

Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-)

[Antioxidant activity of seed extracts from three apple cultivars (*Malus domestica* Borkh –Rosaceae-)]

Verónica CERVANTES-CARDOZA, Nuria Elizabeth ROCHA-GUZMÁN, José Alberto GALLEGOS-INFANTE, Martha ROSALES-CASTRO¹, Luis MEDINA-TORRES² & Rubén Francisco GONZÁLEZ-LAREDO*

*Instituto Tecnológico de Durango, Dpto. de Ingenierías Química y Bioquímica
Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote. C.P. 34080, Durango, Dgo., México*

¹CHIDIR Durango, Instituto Politécnico Nacional, Sigma 119 Fracc.20 de Nov. Durango 34220 México

²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, U.N.A.M., CP.04510 México, D.F.

Abstract

The oily (hexane) and aqueous extracts from apple seeds (*Malus domestica* Borkh –Rosaceae-) cultivars Winter Banana (WB), Winter Permain (WP) and Blanca de Asturias (BA) have shown significant differences in phenolic content and antioxidant activity. BA seed oily extracts and WB seed aqueous extracts have presented the best scavenging capacity of DPPH• radical and inhibition of hydroxyl radicals. In the biological assay apple seed extracts showed protection against low density lipoproteins (LDL) oxidation, which might fight the risk of atherosclerosis. The BA oily seed extract may have potential use as nutraceutical ingredient.

Keywords: Apple seeds, *Malus domestica*, antioxidant, polyphenols, seed oil

Resumen

La fracción oleosa (obtenida con hexano) y extractos acuosos de harina de semilla de manzana (*Malus domestica* Borkh–Rosaceae-) variedades Winter Banana (WB), Winter Permain (WP) y Blanca de Asturias (BA) mostraron diferencias significativas en el contenido de polifenoles independientemente de la variedad. Las diferentes fracciones mostraron capacidad de atrapamiento del radical DPPH• y de inhibición del radical hidroxilo, siendo la fracción oleosa de las semillas de BA la mejor en los dos análisis; en el caso de los extractos acuosos, las semillas de WB presentaron la mejor respuesta. En la evaluación biológica los diferentes extractos mostraron un efecto protector contra la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo cual puede disminuir el riesgo de aterosclerosis. La fracción oleosa de semillas de BA mostró mayor potencial como ingrediente nutracéutico.

Palabras Clave: semillas, manzana, *Malus domestica*, antioxidante, aceite, polifenol

Recibido | Received: 5 de julio de 2010.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 3 de Noviembre de 2010.

Publicado en línea | Published online: 30 de Noviembre de 2010.

Declaración de intereses | Declaration of interests: La presente investigación se llevó a cabo con apoyo financiero de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) del Gobierno Mexicano.

This article must be cited as: This article must be cited as: Verónica CERVANTES-CARDOZA, Nuria Elizabeth ROCHA-GUZMÁN, José Alberto GALLEGOS-INFANTE, Martha ROSALES-CASTRO¹, Luis MEDINA-TORRES² & Rubén Francisco GONZÁLEZ-LAREDO 2010. Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 9(6): 446 - 456.

*Contactos | Contacts: E-mail address: gonzalezlaredo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La manzana (*Malus domestica* Borkh – Rosaceae -) es un fruto ampliamente consumido que brinda un importante aporte de antioxidantes, como los ácidos fenólicos caféico y clorogénico, procianidinas, catequinas ((+)-catequina y (-)-epicatequina) y flavonoles derivados de quercetina (Wolfe et al., 2003). En la elaboración de jugo de manzana se generan grandes cantidades de desechos de cáscara, corazón y semilla ricos en componentes fenólicos bioactivos (Foo y Lu, 1999). La distribución cualitativa y cuantitativa de los polifenoles de la manzana está más concentrada en la cáscara y ésta varía relativamente poco en función de la variedad (Lata et al., 2009), promediando 380 y 160 mg por 100 g de manzana de concentración fenólica y de taninos respectivamente (Salgado et al., 2008).

Por otra parte, la contribución de estos compuestos a la capacidad antioxidante total de la manzana está relacionada directamente con su concentración (Lee et al., 2003) lo mismo que su actividad antiproliferativa sobre células cancerosas hepáticas (Wolfe et al., 2003). Por lo expuesto, el consumo de manzana (Boyer y Liu, 2004) y una dieta balanceada rica en frutas y verduras trae asociado un efecto sinérgico de principios activos que contribuyen a menores riesgos de contraer enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, la diabetes y las afecciones cardiovasculares (Liu, 2004).

En los extractos hexánicos de semillas de manzana, los ácidos linoléico, palmítico, linolénico y esteárico fueron reportados como los más representativos (Lu y Foo, 1998). Asimismo, en los extractos polares se encontró amigdalina y floridzina como los polifenoles más importantes, además de ácidos clorogénico y *p*-cumarílico y algunos glicósidos de quercetina. A las semillas de manzana en particular, se les han atribuido propiedades benéficas para la salud como actividad antiulcerativa, anticancerígena y procardiovascular, disminuyendo el nivel de colesterol y azúcar en la sangre (Cabrera, 1994; Eberhardt et al., 2000). En un reporte previo se demostró que los extractos polares de semillas de manzana poseen actividad antiproliferativa contra células transformadas HeLa (Gonzalez-Laredo et al., 2007).

El objetivo del presente trabajo comprendió la caracterización de las propiedades químicas y el efecto biológico (actividad antioxidante) de la fracción oleosa

y de extractos acuosos de semillas de manzana (*M. domestica*) variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y biológico

Las semillas se obtuvieron descorazonando manualmente manzanas de las variedades Winter Banana (WB), Winter Permain (WP) y Blanca de Asturias (BA), acumulando aproximadamente 500 g de cada una. Las manzanas fueron proporcionadas por el Campo Experimental de Canatlán del INIFAP, Durango, México. Las semillas fueron secadas a la sombra por 36 h y posteriormente almacenadas a -4°C para su conservación previo a su molienda y extracción.

El plasma sanguíneo fue obtenido de un paciente sano y donado por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea del Hospital General del Estado de Durango, México.

Obtención de los extractos

Las semillas molidas en fina harina (10 g) fueron sometidas a extracción en un aparato soxhlet usando hexano (mezcla de isómeros, grado reactivo, Sigma-Aldrich) como solvente para el extracto oleoso. Posteriormente, la harina residual fue secada bajo campana extractora y procesada similarmente, empleando agua tridestilada. En ambas extracciones se empleó una relación de 1:10 de sólido a solvente, extendiéndose la extracción por un lapso de 2 h aproximadamente. El extracto hexánico (oleoso) fue concentrado en un evaporador rotatorio a vacío, dando lugar al aceite de semilla de manzana, mientras que el extracto acuoso fue liofilizado. El extraíble metanólico del aceite de semilla de manzana se obtuvo a partir de la disolución de 2.5 g de aceite en 2.5 mL de *n*-hexano, mismos que se lavaron (3X) con 2.5 mL de metanol-agua (4:1), y se centrifugaron (centrífuga HETTICH EBA 12) por 5 min a 5000 RPM. Una vez obtenidos los extractos se calcularon los rendimientos en base a 100 g de semilla.

Determinación de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales en extractos acuosos se llevó a cabo de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965) y descrito por Waterman y Mole (1994). Muestras (0.125 µL) a 1000 ppm en agua desionizada se adicionaron con 0.5 mL de agua desionizada y 0.125

μL de reactivo de Folin Ciocalteu 2N; se agitaron en vortex y reposaron en oscuridad por 6 min. Luego se agregaron 1.5 mL de Na_2CO_3 7% y 1 mL de agua desionizada. Cada tubo se agitó durante 30 s y reposó en oscuridad por 1.5 h. Se midió la absorbancia a 760 nm (espectrofotómetro marca Cary 50 Bio).

La determinación de fenoles totales en el aceite se semilla de manzana, se realizó a partir de su extraíble metanólico, de acuerdo con Capannesi *et al.* (2000). Al extraíble metanólico del aceite de manzana se le agregó 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 5 mL de Na_2CO_3 7.5%, aforando a 50 mL con agua desionizada. Las muestras permanecieron en reposo toda la noche y fueron leídas a 765 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina y de ácido gálico, compuestos que fueron usados como estándares.

Contenido proteico

En los extractos acuosos se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (1976), empleando seroalbúmina bovina como estándar. A muestras por triplicado (100 μL) a 1000 ppm en agua desionizada, se les adicionaron 5 mL del reactivo de Bradford, se agitaron y leyeron a 595 nm.

Contenido de Carbohidratos

La determinación de carbohidratos en los extractos acuosos, se llevó a cabo aplicando la técnica de Dubois *et al.* (1956). Se prepararon soluciones de las muestras a 1000 ppm en agua desionizada de las cuales se tomaron alícuotas (100 μL) por triplicado que se agregaron a 1 mL de fenol 5% y 5 mL de H_2SO_4 . Los tubos se agitaron 1 min para su homogeneización. Luego se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente a 35°C durante 15 min. Se tomaron lecturas de absorbancias a 490 nm y se compararon contra estándar de glucosa.

Evaluación de la Actividad Antioxidante

Inhibición de la degradación de la desoxi-D-ribosa

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos acuosos y de los extraíbles metanólicos del aceite por el método de la desoxi-D-ribosa (Halliwell *et al.*, 1987), procedimiento que permite valorar la capacidad de un sustrato para inhibir especies reactivas de oxígeno, particularmente radicales hidroxilo. Brevemente, se probaron concentraciones de 1,10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extraíbles metanólicos del aceite y 100, 1000 y 10000 ppm para los extractos acuosos. Soluciones muestra (500 μL) en buffer de fosfatos (KH_2PO_4 -KOH) 50 mM, pH 7.4, se adicionaron a 100

μL de desoxi-D-ribosa 28 mM preparada en buffer de fosfato y 200 μL de una solución premezclada (1:1) de FeCl_3 100 μM y EDTA 100 mM. Luego se agregaron 100 μL de H_2O_2 1mM y 100 μL de ácido ascórbico 1 mM. Se agitaron e incubaron a 37°C por 60 min. Posteriormente, se agregó 1 mL de TCA al 2.8% y 1 mL de TBA 1%. Los tubos se agitaron nuevamente y calentaron en baño maría a 100°C por 20 min. Se detuvo la reacción pasando los tubos por hielo durante 5 min. Se adicionaron 2 mL de alcohol butílico, agitaron y centrifugaron a 4500 RPM por 10 min. Finalmente, la degradación oxidativa de la desoxi-D-ribosa se estimó a partir de las lecturas de absorbancia de la fase orgánica a 532 nm (espectrofotómetro Cary 50 Bio). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de radicales $\text{OH}\cdot$ (%RSA):

$$\% \text{ RSA} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Determinación de la velocidad de rompimiento de cadena. Método del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

Para determinar la velocidad de rompimiento de cadena vía el atrapamiento de radicales DPPH•, se siguió la metodología descrita por Manzocco *et al.* (1998). El blanqueado del radical estable DPPH• por muestras de extractos acuosos se monitoreó a 515 nm (espectrofotómetro marca Cary Bio 50) a 20°C. A 1970 μL de DPPH• $6 \times 10^{-5} \text{M}$ en metanol se le agregó 30 μL de muestra, previamente preparada a 2000 ppm. En el caso de las muestras oleosas, a 2000 μL de DPPH• $6 \times 10^{-5} \text{M}$ en acetona, se le adicionaron 50 μL de muestra de manera directa. La constante de reacción del blanqueado del radical DPPH• se expresa como:

$$1/A^3 - 1/A_0^3 = 3kt$$

donde A_0 es la densidad óptica inicial y A en el tiempo t, mientras que la velocidad de rompimiento de cadena es k ($\text{OD}^{-3} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Inhibición de la Oxidación de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL).

Se determinó el efecto biológico de los extractos acuosos, del aceite y de los extraíbles metanólicos del aceite mediante el ensayo de inhibición de la oxidación de las LDL reportado por Loy *et al.* (2002) y modificado en nuestro laboratorio.

Inicialmente, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se precipitaron de plasma humano, empleando el reactivo LICON. A 500 μ L de plasma se le agregaron 50 μ L del reactivo precipitante; se mezclaron en vortex por 5 min y centrifugaron por 10 min. Se separó el sobrenadante y pesó la fracción precipitada. Se agregó solución buffer de fosfatos a pH 7.4 (1mL por cada 100 mg de LDL).

Previo al ensayo de oxidación, se determinó el contenido de proteína en la fracción de LDL mediante kit de la reacción de Biuret (Teco Diagnostic). Muestras previamente etiquetadas se agitaron por 10 s, reposaron por 20 min y se leyeron a 540 nm. Una vez cuantificadas, se tomaron alícuotas de 2 mL de LDL y congelaron a -84°C hasta su uso.

$$\text{Concentración de proteínas totales} = \frac{(\text{Abs}_{\text{soln problema}}) - (\text{Abs}_{\text{soln patrón}})}{(\text{Abs}_{\text{soln problema}})} \times 100$$

Para el ensayo de inhibición de la oxidación, las alícuotas de LDL son descongeladas a 37°C (200 μ L) y se les agregaron 100 μ L de los extractos acuosos (1, 10, 100, 1000 ppm), del aceite (1, 10, 100 ppm), de los extraíbles metanólicos (1, 10, 100 ppm), así como de los estándares catequina y ácido gálico (1, 10, 100 ppm). Todas las muestras se diluyeron con solución buffer-fosfatos pH 7.4 y adicionaron con 100 μ L de CuSO_4 a 0.5mM y 600 μ L de solución buffer de fosfatos. Se homogeneizaron con vortex e incubaron a

37°C por 3 h. Posteriormente, se agregó 1mL de TBA 0.37% y 1mL de TCA 0.15%, homogeneizando de nuevo. Se llevó a 100°C en baño maría por 20 min y posteriormente se detuvo la reacción con hielo por 5 min. Se adicionaron luego 3 mL de *n*-butanol, se agitó por 30 s y se centrifugó a 3000 RPM por 10 min. Se leyó la absorbancia a 532 nm con *n*-butanol como blanco. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la oxidación de las LDL:

$$\% \text{ Inhibición de la oxidación de LDL} = \frac{\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{blanco}}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza de una sola vía ($p=0.05$) y mediante pruebas de comparación de medias por el método de Tukey ($p= 0.05$). En todos los casos las pruebas experimentales se realizaron al menos por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido fenólico

Se pudo observar una diferencia significativa ($p<0.05$) en el contenido de polifenoles totales cuando se comparan los extractos acuosos y oleosos de las semillas de manzana (Tabla 1). Entre los tres cultivares, el contenido de polifenoles totales en las fracciones oleosas de semillas WP fue el más sobresaliente con 2.25 y 2.31 mg de EAG y EC por g de aceite (59.7 y 61.5 mg de EAG y EC/100 g

semilla), respectivamente. Este contenido fenólico puede compararse positivamente por ejemplo, con el reportado para aceite de oliva extra virgen de 40 mg/100 g aceite (Calligaris et al., 2006). Por otra parte, entre los extractos acuosos se destacan nuevamente los de semillas WP con 73.0 y 77.1 mg de EAG y EC por 100 g de semilla, respectivamente. Sin embargo, en los extractos acuosos hay que tomar en cuenta, dada la composición química de la materia prima estudiada rica en carbohidratos y proteínas, la probable interferencia de compuestos que pueden formar complejos con polifenoles (Karchesy et al., 1989), particularmente monosacáridos reductores, los cuales podrían reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y proporcionar valores falso-positivos (Waterhouse, 2001; Lazarus et al., 1999). En este caso, se cuantificó un promedio de 52 μ g de extraíbles de proteínas en los extractos secos y de 44 μ g de glucosa lo que es poco significativo y similar en las semillas de las tres variedades.

Tabla 1. Rendimientos, Fenoles Totales, Concentración de Proteína y Carbohidratos presentes en extractos acuosos y oleosos de semilla de manzana variedades Blanca de Asturias (BA), Winter Banana (WB) y Winter Permain (WP)

Variedad/ Extracto acuoso	Rendimiento %	mg EAG/g ext. seco ¹ (mg EAG/100 g semilla)	mg EC/g ext. seco ² (mg EC/100 g semilla)	µg ESAB/g ext. seco ³ (µg ESAB/100 g semilla)	µg EG/g ext. seco ⁴ (µg EG/100 g semilla)
BA acuoso	1.54 ± 0.02 ^a	36.66±2.57 (56.5) ^a	38.44±2.62 (59.2) ^a	62.62±3.36 (96.4) ^a	41.41±2.33 (63.8) ^a
WB acuoso	2.21 ± 0.13 ^b	32.40±0.99 (71.6) ^a	34.09±1.00 (75.3) ^a	42.76±0.69 (94.5) ^b	42.31±2.38 (93.5) ^a
WP acuoso	2.55 ± 1.57 ^{ab}	28.62±0.86 (73.0) ^b	30.24±0.88 (77.1) ^b	50.26±1.84 (128.2) ^c	47.58±1.15 (121.3) ^b
Variedad/ Extracto oleoso (aceite)	Rendimiento %	mg EAG/g aceite ¹ (mg EAG/100 g semilla)	mg EC/g aceite ² (mg EC/100g semilla)		
BA oleosa	22.65 ± 0.32 ^a	2.10±0.01 (47.6) ^a	2.17±0.01 (49.1) ^a		
WB oleosa	21.90 ± 2.13 ^a	1.64±0.01 (35.8) ^b	1.69±0.01 (37.0) ^b		
WP oleosa	26.57 ± 1.00 ^b	2.25±0.01 (59.7) ^c	2.31±0.01 (61.5) ^c		

¹ mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto seco, por g de aceite ó por 100 g de semilla

² mg equivalentes de catequina (EC) por g de extracto seco, por g de aceite ó por 100 g de semilla

³ µg equivalentes de seroalbúmina bovina (ESAB) por g de extracto seco ó por 100 g de semilla

⁴ µg equivalentes de glucosa (EG) por g de extracto seco ó por 100 g de semilla

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

Inhibición de la degradación de la desoxi-D-ribosa y atrapamiento de radicales hidroxilo

La capacidad de inhibición de la formación y estabilización del radical hidroxilo se ve incrementada de manera proporcional con la concentración de los extractos acuosos de semillas de manzana, entre los cuales destacan los de la variedad WB, que presentó la mejor respuesta a 10,000 ppm con un 58.47% de inhibición de dicho radical (Figura 1). Sin embargo, esta respuesta no resulta competitiva respecto a los estándares catequina y ácido gálico, los que duplican su efectividad incluso a concentraciones relativamente bajas (100 ppm). La capacidad de atrapamiento del radical OH• entre los diferentes extractos acuosos y variedades evaluadas presentó diferencia significativa (p < 0.05).

Para los extraíbles metanólicos del aceite de semilla de las diferentes variedades de manzana, se encontró que existe diferencia significativa entre las mismas y los estándares evaluados (Figura 2). Las tres variedades presentaron muy buena respuesta a 100 ppm, lo cual podría relacionarse con la presencia de compuestos activos parcialmente polares que fueron separados del aceite (al ser lavados con metanol-agua) y ser los responsables de la capacidad antioxidante mostrada. Considerando que con el modelo cinético se obtiene un indicador conveniente de la actividad rompedora de cadena, esto mediante el seguimiento de una ecuación de tercer orden para mezclas tan complejas como las

por arriba del 80%. A concentraciones aún menores (1 y 10 ppm), los extraíbles metanólicos del aceite de las semillas BA se destacan por sus valores de capacidad de atrapamiento de radical OH•, resultando muy competitivos al momento de ser comparados con los estándares.

Velocidad de rompimiento de cadena

Para llevar a cabo el método del DPPH• existen dos formas documentadas, una de ellas es la dinámica, que evalúa la reactividad de un antioxidante en específico y la otra, la estática que evalúa la actividad antioxidante. La reactividad y la actividad antioxidante no necesariamente están correlacionadas, debido a que en las reacciones donde se involucran antioxidantes, los productos también llegan a formar parte de la reacción (Roginsky y Lissi, 2005). En vista de la dificultad para lograr un modelo cinético creíble, en donde se involucren el orden de las diferentes reacciones, la velocidad de rompimiento de cadena describe un modelo de multipasos generalmente de reacciones que se presentan de manera paralela o consecutiva.

que se encuentran en este estudio, la velocidad de rompimiento de cadena de extraíbles polifenólicos ayuda a categorizar el tipo de reacciones para el atrapamiento de radicales libres. Basados en esta

ideología, se supervisó la relación del blanqueamiento del radical libre estable DPPH•.

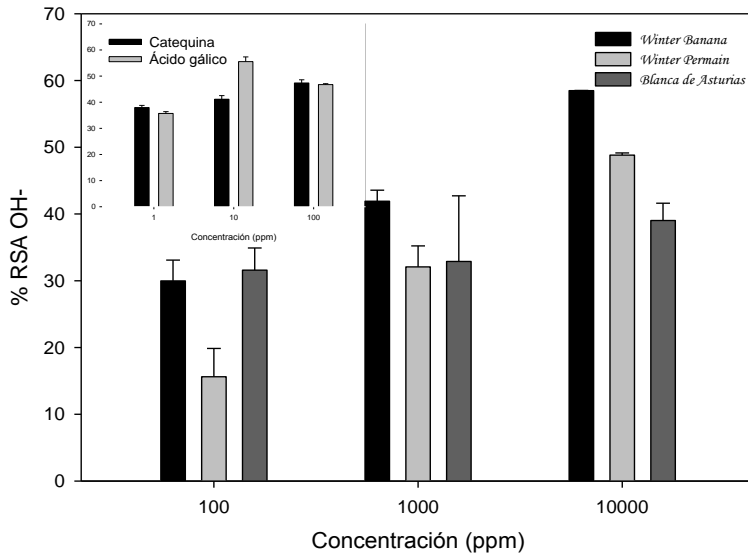


Figura 1.- Atrapamiento del radical hidroxilo (% RSA OH•) por los extractos acuosos de semilla de manzana variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias (a 100, 1000 y 10,000 ppm), comparado con los estándares catequina y ácido gálico (a 1, 10, 100 ppm)

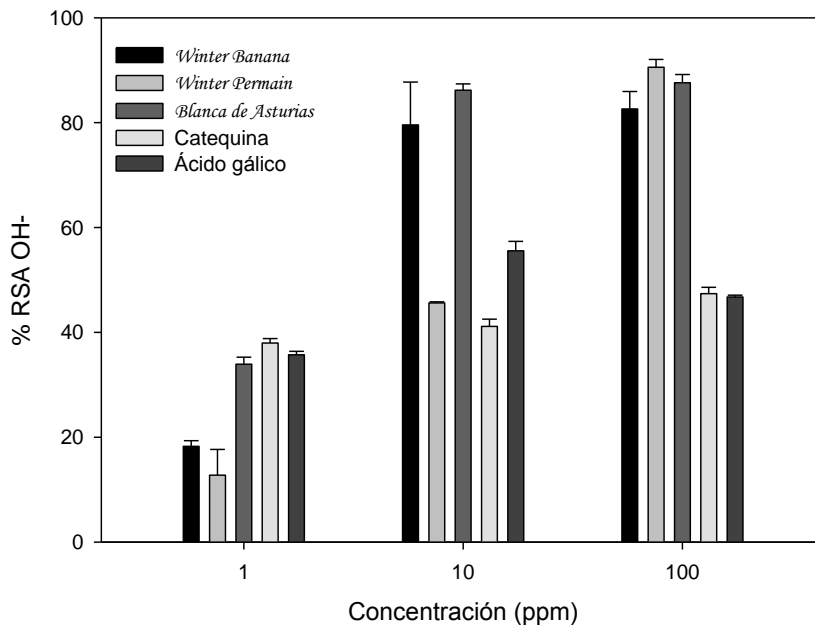


Figura 2.- Atrapamiento de radicales hidroxilo (% RSA OH•) por extraíbles metanólicos del aceite de semillas de manzana variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias, comparado con catequina y ácido gálico (a 1, 10 y 100 ppm)

Considerando que con el modelo cinético se obtiene un indicador conveniente de la actividad rompedora de cadena, esto mediante el seguimiento de una ecuación de tercer orden para mezclas tan complejas como las que se encuentran en este estudio, la velocidad de rompimiento de cadena de extraíbles polifenólicos

ayuda a categorizar el tipo de reacciones para el atrapamiento de radicales libres. Basados en esta ideología, se supervisó la relación del blanqueamiento del radical libre estable DPPH•.

La actividad anti-radical de los extractos acuosos de semillas de manzana presentó diferencia significativa en la velocidad de atrapamiento del radical DPPH• (análisis de varianza, $p < 0.05$), mientras que WB

mostró diferencia significativa respecto a BA y no respecto a WP en el análisis de comparación de medias por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los extractos acuosos de semilla de manzana WB mostraron la mayor velocidad de atrapamiento de

radical DPPH•, la cual corresponde a $1.30 \text{ OD}^{-3} \text{ min mg}^{-1}$, mientras que las tres variedades tuvieron un valor muy similar a la catequina medida a 100 ppm y a una tercera parte del ácido gálico medido a 33 ppm, como se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Atrapamiento del radical DPPH• por extractos acuosos de semilla de manzana variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias (a 2000 ppm, lecturas cada 5 min durante 1 h), comparado con catequina y ácido gálico (a 100 y 33 ppm, respectivamente)

Extractos acuosos	K * OD ⁻³ min mg ⁻¹	r ²	Concentración ppm	Volumen μL
Winter Banana, WB	1.3 ^a	0.917	2000	30
Winter Permain, WP	1.2 ^b	0.912	2000	30
Blanca de Asturias, BA	1.15 ^b	0.959	2000	30
Estándares				
Catequina	1.06 ^b	0.991	100	80
Ácido gálico	3.01 ^c	0.952	33	80

*Literales diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p < 0.05$)

Las velocidades de atrapamiento del radical DPPH• por los extraíbles metanólicos del aceite de semilla de manzana no mostraron diferencia significativa en el análisis de varianza ($p > 0.05$) entre las diferentes variedades analizadas. Los extraíbles metanólicos del aceite de las semillas de WB presentaron una magnitud similar al estándar de catequina a 100 ppm ($p < 0.05$). Por otra parte, el comportamiento de la velocidad de atrapamiento del radical DPPH• presentado por las muestras de aceite, presentó una diferencia significativa entre las variedades de semillas

evaluadas y de igual manera al ser comparados estadísticamente con los extraíbles metanólicos del aceite ($p < 0.05$). Las semillas de BA mostraron la mayor velocidad de atrapamiento de radical DPPH• entre las muestras de aceite, presentando un valor de $2.285 \text{ OD}^{-3} \text{ min mg}^{-1}$ que fue superior al estándar catequina a 100 ppm, sin embargo, este fue inferior al mostrada por el ácido gálico a 33 ppm, como se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Velocidad de atrapamiento del radical DPPH• por el aceite y los extraíbles metanólicos del aceite de semillas de manzana variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias (50 μL de muestra, con lecturas cada 5 min por 1 h), comparada con catequina y ácido gálico (a 100 y 33 ppm respectivamente, con lecturas cada 0.5 min por 10 min)

Aceite	K * (OD ⁻³ min mg ⁻¹)	r ²	Concentración (ppm)	Volumen (μL)
Winter Banana, WB	0.874 ^a	0.995	aceite	50
Winter Permain, WP	1.428 ^b	0.992	aceite	50
Blanca de Asturias, BA	2.285 ^c	0.977	aceite	50
Extraíbles metanólicos del aceite				
Winter Banana, WB	1.326 ^b	0.886	aceite	50
Winter Permain, WP	0.952 ^a	0.794	aceite	50
Blanca de Asturias, BA	0.975 ^a	0.975	aceite	50
Estándares				
Catequina	1.06 ^a	0.991	100	80
Ácido gálico	3.01 ^d	0.952	33	80

*Literales diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p < 0.05$)

Inhibición de la oxidación (%) de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

En este estudio se demuestra que los extractos acuosos de semillas de manzana (Figura 3), exhibieron una menor protección de las moléculas de LDL contra su oxidación a todas las concentraciones probadas, en comparación con los estándares catequina y ácido gálico (p=0.00). Se observa también que la inhibición de la oxidación de las LDL está en función de la concentración, lo cual concuerda con la naturaleza

hidrofílica de dichos extractos (p=0.00) (Miyagi et al., 1997; Anderson et al., 2001).

Por otra parte, los resultados de los extraíbles metanólicos del aceite de semillas de manzana, así como el mismo aceite de las semillas de las diferentes variedades analizadas, mostraron un comportamiento diferente en cuanto a la protección de las LDL. En todo caso la mayor inhibición de la oxidación de las LDL fue observada en los estándares ácido gálico y catequina (p=0.01).

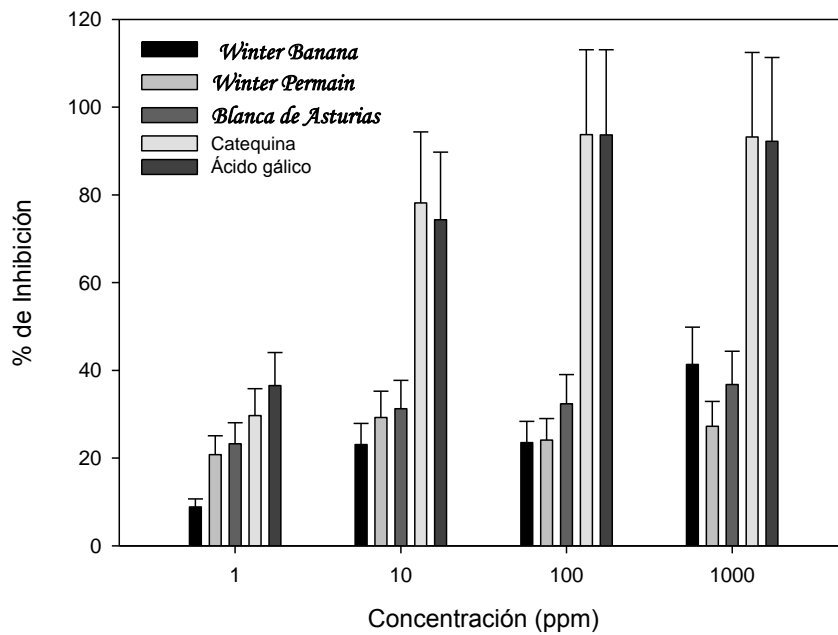


Figura 3.- Inhibición de la oxidación de LDL (%) por extractos acuosos de semillas de manzana, variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias, comparada con catequina y ácido gálico a 1, 10, 100 y 1000 ppm

En la inhibición de la oxidación de las LDL, los aceites de semillas de WB y WP mostraron un comportamiento destacado a 1 ppm (Figura 4), alcanzando valores de 40.9 y 42.9% respectivamente. Así mismo, los aceites de semillas de manzana mostraron una respuesta creciente con la concentración, particularmente de la variedad BA, que presentó el mayor porcentaje de inhibición (57.5% a 100 ppm) entre las fracciones oleosas analizadas (p=0.02).

Los extraíbles metanólicos del aceite de semillas presentaron un comportamiento similar a sus pares oleosos, destacando los extraíbles de WP a baja concentración (1 ppm) y mostrando respuestas consistentes y crecientes a 100 ppm. Nuevamente las semillas de la variedad BA presentaron los porcentajes más altos de inhibición de la oxidación de las LDL con 54.8% seguida por WB con un 49.2% como puede verse en la figura 5.

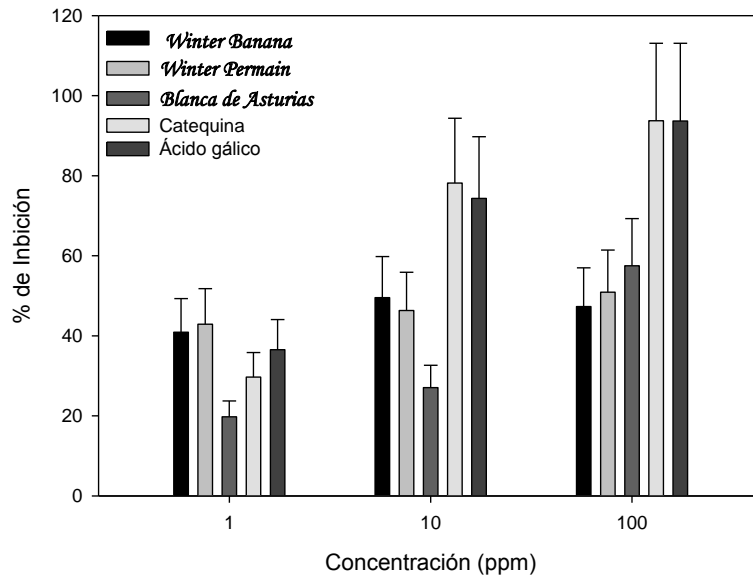


Figura 4.- Inhibición de la oxidación de LDL (%) por la fracción oleosa de semillas de manzana, variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias, comparada con catequina y ácido gálico a 1, 10 y 100 ppm

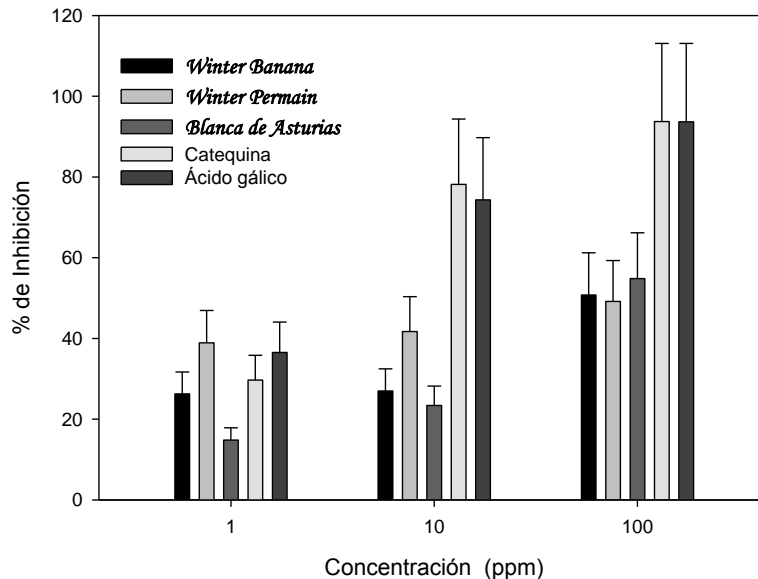


Figura 5.- Inhibición de la oxidación de las LDL (%) por extraíbles metanólicos de fracciones oleosas de semillas de manzana, variedades Winter Banana, Winter Permain y Blanca de Asturias, comparada con catequina y ácido gálico a 1, 10 y 100 ppm

CONCLUSIONES

En este estudio se demuestra que existen diferencias significativas en el contenido de polifenoles presentes en los extractos acuosos y en los extractos oleosos de semillas de manzana, independientemente de la variedad.

Las diferentes muestras estudiadas mostraron capacidad de atrapamiento del radical DPPH• y de inhibición de radicales hidroxilo, resultando el aceite de semillas de la variedad Blanca de Asturias y los extractos acuosos de las semillas de Winter Banana los que exhibieron la mejor respuesta antioxidante.

En la evaluación biológica, los diferentes extractos analizados mostraron un efecto protector contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Estos resultados podrían sugerir su potencial empleo para disminuir el riesgo de aterosclerosis, siendo particularmente relevante la respuesta del aceite de semilla de manzana de la variedad Blanca de Asturias.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se llevó a cabo con apoyo financiero de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) del Gobierno Mexicano.

REFERENCIAS

- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr.* 131: 2837 - 2842.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254.
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 3:5. <http://www.nutritionj.com/content/3/1/5>
- Cabrera LG. 1994. Plantas curativas de México. Editorial Gómez-Gómez Hnos. México D. F.
- Calligaris S, Sovrano S, Manzocco L, Nicoli MC. 2006. Influence of crystallization on the oxidative stability of extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem.* 54: 529 - 535.
- Capannesi C, Palchetti I, Mascini M, Parenti A. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *J Agric Food Chem.* 71: 553 - 562.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350 - 356.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 405: 903 - 904.
- Foo L Y, Lu Y. 1999. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chem.* 64: 511 - 518.
- González-Laredo RF, Reyes-Navarrete MG, Preza y Lerma AM, Rosales-Castro M, Morales-Castro J, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE. 2007. Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana. *Grasas y aceites.* 58: 5 - 9.
- Halliwel B, Guteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constant for reactions of hydroxyl radical. *Anal Biochem.* 165: 215 - 219.
- Karchesy JJ, Bae Y, Chalker-Scott L, Helm RF, Foo LY. 1989. Chromatography of proanthocyanidins. En: *Chemistry and significance of condensed taninns.* Hemingway RW, Karchesy JJ (eds). Plenum Press. Pp 139 - 151.
- Lata B, Trampeczynska A, Paczesna J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae.* 121: 176 - 181.
- Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz H. 1999. High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J Agric Food Chem.* 47: 3693 - 3701.
- Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 51: 6516 - 6520.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* 134: 3479S - 3485S
- Loy S, Simon R, Delgado R. 2002. VIMANG, un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad. *Rev Cub Invest Biomed.* 21: 167 - 170.
- Lu Y, Foo LY. 1998. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chem.* 61: 29 - 33
- Manzocco L, Anese M, Nicoli MC. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT.* 31: 694 - 698.
- Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol.* 80: 1627 - 1631.
- Roginsky V, Lissi EA. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235 - 254.
- Salgado JM, Curte F, Mansi DN. 2008. Effect of gala apples (*Malus domestica* Borkh) on lipidemia of hyperlipidemic rats. *Cienc Tecnol Aliment.* 28: 477 - 484.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16: 144 - 158.
- Waterhouse AL. 2001. Determination of Total Phenolics. En: *Current Protocols in Food*

Analytical Chemistry, 11.1.1-11.1.8, Wrolstad RE (ed). John Wiley & Sons, New York.

Watterman PG, Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Sci Pubs. Oxford UK.

Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidants activity of apple peels. J Agric Food Chem. 51: 609 - 614.