GRASAS Y ACEITES, 58 (1),
ENERO-MARZO, 5-9, 2007,
ISSN: 0017-3495

INVESTIGACIÓN

Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana

Por, **R. F. González-Laredo*, M. G. Reyes-Navarrete, A. M. Preza y Lerma, M. Rosales-Castro, J. Morales-Castro, J. A. Gallegos-Infante, y N. E. Rocha-Guzmán**

Instituto Tecnológico de Durango, Dpto. de Ingenierías Química y Bioquímica
Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote., 34080 Durango, Dgo., México.
Teléfono y Fax: (618) 8 18 69 36, 818 54 02, Ext. 112.
e-mail: gonzalezlaredo@gmail.com

RESUMEN

Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana

Se estudiaron extractos fenólicos de semillas de manzana (*Malus domestica*) de variedades Red delicious (Rd) y Blanca de asturias (Ba). Se realizaron dos procedimientos de extracción sucesiva con solventes orgánicos para la evaluación de fitoquímicos con naturaleza hidrofílica, uno con hexano, acetato de etilo, metanol 50% y otro con hexano y acetona 70%. Los extractos acetónicos mostraron un mayor contenido de fenoles totales y de taninos condensados en comparación con los extractos de acetato de etilo y metanol acuoso en las dos variedades estudiadas. Independientemente de la variedad, los extractos acetónicos mostraron mayor capacidad atrapadora de radicales libre (%ARL), en comparación con los demás extractos. El análisis cromatográfico de los extractos mediante capa fina bidimensional fue positivo para proantocianidinas (taninos condensados). También se evaluó el efecto biológico de los extractos crudos sobre la proliferación de células transformadas (células HeLa), mismo que fue equivalente al control positivo de catequina. Los extractos acetónicos mostraron el mayor efecto inhibitorio en la proliferación celular entre todos los extractos y controles.

PALABRAS-CLAVE: Antioxidante - Manzana - Polifenol - Quimioprotección - Semilla.

SUMMARY

Antioxidant evaluation and chemoprotection of phenolic extracts from apple seeds

Phenolic extracts from apple seeds (*Malus domestica*) belonging to the Red delicious (Rd) and Blanca de asturias (Ba) varieties were studied. Two extraction sequences with organic solvents were performed to evaluate hydrophilic phytochemicals: one with hexane, ethyl acetate and 50% methanol and the other with hexane and 70% acetone. For both apple varieties, acetone extracts showed higher total phenolics and condensed tannin content than ethyl acetate or aqueous methanol extracts. The same trend was observed with acetone extracts, which showed the highest free radical scavenging activity (%RSA). Bidimensional thin later chromatography plates gave positive evidence for proanthocyanidins (condensed tannins). The effect of crude extracts on transformed cells (HeLa) was evaluated and found to be as strong as the positive control (catechin). Aqueous acetone extracts showed the highest inhibition to cell proliferation of all tested extracts and controls.

KEY-WORDS: Antioxidants - Apple - Chemoprotection - Polyphenol - Seeds.

1. INTRODUCTION

Actualmente existe un gran interés por compuestos bioactivos de origen natural como auxiliares en la prevención de enfermedades, por su efectividad biológica al proporcionar bienestar y salud. Está en auge el mercado de complementos dietéticos y nutracéuticos que contengan compuestos capaces de inhibir o inactivar radicales libres, ya que estos compuestos han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares. Al incrementar el consumo de antioxidantes en la dieta es posible coadyuvar al equilibrio entre éstos y los agentes oxidantes. Aproximadamente el 30% de los productos antineoplásicos mas eficaces provienen de fuentes naturales o son derivados de un compuesto natural básico. En el caso de la manzana se encuentran documentados datos sobre su contenido polifenólico en diferentes partes de la misma como su pulpa, piel y jugo (Wolfe *et al*., 2003). Los flavonoides y otros compuestos fenólicos se han reportado con importante actividad antioxidante que se asocia a la reducción de riesgos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Saura-Calixto, 1998).

La metodología tradicional en la investigación de productos naturales, aplica técnicas analíticas para aislar compuestos químicos y purificarlos. Sin embargo, muchos de los compuestos aislados carecen de valor terapéutico. Por ello se impone actualmente detectar primero la actividad biológica (Laux *et al*., 2002) mediante un sondeo probando diferentes bioensayos, con el fin de seleccionar los

extractos más activos (Cordell *et al.*, 1993). Posteriormente, estos extractos se someten a una purificación biodirigida para aislar los compuestos responsables de la actividad biológica. En este contexto, existen estudios que revelan el efecto antioxidante de algunas crucíferas y una gran variedad de frutas (Halvorsen *et al.*, 2002), dentro de las cuales destacan frutas cítricas, drupas y pomos; en este último grupo se incluye a las manzanas.

Existen referencias sobre el contenido polifenólico en diferentes partes de los tejidos de la manzana, como la pulpa y la piel (Lees *et al.*, 1995), en el jugo y licores que de ella se obtienen (Eberhardt *et al.*, 2000). A los flavonoides y otros compuestos fenólicos se les atribuye actividad antioxidante, antimicrobial, antiinflamatoria; asimismo, se les reconocen propiedades benéficas para la salud, específicamente en enfermedades cardiovasculares, así como en la prevención del cáncer (Lu y Foo, 2000). Sin embargo, existen pocos estudios sobre semillas de manzana (Sakakibara *et al.*, 2003) aún cuando ésta ocupa el tercer lugar en contribución de flavonoides, tan solo después del té y de las cebollas (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999). A pesar de las referencias sobre este fruto, una de las partes poco exploradas son sus semillas y particularmente el efecto de sus componentes fenólicos (Lu y Foo, 1998). Por lo anterior, el propósito de este trabajo es evaluar el efecto antioxidante y quimioprotector frente a células cancerosas de extractos fenólicos extraídos de semillas de dos variedades comunes de manzana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

Muestras de semilla de dos variedades de manzana, Red delicious (Rd) y Blanca de asturias (Ba), correspondientes a la cosecha 2000-2001, fueron proporcionadas por el M.C. Manuel González Portillo, investigador del Campo Experimental Valle del Guadiana, Estación "CANATLÁN" del INIFAP, ubicado en camino a Ignacio Manuel Altamirano Km 35, Canatlán, Durango, México.

2.2. Obtención de extractos

Las semillas enteras se sometieron a molienda en un micromolino Bel-Art. Los extractos fenólicos se extrajeron mediante dos secuencias independientes. En ambos casos la harina de semilla de manzana se desengrasó previamente con hexano. En el proceso 1, se extrajeron luego los polifenoles con acetato de etilo, continuando la extracción con metanol acuoso (50%). En el proceso 2, se utilizó acetona acuosa al 70 %. En todos los casos, la relación peso volumen empleada fue 2,5:1, con tres realimentaciones de solvente fresco y combinación de extractos parciales. Todas las muestras en extracción fueron mantenidas en agitación a 50 rpm por 24h a temperatura ambiente en una Agitadora New Brunswick Scientific. Los extractos polifenólicos fueron concentrados a vacío en un rotavapor (Büchi R-200/250) y posteriormente se almacenaron hasta su uso.

2.3. Evaluación cuantitativa

Los fenoles totales fueron evaluados por el método de Folin-Ciocalteu y reportados como equivalentes de ácido tánico. La cuantificación de taninos condensados se realizó por el método de la vainillina y los resultados se expresaron como equivalentes de (+)-catequina. Ambos procedimientos son citados por Waterman y Mole (1994).

El efecto antioxidante fue evaluado como la capacidad atrapadora de radicales libre (%ARL) mediante el método del DPPH* (radical 2,2-difenilo-1picrilhidracilo) (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se tomaron ácido ascórbico, catequina y gravinol como estándares.

Se llevó a cabo un análisis de cromatografía bidimensional en capa fina con soporte de celulosa (Karchesy *et al.*, 1989). Se utilizaron los sistemas de solventes TBA, *ter*-butanol-ácido acético-agua (3:1:1) para la fase orgánica y ácido acético 6% para la fase acuosa. Los cromatogramas fueron observados bajo luz visible, luz ultravioleta (onda corta y larga) (Markham, 1982) y después revelados con solución ácida de vainillina, seguida de calor (Yazaky *et al.*, 1993).

2.4. Evaluación biológica

El material biológico utilizado, fue la línea celular HeLa. Para la evaluación del efecto de los extractos crudos sobre la proliferación de células transformadas (células HeLa) se prepararon soluciones de cada uno de ellos. Se utilizaron (+) catequina, ácido gálico y gravinol como estándares y como control negativo, cultivos celulares sin antioxidantes. Para todos los tratamientos se prepararon soluciones de 0,05; 0,5; 5 y 50 mg/mL en DMEM libre de suero, los cuales se esterilizaron por filtración. En placas de 24 pozos se sembró una densidad de 5 X 10^3células/mL en DMEM suplementado con suero de ternera al 10% y antibióticos. Se incubaron los cultivos a 37°C en una cámara humidificada con atmósfera de 5% de CO_2 durante 48h. Después de este tiempo, se aplicaron los tratamientos con los extractos de prueba y los controles negativos y positivos a las concentraciones señaladas. Se incubaron los tratamientos durante 2h adicionales. Al término de este período, se lavaron los cultivos con solución salina de fosfatos y se continuó la incubación por 48h bajo las condiciones iniciales. Al término del experimento, se cuantificaron células viables empleando el colorante azul tripano.

2.5. Análisis de resultados

Los resultados se analizaron con el programa Statistica versión 5.5. (StatSoft, Inc.) mediante aná-

lisis de varianza de una sola vía ANDEVA ($p<0.05$) y se realizó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de fenoles totales y de taninos condensados en los extractos acetónicos fue la más alta en ambas variedades (Tabla 1). Este hecho confirma la mayor selectividad de este solvente en la extracción de compuestos fenólicos (Chung *et al.*, 1998) en comparación con el acetato de etilo y metanol, empleados en el proceso 1. En la cromatografía en capa fina en celulosa, se confirmó la presencia de proantocianidinas (taninos condensados) en todos los extractos. Previamente se habían reportado proantocianidinas en tejidos de testa de semillas de manzana (Lees *et al.*, 1995). A estos compuestos se les han atribuido algunos efectos biológicos benéficos para la salud.

La capacidad mostrada de atrapamiento de radicales libres (%ARL) determinada por el método de DPPH* no presentó diferencia significativa en relación a la variedad estudiada (Tukey $p<0.05$), sin embargo, el método de extracción si influyó en este parámetro. El comportamiento de los extractos con acetato de etilo [0,5mg/mL] no varió después de 30 min (Figura 1), en comparación a lo mostrado por el ácido ascórbico [0,5mg/mL], la catequina [0,5mg/mL] y el gravinol [0,5mg/mL], los que presentaron un valor máximo constante a partir de los 15min. Al determinar la %ARL de los extractos de acetona acuosa [0,5mg/mL] (Figura 1), se observó un comportamiento similar al mostrado por los estándares, independientemente de la variedad. El gravinol contiene compuestos activos representativos, como resveratrol y proantocianidinas, por lo que es una buena referencia para realizar comparaciones. Los extractos con acetona 70% a una concentración de 0,5mg/mL, presentan una %ARL para las variedades Rd y Ba de 91,23±2.31% y 94,26±3.02%, respectivamente. Estos son valores semejantes a los obtenidos con los estándares de gravinol (91,22±0.21%) y de ácido ascórbico (86,53±3.46%), lo que muestra a los

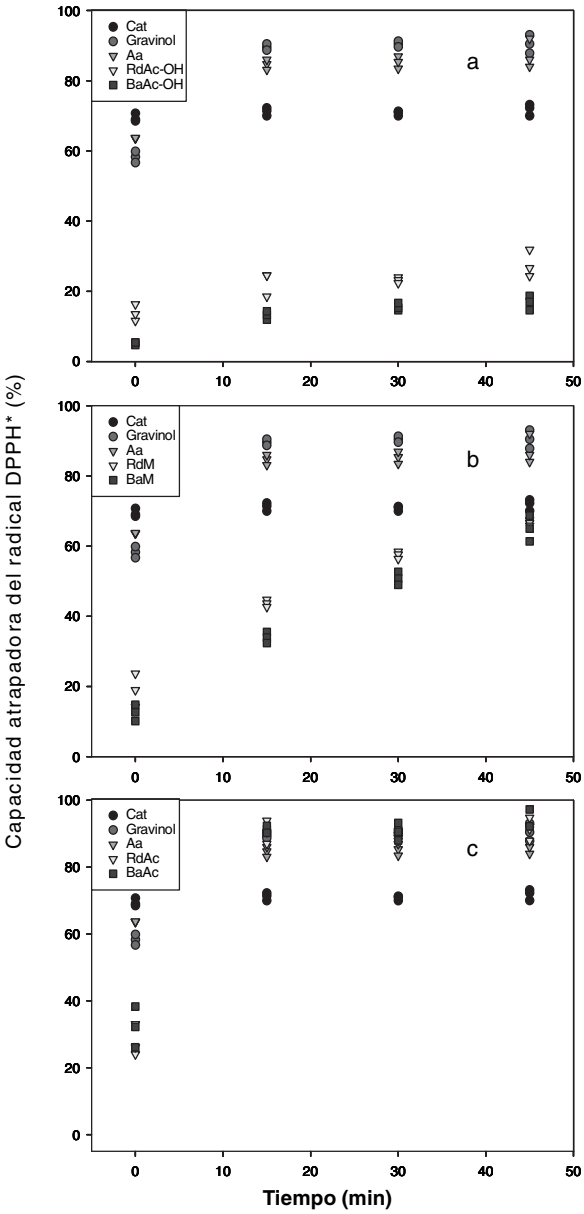

Figura 1
Capacidad de atrapamiento de radicales libre (%ARL) de extractos fenólicos de semilla de manzana. **a.** Extracción con acetato de etilo (Proceso 1). **b.** Extracción con metanol 50% (Proceso 1), **c.** Extracción con acetona 70% (Proceso 2). Concentración [0.5 mg/mL].

Cuadro 1
Rendimientos, contenido de fenoles totales y taninos condensados de extractos fenólicos de semilla de dos variedades de manzana.

	Extracto	Red delicious	Blanca de asturias
Rendimientos %	Acetato de etilo	1,97 ± 0,46	2,49 ± 0,40
	Metanol 50%	5,15 ± 2,48	6,71 ± 3,46
	Acetona 70%	5,80 ± 0,70	6,55 ± 0,21
Fenoles totales	Acetato de etilo	4,96 ± 0,08	4,55 ± 0,79
(equivalentes de	Metanol 50%	17,41 ± 1,67	17,59 ± 1,79
ácido tánico)	Acetona 70%	70,30 ± 1,11	68,14 ± 2,20
Taninos condensados	Acetato de etilo	0,79 ± 0,19	0,59 ± 0,17
(equivalentes de	Metanol 50%	10,92 ± 0,89	7,25 ± 0,25
(+) -catequina)	Acetona 70%	41,01 ± 3,60	43,08 ± 2,01

Cada valor corresponde al promedio de dos experimentos y tres repeticiones de cada parámetro evaluado

extractos acetónicos con una sobresaliente actividad antioxidante.

Los flavonoides y los ácidos fenólicos pueden actuar como antioxidantes por diferentes rutas. La más importante es probablemente la relacionada con el secuestro, desactivación, neutralización y arrastre de radicales con la que los polifenoles pueden romper la reacción prooxidante en cadena de los radicales libres. En los extractos de acetato de etilo de ambas variedades de manzana, se utilizaron concentraciones relativamente altas por lo que no se les puede considerar como buenos antioxidantes basados en el atrapamiento de radicales libres. En el caso de los extractos de acetona 70%, ante la mayor selectividad por polifenoles del solvente, probablemente sean estos compuestos los responsables de la actividad antioxidante detectada en los ensayos. Los extractos acetónicos presentaron características semejantes a los antioxidantes de tipo hidrofílico (como es el caso del ácido ascórbico).

Este estudio fue diseñado para evaluar la presencia de fenoles y su capacidad como agentes antioxidantes (atrapando radicales libres o inhibiendo la peroxidación lipídica) y anticancerígenos (Middleton *et al.*, 2000), características que los clasifican como agentes quimioprotectores (Eberhardt *et al.*, 2000). Para este propósito, se evaluó el efecto de los extractos fenólicos obtenidos a partir de los diferentes métodos de extracción sobre la inhibición de la proliferación de células transformadas HeLa. Las curvas de inhibición para cada uno de los extractos y las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) fueron determinadas dentro de diferentes rangos de concentración, dependiendo del extracto. Se probaron los estándares y extractos fenólicos en el rango de 0.05 a 5 mg/mL, encontrando para el caso del gravinol a todas las concentraciones un efecto citotóxico. Esto se explica recordando que los compuestos fenólicos a dosis altas pueden ser tóxicos, dependiendo de su estructura química, del blanco y el grado de exposición (Middleton *et al.*, 2000), ya que es sabido que en sistemas biológicos actúan como agentes prooxidantes al interactuar con la maquinaria celular. Lo anterior crea situaciones contradictorias al interpretar los datos obtenidos y correlacionarlos simultáneamente con su actividad antioxidante o en el caso específico del gravinol su actividad prooxidante en este sistema. Al evaluar la catequina, el valor de IC_{50} fue determinado como 0,5mg/mL, concentración que fue utilizada para evaluar los extractos fenólicos en estudio (Figura 2). Es importante resaltar que al momento de preparar los tratamientos, el pH del medio de cultivo fue ajustado y mantenido constante, evitando así cualquier efecto negativo sobre la proliferación de las células.

Los extractos acetónicos mostraron un efecto inhibitorio superior al 70% hacia la proliferación de células transformadas HeLa para el caso de los extractos de semillas de Ba y mayor al 60% para los de semillas Rd. Está documentado que algunos polifenoles *in vitro* inhiben eficientemente la proliferación de células de cáncer de origen epidérmico. Esta inhibición se encuentra asociada con una reducción en el nivel y actividad del factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP1). Estas proteínas regulan la transcripción, diferenciación y proliferación celular por enlazamientos *a motifs* de reconocimiento específicos en genes blanco (Balasubramanian *et al.*, 2002).

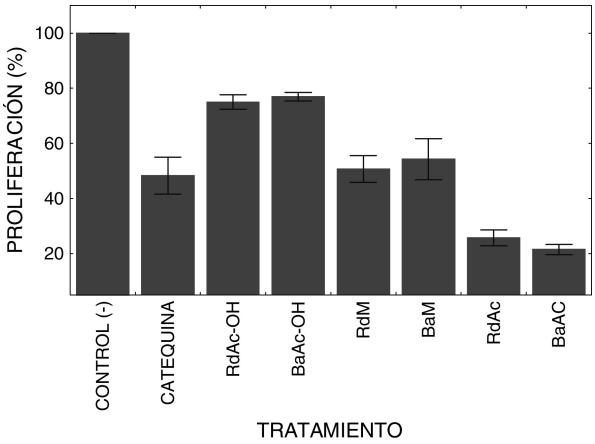

Figura 2.
Proliferación (%) de células transformadas HeLa a las 96 horas de cultivo, sometidas a tratamiento con extractos fenólicos y catequina a concentraciones de 0,5 mg/mL.

Se resalta el hecho de que *in vivo* la mayoría de los polifenoles son desglicosilados por la acción de β-glicosidasas en el intestino delgado ya que este paso es requisito para la absorción de muchos de estos compuestos. Después de la absorción, los productos formados son metabolizados por las enzimas de la fase II, dando como resultado conjugados glucosilados y sulfatados. Esto no ocurre en los ensayos *in vitro* a menos que se adicione un ensayo que simule la biotransformación de los compuestos. Sin embargo, los resultados obtenidos nos permiten recomendar estos extractos polifenólicos para posteriores estudios *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Balasubramanian S, Efimova T, Eckert R L. 2002. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expresión in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 1828-1836.

Brand-Williams WB, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss.u.Technol.* **28**, 25-30.

Chung KT, Wong TY, Wei Ch, Huang YW, Lin Y. 1998. Tannins and Human Health: a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **38**, 421-464.

Cordell, GA, Kinghorn, AD, Pezzuto, JM. 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: *Bioactive natural products: detection, isolation and structure determination*, 199-200. Colegate, S. M., Molyneux, R. J. (Eds.). CRC Press.

Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.***405**, 903-904.

Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod H, Andersen LF, Moskaug JO, Jacobs DR, Blomhoff R. 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* **132,** 461-471.

Karchesy JJ, Bae Y, Chalder-Scott L, Helm RF, Yeap Foo L. 1989. Chromatography of proanthocyanidins. In: *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Karchesy J. J., Hemingway R. W., 139-151. Plenum press.

Lees GL, Wall KM, Beveridge TH, Suttill NH. 1995. Localization of condensed tannins in apple fruit peel, pulp and seeds. *Can. J. Bot.* **73**, 1897-1904.

Laux MT, Ketzis J, Berry J. 2002. Plants natural products as source of anti-cancer drugs, a review. *Revista Latinoamericana de Química* **30**, 29-36.

Lu Y, Foo LY. 1998. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chem.* **61**, 29-33.

Lu Y, Foo LY. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **68**, 81-85.

Markham KR. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, New York, USA.

Middleton E, Kandaswami Ch, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* **52**, 673-751.

Pekkarinen SS, Stockmann H, Schwarz K. 1999. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3036-3043.

Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 571-581.

Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1999. Free radical scavenging capacity and Inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. International.* **32**, 407-412.

Saura-Calixto F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 10-15.

Waterman PG, Mole S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, England.

Wolfe KL, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 609-614.

Yazaky Y, Gu R, Lin Y, Chen N, Nguyen NK. 1993. Analyses of black wattle tannins (*Acacia mearnsii*). *Holzforschung.* **47**, 57-61.

Recibido: Septiembre 2005
Aceptado: Septiembre 2006