



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD MICHOACÁN**



**“PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE
FRUTO DE FRESA DE VARIEDADES MEXICANAS Y EXTRANJERAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

**PRESENTA:
FABIÁN HERIBERTO RIVERA CHÁVEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. HORTENCIA GABRIELA MENA VIOLANTE**

**COORDIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE MOLINA TORRES**

Jiquilpan, Michoacán, México. Noviembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich; siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR - MICH. para examinar la tesis titulada:

Propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de fruto de fresa de variedades nacionales y extranjeras

Presentada por el alumno:

Table with student information: RIVERA (Apellido paterno), CHÁVEZ (Apellido materno), FABIÁN HERIBERTO (Nombre(s)). Includes a registration number: B 0 9 1 4 0 6.

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Signature of Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Signature of Dr. Jorge Molina Torres

Signature of Dra. María Valentina Angoa Pérez

Signature of Dr. Sigifredo López Díaz

Signature of Dr. José Néscas González



Signature of Dr. Guillermo Herrera Arreola, Presidente del Colegio de Profesores



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán. el día 21 del mes de noviembre del año 2011, el que suscribe: IBQ. Fabián Heriberto Rivera Chávez alumno del Programa de Maestría en Ciencia en Producción Agrícola Sustentables con número de registro_B091406, adscrito a CIIDIR unidad Michoacán, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante y cede los derechos del trabajo intitulado Propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de fruto de fresa de variedades nacionales y extranjeras, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: ibqriviera@gmail.com, fabis56@hotmail.com y tenchisgmv@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



IBQ. Fabián Heriberto Rivera Chávez

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN unidad Michoacán), así como en el laboratorio de Alimentos Funcionales del CIIDIR-IPN unidad Sinaloa y en el laboratorio de Fitobioquímica del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato.

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional, por la beca que se me otorgó a partir de la convocatoria de año 2009, sin la cual no habría podido realizar mis estudios de posgrados ni la culminación de este trabajo de investigación.

Del mismo modo quiero agradecer al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Michoacán ubicado en Jiquilpan de Juárez Michoacán (CIIDIR-IPN unidad Michoacán) así como a todo el personal que en él labora por la oportunidad de desarrollo personal y profesional que me brindaron.

Extiendo mi agradecimiento a las instituciones que muy eficientemente me permitieron desempeñar parte de mi investigación en sus instalaciones particularmente el CIIDIR-IPN unidad Sinaloa y CINVESTAV Unidad Irapuato.

Por último, agradezco al CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto de Ciencia Básica 131769.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi consejera, maestra, patrocinadora pero principalmente querida amiga la Dra. Hortencia G. Mena Violante (Tenchis) por haberse atrevido a dirigirme de nuevo en mi proyecto de maestría a pesar de la experiencia de la licenciatura ¡Muchas gracias por todo el apoyo durante estos años!

De la misma manera quiero agradecer al Dr. Jorge Molina Torres por haber aceptado ser codirector de este proyecto y por la confianza de dejarme regresar a trabajar en su laboratorio y toda la facilidad que se me otorgaron en él, así como al M.C. Enrique Ramírez Chávez (Kike) por la paciencia e interés en mi proyecto.

Espero que solo sea la primera de muchas colaboraciones en conjunto.

De manera muy especial quiero también agradecer a mi tutora y también amiga la Dra. María Valentina Angoa Pérez (Valecita), por todos sus contribuciones a mi investigación así como a mi formación como investigador y como persona ¡Muchas gracias por estar tan al pendiente de nuestra formación! Todos tus consejos los llevo grabados en mi mente y trato de ponerlos en práctica todos los días.

Agradezco al Dr. Sigifredo López Díaz y al Dr. José Venegas González por sus contribuciones a mi investigación así como mi formación en estos años en la maestría.

A mis queridas amigas la M.C. Guadalupe Oyoque, Jazmín Medellín y Alicia por todo su apoyo para la realización de este proyecto así como a todo el personal administrativo del CIIDIR-IPN unidad Michoacán: Lupita Arceo, Don Javier, Don Manuel, Toñito, Don Toño, Magdita. ¡Gracias por todo su apoyo!

También extendo mi agradecimiento al Dr. Sergio Medina Godoy por las facilidades que me fueron prestadas en el laboratorio de Alimentos Funcionales en CIIDIR-IPN unidad Sinaloa así como a la Dra. Gabriela Espinoza por su tiempo y paciencia para el desarrollo de este proyecto.

Reza un viejo dicho, “Un hermano no siempre es un amigo, pero un amigo siempre es un hermano” por tal yo agradezco a mis ¡AMIGOS! Víctor Manuel Lomelí Orozco (Chocolate), Jaime Castillo Navarrete, Jonás García Segura (Marranas), Rafael Zamora Vega (El Abuelo) gracias por todo su apoyo pero más que nada gracias por su amistad y por estar conmigo cuando más lo he necesitado sin esperar nada a cambio.

DEDICATORIA

Durante el desarrollo de un proyecto siempre hay que hacerle frente a obstáculos que lejos de ser trabas en ocasiones es de donde más se aprende y este no fue la excepción. Problemas de todo tipo, económicos, personales, geográficos etcétera, se presentaron durante estos últimos dos años y medio pero creo que ninguno como el deterioro de salud que tuve en el último año, obstáculo que de no ser por el apoyo y amor incondicional de mi familia no habría podido superar es por esto que este trabajo se lo quiero dedicar con todo mi afecto, agradecimiento y amor:

A mis padres Ernesto Rivera Tamayo y Alma Chávez Cervantes porque gracias a su ejemplo no me doy por vencido y gracias a su temple sigo en pie.

A mis Hermanos Yuri, Iván, Vanessa y Lorena cuyo apoyo no ha tenido límites y no han dejado de estar al pendiente de mí.

A mis sobrinas Marian y Ximena que todas las noches rezan por mi pronta recuperación y que siempre tienen un beso y un abrazo que lo curan todo.

La familia no solo se marca por los lazos de sangre si no por las personas que entran en tu vida y se vuelven parte indispensable de ella.

Quiero extender la dedicatoria de esta tesis también para aquellas personas que se han incorporado a mi familia en particular mi cuñado Mario Beirana.

Por último, por la ilusión de formar un día una familia, también quiero dedicar este trabajo a Melissa Medina Ríos, cuyo apoyo fue indispensable para buen lograr este proyecto y por su amor, cariño y paciencia en los últimos meses.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. PROBLEMÁTICA DE SALUD	7
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO	11
2.3. RADICALES LIBRES	12
2.4. ANTIOXIDANTES	13
2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS	15
2.5.1. FLAVONOIDES	16
2.5.2. ANTOCIANINAS	18
2.5.3. BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	22
2.5.4. PROPIEDADES BIOACTIVAS.	25
2.6. LA FRESA COMO FUENTE DE COMPONENTES BIOACTIVOS	26
2.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA	27
3. OBJETIVO	29
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	30
5.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH	30
5.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: MÉTODO ABTS	30
5.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	32
5.5. HPLC	33
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
7. RESULTADOS	38
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	50

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración	Página
Figura 1: Estructura básica de los compuestos fenólicos	16
Figura 2: Ión flavilio y su correspondiente base anhidro. El ion flavilo en soluciones alcalinas se torna azul	20
Figura 3: Estructura básica de las antocianinas	21
Figura 4: Ruta sintética de los flavonoides	23
Figura 5: Ruta sintética de antocianinas	24
Fotografía 1: Bandas de separación en TLC con Rf = 0.6	35
Diagrama 1: Espectro de masas para el compuesto mayoritario de la banda con Rf=0.6 observándose un componente con peso molecular 433,14 m/z y un ión padre de 272m/z	35
Diagrama 2: Tiempos de retención en HPLC	36
Diagrama 3: Espectro de absorción, en la región uv/vis, del componente con tiempo de 3.414 min	36
Diagrama 4: Espectro de absorción, en la región uv/vis, del componente con tiempo de 3.74	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de fenoles totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	38
2: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de fenoles totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	39
3: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de flavonoides totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	39
4: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de flavonoides totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	40
5: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de antocianinas totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	40
6: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de antocianinas totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.	41
7: Comparación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, de las fracciones fenólicas extraídas de frutos de distintas variedades de fresa.	42
8: Comparación de la actividad antioxidante por el método de ABTS, de las fracciones fenólicas extraídas de frutos de distintas variedades de fresa.	43

RESUMEN

En los últimos años ha surgido toda una tendencia social de buscar alternativas para una vida más saludable, existe una amplia bibliografía donde se describen diversas ventajas del consumo de compuestos originarios del metabolismo secundario de las plantas. En particular, el grupo de los fenoles ha despertado mucho interés en la comunidad científica, y se ha encontrado que las frutillas o bayas son de los frutos más ricos en dichos compuestos. La fresa (*Fragaria x ananassa*) es hoy en día una de las frutillas de mayor popularidad y demanda en todo el mundo, no solo por su sabor y color, sino por los beneficios a la salud que proveen los compuestos fenólicos presentes en este fruto, a los cuales se les han atribuido propiedades antioxidantes. Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides comprenden alrededor de 15 subgrupos de moléculas dentro de las cuales destacan las antocianinas, pigmentos que confieren su color característico a la fresa.

Esta frutilla es de gran importancia económica en México por la generación de divisas derivada de su exportación. Para cubrir la demanda del fruto se ha optado por la adquisición de plantas mejoradas desarrolladas en el extranjero, lo cual incrementa los costos de producción por el pago de regalías. Es por esta razón que se han desarrollado variedades mexicanas, las que han mostrado su competitividad en cuanto a productividad, pero poco se sabe sobre su calidad interna. En el presente trabajo se determinó la capacidad antioxidante por inhibición de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)(ABTS) de tres extractos metanólicos: fenólicos totales, flavonoides y antocianinas, obtenidos de los frutos de dos variedades mexicanas liberadas en 2010, la CP. Zamorana y la CP. Jacona, y cuatro variedades extranjeras de fresa: Chiflon, Albion, Festival y Krystal. Los resultados mostraron que los flavonoides de todos los frutos poseen mayor poder antioxidante, comparado con los otros dos extractos. Por su parte, la fresa mexicana demostró poseer un poder antioxidante que la hace competitiva

en este parámetro de calidad, con las fresas extranjeras e incluso supera a algunas variedades que se cultivan comúnmente en Michoacán como la Albion y la Chiflon. Por último se estableció la metodología para la evaluación del pelargonidina-3-glucósido por medio del aislamiento por cromatografía en capa fina (TLC) y caracterización por MALDI TOF MS/MS.

ABSTRACT

In recent years it has been a social tendency to look for a healthier way of life exploring natural options in health care, there is an extended bibliography that describes the benefits of the consumption of natural compounds from plant secondary metabolism. Especially, compounds from phenol family have awakened great interest in scientists. It has been found that berries are some of the richest fruits in phenols structures. Strawberry (*Fragaria x ananassa*) is now in day one of the most popular fruit in the world, not only for its unique is now in day but also for the benefits to human health of its consumption, due to the phenolic compounds present in this fruit, particularly flavonoids, which have shown to have antioxidant properties. Most prominent among the flavonoids are the anthocyanins, plant colorants responsible for the red color of strawberries.

Strawberries are an important part of Mexico's economy, mainly because of their export market. In order to satisfy market needs, Mexican strawberry producers must pay royalties to get plants. Thus, new strawberry varieties showing to be competitive with yield of American and European varieties have been developed in México. However, anything is known about the internal quality of their fruit. The goal of this study was to evaluate the antioxidant capacity of the Mexican strawberry fruits, by measuring inhibition of the free radicals 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) and the 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-sulfonic-acid) (ABTS) in three phenolic fraction obtained from mexican varieties CP. Zamorana and CP. Jacona, and also from foreigner strawberry verities Chiflon, Albion, Festival and Kristal. The flavonoids fraction showed higher antioxidant capacity than the other.

The antioxidant capacity of Mexican strawberry varieties, make them competitive with the foreign varieties. Fruits from Jacona and Zamorana varieties had higher antioxidant activity than those from Albion and Chiflon,

varieties commonly grown in Michoacán. Methodology for the evaluation of pelargonidin-3 glucose was established, isolating the molecule by thin layer chromatography technique and characterizing the molecule by MALDI TOF MS/MS.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una preocupación social y económica en países desarrollados es el número de personas que sufren diversas patologías crónico-degenerativas relacionadas con la edad avanzada como son las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, y enfermedades neurodegenerativas. Muchas investigaciones corroboran la estrecha relación que existe entre los procesos de oxidación y estas enfermedades crónico-degenerativas. Dicho proceso de oxidación comprende la formación de *radicales libres* que son átomos o moléculas reactivas, debido a que en el orbital más externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear capaces de causar daños a moléculas aledañas. Algunos de estos radicales libres son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio extenuante, o también pueden ser generados por factores ambientales; la contaminación, el fumar, la radiación ultravioleta que emite el sol, algunos medicamentos y aditivos químicos en alimentos, entre otros.

Del mismo modo, en la naturaleza existe una serie de compuestos que contravienen a los radicales libres, dichos compuestos se conocen como antioxidantes, que son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, este grupo de moléculas antioxidantes abarca a los ascorbatos, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos, entre otros. Muchos estudios relacionados con la capacidad antioxidante, se han centrado en bayas como arándano, uva, mora, frambuesa y fresa por su alto contenido de compuestos fenólicos.

La fresa (*Fragaria x ananassa*) pertenece a la familia de las rosáceas y al género *Fragaria* que comprende diversas plantas rastreras perennes, que se cultiva por su fruto comestible. El fruto de la fresa, contiene componentes bioactivos o nutraceuticos como los fenoles entre los cuales destacan las antocianinas, que se ha descubierto tienen propiedades benéficas para el organismo, ya que

juegan un rol de vital importancia en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas, debido a su capacidad antioxidante.

México ocupa el octavo lugar a nivel mundial en producción de fresa, y dentro del país, Michoacán ocupa el primer lugar ya que genera 48.5 por ciento de la producción, siendo el valle de Zamora la región de mayor importancia en cuanto a volumen de producción, mano de obra empleada y número de empresas procesadoras establecidas. Para poder atender a la gran demanda de este fruto los productores de fresa en México han optado por importar plantas de fresa mejoradas, para una mayor productividad, esto con un costo que supera los 4 millones de dólares anuales solo en pago de regalías. Esto motivó a investigadores nacionales del Colegio de Posgraduados con financiamiento de Fundación Produce Michoacán, a desarrollar variedades de fresa mejoradas mexicanas. Hasta la fecha se han liberado ya dos variedades, la Zamorana y la Jacona, ambas han tenido resultados prometedores en cuanto al rendimiento, productividad, y algunos parámetros de calidad (*e.g.* color y sabor), pero no se sabe nada sobre su calidad nutracéutica relacionada con sus propiedades antioxidantes, por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones de fenoles, flavonoides y antocianinas, contenidos en extractos metanólicos provenientes de frutos de fresa de variedades tanto mexicanas como extranjeras.

2. ANTECEDENTES

2.1. PROBLEMÁTICA DE SALUD

El ritmo de vida de las grandes ciudades y los problemas con los que el hombre tiene que lidiar diariamente han venido a afectar la salud de la población en general. Enfermedades que hace algunos años eran prácticamente desconocidas hoy en día son el común denominador de las clínicas (Pérez y col., 2006). La población de pacientes con problemas de obesidad, hipertensión y enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer supera la capacidad médica de los hospitales.

El sobrepeso, condicionado por una elevada ingesta calórica y conducta sedentaria, se denomina obesidad exógena. Las tasas de sobrepeso y obesidad han alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo. En América Latina esta epidemia trasciende las fronteras socioeconómicas y aqueja por igual a ricos y pobres, así como a personas de todas las edades. Este fenómeno, constituyó así el primer caso de enfermedad crónica no transmisible (ECNT), a la que actualmente se agregan la diabetes mellitus tipo II, la dislipidemia, la hipertensión arterial y la aterosclerosis (Pérez y col., 2006).

En 1931 las principales causas de muerte en México eran diarreas, neumonías y enfermedades de la primera infancia, para el 2011 los principales padecimientos que atiende el sistema de salud son alteraciones cardíacas, cáncer y diabetes. La Encuesta Nacional de Salud 2000 en México, indicó que existen alrededor de 30 millones de adultos en México con sobrepeso u obesidad, en una cantidad de 18.5 millones y 11.4 millones respectivamente. La prevalencia de obesidad fue casi del 50% mayor en las mujeres donde se observa 28.1%, comparada con la de los hombres 18.6%, en contraste, el sobrepeso fue discretamente mayor en el sexo masculino 40.9 *vs.*36.1% (Sepúlveda y col., 2000).

El sobrepeso y la obesidad se han asociado a las enfermedades cardiovasculares, que se deben a fenómenos agudos de obstrucción del paso de la sangre hacia el corazón u otros órganos vitales. Lo alarmante de los problemas cardiovasculares es que hoy en día son muy comunes en jóvenes, lo que antes era muy raro. Es más cotidiano ver a pacientes de 30 años con infartos cuando hace diez años no lo era (Olaiz y col., 2006).

La Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), es uno de los problemas de salud pública más importantes en la población adulta. La Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas del año 2000, reportó una tasa de HAS del 30.05% en la población mayor de 20 años (Huerta y col., 2005).

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el 2006: 70% de los mexicanos tenían obesidad y sobrepeso. De igual forma 1 de cada 3 niños eran obesos. Por otro lado, según la OMS en el 2020 tres cuartas partes de las muertes del mundo serán a causa de enfermedades crónicas (World Health Organization, 2010).

La diabetes mellitus tipo II: Es un aumento de contenido de glucosa en sangre que modifica el funcionamiento del cuerpo. En esta enfermedad la glucosa no puede ingresar a la célula por lo que priva a esta del combustible requerido para su funcionamiento. Esto puede deberse a que los receptores encargados de ingresar la glucosa a la célula no funcionen o no reconozcan a la glucosa y por ende la célula no la pueda utilizar para producir energía. Este cambio metabólico es muy problemático y puede llegar a ser grave si no se le da un manejo y control adecuado, realizando actividad física todos los días y llevando una dieta adecuada.

Las enfermedades cardiovasculares ocupan los primeros lugares como causa de mortalidad en el mundo. El riesgo cardiovascular está asociado a diferentes factores como son (de la Torre, 2007):

- Malos hábitos alimentarios y del estilo de vida:

- Consumo elevado de colesterol
- Consumo elevado de ácidos grasos saturados (AGS)
- Consumo elevado de ácidos grasos *trans*
- Pobre consumo de frutas y verduras
- Vida sedentaria
- Estrés
- Tabaquismo
- Parámetros bioquímicos y clínicos:
 - Triacilglicéridos elevados ($>150 \text{ mg mL}^{-1}$)
 - Valores de lipoproteína de baja densidad (LDL) elevados ($>4.1 \text{ mM}$ ó 160 mg mL^{-1})
 - Valores de lipoproteína de alta densidad (HDL) disminuidos ($<0.9 \text{ mM}$ ó 35 mg mL^{-1})
 - Hipercolesterolemia ($>4.6 \text{ mM}$, o bien 180 mg mL^{-1})
 - Hipertensión: Presión sanguínea sistólica $>140 \text{ mm Hg}$ y diastólica $>90 \text{ mm Hg}$
 - Hiperglucemia (valores en ayunas $>6.0 \text{ mM}$ ó $>110 \text{ mg L}^{-1}$)
 - Obesidad ($\text{IMC} > 27$)
 - Alto porcentaje de grasa intra-visceral
 - Hipertrofia Ventricular izquierda
 - Otros: Niveles plasmáticos elevados de: insulina, fibrinógeno, hemoglobina glicada, remanentes lipoprotéicos, partículas pequeñas de LDL, entre otros.
- Factores no modificables:
 - Edad
 - Sexo
 - Post-menopausia
 - Factores hereditarios

En la actualidad se sabe que el cáncer es un proceso con múltiples estadios, producto de la acumulación, en una célula, de sucesos genéticos y

epigenéticos. Dentro de la biodiversidad de nuestro mundo, las plantas vasculares contienen una enorme variedad de compuestos que pueden ser útiles en la quimio prevención de enfermedades relacionadas con las mutaciones (Arencibia y col., 2003).

Numerosos estudios hacen énfasis en la relación existente entre la mutagénesis y la carcinogénesis en alguna de las fases de desarrollo de la enfermedad. Un buen ejemplo, es el trabajo recogido en la base de datos EBI donde se demuestra que las mutaciones puntuales en el gen p53 son la causa de tumores en líneas celulares de humanos.

Dado que los compuestos químicos ambientales están ampliamente relacionados con el desarrollo de muchos tipos de cáncer en humanos, su eliminación o neutralización en el organismo es de vital importancia para contribuir a la prevención de tales padecimientos.

Las células vivas están adaptadas a reaccionar cotidianamente contra potenciales efectos mutagénicos y carcinogénicos de componentes fisiológicos y no solamente cuando se encuentran en un ambiente desafiante. Además de los factores de protección presentes en la misma, pueden crear una eficiente barrera que tiende a disminuir la dosis activa de los agentes deletéreos. Muchas investigaciones apuntan hacia la estrecha relación que existe entre los procesos de oxidación y las enfermedades crónico-degenerativas ya mencionadas. El proceso de oxidación comprende la formación de radicales libres capaces de causar daños irreparables.

Los antimutágenos naturales presentes en la dieta constituyen una opción importante como agentes quimiopreventivos contra el cáncer y otros padecimientos de riesgo, ya que la mayoría de los tratamientos de la mutagénesis provenientes de otras fuentes exógenas como la radioterapia o quimioterapia pueden causar efectos adversos.

La oxidación causada por estas especies reduce la capacidad para combatir los efectos del envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, por lo que se han asociado a multitud de procesos clínicos incluyendo lesiones inflamatorias, lesiones por compuestos tóxicos y radiaciones, sobrecarga de hierro, enfermedades autoinmunes, diabetes, daño renal, enfisema pulmonar, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, demencia senil, cáncer, aterosclerosis y otras enfermedades cardiacas. De hecho, el propio envejecimiento se considera como el resultado del daño oxidativo, principalmente a la mitocondrias celulares a través del paso del tiempo (de la Torre, 2007).

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El cuerpo humano, dentro de sus procesos metabólicos produce, de manera natural los *radicales libres* y otras especies oxidantes, las cuales serían una grave amenaza para la salud de no ser que el mismo cuerpo reacciona ante ellos mediante defensas naturales. Sin embargo, al paso de los años estas defensas van perdiendo efectividad o se producen en menor cantidad. A la par, el cuerpo va incrementando la producción de radicales libres, si a esto se suman las fuentes exógenas de radicales como los contaminantes ambientales, la radiación solar, el consumo de alimentos procesados o chatarra, entre otros, el envejecimiento fisiológico se va acelerando (de la Torre, 2007).

Dentro del organismo se genera un gran número de reacciones químicas que son favorecidas por acción enzimática y radiaciones ionizantes, produciendo especies reactivas de oxígeno, también conocidas como prooxidantes, las cuáles pueden dañar moléculas como el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. Este desajuste entre el sistema oxidativo de defensa y la producción de prooxidantes, es lo que se conoce como estrés oxidativo. Se ha señalado que dicho desajuste contribuye a la lesión y muerte citológica, acelerando el proceso de envejecimiento y promoviendo un gran número de enfermedades (Yu y col., 2002).

2.3. RADICALES LIBRES

Un radical libre es una especie química definida que tienen en su estructura uno más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable, altamente reactivo con gran capacidad de formar otros radicales libres y dañar estructuras celulares. Estos compuestos, buscan aparear el electrón desapareado con el fin de estabilizarse por lo que, cuando la molécula que ha sido atacada ha perdido un electrón, se convierte en un radical libre, generándose así una reacción en cadena en la cual se forman más radicales libres o se forman otras sustancias tóxicas. Generalmente los radicales libres atacan las moléculas estables más cercanas. Los radicales libres se generan de forma natural durante el metabolismo por medio de la reducción parcial de la molécula de oxígeno formándose así especies reactivas como el hidropéroxido de hidrógeno (H_2O_2^-), superóxido (O_2^-), hidropéroxilo (HO_2^-) e hidroxilo (OH^-) entre otros. La producción puede incrementar frente a diferentes estados de estrés fisiológico. A concentraciones elevadas pueden dañar la mayoría de los constituyentes celulares (Lima, 2002; de la Torre, 2007).

Los radicales libres son producidos por células del sistema inmune para desactivar virus y bacterias, para eliminar gérmenes y para reducir procesos inflamatorios. Los radicales libres son capaces de dañar de forma reversible o irreversiblemente todo tipo de compuestos bioquímicos, principalmente ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos e hidratos de carbono. Este efecto ocasiona desestabilización o desintegración de los componentes celulares (de la Torre, 2007).

Algunas reacciones específicas de los radicales libres son:

a) El radical hidroxilo ataca proteínas, DNA y ácidos grasos poli-insaturados en las membranas celulares.

b) El radical superóxido reacciona con el hierro, produciendo un complejo oxi-radical metal-ión y el radical-hidroxilo que daña las células lipídicas y el DNA.

c) El radical peroxilo se produce durante la cadena de reacción de la peroxidación lipídica; daño ocurrido en la membrana celular.

d) El oxígeno singulete daña el DNA y es mutagénico. Cataliza la producción de radicales libres. Es generado por las reacciones fotoquímicas de la peroxidación lipídica en la membrana celular (Medrano, 2005).

Actualmente se ha incrementado el interés en componentes activos de fuentes naturales para prevenir y combatir el estrés oxidativo (Yu y col., 2002; Kolayli y col., 2003; Montalvo, 2006).

Diversos factores externos contribuyen al estrés oxidativo en el organismo, como son el aire contaminado, alcohol, los componentes del humo de cigarro, la luz solar, el ejercicio extenuante, dietas altas en calorías con poca ingesta de antioxidantes. A pesar que los seres vivos están protegidos por la acción de enzimas y antioxidantes naturales del daño que causan los radicales libres, cuando se abusa de dichos factores, los mecanismos de defensa no son suficientes para combatir los efectos nocivos de la sobreexposición de las células a un medio con grandes cantidades de prooxidantes (Benvenuti y col., 2004).

Los compuestos bioactivos de origen natural han demostrado ser una alternativa efectiva para prevenir padecimientos crónicos y degenerativos como el cáncer o enfermedades cardiovasculares y neuronales, vinculados con la presencia de radicales libres en el organismo (González y col., 2007).

2.4. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes neutralizan los radicales libres, cediéndoles el electrón que les falta y convirtiéndolos en moléculas estables (Medrano, 2005). Existen

antioxidantes exógenos o no enzimáticos y endógenos o enzimáticos según su procedencia. También se pueden clasificar de acuerdo a su campo de acción en: primarios los que impiden la formación de radicales libres y quelan metales de transición; secundarios, los que interrumpen la reacción de propagación por inactivación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno; terciarios los que reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado. Muchos de ellos pueden pertenecer a más de una clase.

En condiciones normales, el organismo puede prevenir el daño producido por radicales libres a través de sus mecanismos de protección, los cuales incluyen algunas enzimas, tales como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Estas enzimas son capaces de catalizar las reacciones que transforman a los radicales libres y a sus precursores en sustancias inocuas. Las enzimas proteolíticas constituyen un sistema secundario de defensa, ya que identifican y remueven proteínas dañadas u obsoletas. Algunas coenzimas que intervienen en los sistemas de defensa antioxidante son: la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) y la nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADP); la flavin adenin dinucleótido (FAD) y la flavin adenin mononucleótido (FMN), la coenzima Q y los grupos hemínicos del citocromo.

Los antioxidantes hidrosolubles (glutatión, ácido úrico y vitamina C, niacina, riboflavina), y los liposolubles (beta-carotenos, vitamina E) también protegen al organismo contra el ataque de los radicales libres.

Las sustancias con actividad captora de radicales libres tienen relevancia en la prevención y terapéutica de enfermedades en las cuales la oxidación o radicales libres están implicados (Medrano, 2005).

Es una realidad actual que al incrementar el consumo de antioxidantes en la dieta es posible lograr un equilibrio entre éstos y los agentes oxidantes. Es precisamente de fuentes naturales o derivados de un compuesto natural básico de donde provienen aproximadamente el 30 % de los productos antioxidantes más eficaces (González y col., 2007).

2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS

Un grupo importante de antioxidantes o compuestos bioactivos lo constituyen los compuestos fitoquímicos, algunos de los cuales se han relacionado con la protección contra enfermedades degenerativas, cáncer, cardiopatías y otras enfermedades. Entre las propiedades benéficas de los compuestos fitoquímicos se encuentran la protección contra lesiones celulares y subcelulares, inhibición del crecimiento de tumores, activación de los sistemas de detoxificación hepáticos y bloqueo de las vías metabólicas que pueden ocasionar carcinogénesis. En particular, los compuestos fenólicos son fitoquímicos que han despertado interés en los últimos años, ya que pueden detener la cadena de radicales libres de reacciones oxidativas por medio de la donación de átomos de hidrógeno de sus grupos hidroxilo, formando radicales libres relativamente estables que no inician o propagan más oxidación de lípidos (de la Torre, 2007). Por tal razón, su consumo se ha asociado con posibles beneficios a la salud como agentes que pueden contrarrestar el deterioro del organismo (envejecimiento)(Velásquez y col., 2004), así como la incidencia de enfermedades de carácter crónico degenerativo como el mal de Parkinson, diabetes o cáncer. Es por ello, que los compuestos fenólicos han sido objeto de múltiples investigaciones y desarrollos tecnológicos para cuantificar estas propiedades (Artajo., 2006; Bhooshan y Ibrahim, 2009) relacionadas con su capacidad de quelar metales, inhibir enzimas como la lipoxigenasa y la peroxidasa, y capturar radicales libres. Se ha reportado que los productos alimenticios ricos en compuestos fenólicos poseen propiedades farmacológicas hipotensoras y antioxidantes (Arroyo y col., 1997). Entre los grupos de alimentos ricos en estos compuestos se encuentra la familia de las bayas o berries. En la medicina tradicional Nórdica por ejemplo, el arándano ha sido utilizado durante décadas como un remedio para los padecimientos gástricos, mientras que la frambuesa se ha usado para combatir infecciones en las vías urinarias, ya que algunos compuestos fenólicos presentes en estos frutos pueden inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos para el ser

humano, siendo una alternativa para contrarrestar la resistencia a antibióticos que muchos de ellos han adquirido (Puupponen, 2005). Adicionalmente, algunos compuestos fenólicos están siendo considerados como posibles aditivos alimentarios antioxidantes (Madrano, 2005).

En términos generales, los compuestos fenólicos tienen una estructura básica que incluye un anillo aromático Figura 1. Se han clasificado hasta el momento alrededor de 8,000 moléculas dentro de este grupo repartidos entre 12 subcategorías, siendo responsables de los brillantes colores que se presentan en un amplio rango de especies vegetales en distintos tejidos (*e.g.* flores, frutos) (Artejo, 2006).

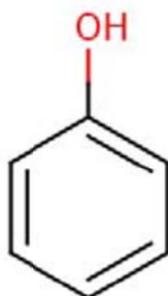


Figura 1: Estructura básica de los compuestos fenólicos

2.5.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides, cuyo nombre deriva del latín *flavus*: “amarillo”, son un grupo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular ampliamente distribuidos en las plantas (Li *y col.*, 2007). Los flavonoides poseen estructuras más complejas y con mayor peso molecular comparadas con la estructura de los fenoles, esto debido a los grupos que se agregan a la estructura básica de los flavonoides principalmente grupos OH y H, y es precisamente la capacidad de estas moléculas para desprenderse de estos grupos lo que les confiere su poder antioxidante (Dejas *y col.*, 2003; Grotewold, 2006).

La estructura de estos pigmentos vegetales se basa en el esqueleto del difenilpropano (C₆-C₃-C₆) con diferente grado de oxidación en el anillo pirano (Figura5). La estructura presenta dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos, ciclada a través de un oxígeno, los cuales se caracterizan por tener varios grupos oxhidrilos en el anillo aromático. Esta estructura base puede presentar muchas sustituciones y variaciones que dan lugar a los diversos tipos de flavonoides: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononas, catequinas, leucoantocianos, antocianos, chalconas y auronas, las catequinas, leucoantocinos, proantocianidinas y antocianos, los cuales a pesar de considerarse dentro del amplio grupo de los flavonoides, usualmente se estudian como grupos fitoquímicos independientes (Li *y col.*, 2007; Ren *y col.*, 2003; Sotiroudis y Kyrtopoulos, 2008).

Existen reportes de alrededor de 2000 moléculas distintas clasificadas dentro del grupo de los flavonoides (Lin y Weng, 2006) siendo la quercetina la estructura básica de estos compuestos y la más abundante de estos, presentes en los alimentos y algunos autores clasifican a los flavonoides como las moléculas de mayor importancia bioactiva como nutraceuticos presentes en las plantas (Grotewold, 2006).

En cuanto a la actividad biológica de estos fitoquímicos, se ha reportado que la quercetina, la catequina y sus derivados: la tirosina, el ácido caféico, el ácido clorogénico y las agliconas de ciertos flavonoides, interfieren en enlaces químicos generadores de moléculas carcinógenas (de la Torre, 2007). Algunos flavonoides como el resveratrol, quercitina y catequina debido su acción antioxidante pueden prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y están ligados a la prevención de cáncer de mama (Pietta, 2000). Otros efectos positivos de los flavonoides sobre la salud humana son el fortalecimiento de los vasos capilares, previniendo que éstos se cierren fácilmente, y la protección contra infecciones. Adicionalmente, los flavonoides pueden relajar el músculo liso del sistema cardiovascular, disminuyendo así la presión de la sangre y mejorando la circulación en el

propio corazón. Debido a los efectos antes descritos, diversos estudios epidemiológicos han reportado la relación entre el consumo en la dieta de productos alimenticios ricos en flavonoides, con una baja incidencia de enfermedad cardiaca coronaria y aterosclerosis (Martínez y col., 2002).

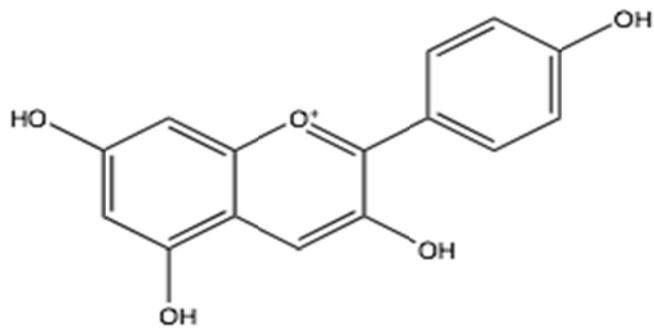
Los flavonoides se encuentran en altas concentraciones en diferentes frutos como la uva, zarzamora, frambuesa y fresa (Manach y col., 2004, Drago y col., 2006), cuya capacidad antioxidante es mayor a la de las vitaminas C y E.

2.5.2. ANTOCIANINAS

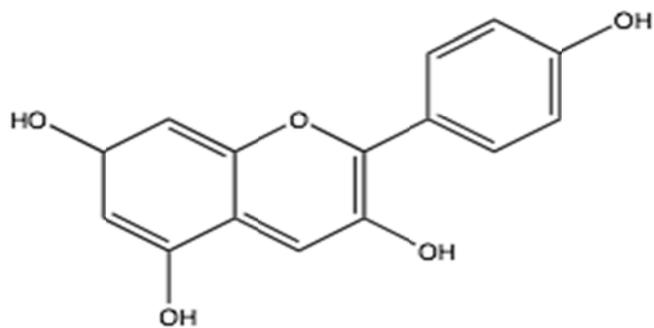
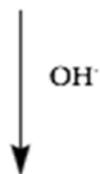
Las antocianinas son el grupo de pigmentos más importantes que puede distinguir el hombre, después de la clorofila (Delgado *y col.*, 2000, Kong *y col.*, 2003). Son moléculas que pertenecen a la clase de los flavonoides que comprende todo un subgrupo de los compuestos fenólicos (Welch *y col.*, 2008). Las antocianinas confieren la mayoría de los tonos rojos, azules y púrpuras a frutas, granos, vegetales, hojas y flores, de donde deriva su nombre en griego *anthos* que significa flor y *kyanos* que significa azul (Delgado *y col.*, 2000, Tsuda *y col.*, 2003, Kong *y col.*, 2003). En la naturaleza se encuentran predominantemente en forma de glucósidos derivados en forma polihidrosil o polimetoxilada del 2-fenil-benzopirilio o sales de flavilo (Figura 4). Los integrantes de este orden comparten un mismo esqueleto (Figura 5) que consiste en dos anillos aromáticos (A y C) que se unen por tres átomos de carbono que forman un tercer anillo heterocíclico oxigenado (B) (Williams y Grayer, 2004).

Las estructuras se diferencian por el número de grupos ya sea hidroxilo o metoxilo unidos al anillo C, por el número de azúcares unidos a la aglicona y la posición de unión, así como por el número y la naturaleza de los ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los residuos de azúcar que los conforman (Kong *y col.*, 2003). Las antocianinas son la forma más oxidada que se encuentra en los flavonoides con el anillo C completamente insaturado y un grupo hidroxilo en la posición 3. La estructura básica es una aglicona, la

antocianidina, con uno o varios azúcares esterificados unidos por lo general a los carbonos 3, 5 o 7. Hay cerca de 19 estructuras agliconas de antocianidina en la naturaleza, de las cuales las 6 más comunes en plantas comestibles son la pelargonidina, la peonidina, la cianidina, la malvidina, la petunidina y la delfinina (Welch *y col.*, 2008), siendo considerada la cianidina como la antocianina más abundante en todo el reino vegetal (Galvanoy *col.*, 2004). Los azúcares predominantes en la estructura de las antocianinas son la glucosa, ramnosa, xilosa, galactosa, arabinosa y fructosa. Muchas antocianinas se han encontrado aciladas por grupos alifáticos o aromáticos, los más comunes son el ácido cumárico, el caféico, el ferúlico, el *p*-hidroxi benzoico, el sináptico, el malónico, el acético, el succínico, el oxálico y el málico. Tomando en consideración estos factores, el número probable de antocianinas es superior a las 600 estructuras de fuentes naturales (Delgado *y col.*, 2000).



Pelargonidín
ión flavilio
(rojo)



base anhidro
(azul)

Figura 2: Ión flavilio y su correspondiente base anhidro. El ion flavilo en soluciones alcalinas se torna azul

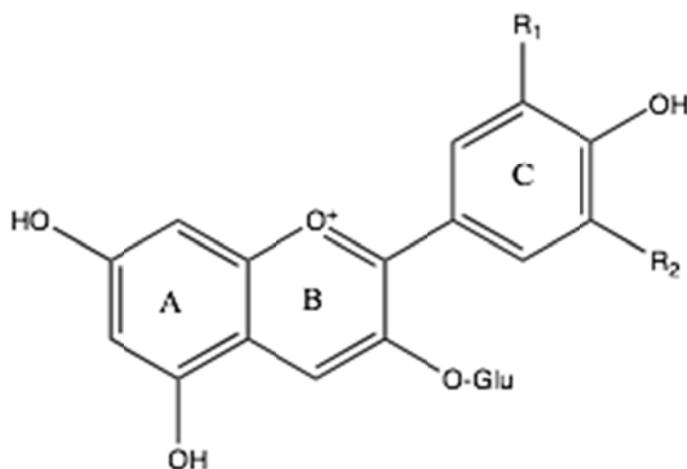


Figura 3: Estructura básica de las antocianinas

Las antocianinas se encuentran en la vacuola de células vegetales. Estas se van formando durante la síntesis de pigmentos en la membrana de la vacuola y, eventualmente, se dispersan para dar una vacuola enteramente teñida (Delgado *y col.*, 2000; Galvano *y col.*, 2004). Podemos encontrar antocianinas distribuidas en todo el mundo, en frutas y vegetales, en los pétalos de las flores aunque por lo general estas son más complejas (Mazza y Miniati, 1993). Las antocianinas son pigmentos vegetales capaces de capturar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno del grupo fenol, por lo que se ha reportado una estrecha relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas de fresa (Castañeda *y col.*, 2009).

De manera general, mientras la concentración vacuolar de antocianinas se incrementa el color será más intenso, esta concentración puede afectar también el tono por ejemplo del rosa y el rojo intenso (Delgado *y col.*, 2000).

La habilidad de las antocianinas, y sus productos, para impartir color a las plantas les confiere también el importante papel de servir como señal de atracción o repulsión para varios tipos de animales, como aves e insectos, con el fin de polinizar las flores y dispersar las semillas (Kong *y col.*, 2003).

Dado que las antocianinas actúan como pigmentos en una gran variedad de frutas, flores y otros órganos, el color, la intensidad, el tono y la estabilidad de

estos metabolitos, son propiedades muy importantes. Estas propiedades dependen de la estructura, el pH, la temperatura, la luz y el oxígeno entre otros factores como los copigmentos. Los copigmentos son moléculas que contribuyen a la coloración. Durante la síntesis de las antocianinas pueden aparecer moléculas como las flavonas y estas participar como copigmentos, protegiendo a las antocianinas (Delgado *y col.*, 2000).

Dado que las antocianinas son altamente reactivas y por lo tanto son fáciles de degradar el ambiente de almacenamiento juega un papel crítico en el mantenimiento de los pigmentos. La luz y la temperatura son dos de los factores que mayormente afectan la estabilidad estructural de las antocianinas, por lo tanto la mejor opción para almacenar estos pigmentos es en lugares fríos y oscuros (Abdel Aal y Hucl, 2003; Welch *y col.*, 2008).

2.5.3. BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En cuanto a al biosíntesis de estos pigmentos, se sabe que el ácido y el acetato shiquímico son los principales precursores de las estructura aromáticas de las que se parte para la formación de muchos compuestos fenólicos incluidas las antocianinas. A partir del shiquimato forman varios ácidos como el cinámico, *p*-cumárico y fenilalanina, como parte de su ruta de biosíntesis. Se ha demostrado que la fenilalanina, producto del ácido shiquímico, es incorporada en C6-C3 de la estructura básica de los flavonoides formando el anillo aromático B que corresponde a la estructura pirano central. El anillo A y el oxígeno del anillo pirano central son provistos por la acetil-CoA (Delgado *y col.*, 2000). Inicialmente la fenilalanina es convertida en *p*-cumaril-CoA por el efecto de tres enzimas: la fenilalanina-amonio-liasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumaril-CoA ligasa (4CL). La *p*-cumaril-CoA es el principal precursor de flavonoides, ligninas y otros fenilpropanos. Después la chalconasintetasa (CHS), que se considera la enzima clave en la síntesis de flavonoides, cataliza la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con cuatro de cumaril-CoA para la forma intermediaria chalcona. En el siguiente paso la chalcona por acción de la chalcona isomerasa (CHI) cambia a su forma estereoisomérica, la

naringenina, que es un precursor común de flavonoides y isoflavonoides. Esta molécula cambia a flavón de dihidrocaempferol por acción ya sea de una dioxigenasa o monooxigenasa, dependiendo del tejido, después la enzima dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) que se sintetiza a partir del NADPH o NAD dependiendo de la planta, reduce el dihidrocaempferol a leucoantocianidina. Más adelante en la ruta esta molécula se transforma en antocianidina. Esta última conversión no ha sido bien caracterizada todavía, pero se presume que contiene un paso donde se oxida la molécula y otro donde se deshidrata, a esta actividad enzimática se le ha nombrado como antocianidina sintetasa (ANS). Sigue a este paso una glicosilación para la conversión de antocianidina a antocianina a cargo de una glucosil-transferasa (GT), la enzima mejor descrita en este proceso es la UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosil-transferasa, que ha mostrado una pronunciada especificidad en cuanto a la posición del sustrato y el azúcar a ser transferido (Delgado y col.,2000). En la Figura2 y 3 se esquematiza el proceso de síntesis antes descrito.

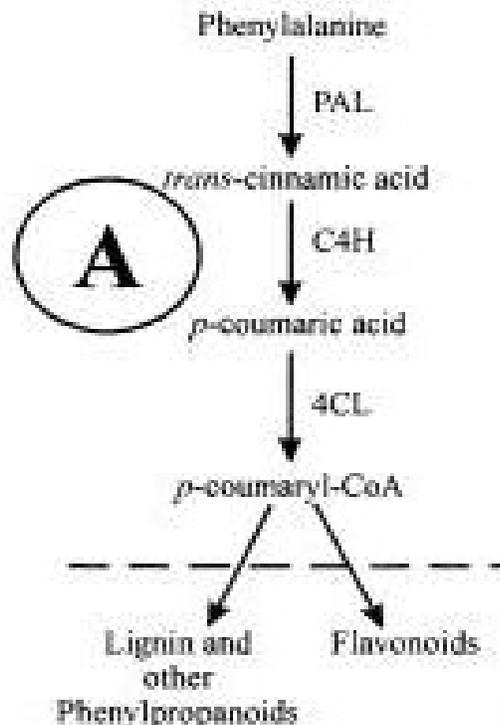


Figura 4: Ruta sintética de los flavonoides

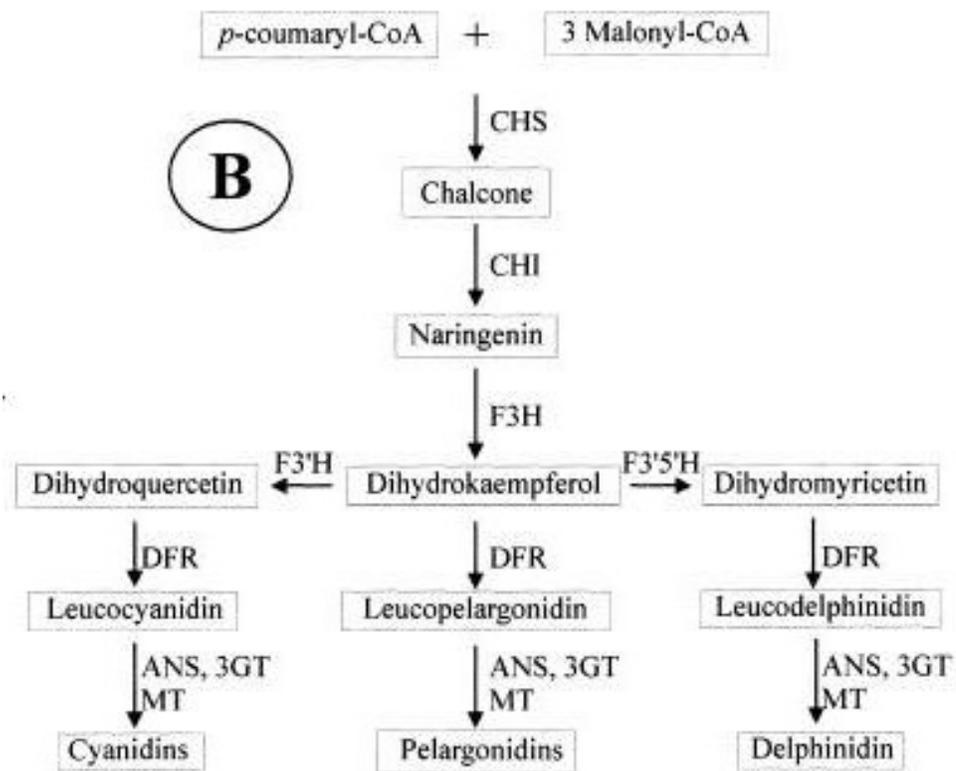


Figura 5: Ruta sintética de antocianinas

Partiendo de la amplia distribución de las antocianinas en el reino vegetal, se vuelve razonable pensar que el ser humano está acondicionado para el consumo de grandes cantidades de estos compuestos (Delgado *y col.*, 2000). Se creía que las antocianidina, es decir la forma no glucosídica de las antocianinas, pasaba por las células de la pared intestinal de manera directa a la sangre debido a la falta de la molécula de azúcar, ya que, al no conocerse ninguna enzima específica que rompiera el enlace glucosídico, se especulaba que las antocianinas eran pobremente absorbidas. En la actualidad hay estudios *in vivo* que han ayudado a reconsiderar esta teoría, dado que demuestran la absorción de estructuras glucosídicas de flavonoides, particularmente la cianidin-3-glucosa así como moléculas derivadas de esta. Hay reportes de la presencia de antocianinas y antocianidinas en el plasma sanguíneo de ratas y humanos después de la ingesta oral de diferentes

glucósidos de cianidina (Galvano *y col.*, 2004). Datos obtenidos por Tsuda *y col.*, (2003) corroboran que las antocianinas se incorporan desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo sin sufrir ninguna alteración a su estructura básica. Así mismo, se ha demostrado que estas son desechadas a través de la orina sin sufrir ningún cambio estructural, lo que sugiere que sus atributos como agentes antioxidantes no se pierden en su tránsito por el organismo (Matsumoto *y col.*, 2001).

2.5.4. PROPIEDADES BIOACTIVAS.

Se ha visto que la administración de cianidin-3-rutinocin lleva a una mejora considerable de la visión, esto asociado a un efecto en la promoción del desarrollo de la proteína G acoplada que es un receptor en la retina del ojo, Tsuda *y col.* en 2003 encontraron que las antocianinas presentes en el maíz morado contribuyen al control del peso y disminución de la formación de tejido adiposo.

Dada a su naturaleza estructural las antocianinas forman un grupo particularmente reactivo, muy sensibles a cambios de temperatura y pH. A pesar de esto, se incluyó a las antocianinas en la lista de compuestos naturales a los que se les atribuye poder antioxidante (Galvano *y col.*, 2004).

La actividad antioxidante de las antocianinas ha sido demostrada por varios métodos en numerosos estudios *in vitro* (Huang *y col.*, 2004). Se ha encontrado que las antocianinas tienen la capacidad de prevenir la oxidación del ácido ascórbico y tienen actividad de inhibición en enzimas del grupo de las oxidasas. En un estudio realizado para ver el efecto de extractos puros de antocianinas en la peroxidación lipídica, todas las antocianinas evaluadas mostraron un poder hasta siete veces superior del α -tocoferol contra la peroxidación lipídica.

Las antocianinas se han llegado a considerar importantes agentes en la prevención de enfermedades como cáncer, diabetes y padecimientos coronarios. Un ejemplo de esto es “el paradigma francés”, donde se atribuye la

baja incidencia de enfermedades cardiacas en la comunidad francesa a pesar de llevar una dieta alta en grasas saturadas, a su consumo regular de vino tinto, rico en antocianinas y otros compuestos fenólicos (Delgado *y col.*, 2000, Bagchi *y col.*, 2004, Afaq *y col.*, 2007, Almajano *y col.*, 2008).

2.6. LA FRESA COMO FUENTE DE COMPONENTES BIOACTIVOS

Al igual que todas las frutas, los frutos de la fresa constituyen un excelente alimento, bien sean consumidas en fresco o en cualquiera de sus variantes elaboradas. Está constituida por un 78-93% de agua, del 3-10% de carbohidratos, 0.33 al 0.9% de proteínas, 0.6% de grasas o menos. Contiene varios compuestos bioactivos, incluyendo fenoles, flavonoides y antocianinas (da Silva *y col.*, 2008).

La principales compuestos nutracéuticos presentes en la fresa son los fenoles conjugados como son taninos (galo y oligo taninos). Después se encuentran las antocianinas, responsables del color rojo característico de las fresas; el ácido hidroxicinámico; los flavonoides y, en menor cantidad protoantocianidinas (Kaisu *y col.*, 2004). La fresa también contiene principios activos como, terpenos, ácidos grasos y proteínas solo que en menor cantidad, los cuales presentan propiedades terapéuticas (Pernia *y col.*, 2004).

Las antocianinas son pigmentos vegetales capaces de capturar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno del grupo fenol, por lo que se ha reportado una estrecha relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas de fresa (Castañeda *y col.*, 2009).

Las antocianinas y demás flavonoides se encuentran como glúcidos fenólicos (Kaisu *y col.*, 2004). En ensayos espectrofotométricos empleados para determinar el efecto de los flavonoides, tales como el ácido tánico, kaempferol, quercetina y epigenina, han demostrado una función desinflamatoria, al inhibir la hialuronidasa que hidroliza al ácido hialurónico, polisacárido relacionado con la permeabilidad del sistema vascular responsable de los procesos

alergénicos e inflamatorios (Pernia *y col.*, 2004). Además se ha documentado el efecto de inhibición de crecimiento de células cancerígenas en presencia de extractos de fresa, en experimentos *in vitro* (Kaisu *y col.*, 2004).

2.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA

En el ciclo agrícola 2007, más del 70 por ciento de la producción nacional de fresa, equivalente a 134 mil 290 toneladas, se destinó a la exportación con un valor superior a los mil setecientos millones de pesos, siendo el mercado estadounidense el principal destino de estas exportaciones (Fundación Produce Michoacán, 2008).

Dentro del país, Michoacán ocupa el primer lugar a nivel nacional, ya que genera 52.38 por ciento de la producción en México. Las regiones de mayor productividad en Michoacán son Zamora, Maravatío y Panindícuaro, siendo el valle de Zamora la más importante en cuanto a volumen de producción, mano de obra empleada y número de empresas procesadoras establecidas (Fresh Plaza, 2009).

Las variedades mejoradas que actualmente se cultivan en el país, y que se comercializan en el mercado nacional e internacional, han reemplazado casi universalmente a la especie silvestre debido a su tamaño superior y alto rendimiento en cultivo. Entre estas podemos mencionar a: Albion actualmente una de las más populares, Aroma, Chiflon, Festival, Cristal, Camarosa entre otras. El problema que existe con estas variedades es que tiene patentes de propiedad, es decir que para su utilización los productores deben pagar regalías, la mayoría de estas variedades provienen de Estados Unidos y son muy costosas, alrededor de 8,000 a 11,500 dólares por hectárea (Fresh Plaza, 2008), limitando el acceso a ellas a solo un pequeño grupo de productores.

Aunado a esto, el productor de fresa requiere de variedades con mayor adaptación al subtrópico, resistente a plagas y enfermedades, con buena

calidad de fruto y altamente productivas, acompañadas de un paquete tecnológico que permita al productor obtener los resultados esperados.

Dado este problema en el 2003 el Colegio de Posgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo con apoyo de la Fundación Produce de Michoacán, inició la investigación para la generación de nuevas variedades mexicanas de fresa con un proyecto de mejoramiento genético de fresa para reducir costos de producción y permitir un mejor aprovechamiento del mercado de exportación por parte de los productores locales.

El Colegio de Posgraduados ha liberado dos variedades adaptadas a las condiciones del área de Zamora-Jacona, Michoacán: CP Zamorana, CP Jacona, que han mostrado potencial de ser explotadas a nivel comercial por su productividad, mayor cantidad de fruta con calidad de exportación en los meses de mejores precios, firmeza de fruto y competitividad frente a las variedades extranjeras (Fundación Produce Michoacán, 2008). Sin embargo, es necesario explorar otro aspecto de calidad del cual cada día hacen más conciencia los consumidores: la calidad de sus componentes bioactivos.

3. OBJETIVO

Evaluar las propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de frutos de variedades de fresa mexicana y extranjera.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antioxidante de extractos de fenoles, flavonoides y antocianinas totales de frutos de fresa de variedades mexicanas y extranjeras por del método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil(DPPH)
2. Evaluar la actividad antioxidante de extractos de fenoles, flavonoides y antocianinas totales de frutos de fresa de variedades mexicanas y extranjeras por del método del 2-2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6 ácido sulfónico (ABTS)
3. Establecer la metodología para la evaluación de la pelargonidina-3-glucósido por medio del aislamiento por cromatografía en capa fina (TLC) y caracterización por MALDI TOF MS/MS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Liofilizados de fenoles, flavonoides y antocianinas hechos a partir de extractos metanólicos puros de frutos de fresa de las variedades extranjeras Chiflon, Cristal, Festival, Albión y las dos variedades mexicanas de reciente liberación Jacona y Zamorana. Los extractos fueron obtenidos y valorados en su concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas según la técnica descrita por Chávez *y col.* (2011).

5.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH

El fundamento del método desarrollado por Brand *y col.*, en 1995, consiste en que este radical (DPPH), de color violeta, tiene un electrón desapareado y se decolora hasta amarillo pálido por la reacción con una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg L⁻¹.

DPPH al 0.1 mM (PM= 394.3 mg mmol⁻¹) se diluye con metanol al 80 %. Para las lecturas se tomaron 100 µL de muestra, se utilizó metanol al 80 % como valor de referencia y se adicionaron a un micro tubo con 1900 µL de DPPH. Se dejaron reposar por 30 min en obscuridad y a temperatura ambiente. La lecturas se hicieron de forma aleatorizada en un espectro absorción UV/Visible leyendo absorbancia a una longitud de 517 nm.

Los resultados se expresaron en % de inhibición

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{(\text{Valor de referencia} - \text{valor de muestra})}{\text{Valor de referencia}} \right) * 100$$

5.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: MÉTODO ABTS

Este método es el más adecuado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos que puedan presentar una absorbancia máxima cercana al

espectro infrarrojo (700-750 nm) como las antocianinas, pero una de las ventajas que tiene esta técnica es que presenta varios máximos de absorbancia; 414, 654, 754, y 815 por lo que puede adaptarse a diferentes compuestos (Moon y Shibamoto, 2009).

El ABTS es un compuesto coloreado, entre azul marino y morado oscuro, cuya naturaleza simula lo que sería una especie reactiva de oxígeno o radical libre. Se emplea para determinar la capacidad antioxidante de materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica, este radical debe ser generado a partir de reacciones ya sean químicas o enzimáticas y es soluble en agua o solventes orgánicos (Kuskoski *y col.*, 2005).

Se preparó la solución madre de ABTS, pesando 0.1920 g de ABTS (SIGMA: A1888) y se agregaron 331 mg de $K_2S_2O_8$ en un matraz aforado de 50 mL, se agregó un poco de agua desionizada para disolver, una vez disuelto se aforó a 50 mL llegando a una concentración final de 2.45 mM. La solución se transfirió a un tubo para centrifuga de 5° mL envuelto en papel aluminio para protegerlo de la luz. Se requieren mínimo de 16 horas para que se genere el radical).

Se pesaron 25 mg de cada extracto y se colocaron en tubos para centrifuga de 15 mL previamente envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz y se diluyeron en un volumen de 5 mL de metanol al 80 % cada uno, obteniendo una concentración final de 5 mg mL^{-1} de muestra.

Se tomó 1 mL de la solución madre de ABTS y se diluyó en 40-50 mL de metanol, se ajustó hasta una lectura entre 0.68 y 0.72 nm en el espectro de absorción de luz visible.

En micro tubos de 1.5 mL, se colocaron 10 μL de muestra más 1 mL del ABTS (todo por triplicado). Se mezclaron en vórtex por 45 s. Se dejó reposar la muestra por 8 min, en completa oscuridad (Miller *y col.*, 1993). Se leyó absorbancia en un espectro absorción UV/Visible a una longitud de 734 nm. Las lecturas se realizaron en celdas de cuarzo, se colocó una celda de cuarzo con alcohol al 80 % para usar como blanco. Las muestras se leyeron de forma aleatorizada.

Los resultados se expresaron en % de inhibición

$$\% \text{ de inhibicion} = \left(\frac{(\text{Valor de referencia} - \text{valor de muestra})}{\text{Valor de referencia}} \right) * 100$$

5.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de las mezclas entre dos fases inmiscibles, la fase móvil también llamada activa, que es la que trasporta las sustancias que se desean separar y que progresa en relación con la otra fase que se denomina fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o líquido.

Todos los sólidos finamente pulverizados tiene el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre sus superficie recíprocamente diferentes sustancias también pueden ser absorbidas con menor o mayor facilidad en comparación con otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.

En el caso de la cromatografía en capa fina se utiliza una placa cubierta con una fase estacionaria de fino espesor que se mantiene constante a lo largo de la placa. El eluyente asciende por capilaridad por la placa y arrastra los compuestos a lo largo de esta dejando diferentes bandas donde se concentran diferentes compuestos.

Para esta técnica se tomó una muestra de 1 ml de antocianinas extraídas de fresas frescas en una concentración de 200 g de fresa en 500 ml de metanol acidificado al 25% con ácido clorhídrico. El sistema de solventes utilizados fue una mezcla de Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial y agua en la proporción 100:11:11:26. El sistema de solventes se metió en una cámara de cristal para corrida y ésta dentro de una cámara fría a 4°C para evitar que los solventes se volatilizaran. En una placa de sílice para cromatografía de 20 x 20 cm se distribuyó el mililitro de muestra a lo largo de toda la placa con una

jeringa capilar de 100 μ L a una distancia de 1.5 cm de la base, la placa se colocó dentro del sistema de solventes, por un periodo de dos horas y media.

Las bandas de mayor definición fueron recolectadas con una espátula (Fotografía 1) y fueron suspendidas en metanol al 80%, después de un periodo de 24 h, se filtró el sílice al vacío para recuperar las antocianinas. Una vez evaporado el solvente el residuo fue enviado para su análisis en MALDI TOF MS/MS. De las bandas identificadas en TLC, la mayoritaria de color rojo y con un $R_f = 0.6$ (Fotografía 1), fue eluída y analizada por MALDI TOF MS/MS como se describe a continuación, obteniéndose el espectro de masas que se presenta en la Diagrama 1.

Para certificar la pureza, la banda fue sometida a HPLC. Se obtuvo el cromatograma mostrado en la Diagrama 2, presentando dos picos cuyo espectro UV-Visible se presenta en las Diagramas 3 y 4.

5.5. HPLC

Después de haber realizado las técnicas necesarias para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos, consideramos que el volumen de muestra restante no eran suficientes para la estandarización de la técnica de HPLC por lo que se decidió adquirir fresa fresca con un productor local en el área de Irapuato y repetir el procedimiento de extracción en metanol de las diferentes fracciones y utilizar este como muestra de estandarización, así al terminar esta etapa se analizarían las muestras entorno a las que se desarrollo este estudio. Lamentablemente no se pudo establecer la variedad del cultivo que se adquirió en Irapuato y dado que por el momento no era factible conseguir más fruta fresca de las variedades que se establecieron como modelo de estudio, sólo se estandarizó

Con objeto de dejar establecida la metodología se procedió al análisis de las antocianinas presentes según el método descrito por Aaby y col en 2007.

Las antocianinas se extrajeron con Metanol: HCl 1N (9:1) en una relación de tejido: solvente (9:1 v/w) durante toda la noche a 4 °C. Se filtró y el filtrado se

concentró en rotavapor hasta un volumen de 1.5 mL en metanol para de aquí aplicar a TLC.

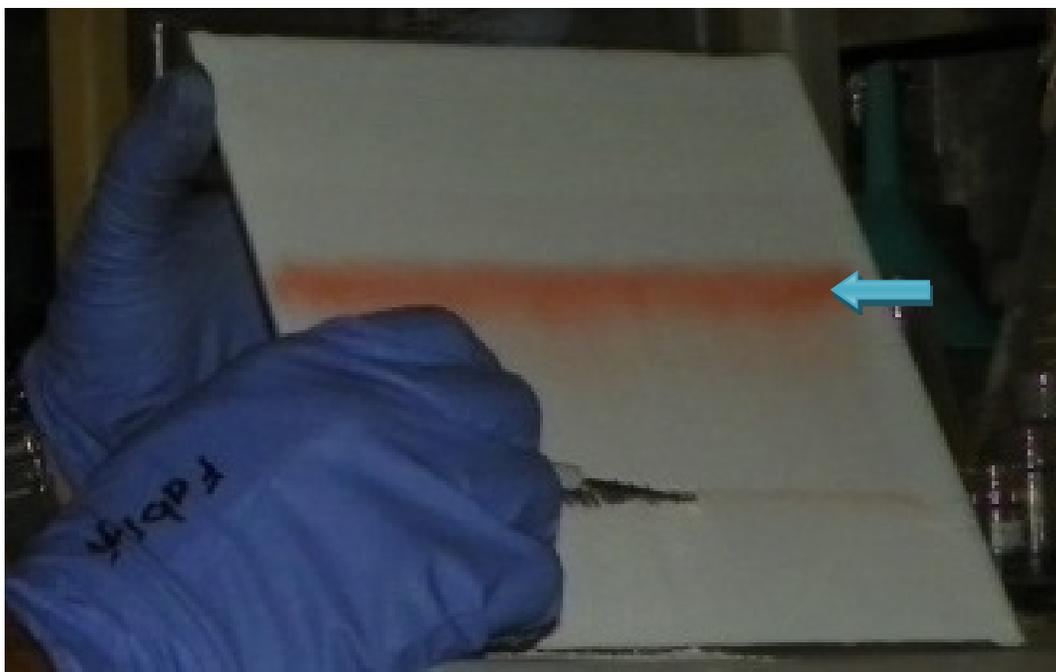
Para la separación preparativa de los componentes se utilizó la TLC antes mencionada.

De las bandas identificadas en TLC de color rojo-naranja, la mayoritaria de color rojo y con un $R_f = 0.6$, fue seleccionada por presentar mayor concentración de pigmento a la vista, esta fue eluída y analizada por HPLC como se describe a continuación:

La muestra se separó por HPLC utilizando una columna de fase reversa: VYDAC C-18 250 X 4.6 mm en un equipo (Agilent Technologies Modelo 1200), se inyectaron 10 μL y para su elución se utilizó el sistema de solventes: Solvente A : H_2O pH 2.3 (ajustado con ácido acético); Solvente B : $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrilo}/\text{H}_2\text{O}$ pH 2.3 (ajustado con ácido acético) en una proporción de 107/ 50 / 40 en base a volumen. El gradiente de elución se ajustó $t_0 = 20\%$ B incrementándose gradualmente hasta $t_{45} = 70\%$ B.

El flujo se mantuvo a 1 mlmin^{-1} , y se hizo un seguimiento a longitud de onda 510 nm.

A los picos con tiempo de retención de 3.427 y 3.748 (Diagrama 2) respectivamente, se les registró la absorción en la región ultravioleta visible desde 200 a 700 nm (Diagramas 3 y 4).



Fotografía 1: Bandas de separación en TLC con Rf = 0.6

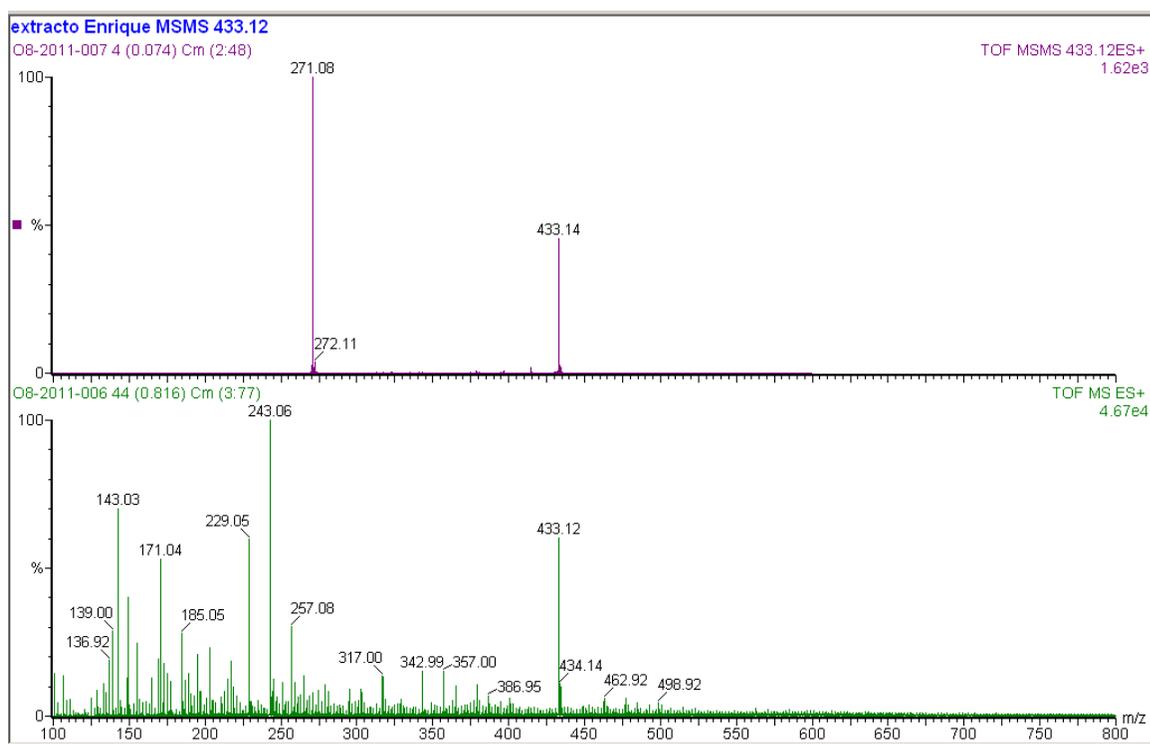


Diagrama 1: Espectro de masas para el compuesto mayoritario de la banda con Rf=0.6 observándose un componente con peso molecular 433,14 m/z y un ión padre de 272m/z

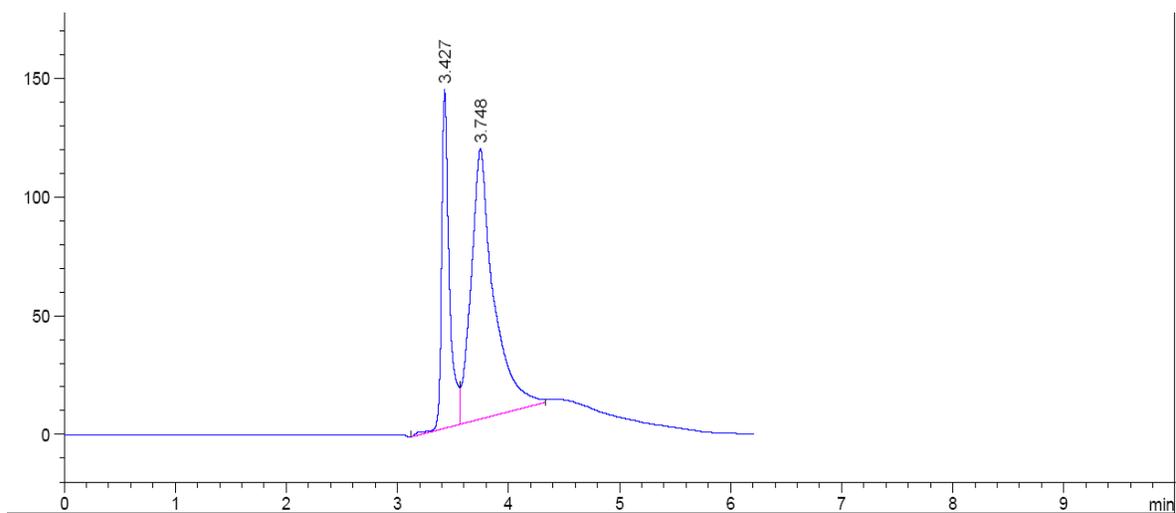


Diagrama 2: Tiempos de retención en HPLC

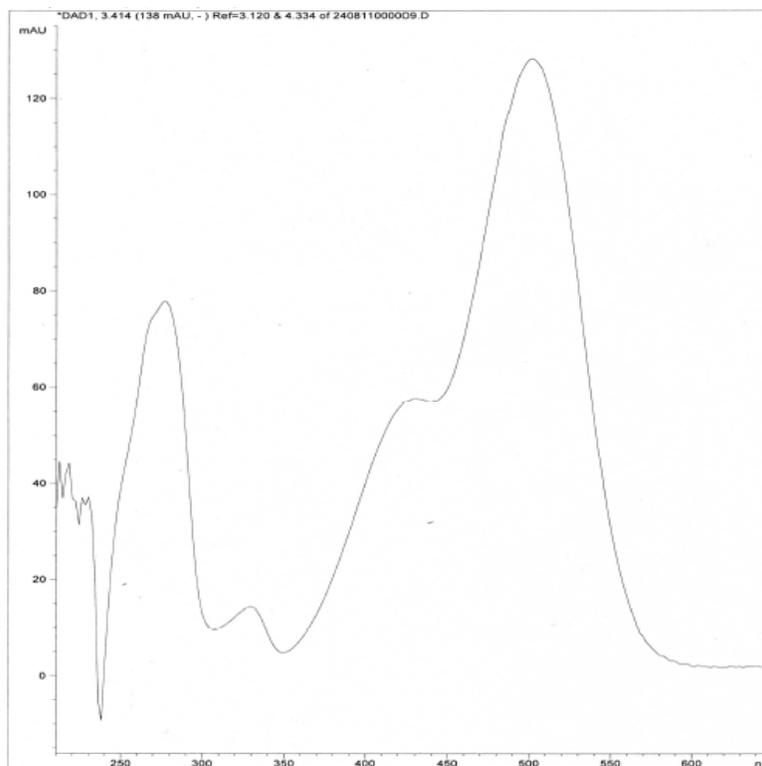


Diagrama 3: Espectro de absorción, en la región uv/vis, del componente con tiempo de 3.414 min

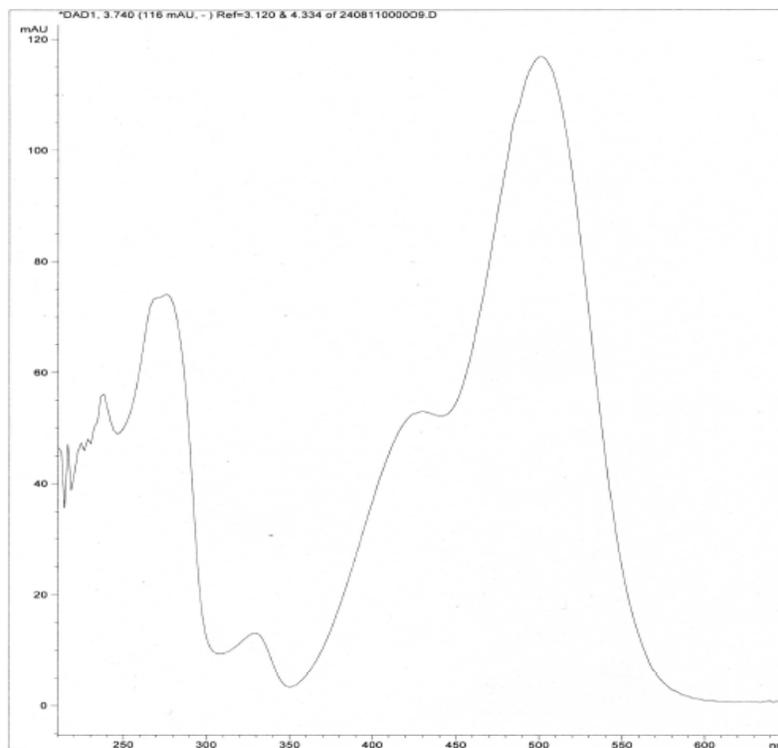


Diagrama 4: Espectro de absorción, en la región uv/vis, del componente con tiempo de 3.740

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se aplicó un diseño completamente al azar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la separación de medias por Tukey al 0.05%, utilizando el programa Statistical Analysis System(SAS Institute, 1985).

7. RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta el poder de inhibición del radical DPPH por los extractos correspondientes a fenoles totales de los frutos de las diferentes variedades de fresa analizadas en este estudio. Los resultados mostraron que el conjunto de compuestos fenólicos presentes en los frutos de las variedades de fresa mexicanas Jacona y Zamorana superó el poder antioxidante de una de las variedades de mayor uso agrícola en nuestro país que es la Albion, la variedad Jacona presentó un comportamiento semejante a la variedad Krystal y Festival ambas variedades muy populares entre los productores.

Tabla 1: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de fenoles totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	61.35	F
Chiflon	60.08	E
Festival	72.77	ABC
Jacona	74.01	AB
Krystal	74.65	A
Zamorana	67.49	CD

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

En cuanto al poder de inhibición del radical ABTS, se observó la misma tendencia (Tabla 2), ya que los extractos de fenoles totales de los frutos de ambas variedades mexicanas y de las variedades Festival y Krystal superaron significativamente los valores obtenidos para las variedades Albion y Chiflon.

Tabla 2: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de fenoles totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	69.81	D
Chiflon	69.48	D
Festival	86.08	A
Jacona	80.55	BC
Krystal	79.94	BC
Zamorana	79.28	BC

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

La Tabla 3 muestra la inhibición del radical DPPH por los extractos de flavonoides de las diferentes variedades de fresa estudiadas. Los resultados señalan a la variedad Krystal como la de mayor poder antioxidante, seguida por las variedades Jacona y Festival.

En cuanto a la prueba de inhibición del radical ABTS por la fracción de flavonoides totales de las diferentes variedades de fresa, también se observó un efecto significativo de la variedad sobre la capacidad antioxidante de los frutos (Tabla 4). Se observó que los flavonoides presentes en los extractos de fresa de la variedad Zamorana tienen mejor poder de inhibición contra este radical en particular.

Tabla 3: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de flavonoides totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	68.29	CDF
Chiflon	55.88	E
Festival	72.07	BC
Jacona	73.91	BC
Krystal	79.11	A
Zamorana	66.97	DFE

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Tabla 4: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de flavonoides totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	83.15	CDE
Chiflon	98.77	A
Festival	79.78	DE
Jacona	85.33	CDE
Krystal	95.06	AB
Zamorana	88.54	BCD

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

La Tabla 5 muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos metanólicos de antocianinas de las diferentes variedades de fresa. Se observó una mayor capacidad inhibitoria por parte de los compuestos antocianínicos presentes en las fresas de las variedades mexicanas Zamorana y Jacona respecto a las variedades extranjeras.

Tabla 5: Actividad antioxidante por el método de DPPH en extractos de antocianinas totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	33.59	CDE
Chiflon	28.72	EF
Festival	32.26	DE
Jacona	41.31	B
Krystal	40.58	BC
Zamorana	58.42	A

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

En relación a la inhibición del radical ABTS por los extractos de antocianinas, el comportamiento fue muy similar, ya que las antocianinas de las variedades mexicanas presentaron una capacidad antioxidante significativamente mayor al resto de las variedades. Cabe destacar el gran poder inhibitorio del radical

ABTS que mostró la fracción de antocianinas de la variedad mexicana Zamorana.

Tabla 6: Actividad antioxidante por el método de ABTS en extractos de antocianinas totales de variedades nacionales y extranjeras de fresa.

Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Albion	35.523	DE
Chiflon	45.67	BC
Festival	26.63	E
Jacona	48.217	B
Krystal	35.743	DE
Zamorana	87.73	A

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

En la Tabla 7 se hace un comparativo entre las tres fracciones de cada variedad, esto con el fin de determinar que fracción es la que ofrece mayores beneficios en términos de capacidad antioxidante. Es en este comparativo en el que se puede dilucidar que la fracción donde se encuentra el total de los flavonoides presentes en las diferentes variedades de fresa, sobresale de manera general en el poder antioxidante aun que se encontró semejanza con las fracciones de fenoles y antocianinas de otras variedades el patrón indica que son los flavonoides los que poseen mayor actividad antioxidante en la prueba realizada con el radical DPPH.

Tabla 7: Comparación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, de las fracciones fenólicas extraídas de frutos de distintas variedades de fresa.

Fracción	Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Antocianinas	Albion	31.23	C
	Chiflon	27.64	B
	Festival	37.93	C
	Jacona	34.91	B
	Krystal	39.12	B
	Zamorana	64.94	A
Fenoles	Albion	61.35	B
	Chiflon	50.41	A
	Festival	70.53	A
	Jacona	74.00	A
	Krystal	76.09	A
	Zamorana	67.48	A
Flavonoides	Albion	68.56	A
	Chiflon	50.61	A
	Festival	62.49	B
	Jacona	71.47	A
	Krystal	74.06	A
	Zamorana	66.97	A

En la Tabla 8 se hace el mismo tipo de comparación con los datos obtenidos en las tres fracciones analizadas mediante la prueba de poder antioxidante con el radical ABTS, donde se reafirma la misma tendencia, en la cual los flavonoides presentan el mayor poder de inhibición hacia este radical, sigue habiendo similitud con algunas fracciones extraídas de otras variedades, pero el patrón sigue indicando que son los flavonoides de la fresa las moléculas con mayor poder antioxidante.

Tabla 8: Comparación de la actividad antioxidante por el método de ABTS, de las fracciones fenólicas extraídas de frutos de distintas variedades de fresa.

Fracción	Variedad	% de inhibición	Agrupamiento
Antocianinas	Albion	18.48	C
	Chiflon	12.01	C
	Festival	9.57	B
	Jacona	37.57	B
	Krystal	31.16	C
	Zamorana	57.02	B
Fenoles	Albion	69.80	B
	Chiflon	63.13	B
	Festival	81.41	A
	Jacona	80.54	A
	Krystal	77.54	B
Flavonoides	Zamorana	79.27	A
	Albion	83.14	A
	Chiflon	98.77	A
	Festival	79.78	A
	Jacona	84.26	A
	Krystal	95.01	A
	Zamorana	88.54	A

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

ENSAYO TLC Y HPLC

A los picos con tiempo de retención de 3.427 y 3.748 (Diagrama 2) respectivamente, se les registró la absorción en la región ultravioleta visible desde 200 a 700 nm (Diagramas 3 y 4).

En el Diagrama 1 se presenta el espectro de masas para el compuesto mayoritario de la banda con $R_f = 0.6$ se puede observar un ion de 343m/z de peso molecular correspondiente alpelargonidina-3-glucósido, previamente reportado por Aaby y col., (2007) quienes obtienen una λ_{max} 502 con un hombro a 428 y picos secundarios 328 y 278, con un peso molecular de PM

433 y un ión padre a 271. En nuestro caso la fragmentación del pico da como resultado un fragmento mayoritario de 271 de peso molecular correspondiente a la molécula de la aglicona después de la pérdida del glucósido correspondiente. Los espectros (Diagrama 2) $R_t = 3.14$ y 3.74 respectivamente) de los picos del cromatograma de HPLC presentan estas características. En este caso dada la similitud de espectros uv/vis y de masas, hicieron pensar que se trataba de un isómero conformacional y de la pelargonidina misma. Más detalles de esto requerirían una exploración más extensa.

Esta técnica es sumamente versátil y podrá contribuir en el conocimiento y la diferenciación de las características de los cultivares en estudio así como sus características espectrométricas diferenciales.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años ha surgido la tendencia social de buscar alternativas para una vida más saludable, existe una amplia bibliografía donde se describen diversas ventajas del consumo de compuestos originarios del metabolismo secundario de las plantas (Kong *y col.*, 2003).

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han dado a conocer cómo es que estas moléculas debido a su configuración estructural pueden donar electrones a moléculas inestables como las especies reactivas de oxígeno asociadas con el deterioro celular (Williams y Grayer, 2004; Cuevas *y col.*, 2008).

En particular el grupo de los fenoles ha despertado mucho interés en la comunidad científica, y se ha encontrado que las frutillas o bayas son de los frutos más ricos en dichos compuestos (Fernández *y col.*, 2008).

En este sentido, el fruto de la fresa ha probado ser una rica fuente de compuestos antioxidantes de naturaleza fenólica como flavonoides y antocianinas (Carkeet *y col.*, 2008). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las tres fracciones metanólicas obtenidas de los frutos de fresa tanto de variedades mexicanas como de variedades extranjeras, mostraron capacidad antioxidante.

Es importante destacar que en un estudio cualitativo realizado con variedades mexicanas CP-Roxana, CP-Paola y CP-Jacona (previo a la liberación de las variedades CP-Zamora y CP-Jacona), se reportaron datos que favorecieron a las variedades mexicanas respecto a las estadounidenses Aroma, Camarosa y Festival, en las pruebas organolépticas como el aroma y el color, características asociadas a los pigmentos de naturaleza fenólica presentes en el fruto. Adicionalmente, en el análisis sensorial se midió el aroma exterior, el interior y el sabor, donde una vez más las fresas mexicanas tuvieron los mejores resultados (Martínez *y col.* en 2008). Sin embargo, no existen estudios de las propiedades nutracéuticas de la fresa mexicana, hasta donde se sabe, este es el único reporte de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de fenoles, flavonoides y antocianinas de las variedades de fresa mexicana que han sido

liberadas recientemente y hace un comparativo con otras variedades extranjeras.

En frutos de fresa, los factores más importantes para asegurar su calidad inician desde campo con la selección de cultivares, los cuales varían en calidad, definida principalmente por la firmeza, contenido de azúcar y la acidez de los frutos; así como la susceptibilidad de los mismos a enfermedades (Martínez *y col.*, 2008). Se ha reportado que frutos de variedades distintas de fresa, pueden tener características de calidad distinta, incluyendo el color (asociado a pigmentos de naturaleza fenólica) y la capacidad antioxidante derivada de perfiles distintos de compuestos fenólicos (Kuskoski *y col.*, 2005). Diferentes factores pueden afectar la acumulación o producción de biomoléculas en el fruto de fresa como son, la fertilización, la disponibilidad de agua, el clima, el suelo (Groyne *y col.*, 1999), sin embargo, las plantas de las distintas variedades de fresa estudiadas, se cultivaron todas bajo las mismas condiciones, por lo que las diferencias que se presentaron en la capacidad antioxidante de los extractos de sus frutos, podrían ser atribuidas a la carga genética que posee cada variedad.

Diversos estudios relacionados con la actividad antioxidante de compuestos fenólicos cuyo objetivo ha sido determinar el grupo o fracción responsable en mayor medida de la capacidad antioxidante, concuerdan en que son los flavonoides los que poseen mayor poder antioxidante comparado con el resto de los compuestos de naturaleza fenólica (Cheel *y col.*, 2007). Grotewold (2006) adjudicó a los flavonoides un mayor poder antioxidante que a otras moléculas también producto del metabolismo secundario de las plantas, particularmente dentro de la familia de los compuestos fenólicos. El autor realizó una serie de estudios *in vitro* en los que asoció la capacidad antioxidante de los flavonoides con la captura de radicales peróxido, lo cual contribuyó a la inhibición de la peroxidación de lípidos y la oxidación del colesterol de baja densidad. Los datos obtenidos en el presente estudio permiten afirmar que la fracción de flavonoides contenida en los frutos de fresa

provenientes de las distintas variedades evaluadas, posee mayor poder antioxidante que los fenoles totales y las antocianinas.

En cuanto a la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones fenólicas en las distintas variedades de fresa estudiadas, se observó que la fracción de fenoles totales, para la prueba con DPPH resultó semejante a la reportada Wang y Jiao (2000), quienes estudiaron la fracción fenólica extraída de jugos de fresa, mientras que Cheel *y col.*,(2007) reportaron hasta un 87% de inhibición en jugo de fresa de la variedad Chandler. Las diferencias en los porcentajes de inhibición del radical DPPH obtenidos podrían atribuirse a un efecto de la variedad, ya que se ha reportado que frutos de variedades distintas de fresa, pueden tener características de calidad distinta, incluyendo el color (asociado a pigmentos de naturaleza fenólica) o la propia capacidad antioxidante derivada de perfiles distintos de compuestos fenólicos (Kuskoski *y col.*, 2005)

En relación a la prueba con ABTS, los valores que se obtuvieron para los frutos de variedades mexicanas superaron significativamente a los de las variedades extranjeras Albion y Chiflon al igual que en la prueba de DPPH. Estos resultados son destacables, ya que sitúan a la fresa mexicana en un nivel competitivo en relación a su calidad interna, igualando a ciertas variedades comerciales y superando a otras tan populares en la región. Este hecho podría explotarse como un valor agregado de la fresa mexicana que conlleve a la aceptación de estas variedades en la región y al fortalecimiento de su mercado.

La familia de compuestos fenólicos presentes en las plantas está constituida por una variedad muy amplia de moléculas, cada una con características y propiedades particulares, en relación al poder antioxidante uno de los grupos más estudiados es el de los flavonoides. Los flavonoides presentes en las variedades mexicanas tuvieron comportamientos distintos en cuanto a la capacidad antioxidante en cada una de las dos pruebas, esta diferencia podría relacionarse con el hecho de que la prueba ABTS expresa el comportamiento de moléculas distintas al DPPH (Kuskoski *y col.*, 2004). El método ABTS es el más adecuado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos que puedan presentar una absorbancia máxima cercana al espectro infrarrojo (700-750

nm) como las antocianinas, pero una de las ventajas que tiene esta técnica es que presenta varios máximos de absorbancia; 414, 654, 754, y 815 por lo que puede adaptarse a diferentes compuestos (Moon y Shibamoto, 2009).

Se ha reportado que los flavonoides más abundantes en la fresa son antocianos, procianidinas y elagitaninos, y también se pueden encontrar flavonoles, ácidos elágicos así como derivados de este, en cantidades menores (Marin *y col.*, 2007). De manera que los resultados diferenciales obtenidos por ambos métodos, podrían atribuirse tanto a la diferencia de perfiles de compuestos fenólicos que posee cada variedad estudiada, entre los cuales podrían encontrarse estos y otros flavonoides, lo cual se ve reflejado en la capacidad propia de cada radical utilizado en los dos métodos ensayados, para interaccionar con moléculas distintas.

La fracción de antocianinas que después de la clorofila son el grupo de pigmentos más abundantes e importantes de la naturaleza, y que como ya se ha mencionado son un subconjunto de los flavonoides con una complejidad estructural mayor al tener más agregados a su molécula, lo que las provee de características particulares relacionadas con su capacidad de inhibir compuestos reactivos o radicales libres (Coté *y col.*, 2010). En el presente estudio que se realizó con este grupo de moléculas, se observó que conservan la misma relación de orden en las dos pruebas. En un estudio realizado por Kuskosky *y col.* (2004) se documentó que la capacidad antioxidante de jugos de diferentes frutas tanto por el método del DPPH como ABTS, fue semejante entre ambas pruebas. Mientras que en un estudio realizado por Heo y Lee (2005), donde se comparó la actividad antioxidante *in vitro* de extractos crudos de fresa, plátano y naranja utilizando células PC12 tratadas con H₂O₂, los extractos de fresa mostraron mayor capacidad antioxidante.

Las antocianinas que se identifican con mayor frecuencia y en mayor cantidad en frutos de fresa son derivados de la Malvidina, la Cianidina y Pelargonidina y en menor cantidad derivados de Petunidina y Delfinina (Jimenez *y col.*, 2004;Chávez *y col.*, 2011). Tanto el método del ABTS como el DPPH en la

actualidad son dos de las técnicas que se usan con mayor frecuencia para medir la capacidad antioxidante dada su estabilidad, las diferencias que presentan es que el método del ABTS permite medir la capacidad antioxidante de compuestos tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica, y presenta varios picos de absorción máxima (414, 654, 754, 815 nm) mientras que el método del DPPH permite medir compuestos solubles en solventes orgánicos y solo se obtienen lecturas a 515 nm (Kuskoski *y col.*, 2005). Es con esta consideración que podrían explicarse algunos de los resultados antes presentados. Tal es el caso de las antocianinas de la fresa Zamorana, al tener 58 % de inhibición del radical DPPH y más del 87 % de inhibición con el radical ABTS, se podría considerar entonces la posibilidad que esta variedad de fresa sea capaz de producir un mayor número de compuestos antocianínicos.

Podría especularse que los compuestos fenólicos reportados mayoritariamente en fresa, tales como el ácido gálico, ácido cafeico (Drago *y col.*, 2006; Cheel *y col.*, 2007), flavonoides como la quercitina y el kempferol (Almeida *y col.*, 2007) e isómeros de la pelargonidina y cianindina (Almeida *y col.*, 2007; Szajdek *y Borowska*, 2008) sean los responsables de la actividad antioxidante que presentaron los extractos estudiados. Sin embargo, se requiere la purificación y cuantificación de sus componentes, así como de ensayos de capacidad antioxidante de cada uno de ellos para afirmarlo.

9. CONCLUSIONES

Las propiedades antioxidantes de los frutos de fresa son dependientes de la variedad del cultivo.

Los flavonoides y los fenoles presentes en las variedades estudiadas de fresa, poseen mayor capacidad antioxidante que las antocianinas.

Los compuestos de naturaleza fenólica particularmente los extractos de fenoles, flavonoides y antocianinas presentes en las variedades de fresa mexicana Zamora y Jacona, presentan una capacidad antioxidante que les permite competir con sus contrapartes extranjeras en este nuevo parámetro de calidad que cada día es más relevante, ya que dicha capacidad es la principal característica que permite asociar el consumo de estos compuestos con posibles propiedades preventivas de enfermedades crónicas degenerativas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aaby K, Ekenberg G y Skrede G 2007 Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:4395-4406

Abdel Aal E y P Hucl 2003 Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2174-2180

sin fecha *abonos verdes* Mexico D.F. SAGARPA

Afaq F, Syed D, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon M, Khan N, Zaid M y Mukhtar H 2007 Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis *Journal of Investigative Dermatology* 127:222-232

Ahmed J, Shivhare U y G Raghavan 2004 Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree *European Food Research and Technology* 218:6525-528

Almajano P, Carbó R, López J y Gordon M 2008 Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions *Food Chemistry* 108:55-63

Almeida, J., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., Ric de Vos, C., Deiml, B., y otros. (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 61-71.

Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach 2004 *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 53:06-313

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The analyst*, 183-198.

Arencibia D, Rosario L, Lopez Y y D Díaz. (2003). Las plantas, fuentes de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Revista de toxicología en línea*, 37-51.

Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Food science & technology* , 419-421.

Arrollo, J., Reaz, E., Rodríguez, M., Chumpitaz, V., Burga, J., De la Cruz, W., y otros. (2007). Reducción de colesterol y aumento de capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays*) en ratas hipercolesterolémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* , 24 (002), 157-162.

Azzini E, Vitaglione P, Intorre F, Napolitano A, Durazzo A, Foddai M, Fumagalli A, Catasta G, Rossi L, Venneria E, Raguzzini A, Palomba L, Fogliano V y Maiani G2010Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects *British Journal of Nutrition* 10411365-1173

Bagchi D, Sen C, Bagchi M, y Atalay M.2004Anti-angiogenic, antioxidant and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin rich berry extract formula *Biochemistry* 69175-80

Benvenuti, S., Pellati, E., Melegari, M., & Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia. *Journal of Food Science* , 3 (69), 164-169.

Brand W, Cuvelier M y C Berset1995Use of free radical method to evaluate antioxidant activity *Food Science and Technology* 28125-30

Cabrita L, Fossen T y M Andersen2000Colour and stability of six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solution *Food Chemistry* 681101-107

Carkeet C, Clevidence B y Novotny J2008Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose *The Journal of Nutrition* 138897-902

Castañeda, A., Pacheco, M., Páez, M., Rodríguez, J., & Galan, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins, a review. *Food Chemistry* , 113, 859-871.

Characterization of humic acids of different main type of soils

Chavez, G., Mena, H., & Angoa, V. (2011). *Evaluación de la actividad antihipertensiva de nutraceuticos de fresa silvestre y comercial*. Jiquipán de Juárez, Michoacán.

Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., Caligari, P., & Schmeda, G. (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from

Fragaria chiloensis ssp. chiloensis, F. vesca and F. x ananassa cv. Chandler. *Food Chemistry* , 36-44.

Corrales M, Fernandez A, Vizoso M, Butz P, Franz C, Sguele E y Tauscher B2010Characterization of phenolic content, in vitro biological activiti, and pesticide loads of extracts white skins from organic and convetional cultivars*Food and Chemical Toxicology* 483471-3476

Coté J, Caillet S, Doyon G, Sylvain J y Lacroix M2010Bioactive compounds in cranberries and their biological properties*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50666-679

Crecimiento y eficiencia de fósforo de algunas leguminosas cultivadas en arena regada consoluciones nutritivas con fosfatos inorgánicos dehierro y calcio2001*Revista de la Facultd de Agronomia de la Luz* 13-32

Cuevas E, Antezana A y Winterhalter P2008Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (Zea Mays) boliviano*Memorias red alfa agrotehc*79-95Cartagena

da Silva, M., Kwon, Y., Apostolidis, E., Maria, F., Inés, M., & Shetty, K. (2008). Functionality of Bioactive Compounds in Brazilian Strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) Cultivars: Evaluation of Hyperglycemia and Hypertension Potential Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 56, 4386-4392.

de la Torre, K. (2007). *Efecto del consumo de aceite de oliva sobre la composiciónde las lipoproteínas de baja dencidaden individuos de diferentes países europeos*. Tesis, Univercidad de Barcelona, Departamento de Bromatologia, Barcelona.

Dejas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Abin J, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H. Ferreira M y A Morqui2003Neuroprotection by flavonoids*Brazilian journal of medical and biological reseach* 1613-1620

Del Rio D, Borges G y Crozier A2010Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and avidence of protective effects*British Journal of Nutrition* 104S67-S90

Delgado F, Jiménez A y O Paredes2000Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains, chacacteristics,biosynthesis, processing, and stability*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 173-289

Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Food science & technology* , 505-512.

Drago, M., López, M., & Sainz, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* , 37 (004), 58-68.

Du Q, Zheng J y Xu Y.2008Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity*Journal of Food Composition and Analysis* 21390-395

Efecto de la fertilizacion foliar y edafica sobre el crecimiento de plantas de maíz sometidas a excesos de humedad en el suelo2006*Bioagro* 107-1014

Eficiencia de uso de Fósforo en triticale y trigo de dos suelos con diferente capacidad de fijacion de Fósforo2001*Terra Latinoamericana* 47-54

Escribano M, Santos C y C Rivas2004Anthocyanins in cereals*Journal of Chromatographi* 105429-141

Fakumoto L y Mazza G2000Assessing antioxidant anprooxidant activities of phenolic compounds*Journal of Aagricultural and Food Chemistry* 483597-3604

Fernandez M, Villano D, Troncoso A y Garcia M2008Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence*Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48649-671

Fertilizacion foiar una herramienta en el desarrollo del cultivo de lilium cv stargazer2002*Chapingo seria horticultura* 371-378

Foliar Fertilization, an Important Enhancing for the Crop Yield2000*Agrociencias* 1-9

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (2005). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and ther antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry* , 890-894.

Fresh Plaza. (2008). Recuperado el 2008, de http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=8995

Fundacion Produce Michoacán A.C. (10 de 2011). *Fundacion Produce Michoacán A.C.* Recuperado el Febrero de 2008, de <http://producemich.comli.com/>

Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini N, Tavazzi B, Galvano G 2004 Cyanidins: metabolism and biological properties *The Journal of Nutritional Biochemistry* 152-11

Gonzalez, R., Reyes, M., Preza, A., Rosales, M., Morales, J., Gallegos, J., y otros. (2007). Antioxidant evaluation and chemoprotection of phenolic extracts from apple seeds. *Grasas y aceites* .

Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R y Kanner J 2005 Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 533397-3402

Gould K y T Vogelmann 2002 Profiles of photosynthesis within red and green leaves of *Quintinia serrata* *Physiologia Plantarum* 127-133

Gramza A y Korczak J. 2005 Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems *Trends in Food Science & Technology* 16351-358

Hernanz D, Recamales A, Meléndez A, González L y Heredia F. 2007 Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soil systems *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 551846-1852

Hou D, Fujii M, Terahara N y Yoshimoto M 2004 Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanins *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 321-325

Huang H, Chang C, Tso T, Huang J, Chang W y Tsai Y 2004 Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55423-429

Huerta, D., Bautista, L., Irigoyen, A., & Arrieta, R. (2005). Estructura familiar y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con hipertensión arterial. *Archivos de medicina familiar* , 87-92.

Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlation with antioxidant levels 2004 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 527264-7271

Jimenez, M., Zambrano, M., & Aguilar, M. (2004). Estabilidad de pigmentos de frutas sometidas a tratamientos con energía de microondas. *Información Tecnológica* , 61-66.

Kolayli, S., Kücü, M., Duran, C., Candan, F., & Dincer, B. (2003). Chemical and antioxidant properties of *Lauro officinalis* roem (Cherry Laurel) fruit grown in the black sea region. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (51), 7489-7494.

Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard R.2003Analysis and biological activities of anthocyanins*Phytochemistry* 1161923-933

Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R2005Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividades antioxidantes en pulpa de frutos*Ciência e Tecnologia de Alimentos* 254726-732

*Las arcillas el barro noble*1995México D.F.Fondo de cultura economica

Lima, L. (2002). *Estrés oxidativo y qntioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos*. Habana, Cuba: Centro nacional de medicina natural y tradicional, Universidad de la Habana .

Lin, J.-K., & Weng, M.-S. (2006). Flavonoids as nutraceuticals. En E. Grotewold, *The science of flavonoids* (págs. 213-239). Columbus: Springer.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A y Rémésy C2005Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies1*The American Journal of Clinical Nutrition* 81230S-42S

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A y Rémésy C.2005Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Reviwe of 97 biabalability studies*The American Journal of Clinical Nutrition* 81230-242

Manejo Biológico del Fósforo en el Suelo1997AGROECOLOGIA Y DESARROLLO 1-7

Marin, A., Buendia, B., Allende, A., & Tomás, F. (2007). Estabilidad de compuestos bioactivos de fresa sometida a tratamientos postcosechoxidativos y atmosfericos. *V congreso iberoamericanode tecnología postcocecha y agroexportaciones*, (págs. 1161-1170). Mauricia España.

Martinez M, Nieto D, Teliz D, Rodriguez J, Martinez M, Vaquera H y O Carrillo.2008Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch) de cultivares mexcianos y estadounidenses*Chapingo, serie horticultura* 142113-119

Martínez, S., González, J., Culebras, J., & M, T. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes . *Nutrición Hospitalaria* , 271-278.

Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M y Tsuda T. 2001 Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:1546-1551

Mazza G y E Miniati 1993 *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains* Boca Raton CRC Press

Medrano, F. (2005). *Capacidad antioxidante, contenido de vitamina "C" y carotenoides en plantas comestibles silvestres del departamento de Chiquimula*. Guatemala: Universidad de San Carlos.

Meyers K, Watkins C, Pritts M y Liu R 2003 Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6887-6892

Montalvo, P. (2006). *Evaluación de las propiedades antioxidantes de extractos de pápalo (Porophyllum ruderale), huazontla (Chenopodiaceae chenopodium) y guaje rojo (Leucaena esculenta)*. Puebla: Universidad de las Américas.

Nenev P, Ciz M, Ambrozova G, Lojek A, Yanakieva I y Kratchanova M 2010 Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties *Food Chemistry* 123:1055-1061

Nutrición potásica del brócoli (*Brassica oleracea*) con manejo convencional y fertirrigación en un vertisol en invernadero 2006 *Agrociencia* 1-11

Nutrient Solution Management in the Hydroponic Production of Tomato Zacatecas Zacatecas México

Olaiz, G., Rivera, J., Shaman, T., Rojas, R., Villalpando, S., Hernandez, M., y otros. (2006). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. Cuernavaca, Morelos, Mexico: Instituto Nacional de Salud Pública.

Origen, importancia y aplicación de vermicomposta para el desarrollo de especies hortícolas y ornamentales 2002 *Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – UL*.

Origin of the exceptional colour stability of the zebrina anthocyanin 1981 *Phytochemistry* 20:143-145

Parry J, Su L, Moore J, Cheng Z, Luther M, Rao J, Wang J y Yu L. 2006 Chemical composition, antioxidant capacities and antiproliferative

activities of selected fruit seed flours *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 543773-3778

Pascual S, Moreno D y Garcia C 2010 Flavanols and anthocianins in cardiovascular health: A review of current evidence *International Journal of Molecular Sciences* 111679-1703

Perez, E., Morales, M., & Ignacio, G. (2006). Panorama epidemiológico de la obesidad en México. *Revista mexicana de enfermería cardiologica* , 62-64.

Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* , 1035-1042.

Prior R y Wu X 2006 Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities *Free Radical Research*, 40101014-1028

Puupponen R, Nohynek L, Alakomi H y K Okasman 2005 The action of berry phenolics against human intestinal pathogens *BioFactors* 23243-251

Recent advances in anthocyanin analysis and characterization 2008 *Curr Anal Chem* 4275-101

Roberts A. y M Gordon. (2003). Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by liposome assay. *Journal of agricultural and food chemistry* , 1488-1493.

Santos M, Ibarra M, Loarca G, Paredes O y Delgado F 2007 Antioxidant and Antimutagenic Activities of *Randia echinocarpa* Fruit *Plant Foods for Human Nutrition* 6271-77

Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaser, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food science* , C329-C335.

Scalbert A y Williamson G 2000 Dietary intake and bioavailability of polyphenols "Chocolate: Modern Science Investigates and Washington D.C. The Journal of Nutrition

Sepúlveda, J., Valdespino, J., Olaiz, G., Lopez, M., Mendoza, L., Palma, O., y otros. (2000). *Encuesta Nacional de Salud*. Cuernavaca, Morelos, Mexico: Instituto Nacional de Salud Publica.

Shih P, Yeh C y Yen G2005Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells*Food and Chemical Toxicology* 431557-1566

Svarcova I, Heinrich J y Valentova K2007Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea**Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 1512163-174

Szajdek, A. y. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* , 147-156.

The action of berry phenolics against human2005*BioFactors* 243-251

*The science of flavonoids*2006Columbus, OhioSpringer Science + business media, inc.

Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H y T Osawa2003Dietary cyaniding 3-O-beta-D-glucoside rich purple corn color prevents obesity an ameliorates hyperglycemia in mice*Journa of Nutrition* 1332125-2130

Velázquez M, Prieto B y R Contretas. (2004). El envejecimiento y os radicales libres. *Ciencias* , 36-43.

Wang S y Jiao H2000Scavenging capacity of berry crops on superoxide redicals, hydrogen preoxide, hydroxil radicals and singlet oxygen*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 485677-5684

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* , 701-705.

Wolrd Health Organization. (2010). *World Health Statistics*.

Yu, L., Perret, B., Davy, J., Wilson, J., & Melby, C. (2002). Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science* , 7 (67), 2600-2603.

Welch C, Wu Q y J Simon. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, 75-101.

Williams C y R Grayer. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 539-573.