



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Evaluación de actividad antioxidante *in vitro* en  
epidermis de manzana (*Malus domestica*)  
variedades california y doble roja**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Lic. Nut. María Guadalupe García Meza

Director de tesis

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Comité tutor

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Arturo Navarro Ocaña

## Índice

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1 <i>Rosaceae</i> .....	4
1.2 <i>Malus X</i> manzana domestica .....	4
1.3 Alimentos funcionales y nutraceuticos. ....	5
1.3.1 Alimento funcional .....	6
1.3.2 Nutraceutico .....	6
1.4 Fitoquímicos .....	8
1.5 Triterpenos .....	13
1.6 Antioxidantes Fitoquímicos .....	15
1.7 Radicales libres .....	17
1.8 Métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante.....	17
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	21
2.1 Valor nutricional y composición de fitoquímicos en manzana.....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	29
6.1 Obtención de la muestra .....	29
6.2 Determinación de polifenoles totales .....	29
6.2.1 Extracción de polifenoles libres para epidermis deshidratada y fresca. ....	30
6.2.2 Cuantificación de polifenoles totales. Folin-Ciocalteau .....	30
6.2.3 Determinación de polifenoles totales en extractos .....	31
6.3 Determinación de carotenoides totales .....	31
6.4 Evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH .....	31
6.5 Actividad Antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) .....	32
6.6 Técnica para determinar el contenido de TBARS.....	33
6.6.1 Disección y homogenizado del tejido cerebral de rata .....	33
6.6.2 Cuenta de proteínas por el método de Lowry .....	34

6.6.3 Inducción de estrés oxidante con FeSO <sub>4</sub> 10 μM.....	35
6.7 Determinación cualitativa de ácido ursólico .....	37
7. RESULTADOS .....	37
7.1 Obtención de la muestra biológica .....	37
7.2 Extractos.....	38
7.3 Contenido de carotenos totales.....	39
7.4 Contenido de polifenoles totales .....	39
7.5 Evaluación de actividad antioxidante.....	42
7.5.1 Actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC).....	42
7.5.2 Evaluación de actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).....	45
7.5.3 IC <sub>50</sub> de los extractos más activos (DPPH).....	48
7.5.4 Determinación del contenido de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en cerebro de rata inducidos con FeSO <sub>4</sub> .....	49
7.5.5 IC <sub>50</sub> de los extractos más activos (TBARS).....	51
7.5.6 IC <sub>50</sub> de antioxidantes sintéticos de referencia, en los modelos de DPPH y TBARS.....	53
7.6 Correlación de actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales de cada extracto. ....	53
7.7 Determinación de Ácido ursólico .....	54
8 DISCUSIÓN .....	54
8.1 Contenido de carotenos totales.....	54
8.2 Contenido de polifenoles totales .....	55
8.3 Evaluación de actividad antioxidante.....	56
8.3.1 Actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC).....	56
8.3.2 Evaluación de actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).....	57
8.3.3 Determinación del contenido de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en cerebro de rata inducidos con FeSO <sub>4</sub> .....	58
8.4 Correlación de polifenoles y actividad antioxidante .....	58

<b>8.5 Determinación de ácido ursólico .....</b>	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Rosaceae*

La familia *Rosaceae* alberga árboles, arbustos y principalmente hierbas perennes que van geográficamente de los trópicos al ártico. Existen cuatro subfamilias: *Spiraeoideae*, *Rosoidae* (ej. *Rosa spp.*, *Rubus spp.*, *Fragaria spp.* etc.), *Amygdaloideae* o *Prunoideae* (ej. *Prunus spp.*, etc.) y *Maloideae* (ej. *Malus spp.*, *Eriobotria japonica*, *Pyrus spp.*, *Cydonia spp.*, etc.) (Watson y Dallwitz 1992). Se estima que hay aproximadamente 100 generos y 2000 especies. La mayoría de las especies dentro de la familia presentan flores aplanadas con cinco sépalos y cinco pétalos con márgenes ondulados, y diez o más estambres. En *Rosoidae* muchos pistilos apocarpos convertidos en aquenios. En *Prunoideae* un solo pistilo monocarpelado maduro en una drupa. En *Spiraeoideae* el gineco consta de dos o más pistilos apocarpos que se desarrollan en los folículos. A excepción de *Maloideae*, el ovario es superior y por lo general hay un cierto desarrollo en la zona periginea. Dentro de *Maloideae* el ovario es compuesto e inferior, y puede estar en una zona epiginea.

Esta familia tiene importancia sobre todo por sus especies de frutos comestibles como: *Crataegus mexicana* (tejocote), *Prunus armeniaca* (chabacano), *Prunus domestica* (ciruelo), *Prunus pérsica* (durazno), *Prunus serótina ssp.* (capulín), *Pyrus communis* (peral), *P. malus* (manzano), o bien por sus flores ornamentales como *Rosa ssp.* (rosa), un arbusto ornamental cultivado con frecuencia en el valle de México es *Pyracanta koidzumil* (piracanto) (Rzedowski y Rzedowski 2001).

### 1.2 *Malus X manzana domestica*

La manzana se encuentra dentro del género *Malus* Miller en la subfamilia *Maloideae*, una de cuatro subfamilias en la familia *Rosaceae*. *Malus* Mill. Está compuesto por árboles deciduos

muy ramificados que se cultivan como huertos o plantas ornamentales. Se dice que el género *Malus* contiene de ocho a 78 especies, pero 25 especies están aún en consenso. La clasificación para las especies es complicada debido a la gran diversidad genética, potencial hibridación y la presencia de apomixis y poliploidia. Diferentes clasificaciones se han basado en caracteres morfológicos, número de cromosomas, análisis molecular y de cruzabilidad. La presencia de cáliz deciduo o persistente es a menudo usada como criterio de clasificación.

*Malus* es un fruto en forma de pomo, es carnoso que consiste en un núcleo central con las semillas delimitada por una cápsula de carpelos unidos. La capa exterior carnosa del receptáculo agrandado es la parte comestible del fruto. Los racimos de flores son en su mayoría simples, sin un tallo central de columna. El hipanto es abierto en antesis y no es cerrado sobre los estilos. Los estilos son más o menos conados basalmente. Las flores de manzana son blancas, rosadas o carmín, los pétalos son por lo general suborbicular u obovadas. Los estambres van de 15 a 50 por lo general con anteras amarillas. El ovario es inferior y de dos a cinco estilos conados a la base.

El género *Malus* se caracteriza por una gran diversidad fenotípica y genotípica. La alta heterocigosidad es reforzada por la autoincompatibilidad y la depresión endogama. Las manzanas “cultivadas” abarca muchos tipos, se trata de un complejo híbrido enterespecífico. Mientras que el binomio *Malus X domestica* Borkh se ha convertido en la designación estándar.

### **1.3 Alimentos funcionales y nutraceuticos.**

En el último siglo se ha observado una transición epidemiológica, en 1900, la esperanza de vida era de 47 años, con enfermedades infecciosas (p. ej. Tuberculosis) como principales causa de mortalidad. En el año 2000, la esperanza de vida había aumentado hasta los 75 años para hombres y 80 para las mujeres. Los datos anteriores tienen importantes implicaciones demográficas, por ejemplo, se ha calculado que en la Unión Europea, entre 1995 y 2015, el

grupo comprendido entre los 20 y 29 años de edad, disminuirá en 11 millones (un descenso del 20%) y en el grupo de 50 a 64 años de edad se darán incrementos significativos en la incidencia absoluta de las enfermedades crónico degenerativas relacionadas con el envejecimiento (enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, etc.), del mismo modo aumentará el riesgo de infecciones, con implicaciones concomitantes para los costos de sanidad (Rowland 2002).

Debido a esto se ha observado una tendencia hacia el consumo de productos que reportan algún beneficio a la salud. Al paso del tiempo, han surgido muchas expresiones para describir los múltiples productos naturales con efectos sobre la salud. Algunas de éstas son “nutraceúticos”, “alimentos funcionales”, “farmalimentos”, “alimentos de diseño”, “vitalimentos”. “sustancias fitoquímicas” y “alimentacinas” (Mazza 2000). Debido a esto, surge la necesidad de uniformar la terminología empleada.

### **1.3.1 Alimento funcional**

El término alimento funcional fue usado por primera vez en Japón en la década de 1980, para productos alimenticios enriquecidos con componentes especiales que poseen efectos fisiológicos benéficos. En 1991, el ministerio de salud japonés publica la reglamentación para los “Alimentos para uso específico de salud” (Food for Specified Health Uses, FOSHU) que incluyó el establecimiento de especificaciones sanitarias para este tipo de alimentos.

### **1.3.2 Nutraceutico**

Otro término empleado es “nutracéutico”, que fue designado en 1989 por la Fundación para la Innovación en Medicina (Nueva York, EE.UU.), para proporcionar un nombre a ésta área de rápido crecimiento en la investigación biomédica. Un nutracéutico se define como *“cualquier sustancia que puede ser considerado un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades”* (DeFelice 1992). Éste puede variar desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y

alimentos “diseñados” mediante el uso de ingeniería genética, productos procesados a base de plantas y productos tales como cereales, sopas y bebidas. Sin duda, muchos de estos productos poseen pertinentes funciones fisiológicas y valiosas actividades biológicas. (Andlauer y Fürst 2002)

En Norteamérica, se han utilizado indistintamente las expresiones alimento funcional y producto nutracéutico, y se han dado diversas definiciones que describen el amplio conjunto de productos. El Health Protection Branch de Canadá, organismo responsable de la protección de la salud de los ciudadanos canadienses, ha sugerido que las expresiones “alimento funcional” y “nutracéutico” se utilicen de forma independiente para referirse a éstas dos formas de presentación (Scott y cols. 1996), según las siguientes definiciones:

*“Un alimento funcional tiene una apariencia similar a la de un alimento convencional, se consume como parte de una dieta normal y, además de su función nutritiva básica, se ha demostrado que presenta propiedades fisiológicas benéficas y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas”.*

*“Alimento funcional es cualquier alimento que además de su aporte de nutrientes tiene un impacto en la salud física o mental del individuo” (American Dietetic Association, 1995)*

*“Un producto nutracéutico es un producto elaborado a partir de un alimento, pero que se vende en forma de píldoras, polvos, (pociones) y otras presentaciones farmacéuticas no asociadas generalmente con los alimentos, que han demostrado tener propiedades fisiológicas benéficas y/o protege contra enfermedades crónicas”, (Rowland 2002, Mazza 2000).*

Los suplementos alimenticios y alimentos funcionales actualmente reciben el reconocimiento internacional ya que tienen potencialmente efectos benéficos sobre la salud cuando se consumen como parte de la una dieta variada de modo regular y en los niveles efectivos. La



comunidad científica y la industria alimentaria son motivadas para extender la calidad de vida y en particular, el tratamiento de las enfermedades crónicas del envejecimiento (Temple 2002).

La creciente evidencia de los estudios epidemiológicos, la investigación con animales, los ensayos clínicos y la investigación en bioquímica nutricional sugiere que algunos suplementos dietéticos pueden ser benéficos en enfermedad coronaria (Hu 2002), cáncer (Willis y Wians 2003) y otras enfermedades crónico degenerativas como diabetes (Silvis 1992) y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Mandel y cols. 2004)

Se han tratado de identificar los componentes exactos de estas dietas que le confieren la protección contra estas enfermedades. Por ejemplo, personas que consumen mayor cantidad de alimentos ricos en luteína como huevos de gallina, espinacas, tomates, naranjas y verduras de hoja verde presentan menor incidencia de cáncer de colon (Nkondjock y Ghadirian 2004).

Así pues, es necesaria la investigación adicional para descubrir qué individuos en la población son más probables que beneficiarse de un alimento funcional e igualmente indagar para tener una mejor comprensión de cómo los componentes funcionales en los alimentos podría aumentar la prevención y el tratamiento de enfermedades.

#### **1.4 Fitoquímicos**

Por lo que se refiere a compuestos fitoquímicos, éstos son también nutraceuticos por definición (Andlauer y Fürst 2002), debido a la forma en que proporcionan beneficios médicos y de salud, fitoquímicos que han sido hallados en frutas, vegetales, especias y plantas medicinales tradicionales, exhiben un amplio rango de efectos fisiológicos, tales como antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, anticarcinogénicos, cardioprotectores y vasodilatadores (Hollman y Katan 1999, Moure y cols. 2001, Tsao y Deng 2004, Balasundram y cols. 2005). Los fitoquímicos no tienen una función

nutricional definida, pero debido a los efectos citados anteriormente, es que tienen un impacto significativo en el curso de enfermedades crónicas y de envejecimiento, ya que son preventivos contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, malaria, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas (Dwyer 1996, Hollman y Katan 1999, Mazza 2000, Tsao y Deng 2004, Lotito y Frei 2004). En la actualidad estas sustancias, son objetivo de los laboratorios de investigación de la industria farmacéutica y alimentaria, ya que son indispensables a largo plazo para la salud de los seres humanos.

Por lo que respecta a la biosíntesis de fitoquímicos, éstos provienen de un pequeño número de compuestos primarios que sirven como precursores de la gran serie de fitoquímicos producidos por las plantas, la mayoría de éstos son productos tempranos de la fotosíntesis. Los metabolitos secundarios no son vitales para la síntesis de tejido o producción y almacenamiento de energía en la planta, pero su producción es esencial para la viabilidad de la misma (Lampe 2003). Algunas evidencias de las funciones biológicas de los metabolitos secundarios en los organismos que los producen son: las propiedades protectoras de estos compuestos en tejidos vegetales contra la radiación UV-B, como fitoalexinas, como antibacterianos, además de contribuir en las características sensoriales de las distintas frutas y vegetales, como sabor y color. Un amplio rango de colores en flores, frutas y vegetales resultan de la presencia de pigmentos como clorofila, carotenoides, betalainas y antocianinas (Fig. 1) como procianidinas (Delgado y cols. 2000). Las procianidinas (Fig. 2) son pigmentos que podemos encontrar en el vino tinto, en los cereales y mayoritariamente en las frutas, especialmente en la piel de estas últimas. Además pueden existir bajo diferentes formas químicas, siendo la cianidina la más común. El contenido en los alimentos está en función de la intensidad del color. Puede llegar hasta 2000-4000 mg/kg en las grosellas y fresas. Estos valores aumentan con el proceso de la maduración (Clifford 2000).

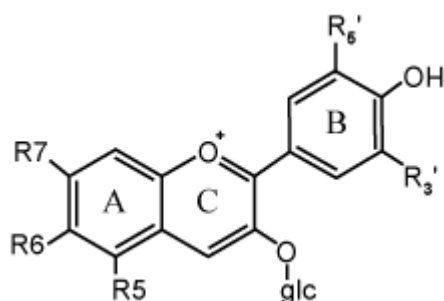


Fig.1, Estructura base de antocianinas, donde R puede ser algún sustituyente como OH

A propósito de color, éste es un factor importante en la aceptabilidad de un alimento, esta propiedad se debe a la habilidad de reflejar o emitir diferentes cantidades de energía a longitudes de onda capaces de estimular la retina del ojo. Las antocianinas producen atractivos colores que van desde el naranja, rojo, morado y azul, estos pigmentos son característicos de la familia *Angiospermae* (Clement y Mabry 1996). Las antocianinas son comúnmente encontradas en las capas epidermales de un gran número de frutas, como las manzanas (*Malus domestica*), ciruelas (*Prunus domestica*) y peras (*Pyrus communis*), las antocianinas también han sido encontradas en la pulpa. Por ejemplo, en las cerezas dulces (*Prunus avium*), la epidermis contiene cantidades significativas de antocianinas, la pulpa podría tener algunas pequeñas concentraciones del mismo compuesto, pero con las cerezas ácidas (*Prunus cerasus*) hay algunas variedades, como la Montmorency, con antocianinas solo en la epidermis.

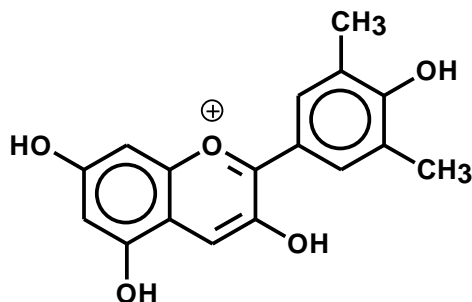


Fig. 2, Cianidina de fresa.

Además de los atributos de color que proporcionan compuestos polifenólicos, se han reportado beneficios a la salud, efectos fisiológicos como antineoplásicos, radioprotectores antiinflamatorios, quimioprotectores, hepatoprotectores y vasoprotectores (Kamei y cols.

1995). En los últimos años, se ha dado una gran atención a la posible protección ejercida por antioxidantes naturales presentes en las plantas comestibles, particularmente los flavonoides y polifenoles, y la reducción del riesgo de enfermedades coronarias, esta asociación ha sido parcialmente explicada basada en el hecho que los polifenoles interrumpen la peroxidación lipídica inducida por las especies reactivas de oxígeno.

Estos compuestos son asociados con las características sensoriales y nutricionales de los alimentos. (Meh y Hokhar 2002). Estos y la mayoría de fitoquímicos son biosintetizados principalmente a partir de 3 reconocidas rutas metabólicas: la ruta del ácido shikímico, la ruta del ácido cinámico y la ruta del isopreno (Lampe 2003). Por otra parte el ácido pirúvico, un producto temprano de la fotosíntesis, es el punto de partida para la ruta del isopreno, de donde se derivan las familias de carotenoides (fig. 3), terpenos y saponinas.

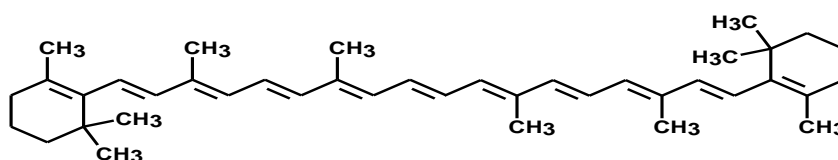


Fig.3, Estructura de un carotenoide

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales presentes en las frutas y hortalizas que son las encargadas de impartir coloraciones que van del amarillo al rojo. En humanos su importancia en la salud se relaciona con sus acciones como provitamina A, antioxidantes, diferenciación celular y reguladores de proliferación, estimuladores de comunicación célula-célula, función inmune moduladores del metabolismo carcinógeno y filtros de luz azul; existen numerosos estudios que muestran una fuerte relación entre ingesta de carotenoides tanto como con la mejora del sistema inmunitario y reducción del riesgo de algunas enfermedades degenerativas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular. (Cooper 2004, Krinsky y Johnson 2005). Los carotenoides también funcionan como atenuadores del oxígeno atómico, como antioxidantes, en la activación de genes, y como modulador de lipoxigenasas en inflamación y procesos inmunes (Bendich

1993).

La ruta del ácido shikímico es la mayor fuente de carbono para muchos compuestos, en parte porque se forman como productos finales 3 aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptófano y tirosina, que son precursores importantes en varias rutas sintéticas, por ejemplo la fenilalanina, es el punto de partida para la ruta del ácido cinámico, que produce numerosos ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, isoflavonas y ligninas.

Los flavonoides son metabolitos secundarios derivados del fenol (fig. 4) estos compuestos son de tipo fenilpropano que generalmente se encuentran como *O*-glicósidos en sus fuentes naturales, aunque también se encuentren de forma natural como agliconas o como *C*-glicósidos. Poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos, la mayoría de los flavonoides se representan como moléculas de tipo  $C_6-C_3-C_6$  con dos anillos aromáticos y un heterociclo con oxígeno (fig. 5) (Harbone y Baxter 2000).

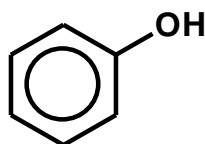


Fig. 4, Estructura del fenol

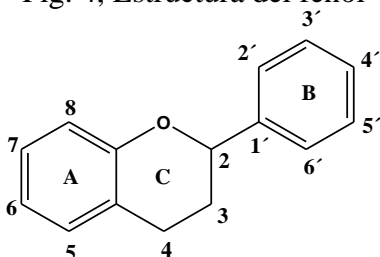


Fig. 5, Estructura base de los flavonoides y sistema básico de numeración

Los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base. Así, cuando la estructura posee un carbonilo en la posición 4, el esqueleto se denomina flavanona.

La introducción de un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 de las flavanonas, de los dihidroflavonoles conduce a los esqueletos que se denominan flavona y flavonol, respectivamente.

Asimismo, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, encontrándose en muchas familias inferiores, como líquenes y musgos, en casi todas las familias superiores, también se observa su relación con las propiedades defensivas de las plantas. Se han aislado escasamente en hongos, en bacterias hasta hoy no hay reportes de su existencia. En animales solo se tiene reportes de flavonoides en la glándula productora del olor característico del castor canadiense y en las alas de una mariposa, pero su origen no es atribuible a biosíntesis animal, sino a los alimentos que consumen (Brouillard y cols. 1993).

### **1.5 Triterpenos**

Los triterpenos (30 átomos de carbono: seis unidades isoprénicas) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estos productos se encuentran ya sea en su estado libre o acompañados de azúcares (glicósidos). Se han propuesto diversos métodos de clasificación, de estos destaca el que los divide por familias tomando en cuenta el número de anillos que los conforman (acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos) y dentro de estas familias, se encuentran subclasificados por grupos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, Lupeol, etc.). Hoy en día se conocen más de 40 esqueletos triterpénicos básicos que pueden ser agrupados en esta clasificación y cada año se reportan nuevos.

A pesar de los limitados usos medicinales reportados para los triterpenos, se está haciendo investigación en esta línea y los resultados indican el gran potencial que tienen como drogas y posibles agroquímicos. En este sentido se puede mencionar la actividad antiinflamatoria de los triterpenos, cuando la inflamación es producida por activadores de la protein-kinasa C (Huger y cols. 2000).

El ácido ursólico (ácido 3-hidroxi-urs-12-ES-28-oico; UA) y su isómero del ácido oleanólico (3-hidroxi-olea-12- en ácido-28-oico; OA) son fitoquímicos comunes, que se encuentran naturalmente en diversas plantas, como algas marinas, como recubrimientos de frutas y muchas hierbas medicinales, por ejemplo romero, tomillo, orégano y lavanda (Ovesn´a y cols. 2004), y por lo tanto su distribución en la dieta humana es muy amplia. Estos ácidos triterpenos pentacíclicos existen en las plantas en forma de ácidos libres o agliconas de saponinas triterpenoides (Liu 1995).

Los usos tradicionales de plantas que contengan la AU y la OA en la medicina popular son múltiples y muchos de sus efectos terapéuticos han sido confirmados por investigación científica (Liu 1995).

UA y OA tienen estructuras moleculares similares, pero sitios diferentes del grupo metilo en el anillo E: si el grupo metilo en C<sub>19</sub> del AU se mueve a C<sub>20</sub>, cambia a OA (Fig. 6) (Li y cols. 2002). Ambos compuestos se consideraron biológicamente inactivos durante mucho tiempo, pero en los últimos años han atraído el interés de la comunidad científica médica, debido a sus efectos farmacológicos, combinados con una baja toxicidad (Novotn´y y cols. 2001). Ha sido demostrado que actúan en las diversas etapas de desarrollo de tumores, incluyendo la inhibición de la formación de tumores (Lee y cols 2001, You y cols. 2001, Shishodia y cols. 2003), la inhibición de la promoción tumoral (Tokuda y cols. 1986, Li y cols. 2002), y la inducción de diferenciación de las células del tumor (Lee y cols.1994). Ellos efectivamente inhiben la angiogénesis (Sohn y cols. 1995, Cardenas y cols. 2004), la invasión de las células tumorales y la metástasis (Shishodia y cols. 2003). Además de estos efectos, se ha informado que tienen otros como antiinflamatorios (Giner-Larza y cols. 2001, Ismaili y cols. 2002, Banno y cols. 2004), hepatoprotector (Saraswat y cols. 1996), gastroprotectores (Rodriguez y cols. 2002), contra el VIH (Kashiwada y cols. 1995), contra enfermedades cardiovasculares (Somova y cols 2003), hipolipemiantes (Rodriguez y cols. 2002, Somova y cols 2003), antiaterosclerótico (Somova y cols 2003) y efectos inmunorreguladores (Raphael y Kuttan 2003).

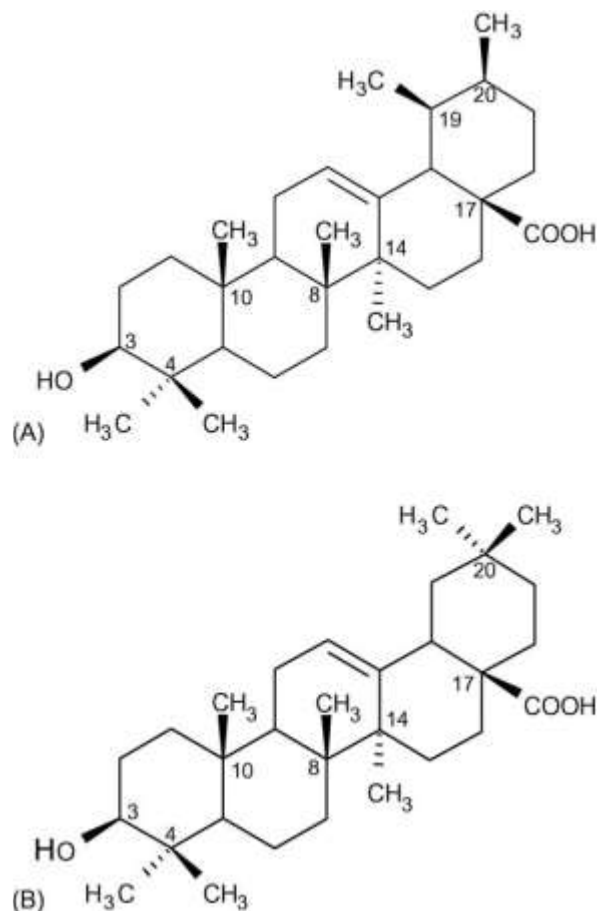


Fig. 6 Acido ursólico (A), ácido oleanólico (B)

## 1.6 Antioxidantes Fitoquímicos

Algunos estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que el consumo regular de frutas y hortalizas está fuertemente asociado con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras. Recientemente, el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales (fitoquímicos) se ha incrementado considerablemente, con la finalidad de usarlos en alimentos o fármacos para sustituir antioxidantes sintéticos, restringidos debido a sus efectos secundarios como carcinogénesis. Los representantes más destacados de los antioxidantes fitoquímicos son los carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles y flavonoides, todos estos pueden proteger al cuerpo



humano de los radicales libres y retrasan el progreso de muchas enfermedades crónicas, así como la rancidez en los alimentos debido a la oxidación de los lípidos (Peschel y cols. 2006).

La importancia de los antioxidantes fitoquímicos es:

- Ya sea por vía endógena o por adición, los antioxidantes brindan protección a los componentes del alimento contra el deterioro oxidativo.
- Los antioxidantes provenientes de la dieta pueden ser absorbidos por el cuerpo humano, proveyéndole de efectos benéficos.
- Por el creciente interés de los antioxidantes fitoquímicos para su uso terapéutico (Ej. Como anti-inflamatorio, anti-isquémico y como agentes antitrombóticos), (Cadenas y Packer 2002).

Muchos fitoquímicos que están presentes en los alimentos son capaces de interferir en las reacciones en cadena de los radicales libres durante el deterioro oxidativo de los lípidos. Los fitoquímicos inhiben la formación de hidroperóxidos (ROOH), catalizada por metales, radiación y los radicales libres en sí, además presentan capacidad “secuestrante” de los radicales peroxi, alcoxi, hidroxilo y oxígeno singulete (Branen y cols, 2002). Antioxidantes, como la Vitamina C y tocoferoles son utilizados ampliamente en la industria y son esenciales para la protección contra las EROs (Especies reactivas al Oxígeno); sin embargo, éstos están siendo sustituidos por los Flavonoides, debido a que se ha comprobado que la actividad mayoritaria de la capacidad antioxidante en las frutas y vegetales es debida principalmente por los ácidos fenólicos y los flavonoides, y no de las Vitaminas C, E y/o  $\beta$ -carotenos (Tsao y cols., 2004). La contribución de la vitamina C a la actividad total de las frutas, ha sido determinada y generalmente esta es < 15 % (Wang y cols. 1996).

La ingesta de dietas controladas ricas en frutas y vegetales incrementan significativamente la capacidad antioxidante del plasma, en cambio este efecto no pudo explicarse por el aumento en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol o carotenoides en el plasma. Entre los distintos grupos de antioxidantes naturales de origen vegetal, los carotenoides y los polifenoles son quizás los dos más importantes (Tsao y Deng 2004).

## 1.7 Radicales libres

Un radical libre es una molécula que en su orbital externo presenta un electrón desapareado o impar, siendo muy inestable y altamente reactivo (Young y cols. 2001); logra su equilibrio cuando sustrae un electrón a una molécula próxima provocando su oxidación y alterando su estructura; generando otro radical libre agresivo y así una reacción en cadena.

Durante el metabolismo normal de células aeróbicas, el oxígeno molecular se reduce a agua, sin embargo, la transferencia de electrones genera especies reactivas de oxígeno (EROs), incluidos los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroxilo ( $OH\cdot$ ). La peroxidación de lípidos es otra fuente importante de EROs. Además, los EROs pueden formarse en la célula como consecuencia de estrés ambiental. La generación excesiva de EROs y otros radicales pueden dañar las proteínas, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y ADN, que causan estrés oxidante además de una variedad de procesos degenerativos y patologías como envejecimiento, inflamación, arteriosclerosis, enfermedades coronarias.

En nuestro cuerpo existe un equilibrio entre generación de EROs y su absorción por el sistema antioxidante. Un desequilibrio entre EROs y los mecanismos de defensa antioxidante llevan a modificación de moléculas en la membrana celular debido a la oxidación. La actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto (composición) de inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo la peroxidación lipídica (Roginsky y Lissi 2005).

## 1.8 Métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante.

Algunos métodos *in vitro* e *in vivo* han sido desarrollados para evaluar la actividad antioxidante. Sin embargo, no hay un sistema perfecto disponible que nos ayude a conocer la “verdadera” actividad antioxidante, tanto de forma individual, como de una mezcla compleja de antioxidantes fitoquímicos, ya que, más de un mecanismo está involucrado. Durante la

oxidación lipídica, los antioxidantes fitoquímicos actúan de diferentes maneras (Moure y cols. 2001):

- I. Uniéndose a metales iónicos
- II. “Secuestrando” radicales libres, y
- III. Descomponiendo peróxidos.

Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2(FLA2),<sup>12</sup> al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). En comparación a los antioxidantes sintéticos, como son: el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), que sólo tienen un modo de acción, que es el “secuestro” de radicales libres (Moure y cols. 2001, Tsao y Deng 2004).

La actividad antioxidante es ampliamente usada como parámetro de caracterización, junto con otros, de los diferentes materiales naturales (Frutas, vegetales, vinos, aceites, etc.). Esta actividad está relacionada con los compuestos capaces de proteger un sistema biológico contra los potenciales daños de los efectos inducidos por la oxidación, que involucra las especies reactivas al oxígeno y las especies reactivas al nitrógeno (Arnao 2000). La actividad antioxidante puede y debe ser evaluada con diferentes pruebas para los distintos mecanismos (Moure y cols. 2001).

La forma en la que se puede evaluar la Actividad Antioxidante puede realizarse por dos métodos:

- I. Métodos Directos

## II. Métodos Indirectos

En los métodos indirectos, el estudio está enfocado principalmente a la habilidad del antioxidante de “secuestrar” radicales libres, los cuales no están asociados realmente con la degradación oxidativa y los efectos de los metales de transición. Como ejemplo de este tipo de métodos algunos radicales libres que sean estables y altamente coloridos (ABTS, DPPH) han sido empleados y para estos casos se cambia la determinación de la actividad antioxidante para determinar la actividad donante de hidrógeno. Mientras que los métodos directos están basados en el efecto del antioxidante sobre la degradación oxidativa en el sistema de prueba. Como sustratos de oxidación, pueden emplearse: lípidos individuales, mezclas de lípidos, proteínas, DNA o lípidos que contienen especies biológicamente importantes, tales como; plasma, LDL, membranas biológicas, etc. (Roginsky y Lissi 2005).

<b>Pruebas para determinar actividad antioxidante</b>
<b>Oxidación de emulsiones en sistemas hidrofílicos e hidrofóbicos</b>
Aceites vegetales y marinos Ácidos grasos, Metil ésteres de ácidos grasos, Ácidos grasos esterificados Fosfolípidos Citronelal Oxidación del Beta-caroteno en emulsión de ácido linoléico
<b>Secuestro de Radicales</b>
ABTS+ (enzimático y químico) Radical peroxi alquilo Actividad secuestrante del radical $\alpha$ , -difeníl - $\beta$ - picrilhidrazilo Actividad secuestrante del radical hidroxilo Capacidad de absorbancia del radical oxígeno Actividad secuestrante del radical superóxido
<b>Otros</b>

<p>Potencial redox</p> <p>Poder reductor (reducción del ion <math>\text{Fe}^{3+}</math>)</p> <p>Degradación proporcional de los compuestos fenólicos como consecuencia de su actividad antioxidante</p> <p>Actividad quelante del <math>\text{Fe}^{2+}</math> y <math>\text{Cu}^{2+}</math></p>
<p><b>Modelos de oxidación en membranas biológicas, ensayos celulares y ensayos <i>in vivo</i></b></p>
<p>Liposomas (Peroxidación lipídica inducida por rayos UV)</p> <p>Oxidación mitocondrial en ratas vivas</p> <p>Actividad secuestrante de radicales en plasma</p> <p>Actividad antiúlcerativa</p> <p>Microsomas</p> <p>Peroxidación de microsomas inducida por NADPH/hierro</p> <p>Oxidación liposómica de la Fosfatidilcolina</p>
<p><b>Ensayos de Fragmentación y Oxidación del DNA, Daños del DNA dependientes de la bleomicina</b></p>
<p>Capacidad antioxidante del plasma de ratas por inducción de Cu y AAPH</p> <p>Oxidación del plasma sanguíneo</p> <p>Experimentos animales, reducción de toxina urémica en la sangre de ratas</p> <p>Actividad antiúlcerativa</p> <p>Producción de leucotrienos por neutrófilos humanos</p>
<p><b>Estabilidad en Alimentos</b></p>
<p>Almacenamiento de productos cárnicos</p> <p>Estabilidad lipídica en productos extruídos de maíz</p> <p>Estabilidad lipídica en productos cárnicos precocidos</p> <p>Estabilidad de aceites durante el freído</p> <p>Estabilidad de materiales que contienen carotenoides</p> <p>Estabilidad oxidativa de un homogenizado de muslo de pavo</p>

Fig. 7 Pruebas para determinar actividad antioxidante (Moure 2001).

De la batería de pruebas para medir la actividad antioxidante, son sólo algunas las que de acuerdo a la logística y recursos son posibles de efectuar, por lo tanto, las metodologías más frecuentemente usadas, son aquellas que emplean técnicas que evalúan compuestos cromógenos que tienen alta estabilidad para su evaluación debido a que son fáciles, rápidas y sensitivas para la evaluación antioxidante *in vitro*. (Arnao 2000).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Valor nutricional y composición de fitoquímicos en manzana

Se considera que el consumo regular de frutas y hortalizas en general disminuye el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Las manzanas son bajas en energía, pero son una buena fuente de vitaminas, minerales, pectina (Fig. 8), así como metabolitos secundarios (Fig. 9). Con base en estudios epidemiológicos, se considera que las manzanas pueden jugar un rol en el mantenimiento de un estilo de vida saludable en general.

En comparación con otras frutas y hortalizas, el consumo de manzanas puede estar asociado con un riesgo reducido de cáncer, enfermedades cardíacas y la diabetes tipo II, así como una pérdida de peso mayor (Boyer y Rui 2004). La pectina, una fibra soluble que tiene un impacto positivo sobre la saciedad y puede atenuar los niveles de glucosa en la sangre y de lípidos en sangre cuando se ingiere en grandes cantidades.

	Manzana
Agua (g)	85.3
Energía(kcal/kJ)	54/227
Proteína (g)	0.3
Grasa (g)	0.6
Hidratos de carbono (g)	11.4
Fibra (g)	2
Pectina (g)	0.5
Potasio (mg)	144
Calcio (mg)	7
Magnesio (mg)	6
Fósforo(mg)	12
Vitamina C (mg)	12
Ácidos orgánicos (g)	0.5

Fig. 8 Contenido medio de nutrientes en manzanas (por 100 g de peso fresco)  
Fuente: Souci y cols. 2005

Las manzanas contribuyen de manera importante a la ingesta de flavonoides en los seres humanos. Así que actúan como antioxidantes más importantes, estos pueden limpiar y neutralizar los radicales libres, que a su vez desempeñan un papel en la aparición de enfermedades degenerativas (Biedrzycka y Amarowicz 2008). Sin embargo, su contenido varía considerablemente con la variedad, condiciones de almacenamiento y otras condiciones pre y post-cosecha.

Las manzanas son buena fuente de procianidinas oligoméricas, integrado unidades de catequina, que recientemente se consideran de interés por potenciales efectos de promoción de la salud (Aron y Kennedy 2008). En las manzanas, 63-77% de los todos los polifenoles se atribuyen a procianidinas oligoméricas. Los compuestos polifenólicos que contribuyen en mayor parte en la actividad antioxidante son epicatequina y procianidina.

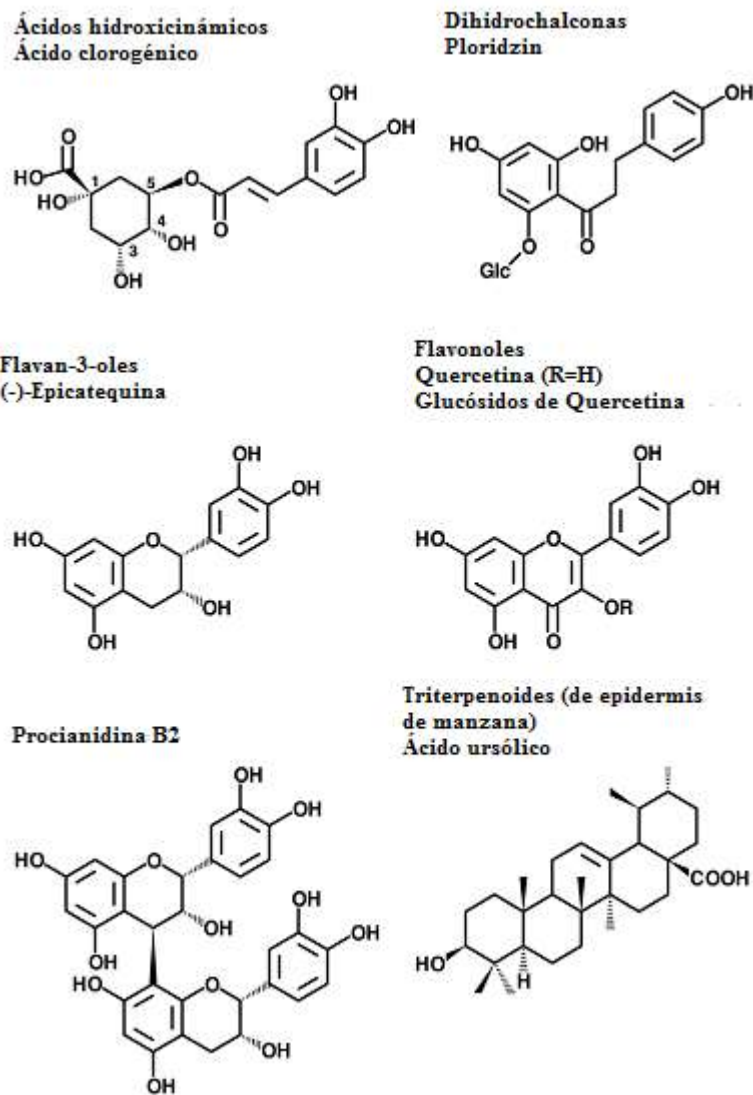


Fig. 9 Estructuras químicas de componentes de manzana

En otro estudio, se encontró que la vitamina C en la piel de las manzanas proporciona sólo 0.4% de la actividad del antioxidante total, sugiriendo que la principal actividad antioxidante es dada por compuestos fenólicos (Eberhardt y cols. 2000). Asimismo, se ha reportado que la actividad antioxidante de las manzanas es correlacional con el contenido total de fenoles (Tsao y cols. 2005).



Además de los polifenoles, la epidermis de manzana contiene una considerable cantidad de triterpenoides lipofílicos, que se concentran en la capa de cera cuticular. El triterpeno más abundante, ácido ursólico, se aisló en cantidades de hasta 50 mg por fruta de tamaño mediano (Frighetto y cols. 2008). Una serie de trece triterpenos con actividad antiproliferativa se aisló de la cáscara de manzana por la extracción con disolventes orgánicos (He y Liu 2007).

Entre las clases mayoritarias de los polifenoles de la manzana, podemos hallar a los flavan-3-ol, que son preponderantes, llegando a estar presentes en formas monoméricas llamadas catequinas, o en su forma polimérica, conocidas como procianidinas. Éstas últimas, contribuyen a la astringencia y acidez de la manzana y sus productos derivados, además de inducir la formación de coloides y precipitados durante el almacenamiento del jugo y la sidra, debido a que tienen la capacidad de asociarse a las proteínas y polisacáridos.

Los ácidos hidroxicinámicos son la segunda clase presente en cantidad, y junto con las catequinas, están involucradas en el fenómeno de oscurecimiento, que se lleva a cabo durante el procesamiento de los productos de manzana, además de ser los responsables de la coloración amarillo y naranja de los productos de manzana. Las dihidrochalconas, flavonoles y antocianinas son los componentes minoritarios que contribuyen a la pigmentación de las manzanas, y a la actividad antioxidante de las manzanas y productos derivados (Alonso-Salces y cols. 2005); ésta composición y concentraciones de los polifenoles mayoritarios son también dependientes de la variedad como se ilustra en la fig. 10

<b>Composición y Cuantificación de Antioxidantes Mayoritarios en algunos cultivos de Manzana.</b>						
<b>Manzanas frescas con piel ( mg/100 g)</b>						
<b>Variedad</b>						
<b>Antioxidante</b>	<b>Golden Delicious</b>	<b>Cortland</b>	<b>Monroe</b>	<b>Rhode Island Greening</b>	<b>Empire</b>	<b>NY674</b>
vitamina C	16.6	12.17	9	14.22	13.22	11.62
ácido clorogénico	8.48	5.36	10.08	14.28	11.52	4.4
Epicatequina	7.12	8.32	10.72	19.16	2.28	74.32
glicósidos de phloretina						
glucósido	1.8	1.44	2.4	2.08	2.8	1.84
xyloglucósido	1.92	3.2	4.92	5.88	1.72	3.56
procianidina B <sub>2</sub>	6.28	11.32	8.32	21.68	3.44	5.04
glicósidos de quercetina						
arabinósido	2.16	2.4	4.44	2.88	2.76	1.56
xylósido	1.68	1.08	2.28	1.92	2.16	1.2
glucósido	2.4	1.56	2.4	1.2	2.4	0.36
galactósido	4.2	3.36	4.8	4.32	4.2	1.92
rhamnósido	3.84	2.28	3.12	4.08	3.84	2.4
<b>TOTAL</b>	<b>56.48</b>	<b>52.49</b>	<b>62.48</b>	<b>91.7</b>	<b>50.34</b>	<b>38.22</b>

Fig. 10 Composición de antioxidantes mayoritarios en algunos cultivos de manzana.  
Fuente. Lee y cols. 2003.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la región centro de México existen una amplia variedad de frutos que por ser locales o de bajo costo no son consumidos. Una de las razones es que la calidad está dada en función del precio, de modo que no se valora el contenido nutrimental. Entre estos frutos no valorados se encuentran diversos cultivos de manzanas.

Existen compuestos contenidos en plantas que tienen diversas funciones como atraer organismos benéficos y rechazar patógenos, fotoprotectores y para responder a cambios medioambientales. Estos compuestos aportan funciones fisiológicas adicionales como es el caso de los antioxidantes, que promueven efectos defensivos contra el daño oxidativo hacia los distintos componentes celulares previniendo enfermedades crónico degenerativas. Por esta causa, el conocimiento de las propiedades funcionales de las frutas, ha aumentado el interés del consumidor en la posibilidad de mejorar la salud a través del consumo de fitoquímicos de frutas y vegetales. Asimismo, la tendencia hacia el uso de conservadores de origen natural, es cada vez de mayor interés en la industria de los alimentos, para la conservación de productos cárnicos o aceites comestibles, ya que representan una opción segura para la salud de los consumidores y una opción viable para los productores. Por lo que la evaluación de la actividad antioxidante en las variedades de manzana (*Malus domestica*) california y doble roja, es necesaria para caracterizar y evaluar sus propiedades funcionales.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos de epidermis de manzana (*Malus domestica*) con mayor concentración de compuestos fenolicos, presentarán mayor actividad antioxidante.

## 5. OBJETIVOS

### ➤ Objetivo General:

- Evaluar cuantitativamente la actividad antioxidante de la epidermis de manzana variedades california y doble roja.

### ➤ Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración de polifenoles y carotenos totales en la epidermis de *Malus domestica* variedad california y doble roja.
- Determinar la concentración de polifenoles totales en los extractos obtenidos de las epidermis de ambas variedades de manzana (california y doble roja)
- Identificar los extractos que presenten mayor actividad antioxidante empleando técnicas analíticas *in vitro*.
- Correlacionar la actividad antioxidante de los extractos con la concentración de polifenoles totales.
- Comparar la actividad antioxidante de los extractos más activos contra antioxidantes comerciales.

## **6. METODOLOGÍA**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Licenciatura en Nutrición, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, ubicado en San Pablo del Monte, Tlaxcala en el periodo de agosto de 2008 a julio de 2010.

### **6.1 Obtención de la muestra**

La muestra biológica se obtuvo de manzanas (*Malus domestica*) de las variedades California y doble roja, recolectados en huertas del municipio de San Lorenzo Chiautzingo en el estado de Puebla, se seleccionaron por su apariencia física, de acuerdo al tamaño, grado de maduración, color, firmeza, sin picaduras o abolladuras. Se separó la epidermis del fruto, se seco a la sombra durante 15 días. Posteriormente, al estar la epidermis de manzana bien seca, ésta se molió. Se colocaron 30 g de la epidermis seca dentro de un garrafón de vidrio ámbar, se adicionaron 300 mL de solvente, se dejó reposar 48 h a temperatura ambiente, una vez obtenidos los extractos se procedió a concentrarlos a vacío empleando un rotavapor. Se emplearon 6 solventes orgánicos utilizando el mismo procedimiento para la misma muestra biológica en el siguiente orden: *n-hexano*, *diclorometano*, *acetato de etilo*, *acetona*, *etanol* y *metanol*.

### **6.2 Determinación de polifenoles totales**

Este método espectrofotométrico se emplea para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 750 nm. Previamente se prepara una curva estándar de ácido gálico, para interpolar los resultados, estos se expresan en mg de ácido gálico por g de epidermis.

### **6.2.1 Extracción de polifenoles libres para epidermis deshidratada y fresca.**

Los compuestos polifenólicos en vegetales se encuentran libres, unidos a la pared celular o bien, a las proteínas. Los polifenoles solubles o extraíbles son fenoles de bajo o intermedio peso molecular, que pueden ser extraídos usando diferentes solventes.

El método de extracción de polifenoles que se empleó fue el siguiente: 500 mg de muestra se extrajeron con 40 ml de *metanol*/agua (50:50 v/v) a temperatura ambiente por 1 hora, transcurrido éste tiempo se filtró y guardó el sobrenadante. El material residual se sometió a una extracción sucesiva con 40 ml de *acetona*/agua (70/30 v/v) a temperatura ambiente por 1 hora, después se filtró y los sobrenadantes se combinaron con los de la extracción previa. Posteriormente se concentró en un rotavapor a 40 °C, 120 rpm y una bomba de alto vacío para eliminar el agua residual. Finalmente el extracto concentrado se redisolvió en 10 ml de etanol, la fracción que no se solubilizó en etanol se redisuelve en 10 ml de agua destilada. La determinación de polifenoles totales se realizó en ambas fracciones del extracto.

### **6.2.2 Cuantificación de polifenoles totales. Folin-Ciocalteu**

La cantidad de polifenoles totales se determinó con una modificación del método descrito por Matthaus (2002). Se tomó 1 mL de la solución del extracto de epidermis de manzana tanto acuoso como etanólico y se llevó a un volumen de 2.5 mL con HCl al 0.3%. Se tomó una alícuota de 50 µL de la solución resultante y se adicionó en 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%. Después de 2 minutos se agregó a la mezcla anterior 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:1). Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro. La concentración de polifenoles se calculó usando ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de peso fresco ó seco.

### **6.2 3 Determinación de polifenoles totales en extractos**

Para la determinación del contenido de polifenoles totales en los extractos de las epidermis de las manzanas de las dos variedades estudiadas (california y doble roja) se hace referencia al mismo principio de la técnica empleada para la determinación de polifenoles para las epidermis fresca y deshidratada. De los seis extractos obtenidos de las epidermis deshidratadas (*n-hexano*, *diclorometano*, *acetato de etilo*, *acetona*, *etanol* y *metanol*) se hicieron diluciones a 1000 ppm y se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de la solución, se adicionó en 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%. Después de 2 minutos se agregó a la mezcla anterior 50  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteau diluido en agua (1:1). Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro. La concentración de polifenoles se calculó usando ácido gálico como estándar

### **6.3 Determinación de carotenoides totales**

La extracción y determinación de carotenoides en la epidermis de manzana fue determinada de acuerdo al método siguiente: Se extrajeron 2 g de muestra con 10 mL de *n-hexano/acetona/etanol* (50:25:25, v/v), durante 1 hora, posteriormente se centrifugó por 5 min a 6500 rpm a 5°C. La capa superior de *n-hexano*, conteniendo el color, se recuperó y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL. El volumen recuperado fue ajustado a 25 mL con *n-hexano*. La cuantificación de carotenoides totales se llevó a cabo extrayendo una alícuota y midiendo su absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro. Los carotenoides totales fueron calculados usando el coeficiente de extinción del  $\beta$ -caroteno,  $\epsilon = 2505$ .

### **6.4 Evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH**

Una de las técnicas más utilizadas para conocer la actividad y eficiencia de los antioxidantes se puede estimar utilizando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH fig.11) mediante el parámetro  $\text{IC}_{50}$ ; que es la concentración equivalente que da un 50% de efecto reductor al



DPPH (radical libre).

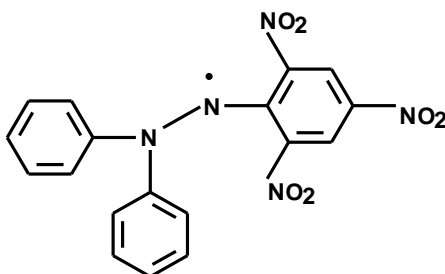


Fig. 11, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)

Este método, se basa en la reducción por antioxidantes de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH•. Para esta prueba se siguió el siguiente procedimiento:

- Se coloca 50  $\mu\text{L}$  de la muestra a 10, 100 y 1000 ppm.
- Se adiciona 50  $\mu\text{L}$  del radical DPPH• 133.33  $\mu\text{M}$ .
- Se incuba a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
- Se lee en el lector de elisa a una longitud de onda de 515 nm.
- Se calcula el porcentaje de reducción del DPPH•.

### 6.5 Actividad Antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) utilizando el radical ABTS

La generación del catión ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazolina-6-ácido sulfónico)], es la base de un método espectrofotométrico. El ensayo original de ABTS, fue basado sobre la activación de la mioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS, para producir el radical catiónico en la presencia y ausencia de antioxidantes. El mejoramiento de la técnica para la generación del ABTS<sup>•+</sup>, involucra la generación directa de la coloración azul/verdosa, característica del cromóforo ABTS<sup>•+</sup>, por una reacción química entre el ABTS y el Persulfato de Potasio. Este cromóforo tiene las siguientes longitudes de onda de absorción máxima: 415, 645 nm, 734 nm y 815 nm, sin embargo la más usada es la de 415 nm.

La adición de antioxidantes al radical catiónico preformado, provoca la reducción del

cromóforo, esto es dependiente del tiempo, actividad y concentración del antioxidante. De esta manera, la decoloración como porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, es determinada como una función de la concentración y tiempo, calculada respecto a la reactividad del Trolox (análogo de la vitamina E, soluble en agua) como estándar, bajo las mismas condiciones.

El método es aplicable para el estudio de antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos, compuestos puros y extractos alimentarios (Re y cols. 1999). Para determinar la capacidad secuestrante de los extractos se siguió el procedimiento descrito por Kuskoski (2005) que consistió en producir el radical ABTS<sup>•+</sup> mediante la solución de ABTS (ácido 2,2.-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, sal diamónica) 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (concentración final). Se mezcló y se incubó en oscuridad 12-16 h a temperatura ambiente. Una vez formado el radical se diluyó con *etanol* hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 a 436 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente, se tomaron 10 µL del extracto de la muestra (100 ppm) y se le adicionó 1 mL de la solución diluida del ABTS<sup>•+</sup>. Se monitoreó el efecto secuestrante cada minuto durante 6 min. La capacidad secuestrante se comparó con la del Trolox.

## **6.6 Técnica para determinar el contenido de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico) en cerebro de rata inducidos con FeSO<sub>4</sub>**

### **6.6.1 Disección y homogenizado del tejido cerebral de rata**

- En esta prueba se observa el efecto del antioxidante sobre la degradación oxidativa, como sistema de prueba se emplea el tejido cerebral como fuente de lípidos. Se usan ratas adultas de la cepa Wistar, como primer paso se anestesia la rata con éter y se sacrifica por dislocación cervical. Se trabaja todo en baño de hielo para detener el proceso de peroxidación.
- Se extrae el cerebro completo.

- Se lava el cerebro con agua destilada para quitar restos de sangre.
- Se pesa el cerebro y se agrega 10 mL de buffer de fosfatos (9.5 mM, pH=7.4) por cada gramo de cerebro.
- Se homogeniza por 60 segundos con un homogeneizador mecánico con punta de teflón.
- Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm y recuperar el sobrenadante.

### **6.6.2 Cuenta de proteínas por el método de Lowry y ajuste a la concentración deseada**

- El homogenizado de cerebro de rata se ajusta a una concentración de 2.666 mg/mL de proteína, esto con la finalidad de estandarizar en contenido de lípidos, ya que existe una relación proporcional entre el contenido de lípidos y proteínas.
- Para esto se toma por duplicado 5  $\mu$ L de homogenizado y se coloca en un pozo de la placa de 96.
- Agregar 20  $\mu$ L de agua destilada.
- Agregar 150  $\mu$ L de la siguiente mezcla: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N, tartrato de Na/K 2%, CuSO<sub>4</sub> 1% (98:1:1) e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital.
- Adicionar 25  $\mu$ L de reactivo de Folin disuelto en agua (1:1). Mezclar bien, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se mide la absorbancia a 540 nm.
- Previamente se realiza una curva estándar con albúmina bovina (Fig.12) y calcular la ecuación de la recta donde se interpolan los valores obtenidos para obtener el contenido de proteína en el homogenizado.

## Curva de calibración de albúmina

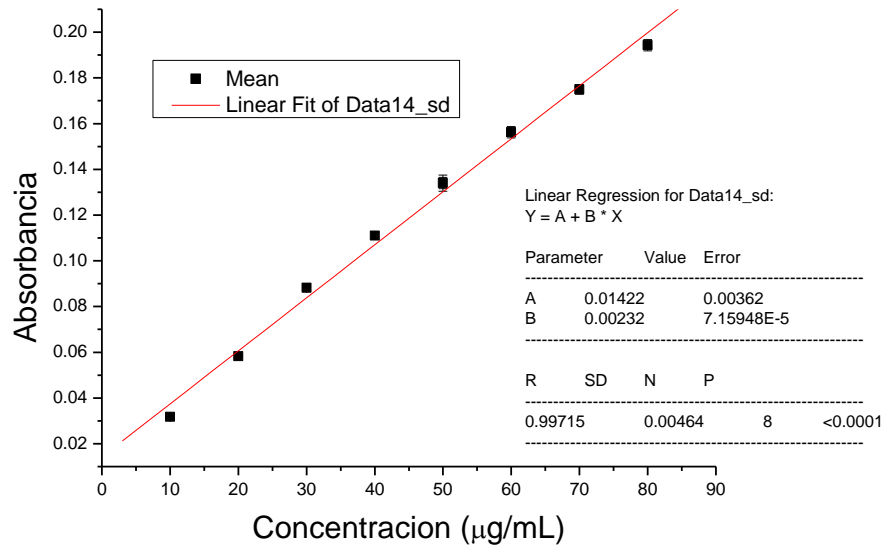


Fig. 12 Curva de calibración de albúmina bovina

- Se sustituyen los valores de absorbancia en la siguiente fórmula:

$$proteína (\mu g / mL) = \left[ \frac{A_{540 \text{ nm}} - 0.05012}{0.0028} \right] 40$$

- Ajustar el contenido de proteína a 2.666 mg/ml con PBS (9.5 mM, pH=7.4).

### 6.6.3 Inducción de estrés oxidante con FeSO<sub>4</sub> 10 µM

- Se trabaja todo en baño de hielo.
- Se coloca por duplicado 375 µL del homogenizado (2.666 mg prot. /ml) en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Se agregar 50 µL de EDTA 10 µM.
- Se adiciona la muestra a evaluar, si presenta actividad antioxidante protegerá a los lípidos del cerebro de ser oxidados, observándose en la coloración final de la solución, si el extracto resulta activo no habrá malondialdehído que reaccione con el ácido tiobarbitúrico, por lo que no presentará color, en cambio si el extracto no protegió a los lípidos presentará una coloración rosa intenso.

- Posteriormente se incubó 30 minutos a 37 °C con agitación orbital.
- Agregar 50 µL FeSO<sub>4</sub> 100 mM
- Incubar 1 hora a 37 °C con agitación orbital.
- A continuación, colocar los tubos en baño de hielo y agregar 500 µL de reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico-ácido tricloroacético 1:1).
- Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm a temperatura ambiente.
- Incubar 30 minutos en baño de agua a 90 °C. En este paso el malondialdehído generado durante la inducción del estrés oxidativo, reacciona con el ácido tiobarbitúrico generando un cromóforo.
- Se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente y se destapan para liberar la presión.
- Tomar por duplicado 200 µL de cada tubo y colocarlos en un pozo de la placa de 96 pozos.
- Medir absorbancia a 540 nm y calcular el porcentaje de inhibición.
- Interpolar los valores obtenidos, en la curva estándar de Malondialdehído (Fig. 13) generado a partir de Tetrametoxipropano, para obtener el contenido de TBARS en solución.

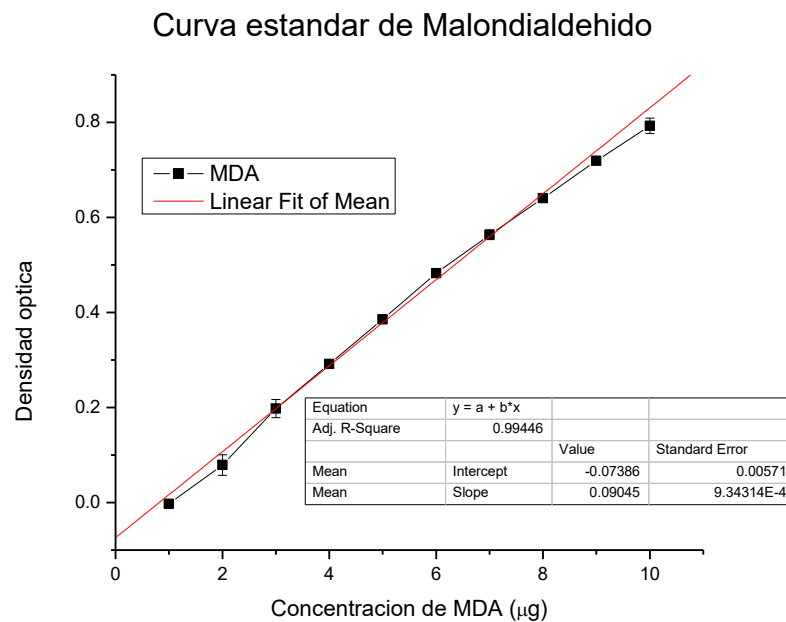


Fig. 13 Curva estándar de malondialdehído

## 6.7 Determinación cualitativa de ácido ursólico

La determinación de ácido ursólico se realizó empleando cromatografía de gases, en un cromatógrafo Agilent, con una columna JW 122-5532 (30.0 m x 250µm x 0.25 µm). Las muestras de 0.1 µL se inyectaron automáticamente. El programa de temperaturas fue: después de un periodo de estabilización de un minuto a 200°C, se realizó una rampa de calentamiento hasta 260°C con una velocidad de 15°C/min y un periodo final de estabilización de 5 minutos, una segunda rampa hasta 300°C con una velocidad de 5°C/min y un periodo final de estabilización de 5 minutos. El tiempo de cada corrida fue de 23 minutos. El gas de arrastre fue H<sub>2</sub> con un flujo de 3.7 mL/min, con relación de flujo 5.4:1. La adquisición y procesamiento de los datos se realizaron con el programa Chemstation (Hewlett Packard).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Obtención de la muestra biológica

De la manzana variedad California (Fig.14), se recolectaron 15 Kg de fruto en fresco y se obtuvo 151 g de epidermis deshidratada (Fig.15). De la variedad doble roja (Fig.16 ) se recolectaron 15 Kg de la que se obtuvo 310 g de epidermis deshidratada (Fig.17 ).



Fig.14, manzana variedad California



Fig. 15 epidermis deshidratada de manzana variedad California



Fig.16, manzana variedad doble roja



Fig. 17 epidermis deshidratada de manzana variedad doble roja

## 7.2 Extractos

La cantidad de extractos y las características de las manzanas se muestran en la figura 18 para la variedad california y en la figura 19 para la variedad doble roja. Estos extractos son los obtenidos a partir de 30 g de epidermis deshidratada y extraída con 300 mL de cada disolvente.







Disolvente empleado	<i>n</i> -Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Acetona	Etanol	Metanol
Imagen						
Peso (g)	0.756	1.402	1.017	0.512	5.2401	5.699

Fig. 18, Características de los extractos de manzana (*Malus domestica*) variedad California







<b>Disolvente empleado</b>	<i>n-Hexano</i>	<i>Diclorometano</i>	<i>Acetato de etilo</i>	<i>Acetona</i>	<i>Etanol</i>	<i>Metanol</i>
<b>Imagen</b>						
<b>Peso (g)</b>	0.631	1.204	1.557	0.438	6.599	4.252

Fig. 19, Características de los extractos de manzana (*Malus domestica*) variedad doble roja

### 7.3 Contenido de carotenos totales

El contenido de carotenos totales para las manzanas variedades california y doble roja se muestra en la Figura 20.

<b>Fruto</b>	<b>Promedio de D.O. a 450 nm</b>	<b>µg de caroteno</b>	<b>µg/g de epidermis deshidratada</b>
<b>Manzana doble roja</b>	<b>0.057±0.004</b>	<b>5.688±0.415</b>	<b>2.844±0.207</b>
<b>Manzana california</b>	<b>0.041±0.001</b>	<b>4.125±0.145</b>	<b>2.062±0.072</b>

Fig. 20 Carotenos Totales

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar

### 7.4 Contenido de polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales, se empleó epidermis fresca, deshidratada y posterior a la obtención de los extractos también se determinó la cantidad de polifenoles totales en estos. El contenido de polifenoles en se muestra en la figura 21 para epidermis fresca, para la epidermis deshidratada en la figura 22, los polifenoles totales para los extractos



de ambas variedades de manzana en la figura 23, en figura 24 para la variedad califonia y figura 25 para la manzana doble roja.

<b>Fruto</b>	<b>Extracto</b>	<b>eq. ácido gálico/g de peso fresco</b>	<b>PT eq. ácido gálico/g de peso fresco</b>
<b>Manzana califonia</b>	<b>EtOH</b>	<b>0.622±0.009</b>	<b>1.132</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.509 ± 0.042</b>	
<b>Manzana doble roja</b>	<b>EtOH</b>	<b>1.250±0.057</b>	<b>1.529</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.279±0.016</b>	

Fig. 21, Contenido de Polifenoles Totales en epidermis fresca  
Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar

<b>Fruto</b>	<b>Extracto</b>	<b>PT eq. ácido gálico/g de peso seco</b>	<b>PT eq. ácido gálico/g de peso seco</b>
<b>Manzana califonia</b>	<b>EtOH</b>	<b>1.831±0.025</b>	<b>2.410</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.579 ± 0.056</b>	
<b>Manzana doble roja</b>	<b>EtOH</b>	<b>0.813±0.201</b>	<b>1.769</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.955±0.154</b>	

Fig. 22, Contenido de Polifenóles Totales en epidermis deshidratada  
Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar.

Polifenoles totales en extractos de epidermis deshidratada de manzana (equivalentes a ácido gálico)		
Extracto	Manzana california	Manzana doble roja
<i>n-hexano</i>	0.078±0.008	0.085±0.0003
<i>diclorometano</i>	0.094±0.002	0.090±0.005
<i>acetato de etilo</i>	0.263±0.005	0.259±0.004
<i>acetona</i>	0.278±0.017	0.354±0.004
<i>etanol</i>	0.155±0.005	0.185±0.005
<i>metanol</i>	0.202±0.016	0.174±0.007

Fig. 23, Contenido de Polifenoles Totales en extractos de manzana  
Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar

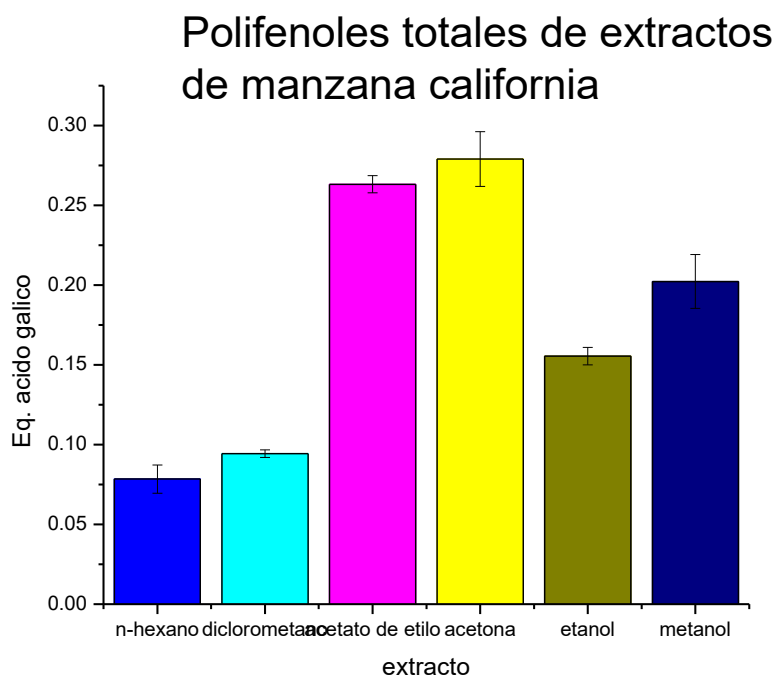


Fig. 24, Contenido de Polifenoles Totales en extractos de manzana california

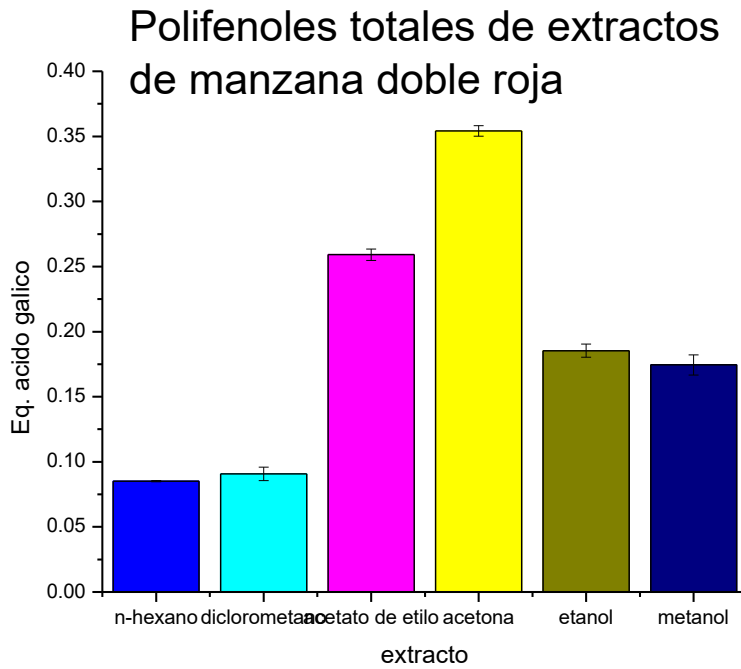


Fig. 25, Contenido de Polifenóles Totales en extractos de manzana doble roja

## 7.5 Evaluación de actividad antioxidante

### 7.5.1 Actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC)

Para la prueba de TEAC se presenta la cinética de reducción del radical ABTS por los extractos, en la figura 26 para la manzana californiana y en la figura 28 para manzana doble roja, así como la actividad antioxidante equivalente al trolox, figura 26 y 27 para manzana californiana figura 29 y 30 para manzana doble roja.

## Reduccion de ABTS Manzana California

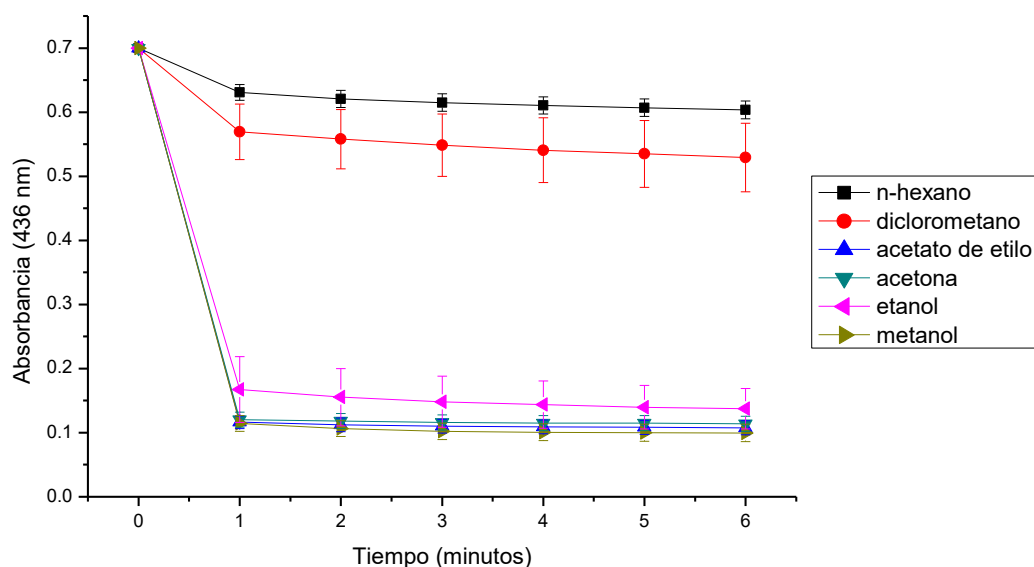


Fig. 26, Cinética de reducción del Radical ABTS por los extractos de manzana californiana

Fruto	Extracto a 100 ppm	Actividad antioxidante equivalente a $\mu\text{M}$ de Trolox
Manzana californiana	<i>n-hexano</i>	$2.238 \pm 0.415$
	<i>Diclorometano</i>	$4.466 \pm 1.604$
	<i>Acetato de etilo</i>	$17.108 \pm 0.327$
	<i>Acetona</i>	$16.918 \pm 0.351$
	<i>Etanol</i>	$16.218 \pm 0.950$
	<i>Metanol</i>	$17.348 \pm 0.411$

Fig. 27, Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

## Reduccion de ABTS Manzana Doble roja

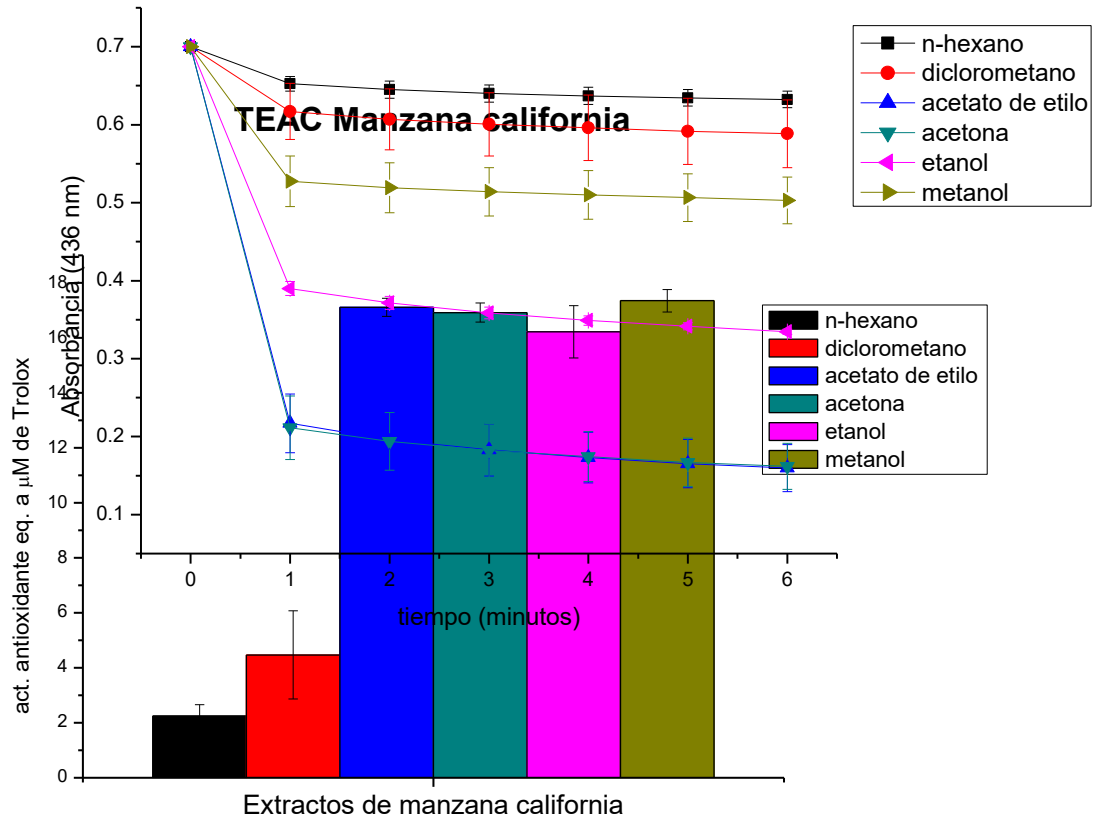


Fig. 28, Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

Fig. 29, Cinética de reducción del Radical ABTS por los extractos de manzana cali

Fruto	Extracto a 100 ppm	Equivalente a $\mu\text{M}$ de Trolox
Manzana doble roja	<i>n-hexano</i>	1.373 $\pm$ 0.314
	<i>Diclorometano</i>	2.692 $\pm$ 1.304
	<i>Acetato de etilo</i>	15.549 $\pm$ 0.900
	<i>Acetona</i>	15.479 $\pm$ 0.884
	<i>Etanol</i>	10.307 $\pm$ 0.104
	<i>Metanol</i>	5.256 $\pm$ 0.899

Fig. 30, Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)  
 Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

### TEAC Manzana doble roja

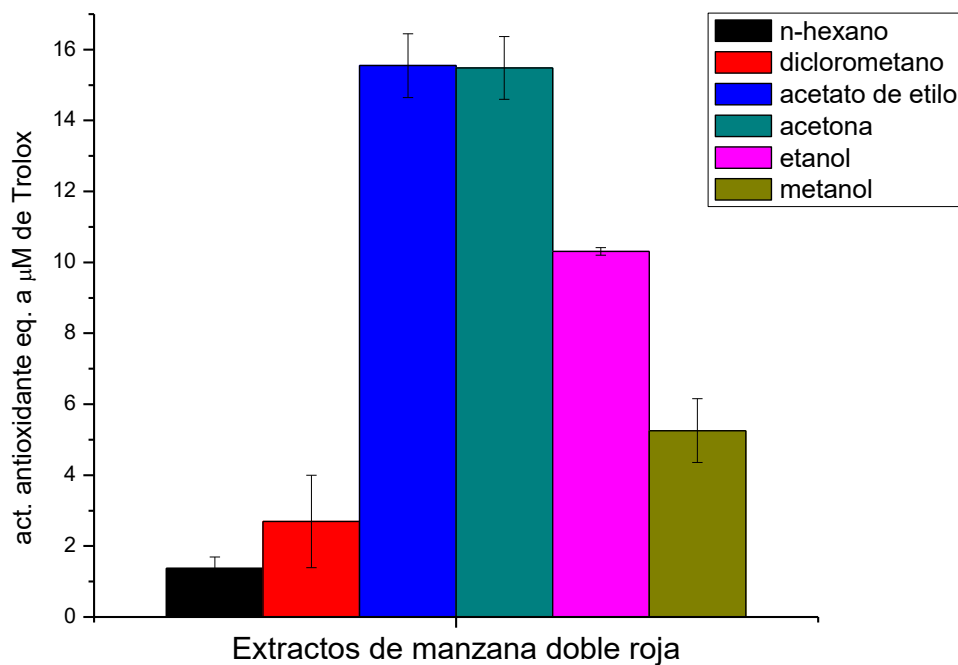


Fig. 31, Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

### 7.5.2 Evaluación de actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

Los resultados de la siguiente prueba empleada (DPPH) se muestran en las figuras 31 y 32 para la variedad california y para la variedad doble roja en las figuras 33 y 34, estos datos corresponden a los barridos gruesos.

% de reducción del DPPH Manzana california (media $\pm$ error estándar)			
<b>EXTRACTO</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>
<i>n-hexano</i>	<b>4.202<math>\pm</math>1.480</b>	<b>6.838<math>\pm</math>4.937</b>	<b>24.770<math>\pm</math>7.753</b>
<i>diclorometano</i>	<b>6.325<math>\pm</math>1.935</b>	<b>19.922<math>\pm</math>5.395</b>	<b>69.994<math>\pm</math>3.851</b>
<i>acetato de etilo</i>	<b>9.473<math>\pm</math>2.408</b>	<b>31.383<math>\pm</math>3.800</b>	<b>91.899<math>\pm</math>0.858</b>
<i>acetona</i>	<b>28.498<math>\pm</math>11.940</b>	<b>89.953<math>\pm</math>6.953</b>	<b>95.409<math>\pm</math>0.574</b>
<i>etanol</i>	<b>8.344<math>\pm</math>2.201</b>	<b>41.306<math>\pm</math>5.639</b>	<b>93.430<math>\pm</math>2.098</b>
<i>metanol</i>	<b>10.773<math>\pm</math>2.724</b>	<b>56.083<math>\pm</math>2.636</b>	<b>95.360<math>\pm</math>0.654</b>

Fig. 32, Evaluación de actividad antioxidante con DPPH Manzana california

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

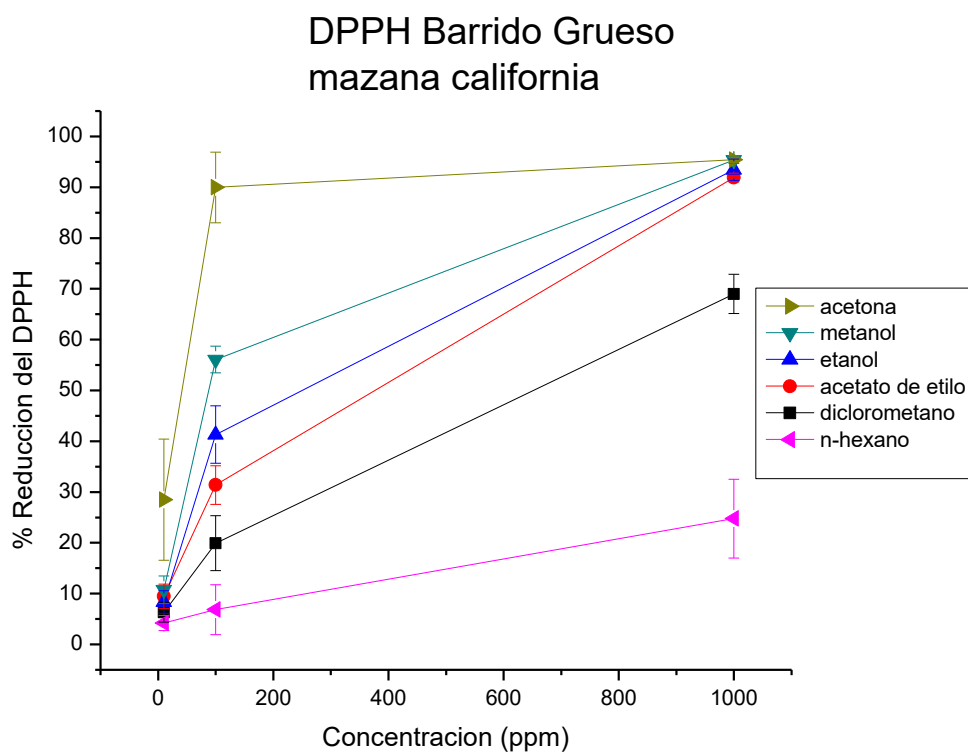


Fig. 33, Evaluación de actividad antioxidante con DPPH

% de reducción del DPPH Manzana Doble roja (media ± error estándar)			
EXTRACTO	10	100	1000
<i>n-hexano</i>	1.812±0.533	3.838±0.100	20.043±0.640
<i>diclorometano</i>	2.239±0.320	9.382±1.493	50.107±0.273
<i>acetato de etilo</i>	8.848±1.386	40.938±0.853	88.060±0.213
<i>acetona</i>	6.823±1.919	37.313±0.213	87.953±0.320
<i>etanol</i>	3.731±1.173	18.977±0.649	86.994±0.640
<i>metanol</i>	2.239±1.173	9.808±0.213	67.804±0.853

Fig. 34, Evaluación de actividad antioxidante con DPPH

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).



### DPPH barrido grueso, manzana doble roja

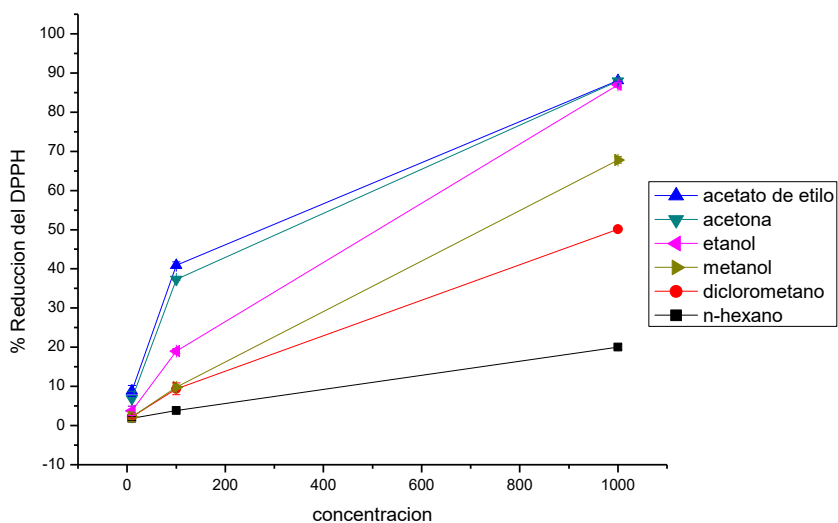


Fig. 35, Evaluación de actividad antioxidante con DPPH

#### 7.5.3 IC<sub>50</sub> de los extractos más activos (DPPH).

De acuerdo al barrido grueso, se calculó la concentración mínima que se necesita para reducir al 50% el DPPH (IC<sub>50</sub>), esto para los extractos más activos, en el caso de la manzana variedad california se presentan las IC<sub>50</sub> en la figura 35 y para los extractos de la variedad doble roja, en la figura 36 .

<b>Extractos de manzana california en DPPH</b>	
<b>Solvente</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Acetato de etilo</b>	<b>59.857±3.739ppm</b>
<b>Acetona</b>	<b>13.03±0.945 ppm</b>
<b>Etanol</b>	<b>119.974±2.268 ppm</b>

<b>Metanol</b>	<b>80.717±1.400 ppm</b>
----------------	-------------------------

Fig. 36, IC<sub>50</sub> de extractos de manzana californiana

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

<b>Extractos de manzana doble roja en DPPH</b>	
<b>Solvente</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Acetato de etilo</b>	<b>143.358± ppm</b>
<b>Acetona</b>	<b>38.731±5.164 ppm</b>
<b>Etanol</b>	<b>104.019±5.204 ppm</b>

Fig. 37, IC<sub>50</sub> de extractos de manzana doble roja

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

#### 7.5.4 Determinación del contenido de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en cerebro de rata inducidos con FeSO<sub>4</sub>

Para la última prueba de evaluación de actividad antioxidante empleada, se realizó en primera instancia un barrido grueso a todos los extractos de ambas variedades, los resultados para la variedad californiana se presentan en las figuras 37 y 38, para la variedad doble roja se presentan en las figuras 39 y 40 .

<b>% de inhibición manzana californiana (media ± error estándar)</b>			
<b>EXTRACTO</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>
<i>n-hexano</i>	<b>3.863±1.822</b>	<b>3.863±1.822</b>	<b>18.003±2.005</b>
<i>diclorometano</i>	<b>4.480±0.754</b>	<b>31.510±0.936</b>	<b>34.157±1.414</b>

<i>acetato de etilo</i>	<b>6.163±1.839</b>	<b>77.503±2.329</b>	<b>94.263±0.290</b>
<i>acetona</i>	<b>3.610±1.224</b>	<b>77.650±0.696</b>	<b>93.817±0.740</b>
<i>etanol</i>	<b>4.263±0.580</b>	<b>19.537±0.814</b>	<b>93.747±0.326</b>
<i>metanol</i>	<b>2.187±1.681</b>	<b>23.570±1.575</b>	<b>94.587±0.326</b>

Fig. 38, Evaluación de actividad antioxidante con el ensayo TBARS, manzana californiana. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

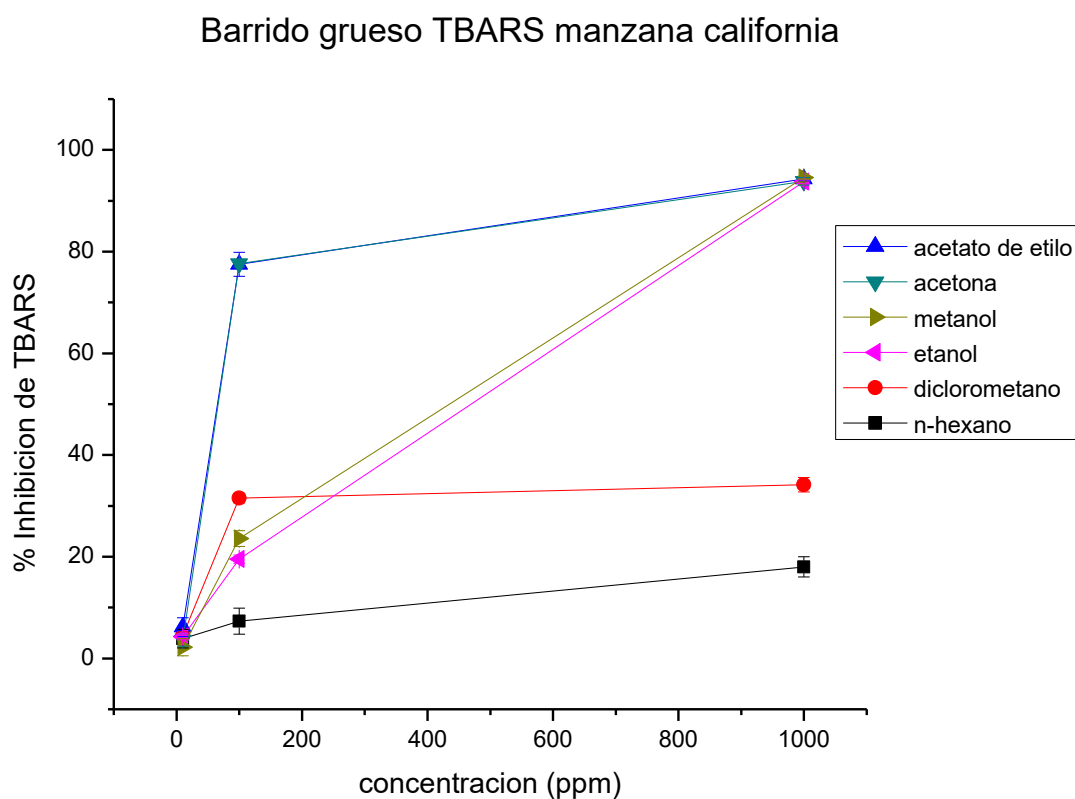


Fig. 39, Evaluación de actividad antioxidante con el ensayo Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

**% de inhibición manzana doble roja (media  $\pm$  error estándar)**

<b>EXTRACTO</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>
<i>n-hexano</i>	<b>1.473±0.672</b>	<b>7.530±0.671</b>	<b>16.010±1.412</b>
<i>diclorometano</i>	<b>11.690±1.520</b>	<b>31.540±0.453</b>	<b>43.750±1.637</b>
<i>acetato de etilo</i>	<b>9.537±0.657</b>	<b>23.613±1.080</b>	<b>94.140±0.777</b>
<i>acetona</i>	<b>8.700±1.572</b>	<b>18.793±1.965</b>	<b>92.960±1.051</b>
<i>etanol</i>	<b>11.990±0.992</b>	<b>14.247±1.052</b>	<b>87.857±4.959</b>
<i>Metanol</i>	<b>5.687±1.093</b>	<b>8.683±0.171</b>	<b>89.250±2.664</b>

Fig. 40, Evaluación de actividad antioxidante con el ensayo Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0)

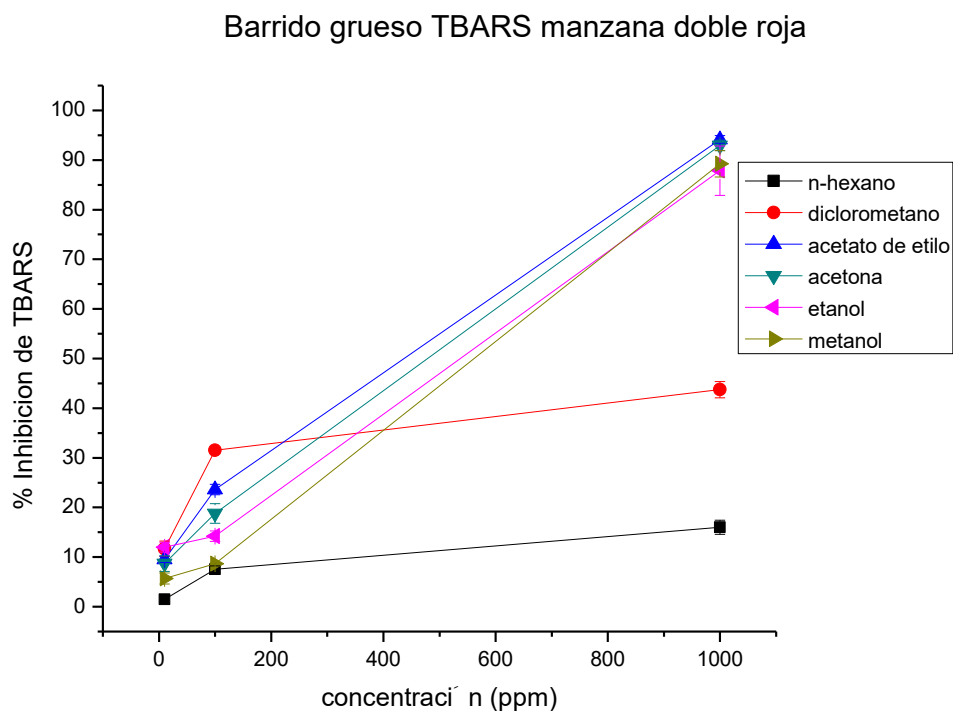


Fig. 41, Evaluación de actividad antioxidante con el ensayo Sustancias Reactivas al Ácido

tiobarbitúrico (TBARS)

### 7.5.5 IC<sub>50</sub> de los extractos más activos (TBARS).

De acuerdo al barrido grueso, se calculó la concentración mínima que se necesita para inhibir al 50% la formación de TBARS (IC<sub>50</sub>), esto para los extractos más activos, en el caso de la manzana variedad california se presentan las IC<sub>50</sub> en la figura 41 y para los extractos de la variedad doble roja, en la figura 42 .

<b>Extractos de manzana california en TBARS</b>	
<b>Solvente</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Acetato de etilo</b>	<b>35.991±0.658 ppm</b>
<b>Acetona</b>	<b>41.747±0.593 ppm</b>
<b>Etanol</b>	<b>259.291±0.917 ppm</b>
<b>Metanol</b>	<b>192.484±1.159 ppm</b>

Fig. 42, IC<sub>50</sub> de extractos de manzana california (TBARS)

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

<b>Extractos de manzana doble roja en TBARS</b>	
<b>Solvente</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Acetato de etilo</b>	<b>267.913±4.839 ppm</b>
<b>Acetona</b>	<b>211.451±2.951 ppm</b>

<i>Etanol</i>	<b>282.501±2.752 ppm</b>
<i>Metanol</i>	<b>345.902±3.840 ppm</b>

Fig. 43, IC<sub>50</sub> de extractos de manzana doble roja (TBARS)

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

### 7.5.6 IC<sub>50</sub> de antioxidantes sintéticos de referencia, en los modelos de DPPH y TBARS

Con la finalidad de tener un criterio de comparación, se calcularon las IC<sub>50</sub> de antioxidantes puros bajo las mismas condiciones en los ensayos DPPH y TBARS, esto nos da una referencia de la actividad antioxidante de los extractos más activos en las variedades de manzana estudiadas (california y doble roja).

<b>Antioxidante</b>	<b>TBARS IC<sub>50</sub></b>	<b>DPPH IC<sub>50</sub></b>
Ácido ascórbico	12.950±0.0109 ppm	15.93±0.37 ppm
Ácido cafeico	13.553±0.0514ppm	18.65±0.73 ppm
Alfa tocoferol	33.177±1.136 ppm	23.15±0.67ppm
quercetina	3.565±0.0789 ppm	5.37±0.14 ppm

Fig. 44, IC<sub>50</sub> de antioxidantes sintéticos de referencia, en los modelos de DPPH y TBARS

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

### 7.6 Correlación de actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales de cada extracto.

	<b>Coefficiente de correlación</b>	<i>p</i>	
<b>Polifenoles vs TEAC</b>	0.866	0.0258	<b>Correlación positiva</b>
<b>Polifenoles vs DPPH</b>	0.761	0.0790	<b>No hay relación significativa</b>
<b>Polifenoles vs TBARS</b>	0.850	0.0321	<b>Correlación positiva</b>

Fig. 45, Correlación manzana california

	<b>Coefficiente de correlación</b>	<i>p</i>	
<b>Polifenoles vs TEAC</b>	0.902	0.0140	<b>Correlación positiva</b>
<b>Polifenoles vs DPPH</b>	0.827	0.0422	<b>Correlación positiva</b>
<b>Polifenoles vs TBARS</b>	0.868	0.0251	<b>Correlación positiva</b>

Fig. 46, Correlación manzana doble roja

### 7.7 Determinación cualitativa de Ácido ursólico

La potencialidad de ácido ursólico en terapéutica ha llamado la atención de los científicos durante la década pasada (Liu, 2005). Este hecho se evidencia en el aumento exponencial de la investigación farmacológica en antiinflamatorios (Dufour y cols, 2007), contra el cáncer (Achiwa y cols. 2005, Ma y cols, 2005), y otras actividades del ácido ursólico.

En el presente trabajo, no fue detectado cuantitativamente el contenido de ácido ursólico, pero se observa la presencia de este en los extractos de acetato de etilo, acetona y etanol de variedades de manzana california y doble roja, lo que indica que el protocolo actual nos da una idea de general de el tipo de antioxidantes presentes en la epidermis de manzana de las variedades estudiadas (california y doble roja).

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Contenido de carotenos totales

Las frutas por lo general tienen niveles menores de provitamina A que los vegetales con hojas. Sin embargo, por lo general son mejor aceptadas por niños y adultos y se cree que sus provitaminas A son más biodisponibles (de Pee y cols1996). A diferencia de las frutas temperadas donde predominan los pigmentos antocianinos, muchas frutas tropicales y subtropicales son carotenogénicas. Las frutas tropicales populares como el mango y la papaya se consideran como fuentes importantes de provitamina A en los países en desarrollo.

El contenido de  $\beta$ -caroteno del mango obtenido en algunos países (Speek y cols1988; Godoy y Rodríguez Amaya 1989, 1994; Wilberg y Rodríguez-Amaya 1995; Reddy y cols1995; Wasantwisut y cols1995; Vaidya 1995) varió de 0.6  $\mu\text{g/g}$  en Tailandia (Speek 1988) a 29  $\mu\text{g/g}$  en la India (Reddy y cols1995). También se analizaron mangos brasileños de variedades desconocidas mediante HPLC y se encontró que contenían  $15\pm 7$   $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno (Wilberg y Rodríguez-Amaya 1995). El rango de  $\beta$ -caroteno en la papaya es menor: 0.4 a 10  $\mu\text{g/g}$  (Pepping y cols1988; Speek y cols1988; Kimura y cols1991; Reddy y cols1995; Vaidya 1995; Wasantwisut y cols1995).

El contenido de carotenos totales en ambas variedades de manzana fue similar, con 2.04  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno en epidermis deshidratada para la variedad california y de 2.84  $\mu\text{g/g}$  para la variedad doble roja. Estos resultados son comparables a los reportados por Felicetti y Schrader



(2009), que para la variedad Fuji se cuantificó 1.49  $\mu\text{g/g}$ , para la variedad gala 0.26  $\mu\text{g/g}$ , lo que hace evidente que las variedades estudiadas (california y doble roja) presentan una cantidad mayor de carotenos, en cambio presentaron un contenido menor que la variedad golden delicious con 3.21  $\mu\text{g/g}$ . En otro estudio de cuantifico 72  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de peso fresco de porción comestible,  $\beta$ -caroteno en manzana (no especifica variedad) (Setiawan y cols 2001), por otra parte la variedad Golden delicious de Cova da Beira, Brasil mostró el mayor valor de  $\beta$ -caroteno ( $0,06 \pm 0,014\text{ mg}/100\text{ g}$  de peso fresco) ( Graça-Dias y cols. 2009).

## **8.2 Contenido de polifenoles totales**

En epidermis fresca, la principal cantidad de polifenoles totales está contenida en la variedad doble roja (1.5294 equivalentes a mg de ácido gálico/g de peso), este valor se asemeja a la variedad northern spy (1.548 equivalentes a mg de ácido gálico/g de peso). En cambio, la cantidad de polifenoles es inferior con respecto a la variedad red delicious (Tsao y cols 2005). Ahora bien, la variedad california mostró un contenido (1.132 equivalentes a mg de ácido gálico/g de peso), semejante a la variedad golden delicious (1.1265 equivalentes a mg de ácido gálico/g de peso).

Por lo que se refiere al contenido de polifenoles totales en epidermis deshidratada, la manzana variedad california presentó mayor cantidad (2.4103 equivalentes a mg de ácido gálico/g de peso seco) a diferencia de la variedad doble roja (1.7691 equivalentes). A causa de que en la variedad doble roja se podrían encontrar algunos tipos de polifenoles sensibles a factores como luz y temperatura que tal vez se perdieron con el proceso de deshidratado.

Con respecto al contenido de polifenoles totales para los extractos de la variedad california, los que tienen una cantidad mayor son los de acetato de etilo, acetona y metanol, para la variedad doble roja, los extractos de acetato de etilo y acetona son los que presentan mayor contenido.

### **8.3 Evaluación de actividad antioxidante**

#### **8.3.1 Actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC)**

En la prueba de TEAC se evalúa la actividad antioxidante de los extractos, cabe resaltar que es específica para compuestos polifenólicos. Para la cinética de reducción del radical por los extractos, inicialmente se realizó hasta los 30 minutos, y se optó por monitorear hasta los seis minutos debido a que a partir de los cinco minutos se observa una tendencia lineal, alcanzando la reducción máxima por los extractos. Este comportamiento se observa en los extractos de las dos variedades (california y doble roja). Por otra parte, en la variedad california a partir del extracto de acetato de etilo se observa que la reducción del radical tiene un comportamiento similar. Para la actividad antioxidante reportada como equivalente de trolox, los extractos de metanol y acetato de etilo son los más activos con  $17.348 \pm 0.41$  equivalentes a  $\mu\text{M}$  de Trolox y  $17.10 \pm 0.32$  equivalentes a  $\mu\text{M}$  de Trolox respectivamente, sin embargo no hay diferencias significativas entre estos y los extractos de acetona y etanol.

En relación con los extractos de manzana variedad doble roja, los de acetato de etilo y acetona tienen un comportamiento similar en la cinética de reducción del radical ABTS. Para la actividad antioxidante reportada como equivalente de trolox, los extractos de acetato de etilo y acetona son los más activos con  $15.54 \pm 0.90$  equivalentes a  $\mu\text{M}$  de Trolox y  $15.47 \pm 0.88$  equivalentes a  $\mu\text{M}$  de Trolox respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos. Finalmente, en esta prueba los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol para la manzana variedad califonia, son los más activos.

#### **8.3.2 Evaluación de actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)**

En esta prueba se evalúa si los extractos son buenos donadores de hidrógeno para actuar como antioxidantes, inicialmente se realiza un barrido grueso con la finalidad de identificar la cantidad mínima de extracto que se necesita para reducir al 50% el radical DPPH, esto se denomina  $IC_{50}$ . Para la variedad california los extractos más activos de acuerdo al barrido grueso fueron a partir del extracto de acetato de etilo hasta metanol, de esta variedad el más activo fue el extracto de acetona con una  $IC_{50}$  de  $13.03 \pm 0.94$  ppm, siendo la actividad mayor al ácido ascórbico, ácido cafeico y alfa tocoferol, y 2.4 veces menor que la quercetina. El extracto de acetato de etilo con una  $IC_{50}$  de  $59.85 \pm 3.73$  ppm también presenta buena actividad, seguido del extracto de metanol con  $80.71 \pm 1.40$  ppm y una  $IC_{50}$  de  $119.97 \pm 2.26$  ppm para el extracto etanolico. En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos de la manzana variedad doble roja, el más activo fue el de acetona con una  $IC_{50}$  de  $38.73 \pm 5.16$  ppm que es 20 veces menor que la quercetina, seguido del etanolico con una  $IC_{50}$  de  $104.01 \pm 5.20$  ppm y finalmente acetato de etilo con 143.35 ppm.

### **8.3.3 Determinación del contenido de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en cerebro de rata inducidos con $FeSO_4$**

En lo que respecta a la prueba de TBARS, se evalúa la actividad antioxidante de un extracto en función de su capacidad para inhibir la lipoperoxidación. En una reacción de lipoperoxidación, como producto final se obtiene malondialdehído, entre otros compuestos, éste reacciona con el ácido tiobarbitúrico y genera un cromóforo que es detectado a 540 nm. En este ensayo, se trabajó inicialmente con barrido grueso a 10, 100 y 1000 ppm con la finalidad de identificar la cantidad mínima de extracto que se necesita para inhibir al 50% la formación de TBARS ( $IC_{50}$ ). Para la variedad california los extractos que de acuerdo al barrido grueso resultaron con mayor actividad fueron los de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol. Posteriormente, al calcular la  $IC_{50}$  de los anteriores extractos, el más activo fue el extracto de acetato de etilo con de  $35.99163 \pm 0.65894$  ppm que es 10 veces menor que la quercetina, seguido del extracto de acetona con  $41.7477 \pm 0.59356$  ppm, en el caso del extracto de metanolico la  $IC_{50}$  es de  $192.48453 \pm 1.15948$  ppm y de  $259.29113 \pm 0.91795$  ppm para el

extracto etanolico.

En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos de la manzana variedad doble roja, los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol fueron los más activos. De estos el extracto de acetona con una  $IC_{50}$  de  $211.4512 \pm 2.95146$  ppm, fue el que presento mayor actividad con la  $IC_{50}$  más pequeña, esta es 59 veces menor que la quercetina. Los extractos de acetato de etilo ( $IC_{50} = 267.91363 \pm 4.83945$  ppm) etanolico ( $IC_{50} = 282.50167 \pm 2.75223$  ppm) y metanolico ( $IC_{50} = 345.90237 \pm 3.84024$  ppm), también presentan una buena actividad antioxidante.

#### **8.4 Correlación de polifenoles y actividad antioxidante**

Hay que tener en cuenta, que Eberhardt y colaboradores (2000) sugieren que la actividad antioxidante primordial es aportada por compuestos fenólicos. De acuerdo con las evidencias obtenidas por la metodología empleada, los extractos de la manzana con un contenido superior de polifenoles presentan mayor actividad antioxidante.

De acuerdo a la correlación entre el contenido de polifenoles de cada extracto, existe una relación positiva entre polifenoles y los ensayos TEAC y TBARS para la variedad california, en el caso del ensayo DPPH no existe relación significativa entre polifenoles y la prueba empleada. A pesar de que en esta prueba se observa el mejor comportamiento del extracto de acetona con la  $IC_{50}$  más pequeña, la actividad antioxidante no se debe a compuestos de tipo polifenólico.

En el caso de la variedad doble roja, se observa una correlación positiva para los tres ensayos de evaluación de actividad antioxidante, lo que indica que para esta variedad la principal actividad es dada por los compuestos polifenólicos. Cabe resaltar que la correlación más alta se presenta entre los polifenoles y la prueba de TEAC, que concuerda con lo esperado ya que esta prueba es específica para compuestos de tipo polifenólicos.

## 8.5 Determinación cualitativa de ácido ursólico

De acuerdo a lo informado por Silva-Fernández y colaboradores (1964), el contenido de ácido ursólico en manzana Granny es muy cercano a 50 mg por fruto maduro, que fue reportado para la manzana Bramley. En variedades Fuji y Smith se promediaron 0.77 y 0.82 mg/cm<sup>2</sup>, respectivamente, pero la manzana Gala presentó un valor total más bajo, así como la concentración más baja por unidad de superficie (0,21 mg/cm<sup>2</sup>) (Frighetto y cols. 2008). Este trabajo es el primero de exploración en cuanto a la presencia de ácido ursólico en las variedades de manzana (california y doble roja) de Chiautzingo. También se ha descrito la presencia de varios derivados del ácido ursólico en la cáscara de manzana, que podrían ser purificados por los métodos convencionales de cromatografía (Ma y cols. 2005).

Ahora bien, el potencial de las manzanas como un alimento funcional se basa actualmente en la cantidad y tipo de vitaminas, contenido fenólico y pectina. Literatura reciente sobre estudios con fenoles, taninos flavonoides dan soporte a este conocimiento. (Tsao y cols. 2005; Wolfe y Liu, 2003; Wolfe y cols. 2003). Se ha demostrado que el ácido ursólico por si mismo tiene propiedades antioxidantes (Adhikari y cols. 2006; Assimopoulou y cols. 2005), pero su eventual contribución a las propiedades de las manzanas como un nutracéutico no fue explicado. Extractos menos polares (acetona / butanol o butanona) de residuos de origen vegetal han sido reportados con potencial antioxidante *in vitro* más elevado, en comparación con los que contienen altos porcentajes de compuestos fenólicos (Etanol / agua o etanol / butanol y butanona) (Peschel y cols. 2006).

## 9. CONCLUSIONES

Los extractos de acetato de etilo y acetona de manzana (*Malus domestica*) variedad california presentan mayor actividad antioxidante en la captación de radicales libres (ABTS y DPPH) así como en la inhibición de la lipoperoxidación en el tejido cerebral de rata (TBARS), en comparación con los extractos de la manzana variedad doble roja. Esto se observa en las  $IC_{50}$  (DPPH y TBARS), que es menor para los extractos de la manzana variedad california comparados con los antioxidantes de referencia (ácido ascórbico, ácido cafeico, alfa tocoferol y quercetina), así como en la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), que para estos extractos presentan un valor mayor. En cuanto a la correlación entre actividad antioxidante y concentración de polifenoles totales, para la manzana variedad doble roja se tiene una correlacion positiva para todas las pruebas (TEAC, DPPH y TBARS), para el caso de los extractos de la manzana doble roja, esta correlación es positiva para las pruebas de TEAC y TBARS, por el contrario para DPPH no hay relación significativa, por lo que en esta prueba la actividad antioxidante no está explicada por la acción de los compuestos polifenólicos contenidos en los extractos.

## 10. REFERENCIAS

- Achiwa**, Y., Hasegawa, K., & Udagawa, Y. (2005). Molecular mechanism of ursolic acid induced apoptosis in poorly differentiated endometrial cancer HEC108 cells. *Oncology Reports*, 14(2), 507–512.
- Adhikari**, D. P., Schutzki, R. E., DeWitt, D. L., & Nair, M. G. (2006). Effects of Amelanchier fruit isolates on cyclooxygenase enzymes and lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 97, 56–64.
- Alonso-Salces** RM, Barranco A, Corta E, Gallo E, Vicente F, Berrueta LA (2005) Clasification of Apple fruits according to their madirity state by the pattern recognition analisys of their poliphenolics composition. *Food Chemistry* 93, 113-123
- Andlauer**, W., Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. Vol. 35. pp.171–176.
- Arnao**, B. M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 11, pp. 419-421.
- Aron** PM, Kennedy JA. (2008) Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*; 52: 79–104
- Assimopoulou**, A. N., Zlatanov, S. N., & Papageorgiou, V. P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, 92, 721–727.
- Balasundram**, N., Sundram, K., Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*.

Article in press.

**Banno** N., Akihisa T., Tokuda H., Yasukawa K., Higashihara H., Ukiya M., Watanabe K., Kimura Y., Hasegawa J., Nishino H., (2004) Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 85–90.

**Bendich**, A. (1993). Biological functions of dietary carotenoids. In *Carotenoids in Human Health* (L. M. Canfield, N. I. Krinsky, and J. A. Olson, Eds.), Vol. 691, pp. 61–67. Ann. N. Y. Acad. Sci. New York.

**Biedrzycka**, E. and Amarowicz, R. (2008). Dieta and health: apple polyphenols as antioxidants. *Food Rev. Int.* 24:235-251.

**Boyer** J. and Liu H.L. (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J* 3:5

**Branen**, L. A., Davidson, M. P., Salminen, S., Thorngate III, J. H. (2002). *Food Additives*. 2ed, Ed. Marcel Dekker, Inc. pp 523 – 538.

**Brouillard**, R., Dangles, O. (1993) The flavonoids: advances in research since 1986, Harbone J.B. (Ed). *Chapman & Hall*. London 565

**Cadenas**, E., Packer, L. (2002). Handbook of Antioxidants. Editorial Marcel Dekker, Inc. E.U.

**Cardenas** C., Quesada A.R., Medina M.A., (2004) Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 402–408.

**Clement**, J. S., & Mabry, T. J. (1996). Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. *Botanica Acta*, 109,360–367.

**Clifford** MN. (2000) Anthocyanidins-nature, occurrence and dietary burden. *A Sci Food Agric*; 80: 1063-1072.

**Cooper**, D. A. (2004). Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*, 134(1), 221S–224S.

**de Pee**, S. and C. E. West. 1996. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: Review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: (in press).

**DeFelice**, S. L. (1992). The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. Economic and regulatory reforms. *Genetic Engineering News*, 12, 13–15.



- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O.** (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173–289.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.-E., Lavoie, S., Longtin, A., et al.** (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 22–28.
- Dwyer, J.** (1996). Is there a need to change the American Diet?. In: Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and treatment. *Adv. Experim. Med. Biol.* 401:192-193.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH.** Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000;405:903–4.
- Frighetto RTS, Welendorf RM, Nigro EN, Frighetto N, Siani AC.** (2008) Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chem*; 106: 767–71
- Gil, M.I., Tomas, B.F.A., Hess, P.B. y Kader, A.A.** (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. Agric. Food. Chem.* 50(17):4976-4982
- Giner-Larza E.M., Manez S., Recio M.C., Giner R.M., Prieto J.M., Cerda-Nicolas M., Rios J.L.,** (2001) Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity, *Eur. J. Pharmacol.* 428 137–143.
- Godoy H. T. and D. B. Rodriguez-Amaya** (1987). Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and pureé. *Int. J. Food Sci. Technol.* 22:451-460.
- Graça Dias M., Filomena M., Camões G.F.C., Luísa Oliveira** (2009) Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry* 113 808–815
- Harbone, J.B., Baxter H.,**(2000) The handbook of natural flavonoids. John Wiley & sons: New York, vols. 1 y 2
- He X, Liu RH.** (2007) Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J Agric Food Chem*; 55: 4366–70

- Hollman**, P., Katan M. B. (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* 37. 937-942.
- Hu** FB, Willett WC. 2002 Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 288:2569–78.
- Huger** AI, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Ríos JL.2000. Effect of triterpenoid on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Euro. J. Pharm.* 410.69-81
- Ismaili** H., Sosa S., Brkic D., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Touati D., Aquino R.P., Tubaro A., (2002) Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 1137–1140.
- Kamei**, H., Kojima, T., Hasewaga, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., & Terabe, K. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest.*, 13(6), 590–594.
- Kashiwada** Y., Wang H.K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Cosentino L.M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu C.Q., Yeh E., Lee K.H., (1998) Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.* 61 1090–1095.
- Kimura**, M., D. B. Rodriguez-Amaya and S. M. Yokoyama. 1991. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebens. Food Agric.* 45:359-371.
- Krinsky**, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459–516.
- Kuskoski** E. M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J., Fett R., (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732, out.-dez.
- Lampe**, J. (2003) Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals *Am J Clin Nutr* 78(suppl):579S–83S
- Lata** B, Tomala K. (2007) Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. *J Agric Food Chem*; 55: 10795–

- Lee H.Y.**, Chung H.Y., Kim K.H., Lee J.J., Kim K.W., (1994) Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 13– 518.
- Lee I.**, Lee J., Lee Y.H., Leonard J., (2001) Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O<sub>2</sub> consumption, and tumor interstitial fluid pressure, *Anticancer Res.* 21 2827–2834.
- Lee KW**, Kim YJ, Kim DO, Lee HY, Lee CY (2003). Major Phenolics in Apple and Their contribution to the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6516-6520.
- Li J.**, Guo W.J., Yang Q.Y. (2002), Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15, *World J. Gastroenterol.* 8 493–495.
- Liu J.**, (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* 49 57–68.
- Liu, J.** (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 92–94.
- Lotito, S.**, and Frei B. (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and vivo effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, No. 2, pp. 201 – 211.
- Ma, C.-M.**, Cai, S.-Q., Cui, J.-R., Wang, R.-Q., Tu, P.-F., Hattori, M., et al. (2005). The cytotoxicity activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 582–589.
- Mandel S**, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH. 2004 Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 88:1555– 69.
- Matthaus, B.** (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed. *J. Agric. Food Chem.* Vol., 50, 3444-3452.
- Mazza, G.**, (2000). Alimentos funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, pp. 401-436.
- Meh U.I.** and Hokhar S. K (2002) Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations *J. Agric. Food Chem.* 50, 6301–6306 **6301**

- Min** B.S., Jung H.J., Lee J.S., Kim Y.H., Bok S.H., Ma C.M., Nakamura N., Hattori M., Bae K., (1999) Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on HIV-I protease, *Planta Med.* 65 374–375.
- Moure**, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. Vol. 72, pp. 145-171.
- Ovesn'á Z.**, Vach'alkov'á A., Horv'athov'á K., T'othov'á D., (2004) Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds, *Neoplasma* 51 327–333.
- Pepping**, F., C. M. J. Vencken and C. E. West. 1988. Retinol and carotene content of foods consumed in East Africa determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 45:359-371.
- Peschel**, W., Sa'nchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jime'nez, D., et al. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97, 137–150.
- Raphael** T.J., Kuttan G., (2003) Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system, *Phytomedicine* 10 483–
- Re**, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.
- Reddy**, V., K. Vijayaraghavan, K. Bhaskarachary and M. Rani. 1995. "Carotene rich foods: The Indian experience." In *Empowering Vitamin A Foods*. Eds. E. Wasantsvisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition. 15-28.
- Rodriguez** J.A., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G., (2003) Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats, *Pharmacol. Res.* 48 291–294.
- Roginsky**, V., Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. Vol. 92. pp. 235-254.
- Romo** de Vivar R. A., (2006) Química de la flora mexicana. Instituto de química, Universidad Nacional Autónoma de México. 66-88
- Rowland**, I. (2002). En *Alimentos Funcionales: Probióticos*. Médica Panamericana S. A.

España. Pág. 1-6.

**Rzedowski J y Rzedowski G** (2001) Flora fanerogámica del Valle de México, Instituto de ecología 44-56

**Saraswat B.**, Visen P.K.S., Dayal R., Agarwal D.P., Patnaik G.K., (1996) Protective action of ursolic acid against chemical induced hepatotoxicity in rats, *Indian J. Pharmacol.* 28 232–239.

**Scott, F. W.**, N. S. Lee, R. Mongeau, N., Hidioglou, M. L'Abbé, A. Sarwar, R. (1996). Recommendations for defining and dealing with functional foods. A discussion paper. Ottawa: Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health Canada.

**Setiawan B.**, Sulaeman A, Giraud DW, and Driskell JA (2001) Carotenoid Content of Selected Indonesian Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 169-176

**Shishodia S.**, Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B.B., (2003) Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1, *Cancer Res.* 63 4375–4383.

**Silva-Fernandes, M. S.**, Baker, E. A., & Martin, J. T. (1964). Studies on plant cuticle. VI. The isolation and fractionation of cuticular waxes. *Annals of Applied Biology*, 53, 43–58.

**Silvis N.** 1992 Nutritional recommendations for individuals with diabetes mellitus. *S Afr Med J* 81:162–

**Sohn K.H.**, Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Yi S.Y., Kim K.W. (1995), Anti-angiogenic activity of triterpene acids, *Cancer Lett.* 94 213–218.

**Somova L.O.**, Nadar A., Rammanan P., Shode F.O., (2003) Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *Phytomedicine* 10 115–121.

**Souci SW**, Fachmann W, Kraut H, revised by Kirchhoff E (2008). Food composition and nutrition tables, based on the 6th edition. Stuttgart: medpharm GmbH Scientific Publishers; 1364 p.

**Speek, A. J.**, S. Speek-Saichua and W. H. P. Schreurs 1988. Total carotenoid and  $\beta$ -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food. Chem.* 27:245-257.

**Temple NJ.** 2002 Nutrition and disease: challenges of research design. *Nutrition* 18:343– 7.

- Thielen** C, Will F, Zacharlas J, Dietrich H, Jacob H (2004). Polyphenols in apples: Distribution of polyphenols in apple tissue and comparison of fruit and juice. *Dtsch Lebensmitt Rundsch*; 100: 389–98
- Tokuda** H., Ohigashi H., Koshimizu K., Ito Y., (1986) Inhibitory effects of ursolic acid and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Lett.* 33 279–285.
- Tsao** R., Yang R., Xie S., Sockovie E., and Khanizadeh S.(2005) Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple? *J. Agric. Food Chem.*, 53 (12), 4989-4995
- Tsao**, R., Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*. Vol. 812, pp. 85-99.
- Vaidya**, Y. 1995. “Vitamin A food production and use in Nepal”. In *Empowering Vitamin A Foods*. Eds. E. Wasantwisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition, 29-44
- Wang**, H.; Cao, G.; Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 701-705.
- Wasantwisut**, E., P. Sungpuag, V. Chavasit, U. Chittchang, S. Jittinandana and T. Viriyapanich. 1995. “Identifying and recommending vitamin A rich foods in Northeast Thailand.” In *Empowering Vitamin A Foods*. Eds. E. Wasantwisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition, 69-90.
- Watson** L y Dallwitz MJ (1992) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version 14 December 2000.
- Wilberg**, V. C. and D. B. Rodriguez-Amaya. 1995. HPLC quantitation of major carotenoides of fresh and processed guava, mango and papaya. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28:474-480.
- Willis** MS, Wians FH. 2003 The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin Chim Acta* 330:57– 83.
- Wolfe**, K. L., & Liu, R. H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676–1683.
- Wolfe**, K. L., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609–614.

**You H.J.**, Choi C.Y, Kim J.Y., Park S.J., Hahm K.S., Jeong H.G., (2001) Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production via nuclear factor- $\kappa$ B activation in the resting macrophages, *FEBS Lett.* 509 156–160.

**Young I.S.**, (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin pathol* 54, 176-186.