

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN  
DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR EN FRUTAS  
TROPICALES Y APLICACIÓN A UN JUGO DE MORA  
SOMETIDO A TRATAMIENTO TÉRMICO Y DIGESTIÓN  
*IN-VITRO***

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

**ESTEBAN GONZÁLEZ CHAVARRÍA**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2011**

## DEDICATORIA

*A mis padres, a quienes les debo lo que hoy soy  
y el haber alcanzado esta meta en mi vida.*

*A Laura, por estar ahí  
y ser la luz de mi vida.*

*A Javier y Pablo.*

## AGRADECIMIENTOS

A Fabrice, por la oportunidad de realizar esta investigación y su confianza en mi trabajo, por compartir tantos conocimientos y consejos invaluable, ayudarme en la elaboración de las publicaciones y sobretodo guiarme en mi formación como investigador.

A Ana Mercedes, por su gran apoyo durante toda la Maestría, en especial con todas las carreras de último momento, y por haber influido de manera muy importante en mi desarrollo tanto como estudiante como profesional.

A Georgina Gómez, por su valiosa asesoría durante la realización de esta investigación.

A Gustavo Rojas, por haber sido parte fundamental en el desarrollo del método ERYCA, y sus importantes aportes en el trascurso de esta investigación, además de ayudarnos a conseguir la sangre para los análisis.

A Jaqueline Aiello, en gran medida le debo a ella el haber ingresado al programa de Posgrado, y ha constituido un gran apoyo y motivación a lo largo de todo este tiempo con mis estudios y desarrollo profesional.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), por la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación, el uso de sus instalaciones y equipos, así como a todo el personal que de una u otra manera ha influido en la culminación de este trabajo. En especial quiero agradecer como parte del Laboratorio de Química del CITA, a doña Marielos Torres, Randall Cordero, Mariela Boniche y Paula Valverde.

A la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, por la posibilidad de cursar esta Maestría, a todos los profesores que formaron parte de ésta, y en particular a Patricia Esquivel y a Juan Carlos Monge, por ponerlos a correr con todos los trámites en esta última etapa.

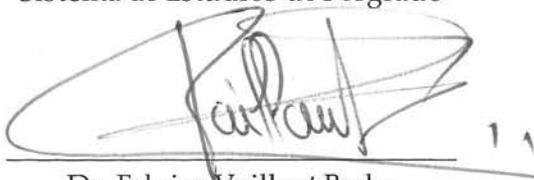
Este proyecto se financió en parte dentro del marco del convenio de cooperación del Centro Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), y el Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-PERSYST) de Francia, por lo que agradezco a estas entidades el haber hecho posible este trabajo de investigación.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”



---

Dra. Silvia Quesada Mora  
Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado



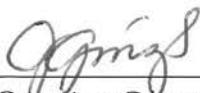
---

Dr. Fabrice Vaillant Barka  
Director de tesis



---

Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal  
Asesora



---

M.Sc. Georgina Gómez Salas  
Asesora



---

Dra. Patricia Esquivel Rodríguez  
Directora del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos



---

Esteban González Chavarría  
Candidato

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA-----	ii
AGRADECIMIENTOS-----	iii
TRIBUNAL EVALUADOR-----	iv
ÍNDICE GENERAL-----	v
RESUMEN-----	vii
ÍNDICE DE CUADROS-----	viii
ÍNDICE DE FIGURAS-----	x
LISTA DE ABREVIATURAS-----	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN-----</b>	<b>1</b>
1.1. Justificación-----	1
1.2. Objetivos-----	3
<b>2. MARCO TEÓRICO-----</b>	<b>4</b>
2.1. Radicales libres y metabolismo humano-----	4
2.2. Compuestos nutracéuticos antioxidantes-----	8
2.2.1. Vitaminas-----	9
2.2.2. Carotenoides-----	10
2.2.3. Polifenoles-----	12
2.3. Biodisponibilidad de los antioxidantes-----	15
2.4. Determinación de la capacidad antioxidante-----	22
2.4.1. Métodos químicos-----	23
2.4.2. Modelos celulares-----	25
2.5. El procesamiento térmico y la actividad antioxidante-----	29
2.5.1. Pasteurización-----	30
2.5.2. Efecto del tratamiento térmico sobre los compuestos bioactivos de los alimentos-----	32
<b>3. METODOLOGÍA-----</b>	<b>37</b>
3.1. Desarrollo y validación de un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante celular en glóbulos rojos humanos-----	37

3.1.1. Reactivos-----	37
3.1.2. Jugos de fruta y bebidas-----	37
3.1.3. Plasma sanguíneo-----	38
3.1.4. Obtención de los eritrocitos (glóbulos rojos)-----	38
3.1.5. Implementación de un método para determinar la capacidad antioxidante celular en eritrocitos (ERYCA)-----	38
3.1.6. Validación del método ERYCA-----	41
3.1.7. Actividad antioxidante por ORAC-----	43
3.1.8. Análisis estadístico-----	43
<b>3.2. Valoración de la capacidad antioxidante de frutas y alimentos comunes a nivel químico y celular-----</b>	<b>44</b>
3.2.1. Reactivos-----	44
3.2.2. Preparación de las muestras de frutas y alimentos-----	44
3.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante celular en matrices alimenticias mediante el método ERYCA-----	45
3.2.4. Contenido de polifenoles totales-----	46
3.2.5. Determinación del contenido de humedad-----	47
3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico-----	48
<b>3.3. Efecto del tratamiento térmico y la digestión <i>in vitro</i> sobre la capacidad antioxidante de un jugo de fruta-----</b>	<b>48</b>
3.3.1. Reactivos-----	48
3.3.2. Elaboración del jugo clarificado de mora-----	49
3.3.3. Efecto del tratamiento térmico-----	50
3.3.4. Efecto de la digestión simulada a nivel <i>in vitro</i> -----	50
3.3.5. Métodos de análisis-----	52
3.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico-----	52
<b>4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS-----</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Desarrollo y validación de un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante celular en glóbulos rojos humanos-----</b>	<b>54</b>
<b>4.2. Valoración de la capacidad antioxidante de frutas y alimentos comunes a nivel químico y celular-----</b>	<b>67</b>
<b>4.3. Efecto del tratamiento térmico y la digestión <i>in vitro</i> sobre la capacidad antioxidante de un jugo de fruta-----</b>	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y OTRAS CONSIDERACIONES-----</b>	<b>95</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA CITADA-----</b>	<b>99</b>

## RESUMEN

En la presente investigación se desarrolló y validó un método para evaluar la capacidad antioxidante a nivel celular empleando eritrocitos (ERYCA). Con este método, se pretende contar con un modelo celular para la determinación semi-automatizada de la actividad antioxidante de compuestos puros, extractos naturales, frutas, jugos, bebidas y plasma sanguíneo humano. El método ERYCA, se basa en las diferencias en las propiedades de dispersión de la luz (turbidez), entre eritrocitos humanos intactos o lisados por acción del 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida dihidrocloruro (AAPH), un generador de radicales peroxilo que induce la peroxidación lipídica de las membranas celulares. La consecuente hemólisis provoca una pérdida de la habilidad de dispersión de la luz de los eritrocitos lisados, lo cual es seguido espectrofotométricamente a 700 nm. Cuando se adiciona un antioxidante, el área bajo la curva de degradación de la absorbancia es linealmente proporcional a la concentración del compuesto antioxidante. Se encontró que el método ERYCA fue relativamente rápido (si se compara con otros modelos celulares), sensible, preciso y repetible, aún cuando se emplearon eritrocitos de diferentes donadores y con diferentes tiempos de almacenamiento.

En una segunda etapa, el método ERYCA fue empleado para evaluar la capacidad antioxidante de extractos acuosos de 36 frutas tropicales comunes. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con el método de ORAC-hidrofílico ("*Oxygen Radical Absorbance Capacity*") y el contenido total de polifenoles (CTP), determinado por el método con el reactivo Folin-Ciocalteu. Las bayas tropicales arándano y mora (*Vaccinium corymbosum* y *Rubus adenotrichus* respectivamente), fueron las frutas con los valores más altos para las tres metodologías de valoración aplicadas (ERYCA, ORAC, CTP). A pesar de que los mecanismos involucrados en el método de ERYCA y ORAC son diferentes, se determinó un buen coeficiente de correlación entre ambas metodologías, aún cuando se presentaron algunas discrepancias. Cuando se compararon los dos métodos empleando el mismo estándar equivalente de Trolox, el efecto protector de los extractos de frutas fue en promedio 2,5 veces mayor en los eritrocitos que en el caso de la fluoresceína (según la evaluación por ORAC). De esta manera, el método ERYCA permitió evaluar tanto la neutralización directa de radicales libres, como la protección relacionada con mecanismos celulares.

Por último, se seleccionó la mora para la producción de un jugo microfiltrado, el cual fue sometido a un tratamiento térmico (90 °C por diferentes tiempos) y a un proceso de digestión *in vitro*. El tratamiento térmico no presentó un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles. Sin embargo, la interacción del tratamiento térmico y la digestión *in vitro*, mostró un efecto significativo ( $p < 0,05$ ), presentándose un descenso de hasta un 44% en la capacidad antioxidante, y de hasta un 70% en el contenido total de polifenoles, después de dichos tratamientos.

**Palabras clave:** eritrocitos, capacidad antioxidante celular, frutas tropicales, tratamiento térmico, digestión *in vitro*.

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales grupos de compuestos polifenólicos y sus fuentes-----	15
<b>Cuadro 2.</b> Propósito de la pasteurización en algunos alimentos-----	31
<b>Cuadro 3.</b> Efecto del procesamiento térmico en el contenido de compuestos bioactivos de algunas frutas exóticas-----	34
<b>Cuadro 4.</b> Cambios en la actividad antioxidante global de los alimentos debido al tratamiento térmico en operaciones de procesamiento y preservación-----	35
<b>Cuadro 5.</b> Resumen de curvas patrón de quercetina para cuatro donadores diferentes de sangre (A-D) con diferentes tiempos de almacenamiento-----	59
<b>Cuadro 6.</b> Precisión y exactitud del ensayo ERYCA para diferentes donadores de sangre y tiempos de almacenamiento-----	61
<b>Cuadro 7.</b> Robustez de los valores de ERYCA para el Trolox empleando sangre tipo O Rh-positivo de diferentes donadores de sangre y tiempos de almacenamiento-----	62
<b>Cuadro 8.</b> Valores de ERYCA para diferentes compuestos antioxidantes naturales puros-----	64
<b>Cuadro 9.</b> Reproducibilidad y exactitud del ensayo ERYCA para diferentes estándares de antioxidantes y dos extractos de frutas con y sin incubación previa por 15 min-----	69
<b>Cuadro 10.</b> Valores de absorbancia obtenidos al finalizar el ensayo ERYCA empleando eritrocitos con cada uno de los extractos de frutas analizados en ausencia de AAPH-----	71
<b>Cuadro 11.</b> Valores de ERYCA y ORAC hidrofílico para 36 frutas Tropicales analizadas-----	79
<b>Cuadro 12.</b> Resultados de la medición de polifenoles totales con el reactivo Folin Ciocalteu en el extracto inicial de fruta-----	81

<b>Cuadro 13.</b> Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados de ERYCA, ORAC hidrofílico, contenido total de polifenoles (CTP), $V_m$ y $V_e$ -----	84
<b>Cuadro 14.</b> Valores de ERYCA, ORAC y contenido total de polifenoles de las muestras de jugo microfiltrado sometidas a diferentes tratamientos-----	90
<b>Cuadro 15.</b> Análisis de covarianza del efecto del tratamiento térmico y la digestión <i>in vitro</i> , sobre los valores de ERYCA, ORAC y polifenoles totales del jugo de mora microfiltrado-----	90
<b>Cuadro 16.</b> Efecto de la digestión simulada a nivel <i>in vitro</i> sobre el contenido de antioxidantes reportado por otros autores-----	92
<b>Cuadro 17.</b> Valores de antocianinas y elagitaninos totales estimados por HPLC de las muestras de jugo sometidas a tratamiento térmico-----	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Condiciones clínicas relacionadas con las especies reactivas de oxígeno-----	5
<b>Figura 2.</b> Estabilización por resonancia de los radicales libres generados por antioxidantes de origen fenólico-----	7
<b>Figura 3.</b> Estructura química general de la vitamina E-----	9
<b>Figura 4.</b> Secuencia de oxidaciones de un electrón del ácido ascórbico----	10
<b>Figura 5.</b> Estructura química general de algunos carotenoides-----	11
<b>Figura 6.</b> Estructura general de los ácidos fenólicos-----	13
<b>Figura 7.</b> Estructura general de los flavonoides-----	13
<b>Figura 8.</b> Estructuras generales de I) taninos condensados, II) taninos hidrolizables, y III) florotaninos-----	14
<b>Figura 9.</b> Relación entre los factores que afectan la biodisponibilidad de los antioxidantes en los alimentos-----	16
<b>Figura 10.</b> Posibles estados de los antioxidantes dentro de la microestructura de los alimentos-----	17
<b>Figura 11.</b> Posibles rutas de los polifenoles de la dieta y sus metabolitos en humanos-----	19
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de recuperación de varios polifenoles dietarios en orina después del consumo de alimentos en humanos-----	20
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de la actividad antioxidante de una muestra evaluada por ORAC-----	24
<b>Figura 14.</b> Ejemplo de cinéticas de decoloración del DPPH en presencia de diferentes concentraciones de un antioxidante---	24
<b>Figura 15.</b> Posibles situaciones al comparar la capacidad antioxidante de un producto por métodos químicos y celulares-----	25
<b>Figura 16.</b> Principio general del método CAA para evaluar actividad antioxidante celular-----	26

<b>Figura 17.</b> Principio general del método CAP-e para evaluar protección antioxidante celular-----	29
<b>Figura 18.</b> Cambios en la actividad antioxidante global debido a eventos diferentes y simultáneos en una matriz alimentaria sometida a calentamiento-----	36
<b>Figura 19.</b> Esquema general del procedimiento del método ERYCA desarrollado para la presente investigación-----	40
<b>Figura 20.</b> Simulación de la digestión de un jugo de fruta <i>in vitro</i> -----	51
<b>Figura 21.</b> Micrográficas de transmisión de electrones de eritrocitos de conejo durante la oxidación-----	54
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de curvas de degradación de la absorbancia de la solución de eritrocitos/PBS inducidas por el AAPH en presencia o ausencia de un compuesto con capacidad antioxidante-----	55
<b>Figura 23.</b> Ejemplo de curvas de degradación de la absorbancia de la solución de eritrocitos/PBS en presencia de diferentes concentraciones de quercetina-----	57
<b>Figura 24.</b> Ejemplo de la relación lineal entre el área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia y la concentración de estándar de quercetina-----	58
<b>Figura 25.</b> Estructuras químicas de los compuestos fenólicos puros estudiados-----	64
<b>Figura 26.</b> Comparación de valores de ERYCA y ORAC para diferentes jugos de frutas y bebidas-----	65
<b>Figura 27.</b> Comparación de valores de ERYCA y ORAC para muestras de plasma sanguíneo de cinco voluntarios sanos en ayuno-----	66
<b>Figura 28.</b> Ejemplos de la relación lineal entre el área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia y la concentración de quercetina y extractos de mora y papaya---	67
<b>Figura 29.</b> Capacidad antioxidante de 36 frutas evaluadas con los métodos ERYCA y ORAC-hidrofílico-----	82

<b>Figura 30.</b> Contenido total de polifenoles (CTP) de 36 frutas evaluadas con el método Folin-Ciocalteu modificado-----	83
<b>Figura 31.</b> Contribución respectiva al potencial antioxidante total de una comida habitual evaluada con el ensayo ERYCA-----	86
<b>Figura 32.</b> Perfil de tiempo y temperatura registrado durante el tratamiento térmico aplicado al jugo microfiltrado de mora----	87
<b>Figura 33.</b> Pérdidas estimadas de los valores de capacidad antioxidante y polifenoles totales por la digestión <i>in vitro</i> del jugo microfiltrado de mora-----	91
<b>Figura 34.</b> Compuestos fenólicos principales detectados por HPLC en el jugo de mora-----	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida dihidrocloruro
<b>ABC</b>	área bajo la curva
<b>ANOVA</b>	análisis de varianza
<b>°C</b>	grados Celcius
<b>CTP</b>	contenido total de polifenoles
<b>EAG</b>	equivalentes de ácido gálico
<b>ERYCA</b>	erythrocyte cellular antioxidant activity
<b>ET</b>	equivalentes de trolox
<b>EQ</b>	equivalentes de quercetina
<b>g</b>	gramos
<b>h</b>	horas
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatograh
<b>kg</b>	kilogramos
<b>kPa</b>	kilopascales
<b>l</b>	litros
<b>min</b>	minutos
<b>mg</b>	miligramos
<b>ml</b>	mililitros
<b>mm</b>	milímetros
<b>nm</b>	nanómetros
<b>ORAC-H</b>	hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PM</b>	peso molecular
<b>PMRS</b>	plasma membrane redox system
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>s</b>	segundos
<b>v</b>	volúmen
<b>V<sub>e</sub></b>	valor de las interferencias (para el método Folin-Ciocalteu)
<b>V<sub>m</sub></b>	valor total de la muestra (para el método Folin-Ciocalteu)
<b>μl</b>	microlitros
<b>μm</b>	micrométros
<b>μM</b>	micromolar
<b>μmol</b>	micromoles

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1. Justificación

Los polifenoles constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas, encontrados comúnmente en frutas y vegetales (Kaur y Kapoor, 2001; Lee *et al.*, 2002). En la actualidad existe un gran interés en explotar su potencial en términos de beneficios para la salud, actividad antioxidante y efectos antimicrobianos (Ross y Kasum, 2002; Sies y Stahl, 2004; Scalbert *et al.*, 2005a; Wu *et al.*, 2005).

Los estudios recientes han sugerido que las dietas ricas en polifenoles pueden reducir significativamente la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Karadeniz *et al.*, 2000; Sies y Stahl, 2004; Scalbert *et al.*, 2005b; Waterhouse, 2005; Tzulker *et al.*, 2007). Asimismo, se han asociado con una importante actividad anticancerígena (Lee *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Nichenametla *et al.*, 2006; Dubick y Omaye, 2007), retraso en la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Álvarez *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008), reducción de los niveles de colesterol sanguíneo (Vidavalur *et al.*, 2006; Jalili *et al.*, 2007), disminución de los efectos de padecimientos como diabetes, osteoporosis y arterosclerosis (Goggs *et al.*, 2005; Scalbert *et al.*, 2005a; Hendrich y Murphy, 2007), actividad antibacteriana (Akai *et al.*, 2007) y retraso en la aparición de numerosos efectos relacionados con el envejecimiento (Joseph *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran ampliamente implicadas en el desarrollo de la mayoría de estos padecimientos, pues en exceso, pueden degradar o modificar moléculas como lípidos, proteínas, enzimas e incluso ADN (Silva *et al.*, 2005; Barreira *et al.*, 2008). Estos compuestos son subproductos naturales del metabolismo humano y, a pesar de que se mantiene un balance por medio de los sistemas de defensa naturales, se debe de proveer al organismo de compuestos antioxidantes adicionales a través de la dieta (Barreira *et al.*, 2008; Chirinos *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

En términos generales, en la dieta occidental los polifenoles constituyen la mayor fuente de antioxidantes que consumimos por día, cerca de 10 veces más que la ingesta diaria de vitamina C y alrededor de 100 veces más que el

consumo de vitamina E y carotenoides (Scalbert *et al.*, 2005a; Dai *et al.*, 2006); a su vez, los polifenoles han demostrado una capacidad antioxidante equivalente mucho mayor que la de otros compuestos antioxidantes (Kim y Lee, 2004).

En consecuencia, resulta relevante poder evaluar el potencial antioxidante de los fitoquímicos y productos alimenticios. Al respecto, la mayoría de los métodos desarrollados para medir la capacidad antioxidante involucran solo reacciones químicas, usualmente llevadas a cabo bajo condiciones no fisiológicas, lo que permite cuestionar dichos resultados para predecir la capacidad antioxidante de estos productos a nivel *in vivo* (Wolfe y Liu, 2007; Honzel *et al.*, 2008).

Otro problema asociado con la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto se refiere a la biodisponibilidad de los antioxidantes para el ser humano, pues en muchos casos ésta se ve sumamente afectada por otros componentes presentes en los alimentos (como hierro o proteínas) y el proceso de digestión en el organismo, así como por las condiciones fisiológicas y los estilos de vida particulares de cada individuo (Ross y Kasum, 2002; Liu y Finley, 2005; Manach *et al.*, 2005).

Desde una perspectiva fisiológica, después de su consumo, los alimentos son sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal antes de alcanzar el intestino, proceso durante el cual los antioxidantes y otros compuestos funcionales pueden ser transformados en otros compuestos con diferente biodisponibilidad y actividad biológica, afectando de esta manera el potencial antioxidante original de estos componentes (Cerdá *et al.*, 2005; Cilla *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior, se ha determinado que el procesamiento de los alimentos, en especial la aplicación de tratamientos térmicos, pueden causar efectos indeseados en la calidad nutricional de los mismos, tales como la pérdida de vitaminas y la degradación de los polifenoles y de algunos compuestos con capacidad antioxidante (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Cisse *et al.*, 2009).

Debido a estos inconvenientes, se requieren métodos biológicos alternativos para la determinación del poder antioxidante de productos de interés. En este sentido, con la presente investigación se desarrolló una metodología sencilla y reproducible para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos con

potencial actividad antioxidante, en una matriz celular en concordancia con las condiciones fisiológicas imperantes en el ser humano. Así mismo, se realizó un análisis de capacidad antioxidante de 36 diferentes frutas consumidas frecuentemente en nuestro país. Además, se analizó la capacidad antioxidante de un jugo de fruta con destacado interés nutricional, considerando los cambios que ocurren durante la digestión simulada a nivel *in vitro*, así como los cambios causados por efecto del tratamiento térmico.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una metodología *in-vitro* con células que permita mejorar la evaluación del potencial antioxidante de jugos de frutas sometidos a tratamientos térmicos y digestión simulada.

### **1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar y validar una metodología para evaluar el poder antioxidante celular empleando glóbulos rojos humanos (eritrocitos).
- Valorar la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles de frutas producidas localmente y seleccionar un producto con valores sobresalientes en estos parámetros.
- Determinar el efecto de un tratamiento térmico (pasteurización) sobre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles del jugo obtenido a partir de la fruta seleccionada.
- Analizar el cambio en la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles del jugo de fruta seleccionado durante el proceso de digestión simulado a nivel *in vitro*.

# 2 MARCO TEÓRICO

---

## 2.1. Radicales libres y metabolismo humano

Los radicales libres pueden definirse como moléculas o fragmentos moleculares, que contienen uno o más electrones desapareados, los cuales usualmente confieren un grado considerable de reactividad a estas especies. (Valko *et al.*, 2007). Los radicales derivados del oxígeno representan el grupo más importante de radicales libres generados en los sistemas vivientes (Nelson y Cox, 2004).

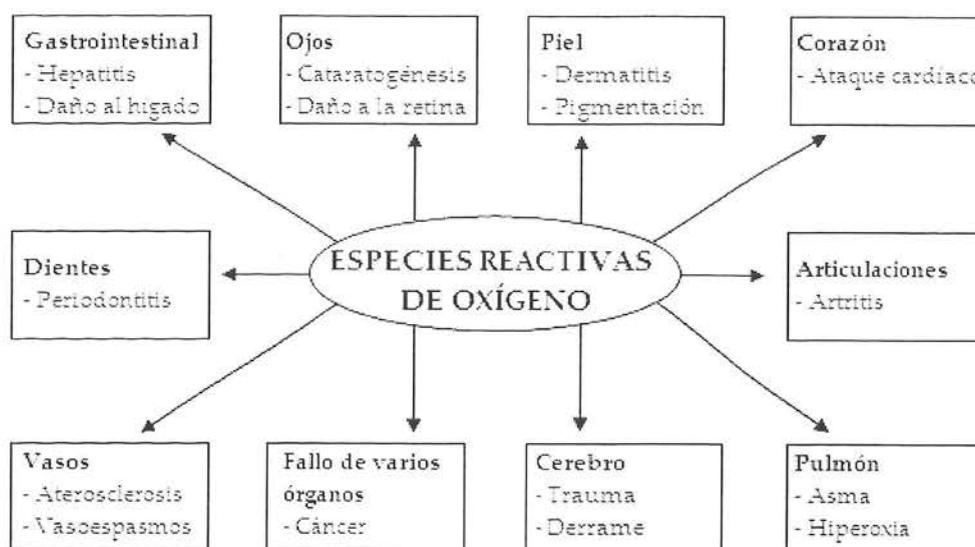
A pesar de que el oxígeno es esencial para las formas de vida aeróbicas, sus metabolitos son altamente tóxicos, y las mitocondrias, que consumen más del 90% del oxígeno en estos organismos, son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y el oxígeno singlete (Lee *et al.*, 2004; Nelson y Cox, 2004; Barreira *et al.*, 2008a). Aproximadamente, del 1% al 5% del oxígeno consumido por las mitocondrias es reducido y convertido a estas especies reactivas (Mathews *et al.*, 2002).

Otras fuentes de radicales libres en el organismo pueden provenir de la acción de enzimas prooxidativas (como la lipooxigenasa), de fuentes ambientales (como la radiación ultravioleta y la contaminación), así como de células o tejidos dañados (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2004). Las especies reactivas de oxígeno también pueden formarse en los alimentos, a través de la oxidación lipídica y de compuestos fotosensibles expuestos a la luz (Lee *et al.*, 2004).

En altas concentraciones, los radicales libres pueden ser importantes mediadores de daño a estructuras celulares, oxidación de lípidos y proteínas, ruptura de la cadena de ADN y modificación de bases, así como la modulación de la expresión génica (Lee *et al.*, 2004). Por ejemplo, se sabe que el radical hidroxilo reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando tanto las bases púricas y pirimídicas, como también el esqueleto de desoxirribosa (Valko *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que conforme avanza el proceso de envejecimiento, se incrementa el contenido de ADN

oxidado como el 8-hidroxideoxiguanosina, y de proteínas oxidadas con modificaciones en el grupo carbonilo o pérdida del grupo -SH (Lee *et al.*, 2004).

Las modificaciones permanentes al material genético como resultado de la acción de los radicales libres, representa el primer paso en el desarrollo de mutagénesis, carcinogénesis y el proceso de envejecimiento celular (Valko *et al.*, 2007). En consecuencia, diversos estudios clínicos han reportado una asociación entre las especies reactivas de oxígeno y el riesgo de desarrollar diversos padecimientos (figura 1), como enfermedades cardiovasculares, problemas inflamatorios, cáncer, diabetes, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, y declive funcional relacionado con el envejecimiento (Mathews *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Nelson y Cox, 2004; Liu y Finley, 2005; Valko *et al.*, 2007; Wolfe y Liu, 2007; Barreira *et al.*, 2008a; Chirinos *et al.*, 2008; Honzel *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Condiciones clínicas relacionadas con las especies reactivas de oxígeno (Modificado de Lee *et al.*, 2004).

En individuos sanos, la producción de radicales libres está continuamente balanceada por los sistemas naturales de defensa antioxidativa, los cuales pueden ser de dos tipos:

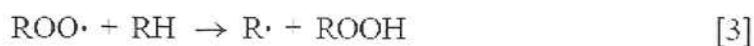
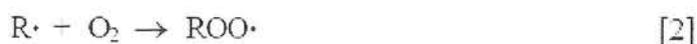
- **Enzimáticos**, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno; la catalasa (CAT),

involucrada en la destoxificación celular y puede convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; y la glutatión peroxidasa (GPx), la enzima removedora de peróxido de hidrógeno más importante de la membrana celular (Lee *et al.*, 2004).

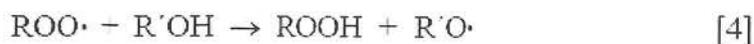
- **De origen no enzimático**, destacando el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), los carotenoides y los compuestos fenólicos (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2004; Honzel *et al.*, 2008).

La actividad antioxidante de estas moléculas se relaciona con diferentes mecanismos, tales como la "captación" de radicales libres, la donación de átomos de hidrógeno, la neutralización de oxígeno singlete, la quelación de iones metálicos y su capacidad como agentes reductores (Barreira *et al.*, 2008a; Chirinos *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009).

El modo de acción general de los antioxidantes puede explicarse de la siguiente manera (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2004). El proceso de oxidación inicia con la formación de un intermediario o radical libre ( $R\cdot$ ) en el proceso de iniciación (ecuación 1), seguido del proceso de propagación donde ocurre la reacción entre el radical libre y el oxígeno para formar un radical de peróxido (ecuación 2). Este radical de peróxido ( $ROO\cdot$ ), al reaccionar con el sustrato produce otro radical libre, estableciéndose así, la cadena de reacciones de oxidación (ecuación 3).

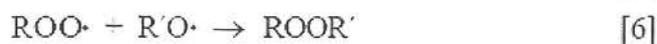
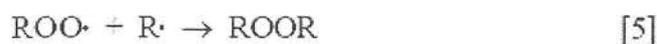


En este punto, los antioxidantes pueden inhibir o retardar la formación de radicales libres en la etapa de iniciación e interrumpir la cadena de reacciones de oxidación (ecuación 4).



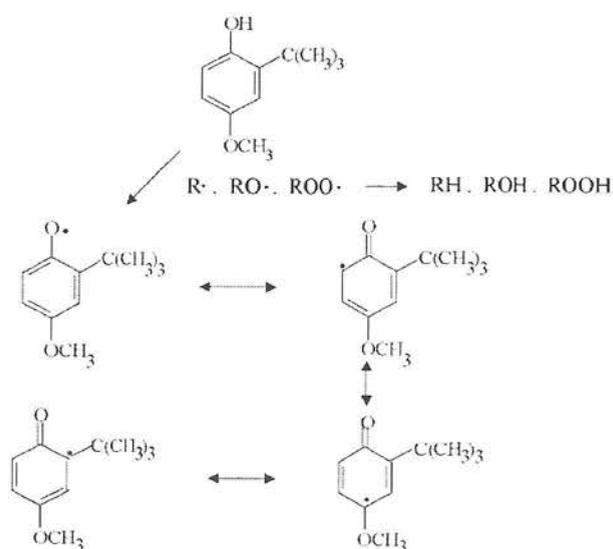
Lo anterior se explica por la capacidad del antioxidante de ceder fácilmente un electrón, con la consecuente formación de un radical libre más estable ( $R'O\cdot$ ) que el formado en la ecuación 2, el cual llega a su estabilidad en las reacciones

de terminación, protegiendo a nuestro organismo, como las reacciones de terminación mostradas a continuación:



Los nuevos radicales libres generados a partir de los antioxidantes, deben ser lo suficientemente estables para no participar en otras reacciones de oxidación en cadena (Valko *et al.*, 2007). Los radicales generados a partir de compuestos fenólicos antioxidantes, pueden ser estabilizados a través de estructuras de resonancia (figura 2).

También es importante considerar que metales como el hierro y el cobre, tienen un papel importante en las reacciones de oxidación, ya que su presencia acelera las etapas de iniciación y propagación, a la vez que están involucrados en la formación de radicales peroxilo y oxígeno singlete (Nelson y Cox, 2004). Por tanto, los antioxidantes con actividad quelante de metales (como el ácido cítrico, el ácido ascórbico y la quercetina), presentan un efecto adicional en el mantenimiento del balance de las reacciones oxidativas (Lee *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Estabilización por resonancia de los radicales libres generados por antioxidantes de origen fenólico (Lee *et al.*, 2004).

Sin embargo, la eficacia de estos sistemas de defensa tiende a disminuir debido a factores como el envejecimiento, los estilos de vida no saludables, o las condiciones ambientales entre otros, generando un desbalance de especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva al proceso conocido como estrés oxidativo (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2004). Por tanto, para la prevención de diversas enfermedades, es sumamente relevante adquirir antioxidantes adicionales por medio de la dieta (Liu y Finley, 2005; Wolfe y Liu, 2007; Barreira *et al.*, 2008b; Honzel *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2008).

Se ha determinado que el consumo de una dieta pobre en antioxidantes, resulta en un descenso en la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo, mientras que al adicionar frutas a la misma dieta, no solo se previene dicho descenso, sino que se observa un aumento en dicha capacidad (Jensen *et al.*, 2008). Al respecto, numerosos estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación entre el consumo regular de frutas y vegetales y la reducción en la incidencia de males cardiacos, cáncer y enfermedades degenerativas, así como en la reducción de los efectos deletéreos del envejecimiento (Huang *et al.*, 2005; Wolfe y Liu, 2007; Honzel *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009). Los principales compuestos antioxidantes encontrados en los alimentos se abordarán con más detalle en la siguiente sección.

## **2.2. Compuestos nutraceuticos antioxidantes**

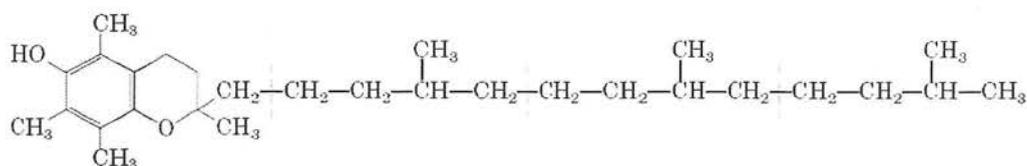
Las frutas, vegetales, especias, hierbas y bebidas como el té y el vino son alimentos típicos que contienen numerosos compuestos nutraceuticos antioxidantes (Huang *et al.*, 2005; Barreira *et al.*, 2008; Chirinos *et al.*, 2008). La actividad antioxidante de estos productos está correlacionada con su contenido de vitaminas antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico (vitamina C), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el  $\beta$ -caroteno o provitamina A (Souza *et al.*, 2008; Tarko *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios recientes indican que por lo general, los compuestos polifenólicos son los principales fitoquímicos con propiedades antioxidantes en las plantas superiores (Magalhães *et al.*, 2009).

### 2.2.1. VITAMINAS

Las vitaminas abarcan un diverso grupo de compuestos orgánicos que son micronutrientes esenciales (Damodaran *et al.*, 2008). Presentan diversas funciones *in vivo*, como coenzimas, factores de regulación genética y otras funciones especializadas, incluyendo los sistemas de defensa antioxidativa como el caso de las vitaminas E y C (Mathews *et al.*, 2002).

La vitamina E es el nombre colectivo para un grupo de lípidos estrechamente relacionados denominados tocoferoles (Nelson y Cox, 2004), los cuales contienen un anillo aromático sustituido y una larga cadena lateral isoprenoide (figura 3).

Debido a su hidrofobicidad, los tocoferoles se asocian con membranas celulares, depósitos lipídicos y lipoproteínas en la sangre (Mathews *et al.*, 2002). Como se mencionó antes, su función principal es como antioxidantes biológicos, ya que el anillo aromático reacciona y neutraliza la mayoría de formas reactivas de oxígeno y otros radicales libres, protegiendo los ácidos grasos insaturados de la oxidación, y previniendo el daño oxidativo de los lípidos de membrana, lo cual puede causar fragilidad celular (Lee *et al.*, 2004). Los tocoferoles pueden encontrarse en huevos y aceites vegetales, y son especialmente abundantes en el germen de trigo (Damodaran *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Estructura química general de la vitamina E (Nelson y Cox, 2004).

Por otro lado, la vitamina C o ácido L-ascórbico, es una estructura en anillo de lactona de 6 carbonos con una fracción 2,3-enediol, la cual es la responsable de su actividad antioxidante (Damodaran *et al.*, 2008). El ácido ascórbico primero cambia a ácido semi-dehidroascórbico a través de la donación de un átomo de hidrógeno y un electrón, y luego a ácido dehidroascórbico con la donación de un segundo átomo de hidrógeno y un electrón (figura 4). Tanto el ácido L-ascórbico como el L-dehidroascórbico retienen su actividad de vitamina C (Damodaran *et al.*, 2008).

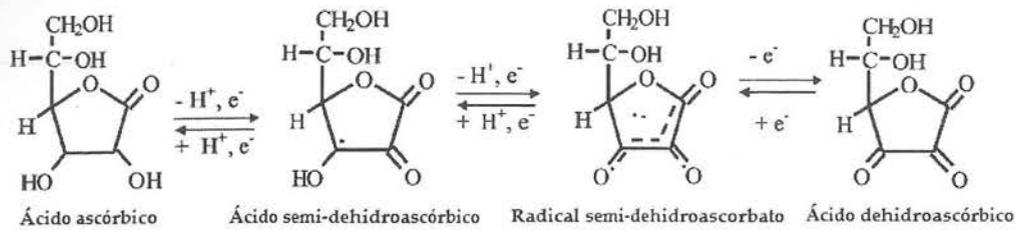


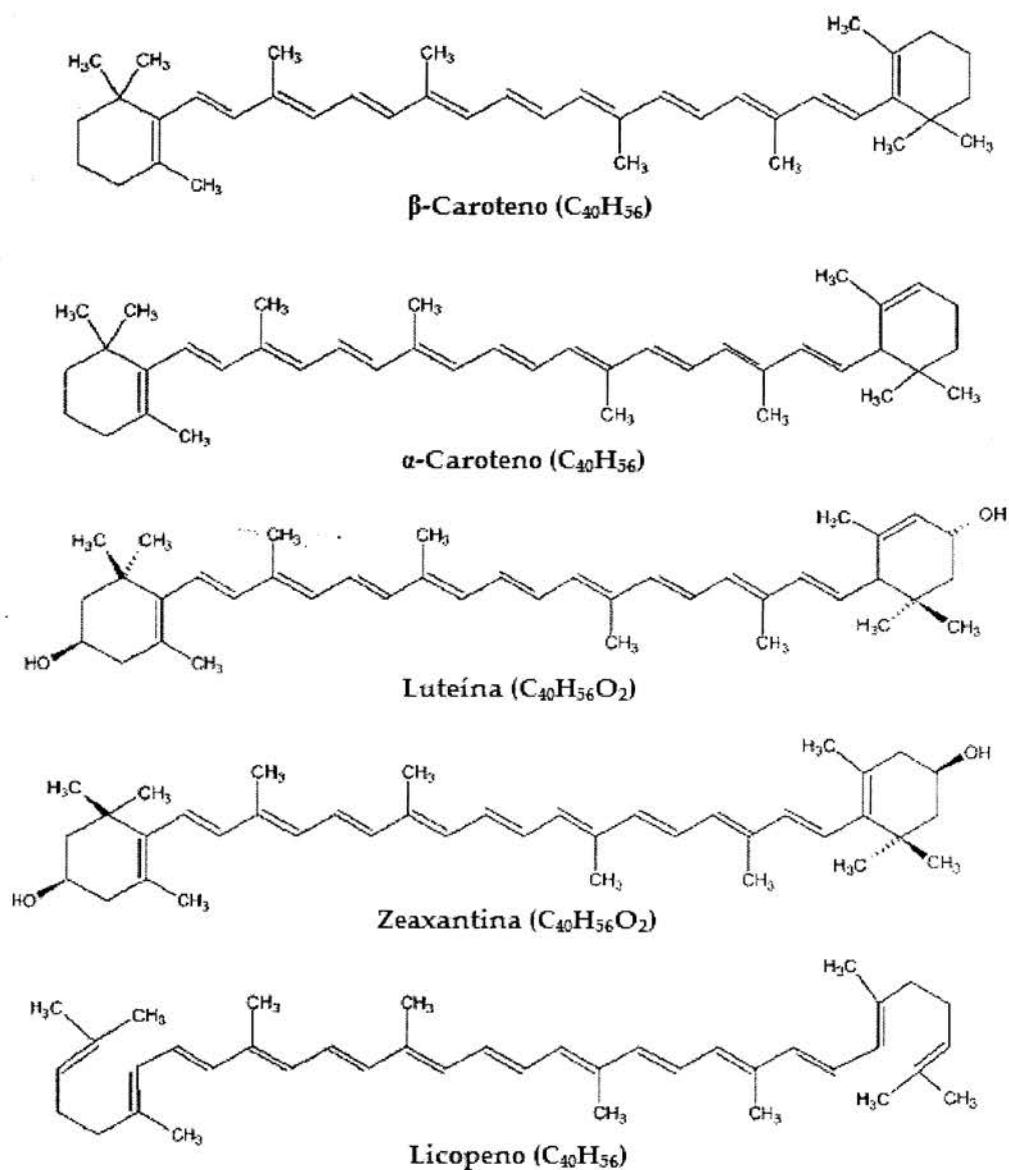
Figura 4. Secuencia de oxidaciones de un electrón del ácido ascórbico (Lee *et al.*, 2004).

Los mecanismos antioxidantes del ácido L-ascórbico están basados en la donación de átomos de hidrógeno, neutralización de oxígeno singlete y remoción de oxígeno molecular, así como la regeneración de  $\alpha$ -tocoferol de las especies radicales de tocoferoxilo (Lee *et al.*, 2004). El ácido ascórbico es un excelente donador de electrones, debido a su bajo potencial de reducción, la generación del relativamente estable ácido semi-dehidroascórbico, y la fácil conversión entre ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico (Nelson y Cox, 2004). El ácido ascórbico se presenta en la naturaleza casi exclusivamente en su forma reducida, ocurre naturalmente en frutas y vegetales, y en menor medida en tejidos animales y productos derivados (Damodaran *et al.*, 2008).

### 2.2.2. CAROTENOIDES

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales, solubles en grasa, que proveen coloraciones brillantes a muchas plantas y otros organismos fotosintéticos. Pertenecen al grupo de los tetraterpenoides, y su esqueleto estructural consiste en unidades de isopreno formadas mediante biosíntesis (Damodaran *et al.*, 2008). Existen dos clases primarias de estos compuestos (figura 5):

- **Carotenos**, que son carotenoides hidrocarbonados como el caso del licopeno (carotenoide principal del tomate) y el  $\beta$ -caroteno (en la zanahoria por ejemplo).
- **Xantófilas**, que contienen oxígeno en la forma de grupos hidroxilo, metoxilo o carboxilo, como ocurre en la luteína (encontrada en hojas verdes de varios vegetales) y la zeaxantina (en el maíz por ejemplo).



**Figura 5.** Estructura química general de algunos carotenoides (Lee *et al.*, 2004).

Los carotenoides son los neutralizadores de oxígeno singlete más eficientes en los sistemas biológicos, como referencia, un mol de  $\beta$ -caroteno puede neutralizar de 250 a 1000 moléculas de oxígeno singlete a una tasa de  $1,3 \times 10^{10}$  M/s (Lee *et al.*, 2004). Por otra parte, los carotenoides contribuyen significativamente a la actividad de vitamina A en alimentos de origen vegetal y animal, pues alrededor de 50 de los carotenoides conocidos exhiben cierta

actividad pro-vitáminica, es decir, son convertidos parcialmente a vitamina A *in vivo* (Damodaran *et al.*, 2008).

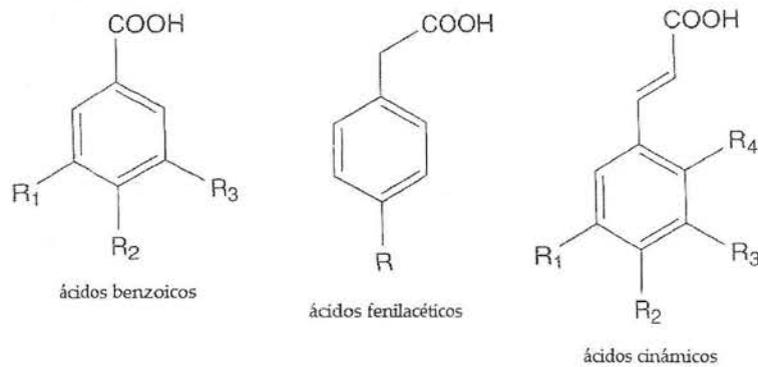
Gracias a estas propiedades, se ha reportado el potencial antioxidante de los carotenoides en la prevención de enfermedades relacionadas con los radicales libres, como el descenso en la incidencia de cáncer de próstata por el consumo de licopeno, la protección de la piel contra la radiación ultravioleta gracias al  $\beta$ -caroteno, o la inhibición de la formación de productos oxidados del colesterol asociados con enfermedad coronaria de corazón, entre otros beneficios (Mathews *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Nelson y Cox, 2004).

### 2.2.3. POLIFENOLES

Ampliamente distribuidos en la naturaleza, actualmente se conocen más de 8000 polifenoles de fuentes naturales, de los cuales los flavonoides y sus derivados son los más comunes (Sies & Stahl, 2004; Waterhouse, 2005; Wrolstad *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006).

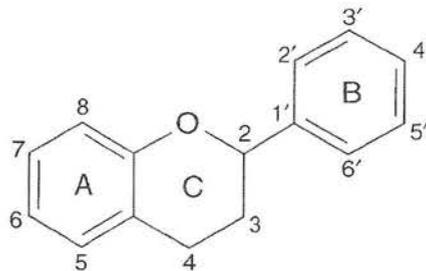
Con base en Wrolstad *et al.* (2005), “los polifenoles comprenden un amplio rango de compuestos químicos constituidos por anillos aromáticos con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales”. En este sentido, de acuerdo con Scalbert *et al.* (2005b); Wrolstad *et al.* (2005) y Damodaran *et al.* (2008), los polifenoles pueden clasificarse en tres grupos principales, los cuales se describen a continuación.

**A) Ácidos fenólicos:** dentro de este grupo se incluyen los ácidos hidroxibenzoico, hidroxifenilacético e hidroxicinámico (figura 6). Estos ácidos son los que se distribuyen mayoritariamente en los tejidos vegetales, siendo los más importantes el *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. En la naturaleza, muchos de estos ácidos raramente se encuentran en forma libre, ya que se presentan como ésteres de glucosa o de ácido quínico.



**Figura 6.** Estructura general de los ácidos fenólicos (Wrolstad *et al.*, 2005).

**B) Flavonoides:** presentan la estructura común del difenilpropano, el cual consiste en dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos que usualmente forman un anillo heterocíclico oxigenado (figura 7). El estado oxidativo de esta cadena de tres carbonos determina las varias clases de flavonoides. Ejemplos destacados incluyen quercetina (flavonol abundante en cebolla, té y manzanas), catequina (flavanol común en té y frutas), hesperidina (flavanona presente en cítricos), cianidina (antocianina de fresas, frambuesas y diversos frutos rojos), daidzeína (isoflavona principal de la soya), y proantocianidinas (responsables de la astringencia o amargor característicos de ciertos frutos como uva o cocoa).



**Figura 7.** Estructura general de los flavonoides (Wrolstad *et al.*, 2005).

**C) Taninos:** son compuestos de alto peso molecular que pueden formar complejos insolubles con las proteínas, y son responsables del fenómeno conocido como astringencia. Típicamente se dividen en tres categorías (figura 8), a saber, I) taninos condensados (procianidinas o proantocianidinas), que son oligómeros o polímeros de dos o más catequinas o epicatequinas; II) taninos hidrolizables, que son polímeros de ácido gálico o elágico; y III) florotaninos, constituidos por subunidades de floroglucinol.

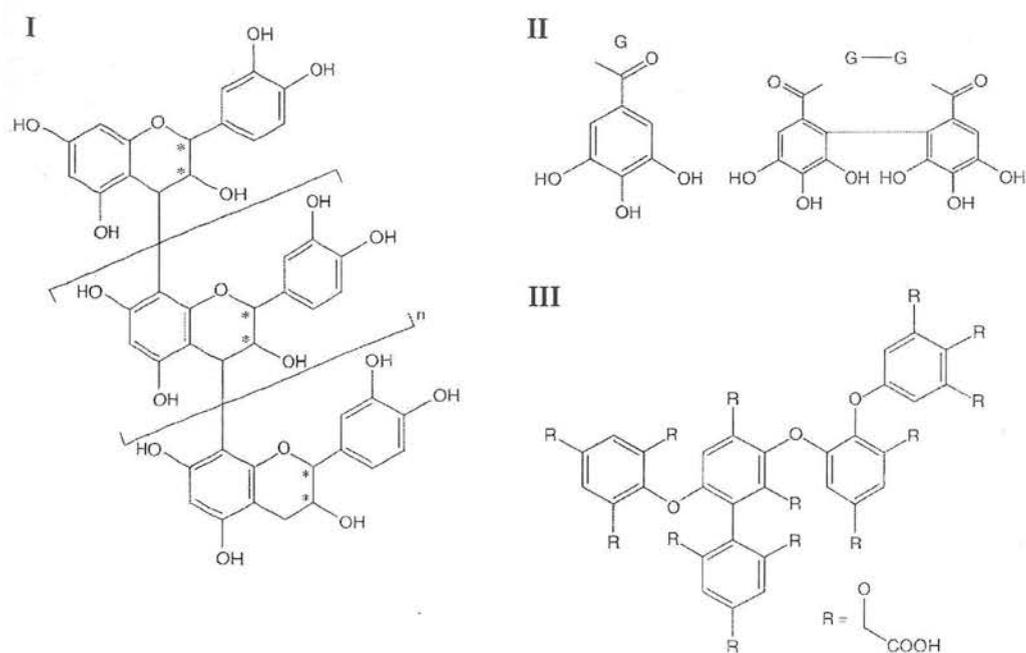


Figura 8. Estructuras generales de los principales taninos (Wrolstad *et al.*, 2005).

De esta manera, fuentes notables de estos compuestos incluyen las fresas, las frambuesas, las cerezas, las zarzamoras, las moras, los arándanos (“blueberry”, “cranberry”), las ciruelas, las uvas (vino), la cerveza, el chocolate (cocoa), el café, el té, las nueces, las manzanas, y diversas frutas, vegetales y cereales (German & Walzem, 2000; Kaur & Kapoor, 2001; Sies & Stahl, 2004; Wrolstad *et al.*, 2005; Hassimotto *et al.*, 2007; Damodaran *et al.*, 2008). A manera de referencia, frutas como las manzanas, las peras, las uvas y numerosas bayas, contienen entre 200-300 mg de polifenoles por cada 100 g de materia fresca, mientras que una copa de vino tinto o una taza de café o té contiene alrededor de 100 mg de polifenoles (Scalbert *et al.*, 2005b). Un resumen de los principales polifenoles y sus fuentes en la naturaleza se presenta en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Principales grupos de compuestos polifenólicos y sus fuentes.

Grupo	Compuestos principales	Fuentes naturales
Antocianinas	Cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, malvidina.	Bayas rojas-azules-moradas, uvas rojas y moradas, vino tinto, cereza, ruibarbo.
Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina.	Repollo rojo, cebolla, cereza, tomate, brócoli, arándano azul, albaricoque, manzana, uva negra, té verde y negro.
Flavonas	Apigenina, luteolina.	Perejil, apio, tomillo, chile picante.
Flavanonas	Hesperetina, naringenina, eriodictiol.	Frutos y jugos de cítricos, uvas.
Isoflavonas	Daidzeína, genisteína, gliciteína.	Soya y productos derivados, algunas legumbres.
Catequinas	Catequina, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato.	Té verde y negro, chocolates, uvas, bayas, manzana.
Proantocianidinas	---	Cacao, manzana, bayas, uva roja, vino tinto.
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido protocatecuico, gálico, <i>p</i> -hidroxibenzoico.	Mora, frambuesa, fresa, pasas.
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido caféico, clorogénico, cumárico, ferúlico, sinápico.	Arándano azul, kiwi, cereza, ciruela, manzana, pera, melocotón, alcachofa, café.
Lignanós	Secoisolariciresinol, matairesinol.	Linaza, lentejas, ajo, espárrago, zanahoria, pera.
Estilbenos	Resveratrol.	Uvas, granada roja ("pomegranate"), maní.

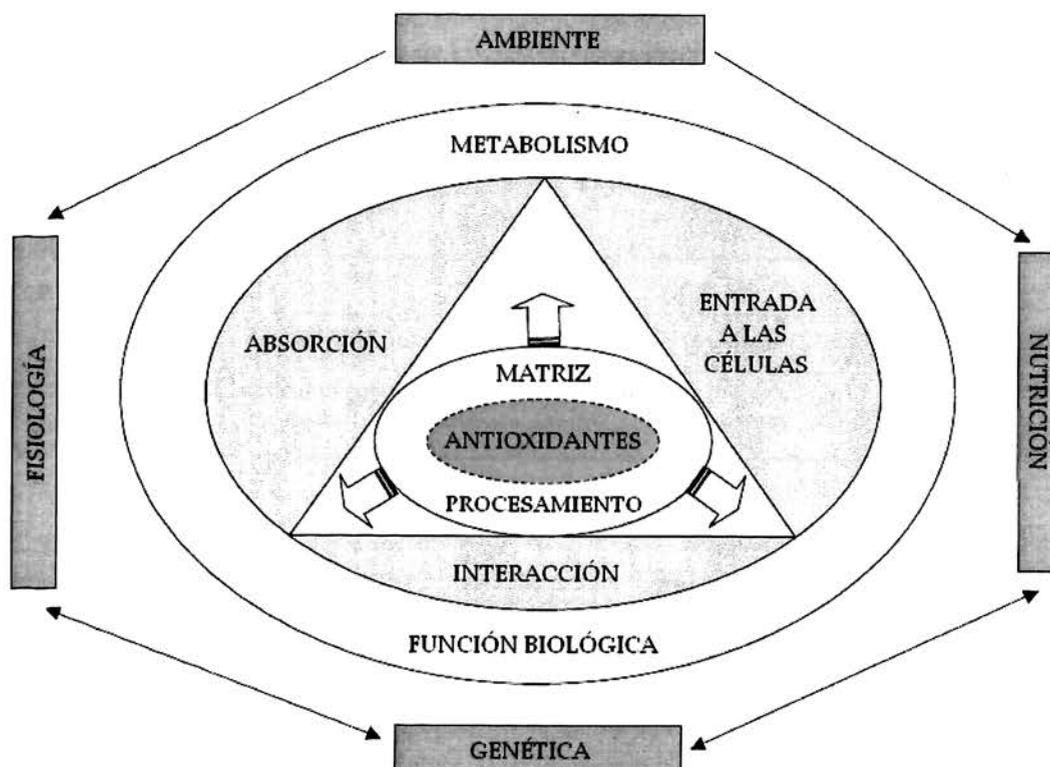
Tomado de: Singh *et al.* (2008).

### 2.3. Biodisponibilidad de los antioxidantes

La biodisponibilidad se define como la cantidad o porcentaje de un nutriente ingerido que es absorbido y por tanto, se encuentra disponible para el uso metabólico por el organismo (Nelson y Cox, 2004). En el estudio de los efectos biológicos de los antioxidantes, resulta indispensable considerar su biodisponibilidad, pues la forma que se encuentra en los alimentos no necesariamente es la misma que se encuentra en la sangre o tejidos objetivo, una vez que estos compuestos han sido digeridos, absorbidos y metabolizados (Liu

y Finley, 2005; Serrano *et al.*, 2007; Wolfe y Liu, 2007; Honzel *et al.*, 2008; Noguer *et al.*, 2008; Manach *et al.*, 2009).

Sin embargo, examinar la biodisponibilidad de los antioxidantes de un alimento representa un gran desafío, pues numerosos factores pueden influir e interactuar entre sí (figura 9).



**Figura 9.** Relación entre los factores que afectan la biodisponibilidad de los antioxidantes en los alimentos (Porrini y Riso, 2008).

Los principales factores que pueden afectar la biodisponibilidad de los antioxidantes se listan a continuación (Wang y Lin, 2000; Lee *et al.*, 2004; Liu y Finley, 2005; Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Porrini y Riso, 2008).

- **Relacionados con el antioxidante:** incluyendo estructura química, especie o forma del compuesto (estereoisometría por ejemplo), vínculo molecular (esterificación o glicosilación por ejemplo), concentración en el alimento, dosis de ingesta (cantidad y frecuencia), interacción con otros compuestos (por ejemplo antioxidantes con mecanismos similares de absorción).

- **Relacionados con el alimento y su preparación:** incluyendo la naturaleza de la matriz alimentaria (figura 10), procesamiento del alimento, presencia de efectores positivos de la absorción (por ejemplo proteína, lecitina y grasa), presencia de efectores negativos de la absorción (como la fibra y agentes quelantes), duración y condiciones del almacenamiento.
- **Relacionados con el hospedero:** que pueden subdividirse en factores intestinales (como secreción de HCl, actividad enzimática, tiempo de tránsito intestinal, microflora) y factores sistémicos (género, edad, estatus hormonal, genética, estado nutricional, condiciones fisiológicas, desórdenes y patologías).

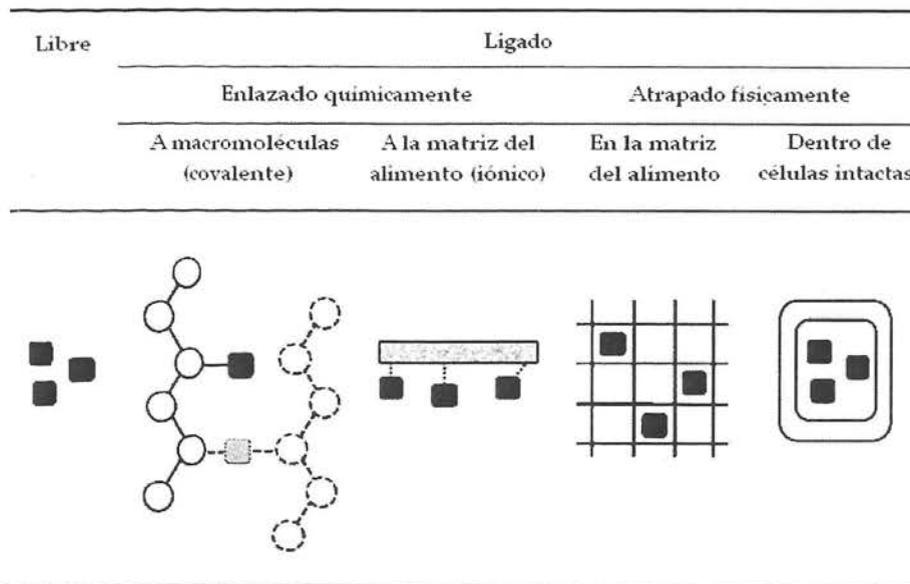


Figura 10. Posibles estados de los antioxidantes dentro de la microestructura de los alimentos (Modificado de Gökmen *et al.*, 2009).

Además, para ejercer su actividad biológica, la absorción y el metabolismo de los antioxidantes debe ser tomada en cuenta, ya que solo podrán ser disponibles aquellos compuestos liberados por la matriz alimentaria por acción de enzimas digestivas y la fermentación bacteriana en el colon (Serrano *et al.*, 2007; Cilla *et al.*, 2009).

Por otra parte, la interacción con otros componentes dentro del alimento frecuentemente va a afectar de manera compleja la biodisponibilidad de los

antioxidantes, ya que pueden darse múltiples tipos de efectos, como adición, sinergismo, mejoramiento, inhibición, enmascaramiento, neutralización o incluso oposición, causando un antagonismo competitivo en algún receptor, o bien “secuestrando” algún compuesto antioxidante (Jeffery, 2005).

Como referencia, se han identificado entre los compuestos no biodisponibles, polifenoles de alto peso molecular asociados a fibra dietaria o compuestos indigeribles de los alimentos (Noguer *et al.*, 2008). A manera de ejemplo, en un ensayo de laboratorio, al mezclar aceite de oliva con puré de tomate, el contenido de ácido ascórbico disminuyó después de unas horas de almacenamiento, debido a la capacidad de estos componentes de reducir las formas radicales del  $\alpha$ -tocoferol contenidas en la matriz lipídica (Nicoli *et al.*, 1999). De esta manera, con el estudio de componentes individuales usualmente no se obtienen los mismos resultados que con el estudio del alimento completo (Serrano *et al.*, 2007).

De manera complementaria, se ha observado que la absorción de licopeno de tomates frescos y de  $\beta$ -caroteno de zanahorias crudas, es significativamente menor que la observada a partir de jugo de tomate o zanahorias cocidas, pues el procesamiento térmico rompe los complejos carotenoide-proteína (Lee *et al.*, 2004). Asimismo, el ácido ascórbico, que en los alimentos se encuentra en un 80-90% en su forma reducida, se ha sugerido que se absorbe mejor en el intestino humano que en su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (Kim y Lee, 2004), que también posee función vitamínica.

## EL PROCESO DE DIGESTIÓN Y EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES

Con base en Scalbert *et al.* (2002) y Tarko *et al.* (2009), la digestión de los polifenoles en el organismo puede conllevar transformaciones en dichos compuestos en tres niveles principales (figura 11):

- A) Los productos absorbidos por el metabolismo intestinal son transportados en la sangre hasta el hígado, donde son modificados enzimáticamente.
- B) Algunos polifenoles y sus derivados son transportados desde el hígado a diferentes tejidos y a los riñones, donde ocurre una transformación subsecuente o son excretados en la bilis.

- C) Metabolitos polifenólicos que no son digeridos y absorbidos en el intestino delgado son metabolizados activamente por la microflora del intestino grueso.

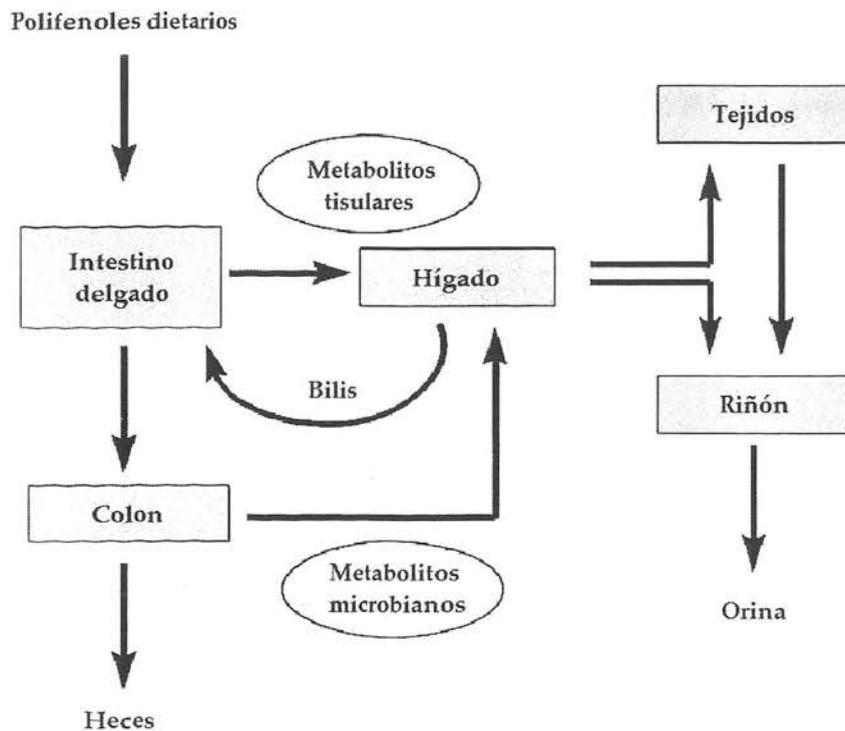


Figura 11. Posibles rutas de los polifenoles de la dieta y sus metabolitos en humanos (Modificado de Scalbert *et al.*, 2002).

En este sentido, los compuestos con actividad antioxidante son excretados o pueden ser metabolizados pero nunca alcanzan los tejidos objetivo, o incluso los compuestos activos pueden ser metabolitos derivados del antioxidante original encontrado en el alimento (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Manach *et al.*, 2009).

A manera de ejemplo se tienen los elagitaninos y el ácido elágico, compuestos fenólicos que han recibido mucha atención por su alta actividad antioxidante *in vitro* (Wang y Lin, 2000). Estos compuestos no son absorbidos como tales, sino que son metabolizados por la flora intestinal produciendo urolitinas, las cuales son detectadas en concentraciones importantes en el plasma, la orina y las heces, lo cual explica la razón de que en numerosos

estudios no se encuentren trazas de elagitaninos después del consumo de productos ricos en dichos compuestos (Cerdá *et al.*, 2005; Espín *et al.*, 2007).

La recuperación de compuestos antioxidantes particulares en orina y otros fluidos biológicos después de la ingestión, permite estudiar y comparar la biodisponibilidad de diferentes moléculas presentes en la dieta (Scalbert *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2005; Manach *et al.*, 2009). En la figura 12 se resumen los resultados obtenidos en varios estudios en humanos, en los cuales se evidencia que la cantidad de polifenoles intactos en la orina varía considerablemente de un tipo de compuesto a otro después de la ingestión.

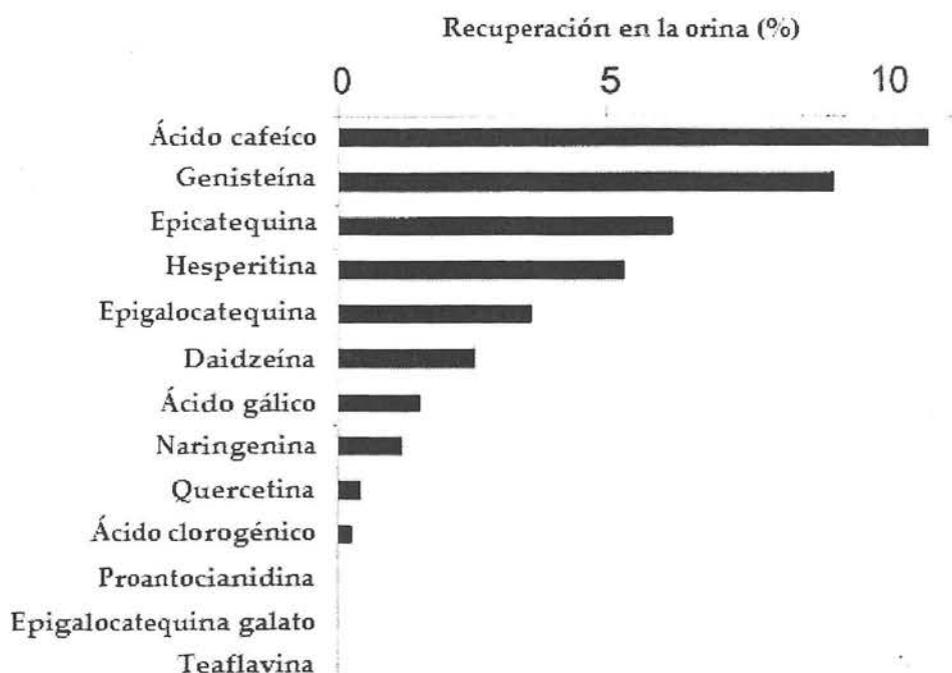


Figura 12. Porcentajes de recuperación de varios polifenoles dietarios en orina después del consumo de alimentos en humanos (Scalbert *et al.*, 2002).

Así mismo, Manach *et al.*, (2005), presentan una extensa revisión de 97 estudios realizados en humanos sobre la biodisponibilidad de los polifenoles. La mayoría de las investigaciones cubiertas en dicho trabajo, involucraron el suministro a voluntarios sanos de una dosis de polifenoles (compuestos puros, extractos de plantas o alimentos completos), con el consiguiente monitoreo de los niveles de polifenoles en plasma y orina. Las concentraciones en plasma de metabolitos totales oscilaron entre 0 y 4 mol/l, con una dosis suministrada de 50

mg de equivalentes de aglicona. La excreción relativa en orina osciló entre 0,3% y 43% de la dosis ingerida, en dependencia del polifenol. El ácido gálico y las isoflavonas fueron los polifenoles mejor absorbidos, seguidos por las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Los polifenoles con menor absorción fueron las pro-antocianidinas, las catequinas galoiladas del té y las antocianinas.

También resulta importante considerar el uso potencial del perfil antioxidante del plasma, como marcador del estrés oxidativo tanto en pacientes sanos como enfermos. A modo de referencia, Polidori y colaboradores (2001) realizaron un estudio con voluntarios sanos en Alemania, en el que se evaluó los perfiles en plasma de varios antioxidantes, incluyendo  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol,  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, retinol y ácido ascórbico. Al comparar sus resultados con los obtenidos por otros dos estudios similares realizados en Estados Unidos e Italia, se evidenció que los perfiles de antioxidantes en plasma en individuos sanos fueron bastante consistentes entre estudios, con algunas variaciones en los niveles de  $\gamma$ -tocoferol y licopeno, posiblemente debido a diferencias geográficas y dietarias.

Como se comentó en la sección inicial de este marco teórico, la eficacia de los sistemas de defensa antioxidante del ser humano tiende a disminuir debido a diversos factores como enfermedades, envejecimiento, contaminación ambiental o estilos de vida poco saludables. Esta aseveración también puede reflejarse con la evaluación del perfil antioxidante en plasma.

Retornando al estudio anterior, se encontró que la concentración de antioxidantes en plasma de pacientes con diabetes tipo 2, fue significativamente menor en comparación a los individuos sanos, independientemente de la masa corporal y el consumo dietario, evidenciándose un agotamiento paralelo de todos los antioxidantes lipofílicos evaluados en los individuos con dicho padecimiento (Polidori *et al.*, 2001).

En correspondencia con el caso anterior, a partir de diversos estudios clínicos en humanos, se evidencia que diferentes estados de salud se podrían asociar con perfiles específicos de antioxidantes en plasma:

- En pacientes con fibrosis quística, se ha evidenciado un marcado decrecimiento de los niveles de  $\beta$ -caroteno (Benabdeslam *et al.*, 1999).

- Al comparar individuos control con pacientes con enfermedad coronaria de corazón, se han detectado niveles significativamente menores de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol en las personas enfermas (Kontush *et al.*, 1999).
- En pacientes con cáncer de pulmón, se encontraron diferencias significativas al comparar con individuos control, evidenciándose niveles menores de criptoxantina, luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno en los pacientes enfermos, mientras que se detectaron niveles similares de  $\alpha$ -caroteno, ácido ascórbico, licopeno y  $\alpha$ -tocoferol entre ambos grupos (Comstock *et al.*, 1997).
- Respecto al fumado, se encontró que las concentraciones en plasma de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, criptoxantina y ácido ascórbico fueron significativamente menores en fumadores en comparación con personas que nunca habían fumado (Ross *et al.*, 1995).

De esta manera, esta herramienta podría ser un medio para valorar el “estatus antioxidante” de una población, dado que una evidencia indirecta de la absorción de los antioxidantes después del consumo de productos ricos en éstos, es precisamente un aumento en la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo (Polidori *et al.*, 2001; Scalbert *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2005).

#### **2.4. Determinación de la capacidad antioxidante**

Como se ha destacado en las secciones anteriores, los antioxidantes presentes en la dieta son imprescindibles para contrarrestar los efectos deletéreos de los radicales libres en la salud humana. Por esta razón, se han desarrollado diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos, incluyendo suplementos vitamínicos, extractos de productos naturales de plantas, animales, hongos y bacterias, e incluso plasma sanguíneo y otros fluidos biológicos (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Wolfe y Liu, 2007; Honzel *et al.*, 2008).

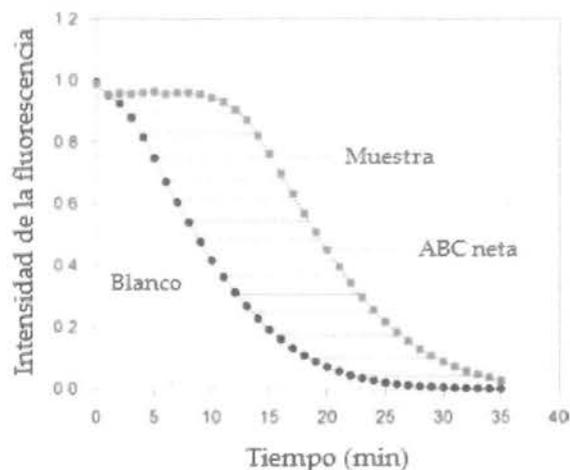
### 2.4.1. MÉTODOS QUÍMICOS

Con base en Huang *et al.* (2005) y Prior *et al.* (2005), en términos generales, los principales métodos químicos para evaluar capacidad antioxidante pueden agruparse en dos categorías:

- **Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)**, en los que se evalúa la capacidad de un antioxidante de neutralizar los radicales libres por la donación de hidrógeno. Ejemplos de este tipo de método son ORAC (*"Oxygen Radical Absorbance Capacity"*) y TRAP (*"Total Radical Trapping Antioxidant Parameter"*).
- **Métodos basados en la transferencia de un electrón sencillo (ET)**, en cuyo caso se detecta la capacidad de un antioxidante de transferir un electrón y reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales libres. Dentro de esta categoría se ubican métodos como TEAC (*"Trolox Equivalent Antioxidant Capacity"*), FRAP (*"Ferric-ion Reducing Antioxidant Parameter"*), DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) y la determinación de polifenoles totales con el reactivo Folin-Ciocalteu.

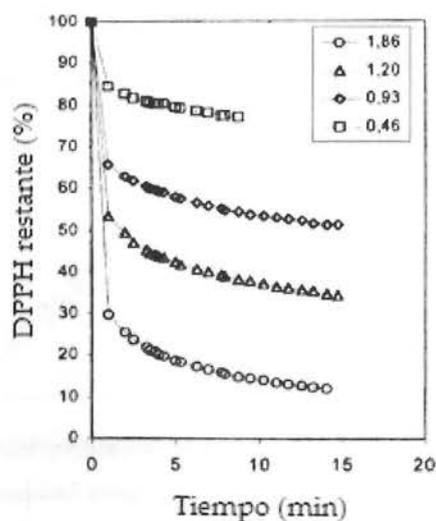
El método ORAC es quizá el más reconocido y utilizado a nivel mundial. Por otra parte, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos libera con cierta regularidad una base de datos de alimentos seleccionados, basada en los valores antioxidantes obtenidos con ésta metodología (USDA, 2010).

El ensayo ORAC evalúa la capacidad de los antioxidantes de inhibir la oxidación inducida por radicales peroxilo, lo que refleja la actividad antioxidante típica de interrupción de la cadena de reacciones de oxidación, por medio de la donación de un átomo de hidrógeno (Prior *et al.*, 2005). De manera resumida, en este método el radical peroxilo reacciona con un reactivo fluorescente, para formar un producto no fluorescente, el cual puede ser cuantificado fácilmente por fluorescencia. Dicha reacción se sigue a través de la pérdida de fluorescencia con el tiempo, por lo que el efecto protector del antioxidante puede ser calculado a partir del área neta bajo la curva de degradación de la fluorescencia (figura 13).



**Figura 13.** Ejemplo de la actividad antioxidante de una muestra evaluada por ORAC, expresada como el área neta bajo la curva (Prior *et al.*, 2005).

El DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados estables que existen, presenta un color morado profundo, y es la base del método de evaluación de la capacidad antioxidante que lleva ese nombre (Prior *et al.*, 2005). En términos generales, este método se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes hacia el DPPH, la cual se refleja en la pérdida de color del radical, y puede ser evaluada con la medición del descenso en la absorbancia a 515 nm (Huang *et al.*, 2005). De esta manera, se calcula el porcentaje de DPPH restante después del tratamiento con la muestra de interés, y dicho porcentaje será proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra (figura 14).



**Figura 14.** Ejemplo de cinéticas de decoloración del DPPH en presencia de diferentes concentraciones de un antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

## 2.4.2. MODELOS CELULARES

Los ensayos de actividad antioxidante total basados en reacciones químicas, no necesariamente reflejan las condiciones fisiológicas celulares, y no consideran la biodisponibilidad ni el metabolismo de los antioxidantes (Serrano *et al.*, 2007; Wolfe y Liu, 2007; Honzel *et al.*, 2008). En adición, los mecanismos de acción de los antioxidantes en la prevención de enfermedades, va más allá de su capacidad como simples neutralizadores de radicales libres (Liu y Finley, 2005).

En este sentido, al comparar la capacidad antioxidante de productos naturales por medio de ensayos químicos y modelos celulares, pueden presentarse diversas situaciones (figura 15):

- A) el producto presenta un alto valor antioxidante estimado por el método químico, pero no tiene la capacidad de proteger a las células del daño oxidativo, por lo que el valor antioxidante por el modelo celular es bajo.
- B) el producto muestra una alta protección de las células frente al daño oxidativo, por lo que el valor antioxidante es mucho más alto con el modelo celular del que se podría extrapolar del análisis químico.
- C) el producto presenta un valor antioxidante alto con ambas metodologías.

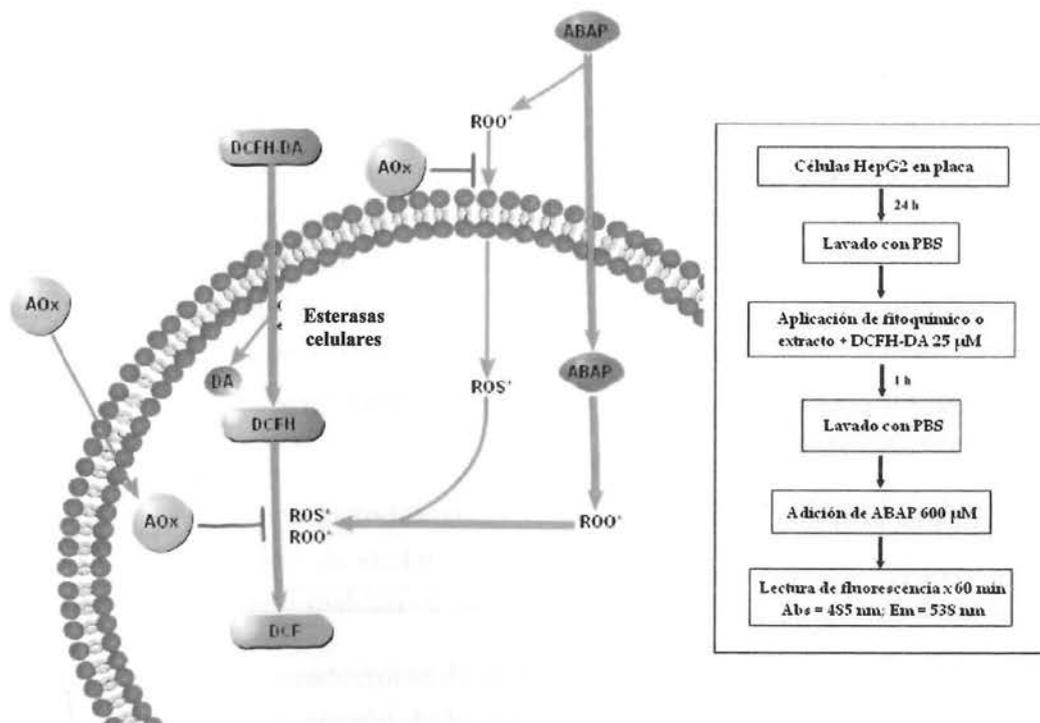


**Figura 15.** Posibles situaciones al comparar la capacidad antioxidante de un producto por métodos químicos y celulares (Honzel *et al.*, 2008).

Por tanto, se requieren métodos biológicos alternativos que permitan medir los niveles antioxidantes tanto en productos naturales como en muestras de sangre, antes y después del consumo de productos de interés. Esto implica sistemas celulares complejos o ensayos clínicos en pacientes enfocados en la capacidad antioxidante del suero, la peroxidación lipídica y otras mediciones fisiológicas asociadas (Honzel *et al.*, 2008).

Los estudios clínicos en humanos pueden resultar costosos y demandan mucho tiempo, mientras que los modelos celulares permiten un estudio rápido y bajo en costos (Liu y Finley, 2005). En dicho sentido, se espera que los modelos celulares *in vitro* representen más cercanamente la complejidad de los sistemas biológicos *in vivo* (Wolfe y Liu, 2007; Barreira *et al.*, 2008b; Chirinos *et al.*, 2008; Honzel *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

Un ejemplo de este tipo de ensayo es el método desarrollado por Wolfe y Liu (2007), llamado "Cellular Antioxidant Activity" (CAA por sus siglas en inglés), el cual emplea células HepG2, las cuales provienen de un hepatocarcinoma humano bien definido (figura 16).



**Figura 16.** Principio general del método CAA para evaluar actividad antioxidante celular (modificado de Wolfe y Liu, 2007).

En este método, las células son pretratadas con compuestos antioxidantes o extractos de alimentos (AOx) y DCFH-DA, un precursor de un tinte fluorescente. Los antioxidantes se asocian a la membrana celular o son internalizados a través de ésta hacia el interior de la célula. Por su parte, el DCFH-DA también se difunde al interior de la célula, donde esterasas celulares cortan el grupo diacetato generando el compuesto DCFH. Luego las células son tratadas con ABAP, el cual también se difunde a través de la membrana y se descompone espontáneamente para generar radicales peroxilo. Estos radicales oxidan el DCFH intracelular a su forma fluorescente DCF. En este punto, los antioxidantes previenen la oxidación del DCFH y de esta manera se reduce la formación del compuesto fluorescente (Wolfe y Liu, 2007).

Además de células cancerígenas, también se han empleado otros tipos celulares para la evaluación de actividad antioxidante. En dicho sentido, el uso de eritrocitos (glóbulos rojos) para evaluar la capacidad de protección de una sustancia frente al estrés oxidativo es biológicamente relevante, ya que estas células cumplen un papel crítico en la protección antioxidante en la sangre (Simon *et al.*, 1998; Buehler y Alayash, 2005; Lexis *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Kunwar *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008; Honzel *et al.*, 2008).

Se ha reportado que en individuos con enfermedades cardiovasculares, los mecanismos de defensa antioxidante de los eritrocitos se encuentran deteriorados (Simon *et al.*, 1998). Además, aunque la deficiencia de vitamina E en humanos es poco frecuente, el principal efecto que se ha reportado es un aumento en la fragilidad de los eritrocitos (Nelson y Cox, 2004). El daño oxidativo a estas células también se ha señalado como la causa principal para el desarrollo de diversas hemoglobinopatías, como la anemia (Yang *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2008), así como en el envejecimiento celular natural (Magalhães *et al.*, 2009).

En términos de una metodología basada en glóbulos rojos para evaluar la capacidad antioxidante de sustancias destacadas, los eritrocitos presentan una serie de ventajas que respaldan su utilización:

- Son células vivas, productoras de energía y constituyen el tipo de célula más abundante en la circulación de la sangre (Buehler y Alayash, 2005; Honzel *et al.*, 2008).

- La habilidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el plasma, representa una protección directa de nuestro organismo a nivel antioxidante y antiinflamatorio (Konukoglu *et al.*, 1998; Lexis *et al.*, 2006).
- Al no poseer mitocondrias, el ensayo no es afectado por la producción interna de especies reactivas de oxígeno por parte de estas organelas (Buehler y Alayash, 2005; Magalhães *et al.*, 2009).
- La mayoría de las enzimas que intervienen en reacciones de óxido-reducción (*Redox*) y que están presentes en las células sanguíneas (principales responsables de los mecanismos de defensa antioxidante) son las mismas que se encuentran en células polimorfonucleares (Buehler y Alayash, 2005).
- Su membrana es rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy susceptibles a la peroxidación mediada por radicales libres, y es representativa de la membrana plasmática en general (Kunwar *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009).
- Son células fáciles de recolectar, manejar y preservar bajo refrigeración y sin necesidad de antibióticos o preservantes químicos, evitándose así las laboriosas etapas de cultivo celular (Honzel *et al.*, 2008).

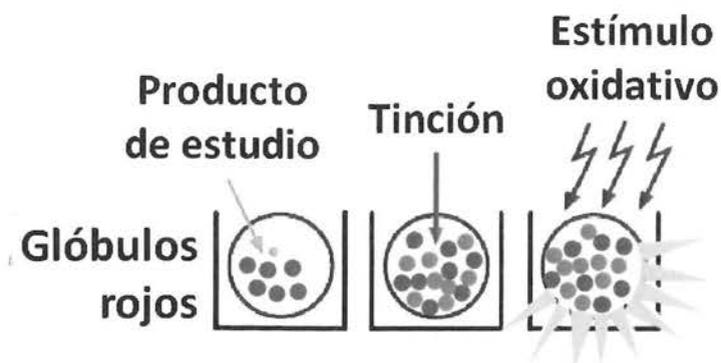
Los eritrocitos ya han sido utilizados para la evaluación indirecta de la capacidad antioxidante, por medio de la determinación del nivel de inhibición de la hemólisis causada por radicales libres peroxilo (Bureau *et al.*, 2005; Kunwar *et al.*, 2007; Tang y Liu, 2007; Barreira *et al.*, 2008a; Barreira *et al.*, 2008b; Takebayashi *et al.*, 2008).

Las membranas de los eritrocitos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y proteínas, ambos tipos de compuestos son susceptibles a la oxidación mediada por radicales libres, lo que conduce a daño en la membrana y la consecuente liberación de hemoglobina (Celedon *et al.*, 2001a; Celedon *et al.*, 2001b; Lahet *et al.*, 2008). Por consiguiente, la hemólisis ha sido evaluada tradicionalmente por medio de lecturas espectrofotométricas a 540 nm de la hemoglobina liberada, después de la centrifugación para remover células lisadas y fragmentos insolubles. Cuando están presentes compuestos antioxidantes, éstos neutralizan los radicales peroxilo, convirtiéndolos en especies no reactivas y de esta

manera, inhiben la hemólisis y consecuente liberación de hemoglobina (Kunwar *et al.*, 2007).

Una mejora reciente de los ensayos de inhibición de la hemólisis empleando eritrocitos es el método llamado “*Cell-based Antioxidant Protection in erythrocytes*” o CAP-e por sus siglas en inglés (figura 17).

En este ensayo, los eritrocitos son incubados con un precursor de un tinte fluorescente, y luego son expuestos a radicales peroxilo. El precursor del tinte penetra las células y se torna fluorescente cuando es sometido a daño oxidativo. En consecuencia, la intensidad de la fluorescencia refleja el grado del daño oxidativo. Este método no requiere centrifugación antes de realizar las lecturas de fluorescencia y puede ser semiautomatizado para la determinación de la actividad antioxidante celular. Sin embargo, este ensayo es en gran medida cualitativo, aunque se han realizado algunas comparaciones semicuantitativas con estándares de antioxidantes (Honzel *et al.*, 2008). Además, la valoración de la capacidad antioxidante está basada esencialmente en la habilidad de oxidar el precursor del tinte, mientras que los eritrocitos solo hospedan la reacción.



**Figura 17.** Principio general del método CAP-e para evaluar protección antioxidante celular (modificado de Honzel *et al.*, 2008).

## **2.5. El procesamiento térmico y la actividad antioxidante**

Considerando los numerosos beneficios para la salud con el consumo de antioxidantes naturales, la calidad nutricional de los alimentos procesados es de gran interés para la industria alimentaria. En este sentido, el procesamiento

térmico es una de las tecnologías más utilizadas para garantizar la seguridad microbiológica de los productos (Christen y Smith, 2000; Damodaran *et al.*, 2008). Particularmente, las frutas son productos altamente perecederos que son tratados térmicamente para ayudar a su preservación, además de ser ampliamente procesados en jugos, batidos o concentrados, además de ser comercializados deshidratados o enlatados, sea enteros o en trozos (Rawson *et al.*, 2011).

El procesamiento térmico puede ser alcanzado con una variedad de técnicas: a) empleando agua caliente o vapor, como en la cocción, escaldado, pasteurización, esterilización, evaporación o extrusión; b) con aire caliente, por ejemplo en el horneado, asado o secado; c) por medio de aceite caliente, en el caso de la fritura; y d) aplicando energía irradiada, que incluye microondas, radiación infrarroja o radiación ionizante (Ramaswamy y Marcotte, 2006).

### 2.5.1. PASTEURIZACIÓN

La pasteurización es un tratamiento térmico moderado, en el que los alimentos son calentados a temperaturas menores a 100 °C (Christen y Smith, 2000; Damodaran *et al.*, 2008). En alimentos de baja acidez ( $\text{pH} > 4,5$  como la leche), este proceso se aplica para destruir especies microbianas vegetativas seleccionadas (principalmente patógenos) y extender la vida útil del producto; mientras que en alimentos ácidos ( $\text{pH} < 4,5$  por ejemplo frutas), la pasteurización se utiliza para extender la vida útil del producto por destrucción de microorganismos de deterioro (mohos y levaduras) y/o por inactivación de enzimas (Fellows, 2000).

Debido a que este proceso no elimina todas las bacterias vegetativas, sobre todo las formadoras de esporas, los alimentos pasteurizados deben ser contenidos y almacenados bajo condiciones de refrigeración, con o sin aditivos químicos o en empaques con atmósfera modificada, de manera que se minimice el crecimiento microbiano (Ramaswamy y Marcotte, 2006).

La severidad del tratamiento térmico y la duración del almacenamiento, dependen de la naturaleza del producto, las condiciones de pH, la resistencia térmica de los microorganismos o enzimas objetivo, la sensibilidad del

producto, y la forma de aplicación del calor (Fellows, 2000). Algunas de estas condiciones son resumidas en el cuadro 2.

La mayoría de las operaciones industriales de pasteurización que involucran líquidos (leche, productos lácteos, cerveza, jugos de fruta, huevo líquido, entre otros), son llevadas a cabo en intercambiadores de calor continuos, en los cuales la temperatura del producto es elevada rápidamente al nivel de pasteurización en un primer intercambiador de calor, luego se mantiene por el período de tiempo requerido en tubos contenedores, y finalmente es enfriado rápidamente en un segundo intercambiador de calor. En el caso de fluidos viscosos, usualmente se emplea un intercambiador de calor de barrido de superficie (SSHE por sus siglas en inglés), para promover la rápida transferencia de calor y también prevenir problemas por acumulación de producto (Ramaswamy y Marcotte, 2006).

**Cuadro 2.** Propósito de la pasteurización en algunos alimentos.

Alimento	Objetivo principal	Objetivo secundario	Condiciones mínimas de proceso
Jugo de fruta	Inactivación de enzimas (pectinesterasa y poligalacturonasa).	Destrucción de microorganismos de deterioro (levaduras y hongos).	65 °C x 30 min. 77 °C x 1 min. 88 °C x 15 s.
Cerveza	Destrucción de microorganismos de deterioro (levaduras nativas, especies de <i>Lactobacillus</i> y levaduras residuales como especies de <i>Saccharomyces</i> ).	---	65-68 °C x 20 min.
Leche	Destrucción de patógenos ( <i>Brucella abortis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Coxiella burnettii</i> ).	Destrucción de microorganismos y enzimas de deterioro.	63 °C x 30 min. 71,5 °C x 15 s.
Huevo (líquido)	Destrucción de patógenos ( <i>Salmonella seftenburg</i> ).	Destrucción de microorganismos de deterioro.	64,4 °C x 2,5 min. 60 °C x 3,5 min.
Helados	Destrucción de patógenos.	Destrucción de microorganismos de deterioro.	65 °C x 30 min. 71 °C x 10 min. 80 °C x 15 s.

Modificado de: Ramaswamy y Marcotte (2006).

## 2.5.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LOS ALIMENTOS

Las operaciones de procesamiento de los alimentos, particularmente el tratamiento térmico, se consideran responsables de la degradación de las propiedades nutricionales naturales de los alimentos (Nicoli *et al.*, 1999; Christen y Smith, 2000; Damodaran *et al.*, 2008). El cuadro 3 resume los efectos del tratamiento térmico reportados en distintas investigaciones con frutas, en el cual se puede apreciar una reducción de los niveles de compuestos bioactivos en la mayoría de los casos.

Uno de los cambios más importantes que puede producirse con el tratamiento térmico es el movimiento de agua y sólidos en el alimento (Christen y Smith, 2000). De esta manera, en especial en productos acuosos, como resultado de un tratamiento con calor puede ocurrir dilución, deshidratación o pérdida de sólidos totales, lo cual puede relacionarse directamente con la disminución de nutrientes (Damodaran *et al.*, 2008).

A nivel molecular, pueden ocurrir diversas reacciones durante el tratamiento térmico de los alimentos: desnaturalización de proteínas, oxidación lipídica, transformación de compuestos menores (como las vitaminas), y reacciones que involucran aminoácidos libres o asociados a proteínas, como es la reacción de Maillard (Arnoldi, 2002).

Las vitaminas constituyen uno de los componentes de los alimentos más sensibles al deterioro por la esterilización con calor (Fellows, 2000; Arnoldi, 2002; Ramaswamy y Marcotte, 2006). Los mecanismos de degradación de vitamina C en los alimentos pueden seguir una vía aeróbica (reacciones dependientes de oxígeno), o una vía anaeróbica (Fellows, 2000). Estas dos vías presentan productos intermedios de degradación difíciles de distinguir por análisis químicos, pero ambas conducen a la formación de ácido dehidroascórbico, el cual por degradación posterior (reacción irreversible) forma el ácido 2,3-diketogulónico, carente de actividad de vitamina C (Rawson *et al.*, 2011).

La estabilidad de las vitaminas varía según distintas condiciones (matriz y tipo de operación de procesamiento), siendo la vitamina C y la tiamina las más susceptibles a la degradación por acción del calor (Damodaran *et al.*, 2008). Por

su parte, las vitaminas liposolubles son las más estables, aunque pueden ser degradadas mediante oxidación, en especial cuando son calentadas; por tanto, las pérdidas de vitaminas y, por ende, del valor nutritivo y posible actividad antioxidante, pueden ser considerablemente mayores durante un tratamiento térmico prolongado (Christen y Smith, 2000).

Los carotenoides son compuestos bioactivos sensibles al oxígeno, calor y luz, y su estabilidad puede ser influenciada por el proceso de pasteurización (Damodaran *et al.*, 2008). Adicionalmente, la exposición al tratamiento térmico puede inducir isomerización de los carotenoides, lo cual adquiere relevancia, por el hecho de que se ha reportado que las configuraciones *cis* presentan mayor capacidad antioxidante que las formas originales de dichos compuestos (Rawson *et al.*, 2011).

A manera de ejemplo, en un estudio sobre el efecto del calentamiento sobre los carotenoides del jugo de marañón (Zepka y Mercadante, 2009), se registró un descenso en los niveles de los carotenoides *trans*, acompañado de un incremento de los isómeros *cis* y de productos de oxidación, conforme aumentaba la temperatura y el tiempo de tratamiento. Además, se detectó la formación de compuestos no coloreados, dado que el incremento de isómeros *cis* y de productos de oxidación no compensó las pérdidas del contenido total de carotenoides. El calentamiento también condujo a pérdidas significativas de luteína y violaxantina (Zepka y Mercadante, 2009).

Además de la pérdida de color, los compuestos originados por la oxidación de los carotenoides pueden presentar efectos perjudiciales *in vivo*, a través de la generación de estrés oxidativo, inducción de citotoxicidad e inhibición de los mecanismos de comunicación intercelular (Rawson *et al.*, 2011).

Por su parte, las antocianinas constituyen uno de los pigmentos más lábiles en la industria alimentaria (Wrolstad *et al.*, 2005; Damodaran *et al.*, 2008). La temperatura y el pH constituyen dos factores que afectan enormemente la estabilidad de las antocianinas, presentándose la mayor inestabilidad a pH bajo y temperaturas elevadas (Wrolstad *et al.*, 2005). Con relación a su estructura, se ha observado que antocianinas altamente hidroxiladas presentan la mayor susceptibilidad a estos dos factores, mientras que aquellas con mayor metilación presentan mayor estabilidad (Damodaran *et al.*, 2008).

**Cuadro 3.** Efecto del procesamiento térmico en el contenido de compuestos bioactivos de algunas frutas exóticas.

Fruta	Presentación	Condiciones	Parámetros afectados
Açaí	Puré	Tratamiento a 80 °C x 1, 5, 10, 30 o 60 min.	↓ Antocianinas ↔ Otros polifenoles
Piña	Cubos	Escaldado a 70, 85 o 100 °C x 2, 4, 6, 8, 10 o 12 min. Secado a 65 °C x 5-6 h.	↓ Carotenoides ↓ Antocianinas
	Jugo	Tratamiento a 55-85 °C x 80 min.	↑ Hidroximetilfurfural ↓ Carotenoides
Papaya	Cubos	Escaldado a 70, 85 o 100 °C x 2, 4, 6, 8, 10 o 12 min. Secado a 65 °C x 5-6 h.	↓ Carotenoides ↓ Antocianinas
	Fruto	Enlatado a 95 °C x 45 min.	↓ Ácido ascórbico ↓ Caroteno
Guayaba	Trozos	Secado a 30, 40 o 50 °C.	↓ Ácido ascórbico
	Puré	Secado a 43.79, 50, 65, 80 o 86.21 °C x 4-6 h.	↓ Licopeno ↓ Capacidad antioxidante
Mango	Fruto	Tratamiento con agua a 46.1 °C x 75 min.	↔ Ácido gálico ↔ Capacidad antioxidante
	Fruto	Inmersión en agua a 46 o 50 °C x 30 o 75 min.	↔ Carotenoides totales ↔ Ácido ascórbico
	Fruto	Escaldado a 80 °C x 5 min. Enlatado a 95 °C x 35 min.	↓ Ácido ascórbico ↓ Caroteno
	Puré	Tratamiento a 85 o 93 °C x 16 min.	↓ Vitamina A ↓ Polifenol oxidasa
	Trozos	Secado con aire caliente a 60 °C x 20 h.	↓ Carotenoides totales
Mora	Extracto del fruto	Almacenado a 70 °C x 10 h.	↓ Antocianinas totales ↓ Ácido ascórbico
Tomate de árbol	Néctar	Pasteurizado a 80, 90 o 95 °C x 10 min.	↓ Ácido ascórbico ↔ Carotenoides totales
Acerola	Jugo/pulpa	Pasteurizado industrial.	↓ Quercetina ↓ Kaempferol
Marañón	Jugo	Tratado a 90 °C x 1, 2 o 4 h.	↓ Xantófilas ↑ Isómeros <i>cis</i> carotenoides
	Jugo/pulpa	Pasteurizado industrial.	↓ Quercetina ↓ Kaempferol ↓ Miricetina
Pitanga	Jugo/pulpa	Pasteurizado industrial.	↓ Quercetina ↓ Kaempferol ↓ Miricetina

**Simbología:** ↓=decrecimiento, ↑=aumento, ↔=sin cambios. **Modificado de:** Rawson *et al.* (2011).

En resumen, los principales efectos sobre las propiedades antioxidantes intrínsecas de los alimentos debido al tratamiento térmico, se pueden agrupar en tres clases principales (cuadro 4), dichos efectos se detallan seguidamente.

**Cuadro 4.** Cambios en la actividad antioxidante global de los alimentos debido al tratamiento térmico en operaciones de procesamiento y preservación.

Efecto	Posibles fenómenos asociados
Sin cambios	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La concentración de los antioxidantes naturales del alimento se mantiene inalterada.</li> <li>- La pérdida de antioxidantes naturales es balanceada por la formación simultánea de compuestos con propiedades antioxidantes nuevas o mejoradas.</li> </ul>
Aumento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mejoramiento de las propiedades antioxidantes de los compuestos naturales del alimento.</li> <li>- Formación de compuestos nuevos con actividad antioxidante.</li> </ul>
Disminución	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pérdida de los antioxidantes naturales del alimento.</li> <li>- Formación de compuestos nuevos con actividad pro-oxidante.</li> </ul>

Fuente: Nicoli *et al.* (1999).

- **Ausencia de efecto:** como el caso de los carotenoides licopeno y  $\beta$ -caroteno, que se ha encontrado son muy estables a tratamientos térmicos intensos y prolongados (Lee *et al.*, 2004).
- **Pérdida de antioxidantes naturales:** algunas vitaminas hidrosolubles como el ácido ascórbico son susceptibles a pérdidas considerables por el tratamiento térmico (Damodaran *et al.*, 2008). Las antocianinas también son particularmente sensibles a la degradación por tratamientos térmicos (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Cisse *et al.*, 2009). Además, puede darse pérdida de polifenoles en alimentos tratados con calor, por su consumo como reactantes en la reacción de Maillard (Nicoli *et al.*, 1999).
- **Mejoramiento de las propiedades antioxidantes:** algunos polifenoles exhiben mayores propiedades de "captación" de radicales libres en estados intermedios de oxidación, como el caso de la catequina (Nicoli *et al.*, 1999). Asimismo, gracias a la inactivación térmica de la polifenol oxidasa, en jugo de arándano se reporta un incremento en la actividad antioxidante (Rossi *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha demostrado que el procesamiento térmico aumenta la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad del licopeno en

pastas de tomate, principalmente debido a una mayor liberación de licopeno de la matriz celular (Dewanto *et al.*, 2002).

- **Formación de compuestos nuevos con actividad antioxidante:** los productos de la reacción de Maillard, que pueden formarse como consecuencia de los tratamientos térmicos, pueden exhibir propiedades antioxidantes fuertes, como ocurre en el caso del té o el tostado del café (Nicoli *et al.*, 1999). En el caso del café, se ha demostrado que los productos de la reacción de Maillard son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de las infusiones de café, sobrepasando a la cafeína y los ácidos clorogénicos (Liu y Kitts, 2011).
- **Formación de compuestos nuevos con actividad pro-oxidante:** además de las destacadas propiedades antioxidantes reportadas en la literatura, los productos de la reacción de Maillard también pueden exhibir propiedades pro-oxidantes, principalmente en las etapas iniciales de la reacción, donde se forman radicales altamente reactivos relacionados con el desarrollo de pardeamiento del alimento (Nicoli *et al.*, 1999).

Resulta importante considerar que las reacciones mencionadas anteriormente, podrían ocurrir de manera simultánea en una matriz alimentaria sometida a un tratamiento térmico, tal como se ejemplifica en la figura 18.

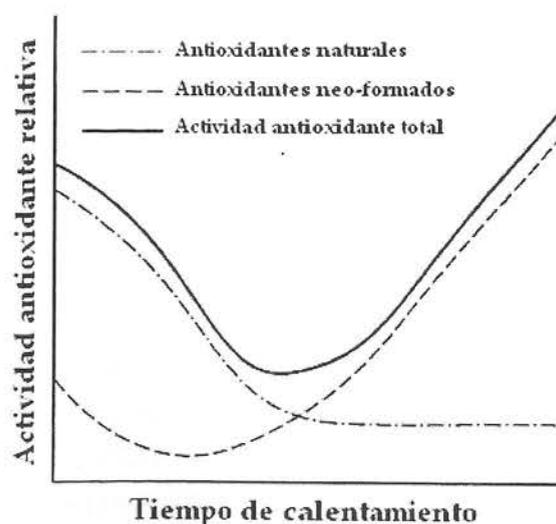


Figura 18. Cambios en la actividad antioxidante global debido a eventos diferentes y simultáneos en una matriz alimentaria sometida a calentamiento (Nicoli *et al.*, 1999).

# 3 METODOLOGÍA

---

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Química y la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), así como en el Laboratorio de Investigación General de la Facultad de Farmacia, ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica (UCR). Las actividades fueron financiadas dentro del marco del convenio de cooperación suscrito entre el CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*) de Francia y el CITA.

## **3.1. Desarrollo y validación de un ensayo para evaluar la actividad antioxidante celular en glóbulos rojos humanos**

### **3.1.1. REACTIVOS**

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO): quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ , PM 302,24), catequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ , PM 290,3), ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ , PM 170,1), ácido tánico ( $C_76H_{52}O_{46}$ , PM 1701,2), ácido clorogénico ( $C_{16}H_{18}O_9$ , PM 354,31), ácido ascórbico, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,9-tetrametilcroman-2-carboxílico) y los reactivos necesarios para preparar solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). El ácido elágico ( $C_{14}H_6O_8$ , PM 302,19) fue comprado a Fluka Biochemika (Buchs, Suiza) y el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) fue adquirido de Wako Chemicals USA Inc. (Richmond, VA).

### **3.1.2. JUGOS DE FRUTA Y BEBIDAS**

La actividad antioxidante fue evaluada directamente en un jugo clarificado de mora tropical de montaña (*Rubus adenotrichus* Schltdl.), el cual fue obtenido según lo descrito por Soto (2010). Dos jugos clarificados comerciales de manzana y uva también fueron evaluados directamente. El jugo pulposo de naranja se obtuvo por prensado manual de los frutos, y luego se realizó una extracción con acetona/agua (70:30 v/v) para obtener un extracto empleado en la determinación de la actividad antioxidante. Café costarricense (4 g de granos de café tostado molido) y té amarillo (2 g de hojas secas), adquiridos en un

supermercado local, fueron macerados con 400 y 200 ml (respectivamente) de agua hirviendo durante 10 min; luego se filtró una alícuota a través de un filtro de jeringa (0,45  $\mu\text{m}$ ) antes de utilizarlos para las pruebas.

### **3.1.3. PLASMA SANGUÍNEO**

Muestras de sangre en ayuno fueron tomadas de 5 voluntarios sanos que participaron en un estudio clínico previo (no publicado todavía). Su salud fue confirmada de acuerdo con criterios comunes, utilizando pruebas clínicas de laboratorio y cuestionarios de historial médico. Previo a la colección de la sangre, todos los sujetos siguieron un período de estandarización de su alimentación de 3 días, el cual consistió en una dieta controlada con bajo consumo de antioxidantes dietarios. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa antecubital, fueron centrifugadas inmediatamente a 12000 g por 3 min y el sobrenadante fue almacenado en tubos eppendorf a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La aprobación ética del estudio se obtuvo del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica, y los sujetos fueron informados y firmaron un consentimiento por escrito antes de participar en el estudio.

### **3.1.4. OBTENCIÓN DE LOS ERITROCITOS (GLÓBULOS ROJOS)**

Un banco de sangre proporcionó muestras de sangre humana de donadores sanos, después de expirada la vida útil (30 días después de la colecta), la cual se mantuvo almacenada a  $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Solo se utilizó sangre O-Rh positivo, aunque otros grupos sanguíneos fueron probados exitosamente. La sangre con anticoagulante CPDA fue lavada 5 veces con solución de PBS ( $\text{NaCl}$  150 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,9 mM, pH 7,4) y centrifugada por 5 min a 1300 g para remover todo el plasma residual y leucocitos. El residuo fue re-suspendido y centrifugado por 10 min a 1300 g. Los eritrocitos concentrados fueron re-dispersados en PBS para obtener una suspensión al 2% (v/v), la cual fue utilizada inmediatamente para la medición de la actividad antioxidante.

### **3.1.5. IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR EN ERITROCITOS (ERYCA)**

Alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de la solución de PBS con los eritrocitos suspendidos fueron adicionadas a los pozos de una microplaca transparente, de fondo plano, de 96 pozos (Costar 9018, Corning Inc., Corning, NY). La concentración final de los eritrocitos en los pozos fue de 0,4%, cerca de  $(1,8 \pm 0,2) \times 10^7$  células/ml, correspondiente a una absorbancia ( $A_0$ ) a 700 nm de alrededor de 1 ( $A_0 = 1,0 \pm 0,2$ ). Solo se emplearon los 60 pozos en el centro de la placa, los pozos externos fueron llenados con agua destilada para prevenir efectos de borde. Todos los estándares de antioxidantes, jugos de frutas, bebidas o plasma sanguíneo fueron diluidos en PBS para realizar el ensayo, y a cada pozo se adicionó un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de solución conteniendo cada uno de estos.

La placa fue cargada en un espectrofluorómetro automático de placas (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT), la cual se mantuvo a  $(37,0 \pm 0,4)$  °C con agitación suave durante 30 s. El espectrofotómetro fue programado para transferir al tiempo 0, 100  $\mu\text{l}$  de una solución de AAPH (para alcanzar una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ ) a cada pozo. Seguidamente, la turbidez de la solución fue monitoreada al registrar cada 5 min, el descenso en la absorbancia ( $A_t$ ) a 700 nm. Antes de cada lectura, el equipo se programó para que agitara suavemente la placa por 15 s. Los análisis típicamente tardaron un promedio de 5 h, hasta que las lecturas de absorbancia fueran  $< 10\%$  de la absorbancia inicial y no se registraran más cambios a partir de este punto.

El efecto protector de los antioxidantes fue medido al evaluar el área bajo la curva de degradación de la absorbancia (ABC) de una muestra en comparación con el blanco PBS/AAPH, el cual no recibió ningún compuesto antioxidante. La quercetina fue empleada como estándar para la curva de calibración, la cual fue completada por duplicado. Las muestras fueron analizadas por sextuplicado. El valor ABC fue estimado por medio de una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA), siguiendo la ecuación 1:

$$ABC = 1 + A_1/A_0 + A_2/A_0 + A_3/A_0 + A_4/A_0 + \dots + A_t/A_0 + \dots + A_f/A_0 \quad (1)$$

donde  $A_0$  es la absorbancia inicial al tiempo 0 min,  $A_t$  es la absorbancia al tiempo t y  $A_f$  es la absorbancia final. La acción de los radicales libres fue seguida hasta su finalización para todas las soluciones, registrando el descenso en la absorbancia desde el valor promedio inicial de  $A_0$ , donde  $A_0 = 1,0 \pm 0,2$ , hasta la absorbancia  $A_f$ , cuando  $A_f/A_0$  fuera al menos  $< 0,1$ .

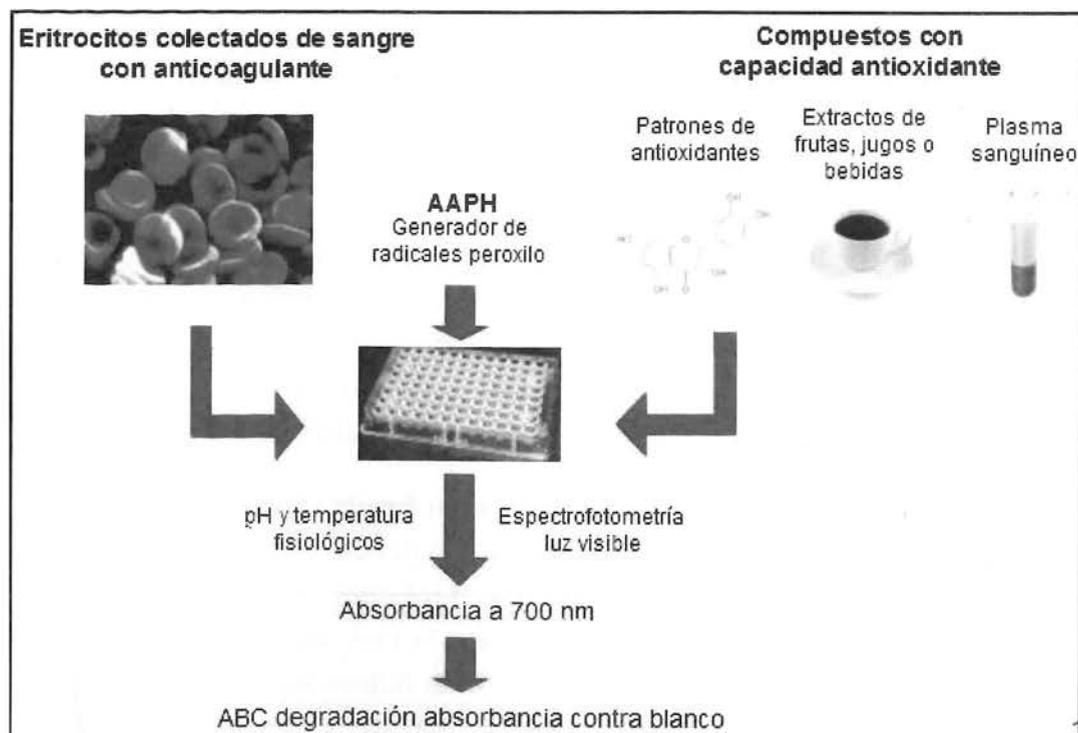
Los valores finales de ERYCA fueron calculados al emplear una ecuación de regresión lineal entre las concentraciones de quercetina y el  $ABC_{neta}$  ( $ABC_{neta\ muestra} = ABC_{muestra} - ABC_{AAPH}$ ), como se expresa en la ecuación 2:

$$ABC_{neta\ quercetina} = a \times (\text{molaridad}_{quercetina}) + b \quad (2)$$

Concentraciones de quercetina de 3, 6, 10, 16 y 24  $\mu\text{M}$  fueron utilizadas como estándares de calibración. Coeficientes de regresión ( $r^2$ ) de  $> 0,98$  fueron obtenidos y la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de equivalentes de quercetina (EQ) fue calculada para cada  $ABC_{neta}$  de las muestras como se muestra en la ecuación 3:

$$\mu\text{M EQ} = (ABC_{neta\ muestra} - b) / a \quad (3)$$

Los valores de ERYCA fueron expresados en términos de micromoles de equivalentes de quercetina por micromol de compuesto puro o litro de jugo, bebida o plasma. Todas las muestras se evaluaron por sextuplicado con dos extractos independientes, y la curva patrón por duplicado. En la figura 19 se presenta un resumen esquemático de la metodología desarrollada. Este método se encuentra respaldado por una publicación científica (González *et al.*, 2010).



**Figura 19.** Esquema general del procedimiento del método ERYCA desarrollado para la presente investigación.

### 3.1.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ERYCA

A partir de la metodología descrita en la sección anterior se definieron diversos factores:

- **Fórmula de la solución de fosfatos (PBS) y preparación de los eritrocitos**

Se realizó una revisión bibliográfica extensa de publicaciones científicas con ensayos en los que se emplean glóbulos rojos, para determinar la composición apropiada del amortiguador de fosfatos (PBS), así como el procedimiento de preparación de los eritrocitos (número de lavados, velocidad y tiempo de centrifugación y concentración de la suspensión final).

- **Tipo de sangre y tiempo máximo de utilización después de su colecta**

Se llevaron a cabo más de 22 ensayos con diferentes muestras de antioxidantes (patrones, jugos y extractos de frutas) empleando eritrocitos provenientes de sangre de todos los tipos sanguíneos posibles y distintos donadores, desde 30 a 60 días después de su toma. Se valoró tanto la precisión y exactitud de los resultados de ERYCA obtenidos, así como el comportamiento de la sangre durante el procedimiento de lavado y centrifugación de la sangre.

- **Concentración final apropiada de eritrocitos y AAPH para el análisis**

Se realizó una revisión bibliográfica extensa de publicaciones científicas con ensayos en los que se evalúa actividad antioxidante celular, para determinar las concentraciones apropiadas de cada componente del ensayo. Complementariamente, se realizaron al menos 16 pruebas diferentes en las que se varió la concentración final de eritrocitos y AAPH en las placas de reacción. Los resultados fueron evaluados a la luz de la precisión y exactitud de los valores de actividad antioxidante obtenidos, el coeficiente de correlación de las curvas patrón, el tiempo total de análisis y el tiempo registrado para el descenso de la absorbancia en el blanco (eritrocitos con AAPH solamente).

- **Determinación de la absorbancia**

Se consultó en la literatura la longitud de onda apropiada para la determinación de la capacidad antioxidante en los eritrocitos bajo las condiciones propuestas para el ensayo. Asimismo, se realizaron al menos 6 ensayos en los que se evaluó el efecto protector de diferentes sustancias con potencial antioxidante a 540, 650 y 700 nm. Los resultados fueron valorados tomando en consideración las cinéticas de reacción, los coeficientes de

correlación de los antioxidantes probados frente al tiempo, así como el objetivo de detección de cada longitud de onda.

- **Curva patrón**

Se empleó como estándar de calibración la quercetina. Se determinó el límite de cuantificación y de detección para dicho compuesto, empleando un rango ascendente de concentración desde 1  $\mu\text{M}$  hasta 400  $\mu\text{M}$ . El área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia se graficó contra las distintas concentraciones de quercetina con el tiempo, para determinar si exhibían una buena linealidad con un coeficiente de correlación alto ( $r^2 > 0,98$ ). Esta determinación se realizó por septuplicado, empleando un mismo tipo sanguíneo para todos los ensayos.

- **Precisión y exactitud**

La precisión y exactitud de la prueba se evaluaron para varios patrones de antioxidantes, empleando un rango de concentraciones para cada uno y diferentes orígenes de los eritrocitos, con lo que se evaluó la desviación estándar relativa (desviación estándar / media de concentración), así como el porcentaje de recuperación de los datos (media de concentración obtenida / concentración inicial) tanto para cada patrón como a nivel interexperimental. Cada análisis se realizó por sextuplicado con un mínimo de 3 réplicas cada uno. La precisión, expresada como la desviación estándar relativa para todos los compuestos probados, fue valorada tomando en consideración que no excediera el 15% (Ou *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; CITA, 2008a).

- **Robustez**

La robustez de la prueba se determinó empleando una misma concentración de patrón antioxidante, con el mismo tipo de sangre pero diferentes donadores de la misma y con tiempos variables de almacenamiento desde su obtención (al menos 9 repeticiones con 6 réplicas cada una). Este análisis se realizó para varios patrones de antioxidantes. El resultado se evaluó considerando la desviación estándar relativa máxima entre análisis.

### 3.1.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ORAC

Los ensayos de ORAC fueron realizados de acuerdo con el protocolo descrito por otros autores (Ou *et al.*, 2001 y Huang *et al.*, 2002), en concordancia con el procedimiento validado en el Laboratorio de Química del CITA (2008a), método de análisis AQCITA-M037.

El análisis se realizó en placas de polipropileno de 96 pozos, utilizando el mismo espectrofluorómetro descrito anteriormente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 485 y 520 nm respectivamente. Todas las soluciones fueron preparadas con amortiguador de fosfatos 75  $\mu\text{M}$  (pH 7,4). Cada pozo fue cargado con 150  $\mu\text{l}$  de una solución de fluoresceína 81,87 nM (para una concentración final en el pozo de 61,40 nM) y 25  $\mu\text{l}$  del amortiguador (blanco), trolox (sustancia patrón) o muestra antioxidante a evaluar. La placa fue incubada a  $(37,0 \pm 0,4)$  °C por 30 min antes de la adición de 25  $\mu\text{l}$  de una solución de AAPH 10,70 mM (para una concentración final en el pozo de 1,34 mM).

El descenso en la fluorescencia fue medido cada minuto durante 45 min. Los valores finales fueron calculados con una ecuación de regresión lineal entre la concentración de trolox (sustancia patrón) y el área neta bajo la curva de degradación de la fluoresceína. El área bajo la curva (ABC) fue calculada siguiendo la ecuación 4:

$$ABC = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_i/f_0 + 0,5 \times (f_{45}/f_0) \quad (4)$$

donde  $f_0$  corresponde a la lectura de fluorescencia inicial al tiempo 0 min y  $f_i$  es la lectura de fluorescencia al tiempo  $t$ .

Los valores finales de ORAC fueron expresados como micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por micromol de compuesto puro o litro de jugo, bebida o plasma, los cuales fueron calculados como se muestra en la ecuación 5:

$$\mu\text{M ET} = [(ABC_{\text{muestra}} - ABC_{\text{blanco}}) / (ABC_{\text{Trolox}} - ABC_{\text{blanco}})] \times (M_{\text{Trolox}} - M_{\text{muestra}}) \quad (5)$$

### 3.1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa XLSTAT (Addinsoft SARL).

### **3.2. Valoración de la capacidad antioxidante de frutas y alimentos comunes a nivel químico y celular**

#### **3.2.1. REACTIVOS**

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO): quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ), catequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ ), ácido tánico ( $C_{76}H_{52}O_{46}$ ), ácido ascórbico, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,9-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ), sal de fluoresceína de sodio ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ), reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) y los reactivos necesarios para preparar solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). También se adquirió ácido elálgico ( $C_{14}H_6O_8$ ) de Fluka Biochemika (Buchs, Suiza), 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) de Wako Chemicals USA Inc. (Richmond, VA), y acetona de Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ). Las muestras de sangre humana (O-Rh positivo) de donadores sanos fueron provistas por un banco de sangre de Costa Rica, después de expirada la vida útil (en promedio 30 días después de la colecta de la sangre).

#### **3.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE FRUTAS Y ALIMENTOS**

Se seleccionaron 36 frutas y alimentos consumidos comúnmente en Costa Rica, los cuales fueron adquiridos en supermercados locales o directamente del campo. La broza de café, un sub-producto del procesamiento del grano de café, fue obtenida de una planta de procesamiento.

Alrededor de 1 kg de cada muestra fue seleccionado al azar. A su ingreso al laboratorio, las frutas fueron procesadas inmediatamente para remover las partes no comestibles tales como cáscaras o semillas. El agua de coco se extrajo directamente de la cavidad de la fruta. La naranja y la naranjilla fueron exprimidas manualmente y filtradas por un tamiz de 1 mm para obtener el jugo. La broza de café fue prensada para obtener un jugo. El chayote, plátano, y pejibaye fueron preparados y cocinados de la manera usual, respectivamente durante 10, 15 y 30 min en agua hirviendo. El plátano maduro fue frito en aceite a 160 °C durante 5 min. El arroz y los frijoles fueron cocinados de la manera usual, en olla arrocera y en olla de presión respectivamente.

Todas las partes comestibles recuperadas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, liofilizadas y pulverizadas en un molino hasta obtener un polvo fino, el cual fue empacado al vacío en bolsas laminadas y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para el análisis, 0,5 g de polvo liofilizado fue extraído a temperatura ambiente con 20 ml de una solución acuosa de acetona (30:70 v/v) por 15 min en agitación magnética a 60-80 rpm, seguido de 15 min en baño ultrasónico, y finalmente otros 15 min en agitación magnética. La suspensión resultante fue filtrada por gravedad a través de papel filtro Whatman N° 41, y el residuo fue resuspendido de nuevo en 20 ml de acetona acuosa y se repitió el procedimiento de extracción. La grasa en el aguacate y el pejíbaye fue extraída previamente con éter de petróleo.

Todos los filtrados recuperados fueron concentrados a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un evaporador rotatorio al vacío para remover la acetona, la cual puede resultar tóxica para los eritrocitos, después se filtró a través de filtros de jeringa de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  y se completó a un volumen final de 25 ml con agua Milli-Q. Todos los procesos para obtener los extractos de las muestras fueron llevados a cabo por duplicado de manera independiente.

### **3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR EN MATRICES ALIMENTICIAS MEDIANTE EL MÉTODO ERYCA**

Este ensayo fue realizado tal como se describió previamente, con una modificación en el protocolo inicial. Después de obtener los eritrocitos concentrados (suspensión al 2% v/v), éstos fueron mezclados con cada extracto individual de fruta, alimento o patrón en tubos de ensayo sellados, y fueron incubados durante 15 min en un baño de agua a  $(37,0 \pm 0,4)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de las mezclas anteriores fueron adicionadas a las placas de 96 pozos, y el espectrofotómetro fue programado para transferir 150  $\mu\text{l}$  de la solución de AAPH. El resto del protocolo, incluyendo concentraciones de cada componente, condiciones de ensayo, así como la evaluación del efecto protector de los antioxidantes, se mantuvieron bajo los mismos parámetros establecidos en el apartado anterior.

Los extractos de las frutas y alimentos fueron diluidos en PBS de manera que se obtuviera un área neta bajo la curva de la muestra ( $ABC_{\text{neta}}$ ) dentro del área

de respuesta lineal de la  $ABC_{\text{neto}}$  del estándar de quercetina. Esto se determinó con ensayos preliminares con diferentes factores de dilución, los cuales finalmente fueron establecidos como: 400 para mora, arándano, broza de café carambola, tamarindo y mamey; 200 para marañón, pitahaya, guayaba rosada, guayaba blanca y noni; 100 para naranjilla y pitahaya amarilla; 50 para guava, kiwi, naranja, pejibaje, guanábana, pitanga y tomate de árbol; 20 para granadilla, papaya, piña, mamón chino y sandía; y 10 para el resto de las muestras. Los valores finales de ERYCA fueron expresados en términos de micromoles equivalentes de quercetina por gramo o ml de muestra.

Para establecer el paso adicional de incubación de los eritrocitos con las muestras antioxidantes a evaluar, se realizaron al menos 9 ensayos previos, en los que se valoraron diferentes estándares de antioxidantes (quercetina, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido tánico, catequina, ácido elágico y trolox), los cuales fueron incubados a una sola concentración con los eritrocitos durante 0, 15, 30 o 60 min en un baño con agua a  $(37,0 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$ , e inmediatamente se realizaron 0, 1, 2 o 3 lavados con PBS acompañados de 5 min de centrifugación a 1300 g, con lo cual se removió el sobrenadante. Los valores de ERYCA obtenidos fueron comparados en términos de la desviación estándar relativa para establecer diferencias entre los tratamientos probados.

Adicionalmente, se determinó la posible toxicidad de los extractos y la estabilidad del sistema de los eritrocitos en presencia de estas sustancias. Para esto se siguió el mismo procedimiento de ERYCA, pero empleando solamente una solución de eritrocitos con PBS o con extracto de cada muestra en la dilución correspondiente, sin presencia de AAPH. Con esta prueba se aseguró que la absorbancia de la línea base de cada muestra se mantuviera constante a través de todo el tiempo de ensayo ( $A_{700\text{nm}} = 1,0 \pm 0,2$  durante 5 h).

### 3.2.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

El contenido total de polifenoles (CTP) de las muestras fue determinado empleando el método Folin-Ciocalteu establecido por Georgé *et al.* (2005) para prevenir la interferencia de compuestos no fenólicos, siguiendo el procedimiento validado en el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2008b), método de análisis AQCITA-M036.

Debido a que el reactivo Folin-Ciocalteu no es suficientemente específico para los compuestos fenólicos y puede reaccionar con compuestos no fenólicos como aminoácidos, azúcares reductores y vitamina C, el procedimiento fue realizado antes y después de una extracción en fase sólida, la cual se ejecutó por medio de un cartucho de extracción OASIS 7 HLB 6cc (Waters Corporation, Milford, MA). El eluido conteniendo los componentes interferentes solubles en agua, fue recuperado después de transferir 2 ml del extracto de la muestra a través del cartucho, el cual luego fue lavado rigurosamente con 2 ml de agua Milli-Q.

Para medir la absorbancia, 2,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu fue agregado a 0,5 ml del extracto inicial de muestra o eluido. Después de 2 min, se adicionaron 2 ml de una solución de carbonato de sodio al 7,5%, y se incubó inmediatamente en un baño de agua a 50 °C durante 15 min para el desarrollo de color. La absorbancia fue evaluada a 760 nm empleando un espectrofotómetro UV-1700 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón).

Con base en una curva patrón obtenida con diferentes concentraciones de un estándar de ácido gálico, los resultados fueron expresados en términos de equivalentes de ácido gálico (EAG). El valor de EAG de los componentes no fenólicos interferentes fue calculado a partir de la absorbancia obtenida con el eluido ( $V_e$ ). El valor para el contenido total de polifenoles (CTP) fue obtenido al deducir el valor de las interferencias ( $V_e$ ) del valor inicial obtenido con la muestra completa ( $V_m$ ), es decir:  $CTP = V_m - V_e$ . Todas las determinaciones fueron realizadas de manera independiente en dos muestras diferentes de cada alimento por triplicado, y se expresó el valor final como miligramos de equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de peso fresco de muestra.

### 3.2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

La determinación de humedad de las muestras se realizó según el método no. 920.151 de la AOAC (2005), tal como se describe en el procedimiento validado en el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2009), método de análisis P-SA-MQ-002. La determinación se fundamentó en la medición de la pérdida de masa debida a la evaporación de agua en una estufa de vacío. Los datos se expresaron en g / 100 g de muestra. Los resultados de este análisis

fueron empleados para calcular los valores obtenidos de ERYCA, ORAC y polifenoles totales en términos de materia seca o peso fresco de las muestras estudiadas.

### 3.2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En esta etapa de la investigación, se evaluaron varios tipos de alimentos con el fin de definir la muestra de mayor interés para la siguiente fase del estudio, en términos de alta capacidad antioxidante y contenido de polifenoles. Para esto se empleó un diseño irrestricto aleatorio, en el que los tratamientos correspondieron a cada tipo de muestra, con tres variables respuesta: ERYCA, ORAC (tal como se describió en la sección 3.1.7) y polifenoles totales, con tres repeticiones cada uno. Diferencias entre las medias de cada tratamiento fueron detectadas por medio de un ANOVA. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa XLSTAT (Addinsoft SARL).

## 3.3. Efecto del tratamiento térmico y la digestión *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de un jugo de fruta

### 3.3.1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO): quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,9-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ), ácido elágico ( $C_{14}H_6O_8$ ), cianidin-3-glucósido ( $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$ ), sal de fluoresceína de sodio ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ), reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), pepsina de mucosa gástrica porcina, pancreatina de páncreas porcino, sales biliares, bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ), y los reactivos necesarios para preparar solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). También se adquirió 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) de Wako Chemicals USA Inc. (Richmond, VA). Acetona, ácido clorhídrico concentrado, ácido fórmico grado HPLC y acetonitrilo grado HPLC fueron comprados a Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ). Muestras de sangre humana (O-Rh positivo) de donadores sanos fueron provistas por un banco de sangre de Costa Rica, después de expirada la vida útil (en promedio 30 días después de la colecta de la sangre).

### 3.3.2. ELABORACIÓN DEL JUGO CLARIFICADO DE MORA

La mora tropical de montaña (*Rubus adenotrichus* Schlech.), fue procesada mediante varias operaciones, para la obtención de un jugo clarificado mediante microfiltración. Toda la producción del jugo requerido para la investigación, se realizó a partir de un mismo lote de fruta y en una misma sesión, para evitar posibles diferencias debido a variaciones en el producto o relacionadas con el proceso de obtención del jugo.

La mora se descongeló en una cámara de almacenamiento a temperatura de refrigeración (a 5 °C durante 24 h). Posteriormente se realizó un pre-prensado con una prensa hidráulica (Hydraulic Shop Press OTC 25 Ton, Owatonna, USA), a una presión de 5000 kPa por 5 min. Luego tanto el jugo como la torta de mora obtenidos se mezclaron en una marmita hasta que el producto alcanzara una temperatura de  $(35 \pm 1)$  °C. En ese punto, se agregó el preparado enzimático Klerzyme® 150 (DSM Food Specialties, México) a una concentración de 500 mg/kg, manteniendo el producto a temperatura constante durante 1 h con agitación esporádica. Transcurrido este tiempo se enfrió el producto hasta temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura se procedió a realizar la operación de prensado. Para el prensado se utilizó una prensa continua de tornillo sin fin (Chisholm-Ryder), utilizando una malla con una abertura de 1,25 mm y pasando el residuo dos veces más por la prensa utilizando la misma malla.

El jugo obtenido del prensado se clarificó mediante el proceso de microfiltración tangencial (MFT). Se utilizó una unidad piloto de MFT, compuesta por un módulo tubular de membrana de cerámica alúmina Zircón (SCT, Francia) con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y un área efectiva de filtración de 0,22 m<sup>2</sup>. El equipo también consistió de una bomba centrífuga para proveer el flujo tangencial, una bomba de desplazamiento positivo para otorgar la alimentación y presión, y un intercambiador de calor para controlar la temperatura. Durante la MFT, se mantuvo una presión transmembranaria (P<sub>tm</sub>) de  $(3,1 \pm 0,3)$  bar, una velocidad tangencial (U) de 7 m/s y una temperatura de  $(35 \pm 1)$  °C. La operación se extendió hasta obtener un FRV (factor de reducción volumétrico) con un valor de 10.

El jugo procesado fue empacado en bolsas plásticas de polietileno de alta densidad (HDPE, por sus siglas en inglés), las cuales fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

Las muestras de jugo de fruta fueron sometidas a un tratamiento térmico, el cual se basó en el procedimiento descrito en las publicaciones de Dhuique-Mayer *et al.* (2007) y Cisse *et al.* (2009). Se transfirieron 15 ml de jugo a tubos *pirex* sellados, los cuales se colocaron en un horno microondas convencional (a máxima intensidad), y se monitoreó la temperatura durante todo el ensayo con un termómetro electrónico de infrarrojo (Sper Scientific Ltd, Scottsdale, AZ) con un tubo control. La temperatura a aplicar fue de 90 °C con cuatro diferentes tiempos de exposición: 0, 30, 90 y 180 s. Dicho tiempo de exposición fue aplicado justo en el momento en que el jugo alcanzara la temperatura de 90 °C. De esta manera, los jugos fueron llevados a la temperatura establecida en el microondas, alcanzado este punto se transfirieron inmediatamente a un baño de agua a 90 °C, donde fueron mantenidos por cada tiempo de exposición. Después del tratamiento, los tubos fueron enfriados inmediatamente en un baño de hielo y posteriormente colocados en un congelador a -20°C hasta el momento de su análisis.

### 3.3.4. EFECTO DE LA DIGESTIÓN SIMULADA A NIVEL *IN VITRO*

Posterior al tratamiento térmico, las muestras fueron sometidas a un proceso de digestión simulado a nivel *in vitro*. El método consistió en una digestión inicial con pepsina/HCl (simulación de la digestión gástrica), seguida de una digestión con pancreatina/sales biliares (simulación de las condiciones del intestino delgado), para simular la liberación de compuestos fenólicos de la matriz alimentaria en el tracto intestinal. Este estudio se realizó con base en el procedimiento desarrollado por Gil-Izquierdo *et al.* (2002), el cual ha sido aplicado en numerosas investigaciones, destacando las publicaciones de Pérez-Vicente *et al.* (2002), Gil-Izquierdo *et al.* (2003), Coates *et al.* (2007) y Cilla *et al.* (2009). En la figura 20 se esquematiza el procedimiento que se aplicó.

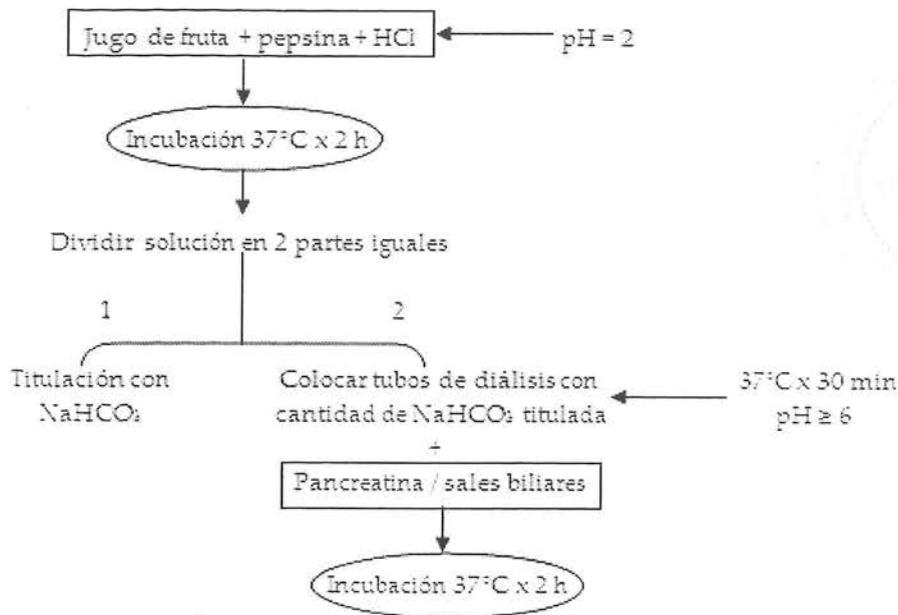


Figura 20. Simulación de la digestión de un jugo de fruta a nivel *in vitro*.

Se disolvieron 267 mg de pepsina en 20 ml de agua destilada. Esta solución se adicionó a 100 ml de jugo de mora para un volumen final de 120 ml (correspondiente a 31500 U de pepsina), y se ajustó el pH a 2 unidades con HCl concentrado. Se incubó a 37 °C durante 2 horas en un baño con agua con agitación suave constante y cubierto con papel *parafilm*. Posteriormente, se tomaron 60 ml del digerido de pepsina y se determinó la acidez titulable con NaHCO<sub>3</sub> 1 M (ver más abajo).

Los 60 ml restantes del jugo digerido con pepsina fueron colocados en un beaker y se sumergieron dos tubos de diálisis de celulosa con un poder de corte de 12 kDa (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), cada uno con la mitad del volumen total de NaHCO<sub>3</sub> titulado en el paso anterior. Se incubó a 37 °C en un baño de agua con agitación constante hasta que el pH alcanzara un valor de 6 (aproximadamente 30 min). Seguidamente se adicionaron 15 ml de una solución de pancreatina (4 g/l) y sales biliares (25 g/l) y se incubó nuevamente a 37 °C durante 2 horas en un baño con agua con agitación suave constante y cubierto con papel *parafilm*.

La acidez titulable con  $\text{NaHCO}_3$  se definió como la cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  requerida para llevar la mezcla de digerido de pepsina con solución pancreatina/sales biliares a pH 7,0. Finalmente, una vez concluida la etapa de digestión, las muestras resultantes fueron purificadas en una columna con una resina adsorbente (Amberlite XAD7HP, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), para la separación de los componentes externos adicionados durante la digestión (enzimas, sales). La solución resultante fue empleada para la realización de los análisis siguientes.

### 3.3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

La evaluación de los cambios en la capacidad antioxidante del jugo de mora se realizó con el método ORAC (ver sección 3.1.7), en combinación con el método celular ERYCA (ver sección 3.2.3). Para definir el impacto sobre el contenido de polifenoles, se empleó el método para la determinación de polifenoles totales con el reactivo *Folin Ciocalteu* y un método por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Los análisis se realizaron por triplicado.

Respecto al análisis por HPLC, se determinó el perfil de compuestos fenólicos con base en Mertz *et al.* (2007) y Gasperotti *et al.* (2010). Para su realización se empleó un sistema de HPLC Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments) equipado con una bomba LL-20AT y acoplado con un detector de arreglo de diodos modelo SPD-M20A y un desgasificador modelo DGU-20As. La separación se llevó a cabo a 30 °C empleando una columna de 150 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  marca YMC (YMC Co., Ltd). Los solventes a utilizar fueron ácido fórmico acuoso al 2% (solvente A) y acetonitrilo/agua/ácido fórmico (80:18:2, v/v/v; solvente B). La detección se llevó a cabo entre 200 y 600 nm.

### 3.3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En esta etapa se aplicó un diseño factorial 4x2, el cual involucró 8 tratamientos diferentes, incluyendo los cuatro tiempos de tratamiento térmico (variable continua) y la aplicación o ausencia de digestión *in vitro* (variable nominal). Las variables respuesta en este caso fueron los valores resultantes de ERYCA, ORAC y polifenoles totales. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

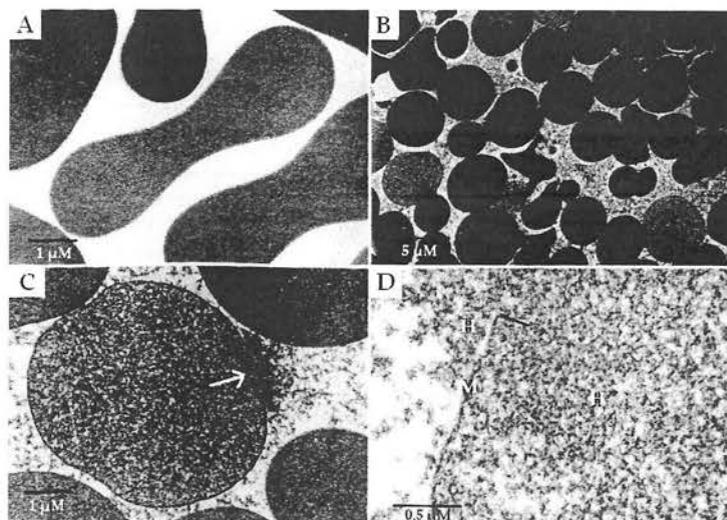
El análisis estadístico consistió en un análisis de ANOVA, con el propósito de determinar si existía un efecto significativo en la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles con respecto a los diferentes tiempos de exposición al tratamiento térmico y la aplicación del proceso de digestión *in vitro* (efectos simples), tomando en cuenta también la evaluación de los efectos combinados de ambos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa XLSTAT (Addinsoft SARL).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1. Desarrollo y validación de un ensayo para evaluar la actividad antioxidante celular en glóbulos rojos humanos

Cuando los glóbulos rojos son suspendidos a bajas concentraciones en una solución fisiológica, éstas células dispersan la luz en longitudes de onda entre 650 y 700 nm (Oster y Zalusky, 1974). Debido a que la hemoglobina no absorbe a estas longitudes de onda, se obtiene una señal clara que representa la concentración de células intactas suspendidas en el medio.

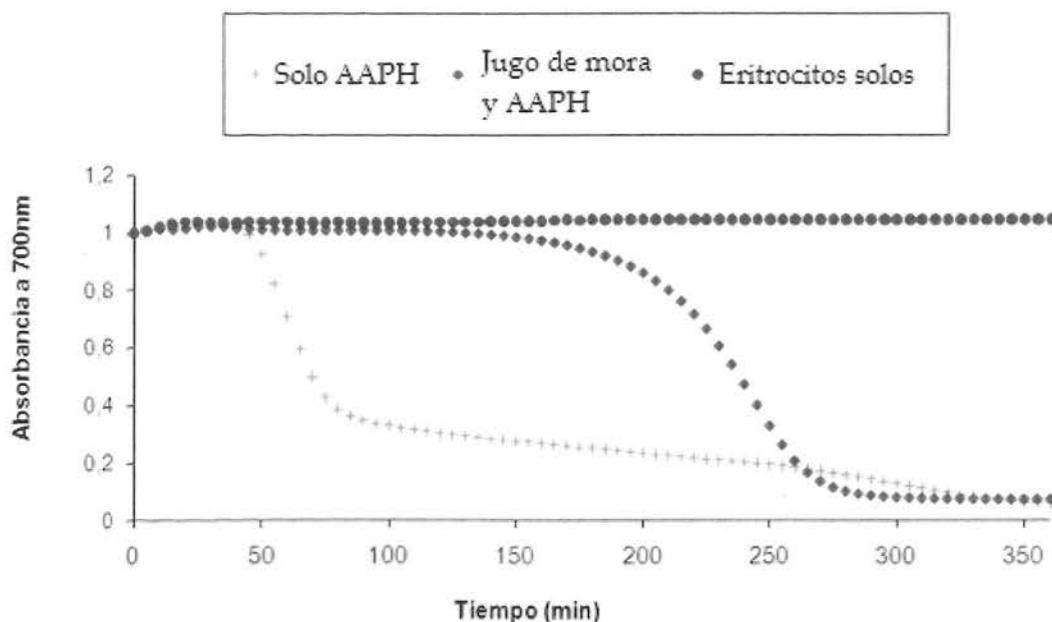
Cuando se adicionan radicales libres al medio con los eritrocitos, los lípidos poliinsaturados son oxidados, lo cual conduce a la desorganización de las membranas celulares (Lahet *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 1998). Las membranas se dañan, formando hoyos hemolíticos (Sato *et al.*, 1999) que conducen a la fuga de potasio al medio extracelular (Lenfant *et al.*, 2000), la disrupción celular y la liberación de hemoglobina, fenómeno conocido como hemólisis (figura 21). Como resultado, se pierden las propiedades de dispersión de la luz de los eritrocitos (Young *et al.*, 1986; Liu y Young, 1988; Lenfant *et al.*, 2005).



**Figura 21.** Micrográficas de transmisión de electrones de eritrocitos de conejo durante la oxidación. A) eritrocitos control sin tratar, B) eritrocitos incubados con AAPH por 100 min, C) eritrocitos incubados con AAPH por 140 min (sitio de hemólisis marcado con flecha), D) parte de C) con hebras de hemoglobina (H) y remanentes de la membrana plasmática (M). Modificado de Niki *et al.* (1988).

Por tanto, en el presente ensayo se siguió la hemólisis de los eritrocitos suspendidos en solución fisiológica directamente a través del monitoreo de los valores de turbidez. Bajo estas condiciones, varios autores ya han establecido una buena correlación entre la hemólisis evaluada con lecturas de absorbancia a 650 o 700 nm y los ensayos convencionales, empleando la absorbancia a 540 nm después de la centrifugación (Liu y Young, 1988).

La figura 22 presenta ejemplos de curvas correspondientes al descenso en la absorbancia relativa a 700 nm, registrada para soluciones de PBS conteniendo 0,4% (v/v) de eritrocitos suspendidos. Estas soluciones fueron incubadas con un generador de radicales peroxilo (AAPH) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , en ausencia o presencia de una sustancia con capacidad antioxidante (el jugo de mora). También se presenta la absorbancia para la solución PBS-eritrocitos sin AAPH ni antioxidante, lo cual demuestra la estabilidad de los eritrocitos a lo largo del experimento, pues los valores de absorbancia se mantienen constantes.



**Figura 22.** Ejemplo de curvas de degradación de la absorbancia de la solución de eritrocitos/PBS inducidas por el AAPH en presencia o ausencia de un compuesto con capacidad antioxidante.

En contraste, cuando se adicionó AAPH 100  $\mu\text{M}$  al medio, la absorbancia a 700 nm se mantuvo estable cerca de una hora, para luego decaer abruptamente,

indicando desintegración celular y hemólisis. En solución acuosa, a temperatura fisiológica (37 °C) y por un extenso período de tiempo (vida media de 175 h), el AAPH se descompone a una tasa constante en radicales alquilo, los cuales en presencia de oxígeno se convierten en radicales peroxilo (Tang y Liu, 2007; Barreira *et al.*, 2008b). El retraso de 1 h en el descenso de la absorbancia, durante el cual la membrana de los eritrocitos resiste el ataque constante de los radicales libres, puede ser el resultado de la acción de antioxidantes endógenos (Sato *et al.*, 1998). La peroxidación lipídica y oxidación proteica fueron demostradas por el descenso en las propiedades de dispersión de la luz de los eritrocitos suspendidos, lo cual significa que el número de eritrocitos intactos estaba declinando, y por consiguiente, el nivel de hemólisis estaba aumentando.

Tal como ocurre con cualquier otra célula viviente, los eritrocitos humanos exhiben un sistema redox de membrana plasmática (PMRS por sus siglas en inglés), el cual provee a la célula un nivel extra de defensa frente a oxidantes extracelulares, y le permite responder a cambios intra- y extracelulares en el ambiente oxidativo de la célula (Fiorani y Accorsi, 2005; Kennett y Kuchel, 2006; Suwalsky *et al.*, 2009; Rizvi y Pandet, 2010). El PMRS actúa por medio de la transferencia de electrones de donantes intracelulares a receptores extracelulares, de manera que se mantiene un ambiente circundante reducido (Kennett y Kuchel, 2006; Rizvi y Pandet, 2010; Rizvi *et al.*, 2010).

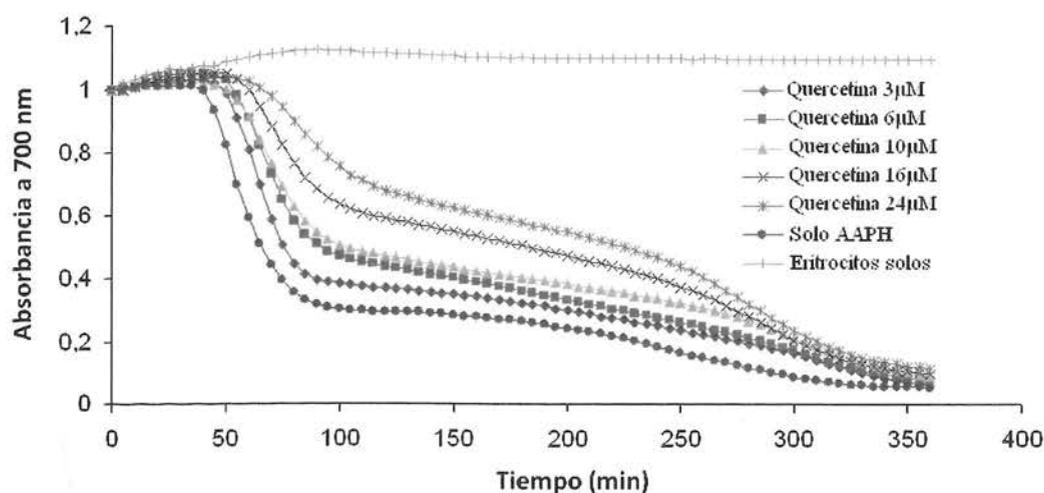
No obstante, sin la colaboración de compuestos antioxidantes exógenos, el PMRS de los eritrocitos resulta abrumado por el ataque constante de los radicales libres después de la primera hora bajo las condiciones del ensayo ERYCA, momento en que los eritrocitos empiezan a perder rápidamente sus propiedades de dispersión de la luz. Esto se evidenció por el hecho de que, cuando se adicionó un extracto de alimento o quercetina al medio, la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo mejoró significativamente, y el descenso en la absorbancia se obstaculizó en proporción a la concentración del compuesto antioxidante y su capacidad protectora relativa (figura 23).

A pesar de que aún no ha sido elucidado completamente el mecanismo por el cual los compuestos antioxidantes exógenos mejoran la capacidad antioxidante protectora de las células, se ha comprobado que los compuestos fenólicos, incluyendo la quercetina, pueden penetrar la bicapa de membranas fosfolipídicas de las células (Suwalsky *et al.*, 2009), y a partir de ahí:

1) actúan como sustratos intracelulares para las enzimas oxido-reductoras del PMRS (Kennett y Kuchel, 2006; Vlachodimitropoulou *et al.*, 2010), y 2) donan electrones a aceptores extracelulares a través del PMRS de los eritrocitos (Fiorani y Accorsi, 2005).

De esta manera, los compuestos fenólicos que pueden ser absorbidos dentro de la membrana de los eritrocitos en mucha mayor concentración que el medio circundante, pueden ayudar a estimular el sistema de transferencia de electrones transmembrana, el cual de otro modo, estaría limitado por la capacidad inicial de los donadores de electrones intracelulares (Suwalsky *et al.*, 2009; Rizvi y Pandet, 2010; Maurya y Prakash, 2011). Se ha sugerido que éste podría ser el mecanismo principal por medio del cual, los flavonoides de la dieta mejoran la protección celular frente al estrés oxidativo, y ejercen sus potenciales beneficios para la salud (Fiorani y Accorsi, 2005).

La figura 23 ilustra que, a medida que aumenta la concentración del compuesto antioxidante (en este caso la quercetina), el descenso en la absorbancia se retrasa proporcionalmente. El efecto protector del compuesto antioxidante puede ser evaluado al medir su ABC y compararla con la del blanco que solo contiene el AAPH. De la misma manera que con el método de ORAC, la ABC neta ( $ABC_{muestra\ neta} = ABC_{muestra} - ABC_{AAPH}$ ) permite una evaluación completa de la capacidad antioxidante, donde el tiempo y el grado de inhibición son valorados a medida que se completa la reacción.



**Figura 23.** Ejemplo de curvas de degradación de la absorbancia de la solución de eritrocitos/PBS en presencia de diferentes concentraciones de quercetina.

La representación de la  $ABC_{\text{neta}}$  contra la concentración de quercetina (figura 24) demuestra una buena linealidad, con el coeficiente de correlación más alto entre los patrones evaluados ( $r^2 = 0,993$ ). Una buena relación lineal (con  $r^2 > 0,98$ ) entre el  $ABC_{\text{neta}}$  y la concentración del estándar de antioxidante fue obtenida con todas las muestras de sangre obtenidas de diferentes donadores, y con diversos tiempos de almacenamiento, hasta 28 días después de su arribo al laboratorio. Dado que las muestras provenientes del banco de sangre tienen una vida útil de 30 días, los ensayos fueron realizados con eritrocitos de hasta 58 días después de la toma de la sangre (cuadro 5). Una buena relación lineal entre  $ABC_{\text{neta}}$  y concentración ( $r^2 > 0,98$ ) también fue obtenida para los otros estándares de antioxidantes estudiados, tales como catequina, ácido gálico, ácido elágico y trolox.

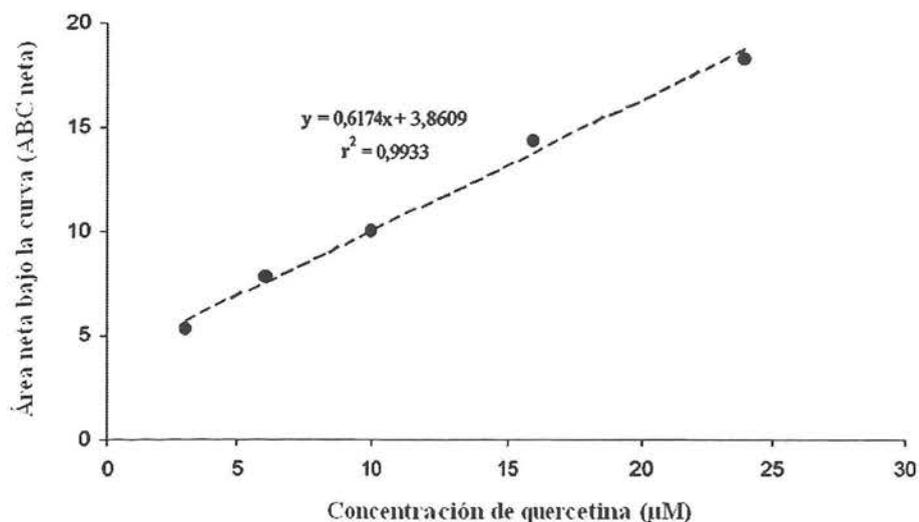


Figura 24. Ejemplo de la relación lineal entre el área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia y la concentración de estándar de quercetina.

**Cuadro 5.** Resumen de curvas patrón de quercetina para cuatro donadores diferentes de sangre (A-D) con diferentes tiempos de almacenamiento.

Donante/días almacenaje	r <sup>2</sup>	Pendiente (m) <sup>a</sup>	Intercepto (b) <sup>a</sup>
A/40	0,9986	0,5489	1,1861
B/32	0,9876	0,7550	5,1905
C/32	0,9930	0,9186	0,4954
C/38	0,9889	0,6329	3,5792
C/40	0,9905	0,6687	0,6322
C/48	0,9914	0,6538	0,5909
C/52	0,9873	0,6438	1,5011
C/58	0,9186	0,7820	2,1579
D/33	0,9909	0,4707	1,8065
<b>Promedio ± DS<sup>b</sup></b>	<b>0,983 ± 0,004</b>	<b>0,67 ± 0,24</b>	<b>2,08 ± 3,18</b>

<sup>a</sup> Y (μM) = b + mX, donde X corresponde al ABC<sub>neto</sub>. <sup>b</sup> DS = desviación estándar.

El efecto del aumento de la concentración de AAPH fue evaluado hasta 400 μM, pero se encontró que tenía un impacto relativamente pequeño, disminuyendo ligeramente el tiempo de análisis y aumentando la pendiente de la ecuación resultante de la relación ABC<sub>neto</sub> frente a la concentración de estándar. De hecho, concentraciones muy altas de AAPH aumentaron la tasa de reacción y en consecuencia disminuyeron la exactitud. De esta manera se encontró que AAPH a 100 μM representaba un buen equilibrio entre tiempo de corrida y exactitud.

El tiempo de análisis promedio fue de 6 h (360 min), para alcanzar una absorbancia menor al 10% del valor inicial. Bajo estas condiciones, se determinó que los valores obtenidos para tres estándares de antioxidantes (catequina; ácido elágico y trolox) fueron reproducibles y exactos (cuadro 6), aún cuando se empleó sangre de diferentes donadores y almacenada en el laboratorio por 18 días (es decir, 48 días después de su toma). La precisión, expresada como la desviación estándar relativa (% DSR), para todos los compuestos analizados osciló entre 1,4 y 15%, y se observó que dicho valor tendió a aumentar conforme mayor el número de días de almacenamiento de la sangre.

Sin embargo, estos valores son aceptables si se comparan con el método de ORAC, con el cual se obtienen porcentajes de error similares (Ou *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002), tomando en consideración además que el ensayo ERYCA se

basa en un modelo celular. Estos resultados demuestran no solo la estabilidad de los eritrocitos en el medio durante el almacenamiento, sino también el comportamiento homogéneo entre células de glóbulos rojos de diferentes donadores de sangre. Con base en los resultados previos (cuadro 6), la exactitud del método varió de 92,5 a 107% para los ensayos individuales, y de 94 a 106% entre experimentos.

Para permitir comparaciones con resultados obtenidos con ORAC, la robustez del método ERYCA fue evaluada para el Trolox, un derivado hidrosoluble de la vitamina E (cuadro 7). Diferentes muestras de sangre de al menos cinco donadores fueron utilizadas después de varios días de almacenamiento en el laboratorio, hasta un máximo de 28 días (58 días después de la obtención de la sangre). La reproducibilidad del valor antioxidante, expresado como micromoles equivalentes de quercetina, fue alcanzada con una desviación estándar relativa máxima (DSR) de 15% para los ensayos individuales, cerca de 15% para los valores obtenidos usando la misma muestra de sangre pero diferentes tiempos de almacenaje, y cerca de 12% para todos los experimentos empleando diferentes donadores de sangre y tiempos de almacenamiento.

Debido a que no es un compuesto natural, el Trolox no fue utilizado como estándar para la curva patrón de este ensayo. En su lugar, el estándar elegido fue la quercetina, un compuesto ampliamente extendido entre frutas y vegetales y que se ha detectado de manera natural en el torrente sanguíneo humano (Egert *et al.*, 2008). Para el método ERYCA, los límites de cuantificación y detección fueron estimados respectivamente en 3 y 2  $\mu\text{M}$  de equivalentes de quercetina. De esta manera, el ensayo parece ser ligeramente más sensible que el método de ORAC, con valores respectivos de 12,5 y 5  $\mu\text{M}$  de equivalentes de Trolox (Ou *et al.*, 2001). Por tanto, los antioxidantes pueden ser analizados a concentraciones muy bajas, lo cual es más cercano a las concentraciones fisiológicas esperadas en el plasma sanguíneo (Egert *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Precisión y exactitud del ensayo ERYCA para diferentes donadores de sangre y tiempos de almacenamiento de la misma.

	Donante B (40 días)		Donante C (32 días)		Donante C (48 días)		Interexperimental	
<b>Catequina</b>	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M
<b>ABC<sub>neto</sub> media</b>	5,80	9,48	15,10	23,13	11,62	20,91		
<b>Concentración media</b>	10,00	17,98	9,98	18,04	9,35	15,03	9,78	17,02
<b>DS<sup>a</sup></b>	0,15	0,55	0,65	1,27	0,98	1,76	0,37	1,72
<b>% DSR<sup>b</sup></b>	1,50	3,07	6,60	7,10	11,80	11,70	0,04	0,10
<b>% REC<sup>c</sup></b>	100,00	99,89	99,80	100,22	93,50	83,50	97,77	94,54
<b>n</b>	3	3	3	3	6	6	3	3
<b>Ácido elágico</b>	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M	10 $\mu$ M	18 $\mu$ M
<b>ABC<sub>neto</sub> media</b>	11,23	17,89	15,04	20,40	12,74	19,13		
<b>Concentración media</b>	10,39	17,29	10,76	16,83	10,84	16,48	10,66	16,87
<b>DS<sup>a</sup></b>	0,67	0,49	0,61	0,23	0,96	2,31	0,24	0,41
<b>% DSR<sup>b</sup></b>	6,46	2,83	5,70	1,40	8,90	14,00	0,02	0,02
<b>% REC<sup>c</sup></b>	103,90	96,06	107,60	93,50	108,40	91,56	106,63	93,70
<b>n</b>	3	3	3	3	6	6	3	3
<b>Trolox</b>	24 $\mu$ M	40 $\mu$ M	24 $\mu$ M	40 $\mu$ M	24 $\mu$ M	40 $\mu$ M	24 $\mu$ M	40 $\mu$ M
<b>ABC<sub>neto</sub> media</b>	4,36	6,14	9,44	13,94	11,94	15,58		
<b>Concentración media</b>	25,78	37,00	24,46	39,43	26,23	34,42	25,49	36,95
<b>DS<sup>a</sup></b>	4,07	2,12	1,12	1,72	2,47	1,72	0,92	2,51
<b>% DSR<sup>b</sup></b>	15,82	5,73	2,20	4,40	9,40	4,99	0,04	0,07
<b>% REC<sup>c</sup></b>	107,42	92,50	101,92	98,58	109,29	86,05	106,21	92,38
<b>n</b>	3	3	3	3	6	4	3	3

<sup>a</sup> DS = desviación estándar. <sup>b</sup> DSR = desviación estándar relativa (DS/concentración media). <sup>c</sup> REC = % de recuperación (conc. media/conc. inicial).

**Cuadro 7.** Robustez de los valores de ERYCA para el Trolox empleando sangre tipo O Rh-positivo de diferentes donadores de sangre y tiempos de almacenamiento.

Donante	Días de almacenaje	ERYCA ( $\mu\text{M EQ}$ )	<i>n</i>
A	50	0,48 $\pm$ 0,02	6
B	35	0,45 $\pm$ 0,03	6
B	40	0,41 $\pm$ 0,04	3
C	32	0,41 $\pm$ 0,06	3
C	40	0,53 $\pm$ 0,05	6
C	48	0,56 $\pm$ 0,03	6
C	52	0,41 $\pm$ 0,06	6
C	58	0,43 $\pm$ 0,04	6
D	33	0,46 $\pm$ 0,04	6
<b>Promedio <math>\pm</math> DS<sup>a</sup></b>		0,46 $\pm$ 0,06	---

<sup>a</sup> DS = desviación estándar.

El ensayo ERYCA fue utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos naturales puros (figura 25). Dichos resultados fueron comparados con los valores obtenidos con el método ORAC (cuadro 8), los cuales para el caso de los estándares fueron similares a los reportados previamente por otros autores (Ou *et al.*, 2001; Ou *et al.*, 2002). Aunque no se encontró una correlación entre los valores de los dos métodos ( $r^2 = 0,405$ ), la jerarquía fue similar para los compuestos con baja capacidad antioxidante (ácido ascórbico y ácido gálico) y para aquellos con alta actividad antioxidante (ácido tánico).

Cuando se utilizó los mismos equivalentes de Trolox para comparar la capacidad antioxidante con ambos métodos, los valores para el ácido elágico en ERYCA fueron mucho más altos que los valores para el Trolox o el ácido gálico. En contraste, para el método ORAC, la capacidad antioxidante del ácido elágico fue similar a la de los dos compuestos mencionados. Sin embargo, la catequina presentó una actividad antioxidante relativamente baja en el método ERYCA, pero una alta actividad antioxidante con ORAC, siendo casi comparable al valor del ácido tánico.

No obstante, las comparaciones entre los dos métodos deben abordarse cuidadosamente, ya que están implicados mecanismos antioxidantes diferentes, aún cuando la habilidad de los compuestos de convertir radicales libres en especies no reactivas es valorada por ambos métodos. El método ERYCA

probablemente difiere en que se evalúa, no solo la habilidad de los compuestos de neutralizar los radicales peroxilo en solución, sino también la capacidad de proteger la membrana celular de los eritrocitos, sea por asociación específica con la membrana, o por penetración de las células y acción desde el espacio intracelular.

Las diferencias observadas en las actividades antioxidantes entre métodos también podrían estar relacionadas con la disparidad estructural de los compuestos estándares. Por ejemplo, se ha demostrado que los flavonoides O-metilados como la quercetina, exhiben una capacidad antioxidante mucho mayor que la catequina en ensayos de peroxidación lipídica (Heim *et al.*, 2002), mientras que los valores antioxidantes de ambos compuestos son similares en ensayos de ORAC (Ou *et al.*, 2001). Por consiguiente, dentro de un ensayo de base celular como ERYCA, parámetros fisiológicamente relevantes pueden influenciar la capacidad antioxidante de los compuestos, tales como lipofilicidad y capacidad de partición de membranas, características otorgadas por estructuras químicas específicas (Heim *et al.*, 2002).

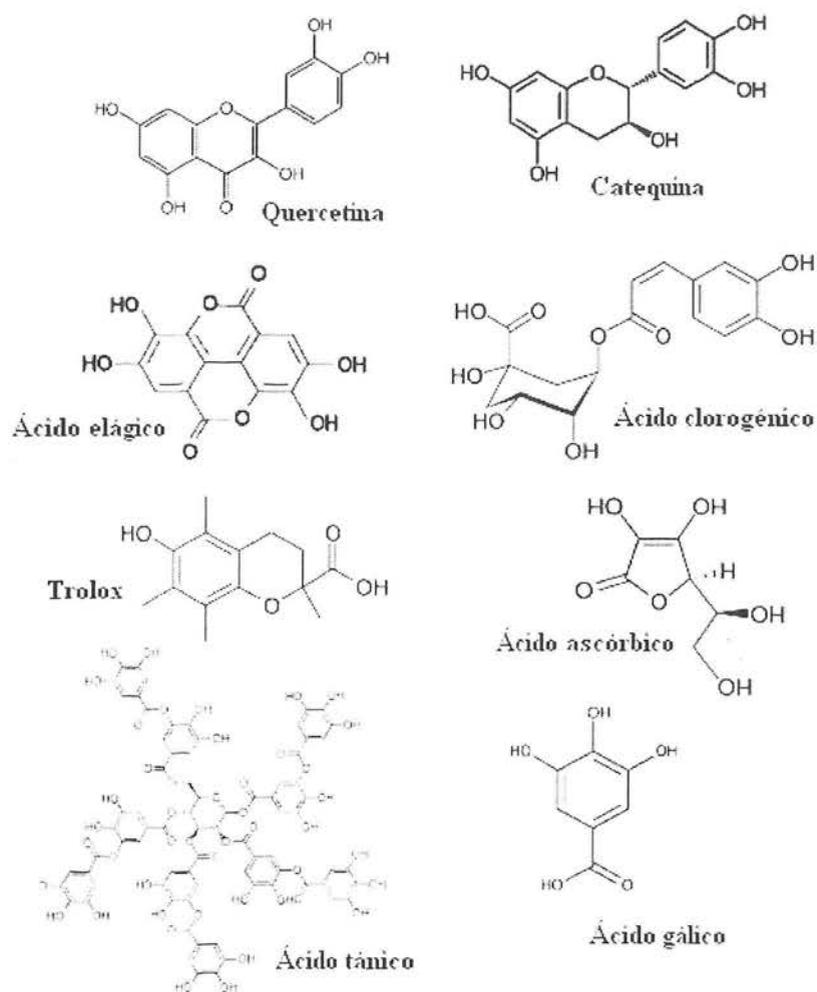


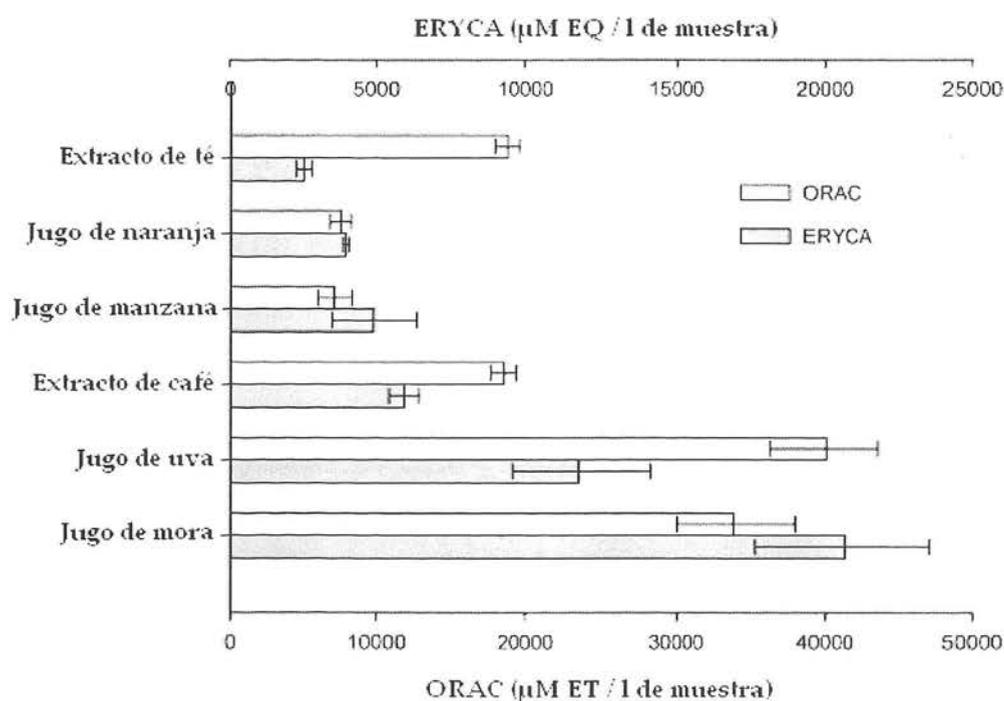
Figura 25. Estructuras químicas de los compuestos fenólicos puros estudiados.

Cuadro 8. Valores de ERYCA para diferentes compuestos antioxidantes naturales puros (media  $\pm$  desviación estándar, con  $n=6$ ).

Compuesto	ORAC ( $\mu\text{M ET}$ )	ERYCA ( $\mu\text{M ET}$ ) <sup>a</sup>	ERYCA ( $\mu\text{M EQ}$ )
Ácido tánico	8,70 $\pm$ 0,80	14,20 $\pm$ 3,46	6,53 $\pm$ 0,58
Ácido elágico	1,29 $\pm$ 0,10	3,83 $\pm$ 0,37	1,76 $\pm$ 0,05
Quercetina	5,59 $\pm$ 0,50	2,17 $\pm$ 0,20	1
Ácido clorogénico	3,80 $\pm$ 0,30	2,13 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10
Catequina	7,86 $\pm$ 0,20	1,87 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,02
Trolox	1	1,00 $\pm$ 0,13	0,46 $\pm$ 0,06
Ácido gálico	1,00 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,02
Ácido ascórbico	0,85 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,03

<sup>a</sup> La conversión se basó en: 1  $\mu\text{M}$  trolox = (0,46  $\pm$  0,06)  $\mu\text{M}$  equivalentes de quercetina.

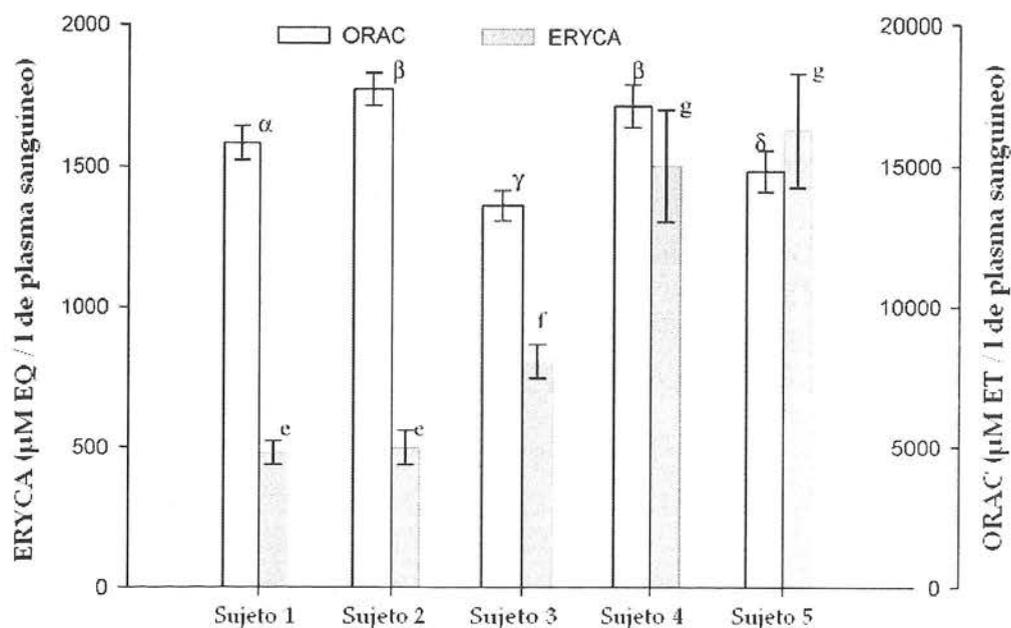
Los métodos ERYCA y ORAC también fueron empleados para evaluar la capacidad antioxidante de algunos jugos de fruta y de dos bebidas estimulantes, café y té (figura 26). Estadísticamente no se obtuvo una buena correlación entre métodos ( $r^2 = 0,576$ ). No obstante, la jerarquía en el orden de capacidad antioxidante fue similar para ambas metodologías, excepto en el caso del té y el jugo de mora. El jugo se ubicó en primer lugar en ERYCA y de segundo en ORAC. Este producto es rico en elagitaninos antioxidantes, hasta 3,8 g de equivalentes de ácido elágico por kg de fruta fresca (Acosta-Montoya *et al.*, 2010), lo cual puede explicar su mayor valor antioxidante en ERYCA, ya que el ácido elágico también presentaba un valor mayor en ERYCA (cuadro 8).



**Figura 26.** Comparación de valores de ERYCA y ORAC para diferentes jugos de frutas y bebidas ( $n=6$ ).

El método ERYCA también presenta el potencial para evaluar la capacidad antioxidante de fluidos biológicos como el plasma sanguíneo. Este ensayo puede valorar el estado antioxidante dentro del mismo ambiente encontrado *in vivo*, sin interferencia de compuestos químicos o antibióticos. De esta manera, resulta biológicamente más relevante que el método ORAC, debido a que en

lugar de utilizar un intermediario fluorescente artificial, las propiedades de dispersión de la luz de los eritrocitos son empleadas directamente como sonda. La figura 27 muestra los valores de ERYCA y ORAC para muestras de plasma sanguíneo de cinco voluntarios en ayuno. Los resultados difieren drásticamente entre métodos, y no se encontró una correlación estadística ( $r^2 = 0,018$ ).



**Figura 27.** Comparación de valores de ERYCA y ORAC para muestras de plasma sanguíneo de cinco voluntarios sanos en ayuno. Diferencia estadística significativa con la prueba *t*-student marcada con letras diferentes, letras romanas para ERYCA y griegas para ORAC ( $p < 0,05$  y  $n=6$ ).

El método ERYCA parece discriminar significativamente mejor entre las muestras de plasma en comparación con el método ORAC. Con el valor antioxidante determinado por ERYCA se distinguen tres grupos de baja, media y alta capacidad antioxidante, con diferencias significativas entre grupos, a diferencia de los valores de ORAC obtenidos. Adicionalmente, el valor promedio de capacidad antioxidante para el plasma de los cinco voluntarios con ERYCA es de  $(983 \pm 582)$  µM EQ/l. Asumiendo un valor de conversión de 0,46, esto es cerca de 2137 µM ET/l, lo cual representa 7 veces menos el valor promedio obtenido con ORAC para las mismas muestras de plasma ( $15827 \pm 1682$  µM ET/l).

#### 4.2. Valoración de la capacidad antioxidante de frutas y alimentos comunes a nivel químico y celular

En primera instancia, se evaluó la capacidad antioxidante a nivel celular mediante el método ERYCA, de diferentes extractos de frutas y patrones comerciales de antioxidantes, incorporando una etapa adicional a la metodología descrita en la sección 3.1.5. Resulta importante resaltar que el área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia, obtenida al deducir el área bajo la curva de los eritrocitos suspendidos solo con AAPH al área correspondiente a los eritrocitos con AAPH y un compuesto antioxidante (quercetina) o un extracto de fruta (mora y papaya), fue proporcional en todos los casos ( $r^2 > 0,97$ ), a la concentración del estándar o extracto de fruta (figura 28).

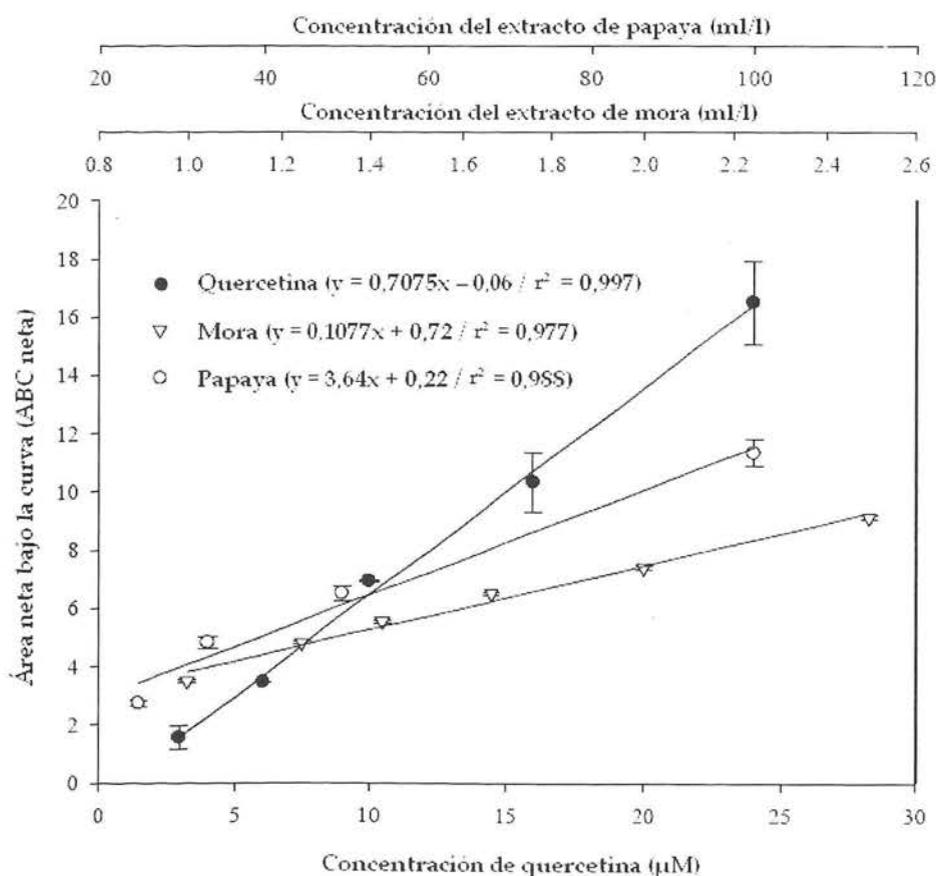


Figura 28. Ejemplos de la relación lineal entre el área neta bajo la curva de degradación de la absorbancia y la concentración de quercetina y extractos de mora y papaya.

Para el caso de la quercetina, el compuesto patrón elegido, la proporcionalidad fue comprobada entre al menos 2 y 24  $\mu\text{M}$ . Nótese que la concentración plasmática de la quercetina después de la ingesta de alimentos ricos en compuestos fenólicos ha sido establecida en alrededor de 0,3 y 0,75  $\mu\text{M}$  (Graefe *et al.*, 2001), la cual no es tan distante del rango de concentración empleado en el ensayo ERYCA. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre el área neta bajo la curva y la concentración de quercetina fue superior a 0,98 en todos los análisis realizados, independientemente de los donadores de la sangre y el tiempo de almacenamiento (hasta 50 días), en concordancia con los resultados observados en la etapa anterior de la investigación.

A pesar de que los sistemas de defensa antioxidante en los eritrocitos se agotan durante el almacenamiento de la sangre (Jówik *et al.*, 1997), y además pueden variar con la edad del donador y el tiempo de almacenaje, la inclusión y uso de las curvas de calibración de quercetina en cada ensayo de ERYCA, permiten obtener resultados repetibles, limitándose la variabilidad inter-ensayo (tal como se demostró en el cuadro 6). Consecuentemente, el área neta bajo la curva obtenida para la dilución de un extracto de fruta específico, puede ser relacionada con una concentración equivalente de quercetina (EQ), por unidad de masa de la parte comestible de la fruta analizada.

Debido a que debe favorecerse la interacción entre los compuestos antioxidantes y las células de los glóbulos rojos, para permitir una mejor difusión a través del medio y eventualmente a través de las membranas de los eritrocitos, se realizó un pequeño ajuste al ensayo con respecto a la metodología presentada previamente, al introducir 15 min de incubación de la solución con el antioxidante a probar y los eritrocitos, antes de evaluar la capacidad de protección antioxidante. Como se muestra en el cuadro 9, los 15 min de incubación reducen significativamente la desviación estándar alrededor de la media, cuando se compara con ensayos sin dicha incubación previa, aunque ambas medias se mantienen estadísticamente similares ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro 9.** Reproducibilidad y exactitud del ensayo ERYCA para diferentes estándares de antioxidantes y dos extractos de frutas con y sin incubación previa por 15 min.

	ERYCA sin incubación			ERYCA con incubación x 15 min		
	Media	Int. conf. <sup>a</sup>	% error	Media	Int. conf. <sup>a</sup>	% error
<b>Estándar</b>	μM EQ / μM estándar			μM EQ / μM estándar		
Quercetina	1,07	0,13	12,1	1,04	0,07	5,8
Ác. ascórbico	0,18	0,03	16,7	0,12	0,01	10,4
Ác. tánico	6,12	1,21	19,7	4,58	0,20	4,5
Catequina	1,87	0,17	9,0	1,71	0,04	2,2
Trolox	0,46	0,06	13,0	0,40	0,02	5,9
<b>Extracto</b>	μM EQ / g materia seca			μM EQ / g materia seca		
Mora	352	33,50	9,5	390	15,60	4,0
Noni	80	1,25	1,6	84	1,50	1,8

<sup>a</sup> Variación con respecto a la media con un intervalo de confianza del 95%.

La interacción de los polifenoles con las membranas celulares, a través del ingreso al interior hidrofóbico y la formación de puentes de hidrógeno, puede inducir cambios en las propiedades físicas de las membranas, los cuales se han relacionado con la protección de las mismas a la oxidación lipídica y proteica inducida por radicales libres (Oteiza *et al.*, 2005).

De esta manera, se ha demostrado que la quercetina y el resveratrol pueden acumularse dentro de la membrana de los eritrocitos después de solo 30 min de incubación, a concentraciones mucho mayores que las del medio circundante (Rizvi y Pandet, 2010). Otros autores han encontrado resultados similares para flavonoides extraídos de plantas, los cuales fueron localizados en la bicapa fosfolipídica de la membrana de los eritrocitos después de una hora de incubación (Suwalsky *et al.*, 2009).

Sin embargo, en nuestro caso, aunque se evaluó la incubación durante 30 min, se alcanzaron resultados muy similares a los obtenidos con 15 min, probablemente debido a que durante la fase inicial del ensayo ERYCA, en los pozos de reacción de la placa para análisis, los antioxidantes van a estar en contacto con la suspensión de glóbulos rojos, por lo que éstos compuestos aún tienen la posibilidad de interactuar y eventualmente difundirse a través de la membrana de los eritrocitos.

El método modificado de ERYCA fue utilizado para evaluar la actividad antioxidante celular de extractos de 36 frutas tropicales consumidas comúnmente en América Latina. Se observó una buena estabilidad del sistema compuesto por las suspensiones de cada extracto de fruta con los eritrocitos. De esta manera, la solución PBS/eritrocitos sin AAPH pero en presencia de extractos de frutas presentó una línea base constante de absorbancia a 700 nm de  $1,0 \pm 0,2$  a lo largo de todo el tiempo de ensayo (360 min), para todos los extractos de fruta en la dilución final correspondiente para cada uno (cuadro 10).

Los resultados obtenidos con el método ERYCA fueron comparados con su valor respectivo de ORAC-hidrofílico (cuadro 11). Para obtener comparaciones más acertadas con los valores de ORAC, los valores de ERYCA también se presentan en el cuadro 11 como micromoles equivalentes de Trolox (ET), tomando en cuenta que el valor promedio de ERYCA con el método modificado, para  $1 \mu\text{M}$  de Trolox fue de  $(0,40 \pm 0,02) \mu\text{M}$  equivalentes de quercetina (como se describe en el cuadro 9).

Complementariamente, en el cuadro 12 se presentan los valores obtenidos con el método Folin-Ciocalteu en equivalentes de ácido gálico (EAG), obtenidos directamente con los extractos de las frutas ( $V_m$ ), tal como es reportado comúnmente en la literatura, así como también los valores correspondientes a la interferencia de compuestos no fenólicos ( $V_e$ ). En la figura 29 se presentan las frutas clasificadas de acuerdo con su valor de ERYCA en el eje-y izquierdo, con su respectivo valor de ORAC-hidrofílico representado en el eje-y derecho. La figura 30 presenta las frutas clasificadas de acuerdo con su contenido total de polifenoles (CTP), incluyendo la representación de las interferencias evaluadas después de la separación de los compuestos no fenólicos con cartuchos de fase sólida.

**Cuadro 10.** Valores de absorbancia obtenidos al finalizar el ensayo ERYCA empleando eritrocitos con cada uno de los extractos de frutas analizados en ausencia de AAPH.

Fruta	Absorbancia después de 360 min de ensayo <sup>a</sup>	Fruta	Absorbancia después de 360 min de ensayo <sup>a</sup>
Agua de coco	1,05497862	Guaba	0,990446
Maracuyá	1,25455861	Plátano cocido	1,22586692
Granadilla	1,2486852	Arándano	1,27050898
Pitanga	1,14112291	Guanábana	1,25223368
Naranjilla	0,999362	Plátano frito	1,04545455
Naranja	1,216455	Chayote	1,02172637
Cas	1,10757523	Guayaba	1,24238026
Mamón chino	1,08729595	Mango	1,09590793
Marañón	1,04373278	Melón	1,18965517
Papaya	1,03146233	Piña	1,07291667
Noni	1,04855491	Pitahaya	1,03056235
Banano	1,09315699	Sandía	1,104531
Pejibaye	1,08480331	Tamarindo	1,16723317
Kiwi	0,99913043	Carambola	1,14546685
Mora	1,26042781	Membrillo	0,99955774
Mamey	0,99888889	Tomate de árbol	0,99567901
<b>Eritrocitos solos</b>	<b>1,07028622</b>	<b>Eritrocitos + AAPH</b>	<b>0,098714</b>

<sup>a</sup> Partiendo de una absorbancia inicial al tiempo 0 min de  $1,0 \pm 0,2$  para todos los casos.

Se aplicaron los dos métodos para analizar capacidad antioxidante (ERYCA y ORAC), con el propósito de determinar si existía correlación entre los resultados de ambos, a la vez que permitió evaluar el modelo celular con una amplia variedad de tipos de muestras. Por otra parte, se incluyó la determinación del contenido total de polifenoles, ya que éstos han sido identificados como los principales responsables de las propiedades antioxidantes en los alimentos de origen vegetal (Magalhães *et al.*, 2009).

Como se observa en las figuras 29 y 30, de las frutas analizadas, el arándano costarricense presentó los valores más altos para ERYCA, ORAC-H y contenido de polifenoles totales. Esta especie de arándano, endémica de nuestro país (*Vaccinium consanguineum* Klotzsch), es un arbusto encontrado entre los 3200 y 3800 m sobre el nivel del mar, en las regiones montañosas de América Central y Panamá (Horn, 1998). El valor antioxidante determinado por ORAC-H es

excepcionalmente alto, si se compara con otras especies de *Vaccinium* encontradas en climas templados, las cuales presentan valores mucho más bajos, de 6000 a 8000 micromoles equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de fruta en materia fresca (Prior *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2004a). Por otra parte, la mora tropical de altura de la variedad vino (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) se ubicó en segunda posición como la fruta con los valores más altos de ORAC-H, ERYCA y contenido de polifenoles totales. Los resultados de ORAC y polifenoles totales fueron muy similares a los reportados previamente por otros autores (Gancel *et al.*, 2010).

Debido a que ninguna de estas bayas es particularmente rica en vitamina C, la interferencia al momento de determinar el contenido total de polifenoles es muy pequeña, siendo menor al 10% del valor inicial ( $V_m$ ) evaluado antes de la separación en fase sólida (cuadro 12). Por su parte, los altos valores de ERYCA observados se encuentran en concordancia con la evidencia de que, estas frutas son grandes fuentes de antocianinas, las cuales pueden mejorar potencialmente la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo *in vitro* e incluso *in vivo* (Youdim *et al.*, 2000).

Si comparamos los valores de ERYCA expresados de acuerdo con el estándar equivalente de Trolox, ambas bayas proveen a los eritrocitos cerca de un 55% más de protección contra el estrés oxidativo que hacia la fluoresceína (como se evalúa con el método ORAC). Evidencia reciente sugiere que las antocianinas pueden interactuar con los eritrocitos, ya que éstas parecen jugar un papel importante en la estabilización de la membrana celular de los glóbulos rojos (Mpiana *et al.*, 2010), lo cual implicaría un potencial efecto de protección antioxidante celular. De esta manera, cuando se compara con el método ORAC-H, el ensayo ERYCA evidencia un nivel adicional de protección, el cual va más allá del simple efecto de neutralización de radicales peroxilo en solución como se evalúa con ORAC.

La anterior observación es verdadera para la mayoría de frutas estudiadas, ya que la capacidad de protección de los eritrocitos con el método ERYCA, expresada en equivalentes de Trolox, es estadísticamente diferente ( $P < 0,02$  para comparaciones pareadas de medias ORAC-H/ERYCA), y en promedio, 2,5 veces mayor que la capacidad de protección valorada para la fluoresceína con el método ORAC-H (cuadro 11). Estos valores demuestran que, en promedio, los

extractos de fruta ejercieron un efecto protector que no se limita solo a la neutralización directa de los radicales libres, sino que también se debe a efectos sinérgicos entre el sistema de defensa natural de los eritrocitos y los compuestos naturales presentes en los extractos de fruta.

En el caso del arándano y la mora, ese nivel adicional de protección de los eritrocitos fue relativamente bajo (1,55 veces mayor en promedio), si se compara con las otras frutas estudiadas, para las cuales dicho nivel extra alcanzó de 4 a 7 veces mayor protección que para la fluoresceína (cuadro 11). Esto significa que, aunque las dos bayas presentaron los valores más altos de capacidad antioxidante tanto en ERYCA como ORAC, la importancia de la protección antioxidante celular es más limitada que en el caso de otras frutas como marañón o maracuyá por ejemplo (cuadro 11).

Solamente un pequeño número de los extractos de fruta proporcionaron a los eritrocitos la misma o menor protección antioxidante que para la fluoresceína; estos fueron: la guaba, papaya, sandía, guanábana, piña y broza de café. Una posible explicación, es que los compuestos antioxidantes principales de estas frutas no pudieron interactuar efectivamente con la membrana de los eritrocitos, de manera que el efecto observado probablemente se debió únicamente a la neutralización de radicales libres. Otra posible razón, es el hecho de que estas frutas podrían contener compuestos que afecten la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo. Para la papaya y la piña, la posible presencia de proteasas activas en el extracto, o en el caso de la broza de café, la presencia de compuestos como el ácido cafeico o clorogénico, podrían incrementar la susceptibilidad de las lipoproteínas de membrana, induciendo una mayor tasa de disrupción celular, aún cuando se observó una buena estabilidad del sistema eritrocitos/extracto de fruta al menos durante el tiempo de duración del ensayo (cuadro 10).

El marañón (*Anacardium occidentale* L.) mostró el tercer valor más alto de ERYCA, mientras que el mamey (*Pouteria sapota*) se ubicó en tercer lugar entre las frutas con mayor valor de ORAC-H y contenido de polifenoles totales (figuras 29 y 30). Los extractos de marañón presentaron mucha mayor capacidad de proteger los eritrocitos del estrés oxidativo inducido por el AAPH (4,3 veces más que para la fluoresceína). El marañón contiene una importante cantidad de vitamina C, reportada en 190 mg / 100 g de fruto (Rufino *et al.*,

2010), lo cual es corroborado por el alto valor de interferencia ( $V_e$ ) utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Este alto contenido de vitamina C también podría explicar el alto valor obtenido con el ensayo de ORAC-H.

Sin embargo, las diferencias entre los valores de ERYCA y ORAC tienden a confirmar, que la protección antioxidante del extracto de marañón es derivada principalmente de efectos celulares no considerados por el ensayo de ORAC-H. De hecho, los compuestos fenólicos principales del marañón son los ácidos anacárdicos (Bolelli Broinizi *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2010), lípidos fenólicos que según se ha reportado, interactúan con la bicapa fosfolipídica de la membrana de los eritrocitos (Stasiuk y Kozubek, 2008; Stasiuk y Kozubek, 2010). A partir de este punto, estos compuestos podrían actuar como sustratos intracelulares para las oxidoreductasas del PMRS (como en el caso de la quercetina), mejorando así la protección de la membrana celular frente a los radicales libres (Fiorani y Accorsi, 2005; Kennett y Kuchel, 2006; Vlachodimitropoulou *et al.*, 2010). El valor mucho mayor de ERYCA en equivalentes de Trolox respecto al valor de ORAC-H parece corroborar esta suposición (figura 29).

Por su parte, el mamey contiene una alta cantidad de carotenoides (de Rosso y Mercadante, 2007), los cuales podrían haber sido parcialmente extraídos con la acetona acuosa. No obstante, se ha encontrado que algunos compuestos carotenoides interactúan con las membranas de los eritrocitos limitando la peroxidación lipídica (Nakagawa *et al.*, 2009), lo cual podría explicar el alto valor de ERYCA obtenido para esta fruta.

Las dos variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) y el cas (*Psidium friedrichsthalianum* [O. Berg] Nied.), también mostraron valores altos con el método ERYCA (figura 29). En promedio, dichos valores fueron 2,5 veces mayores que para el método ORAC-H, cuando se compararon con el mismo equivalente del estándar de Trolox. Los resultados de ORAC y polifenoles totales fueron muy similares a los reportados previamente para estas frutas (Thaipong *et al.*, 2006). De nuevo, la mayor protección antioxidante otorgada a los eritrocitos probablemente sea el resultado de efectos de tipo celular. Al respecto, estas frutas son relativamente ricas y balanceadas en ácido ascórbico, carotenoides y compuestos fenólicos (Thaipong *et al.*, 2006), los cuales podrían

conferir un efecto sinérgico positivo sobre la protección antioxidante de los eritrocitos.

La carambola (*Averrhoa carambola* L.) y la pitahaya roja (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose), presentaron los siguientes valores más altos de ERYCA en la escala de las frutas evaluadas. En ambos casos, pero en mayor medida para la pitahaya, el potencial antioxidante fue mayor con el método ERYCA que con el de ORAC. Al respecto, un valor similar de ORAC fue reportado previamente para la pitahaya roja (Vaillant *et al.*, 2005).

La carambola y la pitahaya roja contienen taninos condensados de catequina y epicatequina (Shui y Leong, 2004; Rebecca *et al.*, 2010), y aunque su extracción con acetona acuosa no se ve particularmente favorecida, parte de estos compuestos podría estar presentes en el extracto, y eventualmente interactuar con los eritrocitos. Recientemente se ha planteado que la captación de (-) epicatequina por parte de los eritrocitos humanos, tiene un papel importante en la regulación del PMRS (Maurya y Prakash, 2011). Adicionalmente, la pitahaya es muy rica en betalainas (Vaillant *et al.*, 2005), las cuales se ha reportado que interactúan con la membrana de los eritrocitos aumentando su resistencia al estrés oxidativo (Tesoriere *et al.*, 2005). Por consiguiente, la comparación entre los métodos de ERYCA y ORAC resulta nuevamente útil para evidenciar los efectos a nivel celular, que mejoran la protección de la membrana de los eritrocitos contra la peroxidación lipídica.

El noni (*Morinda citrifolia* L.), la pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus* [K. Schumann ex Vaupel] Ralf Bauer), el tamarindo (*Tamarindus indica* L.), y la maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*), conforman el cuarto grupo de frutas con un alto valor relativo de ERYCA y un valor medio de ORAC-H. Para el caso del noni, previamente se han reportado valores de ORAC (Chan-Blanco *et al.*, 2007; USDA, 2010), y son comparables con los datos obtenidos en nuestro estudio. Para la pitahaya amarilla y el tamarindo, no fue posible obtener valores publicados por otros autores con el método ORAC-H. Para el tamarindo, se han reportado altos valores con el método antioxidante FRAP (Lamien-Meda *et al.*, 2008), lo cual concuerda con el relativamente alto valor de ORAC-H obtenido en la presente investigación, confirmando así una significativa actividad de neutralización de radicales peróxido.

Dentro de este grupo, la maracuyá presentó casi 5 veces mayor protección para los eritrocitos que para la fluoresceína, a pesar de que su contenido total de polifenoles es relativamente bajo cuando se excluyen las interferencias. Como en el caso de la pitahaya roja, la pitahaya amarilla y el noni proporcionaron alrededor de 2,6 veces más protección para los eritrocitos en el ensayo ERYCA, que para la fluoresceína en el ensayo ORAC-H, cuando se compararon ambos métodos empleando el mismo estándar equivalente de Trolox. Debido a que todos estos extractos presentaron cantidades de compuestos fenólicos un tanto bajas (CTP < 65 mg EAG / 100 g PF), así como una relativamente baja actividad de neutralización de radicales peróxido (como se evaluó con el método ORAC), la protección mejorada de los eritrocitos podría ser atribuida a mecanismos a nivel celular. Este grupo de frutas ha sido poco estudiado, y merece un estudio más detallado de su composición química, con el fin de elucidar cuáles compuestos antioxidantes pueden interactuar con los glóbulos rojos y mejorar la protección de la membrana celular.

Un quinto grupo de frutas con valores medios de ERYCA está conformado por tomate de árbol, membrillo, granadilla, broza de café, naranja, pitanga, banano, mango, guaba, naranjilla, kiwi, piña, guanábana, melón y papaya. Los valores de ORAC-H reportados previamente (USDA, 2010) para la naranja, banano, naranjilla, kiwi, piña y melón se encontraron en el mismo orden de valor que los determinados en nuestro estudio. En el caso de la papaya, nuestro valor de ORAC-H fue significativamente mayor (el doble), que el reportado en la base de datos de la USDA, mientras que para el mango, nuestro valor obtenido fue cerca de 3 veces menor que el reportado. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en el cultivar de la fruta estudiada.

Dentro de este último grupo, la mayoría de las frutas presentaron valores similares de ERYCA y ORAC-H cuando se expresaron como equivalentes de Trolox. Excepciones fueron la granadilla, el mango y la naranjilla, las cuales presentaron valores mayores en ERYCA, y tal como se destacó anteriormente, la broza de café, guaba, piña y guanábana más bien mostraron valores más bajos en el método ERYCA. La granadilla, el mango, la naranja y la naranjilla contienen una cantidad relativamente alta de carotenoides, lo cual podría explicar la mejor respuesta en el ensayo con los eritrocitos, aún cuando su extracción con acetona acuosa pudo ser baja. Resulta interesante notar, que

tanto la granadilla como el maracuyá presentaron la misma relación: alto ERYCA/bajo ORAC (expresados como ET). Dado que ambas pertenecen al género *Passiflora*, probablemente contienen compuestos similares que proveen mayor protección a los eritrocitos, aún cuando tienen un pobre efecto de neutralización directa de radicales peroxilo como se evidencia con ORAC-H.

La broza y las semillas de café contienen cantidades importantes de ácido clorogénico, el cual se ha encontrado que ejerce un efecto protector (dependiente del tiempo y la concentración), contra la hemólisis de los eritrocitos inducida por el AAPH (Tang y Liu, 2008). En los ensayos de ERYCA y ORAC-H (cuadro 11), la broza de café presentó valores similares con el mismo estándar equivalente, lo que comprueba que en nuestro caso, el efecto protector del ácido clorogénico y sus isómeros probablemente se debe más a un efecto de neutralización directa de radicales peroxilo, y no a una protección relacionada con las células.

Para el caso de la guaba, el valor de ORAC-H fue excepcionalmente alto, el cual fue confirmado con datos reportados por otros autores (Silva *et al.*, 2007). Sin embargo, como se observó anteriormente, el extracto mostró una muy baja capacidad de retrasar la hemólisis de los eritrocitos sujetos a estrés oxidativo, indicando la presencia de otras reacciones que incluso podrían haber reducido la resistencia de las membranas de los eritrocitos a la peroxidación lipídica. A pesar de una amplia revisión bibliográfica, prácticamente no existe información disponible sobre la composición bioquímica de esta fruta tropical, lo cual limita la discusión de los resultados obtenidos.

El último grupo de frutas mostró valores muy bajos tanto para los ensayos de ERYCA como los de ORAC-H, incluyendo aguacate, mamón chino, sandía, agua de coco y las frutas cocinadas (plátano, chayote y pejibaye). Excepto para el mamón chino, todas estas frutas también presentaron un contenido total de polifenoles muy bajo, lo cual podría explicar los bajos resultados en actividad antioxidante. El mamón chino exhibió un valor de ORAC-H similar al de la naranja, ya que contiene también una cantidad similar de compuestos no fenólicos interferentes con el reactivo Folin-Ciocalteu (cuadro 12), mayoritariamente vitamina C, tal como se reportó previamente (Leong y Shui, 2002). Por su parte, el aguacate presentó un valor de ORAC-H mucho menor a los valores reportados en otras investigaciones (Wu *et al.*, 2004a; Wu *et al.*,

2004b), incluyendo también un contenido de polifenoles muy bajo. El agua de coco también mostró muy bajos contenidos de polifenoles totales, lo cual podría ser la razón por la que su actividad antioxidante estimada con los dos métodos fue prácticamente inferior al límite de detección.

Dentro de este grupo, las frutas cocinadas (chayote, plátano y pejibaye) presentaron muy baja actividad antioxidante. Debido a su importante contenido de almidón, o a la presencia de compuestos antinutricionales en el caso del pejibaje, estas frutas son consumidas generalmente cocidas, de manera que dicha cocción podría reducir el contenido de compuestos antioxidantes. A pesar de que el pejibaye es una fuente destacada de carotenoides, principalmente isómeros de caroteno (de Rosso y Mercadante, 2007), el extracto presenta un bajo valor de ERYCA, aunque éste último es ligeramente superior que el valor de ORAC-H expresando con el mismo estándar. El plátano maduro frito presentó valores antioxidantes ligeramente superiores que los del plátano cocido, tanto para ERYCA como ORAC, así como en el contenido total de polifenoles, probablemente debido a un contenido mayor de materia seca, o a la presencia de productos de la reacción de Maillard generados durante el proceso de fritura, dado el alto contenido de azúcares del producto, y la temperatura elevada aplicada en su preparación.

Cuadro 11. Valores de ERYCA y ORAC hidrofílico para 36 frutas tropicales evaluadas.

Fruta	Nombre taxonómico	Humedad (%)	ERYCA ( $\mu\text{M}$ EQ/100 g MF) <sup>ab</sup>	ORAC-H ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF) <sup>ab</sup>	ERYCA ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF)	ERYCA/ORAC-H ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF)
Aguacate	<i>Persea americana</i> var. Hass	71,6	124 $\pm$ 6	214 $\pm$ 22	309 $\pm$ 14	1,44
Banano	<i>Musa</i> AAA cv. Grand nain	86,2	398 $\pm$ 21	561 $\pm$ 25	995 $\pm$ 10	1,77
Mora	<i>Rubus adenotrichus</i>	85,4	5757 $\pm$ 358	9327 $\pm$ 618	14392 $\pm$ 247	1,54
Arándano	<i>Vaccinium consanguineum</i>	76,5	6345 $\pm$ 395	10217 $\pm$ 506	15862 $\pm$ 202	1,55
Marañón	<i>Anacardium occidentale</i> L.	88,2	3796 $\pm$ 180	2182 $\pm$ 111	9490 $\pm$ 44	4,35
Chayote	<i>Sechium edule</i>	93,9	69 $\pm$ 5	24 $\pm$ 1	173 $\pm$ 1	7,08
Agua de coco	<i>Cocos nucifera</i>	96,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,36
Broza de café	<i>Coffea arabica</i>	89,2	601 $\pm$ 20	1440 $\pm$ 65	1503 $\pm$ 26	1,04
Cas	<i>Psidium friedrichsthalianum</i>	85,4	2542 $\pm$ 119	2279 $\pm$ 34	6356 $\pm$ 14	2,79
Pitahaya	<i>Hylocereus costaricensis</i>	89,1	1738 $\pm$ 64	935 $\pm$ 54	4346 $\pm$ 22	4,65
Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i>	83,1	612 $\pm$ 18	253 $\pm$ 17	1531 $\pm$ 7	6,06
Guayaba rosada	<i>Psidium guajava</i>	86,3	2777 $\pm$ 117	2608 $\pm$ 177	6941 $\pm$ 71	2,66
Guayaba blanca	<i>Psidium guajava</i>	85,9	2351 $\pm$ 93	2575 $\pm$ 171	5878 $\pm$ 68	2,28
Guaba	<i>Inga edulis</i> M.	63,3	379 $\pm$ 9	2508 $\pm$ 148	947 $\pm$ 59	0,38
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	86,6	287 $\pm$ 22	608 $\pm$ 40	717 $\pm$ 16	1,18
Naranja	<i>Citrus <math>\times</math> limonia</i> Osbeck	91,5	328 $\pm$ 13	339 $\pm$ 14	821 $\pm$ 5	2,42
Mamey	<i>Pouteria sapota</i>	81,3	3764 $\pm$ 183	4829 $\pm$ 233	9411 $\pm$ 93	1,95
Mango	<i>Mangifera indica</i> var. Criollo	84,2	380 $\pm$ 16	255 $\pm$ 8	950 $\pm$ 3	3,72
Melón	<i>Cucumis melo</i> var. Cantaloupe	90,6	246 $\pm$ 4	309 $\pm$ 13	615 $\pm$ 5	1,99
Noni	<i>Morinda citrifolia</i>	86,8	1421 $\pm$ 31	1352 $\pm$ 50	3552 $\pm$ 20	2,63
Naranja	<i>Citrus sinensis</i> var. Valencia	87,1	580 $\pm$ 22	883 $\pm$ 51	1451 $\pm$ 20	1,64
Papaya	<i>Carica papaya</i> var. Criolla	86,3	168 $\pm$ 12	733 $\pm$ 37	420 $\pm$ 15	0,57
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i> var. Flavicarpa	85,7	907 $\pm$ 33	467 $\pm$ 18	2266 $\pm$ 7	4,86

Cuadro 11 (continuación). Valores de ERYCA y ORAC hidrofílico para 36 frutas tropicales evaluadas.

Fruta	Nombre taxonómico	Humedad (%)	ERYCA ( $\mu\text{M}$ EQ/100 g MF) <sup>ab</sup>	ORAC-H ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF) <sup>ab</sup>	ERYCA ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF)	ERYCA/ORAC-H ( $\mu\text{M}$ ET/100 g MF)
Pejibaye	<i>Bactris gasipaes</i>	57,6	30 $\pm$ 2	49 $\pm$ 1	76 $\pm$ 1	1,55
Piña	<i>Ananas comosus</i> var. Dorada	84,5	279 $\pm$ 18	728 $\pm$ 23	697 $\pm$ 9	0,96
Pitahaya amarilla	<i>Hylocereus megalanthus</i>	87,6	1355 $\pm$ 52	1285 $\pm$ 79	3388 $\pm$ 32	2,64
Plátano frito	<i>Musa paradisiaca</i> L AAB	58,4	120 $\pm$ 7	162 $\pm$ 4	300 $\pm$ 2	1,85
Plátano cocido	<i>Musa paradisiaca</i> L AAB	64,8	87 $\pm$ 3	90 $\pm$ 4	218 $\pm$ 2	2,43
Mamón chino	<i>Nephelium lappaceum</i>	85,1	98 $\pm$ 4	78 $\pm$ 4	245 $\pm$ 2	3,12
Guanábana	<i>Annona muricata</i>	85,0	249 $\pm$ 16	762 $\pm$ 49	622 $\pm$ 20	0,82
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	92,3	1820 $\pm$ 81	2696 $\pm$ 103	4550 $\pm$ 41	1,69
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i>	88,6	418 $\pm$ 22	724 $\pm$ 53	1045 $\pm$ 21	1,44
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	56,1	1209 $\pm$ 25	1865 $\pm$ 142	3023 $\pm$ 57	1,62
Tomate de árbol	<i>Solanum betacea</i>	84,5	732 $\pm$ 53	1272 $\pm$ 80	1831 $\pm$ 32	1,44
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	92,2	66 $\pm$ 3	223 $\pm$ 8	164 $\pm$ 3	0,74
Membrillo	<i>Cydonia oblonga</i>	82,0	701 $\pm$ 48	1353 $\pm$ 67	1742 $\pm$ 48	1,29

<sup>a</sup> Datos expresados como materia fresca (MF) del total de la parte comestible de la fruta como forma usual de consumo.

<sup>b</sup> Valor promedio de dos muestras analizadas de manera independiente por sextuplicado cada una  $\pm$  intervalo de confianza al 95%.

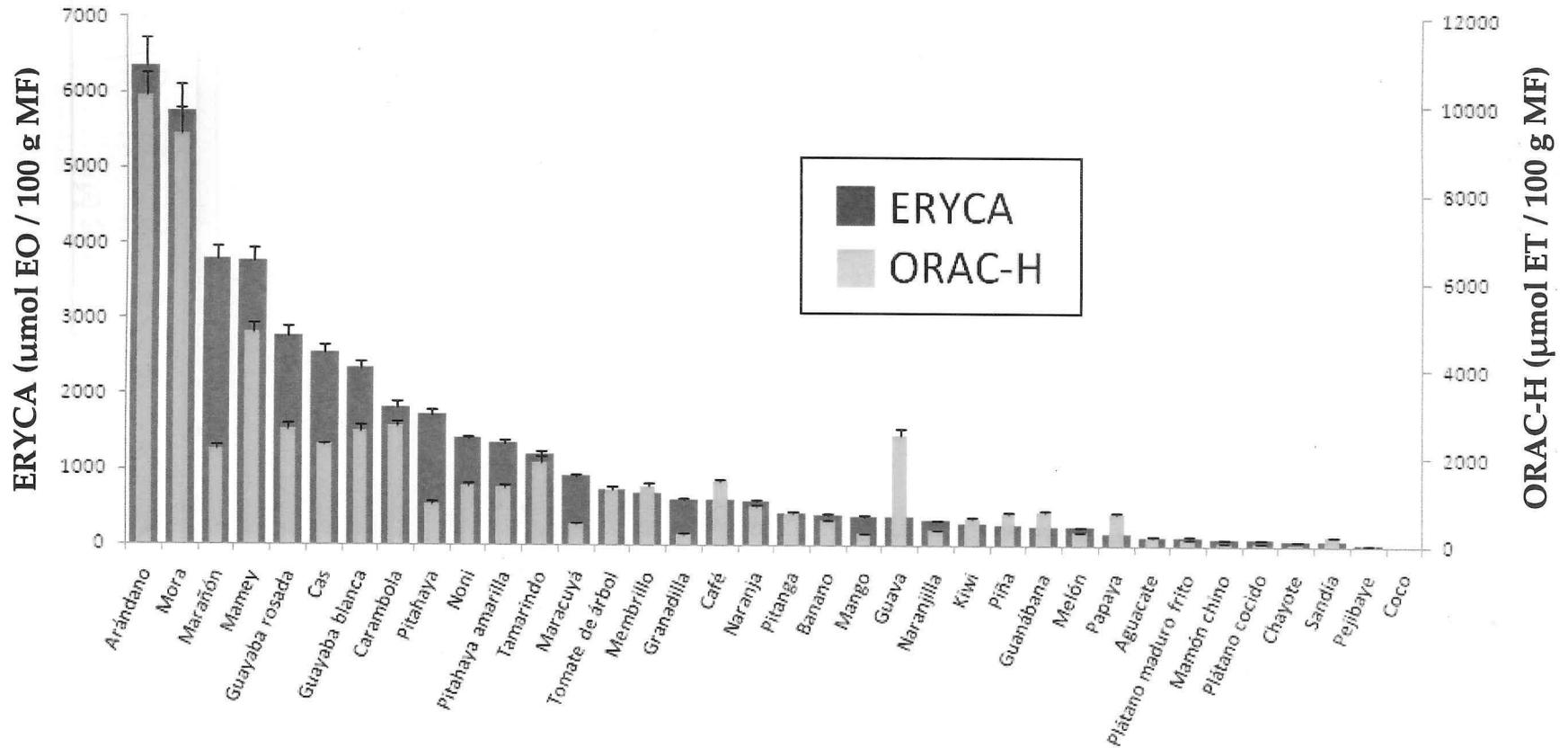
EQ = equivalentes de quercetina / ET = equivalentes de trolox.

**Cuadro 12.** Resultados de la medición de polifenoles totales con el reactivo Folin Ciocalteu en el extracto inicial de fruta ( $V_m$ ), después de la extracción en fase sólida de los compuestos fenólicos ( $V_e$ ) y el contenido total de polifenoles ( $CTP = V_m - V_e$ ).

Fruta	$V_m$ (mg EAG / 100 g MF) <sup>ab</sup>	$V_e$ (mg EAG / 100 g MF) <sup>ab</sup>	CTP (mg EAG / 100 g MF) <sup>ab</sup>	% interferencia
Aguacate	6,9 ± 2,2	4,1 ± 2,7	2,7 ± 0,1	60
Banano	65,5 ± 1,9	12,4 ± 0,4	53,0 ± 2,2	19
Mora	948,6 ± 2,3	82,0 ± 3,4	866,6 ± 1,2	9
Arándano	1454,0 ± 59,7	85,6 ± 2,3	1368,4 ± 57,4	6
Marañón	872 ± 14	167,0 ± 7,8	705,0 ± 7,7	19
Chayote	19,4 ± 0,3	4,8 ± 0,2	14,6 ± 0,5	25
Agua de coco	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0 ± 0	100
Broza de café	1018,5 ± 21,6	624,3 ± 19,0	394,2 ± 2,7	61
Cas	687,4 ± 28,6	69,5 ± 2,1	617,8 ± 26,5	10
Pitahaya	83,8 ± 1,8	67,7 ± 1,1	16,1 ± 0,7	81
Granadilla	50,7 ± 0,4	37,9 ± 1,1	12,8 ± 0,7	75
Guayaba rosada	528,6 ± 4,7	49,3 ± 2,0	479,3 ± 3,0	9
Guayaba blanca	444,6 ± 3,3	77,3 ± 2,4	367,3 ± 1,0	17
Guaba	392,4 ± 3,8	59,0 ± 0,5	333,4 ± 3,3	15
Kiwi	104,7 ± 0,7	77,8 ± 0,8	26,9 ± 0,1	74
Naranjilla	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0 ± 0	78
Mamey	419,2 ± 6,0	35,7 ± 1,8	383,5 ± 7,7	9
Mango	62,8 ± 2,1	21,9 ± 0,6	40,9 ± 1,0	35
Melón	37,1 ± 0,9	31,8 ± 0,6	5,4 ± 0,2	86
Noni	145,5 ± 4,6	104,9 ± 6,4	40,6 ± 1,9	72
Naranja	88,4 ± 3,3	42,1 ± 3,0	46,3 ± 0,3	48
Papaya	99,4 ± 2,1	96,3 ± 2,3	3,1 ± 0,2	97
Maracuyá	68,6 ± 0,1	46,1 ± 0,4	22,5 ± 0,7	67
Pejibaye	57,3 ± 0,5	31,6 ± 0,1	25,6 ± 0,4	55
Piña	106,0 ± 1,8	53,5 ± 1,5	52,5 ± 0,7	51
Pitahaya amarilla	93,8 ± 2,0	29,9 ± 1,0	63,9 ± 3,0	32
Plátano frito	111,3 ± 0,5	33,3 ± 1,6	77,9 ± 2,1	30
Plátano cocido	52,0 ± 0,3	12,6 ± 0,8	39,4 ± 1,0	24
Mamón chino	158,2 ± 4,0	79,8 ± 1,0	78,4 ± 0,1	50
Guanábana	131,9 ± 2,6	46,3 ± 2,9	85,6 ± 2,2	35
Carambola	383,8 ± 6,3	19,9 ± 0,4	363,9 ± 6,7	5
Pitanga	139,1 ± 1,5	35,3 ± 0,8	103,8 ± 0,6	25
Tamarindo	198 ± 0	49,1 ± 1,5	148,9 ± 1,5	25
Tomate de árbol	100,2 ± 0,5	42,0 ± 0,4	58,2 ± 0,1	42
Sandía	21,3 ± 0,3	26,3 ± 0,5	0 ± 0	100
Membrillo	282,03 ± 0,7	231,12 ± 0,60	50,9 ± 0,2	82

<sup>a</sup> Datos expresados como materia fresca (MF) del total de la parte comestible de la fruta (EAG = equivalentes de ácido gálico).

<sup>b</sup> Valor promedio de dos muestras independientes por triplicado ± intervalo de confianza al 95%.



**Figura 29.** Capacidad antioxidante de 36 frutas evaluadas con los métodos ERYCA y ORAC-hidrofilico (valores expresados como equivalentes de quercetina para ERYCA y como equivalentes de Trolox para ORAC-H por cada 100 gramos de materia fresca  $\pm$  intervalo de confianza al 95%).

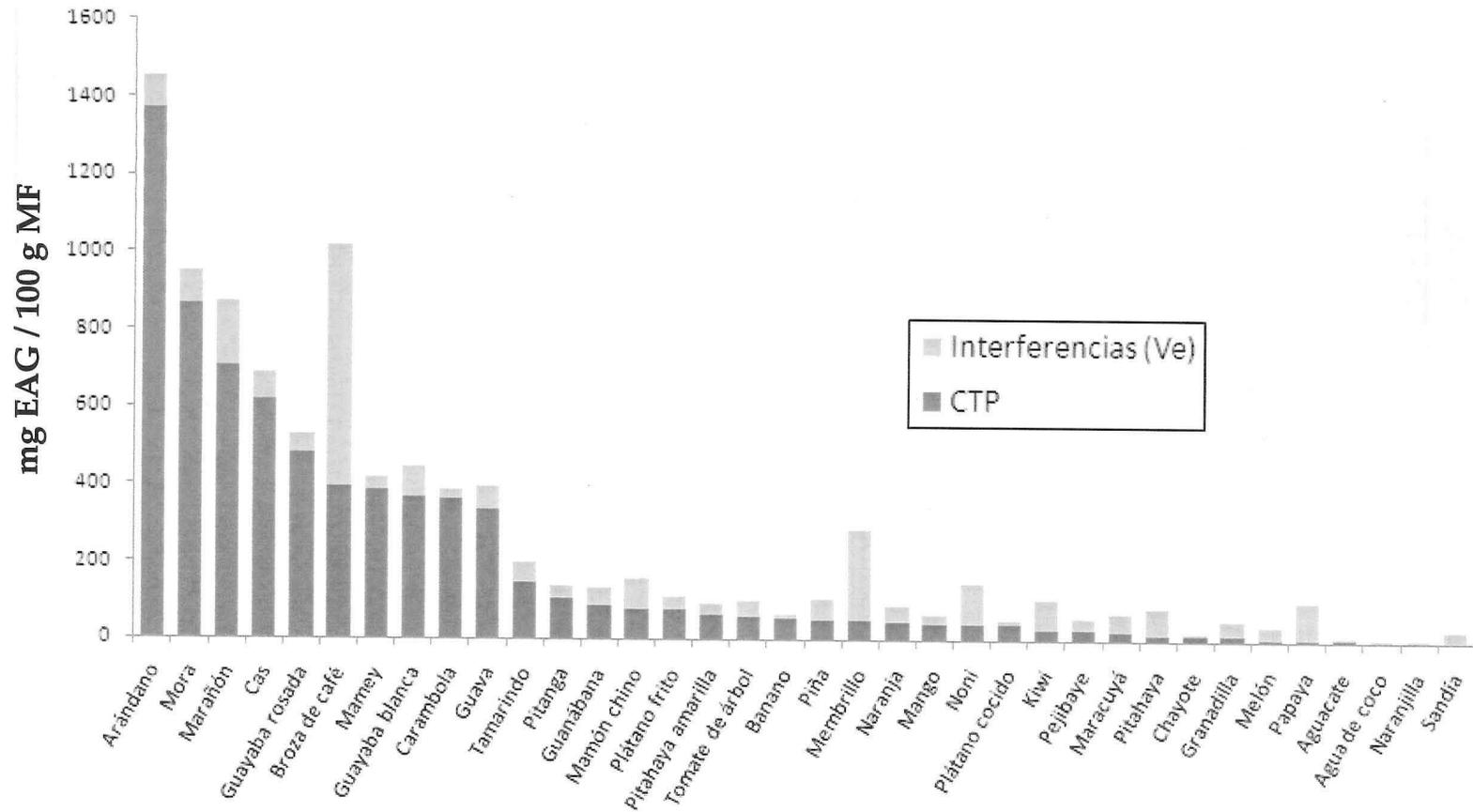


Figura 30. Contenido total de polifenoles (CTP) de 36 frutas evaluadas con el método Folin-Ciocalteu modificado.

En términos generales, las correlaciones de Pearson entre los valores de ERYCA, ORAC-H y CTP fueron altamente positivas, con un  $r^2$  entre 0,887 y 0,926, tanto en base de peso fresco como seco (cuadro 13). Estas altas correlaciones no fueron observadas en la etapa previa de la investigación (sección 3.1), dado que se procesó una menor cantidad de datos. No obstante, estas correlaciones generales ocultan algunas discrepancias entre los métodos, tal como fue destacado previamente. Nótese que el coeficiente de correlación es mucho más bajo para el valor  $V_m$ , el cual es comúnmente reportado en la literatura para el contenido total de polifenoles, y es obtenido cuando el método Folin-Ciocalteu es empleado directamente en el extracto inicial de la fruta sin eliminar la interferencia de compuestos no fenólicos. Con base en la materia seca, la ausencia de correlación del valor  $V_m$  con ambos métodos antioxidantes (ORAC-H y ERYCA) es aún más notoria. Con estos datos se puede concluir que en frutas, el método modificado de Folin-Ciocalteu permite una mejor evaluación de los contenidos totales de polifenoles.

**Cuadro 13.** Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados de ERYCA, ORAC hidrofílico, contenido total de polifenoles (CTP),  $V_m$  y  $V_e$ .

Variables	ERYCA	ORAC-H	CTP	$V_m$
ORAC-H	0,926 (0,926) <sup>a</sup>			
CTP	0,890 (0,903) <sup>a</sup>	0,887 (0,898) <sup>a</sup>		
$V_m$	0,763 (0,493) <sup>a</sup>	0,767 (0,287) <sup>a</sup>	0,939 (0,539) <sup>a</sup>	
$V_e$	0,010 (0,008) <sup>a</sup>	0,035 (0,088) <sup>a</sup>	0,236 (0,349) <sup>a</sup>	0,531 (0,920) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Entre paréntesis el coeficiente de correlación con base en el peso seco de las muestras.

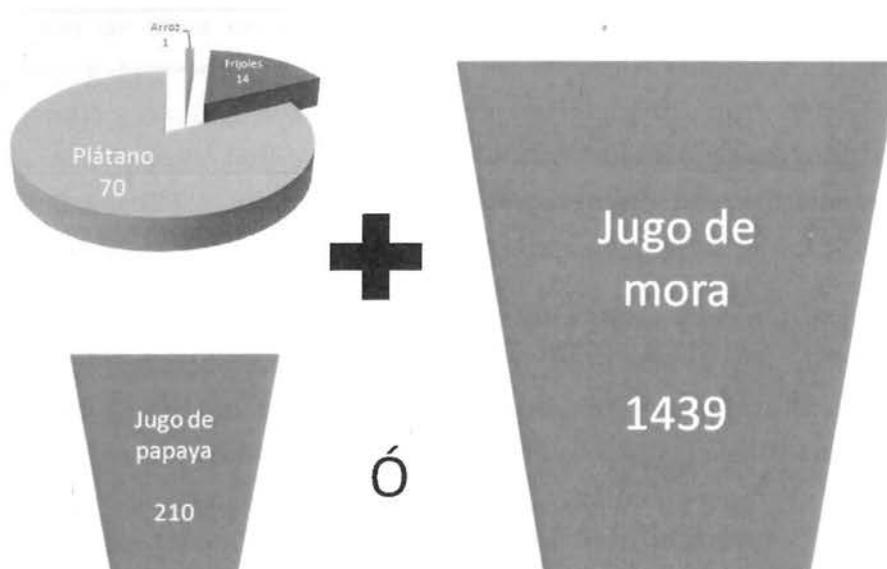
Estos resultados nos sugieren la utilidad de determinar la participación relativa de las frutas, en la capacidad antioxidante potencial de la dieta habitual consumida en América tropical. Para millones de personas en esta región, la cual abarca América Central, la región del Caribe y parte del norte de América del Sur, las comidas usualmente están centradas en arroz y frijoles, a menudo acompañadas de plátano cocido y jugo de fruta, además de la porción ocasional de carne (Glassman *et al.*, 2010).

El arroz blanco cocinado, presentó valores indetectables de ERYCA y de contenido total de polifenoles, y un valor de ORAC-H de solo  $(3,9 \pm 0,3)$  micromoles equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de materia fresca. Los

frijoles negros (*Phaseolus vulgaris* L.), cocinados de la manera usual, mostraron un valor de ERYCA de  $(9,3 \pm 0,3)$  micromoles equivalentes de quercetina por cada 100 gramos de materia fresca, un valor de ORAC-H de  $(237 \pm 7)$   $\mu\text{mol ET}$  por 100 g de PF y un contenido total de polifenoles de  $(43,6 \pm 1,7)$  miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de materia fresca. Notablemente, el extracto de frijoles mostró una muy limitada capacidad de retrasar la hemólisis de los eritrocitos, en contraste con su alto valor de ORAC-H. Una posible explicación es que los frijoles negros, aún cocidos, pueden contener residuales de inhibidores enzimáticos, hemaglutininas y saponinas que exhiben propiedades hemolíticas conocidas.

Se asumió que una comida habitual en nuestro país incluye alrededor de 100 g de arroz cocido, 30 g de frijoles cocidos, 50 g de plátano maduro frito y 250 ml de un jugo de fruta diluido (Ministerio de Salud, 1996). Se utilizaron dos jugos para la comparación: uno elaborado con papaya, fruta que presentó valores antioxidantes relativamente bajos, y otro preparado con mora, la cual exhibió uno de los mayores valores antioxidantes. La contribución al potencial antioxidante total de la dieta habitual, evaluado por ERYCA, de los productos basados en frutas (plátano y jugo) fue de 95% con el jugo de papaya, y del 99% con el jugo de mora (figura 31). De acuerdo con el método ORAC-H, la contribución de estos productos es menor, entre 65% (con jugo de papaya) y 91% (con jugo de mora), pero aún sigue siendo altamente preponderante.

### Valores ERYCA ( $\mu\text{mol EQ}$ )



**Figura 31.** Contribución respectiva al potencial antioxidante total de una comida habitual evaluada con el ensayo ERYCA (jugo de papaya en dilución 1/2 en agua y jugo de mora en dilución 1/10 en agua).

#### **4.3. Efecto del tratamiento térmico y la digestión *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de un jugo de fruta**

A partir de los resultados obtenidos en la sección anterior (cuadro 11), se determinó que el arándano y la mora fueron los alimentos con los valores más altos en las tres variables respuesta (ORAC, ERYCA y polifenoles totales). Para la selección del producto que sería analizado en esta siguiente etapa de la investigación, también fueron considerados otros factores, como extensión de siembra, relevancia económica, frecuencia de consumo, costo y facilidad de adquisición, entre otros.

Como se ha reportado, la mora es una buena fuente de antioxidantes, pues contiene niveles importantes de varios compuestos fenólicos (Acosta-Montoya *et al.*, 2010). En el caso de las variedades tropicales de altura, como la utilizada en la presente investigación, el fruto posee mayores contenidos de antocianinas y elagitaninos solubles que otras moras de climas templados, e incluso sobrepasa a la granada real ("pomegranate"), considerada como una "súper

fruta" a nivel antioxidante (Gancel *et al.*, 2010). Así mismo, para el año 2005, la producción de mora en nuestro país se estimó en aproximadamente 1650 toneladas, y la producción combinada de México, Centro y Sur América correspondió a casi el 25% de la producción mundial (Strik *et al.*, 2007). De esta manera, se seleccionó la mora para la producción de un jugo microfiltrado, el cual fue sometido a un tratamiento térmico y a un proceso simulado de digestión *in vitro*.

Respecto al tratamiento térmico, en la figura 32 se presenta el perfil de temperatura registrado a lo largo del ensayo, con lo cual se comprueba que la temperatura de tratamiento (90 °C), fue alcanzada rápidamente (menos de 1 min), y se mantuvo constante durante los tiempos de tratamiento establecidos. Lo anterior resulta de gran importancia, pues se trató de reproducir a nivel de laboratorio, un tratamiento de pasteurización industrial típico, el cual se caracteriza por una elevación rápida de la temperatura al nivel de pasteurización, el mantenimiento de dicha temperatura por el tiempo requerido, y finalmente el descenso rápido de la misma (Ramaswamy y Marcotte, 2006). Adicionalmente, debe resaltarse que los tiempos de pasteurización en jugos de fruta comúnmente son cortos (cuadro 2), de ahí la selección de los tiempos de tratamiento aplicados en la presente investigación.

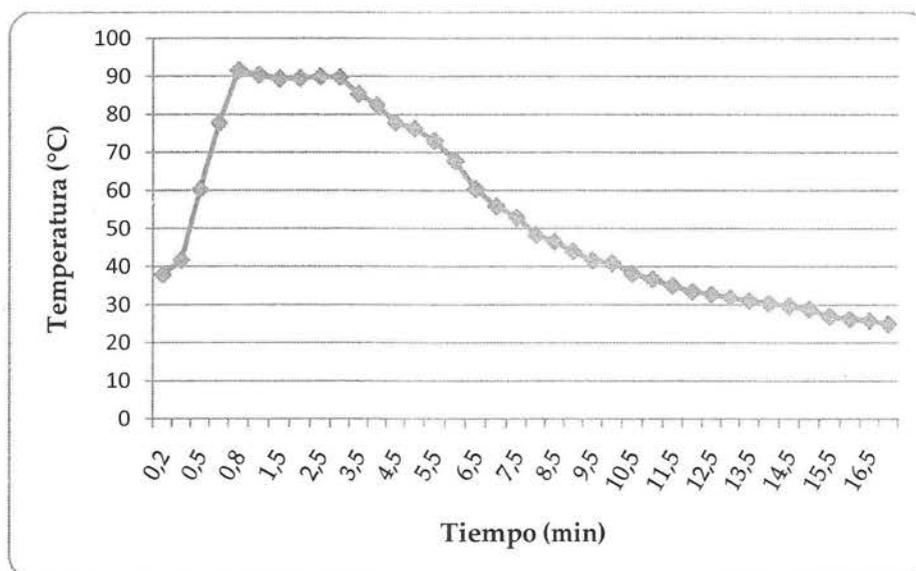


Figura 32. Perfil de tiempo y temperatura registrado durante el tratamiento térmico aplicado al jugo microfiltrado de mora.

El cuadro 14 presenta los valores promedio de capacidad antioxidante (ERYCA y ORAC) y polifenoles totales, correspondientes al jugo de mora microfiltrado sometido a los diferentes tratamientos. Con base en el análisis estadístico (cuadro 15), se observa que el tratamiento térmico por sí solo no presentó un efecto significativo sobre las variables respuesta analizadas. Sin embargo, la combinación del tratamiento térmico y la digestión *in vitro*, sí mostró un efecto significativo sobre los valores de capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles.

Respecto al tratamiento térmico, como se ha comentado antes, su efecto sobre los compuestos antioxidantes es dependiente de la matriz y el tipo de proceso (Damodaran *et al.*, 2008). En jugo de naranja (“blood orange”), tratado durante 1 min a 80 °C, Lo Scalzo *et al.* (2004), reportan un ligero incremento del contenido de compuestos fenólicos después de dicho tratamiento, lo cual se reflejó en un pequeño aumento de la capacidad antioxidante del jugo. Por el contrario, en jugo de toronja, Igual *et al.* (2010), observaron que la pasteurización disminuyó en un 25% el contenido total de compuestos fenólicos, y en un 80% la capacidad antioxidante. En el caso del procesamiento de la fresa en jugos y purés, Hartmann *et al.* (2008), encontraron un aumento del 6-10% de la capacidad antioxidante con el tratamiento térmico, aún cuando se evidenció un descenso importante (cerca del 30%), del contenido total de polifenoles.

Para el caso del procesamiento de la mora, en la elaboración de una bebida a escala industrial, Gancel *et al.* (2010) determinaron que el tratamiento térmico, en especial el escaldado, redujo drásticamente el contenido de antocianinas, mientras que el llenado en caliente, degradó de manera importante el contenido de elagitaninos; lo cual tuvo un impacto negativo en la capacidad antioxidante del producto final. Por su parte, en la elaboración de purés y jugos de mora, con el tratamiento térmico se reportan pérdidas de hasta un 65% de antocianinas monoméricas, asociado a un descenso importante en la capacidad antioxidante (Hager *et al.*, 2008); mientras que para los elagitaninos, se reportan cambios mínimos por el procesamiento térmico (Hager *et al.*, 2010).

En nuestro caso, a pesar de que el proceso de pasteurización no presentó un efecto significativo sobre el contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante del jugo microfiltrado de mora, sí se observó un ligero descenso de la actividad antioxidante por ERYCA y ORAC en el tiempo inicial de

tratamiento térmico (30 s), seguido de un aumento de dicha actividad con el tratamiento más prolongado (cuadro 14). De esta manera, para tratamientos cortos con calor, podría detectarse una reducción de las propiedades antioxidantes debido a pérdida de antioxidantes naturales y/o la formación de sustancias pro-oxidantes; mientras que para tiempos prolongados de calentamiento, esta pérdida podría verse minimizada o incluso incrementada, por el mejoramiento de la actividad antioxidante, así como la generación de nuevas especies con actividad antioxidante (Nicoli *et al.*, 1999).

Sin embargo, deben resaltarse los resultados obtenidos de la combinación del tratamiento térmico y la digestión *in vitro*, pues se detectó un descenso importante de la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles (cuadro 14). Aún más, se podría establecer una relación entre el tiempo de pasteurización y el proceso de digestión simulada, ya que como se observa en la figura 33, entre más prolongado el tratamiento térmico, mayor fue la disminución de los parámetros analizados por efecto de la digestión *in vitro*.

En las muestras que no fueron pasteurizadas, con el proceso de digestión se detectó una disminución pequeña de la capacidad antioxidante (7-8%), mientras que en las muestras que también fueron tratadas térmicamente, las pérdidas de capacidad antioxidante fueron desde un 18-19% (30 s) hasta un 37-44% (180 s). En cuanto a los polifenoles totales, dicho efecto fue más contundente, pues las muestras sin tratamiento térmico evidenciaron una disminución del 40% con la digestión *in vitro*, y al combinar con el tratamiento térmico, dicha disminución alcanzó hasta un 70% (figura 33).

Estas observaciones podrían relacionarse con el hecho de que, el tratamiento térmico podría haber inducido cambios en la estructura química de los compuestos antioxidantes originales, así como su asociación con otras macromoléculas dentro del jugo, lo cual aumentó su vulnerabilidad a la actividad de las enzimas empleadas en la digestión *in vitro*.

**Cuadro 14.** Valores de ERYCA, ORAC y contenido total de polifenoles de las muestras de jugo microfiltrado sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	ERYCA ( $\mu\text{M EQ} / \text{l de jugo}$ ) <sup>a</sup>	ORAC-H ( $\mu\text{M ET} / \text{l de jugo}$ ) <sup>a</sup>	CTP (mg EAG / l de jugo) <sup>b</sup>
90 °C x 0 s, sin digerir	20206 $\pm$ 1399	34552 $\pm$ 2392	2597 $\pm$ 17
90 °C x 30 s, sin digerir	19801 $\pm$ 1241	32150 $\pm$ 2122	2660 $\pm$ 27
90 °C x 90 s, sin digerir	25070 $\pm$ 872	42870 $\pm$ 979	2704 $\pm$ 15
90 °C x 180 s, sin digerir	22621 $\pm$ 1092	38682 $\pm$ 1868	2752 $\pm$ 17
90 °C x 0 s, digerido	18807 $\pm$ 764	32161 $\pm$ 1306	1531 $\pm$ 12
90 °C x 30 s, digerido	16568 $\pm$ 866	28331 $\pm$ 1481	903 $\pm$ 13
90 °C x 90 s, digerido	14609 $\pm$ 775	24981 $\pm$ 1325	793 $\pm$ 14
90 °C x 180 s, digerido	12641 $\pm$ 514	21615 $\pm$ 880	781 $\pm$ 13

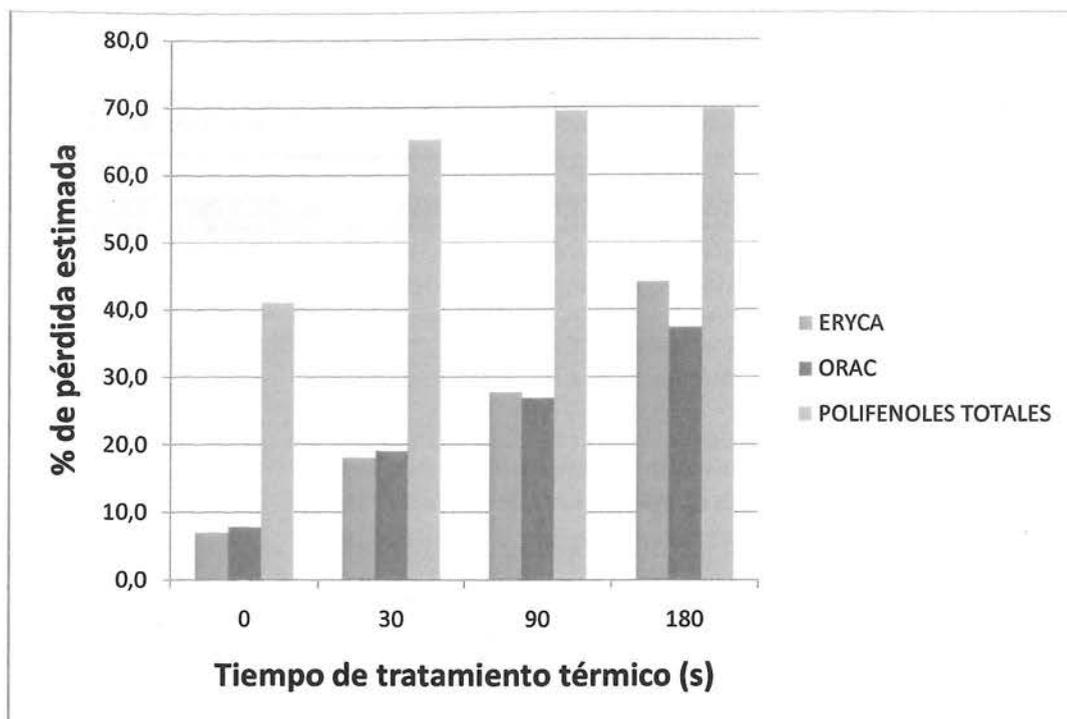
<sup>a</sup> Valor promedio de dos muestras analizadas de manera independiente por triplicado, con seis réplicas cada una  $\pm$  intervalo de confianza al 95%.

<sup>b</sup> Valor promedio de dos muestras independientes analizadas por triplicado, con tres réplicas cada una  $\pm$  intervalo de confianza al 95%.

**Cuadro 15.** Análisis de covarianza del efecto del tratamiento térmico y la digestión *in vitro*, sobre los valores de ERYCA, ORAC y polifenoles totales del jugo de mora microfiltrado.

Efectos	Probabilidad asociada		
	ERYCA	ORAC	POLIFENOLES TOTALES
Tratamiento térmico	0,3340	0,3250	0,2757
Tratamiento térmico + Digestión <i>in vitro</i>	0,0069*	0,0069*	0,0415*

\* Significativo,  $p < 0,05$ .



**Figura 33.** Pérdidas estimadas de los valores de capacidad antioxidante y polifenoles totales por la digestión *in vitro* del jugo microfiltrado de mora.

El cuadro 16 presenta resultados de algunos ensayos de simulación *in vitro* de la digestión realizados por otros autores, empleando condiciones similares a las del presente trabajo (digestión gástrica con pepsina y HCl, seguida de digestión intestinal con pancreatina y sales biliares). Como se observa, en la mayoría de los casos se presentan pérdidas grandes en el contenido de compuestos fenólicos, como en el caso de la presente investigación. Sin embargo, a pesar de dicha disminución, en algunos casos también se reportan aumentos en la capacidad antioxidante de los alimentos, generalmente relacionados con la posible generación de nuevas especies con actividad antioxidante.

Como se ha comentado con anterioridad, los fitoquímicos, una vez absorbidos, pueden encontrarse en el organismo inalterados o en forma de varios metabolitos. En este sentido, los polifenoles son en gran parte deglicosilados cuando son absorbidos a través de la barrera intestinal, y son conjugados a grupos glucoronil y sulfato a nivel de los intestinos y el hígado, lo cual podría relacionarse con un impacto directo en su capacidad antioxidante (Manach *et al.*, 2009).

**Cuadro 16.** Efecto de la digestión simulada a nivel *in vitro* sobre el contenido de antioxidantes reportado por otros autores.

Alimento	Efecto principal	Referencia
Aronia ("chokeberry")	Pérdida del 43% de antocianinas totales y del 26% de flavonoles. Aumento del contenido de ácido clorogénico en 24%.	Bermúdez-Soto <i>et al.</i> (2007).
Bebida de frutas (uva, naranja y albaricoque)	Disminución en un 47% del contenido total de compuestos fenólicos.	Cilla <i>et al.</i> (2009).
Bebida de frutas (uva, naranja y albaricoque)	Aumento del 59% del valor antioxidante por ORAC. Disminución del contenido de ácido ascórbico en 36% y de polifenoles en 16%.	Cilla <i>et al.</i> (2011).
Frambuesa	Pérdida del 30% de las antocianinas.	McDougall <i>et al.</i> (2005).
Vino tinto (diferentes fracciones)	Actividad antioxidante aumentó de 100 a 1000 veces, y aumentó la concentración de algunos compuestos fenólicos como ácido cafeico y <i>p</i> -cumárico.	Noguer <i>et al.</i> (2008).
Jugo de granada real ("pomegranate")	Pérdida del 70% de los compuestos fenólicos totales, degradación > 95% del ácido ascórbico.	Pérez-Vicente <i>et al.</i> (2002).
Dieta mediterránea (España)	Disminución del 52% de los polifenoles dietarios totales	Saura-Calixto <i>et al.</i> (2007).
"Chokeberry", pera, banano, manzana, ciruela	"Chokeberries", peras y bananos con menor potencial antioxidante que las frutas frescas. Manzanas y ciruelas con efecto inverso. En todos los casos disminuyó el contenido de polifenoles totales.	Tarko <i>et al.</i> (2009)

Por otra parte, la evaluación de los polifenoles por HPLC fue empleada solamente para el análisis cualitativo de las muestras, de manera que se pudieran detectar cambios en el perfil de polifenoles como resultado de los distintos tratamientos. En primer lugar, en la figura 34 se resumen los resultados del análisis por HPLC de la muestra de jugo microfiltrado de mora sin tratar. Los cuatro compuestos fenólicos identificados corresponden a cianidin-3-glucósido y cianidin-3-malonil glucósido (antocianinas principales) y lambertianina C y sanguin H-6 (elagitaninos principales). Dichos resultados coinciden con los reportados por otros autores empleando mora de la misma variedad utilizada en el presente trabajo (Mertz *et al.*, 2007; Gancel *et al.*, 2010).

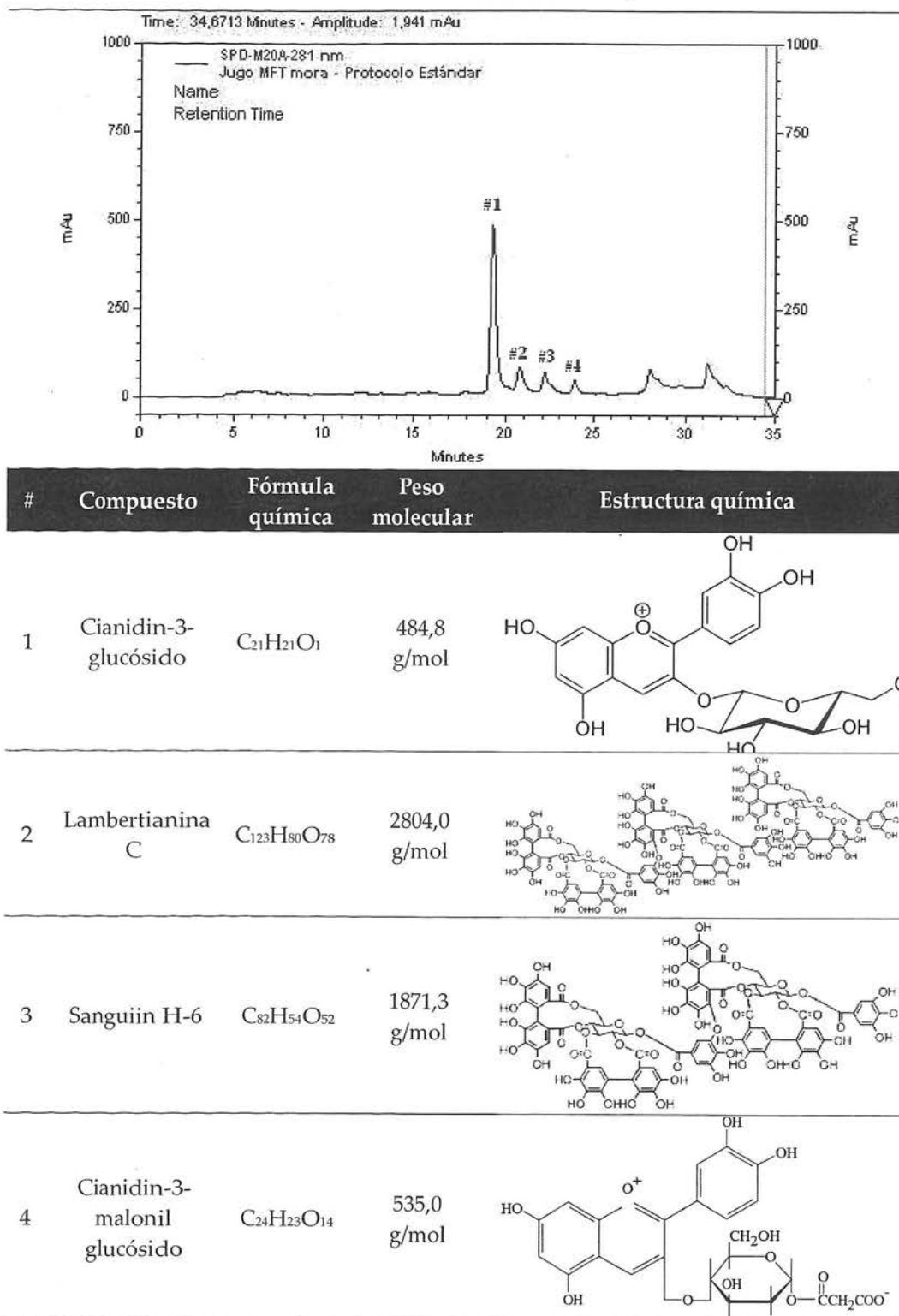


Figura 34. Compuestos fenólicos principales detectados por HPLC en el jugo de mora.

En el cuadro 17 se presentan los valores de antocianinas totales y elagitaninos totales, evaluados mediante HPLC, del jugo de mora microfiltrado sometido a los distintos tratamientos aplicados para la presente investigación. Debe resaltarse que no fue posible obtener datos de las muestras sometidas a la digestión *in vitro*, ya que la concentración final de dichos compuestos fue inferior a los límites de detección del equipo de HPLC. Se emplearon varios métodos de concentración para éstas muestras (burbujeo con nitrógeno y evaporación en rotavapor), los cuales no fueron suficientes para obtener una concentración adecuada, a la vez que en el caso del rotavapor, se requería de un tiempo prolongado de calentamiento, el cual podría haber afectado los valores de capacidad antioxidante y polifenoles totales.

Como se observa en el cuadro 17, los contenidos de antocianinas y elagitaninos totales permanecieron prácticamente inalterados durante el tratamiento térmico, pues no se encontró diferencia significativa entre dichos valores ( $p= 0,5284$  y  $0,5653$  respectivamente). Así mismo, no se detectaron cambios aparentes en los cromatogramas de HPLC para cada tiempo de tratamiento térmico, por lo que fueron prácticamente iguales al cromatograma mostrado en la figura 34. Dichos resultados coinciden con el comportamiento observado, tanto para la capacidad antioxidante evaluada mediante ERYCA y ORAC, como para el contenido de polifenoles totales (cuadro 14).

**Cuadro 17.** Valores de antocianinas y elagitaninos totales estimados por HPLC de las muestras de jugo sometidas a tratamiento térmico.

Tratamiento	Antocianinas totales (mg equivalentes de cianidin-3- glucósido / l de jugo) <sup>a</sup>	Elagitaninos totales (mg equivalentes de ácido elágico / l de jugo) <sup>a</sup>
90 °C x 0 s	1325 ± 107	1087 ± 91
90 °C x 30 s	1260 ± 23	1137 ± 13
90 °C x 90 s	1274 ± 56	1006 ± 55
90 °C x 180 s	1344 ± 60	1213 ± 30

<sup>a</sup> Promedio de dos muestras independientes analizadas por triplicado ± intervalo de confianza al 95%.

## 5 CONCLUSIONES Y OTRAS CONSIDERACIONES

---

El método ERYCA constituye un ensayo original para emplear un modelo celular en la determinación automatizada de la actividad antioxidante. El método es relativamente rápido (5-6 h aproximadamente), si se compara con otros modelos celulares. Debido a que puede ser automatizado, en un solo análisis se pueden evaluar hasta 8 muestras por sextuplicado con 2 curvas patrón. La metodología resultó reproducible, ya sea empleando eritrocitos de diferentes donadores, o empleando la misma muestra de sangre con hasta 58 días de almacenamiento en refrigeración. El ensayo resultó ser más sensible que el conocido método de ORAC, pues permitió discriminar mejor entre muestras distintas. Adicionalmente, a pesar de ser un modelo celular, el método ERYCA resultó poco costoso, pues se eliminan las etapas de cultivo celular.

Tal como se mencionó en el marco teórico del presente documento, los eritrocitos ya han sido utilizados para evaluar la capacidad antioxidante, principalmente a través de la medición del nivel de hemólisis causado por los radicales libres. Al realizar el ensayo desde esa perspectiva, se requiere una etapa adicional de centrifugación, la cual además de consumir tiempo, impide la automatización y la realización de estudios de cinética para grandes números de muestras. En adición, se requieren consideraciones especiales para asegurar que las respuestas evaluadas son específicas de la hemólisis, y que no incluyen la subsiguiente oxidación de la hemoglobina que está expuesta directamente a los radicales libres.

Otros métodos más conocidos para evaluar actividad/capacidad antioxidante como ORAC, TRAP, TEAC, TOSC, PSC y FRAP, presentan limitaciones debido a la incapacidad de representar la complejidad de los sistemas biológicos. Estos métodos evalúan solamente reacciones químicas, las cuales no pueden ser interpretadas como representativas de la actividad *in vivo*, ya que no toman en consideración la biodisponibilidad, estabilidad, retención en los tejidos o reactividad de los compuestos bajo condiciones fisiológicas. En este sentido, los modelos celulares se plantean como un enfoque más completo para la determinación de la actividad antioxidante de alimentos, fitoquímicos y suplementos dietarios con potencial actividad biológica.

En esta etapa inicial de desarrollo de la metodología, solo se tomó en consideración la actividad antioxidante global. No se realizó distinción alguna entre las moléculas con capacidad de atravesar o interactuar con las membranas celulares de los eritrocitos. En la siguiente etapa de la investigación se abordó dicho aspecto, al incluir un paso adicional de lavado después de la incubación de los eritrocitos con los compuestos antioxidantes.

Al incorporar el paso adicional de incubación al método ERYCA, se comprobó que éste método permite evaluar tanto la neutralización directa de radicales libres, como también la potencial protección a nivel celular. Los resultados obtenidos mostraron que, cuando se compara con el mismo equivalente del estándar de Trolox, el efecto protector de los extractos de fruta sobre los eritrocitos fue en promedio, 2,5 veces mayor que la protección sobre la fluoresceína, tal como es valorado con el método de ORAC-hidrofílico. La protección antioxidante celular de los extractos evaluados con ERYCA osciló entre 0 y 6345 micromoles equivalentes de quercetina por cada 100 gramos de materia fresca, siendo las bayas tropicales: arándano y mora (*Vaccinium consanguineum* y *Rubus adenotrichus*), las frutas con los mayores valores antioxidantes.

Los coeficientes de correlación entre ERYCA, ORAC-H y contenido total de polifenoles (evaluado con un método modificado que excluye la interferencia por compuestos no fenólicos), fueron bastante altos ( $r^2 > 0,89$ ), aún cuando se encontraron algunas discrepancias entre los resultados de los diferentes métodos.

En el método ERYCA, no se puede especificar qué parte de la protección antioxidante exhibida se debe a procesos relacionados con las células o a la neutralización directa de radicales libres en el medio circundante. No obstante, gracias a la comparación con ORAC, el cual evalúa exclusivamente la actividad de neutralización de radicales peroxilo, se evidencia la importancia relativa de la protección celular sobre la capacidad antioxidante global de los extractos de frutas. En consecuencia, el ensayo ERYCA en combinación con el de ORAC, permite mejorar las estrategias de determinación del potencial antioxidante de los alimentos.

Adicionalmente, los resultados obtenidos con ambos ensayos, en particular con ERYCA, demuestran la importancia de los productos basados en frutas como fuentes primordiales de antioxidantes en la dieta en América Latina. Esta información es altamente relevante, debido a que dicha dieta es consumida habitualmente por millones de personas, incluyendo los más pobres, a la vez que se ha observado una tendencia a remplazar el hábito tradicional de consumir jugos de frutas por bebidas gaseosas, las cuales tienen prácticamente nula actividad antioxidante. Este último aspecto podría explicar parcialmente, la creciente incidencia y prevalencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo observada recientemente en esta población.

En concordancia con otras investigaciones, se encontró que la degradación de compuestos bioactivos en alimentos debido al procesamiento, es un factor dependiente del tipo de proceso y de la matriz. En el caso de la presente investigación, el tratamiento térmico por sí solo no representó una depreciación del contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante del jugo microfiltrado de mora. Sin embargo, se requiere un mejor entendimiento del proceso de degradación de dichos compuestos, no solo por las pérdidas potenciales de los mismos durante el procesamiento y almacenamiento, sino también por las posibles implicaciones a la salud humana (como el desarrollo de sustancias con actividad prooxidativa por ejemplo).

Los resultados de la digestión *in vitro* del presente trabajo, muestran que los polifenoles dietarios son altamente sensibles a las condiciones simuladas del tracto estomacal e intestino delgado, pues se presentaron pérdidas muy elevadas del contenido total de polifenoles, lo cual estaría directamente relacionado con la disminución de la capacidad antioxidante del jugo, también reportada en esta investigación. Así mismo, se evidenció un efecto de sinergismo, entre el tratamiento térmico y la digestión *in vitro*, pues entre más prolongado el proceso de pasteurización, mayores las pérdidas por acción de la digestión simulada.

Además, una implicación importante del proceso de digestión *in vitro*, se refiere a las posibles modificaciones de la estructura química de los polifenoles originales, lo cual podría relacionarse con cambios en la biodisponibilidad y actividad biológica de éstos a nivel *in vivo*.

A partir de estos resultados, se podría inferir que una importante proporción de los compuestos antioxidantes en el jugo, podrían haber sido transformados a otras formas estructurales desconocidas o que no pudieron ser detectadas bajo la metodología empleada. Esto refuerza la necesidad de contar con estudios clínicos en humanos, de manera que se pueda estudiar los productos finales de la ingesta de los alimentos (plasma, orina, heces), para dilucidar el destino metabólico de estos compuestos, y poder así obtener una idea más cercana del potencial antioxidante “real” de los alimentos.

## 6 BIBLIOGRAFÍA CITADA

---

- Acosta-Montoya, Ó.; Vaillant, F.; Cozzano, S.; Mertz, C.; Pérez, A.M. y Castro, M.V. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119(4): 1497-1501.
- Akai, Y.; Nakajima, N.; Ito, Y.; Matsui, T.; Iwasaki, A. y Arakawa, Y. 2007. Green tea polyphenols reduce gastric epithelial cell proliferation and apoptosis stimulated by *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition*. 40(2): 108-115.
- Álvarez, P.; Alvarado, C.; Mathieu, F.; Jiménez, L. y De la Fuente, M. 2006. Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *European Journal of Nutrition*. 45(8): 428-438.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland.
- Arnoldi, A. 2002. Thermal processing and nutritional quality. En: Henry, C.J.K. y Chapman, C. (editores). *The nutrition handbook for food processors*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. Capítulo 11.
- Babu, C.K.; Khanna, S.K. y Das, M. 2008. Antioxidant status of erythrocytes and their response to oxidative challenge in humans with argemone oil poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 230: 304-311.
- Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P. y Pereira, J.A. 2008a. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*. 107(3): 1106-1113.
- Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P. y Pereira, J.A. 2008b. Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 46(6): 2230-2235.

- Benabdeslam, H.; Abidi, H.; Garcia, I.; Bellon, G.; Gilly, R. y Revol, A. 1999. Lipid peroxidation and antioxidant defenses in cystic fibrosis patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 37: 511-516.
- Bermúdez-Soto, M.-J.; Tomás-Barberán, F.-A. y García-Conesa, M.-T. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 102: 865-874.
- Bolelli Broinizi, P.R.; Silva de Andrade-Wartha, E.R.; de Oliveira e Silva, A.M.; Vidal Nova, A.J.; Pavan Torres, R.; Monteiro Cordeiro Azeredo, H.; Elesbao Alves, R. y Mancini-Filho, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the cashew apple (*Anacardium occidentale* L). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 27(4): 902-908.
- Buehler, P.W. y Alayash, A.I. 2005. Redox biology of blood revisited: The role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxidant and Redox Signaling*. 7(11-12): 1755-1760.
- Bureau, A.; Lahet, J.J.; Lenfant, F.; Bouyer, F.; Petitjean, M.; Chaillot, B. y Freysz, M. 2005. Optimization of a model of red blood cells for the study of antioxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 59(7): 341-344.
- Celedon, G.; Gonzalez, G.; Lissi, E.A.; Hidalgo, G. 2001a. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by the localization of radical generation. *IUBMB Life*. 51(6): 377-380.
- Celedon, G.; Rodriguez, I.; Espana, J.; Escobar, J.; Lissi, E. 2001b. Contribution of haemoglobin and membrane constituents modification to human erythrocyte damage promoted by peroxy radicals of different charge and hydrophobicity. *Free Radical Research*. 34(1): 17-31.
- Cerdá, B.; Periago, P.; Espín, J.C. y Tomás-Barberán, F.A. 2005. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(14): 5571-5576.

- Chan-Blanco, Y.; Vaillant, F.; Pérez, A.M.; Belleville, M.P.; Zuniga, C. y Brat, P. 2007. The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): microbiological flora and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(9): 1710-1716.
- Chirinos, R.; Campos, D.; Warnier, M.; Pedreschi, R.; Rees, J.-F. y Larondelle, Y. 2008. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. *Food Chemistry* 111(1): 98-105.
- Christen, G. y Smith, J. 2000. *Food Chemistry: Principles and applications*. Science Technology System. Sacramento, California. 454 p.
- Cilla, A.; González-Sarriás, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. y Barberá, R. 2009. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*. 114: 813-820.
- Cilla, A; Perales, S.; Lagarda, M.J.; Barberá, R.; Clemente, G. y Farré, R. 2011. Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 87-94.
- Cisse, M.; Vaillant, F.; Acosta O.; Dhuique-Mayer, C. y Dornier M. 2009. Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the arrhenius, eyring, and ball models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(14): 6285-6291.
- CITA. 2008a. Determinación de la actividad antioxidante: Método ORAC con espectrofluorómetro Biotek. Método de análisis AQCITA-M037. Emisión N° 4. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- CITA. 2008b. Determinación de polifenoles. Método de análisis AQCITA-M036. Emisión N° 5. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- CITA. 2009. Humedad. Método de análisis P-SA-MQ-002. Emisión N° 1. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.

- Coates, E.M.; Popa, G.; Gill, C.; McCann, M.J.; McDougall, G.J.; Stewart, D. y Rowland, I. 2007. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Journal of Carcinogenesis* 6(4). Disponible en: <<http://www.carcinogenesis.com/content/6/1/4>>.
- Comstock, G.W.; Alberg, A.J.; Huang, H.Y.; Wu, K.; Burke, A.E.; Hoffman, S.C.; Norkus, E.P.; Gross, M.; Cutler, R.G.; Morris, J.S.; Spate, V.L. y Helzlsouer, K.J. 1997. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acid, carotenoids, a-tocopherol, selenium, and total peroxy radical-absorbing capacity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 6: 907-916.
- Dai, Q.; Borenstein, A.R.; Wu, Y.; Jackson, J.C. y Larson, E.B. 2006. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: The *Kame* Project. *The American Journal of Medicine*. 119(9): 751-759.
- Damodaran, S.; Parkin, K. y Fennema, O. (editores). 2008. *Food chemistry*. Cuarta edición. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1144 p.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(13): 5062-5072.
- Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.K. y Liu, R.H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(10): 3010-3014.
- Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M. y Amiot, J.A. 2007. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: Kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(10): 4209-4216.
- Dubick, M.A. y Omaye, S.T. 2007. Grape wine and tea polyphenols in the modulation of atherosclerosis and heart disease. En: Wildman, R.E.C. (editor). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Segunda Edición. CRC Press. Boca Raton, Florida. Capítulo 5.

- Egert, S.; Wolfram, S.; Bosy-Westphal, A.; Boesch-Saadatmandi, C.; Wagner, A.E.; Frank, J.; Rimbach, G. y Mueller, M.J. 2008. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *Journal of Nutrition*. 138(9): 1615-1621.
- Espín, J.C.; González-Barrio, R.; Cerdá, B.; López-Bote, C.; Rey, A.I. y Tomás-Barberán, F.A. 2007. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(25): 10476-10485.
- Fellows, P. 2000. *Food processing technology*. Segunda edición. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. Capítulo 11.
- Fiorani, M. y Accorsi, A. 2005. Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity. *British Journal of Nutrition*. 94: 338-345.
- Gancel, A.-L.; Feneuil, A.; Acosta, O.; Pérez, A.M. y Vaillant, F. 2010. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*. 44: 2243-2251.
- Gasperotti, M.; Masuero, D.; Vrhovsek, U.; Guella, G. y Mattivi, F. 2010. Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(8): 4602-4616.
- Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P. y Amiot, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5): 1370-1373.
- German, J.B. y Walzem, R.L. 2000. The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*. 20: 561-593.
- Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla P. y Tomás-Barberán, F.A. 2002. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*. 214(2): 155-159.

- Gil-Izquierdo, A.; Gil, M.I.; Tomás-Barberán, F.A. y Ferreres, F. 2003. Influence of industrial processing on orange juice flavanone solubility and transformation to chalcones under gastrointestinal conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(10): 3024-3028.
- Glassman, A.; Gaziano, T.A.; Bouillon-Buendia, C.P. y Guanais de Aguiar, F.C. 2010. Confronting the chronic disease burden in Latin America and the Caribbean. *Health Affairs*. 29(12): 2142-2148.
- Goggs, R.; Vaughan-Thomas, A.; Clegg, P.D.; Carter, S.D.; Innes, J.F.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M.; Schwab, W. y Bondy, C.A. 2005. Nutraceutical therapies for degenerative joint diseases: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(3): 145-164.
- Gökmen, V.; Serpen, A. y Fogliano, V. 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach *Trends in Food Science & Technology*. 20(6-7): 278-288.
- González, E.; Vaillant, F.; Rojas, G. y Pérez, A. 2010. Novel semiautomated method for assessing *in vitro* cellular antioxidant activity using the light-scattering properties of human erythrocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(3): 1455-1461.
- Graefe, E.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H. y Veit, M. 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 41(5): 492-499.
- Hager, T.J.; Howard, L.R. y Prior, R.L. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 689-695.
- Hager, T.J.; Howard, L.R. y Prior, R.L. 2010. Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 11749-11754.

- Hartmann, A.; Patz, C.-D.; Andlauer, W.; Dietrich, H. y Ludwig, M. 2008. Influence of processing on quality parameters of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(20): 9484-9489.
- Hassimotto, N.; Genovese, M. y Lajolo, F. 2007. Identification and characterization of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*. 13(1): 17-25.
- Hendrich, S. y Murphy, P.A. 2007. Isoflavones: Source and metabolism. En: Wildman, R.E.C. (editor). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Segunda edición. CRC Press. Boca Raton, Florida. Capítulo 2.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R. y Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10): 572-584.
- Honzel, D.; Carter, S.G.; Redman, K.A.; Schauss, A.G.; Endres, J.R. y Jensen, G.S. 2008. Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: Generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(18): 8319-8325.
- Horn, S.P. 1998. Postfire regrowth of *Vaccinium consanguineum* (Ericaceae) in the Costa Rican páramos. *Revista de Biología Tropical*. 46(4): 1117-1120.
- Huang, D.J.; Ou, B.X.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A. y Prior, R.L. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(16): 4437-4444.
- Huang, D.; Ou, B. y Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 1841-1846.
- Igual, M.; García-Martínez, E.; Camacho, M.M. y Martínez-Navarrete, N. 2010. Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*. 118: 291-299.

- Ito, H.; Gonthier, M.-P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Rémésy, C. Y Scalbert, A. 2005. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *British Journal of Nutrition*. 94: 500-509.
- Jalili, T.; Medeiros, D.M. y Wildman, R.E.C. 2007. Dietary fiber and coronary heart disease. En: Wildman, R.E.C. (editor). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Segunda Edición. CRC Press. Boca Raton, Florida. Capítulo 6.
- Jeffery, E. 2005. Component interactions for efficacy of functional foods. *The Journal of Nutrition*. 135: 1223-1225.
- Jensen, G.S.; Wu, X.; Patterson, K.M.; Barnes, J.; Carter, S.G.; Scherwitz, L.; Beaman, R.; Endres, J.R. y Schauss, A. 2008. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(18): 8326-8333.
- Joseph, J.A.; Shukitt-Hale, B. y Casadesus, G. 2005. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: Beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1): 313S-316S.
- Jówik, M.; Jówik, M.; Jówik, M.; Szczypka, M.; Gajewska, J. y Laskowska-Klita, T. 1997. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta*. 267(2): 129-142.
- Karadeniz, F.; Durst, R.W. y Wrolstad, R.E. 2000. Polyphenolic composition of raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(11): 5343-5350.
- Kaur, C. y Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. 36(7): 703-725.
- Kennett, E.C. y Kuchel, P.W. 2006. Plasma membrane oxidoreductases: Effects on erythrocyte metabolism and redox homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8: 1241-1247.

- Kim, D.-O. y Lee, C.Y. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(4): 253-273.
- Kontush, A.; Spranger, T.; Reich, A.; Baum, K. y Beisiegel, U. 1999. Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of  $\alpha$ -carotene and  $\gamma$ -tocopherol. *Atherosclerosis*. 144: 117-122.
- Konukoglu, D.; Akçay, T. y Erdem, T. 1998. Susceptibility of erythrocyte lipids to oxidation and erythrocyte antioxidant status in myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*. 31(8): 667-671.
- Kunwar, A.; Mishra, B.; Barik, A.; Kumbhare, L.B.; Pandey, R.; Jain, V.K.; Priyadarsini, K.I. 2007. 3,3'-diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. *Chemical Research in Toxicology*. 20(10): 1482-1487.
- Lahet, J.-J.; Lenfant, F.; Lecordier, J.; Bureau, A.; Duvillard, L.; Chaillot, B. y Freysz, M. 2008. Effects of various osmolarity on human red blood cells in terms of potassium efflux and hemolysis induced by free radicals. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 62(10): 697-700.
- Lamien-Meda, A.; Lamien, C.E.; Compaore, M.M.Y.; Meda, R.N.T.; Kiendrebeogo, M.; Zeba, B.; Millogo, J.F. y Nacoulma, O.G. 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*. 13(3): 581-594.
- Lee, J.; Durst, R.W. y Wrolstad, R.E. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*. 67(5): 1660-1667.
- Lee, J.; Koo, N. y Min, D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3: 21-33.

- Lenfant, C.; Lahet, J.; Vergely, C.; Volot, F.; Freysz, M. y Rochette, L. 2000. Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress *in vitro*. *General Pharmacology*. 34: 193-199.
- Lenfant, F.; Bureau, A.; Lahet, J.-J.; Bouyer, F.; Chaillot, B. y Freysz, M. 2005. Effects of an oxidative stress on human hemoglobin: A multiwavelength visible spectrometry study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 59: 230-232.
- Leong, L.P. y Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 76(1): 69-75.
- Lewis, L.A.; Fenning, A.; Brown, L.; Fassett, R.G. y Coombes, J.S. 2006. Antioxidant supplementation enhances erythrocyte antioxidant status and attenuates cyclosporine-induced vascular dysfunction. *American Journal of Transplantation*. 6: 41-49.
- Liu, C.C. y Young, J.D. 1988. A semi-automated microassay for complement activity. *Journal of Immunological Methods*. 114(1-2): 33-39.
- Liu, R.H. y Finley, J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 4311-4314.
- Liu, Y. y Kitts, D.D. 2011. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*. En prensa.
- Lo Scalzo, R.; Iannocari, T.; Summa, C.; Morelli, R. y Rapisarda, P. 2004. Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry*. 85: 41-47.
- Magalhães, A.S.; Silva, B.M.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B.; Valentão, P. y Carvalho, M. 2009. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1372-1377.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A. y Rémésy, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1): 230S-242S.

- Manach, C.; Hubert, J.; Llorach, R. y Scalbert, A. 2009. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53: 1303-1315.
- Mpiana, P.T.; Ngbolua, K.N.N.; Bokota, M.T.; Kasonga, T.K.; Atibu, E.K.; Tshibangu, D.S.T. y Mudogo, V. 2010. *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfusion*. 8(4): 248-254.
- Mathews, C.K.; Van Holde, K.E. y Ahern, K.G. 2002. *Bioquímica*. Tercera edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1368 p.
- Maurya, P.K. y Prakash, S. 2011. Intracellular uptake of (-)epicatechin by human erythrocytes as a function of human age. *Phytotherapy Research*. 25(6): 944-946.
- McDougall, G.J.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A. y Stewart, D. 2005. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(15): 5896-5904.
- Mertz, C.; Cheynier, V.; Günata, Z. y Brat, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(21): 8616-8624.
- Ministerio de Salud. 1996. Encuesta Nacional de Nutrición. Fascículo 3: Módulo de consumo aparente de Alimentos. Ministerio de Salud, Costa Rica. 45 p.
- Monteiro, R.; Azevedo, I. y Calhau, C. 2006. Modulation of aromatase activity by diet polyphenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(10): 3535-3540.
- Morais, T.C.; Pinto, N.B.; Carvalho, K.M.M.B.; Rios, J.B.; Ricardo, N.M.P.S.; Trevisan, M.T.S.; Rao, V.S. y Santos, F.A. 2010. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 183(1): 264-269.

- Nakagawa, K.; Kiko, T.; Hatade, K.; Sookwong, P.; Arai, H. y Miyazawa, T. 2009. Antioxidant effect of lutein towards phospholipid hydroperoxidation in human erythrocytes. *British Journal of Nutrition*. 102(9): 1280-1284.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2004. *Lehninger: Principles of biochemistry*. Cuarta edición. W.H. Freeman. Bedford, Nueva York. 1119 p.
- Nichenametla, S.N.; Taruscio, T.G.; Barney, D.L. y Exon, J.H. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(2): 161-183.
- Nicoli, M.C.; Anese, M. y Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 94-100.
- Niki, E.; Komuro, E.; Takahashi, M.; Urano, S.; Ito, E. y Terao, K. 1988. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(36): 19809-19814.
- Noguer, M.; Cerezo, A.B.; Rentsch, M.; Winterhalter, P.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C. 2008. Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 8879-8884.
- Oster, G. y Zalusky, R. 1974. Shape transformation of erythrocytes determined by light scattering changes associated with relaxation of particle orientation. *Biophysical Journal*. 14: 124-128.
- Oteiza, P.I.; Erlejman, A.G.; Verstraeten, S.V.; Keen, C.L. y Fraga, C.G. 2005. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology*. 12(1): 19-25.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M. y Prior, M. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-4626.

- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.; Deemer, E.K.; Prior, R.L. y Huang, D. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2772-2777.
- Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A. y García-Viguera, C. 2002. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(8): 2308-2312.
- Polidori, M.C.; Stahl, W.; Eichler, O.; Niestroj, I. y Sies, H. 2001. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*. 30(5): 456-462.
- Porrini, M. y Riso, P. 2008. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 18: 647-650.
- Prior, R.L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G. y Mainland, C.M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(7): 2686-2693.
- Prior, R.L.; Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 4290-4302.
- Ramaswamy, H. y Marcotte, M. 2006. *Food processing: Principles and applications*. Taylor & Francis Group. Boca Ratón, Florida. Capítulo 3.
- Rawson, A.; Patras, A.; Tiwari, B.K.; Noci, F.; Koutchma, T. y Brunton, N. 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*. En prensa.

- Rebecca, O.P.S.; Boyce, A.N. y Chandran, S. 2010. Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *African Journal of Biotechnology*. 9(10): 1450-1454.
- Rizvi, S. y Pandet, K.B. 2010. Activation of the erythrocyte plasma membrane redox system by resveratrol: A possible mechanism for antioxidant properties. *Pharmacological Reports*. 62: 726-732.
- Rizvi, S.; Jha, R. y Pandey, K. 2010. Activation of erythrocyte plasma membrane redox system provides a useful method to evaluate antioxidant potential of plant polyphenols. *Methods in Molecular Biology*. 594: 341-348.
- Ross, M.A.; Crosley, L.K.; Brown, K.M.; Duthie, S.J.; Collins, A.C.; Arthur, J.R. y Duthie, G.G. 1995. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: Influences of smoking. *European Journal of Clinical Nutrition*. 49: 861-865.
- Ross, J.A. y Kasum, C.M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19-34.
- Rossi, M.; Giussani, E.; Morelli, R.; Lo Scalzo, R.; Nani, R.C. y Torreggiani, D. 2003. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*. 36: 999-1005.
- Rufino, M.d.S.M.; Alves, R.E.; de Brito, E.S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. y Mancini-Filho, J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 121(4): 996-1002.
- Sato, Y.; Kanazawa, S.; Sato, K. y Suzuki, Y. 1998. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: II. Hemolysis by lipid-soluble radical initiator. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 21: 250-256.
- Sato, Y.; Sato, K. y Suzuki, Y. 1999. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: Comparison of calculated rate constants for hemolysis with experimental rate constants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 366(1): 61-69.

- Saura-Calixto, F.; Serrano, J. y Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101: 492-501.
- Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C. y Rémésy, C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56: 276-282.
- Scalbert, A.; Johnson, I.T. y Saltmarsh, M. 2005a. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 85(1): 215S-217S.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jiménez, L. 2005b. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(4): 287-306.
- Serrano, J.; Goñi, I. y Saura-Calixto, F. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*. 40: 15-21.
- Shui, G. y Leong, L.P. 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1022(1-2): 67-75.
- Sies, H. y Stahl, W. 2004. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annual Review of Nutrition*. 24: 173-200.
- Silva, C.; Herdeiro, R.; Mathias, C.; Panek, A.; Silveira, C.; Rodriguez, V.; Renno, M.; Falcao, D.; Cerqueira, D.; Minto, A.; Nogueira, F.; Quaresma, C.; Silva, J.; Menezes, F. y Eleutherio, E. 2005. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian Plants. *Pharmacological Research*. 52: 229-233.
- Silva, E.M.; Souza, J.N.S.; Rogez, H.; Rees, J.F. y Larondelle, Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*. 101(3): 1012-1018.
- Simon, E.; Paul, J.-L.; Atger, V.; Simon, A. y Moatti, N. 1998. Erythrocyte antioxidant status in asymptomatic hypercholesterolemic men. *Atherosclerosis*. 138: 375-381.

- Singh, M.; Arseneault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V. y Ramassamy, C. 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(13): 4855-4873.
- Soto, M. 2010. Evaluación del efecto de tratamientos físicos acoplados a un tratamiento enzimático sobre las propiedades físico-químicas y el contenido de compuestos antioxidantes de jugo de mora (*Rubus adenotrichus*). Trabajo final de graduación. Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica.
- Souza, J.N.S.; Silva, E.M.; Loir, A.; Rees, J.-F.; Rogez, H. y Larondelle, Y. 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry*. 106(1): 331-339.
- Stasiuk, M. y Kozubek, A. 2008. Membrane perturbing properties of natural phenolic and resorcinolic lipids. *FEBS Letters*. 582(25-26): 3607-3613.
- Stasiuk, M. y Kozubek, A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(6): 841-860.
- Strik, B.C.; Clark, J.R.; Finn, C.E. y Bañados, M.P. 2007. Worldwide blackberry production. *Comprehensive Crops Report*. 17(2): 205-213.
- Suwalsky, M.; Oyarce, K.; Avello, M.; Villena, F.; y Sotomayor, C.P. 2009. Human erythrocytes and molecular models of cell membranes are affected in vitro by *Balbisia peduncularis* (Amancay) extracts. *Chemico-Biological Interactions*. 179(2-3): 413-418.
- Takebayashi, J.; Yagy, Y.; Ishii, R.; Abe, S.; Yamada, K. y Tai, A. 2008. Antioxidant properties of 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 72: 1558-1563.
- Tang, Y.-Z. y Liu, Z.-Q. 2007. Free-radical-scavenging effect of carbazole derivatives on AAPH-induced hemolysis of human erythrocytes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15(5): 1903-1913.

- Tang, Y.-Z. y Liu, Z.-Q. 2008. Chemical kinetic behavior of chlorogenic acid in protecting erythrocyte and DNA against radical-induced oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(22): 11025-11029.
- Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Sroka, P.; Satora, P. y Michalik, J. 2009. Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technology and Biotechnology*. 47(4): 456-463.
- Tesoriere, L.; Butera, D.; Allegra, M.; Fazzari, M. y Livrea, M.A. 2005. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to *ex vivo* induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(4): 1266-1270.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. y Byrne, D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7): 669-675.
- Tzulker, R.; Glazer, I.; Bar-Ilan, I.; Holland, D.; Aviram, M. y Amir, R. 2007. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(23): 9559-9570.
- USDA. 2010. USDA Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods. Release 2. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center.
- Vaillant, F.; Pérez, A.; Dávila, I.; Dornier, M. y Reynes, M. 2005. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*. 60: 3-12.
- Vidavalur, R.; Otani, H.; Singal, P.K. y Maulik, N. 2006. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Experimental Clinical Cardiology*. 11(3): 217-225.

- Vlachodimitropoulou, E.; Naftalin, R.J., y Sharp, P.A. 2010. Quercetin is a substrate for the transmembrane oxidoreductase Dcytb. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(10): 1366-1369.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M. y Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84.
- Wang, S.Y. y Lin, H.-S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(2): 140-146.
- Waterhouse, A.L. 2005. Consumer labels can convey polyphenolic content: Implications for public health. *Clinical & Developmental Immunology*. 12(1): 43-46.
- Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A. y Wolkow, C. A. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 5(1): 59-68.
- Wolfe, K.L. y Liu, R.H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(22): 8896-8907.
- Wrolstad, R.E.; Acree, T.E.; Decker, E.A.; Penner, M.H.; Reid, D.S.; Schwartz, S.J.; Shoemaker, C.F.; Smith, D.M. y Sporns, S. (editores) 2005. *Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. Volumen 2. John Wiley & Sons Inc. Washington, Estados Unidos. 606 p.
- Wu, X.; Gu, L.; Holden, J.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Beecher, G. y Prior, R.L. 2004a. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17(3-4): 407-422.

- Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E. y Prior, R.L. 2004b. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(12): 4026-4037.
- Wu, C.-P.; Calcagno, A.M.; Hladky, S.B.; Ambudkar, S.V. y Barrand, M.A. 2005. Modulatory effects of plant polyphenols on human multidrug resistance proteins 1, 4, and 5 (ABCC1, 4, and 5). *FEBS Journal*. 272(18): 4725-4740.
- Yang, H.-L.; Chen, S.-C.; Chang, N.-W.; Chang, J.-M.; Lee, M.-L.; Tsai, P.-C.; Fu, H.-H.; Kao, W.-W.; Chiang, H.-C.; Wang, H.-H. y Hseu, Y.-C. 2006. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1513-1521.
- Youdim, K.A.; Shukitt-Hale, B.; MacKinnon, S.; Kalt, W. y Joseph, J.A. 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *In vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1523(1): 117-22.
- Young, J.D.-E.; Leong, L.G.; DiNome, M.A. y Cohn, Z.A. 1986. A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins. *Analytical Biochemistry*. 154(2): 649-654.
- Zepka, L.Q. y Mercadante, A.Z. 2009. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*. 117: 28-34.