K., Mattheos A. G., **2005**, Biosynthesis of Natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71, 5610-561
- Yan** Y., Yu C., Chen J., Li X., Wang W., Li S., **2010**, Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymers*
- Yoo** K., Lee K. W., Park J. B., Lee H. J., Hwang K., **2004**, Variation in Major Antioxidants and Total Antioxidant Activity of Yuzu (*Citrus junos Sieb ex Tanaka*) during Maturation and between Cultivars. *J. Agric. Food Chem*, 52, 5907-5913
- Zhou** H., Liu C., **2006**, Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography*, 1129, 135–139

