

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“FRUTAS TROPICALES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN COMO
ALIMENTO E INGREDIENTE FUNCIONAL: EVALUACIÓN DE
COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M.C VÍCTOR MANUEL MOO HUCHIN

ASESOR:

DR. ENRIQUE SAURI DUCH

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

16 DE FEBRERO DE 2016

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Mérida

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-035/2016

MÉRIDA, YUCATÁN A 02 DE FEBRERO DE 2016

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

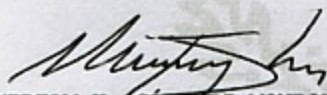
C. VÍCTOR MANUEL MOO HUCHIN
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE.

De acuerdo al fallo emitido por sus asesores el Dr. Enrique Sauri Duch, y la comisión revisora integrada por el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, la Dra. María de Lourdes Vargas y Vargas, el Dr. Iván Alfredo Estrada Mota, y el Dr. Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"FRUTAS TROPICALES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN COMO ALIMENTO E INGREDIENTE FUNCIONAL:
EVALUACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES"**

ATENTAMENTE

IN HOC SIGNO VINCES


M.C. MIRIAM H. SÁNCHEZ MONROY
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
MHSM/fga.



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


Fecbi



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P. 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México. Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail:itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



MANUFACTURADO
MÁS DEL 75%
EN YUCATÁN EN
VIGENCIA DEL
15 DE FEBRERO DE
2016

GL
MÁS DEL 75%
EN YUCATÁN

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación, no ha sido aceptado previamente por ninguna institución para la obtención de grado académico alguno.

Los resultados que se presentan en ésta tesis, provienen de las investigaciones realizadas por el autor, excepto en aquellas secciones donde se reconocen las fuentes de información consultadas.

El autor, otorga su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida, para cualquier tipo de reproducción del documento con el fin de intercambio bibliotecario; asimismo, autoriza que los resultados de la investigación estén disponibles para quien lo solicite, siempre y cuando se proporcione los créditos pertinentes.

M. en C. Víctor Manuel Moo Huchin

DEDICATORIA

Con todo mi amor y aprecio para ustedes:

A mis padres: Gloria Huchin y Gilberto Moo

A mi hermana: Mariela Moo

A mi novia: Diana Aguilar

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento, al Dr. Enrique Sauri Duch, una persona que admiro como amigo y profesional. Su amplia visión, congruencia y los sabios consejos como director de tesis permitió la conclusión de la tesis y el inicio de mi formación como investigador.

Agradezco infinitamente al Dr. Luis Cuevas Glory, Dr. Elizabeth Ortiz, Dr. Maria Lourdes Vargas y Vargas; ustedes han sido parte medular importante de mi formación desde la Maestría al Doctorado. Son grandes amigos y aún recuerdo todos aquellos consejos y tutoría de ustedes durante muchos años.

Agradezco al Director General y Director Académico del ITESCAM por todo su apoyo y facilidades para la conclusión de esta etapa de mi formación.

Al Laboratorio de Instrumentación Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida y el Laboratorio de Análisis instrumental del ITESCAM que me ha cobijado durante varios años con excelentes resultados en mi formación académica y profesional.

A mis amigos el Dr. Emilio Pérez Pacheco, Dr. Raciél Estrada León y Dr. Iván Estrada Mota; ustedes que siempre me acompañan en mi trabajo y que somos parte de un cuerpo académico: Bioprocesos.

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma estuvieron colaborando conmigo, porque cada una aportó con un granito de arena; y es por ello que a todos y cada uno de ustedes reciban un especial reconocimiento.

RESUMEN

Actualmente, las dietas recomendadas son las que incluyen una alta proporción de alimentos de origen vegetal, entre los que destacan las frutas como vía de prevención de algunas enfermedades crónicas-degenerativas como el cáncer. Las frutas comparten en su composición una serie de compuestos naturales que se complementan y unen para ayudar al desarrollo de una vida sana. Es por ello importante conocer la composición de los alimentos de origen vegetal para poder obrar en beneficio de la salud. El beneficio del consumo de frutas en la salud parece estar relacionado con la presencia de un amplio número de compuestos que pertenecen al grupo de las denominadas sustancias bioactivas tales como las sustancias nitrogenadas, las azufradas, las térpenicas y, las más ampliamente estudiadas, los compuestos fenólicos. Actualmente, los países de clima tropical son reservorios de especies de frutas nativas que son consumidos por los pobladores locales y que han sido reportados como fuente importante de antioxidantes que pueden tener efectos beneficiosos en la prevención del desarrollo de distintos tipos de enfermedades. Actualmente, diferentes investigadores indican que no es seguro que puedan conseguirse los mismos beneficios con los componentes aislados de las frutas como los que se consiguen con una dieta equilibrada adecuada. La Península de Yucatán presenta un ecosistema tropical en donde ofrece una gama de frutas nativas con diversas coloraciones que pueden resguardar una amplia variedad estructural de sustancias con potencial bioactivo con beneficios para la conservación de la salud. Además, con el concepto de aprovechamiento integral, se destacan las estrategias para la revalorización de bio-productos de las frutas como piel, cáscara, semillas, hojas, huesos y otras fracciones no comestibles o partes desechadas sin poco valor; pero se ha comprobado que dichas fracciones muestran un alto contenido de sustancias bioactivas y un potencial bioactivo. Dado que se pretende contribuir al valor y reconocimiento de las frutas tropicales pocos estudiados y con posibilidades comerciales cultivadas en la Península de Yucatán; la presente tesis doctoral tiene como objetivo, evaluar el contenido de compuestos bioactivos y la actividad biológica de un grupo de frutas tropicales con valor promisorio cultivadas en la Península de Yucatán, México para contribuir en el potencial, valoración y aplicabilidad de estas frutas en el sector

alimentario. Las frutas fueron adquiridas con maduración comestible en los diversos mercados locales de Campeche y Yucatán. Se obtuvieron las partes comestibles de todas las frutas y fueron inmediatamente almacenadas a -20°C hasta su análisis. Además, la cáscara de frutas que se distinguieron por su intensa coloración (marañón amarillo, marañón rojo y caimito morado) fueron separados para su liofilización y evaluación. Las partes comestibles de las frutas tuvieron una alta variabilidad en sus características físico-químicas tales como humedad, rendimiento de partes comestibles, sólidos solubles totales, parámetros de color CIELAB y acidez titulable. En otro resultado, las partes comestibles y la cáscara de las frutas analizadas resultaron con mayor cantidad de compuestos bioactivos (antocianinas totales, flavonoides totales, vitamina C, compuestos fenólicos totales, carotenoides totales y fibra dietética) comparado con otras frutas tropicales y no tropicales producidas en el mundo. Respecto a la capacidad de secuestro de radical DPPH y ABTS, las partes comestibles de uaya, caimito, ciruela, marañón, zapote blanco, anona, saramuyo y nance mostraron alta capacidad antioxidante. Se encontró que el contenido de fenoles solubles totales se correlaciona con la actividad antioxidante medido con el ensayo ABTS ($R=0.52$, $P\leq 0.05$) y DPPH ($R=0.43$, $P\leq 0.05$). Ambos métodos usados para medir la capacidad antioxidante de las frutas mostraron resultados comparables atribuido a una alta correlación entre los ensayos ($R=0.82$, $P\leq 0.05$). De manera general, la capacidad antioxidante resultó similar entre las cáscaras liofilizadas de las tres frutas evaluadas; sin embargo, estos valores fueron muy superiores a otros bio-productos de la industria frutícola reportados. Se encontraron 6 y 12 compuestos fenólicos en las cáscaras y partes comestibles de las frutas por HPLC, respectivamente. Se destaca que la porción comestible de nance rojo obtuvo la mayor cantidad de ácido cafeico (596.8 mg/100 g de porción comestible); mientras que la cáscara de caimito morado obtuvo la mayor cantidad de ácido gálico (229.49 mg/100 g de cáscara liofilizada). De acuerdo al perfil cromatográfico de carotenoides individuales se encontraron cuatro carotenoides (luteína, licopeno, β -caroteno y β -criptoxantina) en las porciones comestibles de las frutas. Los carotenoides identificados en las frutas se han reportado en la literatura que ayudan a prevenir el desarrollo de enfermedades degenerativas tales como enfermedades

cardiovasculares, degeneración macular, algunos tipos de cáncer y cataratas. El extracto de carotenoides de la porción comestible de ciruela roja, saramuyo verde, ciruela verde-amarillo, marañón amarillo, saramuyo morado y nance verde mostró alta capacidad antioxidante cuando se utilizó el ensayo ABTS. Sin embargo, cuando se utilizó el ensayo DPPH, el extracto de carotenoides de nance verde resultó con mayor actividad antioxidante. Las porciones comestibles de uaya, marañón rojo y marañón amarillo obtuvieron altos valores de equivalente a retinol (1,266–2,908 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de porción comestible). Los contenidos de luteína y β -criptoxantina se correlacionaron con la actividad antioxidante medido con ABTS ($R=0.41$ y $R=0.31$, respectivamente). El ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B revela que los extractos de antioxidantes de las frutas no mostraron toxicidad para la célula de la línea Vero. El análisis de cluster y análisis de componentes principales permitieron la clasificación de las frutas en cuatro grupos, en donde el primer grupo (marañón rojo, ciruela verde, marañón amarillo, saramuyo verde, caimito morado, anona roja, saramuyo morado, zapote blanco, nance rojo, nance amarillo, ciruela roja, uaya, nance verde, anona amarillo y caimito verde) correspondió a frutas con alta actividad antioxidante y alto contenido de compuestos fenólicos totales. Todos los hallazgos promocionan el consumo y procesamiento de las partes comestibles y cáscaras como bio-productos de las frutas nativas de la Península de Yucatán, ya que son fuente importante de antioxidantes naturales con actividad no-tóxica para la dieta y pueden ser usados como ingredientes funcionales para el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria.

Palabras claves: Frutas tropicales; actividad antioxidante; compuestos bioactivos; toxicidad; alimento funcional.

GENERAL SUMMARY

Currently, the most recommended diets are those which include a high proportion of food derived from plants, in particular fruit, as a preventive measure against certain chronic-degenerative diseases such as cancer. All fruits share a series of natural compounds in their composition which complement each other and combine, aiding the development of a healthy life. It is important therefore to identify the composition of the products of plant origin in order to stimulate health improvement. The advantage of consuming fruit appears to be associated with the presence of a large number of compounds belonging to the group of bioactive substances, such as nitrogenous, sulfur and terpenic substances, as well as the most widely studied, phenolic compounds. Countries with a tropical climate are reservoirs of native fruit species which are consumed by the local inhabitants; these fruits have been reported as an important source of antioxidants which can have beneficial effects in preventing the development of certain types of diseases. A number of researchers have recently reported that there is, as yet, no guarantee that the benefits obtained from the compounds isolated from the fruit are the same as those obtained from an adequately balanced diet. The Yucatan Peninsula presents a tropical ecosystem offering a range of native fruits with a diversity of colors which may contain a wide structural variety of substances with the bioactive potential for health conservation. Moreover, within the concept of integral exploitation, strategies for the revalorization of fruit bio-products, such as skin, peel, seeds or pits and other inedible or discarded parts of little value are of particular importance; however, these fractions have been found to present a high content of bioactive substances and bioactive potential. With the purpose of contributing to the value and recognition of tropical fruits with commercial possibilities cultivated in the Yucatan Peninsula, the aim of the present doctoral thesis is to evaluate the content of bioactive compounds and the biological activity of a group of tropical fruits with promising value cultivated in the Yucatan Peninsula, Mexico, and thus contribute to the potential, evaluation and applicability of these fruits in the food industry. The fruit was acquired with ripeness for consumption in diverse local markets of Campeche and Yucatan. The edible parts of all the fruits were obtained and stored immediately at -20°C until analysis.

In addition, the skin or peel of the most intensely colored fruits (yellow cashew, red cashew and purple star apple) was collected for lyophilization and evaluation. The edible parts of the fruits presented a high variability in their physico-chemical characteristics, such as humidity, yield of edible parts, total soluble solids, CIELAB color parameters and titratable acidity. In another result, the edible parts and peel of the fruits analyzed presented a greater quantity of bioactive compounds (total anthocyanins, total flavonoids, vitamin C, total phenolic compounds, total carotenoids and dietary fiber) in comparison with other tropical and non-tropical fruits produced in the world. With respect to DPPH and ABTS radical scavenging capacity, the edible parts of mamoncillo, star apple, mombin, cashew, white sapote, ilama, sugar apple and nance showed high antioxidant capacity. The total soluble phenolic content was found to be in correlation with the antioxidant activity measured with the ABTS assay ($R=0.52$, $P\leq 0.05$) and DPPH ($R=0.43$, $P\leq 0.05$). Both methods used to measure the antioxidant capacity of the fruits showed similar results which can be attributed to a high correlation between the assays ($R=0.82$, $P\leq 0.05$). In general, the antioxidant capacity was similar among the lyophilized peels of the three fruits evaluated; however, these values were much higher than those reported for other bio-products of the fruit industry. By means of HPLC, the peels and edible parts of the fruits were found to contain 6 and 12 phenolic compounds, respectively. The edible portion of the red nance presented the greatest quantity of caffeic acid (596.8 mg/100 g of edible portion); while the peel of the purple star apple obtained the highest quantity of gallic acid (229.49 mg/100 g of lyophilized peel). According to the chromatographic profile of individual carotenoids, four carotenoids were found (lutein, lycopene, β -carotene and β -cryptoxanthin) in the edible portions of the fruits. The carotenoids identified in the fruits have been reported to be of help in preventing the development of degenerative disorders such as cardiovascular disease, macular degeneration, certain types of cancer and cataracts. The carotenoid extract from the edible portion of the red mombin, green sugar apple, green-yellow mombin, yellow cashew, purple sugar apple, and green nance showed a high antioxidant capacity with the use of the ABTS assay. However, when the DPPH assay was used, the carotenoid extract from green nance presented greater antioxidant

activity. The edible portions of mamoncillo, red cashew and yellow cashew obtained high values of retinol equivalent (1,266–2,908 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of edible portion). The contents of lutein and β -cryptoxanthin correlated with the antioxidant activity measured with ABTS ($R=0.41$ and $R=0.31$, respectively). The cytotoxicity assay with sulforhodamine B revealed that the antioxidant extracts from the fruits did not show toxicity for the Vero cell line. Cluster analysis and principal components analysis facilitated the classification of the fruits into four groups, where the first group (red cashew, green mombin, yellow cashew, green sugar apple, purple star apple, custard apple, purple sugar apple, white sapote, red nance, yellow nance, red mombin, mamoncillo, green nance, ilama and green star apple) corresponded to fruit with high antioxidant activity and high content of total phenolic compounds. All the findings recommend the consumption and processing of the edible parts and peel as bio-products of the native fruits of the Yucatan Peninsula, given that they represent an important source of natural antioxidants with non-toxic activity for the diet and can be used as functional ingredients for the development of new products in the food industry.

Keywords: tropical fruits; antioxidant activity; bioactive compounds; toxicity; functional food.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. <i>Las frutas tropicales y sus beneficios en la salud</i>	5
2.2. <i>Sustancias bioactivas de frutas tropicales</i>	9
2.3. Los radicales libres.....	45
2.3.1. Concepto y generalidades.....	45
2.3.2. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.....	46
2.3.3. Fuentes generadores de radicales libres en la célula.....	48
2.4. Estrés oxidativo.....	50
2.4.1. Concepto y generalidades.....	50
2.4.2. Efectos bioquímicos y fisiológicos del estrés oxidativo.....	50
2.5. Antioxidantes.....	51
2.5.1. Actividad antioxidante.....	53
2.5.2. Caracterización de la actividad antioxidante.....	54
2.5.3. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	55
2.5.3.1. Pruebas químicas <i>in vitro</i> de medida de la actividad antioxidante.....	56

REFERENCIAS	63
3. INTERÉS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	81
4. OBJETIVOS.....	83
4.1. <i>Objetivo general</i>	83
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	83
5. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....	85
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
6.1. <i>Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico.</i>	88
6.1.1 Abstract.....	89
6.1.2. Introduction	90
6.1.3. Materials and methods.....	91
6.1.3.1. Chemical reagents	91
6.1.3.2. Samples.....	91
6.1.3.3. Analysis of bioactive compounds.....	93
6.1.3.3.1. Total soluble phenols (TSP) and total flavonoids determination	93
6.1.3.3.2. Vitamin C	93
6.1.3.3.3. Total anthocyanins.....	94
6.1.3.3.4. Total carotenoids	94
6.1.3.4. Dietary fiber.....	95
6.1.3.5. Extracts preparation for antioxidant capacity (AOC) analysis	95
6.1.3.6. Statistical analysis	97
6.1.4. Results and discussion	97

6.1.5. Conclusions	108
6.1.6. Acknowledgments	109
6.1.7. References	109
<i>6.2. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico.</i>	114
6.2.1. Abstract.....	115
6.2.2. Introduction	116
6.2.3. Materials and methods.....	117
6.2.3.1. Sample	117
6.2.3.2. Analysis of antioxidant compounds	117
6.2.3.2.1. Determination of total soluble phenols (TSP) and total flavonoids	117
6.2.3.2.2. Total anthocyanins.....	118
6.2.3.2.3. Total carotenoids	119
6.2.3.2.4. Vitamin C	119
6.2.3.3. Antioxidant capacity (AOC).....	120
6.2.3.4. Analysis of phenolic compounds.....	121
6.2.3.5. Statistical analysis	121
6.2.4. Results and discussion	121
6.2.5. Conclusions	129
6.2.6. Acknowledgments	130
6.2.7. References	130
<i>6.3. Carotenoid composition and antioxidant activity of extracts from tropical fruits</i>	136
6.3.1. ABSTRACT	137

6.3.2. INTRODUCTION	138
6.3.3. MATERIALS AND METHODS	139
6.3.3.1. Chemical reagents	139
6.3.3.2. Samples.....	139
6.3.3.3. Extraction of carotenoids.....	141
6.3.3.3.1. Total carotenoids	141
6.3.3.3.2. Antioxidant activity determinations	141
6.3.3.3.2.1. DPPH radical-scavenging assay	141
6.3.3.3.2.2. ABTS radical-scavenging activity.....	142
6.3.3.4. HPLC analysis of individual carotenoids	142
6.3.3.5. Statistical analysis	143
6.3.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	143
6.3.4.1. Total carotenoids content in tropical fruits.....	143
6.3.4.2. Antioxidant activity of carotenoids extract from the tropical fruits evaluated.....	145
6.3.4.3. Composition of individual carotenoids from the tropical fruits studied.....	148
6.3.5. CONCLUSIONS	153
6.3.6. REFERENCES	154
6.4. <i>Phenolic compounds, classification and cytotoxic activity of tropical fruits</i>	158
6.4.1. Abstract.....	159
6.4.2. Introduction	160
6.4.3. Materials and methods.....	162
6.4.3.1. Samples.....	162
6.4.3.2. Analysis of antioxidant compounds	163

6.4.3.2.1. Determination of total soluble phenols (TSP) and total flavonoids	163
6.4.3.2.2. Total anthocyanins.....	164
6.4.3.2.3. Total carotenoids	165
6.4.3.2.4. Vitamin C	165
6.4.3.3. Antioxidant capacity (AOC).....	165
6.4.3.4. Analysis of phenolic compounds.....	167
6.4.3.5. Assessment of cytotoxicity	167
6.4.3.6. Statistical analysis	168
6.4.4. Results and discussion	169
6.4.4.1. Composición de compuestos fenólicos individuales de frutas tropicales evaluados.	169
6.4.4.2. Classification of tropical fruits by multivariate statistical analysis	172
6.4.4.3. Actividad citotóxica.....	176
6.4.5. Conclusions	177
6.4.6. Acknowledgments	178
6.4.7. References	178
7. DISCUSIÓN GENERAL	182
8. CONCLUSIONES GENERALES	188
REFERENCIAS	190
ANEXO 1	193
ANEXO 2	194
ANEXO 3	198
ANEXO 4	199
ANEXO 5	201

ÍNDICE DE TABLAS

2.1. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica.....	12
2.2. Compuestos fenólicos totales de cáscaras en frutas de Colombia	14
2.3. Contenido en mg/kg de ácidos fenólicos totales en frutas rojas.....	16
2.4. Contenido de antocianinas totales de semilla, hojas, flores y cáscara de granada	22
2.5. Contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas frutas tropicales	32
2.6. Actividad antioxidante de carotenoides en frutas y vegetales	39
2.7. Principales carotenoides identificados en frutas y verduras.....	40
2.8. Cantidades requeridas de Vitamina C en mg/día.	44
2.9. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.....	46
6.1. List of the species tropical fruits from Yucatan included in the study and parts analyzed	92
6.2. Some physicochemical characteristics of the edible parts of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.....	98
6.3. Dietary fiber contents of the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico	100
6.4. Content of bioactive compounds in the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico	102
6.5. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) in tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico	106

6.6. Pearson's Correlation between different parameters of antioxidant capacity (expressed with TEAC using ABTS and DPPH) and ascorbic acid, total flavonoids, total phenolic compounds, total carotenoids and total anthocyanins.....	107
6.7. Content of antioxidant compounds in the freeze-dried peel of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.	122
6.8. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) of the freeze-dried peel of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.....	126
6.9. Content of phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits	127
6.10. List of the tropical fruit species from Yucatan included in the study and parts analysed	140
6.11. Content of total carotenoids of tropical fruits from Yucatan, Mexico.....	144
6.12. Antioxidant activity of carotenoid extracts of tropical fruits from Yucatan, Mexico.....	146
6.13. Carotenoids contents of nineteen tropical fruits from Yucatan, Mexico	149
6.14. List of the species tropical fruits from Yucatan included in the study and parts analyzed	162
6.15. Contents of individual phenolic compounds (mg/100 g de porción comestible) in tropical fruits from Yucatan, Mexico	171
6.16. Content of bioactive compounds in the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.....	172
6.17. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) in tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.....	173
6.18. Cytotoxic activity (CC ₅₀) of antioxidant extracts from fruits cultivated in Yucatan.....	176

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Sustancias bioactivas (compuestos fenólicos y fibra dietética) en una matriz de fruta (Quirós-Sauceda et al., 2014)	5
2.2. Actividad anti-diabética de la Pitahaya roja en modelo animal.....	9
2.3. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de cumaril-CoA y malonil-CoA (Shahidi y Nacz, 2004).	13
2.4. Estructura química de los principales ácidos fenólicos	15
2.5. Estructura química de los ácidos gálico y elágico	17
2.6. Estructura química de los estilbenos.....	18
2.7. Estructura química de los flavonoides.	21
2.8. Principales grupos implicados en el potencial antioxidante. Amarillo: grupo catecol, azul: grupo hidroxilo con capacidad quelante de metales, rojo: enlace insaturado en anillo C, verde: función 4-oxo en anillo C.....	23
2.9. Destino de los compuestos fenólicos después de su ingestión.....	25
2.10. Distribución del resveratrol en órganos de ratas después de una hora de ingestión de 20 mg/kg de extracto de <i>Polygonum cuspidatum</i> . nd: no detectado.....	25
2.11. Estructura y partes de la pared celular, origen fundamental de la fibra alimentaria.....	30
2.12. Estructura de los carotenoides	35
2.13. Estructuras de los principales carotenoides presentes en los alimentos	36
2.14. Estructura molecular del ácido L-ascórbico (C: átomos de carbono, O: átomos de oxígeno, Or: átomo de oxígeno del anillo, H: átomo de hidrógeno). Fuente: Xammar Oro and Donnamaría (2006).....	41
2.15. Contenido de ácido ascórbico en la cáscara de camu-camu en estado fresco y seco.....	43
2.16. Reacciones de generación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	48

2.17. Reacciones de generación de radicales libres del oxígeno.	49
2.18. Daños producidos por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.....	52
5.1. Estrategia general de trabajo.....	87
6.1. HPLC chromatogram of phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits: (A) red cashew, (B) purple star apple and (C) yellow cashew. The peak identification of phenolic compounds are (1) gallic acid; (2) caffeic acid; (3) ellagic acid; (4) sinapic acid; (5) ferulic acid; (6) myricetin.....	128
6.2. HPLC chromatograms for carotenoids. Carotenoid standards (A); Custard apple (B).....	150
6.3. HPLC chromatograms for phenolic compounds. Red cashew (A); green-yellow mombin (B).	170
6.4. Dendograma tomando en consideración los contenidos de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, vitamina C, antocianinas totales, carotenoides totales y la actividad antioxidante medidos con los ensayos DPPH y ABTS.....	174
6.5. Proyección general de las muestras obtenidos a través del análisis de componentes principales basados en los contenidos de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, vitamina C, antocianinas totales, carotenoides totales y la actividad antioxidante medidos con los ensayos DPPH y ABTS.....	175
6.6. Proyección de variables obtenidos por el análisis de componente principal basados en los contenidos de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, vitamina C, antocianinas totales, carotenoides totales y la actividad antioxidante medidos con los ensayos DPPH y ABTS.....	175

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumo de frutas en la alimentación humana, ha dejado de ser solamente un placer para convertirse en una necesidad, dadas las buenas características que las frutas tienen para la salud y bienestar del hombre. Las frutas son muy buena fuente de energía, carbohidratos, diversas vitaminas, minerales y compuestos bioactivos para la dieta humana (Vasco *et al.*, 2008).

Hoy en día existe un consenso universal (muy extendido) de que las frutas y vegetales no sólo proporcionan los nutrientes básicos normalmente recomendados para una vida sana, sino que también contienen compuestos con actividad biológica (sustancias bioactivas) promotores de la salud como antioxidantes, antidiabéticos, anti-inflamatorios y otros compuestos con propiedades comprobadas en la prevención de enfermedades degenerativas (Robles-Sánchez *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2014; Omidizadeh *et al.*, 2014).

Es bien conocido que los radicales libres son la principal causa de enfermedades degenerativas como diversas formas de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Halliwell, 1994; Yu, 1994). Un exceso de radicales libres, suele iniciar un daño de generación celular, debido a que estos compuestos pueden reaccionar químicamente con proteínas, lípidos y ADN, produciendo en milisegundos un daño celular irreversible que puede llevar al daño del tejido y eventualmente a la muerte celular (Donaldson *et al.*, 1996; Turrens, 2003). Los compuestos bioactivos de las frutas funcionan como supresores del oxígeno singlete y triplete, depuradores de radicales libres, descomponedores de peróxido e inhibidores enzimáticos (Wang y Lim, 2000).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, indica que aumentar el consumo de frutas es un componente necesario de los esfuerzos que se despliegan para reducir la creciente carga mundial de enfermedades crónicas (OMS, 2013). Asimismo, numerosos profesionales de la salud y representantes del sector industrial sugieren ampliar la iniciativa de promoción del

consumo de frutas, especialmente las de origen de clima tropical. En este sentido el consumo de frutas tropicales producidos en diferentes países tales como México, Brasil, Tailandia, Malasia, Indonesia entre los más importantes, se ha incrementado en el mercado local e internacional debido al reconocimiento de su valor nutricional y terapéutico (Vasco *et al.*, 2008; Rufino *et al.*, 2010). Según la OMS y la FAO (2003) recomiendan un consumo diario de 400 g de fruta para la prevención de enfermedades como el cáncer, diabetes tipo 2 y la obesidad. Además, en la guía sobre alimentación saludable de la Sociedad Española y de Estados Unidos se propone una nueva pirámide nutricional que recomienda incrementar el consumo de frutas y verduras. La cantidad recomendada es un volumen equivalente a dos tazas de fruta y 2.5 tazas de vegetales al día, basado en una ingestión de 2,000 kilocalorías (Álvarez *et al.*, 2010) para la prevención de enfermedades como el cáncer, diabetes tipo II y la obesidad.

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas frescas juega un papel importante en la dieta humana, debido a los efectos positivos en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como las cardiovasculares, distintos tipos de cáncer y problemas neurológicos (Wu *et al.*, 2004, Cano *et al.*, 2005; Manach *et al.*, 2005). Este efecto protector ha sido atribuido a los compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos, fibra dietética y carotenoides, los cuales se encuentran de manera natural en las frutas y la mayoría de ellos poseen actividad antioxidante (Horubala, 1999; Borowska, 2003).

En la actualidad, diversos investigadores han reportado niveles importantes de antocianinas, compuestos fenólicos solubles, flavonoides, carotenoides, fibra dietética y una alta actividad antioxidante (evaluado a través de diferentes métodos, DPPH, ABTS, FRAP, decoloración del β -caroteno, en modelo celular: eritrocitos humanos, etc) de pulpa y cáscara de un gran número de frutas de diferentes regiones del mundo tales como Brasil, Republica Dominicana, Italia, Singapur, China, Malasia, México, India, España, Tailandia, Corea, Japón y Perú entre los más importantes (Bystrom *et al.*, 2009; Ballistreri *et al.*, 2012; Isabelle *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2009; Ikram *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Kuskoski *et al.*, 2005; Torres-Rodríguez *et al.*,

2011; Prasad *et al.*, 2011; Khonkarn *et al.*, 2010; Al-Sheraji *et al.*, 2011; Dembitsky *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2008; Clerici y Carvalho-Silva, 2011; Ugartondo *et al.*, 2006). Los resultados encontrados en estos trabajos han permitido la valoración de las frutas y sus subproductos como las cáscaras como un potencial terapéutico y funcional, lo cual ha permitido una expansión de estas frutas en el comercio internacional (Rufino *et al.*, 2010).

México es un país privilegiado al poseer vastas extensiones de tierra en zonas con clima cálido que permite la producción de frutas tropicales de buena calidad. En este sentido, la producción y comercialización de frutas tropicales en la Península de Yucatán constituye uno de los principales sectores socioeconómicos. Es de señalar que la Península de Yucatán produce una gran variedad de especies frutícolas con muy buena calidad y gran aceptación por parte de los consumidores (Sauri, 2001). Sin embargo, se considera que existen centenas de especies poco estudiadas y aprovechadas, aunque muchas de ellas se consumen ampliamente en las zonas de su producción, requieren ser estudiadas para favorecer su cultivo, comercialización, aprovechamiento e industrialización. Estas frutas tropicales representan una oportunidad para el crecimiento local que permitan el acceso a mercados especiales donde los consumidores hacen énfasis sobre lo carácter de exótico y la presencia de nutrientes capaces de prevenir enfermedades degenerativas (Alves *et al.*, 2008).

Por otra parte, en los años recientes son pocos los trabajos que se han realizado con el objetivo de contribuir al valor y reconocimiento de las frutas tropicales con posibilidades comerciales cultivadas en la Península de Yucatán. Además es importante la caracterización en la composición de las frutas de regiones tropicales ya que constituye el primer paso para la determinación del aporte de los compuestos bioactivos en la dieta. Aún existen un sin número de frutas disponibles en regiones locales que no han sido estudiados. De todo lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el contenido de compuestos bioactivos y la actividad biológica de un grupo de frutas tropicales con valor promisorio cultivadas en la Península de Yucatán, México para contribuir en el potencial, valoración y aplicabilidad de estas frutas en el sector alimentario.

La presente investigación permitiría visualizar o avanzar en el conocimiento sobre la evaluación de ingredientes bioactivos y sus propiedades de estas frutas y por lo tanto la comercialización de éstas y de los ingredientes bioactivos derivados o que se pudieran obtener a partir de ellas. De esta forma, el desarrollo del estudio podría contribuir de forma significativa para el desarrollo socioeconómico de la región peninsular en la medida en la que se divulgue de forma maximizada los resultados que se obtengan.

El presente documento, después de una revisión de literatura (Capítulo 2), se compone de artículos derivados del trabajo mismo, razón por la cual difieren en formato, ya que responden a las normas de autor que emite cada revista a la cual fueron o serán sometidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Las frutas tropicales y sus beneficios en la salud

El beneficio del consumo de frutas en la salud parece estar relacionado con la presencia de un amplio número de compuestos que pertenecen al grupo de los denominados sustancias bioactivas (Figura 2.1). Es importante destacar que aún no están claros los mecanismos de acción de estas sustancias, pero su efecto es el resultado de muchas interacciones tanto entre los distintos componentes de los alimentos, como con el propio organismo (Martínez-Navarrete, Vidal, & Lahuerta, 2008). En este sentido, no es seguro que puedan conseguirse los mismos beneficios con los componentes aislados como los que se consiguen con una dieta equilibrada adecuada.

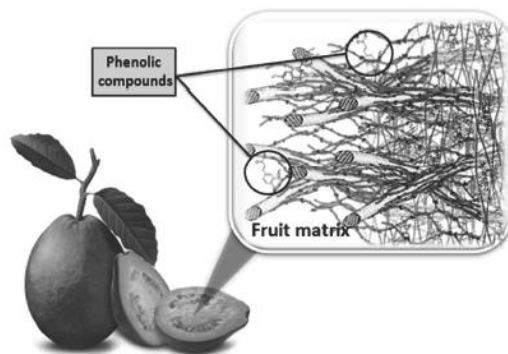


Figura 2.1. Sustancias bioactivas (compuestos fenólicos y fibra dietética) en una matriz de fruta (Quirós-Sauceda et al., 2014)

En las regiones tropicales del mundo existe una gran diversidad de frutas tropicales que son producidos y consumidos por los pobladores locales; muchas de estas frutas y sus subproductos como las cáscaras se pueden considerar como fuente de sustancias bioactivas (vitaminas, fibra dietética, compuestos fenólicos, carotenoides, esteroides y saponinas) con un interés especial debido a sus propiedades que promueven la salud humana (Allothman, Bhat,

& Karim, 2009; Cassileth, 2008; Murillo et al., 2013; Xu et al., 2004; J. Yang, Paulino, Janke-Stedronsky, & Abawi, 2007). Muchas frutas como los cítricos, las bayas, el mangostán y la granada, han atraído la atención por sus beneficios para la salud debido a la amplia gama de bioactividad que presentan (Chen & Wang, 2008).

Las frutas tropicales y subtropicales como el mango, guayaba, papaya, caqui y muchos otros, son bien conocidos en América del Norte y Europa y la información científica para promover el incremento de su consumo aún es limitado (Dube et al., 2004; Garcia, Magpantay, & Escobin, 2005; Leontowicz et al., 2006). Sin embargo, las frutas como la guayaba, mango, plátano, maracuyá, carambola, lima, piña, chirimoya, zapote, litchi y mamey, son alimentos vegetales comunes en la dieta en América del Norte y en la actualidad en Europa (Aparecida de Assis et al., 2009; Doyama, Rodrigues, Novelli, Cereda, & Vilegas, 2005; Dube et al., 2004; Kondo, Kittikorn, & Kanlayanarat, 2005; Luximon-Ramma, Bahorun, & Crozier, 2003; Mahattanatawee, Manthey, Talcott, Goodner, & Baldwin, 2005; Murcia, Jiménez, & Martínez-Tomé, 2001; Nilsson et al., 2005; Proteggente et al., 2002; Talcott, Percival, Pittet-Moore, & Celoria, 2003) (Wu et al., 2006).

RUFINO et al. (2010) Reportaron un grupo de frutas tropicales no tradicionales de Brasil con alto contenido de vitamina C, antocianinas, flavonoides, carotenoides y una alta capacidad antioxidante evaluado como la capacidad secuestradora del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrylhidrazil). Por otra parte, Barreca *et al.*, (2011) encontraron que el extracto de chirimoya presentó altas propiedades antioxidantes, disminuyendo la peroxidación lipídica de eritrocitos y con efecto citoprotector en la oxidación de linfocitos tratados con ter-butilo hidroperóxido. En este sentido en los últimos años se ha observado una tendencia del estudio de compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes de frutas tropicales no tradicionales en varios países, como Brasil que recientemente comercializa ingredientes bioactivos a Japón y Estados Unidos a partir de frutas nativas de su país (SAGARPA, 2011).

Existe la evidencia de que las frutas y vegetales juegan un papel benéfico en la prevención e incluso para el tratamiento de diferentes enfermedades (Kris-Etherton et al., 2002; Lim, Lim, & Tee, 2007; Luximon-Ramma et al., 2003; Paganga, Miller, & Rice-Evans, 1999; Proteggente et al., 2002). En un trabajo realizado, se ha demostrado que el consumo de cinco porciones de frutas o vegetales al día, las personas sujetas al estudio mostraron menos riesgo de desarrollar cáncer, particularmente los causados en el tracto intestinal (Gescher, Pastorino, Plummer, & Manson, 1998). En otro estudio, los resultados sugieren que el consumo de frutas ricas en compuestos fenólicos permiten incrementar la capacidad antioxidante de la sangre de personas (Burton-Freeman, 2010). Algunos estudios han demostrado que la fibra dietética y los compuestos fenólicos de las frutas mejoran el metabolismo lipídico y previene la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL-C) y como consecuencia impiden el desarrollo de la aterosclerosis (Gorinstein, Bartnikowska, Kulasek, Zemser, & Trakhtenberg, 1998; Gorinstein et al., 1999). Adicionalmente se ha demostrado que un bajo nivel de antioxidantes en plasma conduce a una alta mortalidad por aterosclerosis coronaria (Rankin et al., 1993). Por tanto, algunos autores sugieren dietas ricas en vegetales y frutas que son la fuente natural de antioxidantes (De Lorgeril et al., 1994).

Numerosos estudios epidemiológicos demuestran el papel de la fibra dietética presente en las frutas sobre la salud intestinal y la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad y diabetes (Anderson et al., 2009; Rosa, Alvarez-Parrilla, & González-Aguilar, 2010). El alto contenido de fibra soluble en las frutas tropicales se ha asociado a efectos más pronunciados en el ámbito intestinal (Anderson et al., 2009).

Por otro lado, acorde a Gorinstein et al. (2010), encontraron que la actividad antioxidante en sangre de ratas alimentadas con frutas de Caqui se atribuye a los compuestos fenólicos. Algunos estudios han demostrado el efecto de diversos fenoles, como el ácido gálico, miricetina, flavan-3-ols (1)-catequina y (2)-epicatequina y otros como antioxidantes. El ácido gálico se produce naturalmente en las plantas y se ha encontrado que son farmacológicamente activos como antioxidantes, antimutagénico y como agente anticancerígeno. Es evidente que

una dieta con frutas y verduras previene la arteriosclerosis y otras enfermedades (Duttaroy & Jørgensen, 2004).

Por otra parte, se ha demostrado que el consumo de kiwi disminuye los niveles de triglicéridos en la sangre de personas en comparación con el grupo control. Los investigadores reportaron que el consumo de dos o tres frutas de kiwi al día durante 28 días reduce la respuesta de la agregación plaquetaria al colágeno (Duttaroy & Jørgensen, 2004).

La actividad antioxidante, anti-inflamatorio, anticancerígena y antimicrobiana de las frutas están relacionados con el contenido de compuestos bioactivos tales como antocianinas, flavonoides, polifenoles y carotenoides (Dembitsky et al., 2011). En un trabajo reportado en la literatura se ha demostrado que los compuestos bioactivos del jugo de Pitanga, una fruta tropical de Brasil, tiene propiedades anti-inflamatoria en las encías de la boca (Soares et al., 2014).

En un estudio reciente, se ha demostrado que la variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos, fibra dietética, actividad antioxidante y la actividad anti-diabético (estudio con ratas Sprague-Dawley) puede ser atribuida al método de procesamiento de la Pitahaya roja (Omidzadeh et al., 2014) (Figura 2.2).

En un estudio realizado para determinar el efecto de la ingesta de licopeno, un carotenoide, en el tejido testicular de roedores, se obtuvo una reducción en la expresión de genes del metabolismo de la testosterona con una dieta alta en licopeno. Dado que el incremento en la concentración de testosterona se asocia con un mayor riesgo de cáncer de próstata, los resultados obtenidos podrían indicar un efecto positivo en la reducción de este riesgo (Ordóñez & Rodríguez, 2013). Asimismo, se ha demostrado que los carotenoides protegen a las células frente al ataque de las ROS, contribuyendo así a la prevención y protección contra los trastornos de salud graves como ciertos tipos de cáncer, enfermedades del corazón, y degeneración macular causadas por el exceso de radicales libres en el cuerpo (Rivera & Canela-Garayoa, 2012).

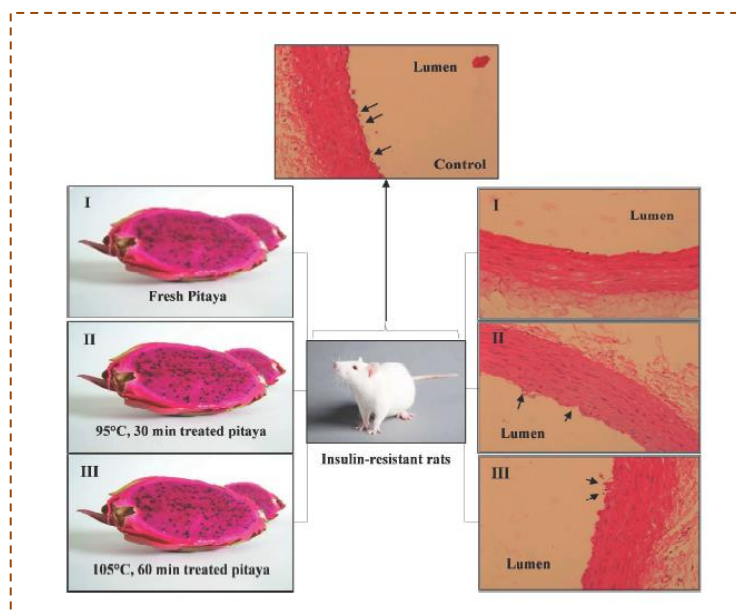


Figura 2.2. Actividad anti-diabética de la Pitahaya roja en modelo animal.

De todo lo expuesto anteriormente, en los últimos años se ha observado una clara tendencia del estudio de compuestos bioactivos y su actividad biológica especialmente en frutas tropicales nativas de cada país con el objetivo de aprovechar el acceso a mercados especiales donde los consumidores hacen énfasis sobre lo carácter de exótico y la presencia de nutrientes capaces de prevenir enfermedades degenerativas, consecuentemente ampliando las posibilidades de negocio y beneficios para los productores del sector fruticultura.

2.2. Sustancias bioactivas de frutas tropicales

➤ Compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas

Los compuestos fenólicos, denominados a veces impropriadamente polifenoles, son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009). Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de

azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Los azúcares pueden ser tanto monosacáridos como disacáridos o incluso oligosacáridos. Los más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico. En ocasiones, pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo & Saura-Calixto, 1998).

Se han llegado a identificar más de 8,000 compuestos fenólicos con estructura muy variada, por lo que su clasificación es una tarea compleja. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados por el número y arreglo de los átomos de carbono (Crozier et al., 2009). La clasificación se muestra en la Tabla 2.1.

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos fenólicos más o menos variado, siendo la familia de los flavonoides, con cerca de 4,000 estructuras diferentes una de las más estudiadas (Crozier et al., 2009).

La presencia de fenoles en las plantas es muy variada, dependiendo de la especie vegetal, variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), condiciones agroclimáticas del cultivo, así como aspectos tecnológicos relacionados con el procesado y conservación de los productos que los contienen. Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas (Figura 2.3) y Wheldale (1916) escribió un libro sobre el papel de los antocianos en las plantas. Esta investigadora había observado que los antocianos de las plantas tenían numerosos efectos protectores, tales como favorecer el camuflaje e incluso atraer insectos contribuyendo de esta manera a la polinización, pero las explicaciones que demostraban una funcionalidad en una determinada planta presentaban numerosas excepciones que quedaban sin explicación en otras plantas. Actualmente una de las explicaciones más aceptadas a la síntesis de fenoles en las plantas es como respuesta al estrés. Las plantas están casi de forma continua sometidas a un estrés ambiental debido a radiaciones

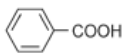
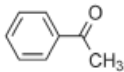
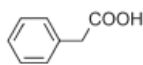
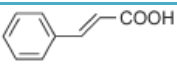
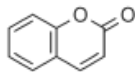
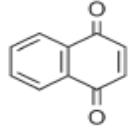
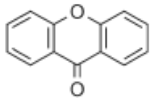
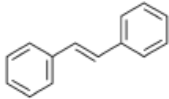
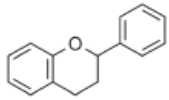
UV, altas temperaturas particularmente en zonas de clima mediterráneo, baja disponibilidad de agua, plagas, etc (Cuadra, Harborne, & Waterman, 1997).

Existen estudios que demuestran como las plantas sintetizan compuestos fenólicos para protegerse de los herbívoros (insectos o vertebrados) (Parr & Bolwell, 2000) o de las radiaciones UV u otras situaciones de estrés físico (Cuadra et al., 1997). Asimismo, los compuestos fenólicos son atractivos de animales polinizadores y/o diseminadores de semillas (Manach & Donovan, 2004), actúan como señales químicas entre plantas y microorganismos simbióticos y el ejercer una función estructural, por el efecto de las ligninas en el soporte mecánico de las plantas (Parr & Bolwell, 2000).

Pero los compuestos fenólicos no sólo son importantes para la planta, también tienen consecuencias para los animales y humanos, ya que los incorporamos a nuestro organismo con el consumo de alimentos de origen vegetal (Bravo & Saura-Calixto, 1998).

El estudio de los compuestos fenólicos en alimentación se ha centrado en varios aspectos; por una parte, en la contribución a las propiedades organolépticas como el color y el amargor. Por ejemplo, la elevada concentración de derivados de oleuropeína en el aceite de oliva virgen potencia los atributos amargo y picante (Gutierrez-Rosales, Rios, & Gomez-Rey, 2003). Por otra parte, en la participación en los procesos de oxidación durante la producción y conservación. Así, los aceites de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos están especialmente protegidos de la oxidación (Bravo & Saura-Calixto, 1998).

Tabla 2.1. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica.

Esqueleto	Clase	Estructura básica
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	
C ₆ -C ₂	Acetofenona	
C ₆ -C ₂	Ácido fenilacético	
C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico	
C ₆ -C ₃	Coumarinas	
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	

Fuente: Crozier *et al.* (2009)

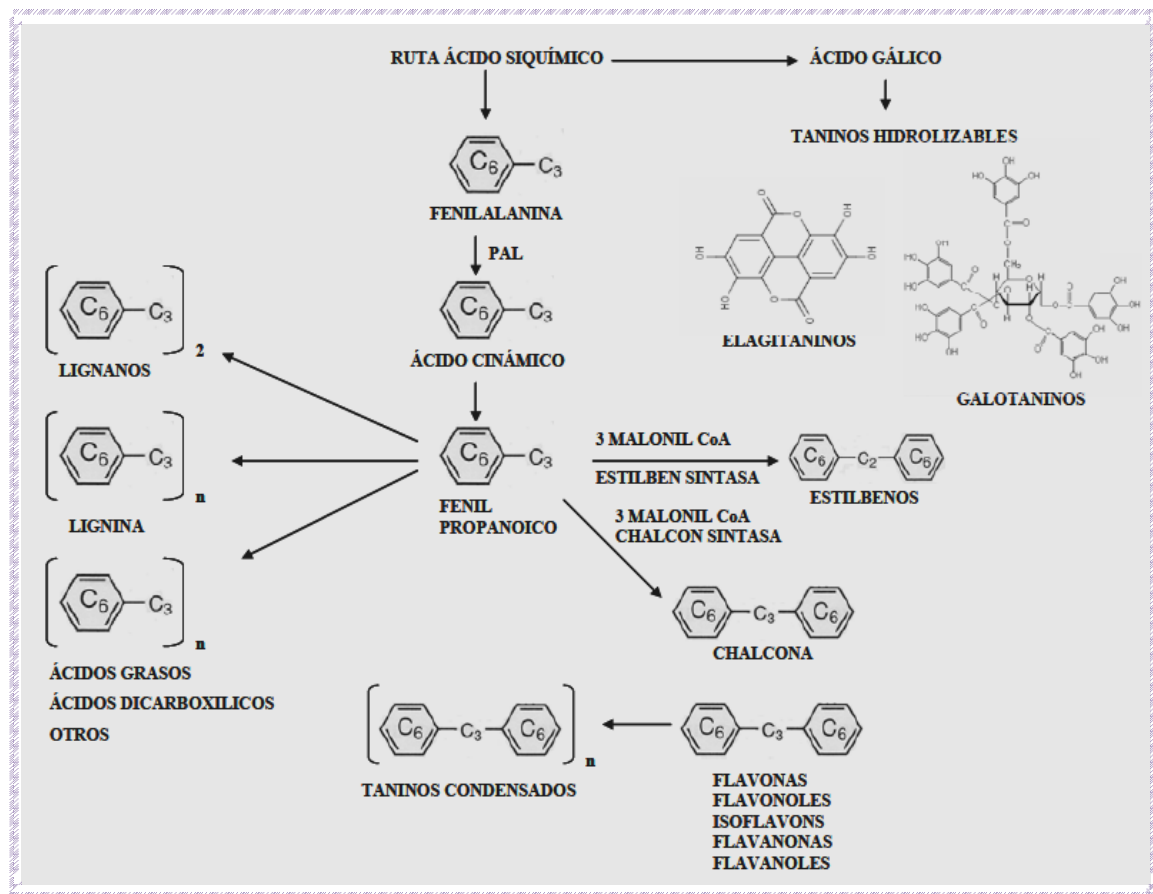


Figura 2.3. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de cumaril-CoA y malonil-CoA (Shahidi y Nacz, 2004).

Sin embargo, la principal razón que ha hecho que el estudio de los compuestos fenólicos haya sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos 15 años es su contribución a la mejora de la salud (Crozier et al., 2009). En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos con la dieta habitual pueden tener implicaciones sobre la salud humana, concretamente en la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales del ámbito de la nutrición, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la CIIC o la AAR, recomiendan un consumo diario de antioxidantes, principalmente a través de frutas y verduras, con el fin de prevenir o atenuar patologías asociadas al estrés oxidativo

celular (Manach & Donovan, 2004). Dentro de este grupo de antioxidantes se encontrarían carotenoides, licopenos, vitamina C, zinc, selenio, etc. además de los compuestos fenólicos.

Dado a la importancia en la salud de los compuestos fenólicos presentes en los vegetales, se han intensificado los estudios de cuantificar los niveles de estos compuestos antioxidantes en cáscaras como subproductos de las frutas tropicales cultivadas de cada país, como el caso de Colombia, en donde las cáscaras de ciertas frutas nativas muestran altos niveles de compuestos fenólicos (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Compuestos fenólicos totales de cáscaras en frutas de Colombia.

Cáscara de frutas	Compuestos fenólicos totales equivalente a mg de ácido gálico/100 g de peso fresco.
Algarrobo	1712±42.5
Palma aceitera	282±15.8
Curuba	246±8.22
Curuba india	288±8.41
Borojo	61.5±2.16
Cassabanana	96.9±0.83
Zapote costeño	1488±20.1
Cupuazú	252±28.7
Tumbo gigante o quijón	120±1.69
Nuez de macadamia	93.7±2.68
Lulo, naranjilla, obando, coconilla	83.6±0.64
Cocona	87.4±5.16
Chontaduro, tembe, pejibaye	108±2.06
Umari, guacure, yure o teechi	107±19.2

Fuente: Calderón-Contreras *et al.* (2012).

Entonces, las frutas constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. En ellas es frecuente encontrar derivados de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoles, catequinas, y taninos condensados e hidrolizables (Vasco, Riihinen, Ruales, & Kamal-Eldin, 2009). La mayoría de estos compuestos permanecen en productos elaborados a base de frutas y bayas (Heinonen, Meyer, & Frankel, 1998), como por ejemplo zumos, mermeladas, jaleas, gelatinas, etc. (Zafrilla, Ferreres, & Tomás-Barberán, 2001). A continuación se describen los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos vegetales.

Ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos (Figura 2.4) son compuestos fenólicos abundantes en los alimentos. Los más frecuentes son el ácido cafeico, y en menor medida el ácido ferúlico, que se encuentra asociado a la fibra dietética mediante la formación de enlaces éster con la hemicelulosa. El ácido cafeico también se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico (ácido 5-cafeilquínico), que está presente en el café, y en muchas frutas y verduras (Vasco et al., 2009). Se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos.

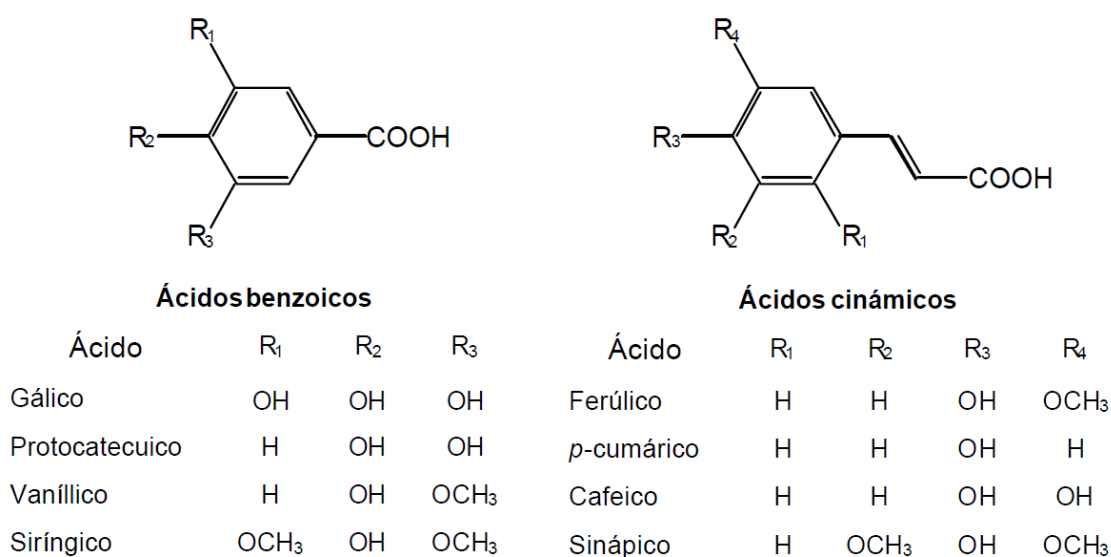


Figura 2.4. Estructura química de los principales ácidos fenólicos

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C₆-C₁. Los principales son los ácidos gálico, salicílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéuico, vanílicico y siríngico, estos cuatro últimos se consideran universales ya que forman parte de las ligninas. Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden ser detectados en forma libre en algunas frutas o tras su liberación como consecuencia del procesado (Manach & Donovan, 2004). El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácido elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrameros (ácido galágico), los dos últimos menos frecuentes. Los ácidos gálico y elágico son componentes esenciales de los taninos hidrolizables, como por ejemplo los elagitaninos de fresas,

frambuesas y zarzamoras. Generalmente los contenidos en estos ácidos son bajos a excepción de las frutas rojas (Manach & Donovan, 2004).

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, incluyendo muchos alimentos y bebidas. Entre ellas, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa. Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico. Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico. Así, el ácido cafeico, libre o esterificado, constituye el ácido fenólico más abundante en muchas frutas (Manach & Donovan, 2004).

Algunos contenidos en ácidos fenólicos de varias frutas rojas se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Contenido en mg/kg de ácidos fenólicos totales en frutas rojas.

Fruta	Ácidos benzoicos	Ácidos cinámicos
Zarzamora	80-270	15
Frambuesa	60-100	3
Cereza	2.5	180-1150
Grosella	40-130	----
Fresa	20-90	19-27
Arándano	----	2000-2200

Fuente: (Manach & Donovan, 2004).

Taninos hidrolizables. Los taninos hidrolizables resultan de la esterificación de los ácidos gálico y elágico (Figura 2.5). Se distinguen 2 grupos principales; los galotaninos, que son frecuentes en frutas como el mango, y los elagitaninos, característicos de frutas rojas como las fresas, frambuesas y zarzamoras (Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin, & Törrönen, 2004).

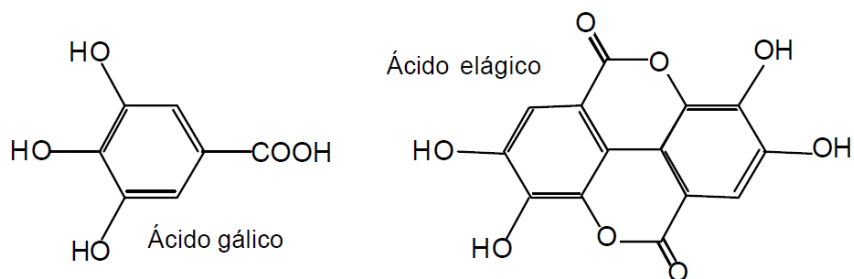


Figura 2.5. Estructura química de los ácidos gálico y elágico

Así, el zumo de frambuesa puede contener en torno a 41 mg/kg de ácido elágico (Määttä-Riihinen et al., 2004). En las zarzamoras, ácido elágico llega a constituir hasta el 88 % de los compuestos fenólicos totales, con niveles comprendidos entre 207 y 244 mg/kg de peso fresco (de Ancos, González, & Cano, 2000). El procesado incrementa el contenido en ácido elágico libre llegando en torno al doble del contenido presente en la fruta fresca. En el caso de la frambuesa el contenido inicial fue de 8 mg/kg y tras el procesado llegó a 12 mg/kg (Amakura, Umino, Tsuji, & Tonogai, 2000).

Estilbenos. Los estilbenos tienen un esqueleto básico de 14 carbonos (C₆-C₂-C₆) y su distribución en alimentos vegetales no es muy amplia (Scalbert & Williamson, 2000). Los estilbenos con mayor interés nutricional son el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) y el piceido (resveratrol-3-O-β-D-glucósido), presentes en uvas y vinos (Figura 2.6). El resveratrol se encuentra en uvas, zumos de uva y vinos, por lo que estos alimentos van a ser las principales fuentes de estilbenos en la dieta (Ortíz, Vargas, Madinaveitia, & Velázquez, 2011). El resveratrol muestra actividades antitumorales e inhibe reacciones que incrementan el riesgo de enfermedades coronarias (Manach & Donovan, 2004). Al actuar como antioxidante es capaz de inhibir la oxidación de las LDL (Frankel, Waterhouse, & Teissedre, 1995). Un vino tinto puede contener 200 mg/L de resveratrol (Frankel et al., 1995). Las uvas rojas de la variedad Napoleón, contienen 2.4 mg de estilbenos (resveratrol y piceido) por kg de peso fresco (Cantos, García-Viguera, de Pascual-Teresa, & Tomás-Barberán, 2000).

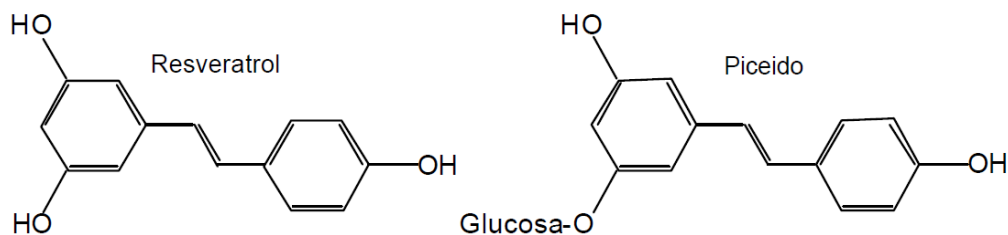


Figura 2.6. Estructura química de los estilbenos

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 2.7) (Manach & Donovan, 2004). En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos (Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999).

Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5' (Tsao, 2010). La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides; los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas) (Manach & Donovan, 2004).

La mayoría de los tejidos de la planta pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glicósidos solubles en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana. Las agliconas de los flavonoles y flavonas no se encuentran en el vegetal fresco pero pueden presentarse como consecuencia del procesado. Los azúcares predominantemente se unen al núcleo del flavonoide mediante enlace β -glicosídico, preferentemente en posición 3, aunque las uniones se pueden producir en otras posiciones. Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides; monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso

tetrasacáridos (Hollman & Arts, 2000). Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico (Manach & Donovan, 2004).

Los principales flavonoles son: quercetina, canferol, miricetina e isoramnetina (Hollman & Arts, 2000) y algunos de sus glicósidos son la rutina (quercetina-3-O-ramnosilglucósido) y la hiperina (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosido) (Robards et al., 1999). Bebidas, frutas y verduras son las principales fuentes de estos flavonoides (Scalbert & Williamson, 2000).

Las antocianidinas tienen la estructura básica del catión flavilio. Seis antocianidinas son importantes en los alimentos; cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina, contribuyendo a la coloración de numerosas frutas. En los vegetales frescos, generalmente se encuentran unidas a azúcares dando lugar a los antocianos o antocianinas, que son responsables de los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas y grosellas (Clifford, 2000; Scalbert & Williamson, 2000). Los azúcares más comunes son: glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, normalmente unidos a la posición 3 o a las posiciones 3 y 5, generando diglicósidos (Clifford, 2000).

Las antocianinas constituyen una subclase de flavonoides, y son responsables de las coloraciones rojiza y azulada encontradas en plantas (Ortíz et al., 2011). La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, principalmente bayas y uvas rojas, cereales, principalmente maíz morado, vegetales y vino rojo entre las bebidas (Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2004; Harbone & Baxter, 1993).

Los antocianos más comunes en las frutas son los 3-monoglucósidos de cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina y petunidina, la cianidina-3-galactósido y la cianidina-3-arabinósido (Robards et al., 1999). También se encuentran disacáridos de glucosa (soforósidos), de ramnosa y glucosa (rutinósidos), de xilosa y glucosa (sambubiosidos) y trisacáridos (Clifford, 2000). Además de las glicosilaciones, se pueden encontrar antocianos acilados (Robards et al., 1999) con ácidos cinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico) y ácidos alifáticos (acético, málico, malónico, oxálico o succínico) (Clifford, 2000).

Las antocianinas son consideradas como sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y solubilidad en el agua que permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos también como posibles beneficios en la salud humana (Mazza y Miniati, 1993). Recientemente, los investigadores se han enfocado sobre los beneficios en la salud de estos pigmentos, especialmente su actividad antioxidante (Camire *et al.*, 2002), actividad antimutagénica (Gasiorowski *et al.*, 1997; Peterson y Dwyer, 1998) y actividad quimopreventiva (Koide *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2004), contribuyendo a reducir la incidencia de enfermedades crónicas.

La fruta tropical más representativa como fuente de antocianos es la granada. Esta fruta tropical contiene niveles importantes de antocianinas totales como se muestra en la tabla 2.4. En la tabla 2.4 se observa que el mayor contenido de antocianinas totales, expresado como mg de cianidina-3-glucósido por gramo de peso seco, fue encontrado en flores y cáscara, lo cual se sugiere estas dos partes del fruto de granada como fuente de antocianinas totales.

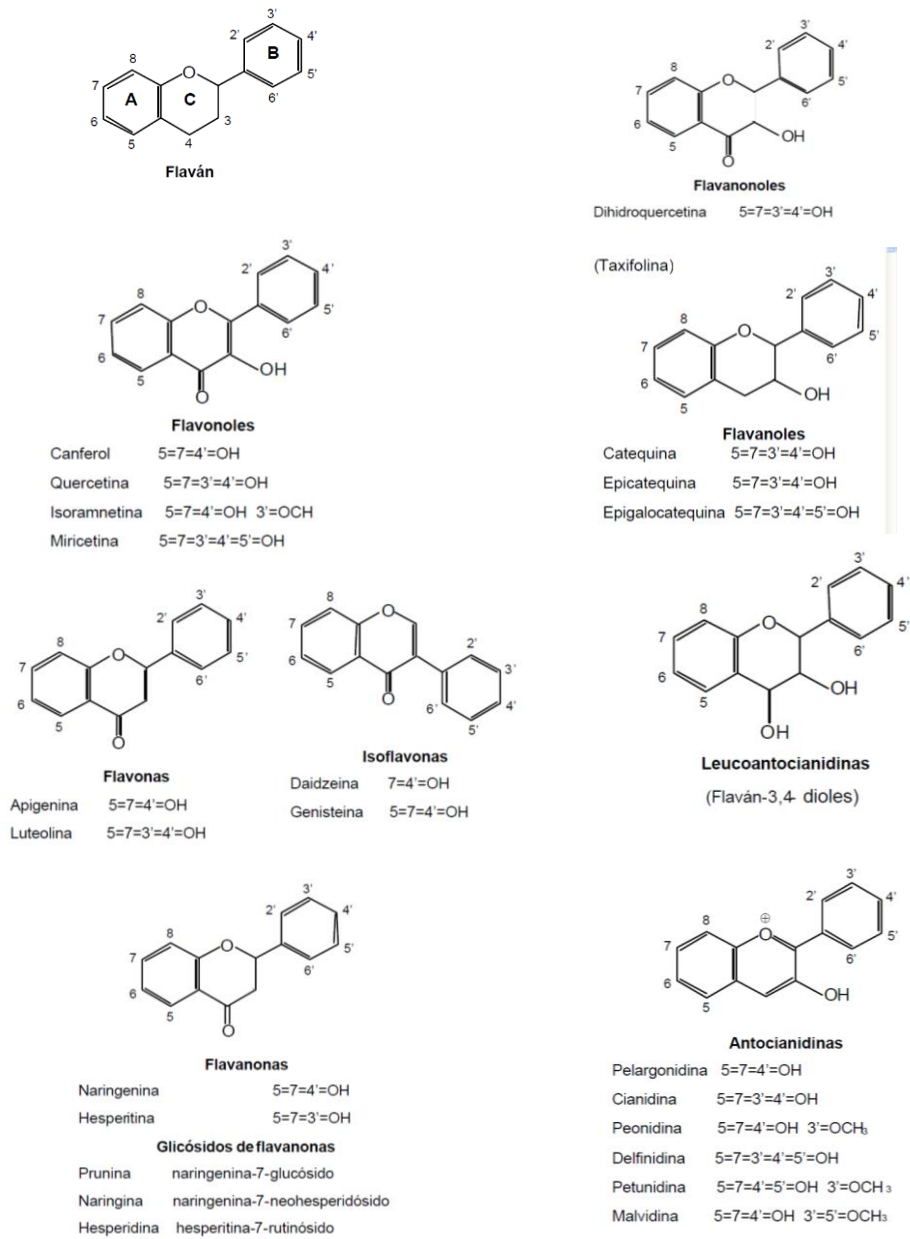


Figura 2.7. Estructura química de los flavonoides

Tabla 2.4. Contenido de antocianinas totales de semilla, hojas, flores y cáscara de granada.

Parte del fruto	Antocianinas totales (expresados en mg de cianidina-3-glucosido equivalentes por g de peso seco)
Semillas	40.84±7.77
Hojas	89.81±7.50
Flores	168.91±3.13
Cáscara	102.20±16.42

Fuente: Elfalleh et al. (2012)

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers) y de quelación de metales (Urquiaga & LEIGHTON, 2000). Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (Sang et al., 2002). Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos son (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996):

- Presencia de un grupo catecol (dihidroxilo en las posiciones 3' y 4') del anillo B, que confiere estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones. Esta estructura les confiere la propiedad de quelar metales.
- Presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 7 del anillo A.

- Doble enlace en posición 2,3 conjugado con el grupo 4-oxo y 3-hidroxi del anillo C, responsable de la deslocalización de electrones desde el anillo B.

De acuerdo con estos criterios, la quercetina sería el flavonoide con mayores propiedades antioxidantes (Figura 2.8). De hecho, su capacidad antioxidante ha sido ya puesta de manifiesto (Zhang *et al.*, 2011).

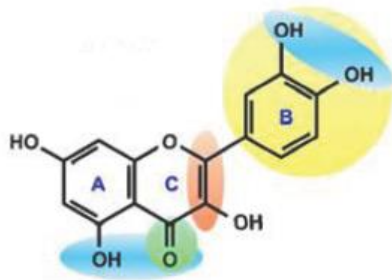


Figura 2.8. Principales grupos implicados en el potencial antioxidante. Amarillo: grupo catecol, azul: grupo hidroxilo con capacidad quelante de metales, rojo: enlace insaturado en anillo C, verde: función 4-oxo en anillo C.

Además de sus propiedades antioxidantes, los polifenoles poseen otras actividades biológicas específicas derivadas o no de su acción antioxidante. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas con enfermedades coronarias, y protegen el ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad (Barry Halliwell & Gutteridge, 1999); además inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos antiinflamatorios (Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000); se ha descrito que poseen actividad anticarcinogénica, actuando como inhibidores de procesos cancerígenos (F. Yang *et al.*, 2001); (Hou, Fujii, Terahara, & Yoshimoto, 2004), actividad antiVIH y actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos (Urquiaga & LEIGHTON, 2000).

Debido a todas estas actividades biológicas y a que son micronutrientes muy abundantes en nuestra dieta, cada vez cobra más importancia la implicación de los compuestos polifenólicos en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer o enfermedades cardiovasculares (Ugartondo, Mitjans, Lozano, Torres, & Vinardell, 2006). Además, por sus características físico-químicas destacan como candidatos para aplicaciones dermofarmacéuticas y alimentarias.

Para que los compuestos fenólicos puedan ejercer su bioactividad, deben ser liberados y absorbidos en el tracto intestinal, transportados a la circulación sanguínea y finalmente a los tejidos. Durante el transporte de los nutrientes de los tejidos a la excreción final, los compuestos fenólicos sufren diversas modificaciones durante su absorción, deposición, metabolismo y excreción, y consecuentemente su bioactividad puede ser modificado (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Los compuestos fenólicos deben ser liberados de la matriz del alimento mediante medios mecánicos, químicos y enzimáticos para facilitar la absorción a lo largo del tracto intestinal, particularmente en la sección superior del intestino delgado (Figura 2.9). La glicosilación de los compuestos fenólicos dirige la ruta de su absorción con gliconas (transportados por la vía del transporte activo) y agliconas (transportados por difusión pasiva). Después de la absorción, la mayoría de los compuestos fenólicos son transformados por el sistema de desintoxicación en los enterocitos y el hígado para la excreción en la bilis, heces y orina (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Wang, Dong, and Xiu (2008) reportaron la distribución del resveratrol en diferentes tejidos de ratas después de una hora de la administración oral de 20 mg/kg de extracto de *Polygonum cuspidatum* (Figura 2.10). Este trabajo confirma que los compuestos fenólicos son pobremente biodisponibles con una baja absorción en el intestino delgado.

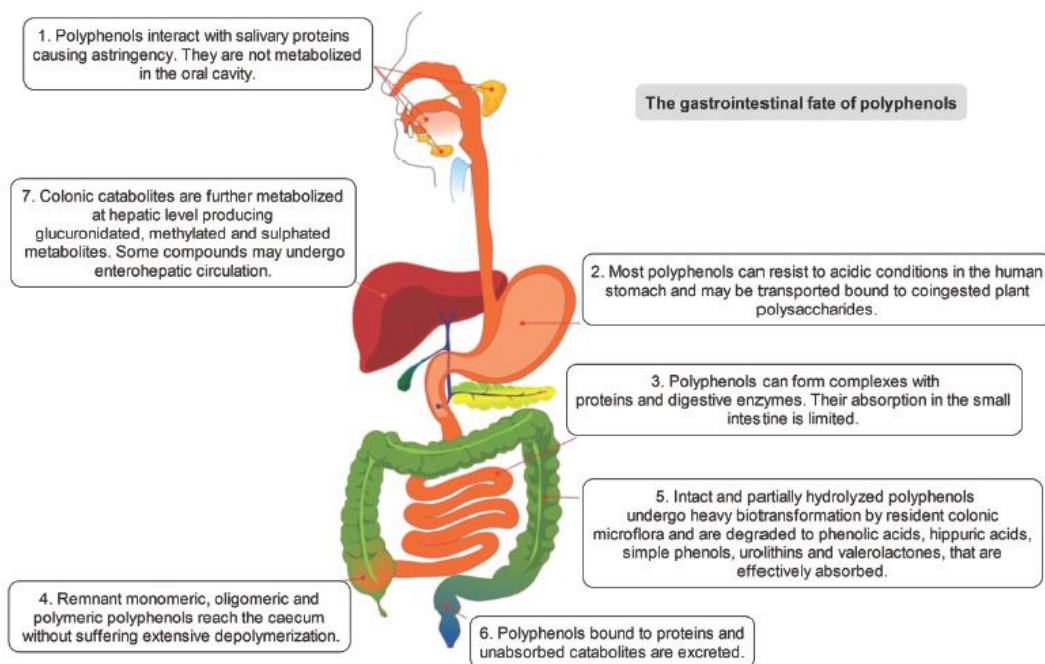


Figura 2.9. Destino de los compuestos fenólicos después de su ingestión.

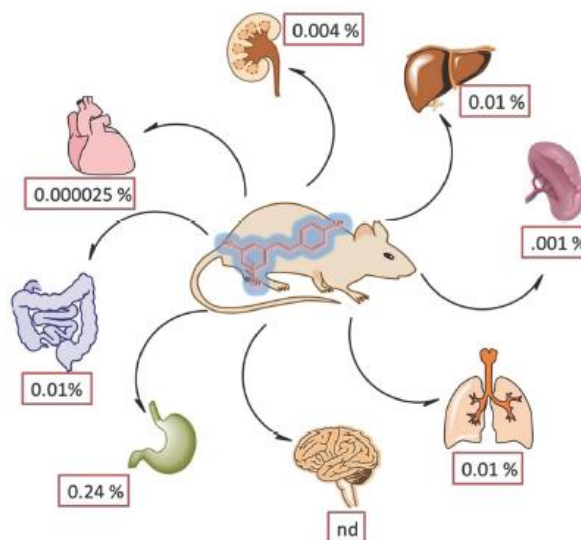


Figura 2.10. Distribución del resveratrol en órganos de ratas después de una hora de ingestión de 20 mg/kg de extracto de *Polygonum cuspidatum*. nd: no detectado.

➤ Fibra dietética

La definición de *fibra alimentaria o dietética* es frecuentemente controvertida ya que entre los especialistas en este tema no termina de existir unanimidad de criterios. La razón estriba en que no se trata de un solo componente de los alimentos, sino de un conglomerado de varios, y no está delimitada la inclusión o exclusión de algunos. Incluso desde una perspectiva más amplia, existen materiales fibrosos de plantas, tales como algodón, madera, etc. que son completamente indigeribles por el hombre y no son fibra alimentaria humana, aunque son materiales fibrosos, en apariencia (Heredia, Jimenez, Fernández-Bolaños, Guillén, & Rodríguez, 2002).

Se cree que Hipsley, en 1953, fue el primer investigador que aplicó el término fibra alimentaria para describir los constituyentes no digeribles que forman la pared celular vegetal. Entre 1972 y 1976 Trowell, Burkitt, Walker y Painter (Burkitt, Walker, & Painter, 1972; H_ Trowell, 1976) adoptaron el término acuñado por Hipsley y fueron desarrollando una serie de hipótesis acerca de las propiedades saludables de la fibra alimentaria, a la que definieron como los restos de plantas comestibles resistentes a la digestión por enzimas humanas, en la cual incluirían como componentes a la celulosa, hemicelulosas, lignina y sustancias minoritarias asociadas, tales como las ceras, cutina, y suberina. Las hipótesis de fibra alimentaria postulaban la relación inversa existente entre su consumo regular y la incidencia de cáncer de colon y enfermedad cardiovascular. En 1976, la definición se revisó para incluir además de los componentes mencionados las gomas, celulosas modificadas, mucílagos y pectinas y oligosacáridos (DeVries, Prosky, Li, & Cho, 1999; Gray, 2006).

El concepto más generalizado de fibra alimentaria es el que se refiere al conjunto de polisacáridos y lignina de la dieta que no son digeridos por las secreciones endógenas del tracto digestivo humano (Hugh Trowell et al., 1976). Esta definición significa que la pared celular de frutas, verduras, legumbres y cereales constituye casi toda la fibra de la dieta (McDougall, Morrison, Stewart, & Hillman, 1996; R. Selvendran & Robertson, 1994).

En la actualidad, tanto en las bases de datos como en el etiquetado de los alimentos se manejan cinco conceptos de fibra alimentaria que dependen del método analítico empleado (Charrondiere, Chevassus-Agnes, Marroni, & Burlingame, 2004):

-*Fibra alimentaria total analizada por el método de la AOAC* (basado en la indigestibilidad de los componentes). Este método puede medir casi completamente los polisacáridos no-almidón (PNA), la lignina, almidón resistente y residuos no-específicos. El método de referencia de la AOAC es el método enzimático-gravimétrico de Prosky et al. (1984) y sus modificaciones.

-*Polisacáridos no-almidón (PNA) analizados por el método de Englyst* (Englyst, Quigley, & Hudson, 1994). El valor de PNA no incluye lignina, ceras, cutina y almidón resistente.

-*Fibra alimentaria total por diferencia*: calculada como $100 - (\text{humedad} + \text{proteína} + \text{grasa} + \text{cenizas} + \text{carbohidratos disponibles})$. Este cálculo incluye bajo el término de FA total al almidón resistente. Este cálculo es raramente utilizado.

-*Fibra alimentaria total analizada por el método de Southgate* (Southgate, 1969).

Este método es, actualmente, poco utilizado aunque se puede encontrar en la 5ª edición de las tablas de composición de alimentos británicas y en las tablas de composición de alimentos de Grecia (1992). Consiste en colorimetrías que analizan PNA, lignina y algo de almidón.

-*Fibra bruta analizada por el método de Weende*, es la suma de sustancias resistentes a la hidrólisis con ácido seguida de hidrólisis con álcali. Este método incluye parte de lignina, celulosa y hemicelulosas. Se utiliza en algunas bases de datos de composición de alimentos, pero principalmente en el análisis de alimentos para animales.

-*Fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD)*. El método para medir FAD lo desarrolló (Van Soest, 1963) Van Soest (1963a, b) y en 1967, Van Soest y Wine propusieron el método para obtener un residuo insoluble (FND). El inconveniente más importante es que no se determina la fracción soluble de la fibra.

Las definiciones más recientes emanan de la American Association of Cereal Chemists, del US Institute of Medicine, de la Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, del

Codex Alimentarius Commission y del Health Council of The Netherlands. Estas definiciones incluyen el efecto fisiológico de la fibra alimentaria, aunque con diverso énfasis (Gray, 2006):

American Association of Cereal Chemists (AACC, 2001). La fibra alimentaria es la parte o partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado y que fermentan completa o parcialmente en el intestino grueso.

La fibra alimentaria incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias asociadas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos beneficiosos incluyendo laxación, y/o atenuación del colesterol sanguíneo, y/o atenuación de la glucosa en sangre (DeVries et al., 1999). Esta definición la adopta como oficial la Association of Oficial Analytical Chemists Internacional (AOAC) (McCleary, 2003).

The US Institute of Medicine (2002). En sus referencias alimentarias de ingestas de energía, carbohidratos, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, utiliza los siguientes conceptos: “fibra funcional” (carbohidratos no digeribles aislados que tienen efectos fisiológicos beneficiosos en el ser humano), “fibra alimentaria” (carbohidratos no digeribles y lignina que proceden directamente del tejido de los vegetales). Estos conceptos han sido adoptados por la Food and Nutrition Board of the US Institute of Health (McCleary, 2003).

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2002).

Según este organismo la fibra alimentaria consiste en:

- Polímeros de carbohidratos (grado de polimerización ≥ 3) de origen vegetal y lignina u otros componentes no-carbohidratos, como polifenoles, ceras, saponinas, cutina, fitatos, fitoesteroles.
- Polímeros de carbohidratos (grado de polimerización ≥ 3) que han sido procesados física, enzimática o químicamente, o que han sido sintetizados.

La fibra alimentaria, por otra parte, no puede ser digerida ni absorbida en el intestino delgado, y al menos debe tener una de las siguientes propiedades: estimular la fermentación colónica, reducir los niveles de colesterol preprandrial o reducir los niveles de glucosa en sangre y/o niveles de insulina postprandrial.

Codex Alimentarius Commission (CAC, 2006). En su opinión el concepto de fibra alimentaria coincide con lo señalado por el organismo anterior. Añade además que cuando los polisacáridos están en el tejido vegetal, la fibra alimentaria puede incluir fracciones de lignina y/u otros componentes que están asociados a dichos polisacáridos en la pared celular y que de hecho se pueden cuantificar por el método gravimétrico de la AOAC. Las fracciones de lignina y/u otros componentes, es decir, fracciones proteicas, compuestos fenólicos, ceras, saponinas, fitatos, cutina, fitoesteroles están íntimamente asociados a los polisacáridos. En este caso estas sustancias están incluidas en la definición de fibra alimentaria porque pueden proporcionar un efecto beneficioso adicional.

Sin embargo, cuando estos compuestos se añaden a un alimento que contiene polisacáridos no digeribles, no pueden ser considerados como fibra porque no se encuentran estrechamente asociados, tal y como se indicaba anteriormente.

Health Council of The Netherlands (2006). La fibra alimentaria es un conjunto de sustancias que no se digieren ni se absorben en el intestino delgado humano, que tienen estructura química de carbohidratos, compuestos análogos a estos y lignina y sustancias relacionadas.

La terminología que diferencia fibra *soluble* e *insoluble* permite una útil y sencilla categorización de la fibra alimentaria con diferentes propiedades fisiológicas.

Tradicionalmente se emplea el término fibras solubles porque muchas de ellas forman geles viscosos en el intestino delgado (pectinas y β -glucanos) y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa. Por otro lado, las fibras con una gran influencia en el funcionamiento del intestino grueso, son las fibras insolubles (celulosa y lignina). Por otra parte, la clasificación en soluble e insoluble también tiene un significado analítico.

El origen fundamental de la fibra alimentaria es la pared celular de los vegetales, que consiste en una serie de polisacáridos, a menudo asociados y/o sustituidos con proteínas y compuestos fenólicos en algunas células, junto con el polímero fenólico lignina (Figura 2.11). Este origen tiene una importancia evidente, ya que sus componentes serán los constituyentes de la fibra alimentaria, y además las estructuras y enlaces que presenta determinarán los efectos fisiológicos (Knudsen, 2001; R. R. Selvendran & Verne, 1990).

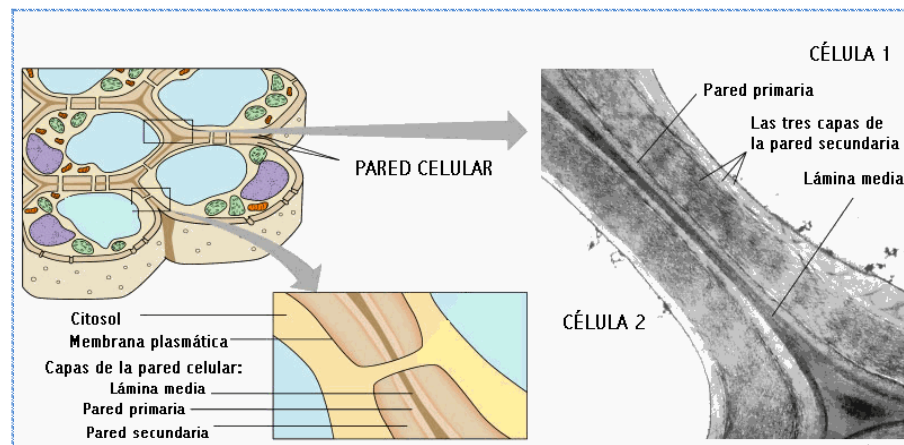


Figura 2.11. Estructura y partes de la pared celular, origen fundamental de la fibra alimentaria.

La fibra alimentaria tiene efectos beneficiosos sobre la salud humana, así que es recomendable, y se ha de promover por los profesionales de la alimentación y de la nutrición, el consumo de alimentos ricos en fibra tales como los cereales, legumbres, frutas y verduras. Las poblaciones que consumen más fibra alimentaria sufren menos enfermedades crónicas, ya que esta tiene efectos beneficiosos sobre los factores de riesgo que desarrollan algunas de las mismas. Se recomienda el consumo de 14 g de fibra dietética por cada 1000 kcal, o 25 g al día para mujeres adultas y 38 g para hombres adultos, datos basados en estudios epidemiológicos que mostraron protección frente a enfermedades cardiovasculares (American Dietetic Association, 2008).

Un factor de interés en relación con el valor nutritivo de la fibra es que, si bien la mayor parte de los componentes son por si mismos indigeribles, por fermentación bacteriana se convierten parcialmente en ácidos grasos volátiles que pueden ser absorbidos por el intestino (Heredia Moreno & Fernandez Diez, 1979).

La fibra alimentaria afecta a muchos procesos del sistema gastrointestinal, desde la ingestión hasta la excreción, pero es en el intestino delgado donde más se manifiesta.

En general, los polisacáridos más viscosos, como las pectinas y gomas, reducen la absorción de nutrientes, mientras que los componentes más insolubles tienen poco efecto en la misma. La masa bacteriana que se produce a partir de las fibras fermentables (sustancias pécticas), unida a los residuos de las poco fermentables (celulosa y hemicelulosas) y al agua retenida por las mismas, son las que originan el aumento de la masa fecal (Lefebvre, Thébaudin, Tirilly, & Bourgeois, 2002).

En consecuencia, la fibra puede modificar muy directamente y disminuir la digestibilidad de las proteínas, junto con lípidos y ciertos minerales (Kritchevsky, 1988).

Generalmente se acepta que una dieta rica en fibra alimentaria, particularmente en fibra soluble, es útil en el control de la concentración de glucosa en plasma en individuos diabéticos (Gray, 2006).

Los ácidos grasos de cadena corta, acetato y propionato, producidos en la fermentación de la fibra alimentaria regulan el metabolismo de la glucosa, ya que disminuyen la glucosa postprandial y la respuesta insulínica (Peris, Lesmes, De la Cuerda Compes, & Álv, 2002).

La producción de ácidos grasos de cadena corta por la fermentación de la fibra soluble en el colon contribuye a reducir la síntesis de colesterol hepático (Anderson & Hanna, 1999) ya que están implicados en el metabolismo intermediario hepático y puede regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos. El ácido propiónico, uno de estos ácidos de cadena corta, disminuye la síntesis del colesterol hepático por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima-A (Peris et al., 2002).

La fibra alimentaria disminuye el tiempo de tránsito intestinal, previene el endurecimiento de las heces y retiene agua (Gray, 2006).

Los efectos fisiológicos de la fibra alimentaria en el colon dependen de los componentes que la constituyen. La fibra insoluble presenta efectos mecánicos que implican el acortamiento del tiempo de tránsito intestinal, mientras que la fibra soluble tiene efectos sistémicos (Bennett & Cerda, 1996).

La fibra alimentaria puede presentar un papel en el cáncer de colon, y también se le atribuye en la reducción del riesgo de otras enfermedades crónicas del aparato digestivo (Gray, 2006; Scheppach et al., 2004).

En la literatura se ha reportado diversos estudios respecto al contenido de fibra dietética total, fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble en frutas tropicales (tabla 2.5). En la tabla 5 se observa que el mango tiene el mayor contenido de fibra dietética (total, soluble e insoluble) a lo reportado por otros autores (Gorinstein et al., 2011; Maria do Socorro et al., 2011; Ramulu & Rao, 2003; Redondo-Cuenca, Villanueva-Suárez, & Mateos-Aparicio, 2008). Esto indica que el mango como fruta tropical es una buena fuente de fibra dietética para el ser humano.

Tabla 2.5. Contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas frutas tropicales.

Frutas	Fibra dietética total (g/100 g)	Fibra soluble (g/100 g)	Fibra insoluble (g/100 g)	Autor
Durián, Salak, mangostán, mango, kiwi, aguacate.	2.9-6.2	1.2-2.1	1.7-4.1	Gorinstein <i>et al.</i> , 2011.
Mango	87.57	9.05	78.52	Al-Sheraji <i>et al.</i> , 2011
Semillas de soja y pulpa de soja.	24.36-55.48	3.5-4.71	20.86-50.77	Redondo-Cuenca <i>et al.</i> , 2008.

Acaí	71.22	2.75	68.49	Rufino <i>et al.</i> , 2011.
Sandía, melón, naranja, uva, cereza, pera, plátano, mango, fresa, papaya, piña, ciruela y manzana.	0.6-2.8	0.3-2.3	0.3-1.3	Punna <i>et al.</i> , 2003

➤ Carotenoides

Los carotenoides son compuestos lipófilos, responsables de las tonalidades rojas, anaranjadas y amarillas de muchas frutas y verduras (Rao & Rao, 2007). Son pigmentos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en plantas y otros organismos fotosintéticos y no fotosintéticos como algas, levaduras, bacterias y animales. Los humanos y animales no pueden sintetizarlos; sin embargo, son capaces de absorberlos con modificaciones en su estructura básica (Arango, 2006) .

La principal función de los pigmentos carotenoides, tanto en vegetales como en bacterias, es captar energía luminosa, energía que es luego transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis (Morillo Coronado, 2009).

Debido a la presencia en su molécula de un cromóforo consistente total o principalmente en una cadena de dobles enlaces conjugados (Figura 2.12) proporcionan a frutas y verduras colores amarillos, anaranjados y rojizos. Los carotenoides siempre acompañan a la clorofila en una relación de tres a cuatro partes de clorofila por una parte de carotenoide. Estos pigmentos se encuentran en los cloroplastos de tejidos verdes, donde están enmascarados por la clorofila hasta que el tejido envejece (A. Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2007).

Entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, no hay duda de que los carotenoides son, después de las clorofilas, los más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos compuestos liposolubles se localizan en las células vegetales, en el interior de orgánulos especializados, cloroplastos y cromoplastos (Kopsell & Kopsell, 2006). El contenido en carotenoides de las frutas aumenta durante la maduración, si bien parte de la intensificación del color se debe a la pérdida de clorofila (A. J. Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2004). En el caso de los frutos maduros, se acumulan en los plastoglobulos de los cromoplastos en forma masiva y es donde la diversidad estructural alcanza un mayor grado (Sanchez, 2008). Actualmente se han identificado más de 600 carotenoides en la naturaleza (Krinsky & Johnson, 2005).

Hasta hace pocos años, gran parte de la importancia nutricional de estos pigmentos ha radicado en el hecho de que algunos de ellos poseían actividad provitamínica A, recientemente se ha puesto de manifiesto que la relevancia de estos compuestos va más allá, al haberse demostrado que juegan un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas en humanos (Morillo Coronado, 2009).

La estructura de un carotenoide determina que funciones biológicas pueda tener. Su patrón distintivo de enlaces dobles y simples en su estructura es lo que les permite absorber excesos de energía de otras moléculas, mientras que la naturaleza de sus grupos terminales tiene una influencia en su polaridad (Swaminathan & Madavalappil, 2013).

Químicamente la mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides (Terpenos superiores), compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides (C_5) unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula. Es decir, la unión de dichas unidades es “cabeza-cola”, excepto en el centro de la molécula, donde es “cabeza-cabeza”. Debido a ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena poliénica están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto están separados por cinco (Figura 2.12) (A. Meléndez-Martínez et al., 2007).



Figura 2.12. Estructura de los carotenoides

La mayoría de los carotenoides se derivan de una cadena de polieno de 40 carbonos, lo que podría ser considerado como el esqueleto de la molécula. Dichos pigmentos tienen una larga cadena central de dobles enlaces conjugados, formados por hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, oxidación o alguna combinación de estos procesos. Esta cadena puede ser terminada por grupos extremos cíclicos (anillos) y puede ser complementado con grupos funcionales que contienen oxígeno (hidroxi, metoxi, carboxi, oxo, aldehído y epóxido) (Hurst, 2002).

En la naturaleza, los carotenoides son predominantemente presente en la configuración all-trans (Lessin, Catigani, & Schwartz, 1997). Las estructuras de algunos carotenoides comúnmente encontrados en alimentos se muestran en la figura 2.13.

Los carotenoides se clasifican de acuerdo a su estructura de la siguiente manera:

- a) Carotenos, son carotenoides hidrocarbonados. Pueden ser ácidos o poseer un anillo de 5 a 6 carbonos unido a uno o ambos extremos de la molécula. ejemplo β -caroteno (Fennema, 2000).
- b) Xantofilas, son carotenoides oxigenados derivados de los hidrocarbonados, frecuentemente contiene grupos funcionales oxigenados, ejemplos de estos compuestos son, zeaxantina y luteína (hidroxi), espiriloxantina (metoxi), equinenona (oxo), y anteraxantina (epoxi) (Fennema, 2000).
- c) Apocarotenoides, carotenoides que tienen cadenas de carbonos más cortos, ejemplo Bixina (30 carbonos) (Hurst, 2002).

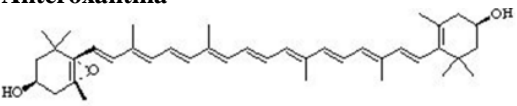
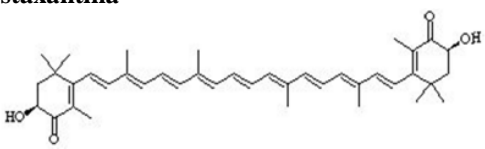
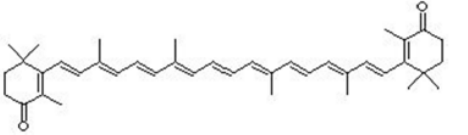
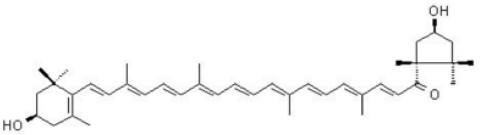
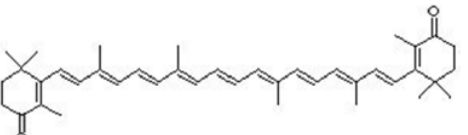
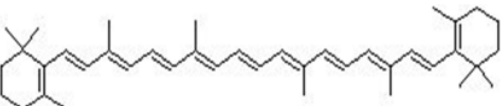
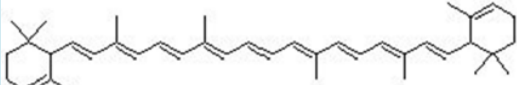
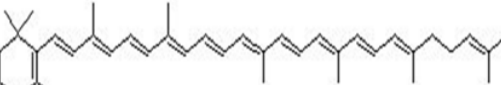
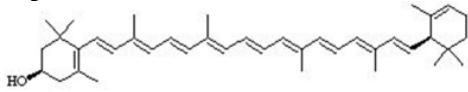
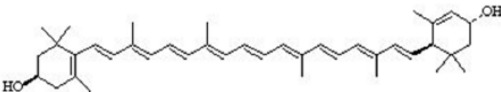
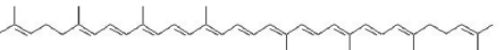
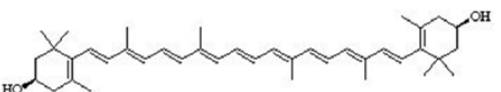
<p>Anterioxantina</p>  <p>Presente en muchas plantas, especialmente maíz</p>	<p>Astaxantina</p>  <p>Presente en: salmón, camarón, langosta y flamingo</p>
<p>Cantaxantina</p>  <p>Presente en salmón, shrimp, plumas de flamenco</p>	<p>Capsantina</p>  <p>Presente en chiles y pimientos</p>
<p>α- caroteno</p>  <p>Presente en zanahorias, la mayoría de las plantas verdes</p>	<p>β- caroteno</p>  <p>Presentes en zanahorias y muchas otras plantas</p>
<p>ϵ- caroteno</p>  <p>Presente en muchas plantas verdes</p>	<p>γ- caroteno</p>  <p>Presentes en muchas plantas, a menudo con β-caroteno</p>
<p>α- criptoxantina</p>  <p>Presente en muchas plantas como maíz y papaya</p>	<p>Luteína</p>  <p>Presente en muchas plantas verdes</p>
<p>Licopeno</p>  <p>Presente en muchas plantas, especialmente en tomates</p>	<p>Zeaxantina</p>  <p>Presente en muchas plantas, especialmente en maíz</p>

Figura 2.13. Estructuras de los principales carotenoides presentes en los alimentos

Una de las funciones fisiológicas más importantes de carotenoides en la nutrición humana es la de actuar como precursores de la vitamina A. Compuestos carotenoides pro-vitamina A apoyan el mantenimiento de la salud, diferenciación de células epiteliales, el desempeño reproductivo normal, y las funciones visuales (Combs & Gray, 1998).

Ambos carotenoides provitamina A (β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina) y no provitamina A (luteína, zeaxantina y licopeno) funcionan como captadores de radicales libres, mejoran la respuesta inmune, inhiben el desarrollo del cáncer, y protegen tejidos del ojo (Yeum & Russell, 2002).

Los seres humanos no pueden sintetizar carotenoides y, por lo tanto, tienen que depender de fuentes de la dieta para proporcionar niveles suficientes. Las frutas y vegetales son fuentes primarias de carotenoides en la dieta humana y su consumo se ha asociado con numerosos beneficios para la salud (Mortensen, Skibsted, & Truscott, 2001).

Los carotenoides pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular a través de reducciones en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y el estrés oxidativo en las localizaciones de formaciones de placa. Estudios recientes han establecido una relación entre el aumento del consumo de frutas y verduras que son ricas en carotenoides con menores incidencias de mortalidad relacionadas con las enfermedades cardiovasculares. Los estudios de cohorte que implican un cuestionario de frecuencia alimentaria y los datos de carotenoides en suero (sanguíneo) han establecido los efectos preventivos de los carotenoides de la dieta sobre las enfermedades cardiovasculares en estudios separados de las poblaciones de Italia (Tavani, Gallus, Negri, Parpinel, & La Vecchia, 2006), Japón (Ito et al., 2006), Europa (Buijsse et al., 2005) y Costa Rica (Kabagambe, Baylin, Ascherio, & Campos, 2005). La reducción de enfermedades cardiovasculares se asocia principalmente con el aumento de la ingesta de α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina (Kopsell & Kopsell, 2006).

Los carotenoides pueden inhibir la proliferación celular, transformaciones de células, y modular la expresión de genes determinantes en la prevención de ciertos tipos de cánceres.

Hay una gran cantidad de investigación sobre los efectos anticancerígenos de los carotenoides individuales en tipos específicos de cánceres. Los datos de los estudios de cohorte muestran efectos protectores de la ingesta de β -caroteno contra el riesgo de cánceres relacionados con el tabaco en los no fumadores, sin embargo, β -caroteno puede aumentar los riesgos de cáncer entre los fumadores (Touvier, Kesse, Clavel-Chapelon, & Boutron-Ruault, 2005).

Los efectos protectores de los carotenoides contra los cánceres de pulmón son diferentes entre los sexos, los hombres se benefician más por el aumento de la ingesta de carotenoides (Ito et al., 2005). Una mayor ingesta de carotenoides también puede reducir el riesgo de ciertos linfomas (Kelemen et al., 2006).

En tanto que, los efectos preventivos del licopeno en el cáncer de próstata no son claras, los resultados positivos se han demostrado *in vivo*, pero los últimos resultados de los ensayos de detección muestran que los niveles de licopeno no se asociaron con el riesgo de cáncer de próstata (Kirsh et al., 2006). Por otra parte, la luteína y la zeaxantina son dos de los siete carotenoides principales encontrados en el suero sanguíneo humano, sin embargo, ellos son los únicos carotenoides presentes en la retina y el cristalino (BONE et al., 1997).

Existen pocos estudios acerca de la actividad antioxidante de carotenoides en frutas tropicales; en la tabla 2.6 se observa algunos estudios de actividad antioxidante de carotenoides, según los objetivos del investigador están expresados de diferente manera ya sea por porcentaje de actividad, μmol equivalente a Trolox o mg equivalente a ácido ascórbico.

En la tabla 2.7 se muestran algunos carotenoides de principal importancia en la dieta humana que han sido identificados y cuantificados en muestras de alimentos usualmente consumidos y en algunas frutas tropicales como el Murici o el Açaí que son de consumo no convencional.

Tabla 2.6. Actividad antioxidante de carotenoides en frutas y vegetales.

Alimento	Nombre científico	Actividad antioxidante			Autores
		DPPH	ABTS	FRAP	
Dabai	<i>Canarium odontophyllum</i> Miq	30.5 ± 1% de actividad	44.5±0.3% de actividad	---	Prasad <i>et al.</i> (2011).
Maíz Bc 354	<i>Zea Mays L</i>	---	0.650±0.020 µmol ET/g	---	Kljak y Grbeša (2014).
Maíz Bc 394	<i>Zea Mays L</i>	---	0.587±0.017 µmol ET/g	---	Kljak y Grbeša (2014).
Mamey	<i>Pouteria sapota Jacq.</i>	8.700 ± 2.38 mg AA/100 g	---	3.465±0.407 mg AA/100 g	Yahia <i>et al.</i> (2011a).
Zapote negro	<i>Diospyros digyna Jacq</i>	2.2±0.7 mg AA/100 g	---	---	Yahia <i>et al.</i> (2011b).

*AA= equivalente a ácido ascórbico; ET= equivalente a Trolox.

Tabla 2.7. Principales carotenoides identificados en frutas y verduras.

Fruta	Nombre científico	Carotenoide identificado	Contenido	Autores
Murici (Pulpa)	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Luteína	17.3 ± 1.2 µg/g	Mariutti <i>et al.</i> (2013)
		(all-E)-zeaxantina	3.5 ± 0.2 µg/g	
Açaí (Pulpa)	<i>Euterpe precatoria Mart.</i>	β-caroteno	221.5 ± 25.1 µg/g	Kang <i>et al.</i> (2012).
		Licopeno	186.5 ± 14.2 µg/g	
		Luteína	483.0 ± 37.8 µg/g	
Naranja (Jugo)		Luteína	53.55 ± 4.69 µg/100 g	Cortés <i>et al.</i> (2004).
		β-cryptoxantina	118.31 ± 3.61 µg/100 g	
		β-caroteno	20.63 ± 3.12 µg/100 g	
Naranja-Zanahoria (Jugo)	<i>Daucus carota L.</i>	Luteína	38.56 ± 1.69 µg/100 g	Cortés <i>et al.</i> (2004).
		β-cryptoxantina	36.80 ± 2.18 µg/100 g	
		β-caroteno	2253.27 ± 13.55 µg/100 g	
Pimentón rojo, Pimentón amarillo.	<i>Capsicum annuum L.</i>	Luteína	143.70±3.98, 21.39± 1.17 µg/g	Park <i>et al.</i> (2014).
		β-cryptoxantina	2.02± 0.20, 27.86±1.15 µg/g	
		Capsantina	3.21±0.16, 66.45±1.99 µg/g	
Lechuga, Brocoli, Mango	<i>Lactuca sativa L.</i>	Luteína	123.9±8.8, 1.9±0.3, ND µg/g	Burns <i>et al.</i> (2003).
	<i>Brassica oleracea L.</i>	β-cryptoxantina	ND	
	<i>Magnifera indica L.</i>	β-caroteno	225.7±40.4, 1.2±0.2, 49.8±9.8 µg/g	
		Licopeno	ND	

ND= No detectado

➤ Vitamina C

Es un compuesto blanco, cristalino o levemente amarillo, inodoro que se oscurece de manera gradual cuando se expone a la luz (Gennaro, 2003). Cuando el ácido ascórbico es seco, se caracteriza por su estabilidad al aire pero en solución se deteriora con rapidez en presencia de aire. Asimismo, este compuesto muestra un punto de fusión de alrededor de 190 °C. Es soluble en 1 g por 3 mL de agua o 40 mL de alcohol, insoluble en cloroformo, éter o benceno. En la naturaleza se puede encontrar en su forma reducida y en su forma oxidada (Gennaro, 2003).

Los nombres químicos de la vitamina C son Ácido Ascórbico y escorbato. Estructuralmente es una lactona de seis carbonos la cual se sintetiza a partir de la glucosa en muchos animales. La fórmula empírica del ácido L-ascórbico es $C_6H_8O_6$ con peso molecular 176.12 y su fórmula estructural se muestra en la Figura 2.14.

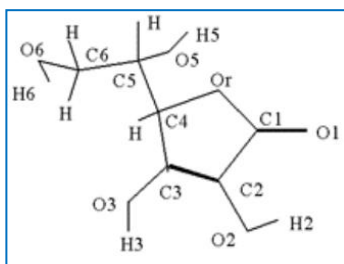


Figura 2.14. Estructura molecular del ácido L-ascórbico (C: átomos de carbono, O: átomos de oxígeno, Or: átomo de oxígeno del anillo, H: átomo de hidrógeno). Fuente: Xammar Oro and Donnamaría (2006).

La vitamina C es sintetizada en el hígado de algunos mamíferos y en el riñón de aves y reptiles. Sin embargo, varias especies, incluyendo los humanos, los primates no humanos, los murciélagos indios, entre otros, no son capaces de sintetizar la vitamina C. Cuando no hay suficiente vitamina C en la dieta, los humanos sufren una enfermedad potencialmente letal

llamada escorbuto (WHO, 2004). El ácido ascórbico tiene un carbono con actividad óptica y la acción contra el escorbuto reside en la acción del isómero L (Goodman & Gilman, 2002).

El ácido ascórbico se oxida rápidamente, especialmente en la presencia de iones metálicos como el cobre, hierro, álcalis y enzimas oxidativas (Van Way, Ireton-Jones, & Pinto, 2005); la exposición a la luz y el calor causa su degradación (Drug Information for the Health Care Professional, 1997).

La vitamina C es un donador de electrones (agente reductor o antioxidante), y probablemente todas sus funciones bioquímicas y moleculares pueden deberse a esta propiedad (WHO, 2004)

La vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno, un importante componente estructural de los vasos sanguíneos, tendones, ligamentos, y huesos. La vitamina C, también desempeña un papel importante en la síntesis de los neurotransmisores, la norepinefrina. Los neurotransmisores son fundamentales para la función cerebral y se sabe que afectan el estado de ánimo. Además, la vitamina C es necesaria para la síntesis de carnitina, una pequeña molécula que es esencial para el transporte de grasa a orgánulos celulares llamados mitocondrias, para la conversión a energía (WHO, 2004).

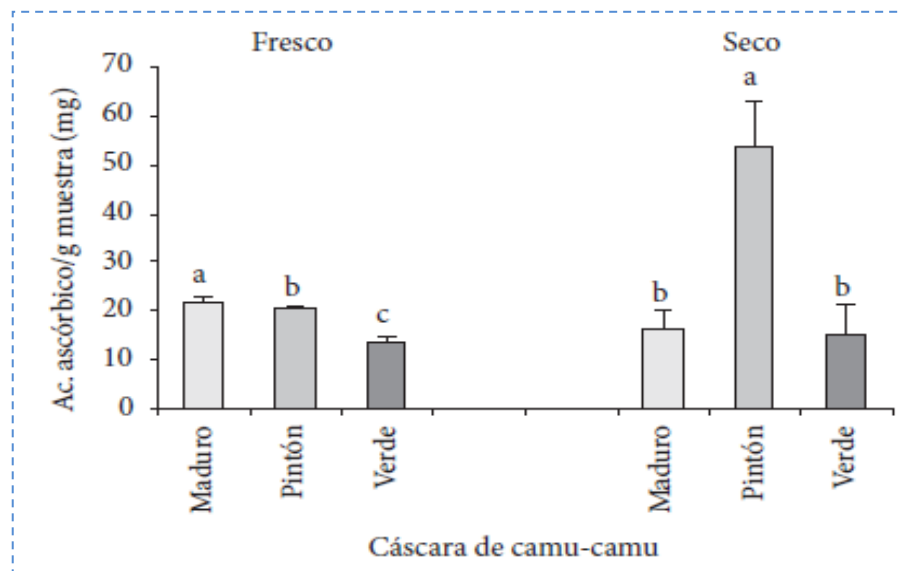
Investigaciones recientes también sugieren que la vitamina C está involucrada en el metabolismo de colesterol a los ácidos biliares, que puede tener consecuencias para los niveles de colesterol en la sangre y la incidencia de cálculos biliares (Tortora & Derrickson, 2007).

El ácido ascórbico funciona como un cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación. De este modo, se requiere para facilitar la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en la procolágena, para la síntesis de colágeno (Braunwald, 2002).

Una enfermedad común en la deficiencia de vitamina C, es la anemia. Las propiedades antioxidantes de esta vitamina pueden estabilizar el folato en la comida y en el plasma (WHO, 2004). Este efecto puede ser alcanzado con la cantidad de vitamina C obtenida de la dieta. Sin embargo, la cantidad de ésta requerida para aumentar la absorción de hierro es de 25 mg como

mínimo y depende de la cantidad de inhibidores de esta vitamina en la comida, como los polifenoles.

Las frutas cítricas y jugos son particularmente ricas fuentes de vitamina C, pero otras frutas incluyendo sandía, melón, guindas, kiwi, mango, papaya, fresas, toronja, tomates contienen cantidades variables de vitamina C. En la figura 2.15 se observa que la cáscara fresca o cáscara seca de camu-camu (en diferentes estados de maduración), un fruto tropical producido en Brasil, muestran niveles considerables de vitamina C, lo que sugiere que las frutas nativas de varias regiones pueden ser una excelente fuente de este compuesto bioactivo y que pueden ser aprovechadas para dar valor agregado.



Fuente: (Villanueva-Tiburcio, Condezo-Hoyos, & Asquiere, 2010).

Figura 2.15. Contenido de ácido ascórbico en la cáscara de camu-camu en estado fresco y seco.

Por otra parte, se sabe que diariamente, un adulto necesita 90 mg de vitamina C para un hombre y 75 mg máximo para una mujer. Estas dosis pueden variar de acuerdo a otros condicionantes o necesidades especiales. Así las mujeres deben aumentar las dosis de consumo de esta vitamina durante el embarazo y la lactancia (INCAP, 2002).

En la tabla 2.8, se reporta la cantidad requerida para saturar la mitad de los tejidos humanos con vitamina C en el 97.5% de la población.

Tabla 2.8. Cantidades requeridas de Vitamina C en mg/día

INFANTES Y NIÑOS	mg / día
0 – 6 meses	25
7 – 12 meses	30
1 – 3 años	30
4 – 6 años	30
7 – 9 años	35
ADOLESCENTES	mg / día
10 – 18 años	40
ADULTOS	mg / día
19 - 65 años	90
65 y más	90
Mujeres Embarazadas	100
Mujeres Lactando	120

Fuente: (WHO, 2004).

Según la FDA (Food and Drug Administration), para que la Vitamina C provea una protección antioxidante, la Dosis Dietética Recomendada (Recommended Dietary Allowance), RDA, es de 90 mg/día para adultos hombres y de 75 mg/día para mujeres adultas, considerando una mínima excreción de ascorbato por medio de la orina. Sin embargo, fumar, implica un aumento diario de aproximadamente 35 mg/día. El nivel superior de consumo de Vitamina C es de 2 g/día, concentración a la cual, los efectos adversos son la diarrea osmótica y disturbios gastrointestinales.

2.3. *Los radicales libres.*

2.3.1. Concepto y generalidades

Los electrones en los átomos y moléculas ocupan las regiones del espacio conocidas como orbitales, en donde cada orbital puede contener un máximo de dos electrones. Por ejemplo, los dos electrones que forman un enlace covalente ocupan el mismo orbital, pero tienen espines opuestos. Si un orbital contiene sólo un electrón, se dice que el electrón está desapareado. Un *radical libre* se define como cualquier especie que contiene uno o más electrones no apareados (Avello & Suwalsky, 2006).

En una definición más clara y amplia, los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye las células del organismo. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (Avello & Suwalsky, 2006).

Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica, el humo de cigarrillos, el consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche, los cuales producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo (Finkel & Holbrook, 2000).

El término **radical libre** y **especies reactivas de oxígeno** (ROS por sus siglas en inglés) son comúnmente usados simultáneamente, sin embargo, el termino ROS es referido a un número de moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno (O₂) (MacFarlane, Wilkerson, Lovett-Barr, & Mitchell, 2008).

2.3.2. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Entre las especies reactivas (Tabla 2.9) cabe destacar los radicales libres, especies dotadas de propiedades paramagnéticas que las convierte en compuestos altamente inestables y de gran reactividad (Gilbert, 2000; Barry Halliwell, 2005) y los no radicales, especies químicas que por sí mismas no son reactivas pero en presencia de metales de transición (hierro y cobre) u otros radicales generan radicales libres altamente reactivos (Nordberg & Arner, 2001). Todos ellos se agrupan con el nombre de especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS).

Tabla 2.9. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

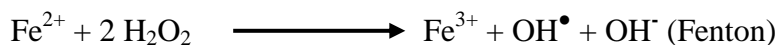
	Radicales		No Radicales	
ROS	O ₂ ^{•-}	Radical superóxido	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
	•OH	Radical hidroxilo	¹ O ₂	Oxígeno singlete
	•OOH	Radical hidroperoxilo	O ₃	Ozono
RNS	NO [•]	Radical óxido nítrico	NO	Óxido nítrico
			ONOO ⁻	Peroxinitrito
			NO ⁻	Anión nitroxilo

La toxicidad de las ROS viene determinada desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son O₂^{•-} < H₂O₂ < OH[•], lo que hace que

sean capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen incluso con capacidad de atravesar membranas celulares.

El **radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**, es un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente del oxígeno molecular. Ha sido implicado en la fisiopatología de una variedad de enfermedades (Aki et al., 2009; Valdivia, Perez-Alvarez, Aroca-Aguilar, Ikuta, & Jordán, 2009). Es una especie menos reactiva que otros radicales aunque puede actuar como oxidante débil o como agente reductor de iones metálicos de transición (MMHCM Valko, Morris, & Cronin, 2005). Así, el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el mayor reductor, la adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. Por lo tanto, su importancia fundamental radica en ser fuente de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno.

El **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**, se considera como el principal intermediario en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno, no es un radical libre, pero en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, o en presencia de otros radicales libres puede dar lugar a la formación del radical OH^{\bullet} , a través de la reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Andreyev *et al.*, 2005).



El **radical hidroxilo (OH^{\bullet})**, es una de las especies químicas más reactivas presentes en el organismo, está implicado en numerosos procesos fisiopatológicos como el cáncer, envejecimiento, diabetes, isquemia. Este ROS tiene una vida extremadamente corta y muy reactiva, su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula, DNA, proteínas y lípidos. Además, es el responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares, ya que puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena (Pastor, Weinstein, Jamison, & Brenowitz, 2000).

El **radical óxido nítrico (NO•)**, un derivado gaseoso e inestable del nitrógeno con un número impar de electrones que le confiere una extraordinaria reactividad química. Radical fisiológico de considerable interés por su papel como mediador vascular y puede reaccionar con iones superóxido formando especies reactivas altamente tóxicas y oxidantes, como el peroxinitrito, que se puede disociar generando otros productos como el radical hidroxilo (Pastor et al., 2000).

2.3.3. Fuentes generadores de radicales libres en la célula.

Las especies reactivas del oxígeno se generan como resultado del metabolismo intracelular normal, también agentes externos son capaces de generar la formación de ROS en el organismo. Una de las principales fuentes endógenas generadora de ROS es la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 2.16), la reducción parcial de la molécula de oxígeno durante la respiración aeróbica genera anión superóxido y radical hidroxilo (Figura 2.17) (Turrens, 2003). Entre un 5-10% del total del oxígeno consumido en la mitocondria, se transforma en radical superóxido, que dismuta a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa, y en presencia de iones metálicos, a través de la reacción de Fenton y/o reacciones de Haber-Weiss se genera el radical hidroxilo, altamente reactivo, causando importantes daños en las proteínas celulares, los lípidos y el DNA (Andreyev, Kushnareva, & Starkov, 2005).

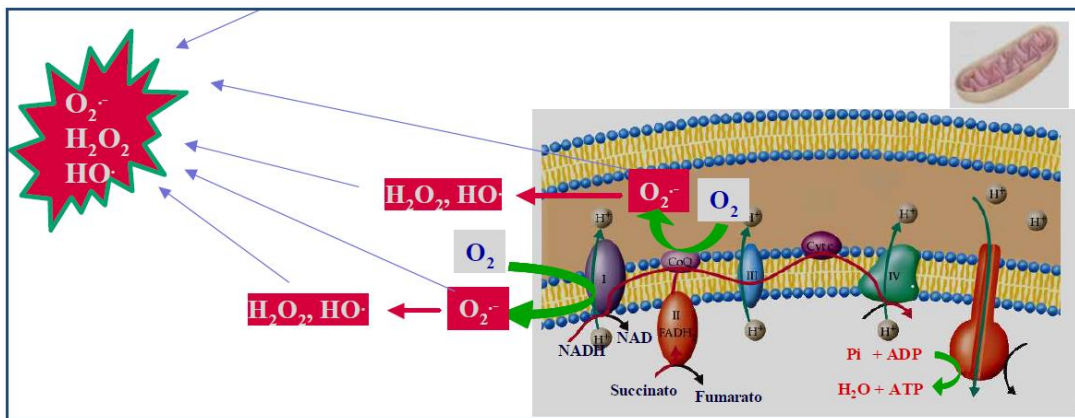


Figura 2.16. Reacciones de generación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Otras fuentes endógenas de ROS y RNS, son la cadena de transporte electrónico no fosforilante en el retículo endoplásmico (Gupta, Dobashi, Greene, Orak, & Singh, 1997), las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) que utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente el radical superóxido (Lambeth, 2004), o la óxido nítrico sintasa que genera óxido nítrico (NO) a partir de la arginina intracelular. La autooxidación de compuestos de carbono reducido como los aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos, da lugar también a la formación de estos compuestos (Li & Jackson, 2002).

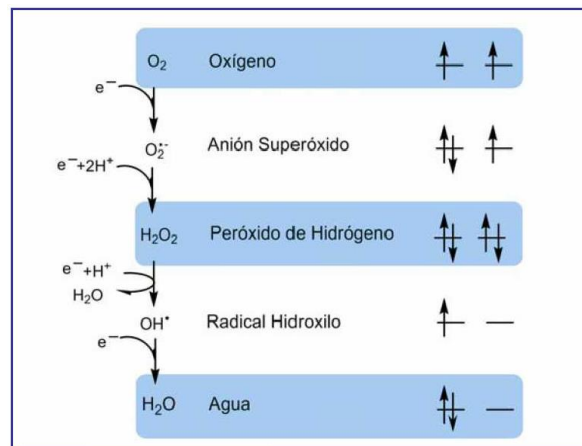


Figura 2.17. Reacciones de generación de radicales libres del oxígeno.

La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario celular, como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, que utilizan el O_2 como sustrato, también contribuyen al incremento endógeno de especies reactivas (Li & Jackson, 2002).

Como fuentes exógenas de radicales libres, se encuentran tanto factores ambientales, farmacológicos, como nutricionales (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009). Entre los agentes medioambientales destacan, el humo, la exposición a metales, benceno, polvo de cemento, luz solar, radiaciones electromagnéticas, que se asocian con incrementos en el daño oxidativo de

biomoléculas y la disminución de antioxidantes como la vitamina E y C (Chia, Hsu, & Chen, 2008; Yoshioka et al., 2008).

2.4. Estrés oxidativo.

2.4.1. Concepto y generalidades.

El aumento en la concentración de radicales libres, provoca un desbalance entre la velocidad de formación y su neutralización por el sistema antioxidante endógeno en el organismo, dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo (Venereo Gutiérrez, 2002).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, principalmente a través del consumo de alimentos con compuestos bioactivos como las vitaminas, los carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos cuya actividad antioxidante contribuye a reforzar la capacidad antioxidante endógena (Prior, 2003). Cada vez más y con el objetivo de mantener el efecto saludable de los alimentos, la industria alimentaria demanda técnicas que puedan ser utilizadas para el procesado de los alimentos sin que se vean modificados los compuestos bioactivos o que resultado del tratamiento mejore su actividad (Saiz, 2010).

2.4.2. Efectos bioquímicos y fisiológicos del estrés oxidativo.

Está bien establecido el papel dual de los radicales libres como especies beneficiosas o perjudiciales para los sistemas vivos (Marian Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006). A bajas concentraciones, los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células (Weinberg & Chandel, 2009). Sin embargo, a altas concentraciones son capaces de dañar de forma reversible o irreversible todo tipo de biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Como consecuencia de ello, los radicales libres están implicados en el control de la patogénesis de muchas enfermedades degenerativas tales como

cáncer, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, etc. (Figura 2.18) (Marian Valko et al., 2007).

El daño oxidativo a las biomoléculas causado por los radicales son de muy diversa naturaleza, pero en general actúan a través uno de los siguientes mecanismos:

- a) Captando un hidrogenión de una molécula.
- b) Introduciéndose como tal en una molécula diana.
- c) Transfiriendo un electrón.

En cualquiera de los tres casos, la reacción de un radical libre con otra molécula origina la formación de un nuevo radical que puede o no ser tan reactivo como la especie original.

El daño oxidativo a las distintas biomoléculas causa alteraciones y disfunciones metabólicas (Marian Valko et al., 2007), como inactivación y desnaturalización proteica, asociado a lesiones en el citoesqueleto celular, peroxidación lipídica, que provoca la pérdida de fluidez de membrana, lisis celular, oxidación de las LDL, daño a los ácidos nucleicos, con la consecuente ruptura de cadenas y la modificación de las bases nitrogenadas, relacionado con procesos de mutagénesis, carcinogénesis y modificación de las vías de señalización, implicadas en el metabolismo y regulación del ciclo celular (Saiz, 2010).

2.5. Antioxidantes.

Gutteridge y Halliwell definieron “antioxidante” como “cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato” (Barry Halliwell & Gutteridge, 1995). La definición enfatiza la importancia de la diana estudiada (sustrato oxidable) y la fuente de especies reactivas (RS) usada cuando se examina la actividad antioxidante. Dado que la definición no tenía en cuenta ciertos sistemas como las chaperonas, sistemas de reparación (del ADN o de residuos de proteínas) o inhibidores de la generación de RL, se simplificó la definición a “cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana” (Barry Halliwell, 2007).

Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y las moléculas de ADN (de Dios Benítez, 2008).

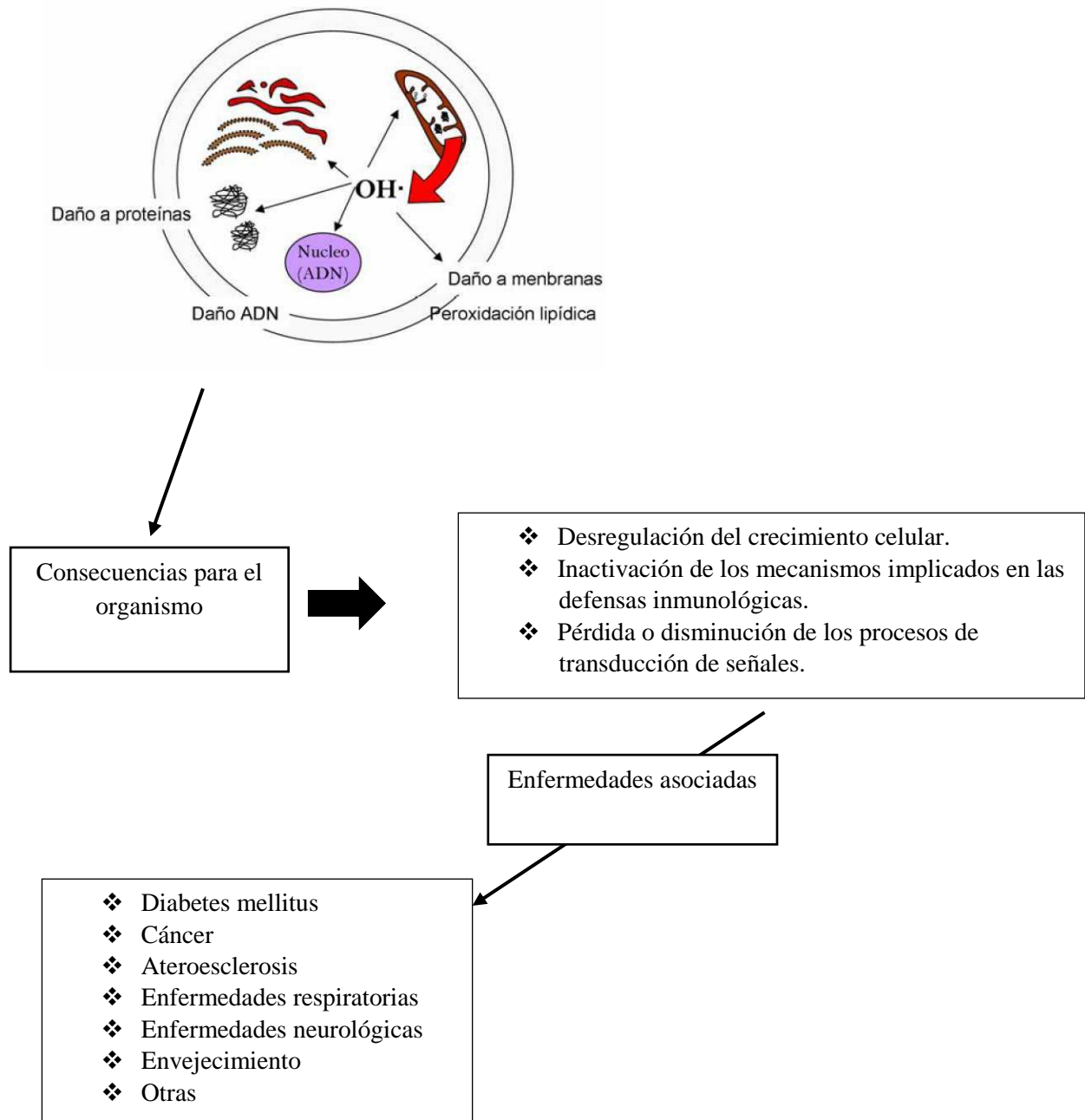


Figura 2.18. Daños producidos por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Los antioxidantes al colisionar con un radical libre le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un radical libre débil no tóxico y debido a que interactúan más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno. Su acción la ejercen en un determinado microambiente que puede ser, la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (Venereo Gutiérrez, 2002).

Los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas (Gómez, 2004):

- Previniendo la formación de EROs.
- Interceptando el ataque de EROs.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de EROs.
- Facilitando la reparación del daño causado por EROs.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros.

2.5.1. Actividad antioxidante

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Barry Halliwell & Gutteridge, 1999).

Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical (R^{\cdot}) (Cos et al., 2003). Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 2.19). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado

del antioxidante (A·) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad (Cadenas, 1997).

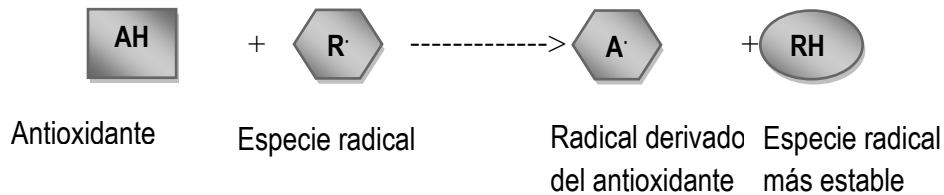


Figura 2.19. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes.

2.5.2. Caracterización de la actividad antioxidante

La importancia relativa de los antioxidantes que entran en escena cuando se generan ROS *in vivo*, depende del tipo de ROS que se forma y, cómo, dónde y qué clase de daño se evalúa.

Para caracterizar la acción antioxidante de un compuesto, lo primero que se debe concretar es cómo el antioxidante ejerce su actividad, ¿actúa directamente?, es decir, mediante el secuestro de ROS o inhibiendo su generación, o ¿está actuando de forma indirecta?, es decir, por “up-regulation” de las defensas antioxidantes endógenas. Para evaluar la acción directa de los antioxidantes, que es probablemente la más común *in vivo*, es importante plantearse y responder a ciertas preguntas (B Halliwell, Aeschbach, Löliger, & Aruoma, 1995):

1. ¿A qué biomolécula está protegiendo el antioxidante? y ¿es suficiente la cantidad de antioxidante que alcanza a esa diana *in vivo*?
2. ¿Cómo ejerce su actividad protectora el antioxidante, por el secuestro de ROS, previniendo su formación, o reparando el daño que han producido?

3. Si el mecanismo de actuación del antioxidante es por secuestro de ROS ¿es posible que los radicales derivados de la actividad del propio antioxidante causen algún tipo de daño por sí mismos?

4. ¿Puede el antioxidante causar daños en otros sistemas biológicos?

Otros dos puntos importantes en la evaluación de la actividad antioxidante son, (i) que el compuesto debe utilizarse a concentraciones “reales”, es decir, alcanzables *in vivo* y (ii) que se deben usar ROS biológicamente relevantes como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), radicales peróxido ($ROO\cdot$), peroxinitritos y el oxígeno singulete ($^1\Delta O_2$).

Experimentos sencillos pueden ayudar a responder algunas de estas preguntas y los resultados obtenidos permiten caracterizar la actividad del antioxidante estudiado y, a menudo, permiten descartarlo como compuesto de interés, ya que un compuesto que resulta ser poco antioxidante *in vitro*, es improbable que sea mucho mejor *in vivo* (Barry Halliwell, 1994).

2.5.3. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

El estudio de nuevos compuestos con potencial efecto antioxidante cada vez adquiere más relevancia en los campos de la biología, la nutrición, la industria alimentaria y la medicina, lo que hace necesaria la existencia de métodos *in vitro* simples, rápidos y, sobre todo, fiables, para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos ya sea en su forma pura (moléculas aisladas) o compleja (alimentos o muestras biológicas) (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008).

Existen gran variedad de métodos de evaluación de la actividad antioxidante, pero ninguno está oficialmente aprobado ni estandarizado. Por esta razón, los datos aportados por los diferentes investigadores son difíciles de comparar e interpretar, ya que el significado y la relevancia de los estudios realizados depende en gran parte del método de ensayo empleado (Frankel & Meyer, 2000). Cada vez es más evidente que una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante requiere el uso de diferentes métodos de ensayo que incluyan y

contemplan los múltiples factores y mecanismos que rodean la inhibición del proceso oxidativo (Schlesier, Harwat, Böhm, & Bitsch, 2002).

Para escoger el protocolo de ensayo adecuado y poder interpretar adecuadamente los resultados obtenidos se deben considerar ciertas pautas de diseño (Frankel & Meyer, 2000):

- Especificar el sustrato oxidable que será protegido por el antioxidante estudiado.
- Determinar el parámetro que medirá la extensión de la oxidación y la inhibición ejercida por el antioxidante y escoger un punto final adecuado de la oxidación.
- Asegurarse de que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Contemplar cualquier posible efecto prooxidante adverso ejercido por los antioxidantes.
- Plantearse los posibles mecanismos de protección.
- Tener en cuenta el efecto de la interacción con otros componentes del sistema.
- Asegurar la accesibilidad de los sustratos a los antioxidantes y prooxidantes.
- Plantearse si las condiciones son relevantes para una aplicación real.

Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante pueden clasificarse en función de la especie oxidante (ROS/RNS específicos o radicales estables no biológicos), del mecanismo de actuación del antioxidante (capacidad secuestradora de radicales, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad de reducir metales, etc...) o del sustrato oxidable utilizado (químico o biológico).

A continuación se resumen los métodos *in vitro* más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia.

2.5.3.1. Pruebas químicas *in vitro* de medida de la actividad antioxidante

Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante (Ensayo FRAP):

Esta técnica fue desarrollada por Benzie y Strain (1996) como método de medida de la capacidad antioxidante plasmática, aunque posteriormente ha sido aplicado a muestras de

alimentos. El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo por hierro férrico con la molécula tripiridil-s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa. De este modo se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra, que puede cuantificarse por colorimetría en base a un patrón de hierro ferroso. La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra.

El ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 min. Sin embargo, en el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a requerir 30 minutos hasta completar la reducción del complejo. El poder reductor de los compuestos fenólicos se asocia con el número de grupos OH^- y en grado de conjugación de la molécula. Debido al potencial redox del complejo Fe^{3+} -TPTZ (0.7 V), el ensayo FRAP es capaz de detectar compuestos con un menor potencial redox y por lo tanto se considera un método adecuado para evaluar la capacidad de los antioxidantes para modular el tono redox de células y tejidos. Sin embargo, cuando se aplica en plasma o suero no es capaz de detectar la actividad de antioxidantes con grupos sulfhidrilo como el glutatión o algunas proteínas, por lo que dará valores de capacidad antioxidante del suero o plasma ligeramente más bajos de los reales. Además, cuando se analizan alimentos vegetales, se han descrito interferencias de azúcares y ácido cítrico (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox (Ensayo TEAC)

El ensayo TEAC o ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$ generado en el medio de reacción. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

El radical catión del $\text{ABTS}^{\cdot+}$ posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm (Sanchez-Moreno, 2002). Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm (Prior et al., 2005). Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y

decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $ABTS^{\cdot+}$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el $ABTS^{\cdot+}$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este (Sanchez-Moreno, 2002). El ensayo TEAC presenta además variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catión $ABTS^{\cdot+}$. Principalmente se consideran dos modos (Prior et al., 2005; Schlesier et al., 2002).

(i) La generación por reacciones enzimáticas, en las que el $ABTS^{\cdot+}$ se incuba con H_2O_2 y con metamioglobina, hemoglobina o peroxidasa de rábano.

(ii) La generación por reacciones químicas, el $ABTS^{\cdot+}$ se hace reaccionar con dióxido de manganeso, persulfato potásico o cloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP). Estas reacciones químicas por lo general requieren tiempos largos de incubación (16 h en el caso del persulfato potásico) o altas temperaturas (60 °C en el caso del ABAP).

Así por ejemplo, el método original descrito por Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, and Milner (1993) emplea metamioglobina y H_2O_2 para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el $ABTS^{\cdot+}$ para generar el $ABTS^{\cdot+}$. La muestra a analizar se añade antes de la formación del $ABTS^{\cdot+}$ por lo que se trata de un ensayo de inhibición. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales (Prior et al., 2005). Sin embargo, se trata de un método ampliamente utilizado en ensayos clínicos, al ser un método rápido, sencillo y automatizable.

Incluso existen kits comercializados por Randox Laboratories Ltd. (Reino Unido) para su uso en investigación. Además, el $ABTS^{\cdot+}$ es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos (Prior et al., 2005; Schlesier et al., 2002).

Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (Ensayo DPPH[·])

Este método se basa en la reducción del radical DPPH[·] por los antioxidantes de la muestra (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general empleando soluciones patrón de Trolox. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método (Prior et al., 2005). En general la reacción puede medirse a los 2, 3, 4, 5 y 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo se espera que la mayoría de sustancias completen la reacción con el DPPH[·], y posteriormente en intervalos de 5 minutos hasta que las variaciones de absorbancia esté en torno a 0.003/minuto, lo cual indicaría que la reacción se ha completado (Schlesier et al., 2002).

El ensayo DPPH[·] es un método rápido y sencillo que no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. A diferencia del ensayo TEAC, en este ensayo no es necesario preparar radical previamente puesto que el DPPH[·] se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total. Es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, mientras que no es adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción (Sanchez-Moreno, 2002). No obstante algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al del DPPH[·], como es el caso de los carotenoides (Prior et al., 2005).

Decoloración del β -caroteno

La actividad antioxidante de los carotenos ha sido relacionada con la capacidad de deslocalizar electrones (deslocalización por resonancia) en el sistema conjugado de dobles enlaces que

estos tienen en su cadena hidrocarbonada, lo cual determina la baja energía de sus estados tripletes y su alta capacidad de neutralizar (quench) los radicales libres y el oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ (Stahl & Sies, 2003). Esta particular propiedad de los compuestos carotenoides se aprovecha para la cuantificación de la actividad antioxidante lipofílica por el método de decoloración del β -caroteno. En este método de medida de la actividad antioxidante, se promueve la peroxidación térmica del ácido linoleico (LH) en presencia de oxígeno molecular (O_2) para formar el radical peróxido (LOO^\cdot). Este radical puede ser neutralizado por el β -caroteno ($\lambda = 470 \text{ nm}$) ocasionando la ruptura de su conjugación y por consiguiente se anula su capacidad de transferencia de carga, manifestándose en el proceso de decoloración que puede ser medido espectrofotométricamente.

De esta manera, la actividad antioxidante de un extracto de compuestos fenólicos o carotenoides (AH_2) puede ser medida al evaluar la capacidad que estos compuestos tienen de neutralizar el radical LOO^\cdot e impedir así el proceso de decoloración del β -caroteno. Entre más actividad antioxidante tenga el compuesto evaluado, menor será la decoloración del β caroteno (Marco, 1968; Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998).

Ensayo de los fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total (Prior et al., 2005). El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton and Rossi (1965) de un método empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los fenoles con mayor especificidad ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una

coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.

Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sin embargo sufre de numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes grupos de investigación, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos, y tiempos y temperaturas de incubación. Además, se producen variaciones en el modo de expresar los resultados de modo que el patrón recomendado de ácido gálico se ha sustituido en ocasiones por los ácidos ferúlico, tánico, cafeico, clorogénico, protocatéuico, vanílico o por catequina. Esto da lugar a variaciones de varios órdenes de magnitud en las medidas de compuestos fenólicos obtenidas por diferentes grupos, lo que dificulta la comparación de resultados. Existen además diversas sustancias de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares y algunas sales inorgánicas (Prior et al., 2005).

No obstante, a pesar de estos inconvenientes, el ensayo de los fenoles totales se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales (ej. frutas y zumos de frutas), al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante (Schlesier et al., 2002; Sun, Chu, Wu, & Liu, 2002). Así, cuando se evalúan las propiedades antioxidantes de estos alimentos, el análisis de fenoles totales constituye un método complementario al análisis cromatográfico de los principales grupos de compuestos fenólicos que caracterizan a cada variedad de fruta o verdura, a la vez que proporciona información valiosa a la hora de seleccionar variedades con mayor potencial antioxidante. El ensayo de Folin-Ciocalteu también se ha empleado en estudios *in vivo* para la determinación de los niveles de compuestos fenólicos totales en plasma/suero tras la ingesta de vino (Duthie et al., 1998; Serafini, Maiani, & Ferro-Luzzi, 1998) y zumos de frutas ricos en compuestos fenólicos (Pedersen, Mortensen, & Larsen, 1994). Para su aplicación a plasma o suero se requiere una

serie de pasos de extracción e hidrólisis que comprenden el tratamiento con HCl y NaOH en metanol. Para evitar interferencias con las proteínas, estas se precipitan con ácido metafosfórico y posteriormente se realiza una extracción de los compuestos fenólicos ligados a las proteínas plasmáticas con una mezcla de acetona y agua (Serafini et al., 1998).

REFERENCIAS

- Aki, H. S., Fujita, M., Yamashita, S., Fujimoto, K., Kumagai, K., Tsuruta, R., . . . Murata, H. (2009). Elevation of jugular venous superoxide anion radical is associated with early inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in forebrain ischemia–reperfusion rats. *Brain research*, *1292*, 180-190.
- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, *115*(3), 785-788.
- Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 6292-6297.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., . . . Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, *67*(4), 188-205.
- Anderson, J. W., & Hanna, T. J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *The Journal of nutrition*, *129*(7), 1457S-1466s.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, *70*(2), 200-214.
- Aparecida de Assis, S., Velloso, J. C. R., Brunetti, I. L., Khalil, N. M., Leite, K. M. d. S. C., Martins, A. B. G., & Oliveira, O. M. M. d. F. (2009). Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International journal of food sciences and nutrition*, *60*(5), 439-448.
- Arango, J. (2006). Análisis de expresión de los genes de la ruta biosintética de carotenos, y cuantificación de carotenos en hojas y raíces de plantas de yuca a diferentes edades. *Pontificia Universidad Javeriana, facultad deficiencias, carrera de Biología, Bogotá*.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*(494), 161-172.

- Bennett, W. G., & Cerda, J. J. (1996). Benefits of dietary fiber. Myth or medicine? *Postgraduate medicine*, 99(2), 153-156, 166-158, 171-152 passim.
- BONE, R. A., LANDRUM, J. T., FRIEDES, L. M., GOMEZ, C. M., KILBURN, M. D., MENENDEZ, E., . . . WANG, W. (1997). Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Experimental eye research*, 64(2), 211-218.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Braunwald, E. (2002). *Harrison: Principios de medicina interna* (Vol. 98): McGraw-Hill Madrid.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
- Buijsse, B., Feskens, E. J., Schlettwein-Gsell, D., Ferry, M., Kok, F. J., Kromhout, D., & de Groot, L. C. (2005). Plasma carotene and α -tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause-specific mortality in European elderly: the Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action (SENECA). *The American journal of clinical nutrition*, 82(4), 879-886.
- Burkitt, D., Walker, A., & Painter, N. S. (1972). Effect of dietary fibre on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. *The Lancet*, 300(7792), 1408-1411.
- Burton-Freeman, B. (2010). Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. *British journal of nutrition*, 104(S3), S1-S14.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6(4), 391-397.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4606-4612.

- Cassileth, B. (2008). Complementary therapies, herbs, and other OTC agents. *Oncology (Williston Park, NY)*, 22(10), 1202-1202.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Combs, G. F., & Gray, W. P. (1998). Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & therapeutics*, 79(3), 179-192.
- Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2003). Phytoestrogens: recent developments. *Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research*, 69(7), 589-599.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26(8), 1001-1043.
- Cuadra, P., Harborne, J. B., & Waterman, P. G. (1997). Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 45(7), 1377-1383.
- Charrondiere, U., Chevassus-Agnes, S., Marroni, S., & Burlingame, B. (2004). Impact of different macronutrient definitions and energy conversion factors on energy supply estimations. *Journal of food composition and analysis*, 17(3), 339-360.
- Chen, F., & Wang, X. (2008). *AGFD 65-Fruit flavors and their health benefits*. Paper presented at the ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Chia, T., Hsu, C. Y., & Chen, H. L. (2008). Oxidative damage of workers in secondary metal recovery plants affected by smoking status and joining the smelting work. *Industrial health*, 46(2), 174-182.
- de Ancos, B., González, E. M., & Cano, M. P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4565-4570.

- de Dios Benítez, J. (2008). *Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en dos grupos de varones prepuberales y puberales*. Tesis Doctoral. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- De Lorgeril, M., Renaud, S., Salen, P., Monjaud, I., Mamelle, N., Martin, J., . . . Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*, *343*(8911), 1454-1459.
- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. *Food research international*, *44*(7), 1671-1701.
- DeVries, J., Prosky, L., Li, B., & Cho, S. (1999). A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World*, *44*, 367-369.
- Doyama, J., Rodrigues, H., Novelli, E., Cereda, E., & Vilegas, W. (2005). Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of ethnopharmacology*, *96*(3), 371-374.
- Dube, M., Zunker, K., Neidhart, S., Carle, R., Steinhart, H., & Paschke, A. (2004). Effect of technological processing on the allergenicity of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(12), 3938-3945.
- Duthie, G., Pedersen, M., Gardner, P., Morrice, P., Jenkinson, A. M., McPhail, D., & Steele, G. (1998). The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, *52*(10), 733-736.
- Duttaroy, A. K., & Jørgensen, A. (2004). Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers. *Platelets*, *15*(5), 287-292.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J Med Plants Res*, *6*, 4724-4730.

- Englyst, H. N., Quigley, M. E., & Hudson, G. J. (1994). Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst*, *119*(7), 1497-1509.
- Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1), 129-141.
- Fennema, O. (2000). Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza, España, 433-469.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*(6809), 239-247.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(13), 1925-1941.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(4), 890-894.
- Garcia, V. V., Magpantay, T. O., & Escobin, L. D. (2005). Antioxidants potential of selected Philippine vegetables and fruits. *Philippine Agricultural Scientist (Philippines)*.
- Gennaro, A. R. (2003). *Remington farmacia* (Vol. 2): Ed. Médica Panamericana.
- Gescher, A., Pastorino, U., Plummer, S. M., & Manson, M. M. (1998). Suppression of tumour development by substances derived from the diet—mechanisms and clinical implications. *British journal of clinical pharmacology*, *45*(1), 1-12.
- Gilbert, D. L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of sciences*, *899*(1), 1-14.
- Goodman, A., & Gilman, A. (2002). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1994: Edición Revolucionaria.

- Gorinstein, S., Bartnikowska, E., Kulasek, G., Zemser, M., & Trakhtenberg, S. (1998). Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. *The Journal of nutrition*, 128(11), 2023-2027.
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J., . . . Sheng, G. P. (2010). Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21(4), 355-362.
- Gorinstein, S., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Vearasilp, S., . . . Tashma, Z. (2011). Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits: in vitro and in vivo studies. *Food research international*, 44(7), 2222-2232.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Haruenkit, R., Chuthakorn, R., Grauer, F., Martin-Belloso, O., & Trakhtenberg, S. (1999). Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(6), 367-371.
- Gray, J. (2006). Dietary Fibre. Definition, Analysis, Physiology and Health. ILSI Europe Dietary Fibre Concise Monograph Series. 2006.
- Gupta, M., Dobashi, K., Greene, E. L., Orak, J. K., & Singh, I. (1997). Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion *The Cellular Basis of Cardiovascular Function in Health and Disease* (pp. 337-347): Springer.
- Gutierrez-Rosales, F., Rios, J., & Gomez-Rey, M. L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6021-6025.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B. (2005). Free radicals and other reactive species in disease. *eLS*.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.

- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology and medicine*, 18(1), 125-126.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Vol. 3): Oxford university press Oxford.
- Harbone, J., & Baxter, H. (1993). Phytochemical dictionary. *A handbook of bioactive compounds from plants*. London7 Taylor and Francis.
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4107-4112.
- Heredia, A., Jimenez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Rodríguez, R. (2002). Fibra alimentaria. *Biblioteca de Ciencias, Madrid*, 1-117.
- Heredia Moreno, A., & Fernandez Diez, M. (1979). Composicion de fibra. II. Lignina y celulosa como componentes de la fibra de aceitunas. *Grasas y aceites*.
- Hollman, P. C. H., & Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols–nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081-1093.
- Hou, D.-X., Fujii, M., Terahara, N., & Yoshimoto, M. (2004). Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. *BioMed Research International*, 2004(5), 321-325.
- Hurst, W. J. (2002). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*: CRC Press.
- Ito, Y., Kurata, M., Suzuki, K., Hamajima, N., Hishida, H., & Aoki, K. (2006). Cardiovascular disease mortality and serum carotenoid levels: a Japanese population-based follow-up study. *Journal of epidemiology*, 16(4), 154-160.
- Ito, Y., Wakai, K., Suzuki, K., Ozasa, K., Watanabe, Y., Seki, N., . . . Ohno, Y. (2005). Lung cancer mortality and serum levels of carotenoids, retinol, tocopherols, and folic acid in

- men and women: a case-control study nested in the JACC Study. *Journal of epidemiology*, 15(Supplement_II), S140-S149.
- Kabagambe, E. K., Baylin, A., Ascherio, A., & Campos, H. (2005). The type of oil used for cooking is associated with the risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. *The Journal of nutrition*, 135(11), 2674-2679.
- Kelemen, L. E., Cerhan, J. R., Lim, U., Davis, S., Cozen, W., Schenk, M., . . . Ward, M. H. (2006). Vegetables, fruit, and antioxidant-related nutrients and risk of non-Hodgkin lymphoma: a National Cancer Institute–Surveillance, Epidemiology, and End Results population-based case-control study. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1401-1410.
- Kirsh, V. A., Mayne, S. T., Peters, U., Chatterjee, N., Leitzmann, M. F., Dixon, L. B., . . . Hayes, R. B. (2006). A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(1), 92-98.
- Knudsen, K. B. (2001). The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal feed science and technology*, 90(1), 3-20.
- Kondo, S., Kittikorn, M., & Kanlayanarat, S. (2005). Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), 309-318.
- Kopsell, D. A., & Kopsell, D. E. (2006). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in plant science*, 11(10), 499-507.
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26(6), 459-516.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., . . . Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.
- Kritchevsky, D. (1988). Dietary fiber. *Annual review of nutrition*, 8(1), 301-328.

- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189.
- Lefebvre, A., Thébaudin, J., Tirilly, Y., & Bourgeois, C. (2002). Las fibras extraídas de las hortalizas.
- Leontowicz, H., Leontowicz, M., Drzewiecki, J., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y.-S., . . . Gorinstein, S. (2006). Bioactive properties of Snake fruit (*Salacca edulis* Reinw) and Mangosteen (*Garcinia mangostana*) and their influence on plasma lipid profile and antioxidant activity in rats fed cholesterol. *European Food Research and Technology*, 223(5), 697-703.
- Lessin, W. J., Catigani, G. L., & Schwartz, S. J. (1997). Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3728-3732.
- Li, C., & Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(2), C227-C241.
- Lim, Y., Lim, T., & Tee, J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103(3), 1003-1008.
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 137-147.
- Luximon-Ramma, A., Baborun, T., & Crozier, A. (2003). Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 496-502.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.

- MacFarlane, P., Wilkerson, J., Lovett-Barr, M., & Mitchell, G. (2008). Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, *164*(1), 263-271.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, *613*(1), 1-19.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J., Talcott, S., Goodner, K., & Baldwin, E. (2005). *Total antioxidant activity of Florida's tropical fruit using the DPPH and ORAC assay*. Paper presented at the Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, March 13–17, AGFD.
- Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research*, *38*(8), 771-785.
- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *45*(9), 594-598.
- Maria do Socorro, M. R., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S., & Saura-Calixto, F. (2011). Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food research international*, *44*(7), 2100-2106.
- Martínez-Navarrete, N., Vidal, M. d. M. C., & Lahuerta, J. J. M. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, *12*(2), 64-68.
- McCleary, B. V. (2003). Dietary fibre analysis. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(01), 3-9.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D., & Hillman, J. R. (1996). Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *70*(2), 133-150.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *57*(2), 109-117.

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149-154.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84, 407-407.
- Morillo Coronado, Y. (2009). *Herencia del contenido de carotenos en raíces de yuca Manihot esculenta Crantz*. Universidad Nacional de Colombia.
- Mortensen, A., Skibsted, L. H., & Truscott, T. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 13-19.
- Murcia, M. A., Jiménez, A. M., & Martínez-Tomé, M. (2001). Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *Journal of Food Protection®*, 64(12), 2037-2046.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A. J., & Mondello, L. (2013). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*, 140(4), 825-836.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, Å., & Åkesson, B. (2005). Comparison of the 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzotiazolone-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular nutrition & food research*, 49(3), 239-246.
- Nordberg, J., & Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Omidizadeh, A., Yusof, R. M., Roohinejad, S., Ismail, A., Bakar, M. Z. A., & Bekhit, A. E.-D. A. (2014). Anti-diabetic activity of red Pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit. *RSC Advances*, 4(108), 62978-62986.

- Ordóñez, T. C., & Rodríguez, E. (2013). Frutos tropicales como fuente de carotenoides: biosíntesis, composición, biodisponibilidad y efectos del procesamiento. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 001-023.
- Ortíz, M. A., Vargas, M. d. C. R., Madinaveitia, R. G. C., & Velázquez, J. A. M. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 16-22.
- Paganga, G., Miller, N., & Rice-Evans, C. A. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free radical research*, 30(2), 153-162.
- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology*, 304(1), 55-68.
- Pedersen, G. A., Mortensen, G. K., & Larsen, E. H. (1994). Beverages as a source of toxic trace element intake. *Food Additives & Contaminants*, 11(3), 351-363.
- Peris, P. G., Lesmes, I. B., De la Cuerda Compes, C., & Álv, M. C. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 17(s02).
- Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 570S-578S.
- Prior, R. L., Wu, X., & 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.
- Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F., & Harland, B. F. (1984). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 677-679.

- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Buren, L. v., Wagner, E., Wiseman, S., . . . Rice-Evans, C. A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical research*, 36(2), 217-233.
- Quirós-Sauceda, A., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S., Ayala-Zavala, J., Bello-Perez, L., Álvarez-Parrilla, E., . . . González-Aguilar, G. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & function*, 5(6), 1063-1072.
- Ramulu, P., & Rao, P. U. (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of food composition and analysis*, 16(6), 677-685.
- Rankin, S. M., de Whalley, C. V., Hoult, J. R. S., Jessup, W., Wllkins, G. M., Collard, J., & Leake, D. S. (1993). The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. *Biochemical pharmacology*, 45(1), 67-75.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., & Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry*, 108(3), 1099-1105.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rivera, S., & Canela-Garayoa, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1-10.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2010). Fruit and vegetable phytochemicals.

- RUFINO, M. d. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. d., PEREZ-JIMENEZ, J., SAURACALIXTO, F., & MANCINI-FILHO, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002.
- SAGARPA, S. (2011). Servicio de información agroalimentaria y pesquera.
- Saiz, M. C. (2010). *Características antioxidantes y efecto sobre biomarcadores de estrés oxidativo del zumo de pomelo desamargado por tecnología enzimática y por tratamiento con resinas de intercambio*. Universidad de Burgos.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biologic systems-review. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sanchez, O. (2008). Efecto de la época de transplante sobre la acumulación de luteína en inflorescencias de cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.) Tesis Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos bióticos. *Yautepec, Morelos*.
- Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.-S., Lachance, P. A., Ho, C.-T., & Rosen, R. T. (2002). Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2459-2463.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scheppach, W., Luehrs, H., Melcher, R., Gostner, A., Schaubert, J., Kudlich, T., . . . Menzel, T. (2004). Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clinical nutrition supplements*, 1(2), 51-58.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- Selvendran, R., & Robertson, J. (1994). Dietary fibre in foods: amount and type. *Metabolic and physiological aspects of dietary fibre in food. Commission of the European Communities, Luxembourg*, 11-20.

- Selvendran, R. R., & Verne, A. V. F. (1990). The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber *Dietary Fiber* (pp. 1-13): Springer.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of nutrition*, 128(6), 1003-1007.
- Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soares, D. J., Walker, J., Pignitter, M., Walker, J. M., Imboeck, J. M., Ehrnhoefer-Ressler, M. M., . . . Somoza, V. (2014). Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. *Food Funct.*, 5(11), 2981-2988.
- Southgate, D. (1969). Determination of carbohydrates in foods II.—Unavailable carbohydrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(6), 331-335.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449-7454.
- Swaminathan, S., & Madavalappil, K. P. (2013). Isolation and purification of carotenoids from marigold flowers: Google Patents.
- Talcott, S. T., Percival, S. S., Pittet-Moore, J., & Celoria, C. (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 935-941.
- Tavani, A., Gallus, S., Negri, E., Parpinel, M., & La Vecchia, C. (2006). Dietary intake of carotenoids and retinol and the risk of acute myocardial infarction in Italy. *Free radical research*, 40(6), 659-664.
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2007). *Principios de anatomía y fisiología*: Panamericana.

- Touvier, M., Kesse, E., Clavel-Chapelon, F., & Boutron-Ruault, M.-C. (2005). Dual association of β -carotene with risk of tobacco-related cancers in a cohort of French women. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(18), 1338-1344.
- Trowell, H. (1976). Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 29(4), 417-427.
- Trowell, H., Southgate, D. T., Wolever, T. S., Leeds, A., Gassull, M., & Jenkins, D. A. (1976). Dietary fibre redefined. *The Lancet*, 307(7966), 967.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Lozano, C., Torres, J. L., & Vinardell, M. P. (2006). Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6945-6950.
- Urquiaga, I., & LEIGHTON, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, 33(2), 55-64.
- Valdivia, A., Perez-Alvarez, S., Aroca-Aguilar, J., Ikuta, I., & Jordán, J. (2009). Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *Journal of physiology and biochemistry*, 65(2), 195-208.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Van Soest, P. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 46(5), 825.

- Van Way, C. W., Ireton-Jones, C., & Pinto, J. R. B. (2005). *Secretos de la nutrición*: McGraw-Hill Interamericana.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1204-1212.
- Velderrain-Rodríguez, G., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., . . . González-Aguilar, G. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, 5(2), 189-197.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A., & Asquiere, E. R. (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh). *Food Science and Technology (Campinas)*, 30, 151-160.
- Wang, H., Dong, Y., & Xiu, Z.-L. (2008). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ammonium sulphate systems. *Biotechnology letters*, 30(12), 2079-2084.
- Weinberg, F., & Chandel, N. S. (2009). Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 66(23), 3663-3673.
- Wheldale, M. (1916). *Anthocyanic Pigments Of Plants*.
- WHO, E. C. (2004). Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*, 363(9403), 157.
- Wu, L.-c., Hsu, H.-W., Chen, Y.-C., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., & Ho, J.-a. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red Pitahaya. *Food Chemistry*, 95(2), 319-327.

- Xammar Oro, J. R. d., & Donnamaría, M. C. (2006). Acción farmacológica, biofísicoquímica y estructura dinámica de la vitamina C. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25.
- Xu, M., Deng, Z., Li, M., Li, J., Fu, H., Proksch, P., & Lin, W. (2004). Chemical Constituents from the Mangrove Plant, *Aegiceras c orniculatum*. *Journal of natural products*, 67(5), 762-766.
- Yang, F., Oz, H. S., Barve, S., de Villiers, W. J., McClain, C. J., & Varilek, G. W. (2001). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Molecular Pharmacology*, 60(3), 528-533.
- Yang, J., Paulino, R., Janke-Stedronsky, S., & Abawi, F. (2007). Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chemistry*, 102(1), 302-308.
- Yeum, K.-J., & Russell, R. M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual review of nutrition*, 22(1), 483-504.
- Yoshioka, N., Nakashima, H., Hosoda, K., Eitaki, Y., Shimada, N., & Omae, K. (2008). Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among nickel-cadmium battery workers. *Journal of occupational health*, 50(3), 229-235.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655.

3. INTERÉS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Factores ambientales relacionados con la dieta y la exposición a agentes pro-oxidantes (radiaciones, metales, pesticidas, contaminación, etc.) aumentan considerablemente las especies reactivas en la célula. Cuando el incremento de las especies reactivas excede la capacidad de actuación del sistema antioxidante endógeno, provoca un estado de estrés oxidativo. Daños sobre las membranas celulares y sobre el ADN son consecuencia directa de una desregulación en el estado redox de la célula. Existen evidencias que sugieren la existencia de una relación entre el estrés oxidativo y los estados patológicos de numerosas enfermedades. Es por ello que la modulación del equilibrio antioxidante fisiológico parece ser esencial para prevenir o reducir el daño al ADN y otras biomoléculas y por tanto, para disminuir la posibilidad de desarrollo de cáncer u otras enfermedades.

Estudios epidemiológicos han comprobado que una dieta rica en frutas y verduras parece ser importante para la prevención de enfermedades. Parece bastante plausible que alguno de los compuestos o la interacción de varios compuestos que constituyen frutas y verduras son responsables del efecto protector que presentan.

En este sentido, las especies de frutas tropicales y subtropicales no tradicionales en los mercados internacionales (ya sean nativas de la región o exóticas pero perfectamente adaptadas) producidas en la península de Yucatán representan una gran oportunidad para los productores regionales para alcanzar nuevos nichos de mercado constituidos por consumidores interesados en productos exóticos y más ricos en términos de nutrientes con propiedades útiles para la conservación de la salud y en la prevención de enfermedades degenerativas. Sin embargo, se considera que existen centenas de especies poco estudiadas y aprovechadas, aunque muchas de ellas se consumen ampliamente en las zonas de su producción, que requieren ser estudiadas para favorecer su cultivo, comercialización aprovechamiento e industrialización. Adicionalmente en Yucatán son pocos o nulos los trabajos que se han realizado con el objetivo de estudiar y profundizar los conocimientos en relación a la caracterización de compuestos bioactivos y sus propiedades antioxidantes de frutas tropicales de la región.

El estilo de vida al que se tiende hoy en día, ha aumentado la demanda de productos saludables que contienen compuestos biológicamente activos, conocidos por el nombre de alimentos funcionales, que además del aporte nutritivo pueden ofrecer beneficios para la salud disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades.

Los resultados prometedores en cuanto a las propiedades beneficiosas y la aceptación de los consumidores para utilizar antioxidantes naturales como complementos nutricionales han disparado el mercado de estos productos. La necesidad de disponer de grandes fuentes de compuestos bioactivos ha puesto en el punto de mira de numerosas investigaciones a partir de frutas tropicales. De hecho, algunos extractos obtenidos a partir de las frutas han sido utilizados como ingredientes o suplementos nutricionales, aplicaciones dérmicas, y/o antioxidantes alimentarios.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de frutas tropicales cultivadas en la Península de Yucatán que presentan un potencial funcional.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el contenido de compuestos bioactivos en la porción comestible de frutas tradicionales de Yucatán: vitamina C o ácido ascórbico, antocianinas totales, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y fibra dietética (total, soluble e insoluble).
- Determinar el contenido de compuestos bioactivos de la cáscara liofilizado de marañón rojo, marañón amarillo y caimito morado: vitamina C o ácido ascórbico, antocianinas totales, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y fibra dietética (total, soluble e insoluble).
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los antioxidantes de naturaleza hidrófila de las frutas tradicionales mediante diferentes ensayos de secuestro de radical ABTS^{•+} y DPPH[•].
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de la cáscara liofilizado de marañón rojo, marañón amarillo y caimito morado a través de los ensayos de secuestro de radical ABTS^{•+} y DPPH[•].
- Determinar el grado de correlación que existe entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos de la porción comestible y cáscaras estudiados.
- Determinar la correlación que existe entre los métodos de determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las frutas tropicales.
- Aplicar el análisis de componentes principales y análisis de cluster para clasificar las frutas acorde a sus características funcionales.

- Determinar el contenido de los compuestos fenólicos individuales y carotenoides como compuestos antioxidantes de las frutas tropicales utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los antioxidantes de naturaleza lipófila de las frutas tropicales mediante los ensayos ABTS^{·+} y DPPH[·].
- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de frutas tropicales de la Península de Yucatán.

5. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

En función de los objetivos de la investigación, en una primera fase, se realizó una colecta de un grupo de frutas tropicales (con madurez comestible) tradicionales en las comunidades de Yucatán y Campeche que presentan un gran potencial funcional con amplias posibilidades de comercialización. Se obtuvieron frutas que se producen a nivel local para obtener muestras de partes comestibles de cada fruta y se determinó algunas de sus principales características físico-químicas de calidad. En una segunda fase se cuantificó los principales compuestos bioactivos de cada fruta (porción comestible) mediante metodologías estandarizadas o adaptadas. Dentro de esta misma fase, también se caracterizaron muestras de cáscara liofilizada de marañón rojo, marañón amarillo y caimito morado. En la tercera fase, se obtuvieron extractos hidrófilos de la porción comestible de cada fruta y se determinó la actividad antioxidante *in vitro* mediante metodologías que difieren en su mecanismo de generación de radicales libres, la estrategia para medir el punto final de la reacción y de la sensibilidad hacia diferentes moléculas en la muestra tales como el DPPH[·] y el ABTS^{·+}. En esta tercera fase, también se caracterizaron las cáscaras liofilizadas de tres frutas. Con los resultados obtenidos en las tres primeras fases, se determinó el grado de correlación entre la actividad antioxidante vs. Contenido de compuestos bioactivos, ABTS vs. DPPH (extracto de naturaleza hidrófilo). Además se aplicó el análisis de componentes principales y análisis de cluster para clasificar las frutas acorde a sus características funcionales.

En la cuarta fase, se identificó y cuantificó mediante HPLC los principales ácidos fenólicos y carotenoides específicos de las frutas como compuestos antioxidantes (Figura 5.1).

En la quinta fase, se obtuvieron extractos lipófilos de la porción comestible de cada fruta y se determinó la actividad antioxidante *in vitro* mediante dos ensayos, DPPH[·] y el ABTS^{·+}. Con los datos obtenidos, se determinó el grado de correlación entre la actividad antioxidante vs. Carotenoides individuales, ABTS vs. DPPH (extracto de naturaleza lipófilos).

En la última fase, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de frutas tropicales de la Península de Yucatán.

Con toda esta información científica generará datos que permitan dar valor agregado a las frutas tropicales de la región con miras a favorecer el comercio de estas frutas a mercados especiales donde hacen énfasis al consumo de alimentos con propiedades benéficas a la salud humana.

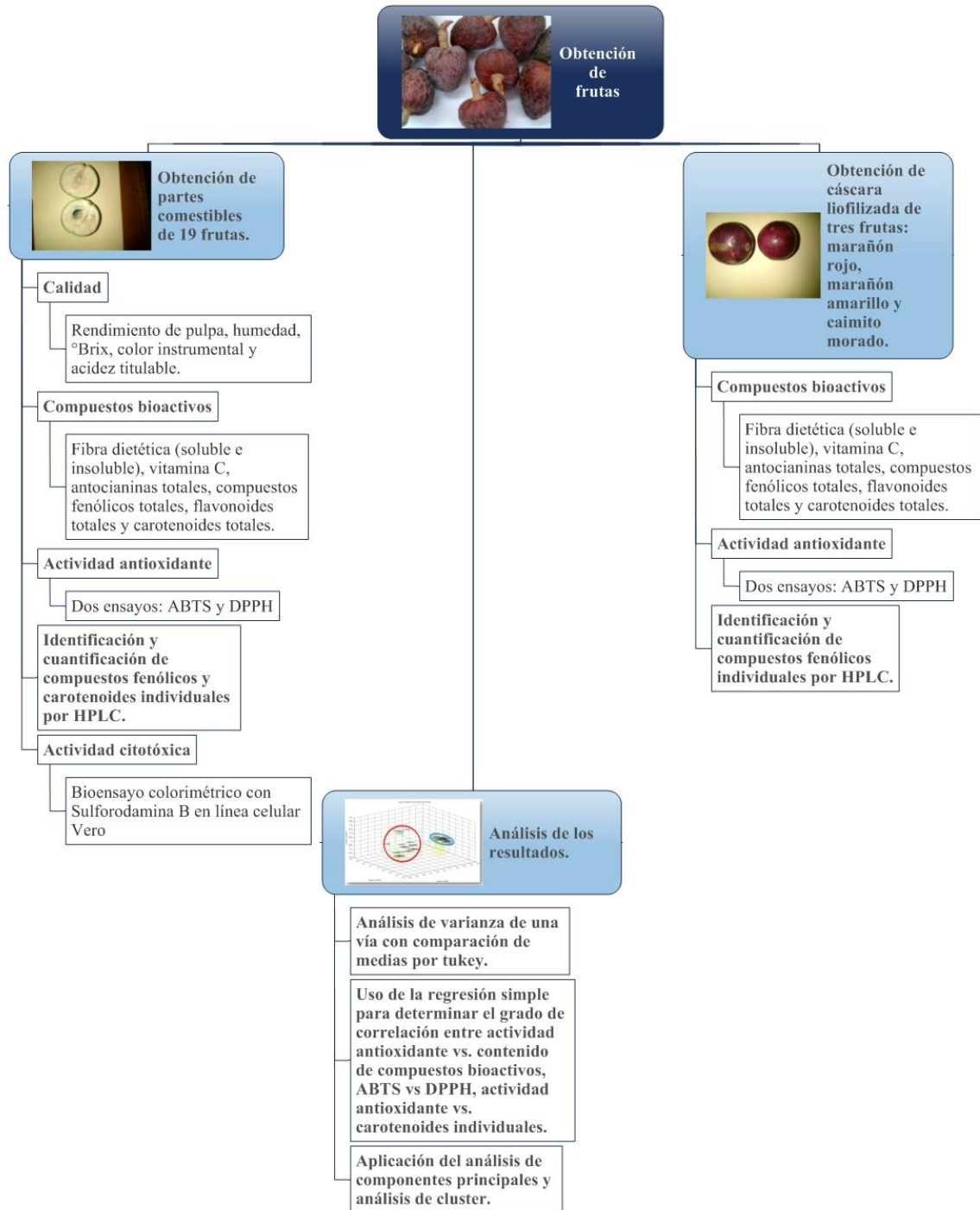


Figura 5.1. Estrategia general de trabajo

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Víctor M. Moo-Huchin^{a*}, Iván Estrada-Mota^a, Raciél Estrada-León^a, Luis Cuevas-Glory^b, Elizabeth Ortiz-Vázquez^b, María de Lourdes Vargas y Vargas^b, David Betancur-Ancona^c, Enrique Sauri-Duch^b

^aInstituto Tecnológico Superior de Calkiní, Av. Ah-Canul, C.P. 24900, Calkiní, Campeche, México. ^bInstituto Tecnológico de Mérida, C.P. 97118, km 5 Mérida-Progreso, Mérida, Yucatán, México. ^cFacultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, periférico Norte Km 33.5, tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203, Mérida, Yucatán, México.

Publicado en Food Chemistry 152(1): 508-515 (2014).

***Corresponding author**

E-mail address: vmoo@itescam.edu.mx

6.1.1 Abstract

The aim to the study was to determine the physicochemical composition, bioactive compounds and antioxidant activity of fruits from Yucatan, Mexico such as star apple, cashew, mombin, mamey sapote, white sapote, sugar apple, sapodilla, dragon fruit, nance, ilama, custard apple, mamoncillo and black sapote. The physicochemical characteristics were different between fruits and were good sources of bioactive compounds. The edible part with the highest values of antioxidant activity were mamoncillo, star apple, mombin, cashew, white sapote, ilama, custard apple, sugar apple, and nance. Total soluble phenols content showed a correlation with antioxidant activity by ABTS ($R=0.52$, $P\leq 0.05$) and DPPH ($R=0.43$, $P\leq 0.05$). A high correlation was obtained between the two assays (ABTS and DPPH) used to measure antioxidant activity in the tropical fruit species under study ($R=0.82$, $P\leq 0.05$). The results show promising perspectives for the exploitation and use of tropical fruits studied with significant levels of nutrients and antioxidant activity.

Keywords: tropical fruits; bioactive compounds; antioxidant activity; ABTS and DPPH methods

6.1.2. Introduction

Nowadays, the consumption of tropical fruits is increasing in both domestic and international markets due to growing recognition of its nutritional and therapeutic value. Therefore, fruits play important roles both economically, through commercialization of their products and nutritionally, through their consumption (Cardoso, Martino, Moreita, Ribeiro, & Sant'ana, 2011). In Yucatan, Mexico there are a large number of underexploited tropical fruits (star apple, cashew, mombin, mamey sapote, white sapote, sugar apple, sapodilla, dragon fruit, nance, ilama, custard apple, mamoncillo and black sapote), which is of potential interest to agroindustry and constitute a possible source of income for the local population in the near future. These fruits represent an opportunity for local growers to gain access to special markets where consumers appreciate the exotic character of such products and the presence of bioactive compounds capable of preventing some diseases (Alves, Brito, Rufino, & Sampaio, 2008).

The uncontrolled production of oxygen-derived from free radicals, is involved in the onset of many diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, as well as in the degenerative process associated with aging, including Parkinson's and Alzheimer's diseases (Ali et al., 2008).

Recent epidemiological studies indicate that the frequent consumption of fruits is associated with a lower risk of chronic diseases (Yahia, 2010). The combination of vitamins, minerals, phenolic antioxidants and fiber seems to be responsible for these effects (Saura-Calixto & Goñi, 2006).

Fruits have been the subject to several studies conducted around the world, reporting in their nutritional values, data especially in relation to the evaluation of antioxidant activity (Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008; Almeida et al., 2011; Contreras-Calderón, Calderón-Jaimes, Guerra-Hernández, & García-Villanova., 2011).

Several methods are used to measure the antioxidant activity of biological material. The most commonly used are those involving chromogen compounds of a radical nature which stimulates reductive oxygen species, because to their ease, speed and sensitivity, and

the presence of antioxidants leads to the disappearance of the radical chromogens. The most widely used methods being the ABTS and DPPH (Ali et al., 2008; Almeida et al., 2011).

In this study, it was determined the physicochemical composition, bioactive compounds content and activity antioxidant of tropical fruits from Yucatan, Mexico.

6.1.3. Materials and methods

6.1.3.1. Chemical reagents

Ascorbic acid, gallic acid, Folin-Ciocalteu reagent, quercetin, β -carotene, ABTS, DPPH and Trolox, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). All the other chemicals used were in an analytical grade.

6.1.3.2. Samples

Nineteen fruits, which are commonly cultivated and consumed in Yucatan, Mexico, were chosen for this study (Table 6.1). About 5 kg of each species fruits (except sapodilla) were purchased at eating ripeness from the local markets in Yucatan, Mexico during 2012.

5 kg of sapodilla fruits were harvested from a single tree from an orchard located in the municipality of Cansahcab, in Yucatan, Mexico and were identified according to quality based on the stage of physiological maturity and determined by the absence of latex. The fruits were stored at 25°C to reach an eating ripeness according to Moo-Huchin et al. (2013).

The fruits without blemishes or damage were selected and sent to the laboratory for edible parts extraction. After the fruits had been cleaned with tap water, edible part were extracted manually with a knife and then were then mixed in a blender, stored in sealed plastic bags at -20°C until the time of analyses (vitamin C, total anthocyanin, total soluble phenols, total flavonoids, total carotenoids, total dietary fibre, soluble dietary fibre, insoluble dietary fibre and antioxidant activity). In addition, representative samples were physically and chemically characterized by measuring moisture (g/100 g), total soluble solids content (TSS, °Brix), lightness (L^*), hue angle (h), and titratable acidity (g of citric acid/100 g).

Table 6.1. List of the species tropical fruits from Yucatan included in the study and parts analyzed.

English name	Common name	Scientific name	Used edible part
Green star apple	Caimito verde	<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	Pulp
Purple star apple	Caimito morado		
Yellow cashew	Marañón amarillo	<i>Anacardium occidentale</i>	Pulp
Red cashew	Marañón rojo		
Green-yellow mombin	Ciruela verde-amarillo	<i>Spondias purpurea</i> L.	Pulp+peel
Red mombin	Ciruela roja		
Mamey sapote	Mamey	<i>Pouteria sapota</i> Jacq.	Pulp
White sapote	Zapote blanco	<i>Lucuma hypoglauca</i> Stanley	Pulp
Green sugar apple	Saramuyo verde	<i>Annona squamosa</i> L.	Pulp
Purple sugar apple	Saramuyo morado		
Sapodilla	Chicozapote	<i>Manilkara sapota</i> L.	Pulp
Dragon fruit	Pitahaya	<i>Hylocereus undatus</i> Haworth	Pulp+seed
Yellow nance	Nance amarillo	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Pulp+peel
Green nance	Nance verde		
Red nance	Nance rojo		
Ilama	Anona	<i>Annona diversifolia</i>	Pulp
Custard apple	Anona roja	<i>Annona reticulata</i>	Pulp
Mamoncillo	Uaya	<i>Melicoccus bijugatus</i> (Jacq.)	Pulp
Black sapote	Zapote negro	<i>Diospyros digyna</i>	Pulp

6.1.3.3. Analysis of bioactive compounds

6.1.3.3.1. Total soluble phenols (TSP) and total flavonoids determination

TSP and flavonoid compounds were extracted using 1 g of edible part of each fruit which was homogenized in 10 mL of 80% methanol. The homogenated was sonicated for 30 min at 40 °C and centrifuged in an eppendorf centrifuge, model 5702 R, at 1200 x g for 10 min at room temperature. The supernatant was collected, and the sediment was subjected to an additional extraction using the same procedure. Both supernatants were mixed and stored at -20°C until analysis. Concentrations of total soluble phenols were measured by the methods described by Singleton and Rossi (1965) modified by González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Martínez-Téllez, Gardea, & Ayala-Zavala (2007). 50 µL of each extract were mixed with 3 mL of H₂O, 250 µL of 1N Folin-Ciocalteu reagent. After 8 min of equilibrium, 750 µL of 20% Na₂CO₃ and 950 µL of H₂O were added to the extracts; after incubation for 30 min at room temperature, the absorbance was read at 765 nm with an UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total soluble phenols compound was calculated using a standard curve of aqueous solutions of gallic acid (0-10 ppm) and expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g fresh weight (FW).

Flavonoid content was determined based on the methods described by Zhishen, Mengcheng, and Jianming (1999) modified by González-Aguilar *et al.* (2007). 1 mL of flavonoids extracted of each sample was mixed and equilibrated with 4 mL of H₂O, 300 µL 5% NaNO₂ by 5 min. After equilibrium 300 µL of 10% AlCl₃ (methanolic solution) were added; the mixture were reposed by 1 min and then 2 mL of 1 M NaOH were added. The last volume was made up to 10 mL with H₂O, stirred, and lectures were taken. The mixture absorbance was determined at 415 nm, using a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total flavonoids of fruits was calculated using a standard curve of quercetin (0-60 ppm) and expressed as mg quercetin equivalents (QE)/100 g of FW.

6.1.3.3.2. Vitamin C

For vitamin C determination the titrimetric method with 2,6-dichlorophenolindophenol reagent (AOAC-Association of official analytical chemists, 1995) with some modifications

was applied. 5 g of homogenized edible part fruits was mixed with 100 mL of 4% oxalic acid solution. The mixture was homogenized and filtered. 5 mL of filtrated solution were diluted to 10 mL with 4% oxalic acid solution. This solution was titrated with 0.01% of 2,6-dichlorophenol-indophenol solution. The final point was considered when the solution had a pink colour for 15 s. The calibration of 2,6-dichlorophenolindophenol solution was performed with 0.05% ascorbic acid solution. Results were expressed as mg of ascorbic acid equivalents per 100 g of FW.

6.1.3.3.3. Total anthocyanins

The anthocyanins were extracted from 1 g of edible parts of each fruit with 30 mL of 95% ethanol/1.5 M HCL (85:15, v:v). The extract was transferred to a 50 mL volumetric flask, completing the volume with 1.5 M ethanol-HCL and stored for 12 h at 4 °C (Francis, 1982). After filtration, the absorbance was measured in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11 at 535 nm. The total anthocyanin content was determined applying the Lambert-Beer law, calculated as mg/100 g of FW, through the formula: $A_{535} \times \text{dilution factor} / E_{1\text{cm},535}^{1\%}$; where A_{535} is the absorbance in the diluted sample and $E_{1\text{cm},535}^{1\%}$ is the values factor (98.2) of molar absorptivity for the acid-ethanol solvent and it refers to the absorption of a mixture of cranberry anthocyanins in acid-ethanol, measured in a 1 cm-cell at 535 nm, at a concentration of 1% (w/v).

6.1.3.3.4. Total carotenoids

Extraction of carotenoids was carried out according to the method developed by Chen, Tai, and Chen (2004). 10 g of edible parts of each fruit were mixed with 50 mL of hexane:acetone:ethanol (70:15:15, v/v/v) containing 0.05% BHT. The mixture was stirred for 1 h using an orbital shaker. Afterwards, 5 mL of 40% KOH in methanolic solution were added, and the solution was saponified at 25°C in the dark for 2 h. Then, 30 mL of hexane were added, the mixture shaken vigorously and the upper layer was collected. The lower layer was extracted twice and the supernatant was also collected and filtered through sodium sulphate powder to remove traces of water. The supernatant obtained was pooled and taken for

analysis. Total carotenoids content was determined spectrophotometrically at 450 nm in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. A calibration curve (0-50 ppm) was prepared using β -carotene in hexane as the standard and hexane as the blank. The results were expressed as mg β -carotene/100 g of FW.

6.1.3.4. Dietary fiber

An enzymatic-gravimetric procedure, AOAC Method 991.43, was used for the determination of DF contents (AOAC-Association of official analytical chemists, 2000). Edible part of each fruit was dried in a hot air oven at 50 °C for 72 h. The dried samples were then powdered in cyclotech mill using 100-mesh size to get a fine powder. In brief, dried powder edible parts were first gelatinized with heat stable α -amylase (Sigma-Aldrich, Germany). After gelatinization, the samples were digested with protease and amyloglucosidase (Sigma-Aldrich, Germany) to remove protein and starch in the samples. Subsequently, insoluble dietary fiber (IDF) was filtered and washed with 10 mL warm distilled water. The filtrate and washed water were combined and added with four volumes of 95% ethanol to precipitate the soluble dietary fiber (SDF). The residues were weighed after drying at 105°C in a hot air oven (SHELL LAB 1350FX-10). Determination of residual protein (as Kjeldahl N x 6.25) and ash contents was carried out for corresponding corrections. Total dietary fiber (TDF) was calculated as the sum of IDF and SDF.

6.1.3.5. Extracts preparation for antioxidant capacity (AOC) analysis

Hydrophilic extracts were obtained as reported by Yahia, Gutierrez-Orozco, and Arvizu-de Leon (2011) with some modifications. 5 g of edible parts of each fruit were homogenized in 10 mL of acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v), sonicated for 30 min in an ultrasonic bath Grant XB3 (Boekel Scientific, Inc, Pennsylvania Blvd.) and then centrifuged for 15 min at 15,000 g. The supernatant was collected, and the sediment was subject to an additional extraction using the same procedure and both supernatants were mixed, these constituted the extracts for AOC analysis. According to Kajdžanoska, Petreska, Stefova (2011), this extraction method enables the collection of soluble phenols, flavonoid

glycosides, procyanidins, and certain oligomeric and polymeric proanthocyanidins from strawberries.

DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was conducted according to the Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) technique with some modifications. The stock solution was prepared by mixing 2.5 mg of DPPH radical with 100 mL of methanol. The solution absorbance was adjusted at 0.7 ± 0.02 in 515 nm using an UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. 3.9 mL of DPPH radical were placed in a test tube and 100 μ L of the sample extract or standard were added (methanol was used as blank). The decrease in absorbance at 515 nm was measured at 1 min intervals for the first 10 min, and then at 5 min intervals until stabilization. Based on preliminary study, the times required to obtain DPPH readings of each fruit were as follows: 30 min (for custard apple, ilama, purple star apple, green star apple, green-yellow mombin, red cashew, red nance, green nance, dragon fruit, purple sugar apple, green sugar apple and white sapote); 90 min (for sapodilla); 25 min (for red mombin and yellow nance); 15 min (for mamey sapote and yellow cashew); 35 min (for mamoncillo); 60 min (for Black sapote). Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as standards and results (AOC) are expressed as μ M Trolox equivalents/100 g of FW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of FW.

The ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) assay was conducted according to Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, and Milner (1993) ABTS \cdot^+ cation was generated through the interaction of 19.2 mg of ABTS dissolved in 5 mL of HPLC-grade water and 88 μ L of 0.0378 g/mL potassium persulfate ($K_2S_2O_8$). The cation was incubated in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS activated radical was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After the addition of 30 μ L of sample or standard to 2970 μ L of diluted ABTS solution, absorbances were recorded 6 min after mixing. Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as a standard and results (AOC) are expressed as μ M Trolox equivalents/100 g of FW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of FW.

6.1.3.6. Statistical analysis

All extraction assays were carried out in triplicate and a duplicate of each extract was analyzed. Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). To determine the correlation between the antioxidant activity methods and the contribution of the bioactive compounds to antioxidant capacity, Pearson's correlation coefficients were calculated. All analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2000.

6.1.4. Results and discussion

Table 6.2 presents the physicochemical characteristics of 19 economically important fruits in the local market of Yucatan. The fruits were sorted (high to low) according to the content of total soluble solids. Some of the fruits selected for the present study are unknown outside their natural range, some are barely known and some are well known and marketed in Mexico. However, there are little data available on the physicochemical characteristics of these fruits grown in Yucatan, Mexico, which further highlights the importance of this work. The values obtained for edible part yield, moisture, total soluble solids, color and titratable acidity differed among the fruits under study. The yield of edible parts for each fruit varied from 36.7% (Green sugar apple) to 80.0% (black sapote). All the fruits showed a high humidity content between 71.67% (purple sugar apple) and 87.50% (yellow cashew). With regard to total soluble solids, yellow nance obtained the lowest level (8.95 °Brix) and black sapote the highest (22.33 °Brix). According to De Souza, Pereira, Queiroz, Borges, and Carneiro (2012), the fruits with the highest possibility of consumer acceptance are those with high levels of soluble solids, such as those reported for the fruits analyzed in this work. Regarding the color of the edible part, lightness L^* varied from 20.67 (black sapote) to 73.92 (red cashew), indicating a dark and light coloring for these fruits, respectively. The hue angle h , which represents the color tone, also varied; from 47.22 (mamey sapote) to 348.42 (purple star apple). The values of h obtained for most of the fruits in this study correspond to red and yellow tones.

Another important chemical characteristic of the fruits is titratable acidity, since high acidity values can influence the taste (Pereira et al., 2013). Of all the fruits analyzed, sapodilla and green star apple showed the lowest values of acidity, 0.19% and 0.20%, respectively, (expressed as percentage of citric acid), while mamoncillo obtained a high value (1.87%). According to Paiva, Manica, Fioravanco and Kist (1997), fruits with citric acid levels ranging from 0.08% to 1.95% can be classified as mild in flavour and are well-accepted by consumers. All the fruits evaluated in this work fell within this category.

According to the results obtained, the physicochemical characteristics obtained for the fruits analyzed in this work are similar to those reported for other tropical fruits from countries such as Ecuador (Vasco et al., 2008) and Brazil (Rufino, Alves, Brito, Pérez-Jiménez, Saura-Calixto, & Mancini-Filho, 2010; De Souza *et al.*, 2012).

Table 6.2. Some physicochemical characteristics of the edible parts of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	Yield of edible parts (%)	Moisture (g/100 g)	Total soluble solids (°Brix)	Lightness (L*)	Tone (°hue)	Titratable acidity (g of citric acid/100 g FW)
Black zapote	80.0±1.0	75.72±0.45	22.33±2.44	20.67±0.60	337.98±2.87	0.91±0.021
Purple sugar apple	37.0±1.0	71.67±1.37	21.12±0.10	67.87±1.78	99.39±1.14	0.37±0.094
Green sugar apple	36.7±1.15	73.0±1.10	21.10±0.13	65.40±0.93	95.07±0.47	0.36±0.098
Mamey sapote	66.0±1.0	74.99±0.63	19.89±0.18	43.43±0.08	47.22±0.07	1.03±0.002
Ilama	45.3±0.58	79.87±0.03	19.38±0.40	55.20±0.38	76.12±0.31	0.52±0.004
Dragon fruit	57.3±2.52	82.83±0.75	18.22±0.05	43.28±3.47	258.28±5.78	1.0±0.025
Custard apple	44.0±1.0	77.47±0.02	17.75±3.38	58.32±0.01	70.42±0.08	0.66±0.005
White zapote	47.2±0.72	79.23±0.41	15.38±0.39	67.53±1.45	85.66±0.59	0.73±0.001
Sapodilla	69.0±1.0	82.17±0.75	15.21±0.06	43.44±0.96	68.97±2.31	0.19±0.007
Mamoncillo	38.7±2.31	83.67±0.82	13.91±0.62	50.42±4.56	60.76±3.16	1.87±0.007

Green star apple	49.0±1.0	83.51±0.05	13.45±0.02	64.68±4.14	93.37±0.51	0.20±0.008
Red mombin	69.0±1.0	84.53±0.34	12.76±0.67	54.76±4.70	81.30±3.48	0.69±0.023
Purple star apple	47.3±1.15	84.67±0.06	11.80±0.06	54.77±0.55	348.42±0.84	0.26±0.004
Red cashew	57.3±1.53	85.80±0.67	11.00±0.24	73.92±0.07	87.90±0.35	0.48±0.009
Yellow cashew	58.0±1.0	87.50±0.84	10.81±0.74	68.85±0.86	87.20±0.30	0.28±0.005
Green nance	60.7±0.58	79.83±1.17	9.79±0.01	49.95±2.35	94.60±0.50	0.31±0.008
Red nance	59.7±0.58	79.67±0.82	9.78±0.16	55.83±2.82	69.16±1.06	0.68±0.025
Green-yellow mombin	70.6±0.58	82.93±1.20	9.62±0.05	64.41±0.90	100.46±0.52	1.22±0.007
Yellow nance	60.3±0.58	79.50±0.55	8.95±0.02	70.25±0.23	87.52±0.45	0.47±0.008

The values are expressed as mean± standard deviation (n=6)

In addition, numerous epidemiological studies have demonstrated the effect of the dietary fiber found in fruits on intestinal health and in the prevention of cardiovascular diseases, cancer, obesity and diabetes (Anderson et al., 2009). Table 6.3 shows total dietary fiber content (TDF), insoluble dietary fiber (IDF) and soluble dietary fiber (SDF) for the edible part of the fruits under study.

Total dietary fiber of the fruits varied from 11.69 g/100 g DW (mamoncillo) to 50.62 g/100 g DW (white sapote); insoluble dietary fiber ranged from 10.15 g/100 g DW (green-yellow mombin) to 41.86 g/100 g DW (white sapote) and soluble dietary fiber from 0.31g/100 g DW (mamoncillo) to 10.17 g/100 g DW (black sapote). These results indicate that the fruits under study showed a higher insoluble dietary fiber content in comparison with soluble dietary fiber content.

Table 6.3. Dietary fiber contents of the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	Total dietary fiber (g/100 g DW)	Soluble fiber (g/100 g DW)	Insoluble fiber (g/100 g DW)
Custard apple	40.41±0.21	5.41±0.21	35.00±0.42
Ilama	27.90±1.04	0.71±0.69	27.20±1.73
Purple star apple	35.68±0.83	2.72±0.17	32.96±1.00
Green star apple	30.78±0.42	7.68±0.14	23.10±0.28
Sapodilla	40.58±0.56	0.73±0.07	39.85±0.64
Red mombin	18.11±0.08	7.07±0.20	11.04±0.12
Green-yellow mombin	17.54±1.06	7.39±0.42	10.15±1.49
Mamey sapote	21.50±1.13	2.37±1.03	19.13±0.12
Yellow cashew	25.42±3.16	1.28±0.76	24.14±2.40
Red cashew	28.26±0.72	4.61±0.22	23.65±0.49
Yellow nance	46.33±0.92	6.48±0.57	39.85±0.35
Red nance	46.33±0.88	6.48±0.50	39.85±0.30
Green nance	43.34±0.15	7.64±0.58	35.70±0.42
Dragon fruit	44.58±0.77	6.89±0.50	37.70±1.27
Purple sugar apple	18.63±0.21	6.93±0.50	11.70±0.28
Green sugar apple	26.15±0.46	6.91±0.01	19.24±0.47
Mamoncillo	11.69±1.19	0.31±0.01	11.39±1.19
White sapote	50.62±3.73	8.76±2.05	41.86±2.55
Black sapote	20.44±1.86	10.17±0.98	10.27±0.88

Values are expressed as mean± standard deviation (n=6)

Dietary guidelines recommend a minimum daily intake of 25 g of DF, equivalent to 12.5 g of DF per 1000 calories consumed (Marlett, McBurney, & Slavin, 2002). In this regard,

dietary intake between 50 and 200 g from fruits studied (dry weight) can provide the recommended amount of total dietary fiber per day.

Values of dietary fiber obtained from the fruits evaluated are comparable to those reported by Jiménez-Escrig, Rincón, Pulido, & Saura-Calixto (2001) for guava (SDF=1.77 g/100 g DW, IDF=47.65 g/100 g DW, TDF=49.42 g/100 g DW), which is a fruit considered as good source of dietary fiber. It is important to note that the value of soluble fiber for guava is lower than those obtained for all fruits studied except ilama, sapodilla, yellow cashew and mamoncillo.

The results obtained for the amounts of vitamin C, total anthocyanins, total soluble phenols, total flavonoids and total carotenoids in the fruits under study are shown in Table 6.4.

Vitamin C is recognized as an important antioxidant compound of natural origin (Almeida et al., 2011). In this study, vitamin C content (expressed as mg of ascorbic acid/100 g fresh weight) varied from 21.43 to 148.41 mg/100 g. The vitamin C content of yellow nance, green nance, red cashew and red nance (116.67-148.41 mg/100 g) was higher than all the other fruits evaluated, while the lowest contents were found in purple star apple, sapodilla, custard apple, green star apple, ilama, mamey sapote, green-yellow mombin, red mombin and dragon fruit (21.43-37.3 mg/100 g). The edible part of mamoncillo, purple sugar apple, green sugar apple, black sapote, white sapote and yellow cashew presented moderate quantities of vitamin C. The vitamin C content of the fruits evaluated in this work was higher than those reported for jackfruit (1.2 mg ascorbic acid/100 g fresh weight), murici (11.8 mg ascorbic acid/100 g fresh weight), sapodilla (3.9 mg ascorbic acid/100 g fresh weight), soursop (3.3 mg ascorbic acid/100 g fresh weight), umbu (18.4 mg ascorbic acid/100 g fresh weight) and abiu (7.05 mg ascorbic acid/100 g fresh weight) (Almeida et al., 2011; Rufino et al., 2010; Contreras-Calderón et al., 2011).

Table 6.4. Content of bioactive compounds in the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	mg of vitamin C/100 g FW	Total anthocyanins (mg AT/100 g FW)	Total phenolic compounds (mg of GAE/100 g FW)	Total flavonoids (mg of quercetin/100 g FW)	Total carotenoids (mg of β -carotene/100 g FW)
Custard apple	23.02 \pm 1.94	1.55 \pm 0.01	358.25 \pm 17.04	418.24 \pm 3.73	2.25 \pm 0.40
Ilama	26.98 \pm 2.46	1.31 \pm 0.01	246.29 \pm 62.06	230.53 \pm 3.57	1.57 \pm 0.62
Purple star apple	21.43 \pm 4.99	3.24 \pm 0.02	14.91 \pm 0.19	35.76 \pm 1.46	2.97 \pm 0.64
Green star apple	26.19 \pm 2.61	0.18 \pm 0.07	18.10 \pm 4.46	1.25 \pm 0.61	4.25 \pm 1.45
Sapodilla	21.43 \pm 2.61	1.16 \pm 0.02	15.35 \pm 0.73	0.18 \pm 0.14	1.69 \pm 0.06
Red mombin	36.51 \pm 2.46	1.77 \pm 0.10	115.53 \pm 6.41	38.31 \pm 18.57	17.16 \pm 0.89
Green-yellow mombin	33.33 \pm 3.01	1.67 \pm 0.09	130.73 \pm 10.08	152.35 \pm 4.08	25.07 \pm 0.04
Mamey sapote	29.37 \pm 3.58	5.57 \pm 0.07	14.21 \pm 3.08	65.24 \pm 4.49	36.12 \pm 1.24
Yellow cashew	92.06 \pm 4.92	1.17 \pm 0.01	186.29 \pm 18.19	59.27 \pm 10.0	13.99 \pm 0.75
Red cashew	131.75 \pm 4.92	1.84 \pm 0.03	287.28 \pm 5.38	344.61 \pm 4.30	11.62 \pm 0.67
Yellow nance	116.67 \pm 3.98	0.37 \pm 0.02	240.76 \pm 16.61	127.27 \pm 12.31	14.54 \pm 0.42
Red nance	148.41 \pm 3.58	0.91 \pm 0.01	266.26 \pm 13.39	131.98 \pm 7.41	14.22 \pm 0.29
Green nance	116.67 \pm 4.99	1.17 \pm 0.11	195.35 \pm 23.80	98.80 \pm 1.83	12.82 \pm 0.28
Dragon fruit	37.30 \pm 3.58	0.36 \pm 0.01	58.89 \pm 11.79	25.51 \pm 5.26	2.93 \pm 0.73
Purple sugar apple	50.0 \pm 3.98	1.15 \pm 0.01	81.78 \pm 19.31	78.73 \pm 1.55	1.30 \pm 0.01
Green sugar apple	50.79 \pm 4.92	0.47 \pm 0.02	207.60 \pm 17.85	200.92 \pm 3.83	1.44 \pm 0.11
Mamoncillo	44.44 \pm 3.89	0.32 \pm 0.01	295.35 \pm 17.54	275.76 \pm 8.08	3.85 \pm 0.08
White sapote	64.29 \pm 4.99	1.91 \pm 0.01	373.27 \pm 26.68	341.88 \pm 1.43	15.86 \pm 2.40
Black sapote	59.52 \pm 7.22	14.19 \pm 0.01	158.48 \pm 1.02	376.04 \pm 72.29	7.99 \pm 0.38

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

The evidence also indicates that anthocyanins are responsible for the range of colors, such as red, blue and purple, observed in fruits (Rufino et al., 2010) and are particularly abundant in strawberries, red grapes, raspberries, cherries, berries and cranberries (Wu, Beecher, Holden, Haytowitz, Gebhardt, & Prior, 2006). Moreover, interest in the study of these pigments has intensified due to their possible pharmacological and therapeutic properties (Garzón, 2008). In this regard, among the fruit species studied herein, black sapote exhibited a high content of total anthocyanins (TA) (expressed as mg TA/100g fresh weight) (14.19

mg/100 g), followed by mamey sapote (5.57 mg/100 g) and purple star apple (3.24 mg/100 g). The remaining fruits showed amounts below 2.0 mg TA/100 g. According to these results, therefore, the total anthocyanin content of the fruits evaluated is similar to that of other tropical fruits (Almeida *et al.*, 2011; Rufino *et al.*, 2010).

The phenolic compounds found in fruits and vegetables have attracted much interest due to their potential as antioxidants. In this work, the content of TSP (expressed as mg gallic acid equivalents /100 g fresh weight) varied from 14.21 to 373.27 mg/100 g. TSP content of the fruits under study was higher in green sugar apple, yellow nance, ilama, red nance, red cashew, mamoncillo, custard apple and white sapote (>200 mg/100 g), but lower in mamey sapote, purple star apple, sapodilla and green star apple (<20 mg/100 g). The remaining fruits showed intermediate amounts of TSP (between 20 and 200 mg/100 g). TSP content of the fruits evaluated in this work was similar to that found in mombin, jackfruit, mangaba, murici, papaya, pineapple, sapodilla, soursop, sugar apple, tamarind, and umbu with values ranging from 13.5 to 159.9 mg gallic acid equivalents /100 g fresh weight (Almeida *et al.*, 2011); abiu, cassabanana, coastal sapote, macadamia and yellow mombin (from 15.7 to 83.0 mg gallic acid equivalents /100 g) (Contreras-Calderón *et al.*, 2011) and in 24 cultivars of Italian sweet cherry (from 84.96 to 162.21 mg gallic acid equivalents/100 g) (Ballistreri, Continella, Gentile, Amenta, Fabroni, & Rapisarda, 2012).

Flavonoids have been demonstrated to have antioxidant activity as well as a positive effect in the prevention of cardiovascular disorders and diseases caused by free radicals (Yao *et al.*, 2004). In this work, the highest contents of total flavonoids were found in white sapote, red cashew, black sapote and custard apple (341.88-418.24 mg quercetin equivalents /100 g fresh weight), while the lowest were observed in sapodilla, green star apple, dragon fruit, purple star apple, red mombin, yellow cashew, mamey sapote, purple sugar apple and green nance (0.18-98.80 mg quercetin equivalents /100 g fresh weight). The remaining fruits showed moderate amounts of total flavonoids between 127.27 and 275.76 mg quercetin equivalents /100 g fresh weight. The total flavonoid contents of the fruits analyzed in this work were

similar to reports for berries (250.1 mg quercetin equivalents /100 g fresh weight) (Lin & Tang, 2007).

Carotenoids are not just vitamin A precursors; they also show a significant level of antioxidant activity (Rufino et al., 2010). In this study, the content of total carotenoids (expressed as mg of β -carotene/100 g fresh weight) obtained in mamey sapote was higher (36.12 mg/100 g) than those obtained in all the other fruits; lower values were found in green-yellow mombin (25.07 mg/100 g) and red mombin (17.16 mg/100 g). Among the other fruit species evaluated, black sapote, red cashew, green nance, yellow cashew, red nance, yellow nance and white sapote showed moderate values of β -carotene (7.99 mg/100 g), while purple sugar apple, green sugar apple, ilama, sapodilla, custard apple, dragon fruit, purple star apple, mamoncillo and green star apple presented values below 5 mg/100 g. The high and moderate β -carotene contents of the fruits studied in this work were higher than those reported for carrot (5.18 mg of β -carotene/100 g fresh weight) (Campos, Pinheiro-Sant'ana, Souza, Stringheta, & Chaves, 2006) and for five Brazilian fruits from Cerrado (0.57-1.31 mg of β -carotene/100 g fresh weight) (De Souza et al., 2012).

The antioxidant capacity of food is determined by a mixture of different antioxidants with different action mechanisms; therefore, the antioxidant capacity of food products must be evaluated with a variety of methods which can address the different mechanisms (Pérez-Jiménez et al., 2008). The most widely used methods are the ABTS and DPPH radicals (Ali et al., 2008; Almeida *et al.*, 2011; Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005). To this effect, two oxidant systems have been selected in the present work, both of which are based on measuring color degradation in DPPH or ABTS. The ABTS method is generally indicated for evaluating the antioxidant activity of hydrophilic compounds and the DPPH method is commonly used for aqueous/organic extracts with hydrophilic and lipophilic compounds (Rufino et al., 2010). Table 6.5 shows the antioxidant capacity of fruits cultivated in Yucatan, determined as Trolox equivalents (TEAC) (μ M Trolox/100 g fresh weight) and vitamin C equivalents (VCEAC) (mg of vitamin C/100 g fresh weight) using the ABTS and DPPH assays.

In this work, the antioxidant activity of the fruits evaluated with the ABTS assay was higher in red cashew, green-yellow mombin, yellow cashew, green sugar apple, purple star apple, custard apple, purple sugar apple, white sapote, red nance, yellow nance, red mombin, mamoncillo, green nance, ilama and green star apple (values between 618.47 and 684.78 μM Trolox/100 g fresh weight and values between 180.48 and 199.98 mg of vitamin C/100 g fresh weight), while black sapote obtained a moderate value of antioxidant activity (559.78 μM Trolox/100 g fresh weight and 163.21 mg of vitamin C/100 g fresh weight). Dragon fruit, mamey sapote and sapodilla exhibited low antioxidant activity (values from 359.69 to 404.75 μM Trolox/100 g fresh weight and values of 104.36 to 117.62 mg of vitamin C/100 g fresh weight).

On the other hand, the antioxidant activity of the fruits evaluated with the DPPH assay was higher in mamoncillo, green star apple, red mombin, yellow cashew, green-yellow mombin, white sapote, ilama, purple sugar apple, purple star apple, green sugar apple, yellow nance, red nance, custard apple and green nance (values ranging from 322.36 to 380.66 μM Trolox/100 g fresh weight and values from 69.45 to 82.05 mg of vitamin C/100 g fresh weight). Among the fruits studied, the antioxidant activity values of dragon fruit, sapodilla and red cashew corresponded to a moderate level, while mamey sapote and black sapote presented low antioxidant activity. The TEAC and VCEAC values obtained in this work for all the fruits with both methods (DPPH and ABTS) coincide with similar results registered in a study of 11 tropical fruits from the Northeast region of Brazil (Almeida et al., 2011). Furthermore, TEAC values found in the present work are similar, inferior or superior, depending on the fruit under study, to other fruits rich in antioxidants, such as berries (430 and 710 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively), grape (700 and 920 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively), guava (590 and 820 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively), strawberry (430 and 1200 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively), acerola (4660 and 6760 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively), pineapple (530 and 340 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH

and ABTS, respectively) and mango (2430 and 1320 μM Trolox/100 g of the sample determined by DPPH and ABTS, respectively) (Kuskoski et al., 2005).

Table 6.5. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) in tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	TEAC ($\mu\text{M}/100 \text{ g FW}$)		VCEAC ($\text{mg}/100 \text{ g FW}$)	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Custard apple	649.69 \pm 21.89	376.30 \pm 2.29	189.66 \pm 6.44	81.10 \pm 0.49
Ilama	674.59 \pm 6.30	357.83 \pm 16.97	196.98 \pm 1.85	77.11 \pm 3.67
Purple star apple	649.63 \pm 15.73	366.56 \pm 8.04	189.64 \pm 4.63	79.00 \pm 1.74
Green star apple	684.78 \pm 6.90	332.72 \pm 6.58	199.98 \pm 2.03	71.69 \pm 1.42
Sapodilla	404.75 \pm 45.03	208.04 \pm 14.79	117.62 \pm 13.24	44.76 \pm 3.20
Red mombin	662.67 \pm 35.34	332.91 \pm 12.88	193.47 \pm 10.39	71.73 \pm 2.78
Green-yellow mombin	624.58 \pm 74.33	348.97 \pm 9.60	182.27 \pm 21.86	75.20 \pm 2.07
Mamey sapote	393.81 \pm 0.36	113.06 \pm 26.45	114.40 \pm 0.11	24.24 \pm 5.71
Yellow cashew	642.06 \pm 38.17	345.15 \pm 15.17	187.41 \pm 11.23	74.37 \pm 3.38
Red cashew	618.47 \pm 6.41	273.69 \pm 0.54	180.48 \pm 1.88	58.94 \pm 0.12
Yellow nance	661.79 \pm 35.0	372.91 \pm 4.05	193.22 \pm 10.29	80.37 \pm 0.88
Red nance	661.68 \pm 22.91	375.54 \pm 2.66	193.18 \pm 6.74	80.94 \pm 0.57
Green nance	669.48 \pm 16.12	380.66 \pm 6.96	195.48 \pm 4.74	82.05 \pm 1.50
Dragon fruit	359.69 \pm 14.61	198.97 \pm 14.12	104.36 \pm 4.30	42.80 \pm 3.05
Purple sugar Apple	655.71 \pm 31.55	357.88 \pm 22.01	191.43 \pm 9.28	77.12 \pm 4.75
Green sugar Apple	646.25 \pm 12.15	368.55 \pm 8.33	188.64 \pm 3.57	79.43 \pm 1.80
Mamoncillo	665.38 \pm 20.96	322.36 \pm 14.40	194.27 \pm 6.17	69.45 \pm 3.11
White sapote	661.03 \pm 18.94	349.21 \pm 19.70	192.99 \pm 5.57	75.25 \pm 4.26
Black sapote	559.78 \pm 23.53	118.44 \pm 13.32	163.21 \pm 6.92	25.40 \pm 2.88

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

The correlation coefficient between antioxidant activity (expressed in TEAC using ABTS and DPPH), vitamin C, total flavonoids, total soluble phenols and total carotenoids are presented in Table 6.6.

Table 6.6. Pearson's Correlation between different parameters of antioxidant capacity (expressed with TEAC using ABTS and DPPH) and ascorbic acid, total flavonoids, total phenolic compounds, total carotenoids and total anthocyanins.

Parameters	Correlation coefficient (R)	
	ABTS	DPPH
DPPH	0.82*	
Vitamin C	0.29	0.23
Total flavonoids	0.29	0.02
Total phenolic compounds	0.52*	0.43*
Total carotenoids	-0.17	-0.26
Total anthocyanins	-0.23	-0.66

*Significant with $P \leq 0.05$. Number of samples $n=19$

Antioxidant activity measured with ABTS and DPPH assays presented a positive correlation ($R=0.52$ and $R=0.43$, $P \leq 0.05$, respectively) with total soluble phenols. There was no significant relationship between antioxidant activity measured with both assay methods (ABTS and DPPH) and vitamin C, total flavonoids, total carotenoids and total anthocyanins. These results suggest that the total soluble phenols may be the most important contributors to the antioxidant activity in the fruits studied in this research. Several studies have reported a high correlation between phenolic compound content and antioxidant activity (Kuskoski et al., 2005; Almeida et al., 2011; Ikram et al., 2009; Rufino et al., 2010), while other authors have found no significant correlations (Sun & Ho, 2004; Amin, Norazaidah, & Emmy Hainida, 2006). Such significant or non significant correlations between phenolic compounds and antioxidant activity could be explained by the strong presence of a diversity of reducing agents such as ascorbic acid, minerals and carotenoids in the fruits (Deepa, Kaur, Singh, & Kapoor, 2006); as well as genetic, agroeconomical and environmental influences (Jagdish, Upadhyay, Kundan, Anant, & Mathura, 2007).

A high positive correlation was obtained between the two assays (ABTS and DPPH) used to measure antioxidant activity in the tropical fruit species under study ($R=0.82$, $P \leq 0.05$), indicating that the fruit extracts showed comparable activities in both assays. However, it is important to note that the DPPH assay presented lower values of antioxidant activity

(approximately 50%) in comparison with the ABTS assay; this result concurs with other studies carried out by Arnao (2000) and Almeida et al. (2011). Using these studies as reference, three possible explanations for this phenomenon can be put forward, firstly: the ABTS assay was measured at 734 nm while the DPPH assay was measured at 515 nm; at this wavelength in the visible region, the colored compounds such as anthocyanins and carotenoids present in the sample may have a spectrum which overlaps that of the DPPH at 515 nm, and thus interferes with the measurements. A second possible explanation is that it could be due to the reaction mechanisms of the DPPH and free radical scavengers, which are influenced by the structural conformation of antioxidants, thus, the small molecules with better accessibility to the active center of the radical apparently possess greater antioxidant activity through this method (Prior, Wu, & Schaich, 2005). A third possible explanation is that it is caused by the reversible reactions of DPPH with certain phenols, such as eugenol and its derivatives, resulting in low values of antioxidant activity (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997).

6.1.5. Conclusions

The results obtained for the physicochemical composition of the tropical fruits from Yucatan, Mexico did show variation, and can be compared with the values found in various conventional fruits.

The samples analyzed in this study had high bioactive compounds content and considerable levels of antioxidant activity.

There was a positive correlation between antioxidant activity and total soluble phenols by the ABTS and DPPH. The fruits studied had a comparable antioxidant activity in both, ABTS and DPPH.

The results indicate promising perspectives for the exploitation of the tropical fruits species from Yucatan, Mexico. Therefore, these fruits represent a major, real potential for the development of new products with functional properties.

6.1.6. Acknowledgments

The General Directorate of Higher Education and Technology and Foundation Pablo Garcia of the State of Campeche for the support provided.

6.1.7. References

Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15.

Almeida, M. M., Sousa, P. H, Arriaga, A. M., Prado, G. M., Magalhães, C. E., Maia, G. A., & Lemos, T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155-2159.

Alves, R. E., Brito, E. A., Rufino, M. S. M., & Sampaio, C. G. (2008). Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. *Acta horticulturae*, 773, 299-305.

Amin, I., Norazaidah, Y., & Emmy Hainida, K. I. (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach species (*Amaranthus* sp.). *Food Chemistry*, 94, 47-52.

Anderson, J. W., Baird, P., Davis, Jr. R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67,188-205.

AOAC Association of official analytical chemists (1995). Vitamin C (Ascorbic acid) in vitamin preparations and juices . 2,6-Dichloroindophenol titrimetric method. *Procedure No. 967.21. In AOAC Official Methods of Analysis* (pp.1058-1059). (15th ed). Arlington, VA: Association of the Official Analytical Chemists.

AOAC-Association of Official Analytical Chemists (2000). (17th ed). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD: AOAC.

Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 419-421.

Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., & Rapisarda, P. (2012). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, 140, 630-638.

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmitte Wissenschaft und-Technologie*, 30, 609-615.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.

Campos, F. M., Pinheiro-Sant'ana, H. M., Souza, P. M., Stringheta, P. C., & Chaves, J. B. P. (2006). Pró-vitaminas A em hortaliças comercializadas no mercado formal e informal de viçosa (MG), em três estações do ano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 33-40.

Cardoso, L. M., Martino, H. S. D., Moreita, A. V. B., Ribeiro, S. M. R., & Sant'ana, H. M. P. (2011). Cagaita (*eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*, 44, 2151-2154.

Chen, J. P., Tai, C. Y., & Chen, B. H. (2004). Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Chromatography A*, 1054, 261-268.

Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44, 2047-2053.

De Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Queiroz, F., Borges, S. V., & Carneiro, J. D. S. (2012). Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food chemistry*, 134, 381-386.

Deepa, N., Kaur, C., Singh, B., & Kapoor, H.C. (2006). Antioxidant capacity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 572-578.

Francis, F. J. (1982). Analysis of anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colors* (pp. 181-207). New York: Academic Press.

Garzón, G. A. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. A Review. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.

González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72, s197-s202.

Ikram, E. H. K., Eng, K. H., Jalil, A. M. M., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A., Nazri, H. S. M., Diton, N. A. M., Mokhtar, R. A. M. (2009). Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 388-393.

Jagdish, S., Upadhyay, A.K., Kundan, P., Anant, B., & Mathura, R. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 106-112.

Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489-5493.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.

Lin, J. Y., & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.

Marlett, J. A., McBurney, M. I., & Slavin, J. L. (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Journal of the American Dietetic Association*, 102, 993-1000.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I. A., Estrada-León, R. J. Ortiz-Vazquez, E., Pino-Alea, J., Quintanar-Guzman, A., Cuevas-Glory, L. F., & Sauri-Duch, E. (2013). Responses of sapodilla fruit (*Manilkara zapota* [L.] P. Royen) to postharvest treatment with 1-methylcyclopropene. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 1050-1058.

Paiva, M. C., Manica, I., Fioravanco, J. C., & Kist, H. (1997). Caracterização química dos frutos de quatro cultivares e de duas seleções de goiabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 19, 57-63.

Pereira, M. C., Steffens, R. S., Jablonski, A., Hertz, P. F., Rios, A. O., Vizzotto, M., & Flôres, S. H. (2013). Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 19-24.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.

Prior, R. L., Wu, X., & 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, 4290-4302.

Rufino, M. S., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94, 442-447.

Singleton, V. L., & Rossi J. A Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-58.

Sun, T., & Ho, C. H. (2004). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90, 743-749.

Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin., A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 111, 816-823.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069-4075.

Yahia, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Phytochemicals: Chemistry, Nutricional and Stability* (pp. 3–51): Wiley-Blackwell Chapter 1.

Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F., & Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Research International*, 44, 2210-2216.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoids content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-9.

6.2. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Víctor M. Moo-Huchin^{a*}, Mariela I. Moo-Huchin^b, Raciél J. Estrada-León^a, Luis Cuevas-Glory^c, Iván A. Estrada-Mota^a, Elizabeth Ortiz-Vázquez^c, David Betancur-Ancona^d, Enrique Sauri-Duch^c

^aInstituto Tecnológico Superior de Calkiní, Av. Ah-Canul, C. P. 24900, Calkiní, Campeche, México. ^bUniversidad Tecnológica del Poniente, Calle 29 Las Tres Cruces, C. P. 97800, Maxcanú, Mérida, México. ^cInstituto Tecnológico de Mérida, C. P. 97118, km 5 Mérida-Progreso, Mérida, Yucatán, México. ^dFacultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203 Mérida, Yucatán, Mexico.

Publicado en Food Chemistry 166 (1): 17-22 (2015).

*Corresponding author. Tel.: +52559968134870

E-mail addresses: vmoo@itescam.edu.mx

6.2.1. Abstract

The aim of this study was to determine the antioxidant compounds, antioxidant activity and content of individual phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits grown in Yucatan, México: purple star apple (*Chrysophyllum cainito* L.), yellow cashew and red cashew (*Anacardium occidentale*). The freeze-dried peels were good source of antioxidant compounds. ABTS and DPPH values in the peel from each fruit were 3050.95 to 3322.31 μM Trolox/100 g dry weight (DW) or 890.19 to 970.01 mg of vitamin C/100 g DW, and 1579.04 to 1680.90 μM Trolox/100 g DW or 340.18 to 362.18 mg of vitamin C/100 g DW, respectively. Six phenolic compounds were identified in the peel from the tropical fruits studied: ferulic, caffeic, sinapic, gallic, ellagic and myricetin. This study demonstrated that freeze-dried peels from purple star apple, yellow cashew and red cashew, could serve as potential sources of antioxidants for use in food and pharmaceutical industries.

Keywords: fruit peel, antioxidant compounds, antioxidant activity, phenolic compounds, *Anacardium occidentale*, *Chrysophyllum cainito* L.

6.2.2. Introduction

The human body produces reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion radical, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide by many enzymatic systems through oxygen consumption (Dina et al., 2009). In small amounts, these ROS can be beneficial as signal transducers and growth regulators (Hancock, Desikan, & Neill, 2001). However, during oxidative stress, large amounts of these ROS may favor some human disease conditions such as cancer, cardiovascular diseases, aging, and neurodegenerative diseases (Bagchi et al., 2000). Hence, certain amounts of exogenous antioxidants are constantly required to maintain an adequate level of antioxidants in order to balance the ROS. Recently, many epidemiological studies have suggested that the consumption of natural antioxidants such as polyphenol-rich food, fresh fruits, vegetables or teas has protective effects against the aforesaid diseases and this protection has been partly ascribed to the presence of several components, such as vitamins, flavonoids, anthocyanins and other phenolic compounds (Klimczak, Malecka, Szlachta, & Gliszczynska, 2007).

Apart from their biological properties, the natural antioxidants are also of interest in the cosmetic, pharmaceutical and especially in the food industries, since they can also be used as substitutes for synthetic antioxidants (Moure et al., 2001), providing protection against oxidative degradation from free radicals.

Many seasonal fruits are processed to make dried products, juices, jams, nectars, compotes, etc. The major by-products of such processing are the peel and the seed. According to many authors, the content of total phenolic compounds, total flavanol content and antioxidant activity is particularly high in the peel of some fruits, more so than in whole fruit (Ajila, Naidu, Bhat, & Prasada, 2007; Kunradi, Da Silva, Copetti, Da Valdemiro, Costa Nunes, & Fett, 2009).

Recently, Moo-Huchin et al. (2014) reported that in Yucatan, Mexico, there are a large number of tropical fruits that contain a considerable amount of bioactive compounds and antioxidant activity in the pulp such as the purple star apple, yellow cashew and red cashew. These fruits are consumed in fresh or in a processed form and the peel of the fruit is discarded

as waste of little value. Because fruit residues are inexpensive, easily available, and composed of bioactive molecules, the focus of research has shifted to such residues as a source of antioxidants, which could be used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Babbar, Oberoi, Uppal, & Patil, 2011). In this regard, the aim of this study was to determine the main antioxidant compounds, antioxidant activity and content of individual phenolic compounds of lyophilized peel from purple star apple (*Chrysophyllum cainito* L.), yellow cashew and red cashew (*Anacardium occidentale*) fruits grown in Yucatan, México. To the best of our knowledge, this is the first paper presenting comprehensive data on antioxidant compounds, antioxidant activity and content of individual phenolic compounds content for the three fruit peels.

6.2.3. Materials and methods

6.2.3.1. Sample

About 5 kg of each fruit were purchased at eating ripeness from the local markets in Yucatan, Mexico during 2012. Eating ripeness for purple star apple was determined by the color of the peel (75% purple) (Álvarez-Vargas et al., 2006), while the eating ripeness for yellow cashew and red cashew was determined by °Brix/acidity ratio (25.86) (Morales-Landa et al., 2013). Fruits without blemishes or damage were selected and sent to the laboratory for peel extraction. After the fruits had been cleaned with tap water, peels were extracted manually with a knife and lyophilized in a freeze dryer Lab-conco Model 6 (Labconco-corp, Kansas City, MO) at 0.04 MBar and -56°C for 48 h. Finally, the freeze-dried peel of each fruit was crushed using a mortar and stored at -20°C until analysis.

6.2.3.2. Analysis of antioxidant compounds

6.2.3.2.1. Determination of total soluble phenols (TSP) and total flavonoids

The 80% methanol has been used to assure the maximum extraction of soluble phenols and flavonoids of tropical fruits such as mature green mangos cv. ‘Ataulfo’ and Irwin mango (Robles-Sánchez, et al., 2011; Shivashankara, Isobe, Al-Haq, Takenaka, & Shiina, 2004). TSP and flavonoid compounds were extracted using 1 g of freeze-dried peel of each fruit, which

was homogenized in 10 mL of 80% methanol (Moo-Huchin et al., 2014). The homogenated extract was sonicated for 30 min at 40°C and centrifuged in an Eppendorf centrifuge, model 5702 R, at 1200 x g for 10 min at room temperature. The supernatant was collected, and the sediment was subjected to an additional extraction using the same procedure. Both supernatants were mixed and stored at -20°C until analysis. Total soluble phenols were determined according to Singleton and Rossi (1965). Briefly, 50 µL of extracts were mixed with 3 mL of deionized water and 250 µL of Folin-Ciocalteu reagent (1N). After 8 min of equilibrium, 750 µL of 20% Na₂CO₃ and 950 µL of H₂O were added to the extracts; after incubation for 30 min at room temperature, the absorbance was read at 765 nm with a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total soluble phenols compound was calculated using a standard curve of aqueous solutions of gallic acid (0-10 ppm) and expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g dry weight (DW).

Flavonoid content was determined according to methods described by González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Martínez-Téllez, Gardea, and Ayala-Zavala (2007). 1 mL from each extracted sample was mixed and equilibrated with 4 mL of deionized water and 300 µL 5% NaNO₂ for 5 min. After equilibrium, 300 µL of 10% AlCl₃ (methanolic solution) were added; the mixture was allowed to sit for 1 min and then 2 mL of 1 M NaOH were added. The last volume was completed to 10 mL with H₂O, stirred, and readings were taken. Mixture absorbance was determined at 415 nm, using a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total flavonoids of fruits was calculated using a standard curve of quercetin (0-60 ppm) and expressed as mg quercetin equivalents (QE)/100 g of DW.

6.2.3.2.2. Total anthocyanins

Anthocyanins were extracted from 1 g of freeze-dried peel of each fruit with 30 mL of 95% ethanol/1.5 M HCL (85:15, v:v) (Moo-Huchin et al., 2014). The extract was transferred to a 50 mL volumetric flask, completing the volume with 1.5 M ethanol-HCL and stored for 12 h at 4°C. After filtration, the absorbance was measured in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11 at 535 nm. The total anthocyanin content was determined applying the Lambert-Beer law, calculated as mg/100 g of DW, through the formula: $A_{535} \times \text{dilution}$

factor/ $E_{1\text{cm},535}^{1\%}$; where A_{535} is the absorbance in the diluted sample and $E_{1\text{cm},535}^{1\%}$ is the values factor (98.2) of molar absorptivity for the acid-ethanol solvent and it refers to the absorption of a mixture of cranberry anthocyanins in acid-ethanol, measured in a 1 cm-cell at 535 nm, at a concentration of 1% (w/v).

6.2.3.2.3. Total carotenoids

Extraction of carotenoids was carried out according to the method developed by Chen, Tai, and Chen (2004). 1 g of freeze-dried peel from each fruit was mixed with 50 mL of hexane:acetone:ethanol (70:15:15, v/v/v) containing 0.05% BHT. The mixture was stirred for 1 h using an orbital shaker. Afterwards, 5 mL of 40% KOH in methanolic solution were added, and the solution was saponified at 25°C in the dark for 2 h. Subsequently, 30 mL of hexane were added, the mixture was shaken vigorously and the upper layer was collected. The lower layer was extracted twice and the supernatant was also collected and filtered through sodium sulphate powder to remove traces of water. The supernatant obtained was pooled and taken for analysis. Total carotenoid content was determined spectrophotometrically at 450 nm in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. A calibration curve (0-50 ppm) was prepared using β -carotene in hexane as the standard and hexane as the blank. The results were expressed as mg β -carotene/100 g of DW.

6.2.3.2.4. Vitamin C

For vitamin C determination the titrimetric method with 2,6-dichlorophenolindophenol reagent (AOAC-Association of Official Analytical Chemists, 1995) with some modifications was applied. 1 g of freeze-dried peel was mixed with 100 mL of a solution of oxalic acid (4%). The mixture was homogenized and filtered. 5 mL of filtrated solution were diluted to 10 mL with 4% oxalic acid solution. This solution was titrated with 0.01% of 2,6-dichloro-phenol-indophenol solution. The end point was considered to be when the solution had attained a pink color which persisted for 15 s. The calibration of 2,6-dichlorophenolindophenol solution was performed with 0.05% ascorbic acid solution. Results were expressed as mg of ascorbic acid equivalents per 100 g of DW.

6.2.3.3. Antioxidant capacity (AOC)

Extraction of antioxidant compounds was done according to the method of Moo-Huchin et al. (2014). 1 g of freeze-dried peel of each fruit was homogenized in 10 mL of acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v), sonicated for 30 min in an ultrasonic bath Grant XB3 (Boekel Scientific, Inc, Pennsylvania Blvd.) and then centrifuged for 15 min at 15,000 g. The supernatant was collected, and the sediment was subjected to an additional extraction using the same procedure. Both supernatants were mixed and these constituted the extracts for AOC analysis and analysis of phenolic compounds. According to Kajdžanoska, Petreska, and Stefova (2011), this extraction method enables the collection of soluble phenols, flavonoid glycosides, procyanidins, and certain oligomeric and polymeric proanthocyanidins from strawberries.

DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was conducted according to the Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) technique with some modifications. The stock solution was prepared by mixing 2.5 mg of DPPH radical with 100 mL of methanol. The solution absorbance was adjusted at 0.7 ± 0.02 in 515 nm using an UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. 3.9 mL of DPPH radical were placed in a test tube and 100 μ L of the antioxidants extract or standard were added (methanol was used as blank). The decrease in absorbance at 515 nm was measured at 1 min intervals for the first 10 min, and then at 5 min intervals until stabilization. Based on a preliminary study, the time required to obtain DPPH readings of each fruit peel was 30 min. Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as standards and results (AOC) are expressed as μ M Trolox equivalents/100 g of DW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of DW.

The ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) assay was conducted according to Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, and Milner (1993). ABTS \bullet^+ cation was generated through the interaction of 19.2 mg of ABTS dissolved in 5 mL of HPLC-grade water and 88 μ L of 0.0378 g/mL potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) The cation was incubated in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS activated radical was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After the addition of 30 μ L of antioxidants extract or

standard to 2970 μL of diluted ABTS solution, absorbances were recorded 6 min after mixing. Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as a standard and results (AOC) are expressed as μM Trolox equivalents/100 g of DW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of DW.

6.2.3.4. Analysis of phenolic compounds

Identification and quantification of individual phenolics were carried out using HPLC-1220 Agilent equipped with a UV-visible detector at 280 nm. Extracts were prepared as mentioned previously (section 6.2.3.3.) and were evaporated at 40°C using a rotary evaporator (Buchi R-205, Labortechnik, Switzerland). The residue was reconstituted in 5 mL of methanol and taken to 10 mL with HPLC water. An aliquot was filtered through a 0.45 μm membrane and aliquots of 20 μL were injected in the HPLC system. A 250 x 4.6 mm i.d., 5 μm , Nucleosil C18 column was used (operated at 25°C). Mobile phase consisted of 1% formic acid (98%) (A) and acetonitrile (2%) (B), at a flow rate of 0.5 mL/min. Elution gradient was 2 to 100% (B) from 0 to 70 min (Yahia, Gutierrez-Orozco, & Arvizu-De Leon, 2011). The following individual phenolic standards were purchased from Sigma Aldrich: gallic, caffeic, ellagic, trans-cinnamic, quercetin, catechin, epicatechin, ferulic, myricetin, sinapic, *p*-hydroxybenzoic and kaempferol. Calibration curves for each standard were prepared for quantification.

6.2.3.5. Statistical analysis

All extraction assays were carried out in triplicate and a duplicate of each extract was analyzed. Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out by Statgraphics Plus software, version 2.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA). The comparison of means was performed by Tukey test. Statistical differences were considered to be significant ($P\leq 0.05$)

6.2.4. Results and discussion

Drying is increasingly used to extend the shelf life of raw materials with high moisture content, such as fruits and vegetables, due to their microbial instability. Drying allows longer periods of storage, while it minimizes packing requirement, transport, handling, and distribution (Kwok, Hu, Durance, & Kitts, 2004). The drying process may affect the content

and activity of antioxidants compounds of vegetables (Chang, Lin, Chang, & Liu, 2006). In this regard, it has been suggested freeze-drying to ensure the retention of antioxidant compounds from fruit byproducts (Henríquez, Almonacid, Lutz, Simpson, & Valdenegro, 2012; Wolfe & Liu, 2003). This explains the use of freeze-drying of fruit peels analyzed in this work.

According to several authors, content of antioxidant compounds and antioxidant activity are particularly high in the peel of some fruits (Ajila et al., 2007; Kunradi et al., 2009). In this paper, significant levels of antioxidant compound contents are reported in the freeze-dried peel of three tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico (Table 6.7).

Table 6.7. Content of antioxidant compounds in the freeze-dried peel of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico

Freeze-dried peel	Vitamin C (mg/100 g DW)	Total anthocyanins (mg TA/100 g DW)	Total phenolic compounds (mg of GAE/100 g DW)	Total flavonoids (mg of quercetin/100 g DW)	Total carotenoids (mg of β -carotene/100 g DW)
Purple star Apple	117.96 \pm 27.24a	85.44 \pm 9.68b	695.18 \pm 47.36a	844.32 \pm 30.55b	59.02 \pm 0.78a
Yellow cashew	172.62 \pm 11.90b	1.83 \pm 0.04a	633.29 \pm 22.21a	628.18 \pm 33.36a	172.32 \pm 5.74b
Red cashew	1583.33 \pm 13.74c	9.29 \pm 0.16a	1316.89 \pm 45.78b	833.79 \pm 42.89b	256.90 \pm 6.26c

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

Statistical analysis revealed significant differences ($P \leq 0.05$) in the content of antioxidant compounds of the different fruit peel samples under study.

Vitamin C is considered to be an antioxidant compound of natural origin in the diet (Almeida et al., 2011). In this paper, the freeze-dried peel of red cashew (1583.33 mg of ascorbic acid/100 g DW) presented a higher content of vitamin C in comparison with the other peel samples studied. The vitamin C content found in the freeze-dried fruit peels in this study was higher than those reported for orange peel (16.25 mg of ascorbic acid/100 g DW),

mandarin peel (12.32 mg of ascorbic acid/100 g DW), grapefruit peel (28.17 mg of ascorbic acid/100 g DW) (Rincón, Vásquez, & Padilla, 2005) and similar to reports for camu-camu fruit peel (1538-1641 mg of ascorbic acid/100 g DW) (Villanueva-Tiburcio, Condezo-Hoyos, & Asquiere, 2010). These results indicate that the freeze-dried peel of red cashew is an excellent source of vitamin C that can be used in the pharmaceutical industry. A number of studies have provided scientific evidence confirming that extracts rich in anthocyanins can improve visual acuity, show antioxidant activity, radical scavenging activity and act as chemoprotecting agents (Aguilera-Ortíz, Reza-Vargas, Chew-Madinaveitia, & Meza-Velázquez, 2011). Clinical studies in Italy showed that 79% of diabetic patients consumers of bilberries extract (160 mg twice daily for a month) showed improvement in symptoms of diabetic retinopathy (Perossini, Guidi, Chiellini, & Siravo, 1987).

According to the results, the freeze-dried peel of the purple star apple (85.44 mg AT/100 g DW) presented a higher content of total anthocyanins (TA) followed by red cashew and yellow cashew. Total anthocyanin contents of each freeze-dried fruit peel under study was higher than those reported by Silva et al. (2014) for guava (0.90 mg of AT/100 g DW) and sapodilla (1.07 mg of AT/100 g DW) byproducts of tropical fruits from Brazil.

Food extracts rich in anthocyanins have been developed and incorporated into dietary supplements. For example, extracts of purple corn anthocyanins have been used as an antioxidant dietary supplement recommended for promoting health (look younger and more radiant skin) (Shipp & Abdel-Aal, 2010). Anthocyanins are being marketed as a supplement called Medox®, which incorporates a concentrated amount of cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside extracted from Norwegian berries (*Vaccinium myrtillus*) and blackcurrants (*Ribes nigrum*) (Biolink Group, 2014). This information provides the possibility of using the peels of three fruits studied in the industry as a source of anthocyanins.

The phenolic compounds found in fruits and vegetables have attracted much interest due to their potential as antioxidants. In this paper, the freeze-dried peel of red cashew (1316.89 mg of GAE/100 g DW) showed a higher content of total soluble phenols in comparison with the other fruit peels analyzed. These results are similar to those reported for

the peels of green grape (Perlette and Sugra One), red grape (Flame and Red Globe) (values from 718 to 1060 mg of GAE/100 g DW) and kiwano (500 mg of GAE/100 g DW) (Matsusaka & Kawabata, 2010; Molina-Quijada, Medina-Juárez, González-Aguilar, Robles-Sánchez, & Gámez-Meza, 2010), indicating that the freeze-dried peel of the fruits under study represents an excellent source of phenolic compounds which can be used in the food and pharmaceutical industries.

Flavonoids are a widely distributed group of polyphenolic compounds with health-related properties, which are based in their antioxidant activity (Benavente-García, Castillo, Marin, Ortuño, & Del Rio, 1997). Epidemiological studies suggest dietary intake of flavonoids may reduce the risk of tumors of the breast, colon, lung, prostate, and pancreas (Romagnolo & Selmin, 2012). It is known that industrial citrus wastes are exploited by the industry to extract flavonoids (Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo, & Pérez-Alvarez, 2007). In this regard, the company Nature's Plus sells a dietary supplement called bioflavonoids from lemon peel (NatureFarma, 2014). In this paper, the contents of total flavonoids obtained for the freeze-dried peel of red cashew (833.79 mg of quercetin/100 g DW) and purple star apple (844.32 mg of quercetin/100 g DW) were higher in comparison with that of yellow cashew peel (628.18 mg of quercetin/100 g DW). The fruit peels under study showed levels of total flavonoids similar to those reported for the peel of green grape (Perlette and Sugra One) and red grape (Flame and Red Globe) (from 600 to 881 mg of quercetin/100 g DW) (Molina-Quijada et al., 2010).

Carotenoids are phytochemicals presented in considerable amount in tropical exotic fruit tissue (Rufino, Alves, Brito, Pérez-Jiménez, Saura-Calixto, & Mancini-Filho, 2010). Carotenoids play a potentially important role in human health by acting as biological antioxidants, protecting cells and tissues from the damaging effects of free radicals and singlet oxygen and are used as natural colorants in the food industry (Oreopoulou & Tzia, 2007). In this study, the freeze-dried peel of red cashew (256.90 mg β -carotene/100 g DW) showed a higher total carotenoid content, followed by yellow cashew (172.32 mg β -carotene/100 g DW) and purple star apple (59.02 mg β -carotene/100 g DW). The values of total carotenoids found

in the present study are superior to those reported for orange peel, mandarin peel and grapefruit peel (from 2.25 to 11.03 mg of β -carotene/100 g DW) (Rincón et al., 2005).

The antioxidant capacity of food is determined by a mixture of different antioxidants with different action mechanisms; therefore, the antioxidant capacity of food products must be evaluated with a variety of methods which can address the different mechanisms (Pérez-Jiménez et al., 2008). The most widely used methods are the ABTS and DPPH radicals (Ali, Kasoju, Luthra, Sharanabasava, Sahu, & Bora, 2008; Almeida et al., 2011; Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005). To this effect, two oxidant systems have been selected in the present work, both of which are based on measuring color degradation in DPPH or ABTS. The ABTS method is generally indicated for evaluating the antioxidant activity of hydrophilic compounds and the DPPH method is commonly used for aqueous/organic extracts with hydrophilic and lipophilic compounds (Rufino et al., 2010). Table 6.8 shows the antioxidant capacity of the freeze-dried fruit peels under study, determined as Trolox equivalents (TEAC) (μM Trolox/100 g DW) and vitamin C equivalents (VCEAC) (mg of vitamin C/100 g DW) using ABTS and DPPH assays.

When the ABTS assay was used, the freeze-dried peel with higher antioxidant activity corresponded to purple star apple (3310.95 μM Trolox/100 g DW) and yellow cashew (3322.31 μM Trolox/100 g DW) in comparison with red cashew peel. The TEAC values found in the freeze-dried peels, using the ABTS assay, are superior to those reported for banana peel (567 μM Trolox/100 g DW) and kiwano peel (1420 μM Trolox/100 g DW) (Babbar et al., 2011; Matsusaka & Kawabata, 2010).

When the antioxidant activity was measured with the DPPH method, the freeze-dried fruit peels under study showed similar values of antioxidant activity with no significant difference. These results are superior to those reported for freeze-dried apple peel (1435 μM Trolox/100 g DW) (Henríquez et al., 2012), which is a waste product from dried apple manufacture considered as good source of antioxidants.

Table 6.8. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) of the freeze-dried peel of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico

Freeze-dried peel	TEAC ($\mu\text{m}/100 \text{ g DW}$)		VCEAC ($\text{mg}/100 \text{ g DW}$)	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Purple star apple	3310.95 \pm 32.48b	1680.90 \pm 75.81a	966.66 \pm 9.55b	362.18 \pm 16.3a
Yellow cashew	3322.31 \pm 49.24b	1579.04 \pm 121.53a	970.01 \pm 14.48b	340.18 \pm 26.2a
Red cashew	3050.95 \pm 188.9a	1593.65 \pm 67.8a	890.19 \pm 55.57a	343.34 \pm 14.6a

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

Furthermore, TEAC and VCEAC values obtained in this work for freeze-dried fruit peels with both methods (DPPH and ABTS) are inferior to those reported for residue from star fruit which is a good source of natural antioxidants and that polyphenolics are its major antioxidants (Shui & Leong, 2006).

Phenolic compounds have drawn increasing attention due to their potent antioxidant properties and their marked effects in the prevention of various oxidative stress associated diseases such as cancer (Dai & Mumper, 2010). In this paper, six phenolic compounds were identified and quantified in freeze-dried peel from the tropical fruits studied (Table 6.9) (Fig. 6.1). From these, three were hydroxycinnamic acids (ferulic, caffeic and sinapic); two were hydroxybenzoic acids (gallic and ellagic); and one flavonol (myricetin). A comparison of the phenolic acids of all the peels showed that the purple star apple contained the highest level of gallic acid, with a concentration of 229.49 mg/100 g DW.

Table 6.9. Content of phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico

Phenolic compounds	Purple star apple	Red cashew	Yellow cashew
Ferulic acid	2.370.03a	107.28±0.02c	56.80±0.27b
Gallic acid	229.49±0.72c	33.64±0.50a	39.84±0.21b
Ellagic acid	121.87±1.24c	95.64±0.50b	48.68±0.45a
Myricetin	9.88±0.15a	29.51±0.69b	125.72±0.38c
Caffeic acid	nd	2.19±0.00a	2.18±0.01a
Sinapic acid	nd	3.69±0.43a	15.90±0.13b
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	nd	0.79±0.00b	0.35±0.06a

nd, not detected. Values are expressed as mean±standard deviation (n=6)

Ferulic was the most abundant phenolic acid in red cashew peel; while gallic acid and ellagic acid were the predominant phenolic acids in purple star apple peel and myricetin and sinapic acid were the most abundant phenolic compounds in yellow cashew peel. Caffeic acid and sinapic acid were not detected in the purple star apple peel. These phenolic compounds found in the freeze-dried peel from tropical fruits were also identified in gac fruit peel, pomegranate fruit peel and pineapple peel (Kubola & Siriamornpun, 2011; Middha, Usha, & Pande, 2013; Yi, Wei, Teng, & Gao, 2006).

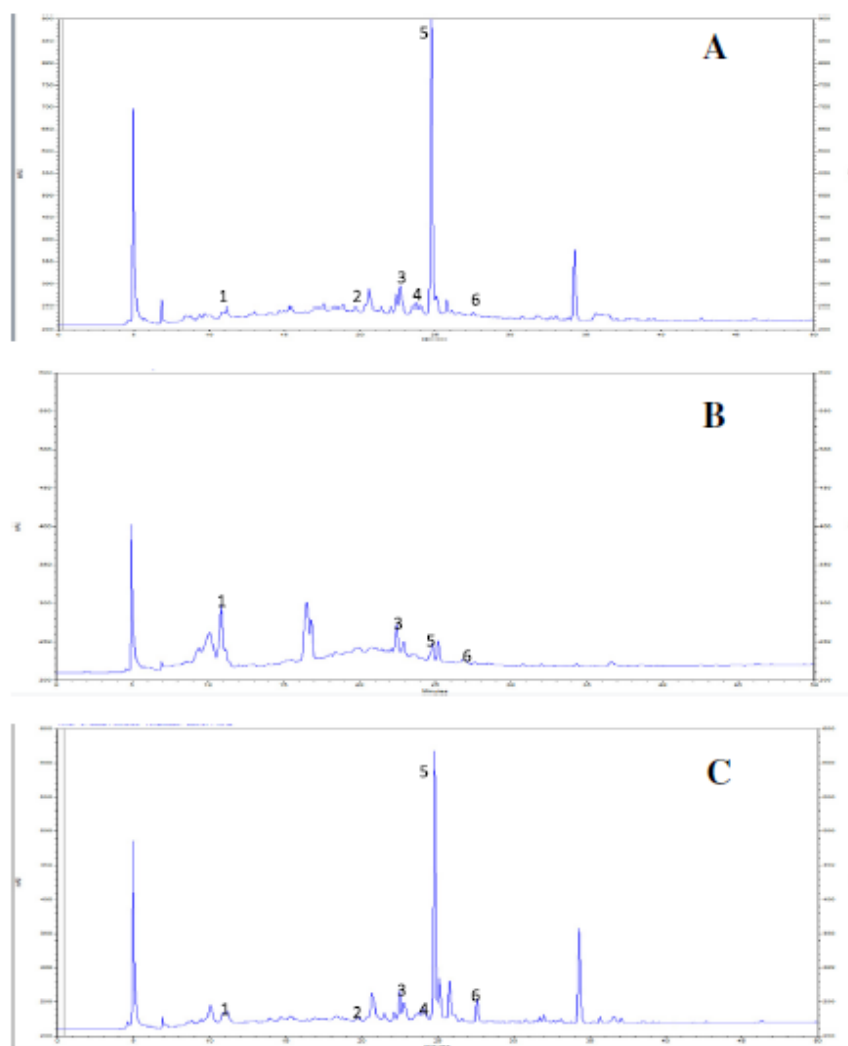


Fig. 6.1. HPLC chromatogram of phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits: (A) red cashew, (B) purple star apple and (C) yellow cashew. The peak identification of phenolic compounds are (1) gallic acid; (2) caffeic acid; (3) ellagic acid; (4) sinapic acid; (5) ferulic acid; (6) myricetin.

Some examples of tropical exotic fruit byproducts that have found a successful opportunity at the secondary process of extraction of antioxidant compounds are coffee, macadamia, mango, and papaya (Miljkovic & Bignami, 2002). Processing of coffee generally involves separating the desired beans from the byproducts of processing e.g., the so-called “coffee cherry,” which consists of the fruit skin and other undesirable constituents. On the other hand, macadamia is a tropical exotic fruit that contains an inner and outer shell, and a nut. Processing generally involves separating the valuable nut (main product) from the shells considered as byproducts. Also, pineapple, taro, papaya, and mango are typically appreciated for their flesh but processing of these crops involves separation and removal of the skin and seed byproducts. For instance, U.S. Patent application US 2002/0187239 A1 have proposed the use of coffee cherry, macadamia, mango, taro and papaya byproducts as a source of nutritional constituents (Miljkovic & Bignami, 2002). Foo, Lu, and Watson (2010) patented an extract from the skin of passion fruit, which showed the effect of lowering blood pressure and serum nitric oxide levels, providing a hepatoprotective effect, as well as antioxidant and anti-inflammatory effects in mammals.

The number of studied byproduct sources has been augmented considerably, which is caused by the value of recycling and integral exploitation interest of the agri-food industry, but also increasing information on the specific location of active compounds (Peschel et al., 2006).

6.2.5. Conclusions

The freeze-dried peels of purple star apple, yellow cashew and red cashew from Yucatan, Mexico contained vitamin C, anthocyanins, phenolic compounds, flavonoids and carotenoids and these peels exhibited good antioxidant activity using the ABTS and DPPH assays. The major phenolic compounds present in purple star apple, yellow cashew and red cashew were ferulic acid, gallic acid, ellagic acid and myricetin.

This study showed that freeze-dried fruit peels are good sources of antioxidant compounds and the exploitation of these abundant and low-cost renewable resources could be

anticipated for the pharmaceutical and food industries with opportunities of developing ingredient for the formulation of functional food products and/or pharmaceutical products.

6.2.6. Acknowledgments

The General Directorate of Higher Education and Technology and Foundation Pablo Garcia of the State of Campeche for the support provided.

6.2.7. References

Aguilera-Ortiz, M., Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveitia, R., & Meza-Velázquez, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista Biotecnia*, 13, 16–22.

Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105, 982–988.

Alí, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1–15.

Almeida, M. M., Sousa, P. H., Arriaga, A. M., Prado, G. M., Magalhaes, C. E., Maia, G. A., & Lemos, T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155–2159.

Álvarez-Vargas, J. E., Alia-Tejagal, I., López-Martínez, V., Acosta-Durán, C. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Delgado-Escobar, I., & Villegas-Torres, O. (2006). Caracterización de frutos de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.), en el Estado de Morelos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 12, 217-221.

AOAC Association of official analytical chemists (1995). Vitamin C (Ascorbic acid) in vitamin preparations and juices. 2,6-Dichloroindophenol titrimetric method. *Procedure No. 967.21*. In *AOAC Official Methods of Analysis* (pp.1058-1059). (15th ed). Arlington, VA: Association of the Official Analytical Chemists.

Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44, 391–396.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., & Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187–197.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F., Ortuño, A., & Del Río, J. (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505–4515.

Biolink Group (2014). *Sandnes, NO: Biolink Group, AS*. Available from: <http://www.biolink.no/products/profesional-dietary-supplement-article86-111.html>.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.

Chang, C., Lin, H., Chang, C., & Liu, Y. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77, 478–485.

Chen, J. P., Tai, C. Y., & Chen, B. H. (2004). Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Chromatography A*, 1054, 261-268.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.

Dina, A., Nassima, C., Meriem, B., Karima, A., Hakima, L., Hania, B., Nadjat, D., & Djebbar, A. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112, 303–309.

Foo, L. Y., Lu, Y., & Watson, R. R. (2010). *Extracts of passion fruit and uses thereof*. USA. Published In. Google Patents: Issuing organization: Industrial Research Limited, Southwest Scientific Editing & Consulting LLC.

González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72, s197-s202.

Hancock, J., Desikan, R., & Neill, S. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29, 345–350.

Henríquez, M., Almonacid, S., Lutz, M., Simpson, R., & Valdenegro, M. (2012). Comparison of three drying processes to obtain an apple peel food ingredient. *CyTA Journal of Food*, 1, 1–9.

Kajdžanoska, M., Petreska, J., & Stefova, M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5272–5278.

Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., & Gliszczynska, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, Vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313–322.

Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138–1145.

Kunradi Vieira, F.G., Da Silva Campelo Borges, G., Copetti, C., Da Valdemiro Gonzaga, L., Costa Nunes, E., & Fett, R. (2009). Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59, 101–106.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726–732.

Kwok, B., Hu, C., Durance, T., & Kitts, D. D. (2004). Dehydration techniques affect phytochemical contents and free radical scavenging activities of saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt). *Journal of Food Science*, 69, 122–125.

Marín, F. R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100, 736–741.

Matsusaka, Y., & Kawabata, J. (2010). Evaluation of antioxidant capacity of non-edible parts of some selected tropical fruits. *Food Science and Technology Research*, 16, 467–472.

Middha, S., Usha, T., & Pande, V. (2013). HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/296236>

Miljkovic, D., & Bignami, G. S. (2002). *Nutraceuticals and methods of obtaining nutraceuticals from tropical crops. USA. Application number: 10/992.502*. Published In. Google Patent.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

Molina-Quijada, D. M. A., Medina-Juárez, L. A., González-Aguilar, G. A., Robles-Sánchez, R. M., & Gámez-Meza, N. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinífera* L.) skin from northwest México. *CyTA Journal of Food*, 8, 57–63.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas y Vargas, M. L., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–515.

Morales-Landa, J., Sánchez-Contreras, M., Reyes-Vázquez, N., Pacheco-López, N., Gastelum-Martínez, E., González-Flores, T., Flores-Montaña, J., Godoy-Zaragoza, M., Moo-Huchin, V., González-Martínez, M., & Rodríguez-Buenfil, I. (2013). Aplicación potencial de la pulpa de marañón. *Revista Fomix Campeche*, 15, 34-37.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M., & Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.

NatureFarma (2014). Nature's Plus. Available from: <http://www.naturefarma.com/bioflavonoides-500-mg-90-comprimidos-nature-s-plus.html>.

Oreopoulou, V., & Tzia, C. (2007). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, 209–232.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Caixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.

Perossini, M., Guidi, G., Chiellini, S., & Siravo, D. (1987). Studio clinic sull'impeigo degli antocianisidi del mirtillo (Tegens) nel trattamento delle microangiopathi retiniche di tipo diabético ed ipertensivo. *Ottal Clinical Ocular*, 113, 1173–90.

Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., & Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97, 137–150.

Rincón, A. M., Vásquez, A. M., & Padilla, F.C. (2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55, 1–8.

Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., A de la Rosa, L., Yepiz-Plascencia, G., González-Aguilar, G. (2011). Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44, 1386–1391.

Romagnolo, D. F., & Selmin, O. I. (2012). Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31, 206–238.

Rufino, M. S., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

Shipp, J., & Abdel-Aal, S. M. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4, 7–22.

Shivashankara, K., Isobe, S., Al-Haq, M., Takenaka, M., & Shiina, T. (2004). Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1281–1286.

Shui, G., & Leong, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97, 277–284.

Silva, L. M., Figueiredo, E. A., Ricardo, N. M., Vieira, I. G., Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404.

Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A., & Asquieri, E.R. (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 151–160.

Wolfe, K., & Liu, R. H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1676–1683.

Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F., & Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Research International*, 44, 2210–2216.

Yi, X., Wei, B., Teng, J., & Gao, C. (2006). Determination of the phenolic compounds in pineapple by high-performance liquid chromatography. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, 32, 99–101.

6.3. Carotenoid composition and antioxidant activity of extracts from tropical fruits

Víctor M. Moo-Huchin^a, Gustavo A. González-Aguilar^b, Mariela Moo-Huchin^c, Elizabeth Ortiz-Vázquez^d, Luis Cuevas-Glory^d, Enrique Sauri-Duch^d, David Betancur-Ancona^{e*}

[^a] Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, Av. Ah-Canul, C.P. 24900, Calkiní, Campeche, México

[^b] Research Center for Food & Development (CIAD), AC., Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo (83000), Sonora, México

[^c] Universidad Tecnológica del Poniente, Calle 29 Las Tres Cruces, C. P. 97800, Maxcanú, Mérida, México.

[^d] Instituto Tecnológico de Mérida, C.P. 97118, km 5 Mérida-Progreso, Mérida, Yucatán, Mexico

[^e] Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203, México, Telephone: +529999460956, Fax +529999460994 *Corresponding author: bancona@uady.mx

Accepted in Chiang Mai Journal of Science (2016).

6.3.1. ABSTRACT

The aim of this study was to determine the carotenoid composition, as well as the antioxidant activity of carotenoid extracts of fruits from Yucatan, Mexico. Among the fruits evaluated, the mamey sapote (36.41 mg of β -carotene/100 g of edible portion) obtained the highest total carotenoids content, while the red mombin, green sugar apple, green-yellow mombin, yellow cashew, purple sugar apple and green nance showed greater antioxidant activity of carotenoids extract using the ABTS assay. When the antioxidant activity of the carotenoid extracts was measured with the DPPH assay, the edible portion of the green nance was found to have the highest antioxidant activity. Four carotenoids (two xanthophyll's and two carotenes) were identified in the fruits. The mamoncillo, red cashew and yellow cashew obtained high values of retinol equivalents (1,266–2,908 μ g/100 g of edible portion). Lutein and β -cryptoxanthin contents showed a positive correlation with antioxidant activity by ABTS ($R=0.41$ and $R=0.31$, respectively). The results indicate a perspective for the exploitation and use of these tropical fruits in the diet, given their antioxidant activity with beneficial in human health.

Keywords: Carotenoids; antioxidants; tropical fruits; antioxidant activity; lutein.

6.3.2. INTRODUCTION

Carotenoids are lipophilic compounds, responsible for the red, orange and yellow hues of fruits and vegetables; they are also used as additives to confer a yellow-reddish colour to many foods [1]. Approximately 750 carotenoids have been identified to date [2]. However, only a fraction of these compounds are absorbed and utilized by humans, and only a small percentage serve as precursors of vitamin A. Carotenoids, which contain an unsubstituted β -ionone ring, including β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin, and α -cryptoxanthin, have the ability to be converted into vitamin A *in vivo* [2]. The biological effects of vitamin A include growth promotion, cellular differentiation, immune function, embryonic development, and gap junction communication [3].

Several epidemiological studies have suggested that consumption of vegetables and fruits containing carotenoids helps prevent the development of degenerative diseases such as cardiovascular diseases, macular degeneration, some types of cancer and age-related cataracts [4]. The health benefits of carotenoids are most probably due to the antioxidant activities of their electron-rich conjugated system, both by quenching singlet oxygen and by scavenging radicals to terminate the chain reactions [5]. Such properties make these compounds ideal for the ever-increasing functional food industry while promoting the consumption of the natural products in which they are contained.

In tropical regions there is a great diversity of fruits that are consumed by wild animals, indigenous people or farmers. Many tropical fruits can be considered a reservoir of bioactive substances of special interest due to their possible health-promoting properties. Recently, Moo-Huchin *et al.* [6] reported that in Yucatan, Mexico, there are a large number of tropical fruits containing a considerable amount of phenolic compounds and antioxidant activity in the pulp with red and yellow tones such as the star apple, cashew, mombin, mamey sapote, white sapote, sugar apple, sapodilla, dragon fruit, nance, ilama, custard apple, mamoncillo and black sapote, which are of potential interest to agro-industry and constitute a possible source of income for the local population in the near future. Some of these fruits are also cultivated and commercialized on a small scale in Brazil [7] and Panama [8]. The fruits cultivated in

Yucatan, Mexico are characterized by their high content of water (71.6-87.5%), total soluble solids (8.95-22.3°Brix) and moderate acidity (0.19-1.87%); making them more attractive to consumers [6]. Taking into consideration the supporting information regarding the potential health benefits of carotenoids, the composition of carotenoids and their antioxidant activity in fruits collected in Yucatan needs to be investigated and reported. In this regard, the aim of this study was to determine the content of individual carotenoids and to demonstrate their antioxidant activity in tropical fruits grown in Yucatan, Mexico. To the best of our knowledge, this is the first paper presenting comprehensive data on individual carotenoids content and their antioxidant activity in tropical fruits from Yucatan, Mexico.

6.3.3. MATERIALS AND METHODS

6.3.3.1. Chemical reagents

β -carotene, β -cryptoxanthin, lycopene, lutein, ABTS, DPPH and Trolox, were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). All other chemicals used were of analytical grade.

6.3.3.2. Samples

Nineteen fruits, which are commonly cultivated and consumed in Yucatan, Mexico, were chosen for this study (Table 6.10). About 5 kg of each fruit species (except sapodilla) were purchased at eating ripeness from the local markets in Yucatan, Mexico during 2012.

Five kg of sapodilla fruits were harvested from a single tree in an orchard located in the municipality of Cansahcab, in Yucatan, Mexico and were identified according to quality based on the stage of physiological maturity and determined by the absence of latex. The fruits were stored at 25 °C to reach an eating ripeness according to Moo-Huchin *et al.* [9].

The fruits without blemishes or damage were selected and sent to the laboratory for edible portion extraction. After the fruits had been cleaned with tap water, the edible portion were extracted manually with a knife, processed in a blender and stored in sealed plastic bags. The

carotenoid pigments were extracted from the fresh fruits on the same day of collection and when the sapodilla reached its eating ripeness.

Table 6.10. List of the tropical fruit species from Yucatan included in the study and parts analysed.

English name	Common name	Scientific name	Edible portion used
Green star apple	Caimito verde	<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	Pulp
Purple star apple	Caimito morado		
Yellow cashew	Marañón amarillo	<i>Annacardium occidentale</i>	Pulp
Red cashew	Marañón rojo		
Green-yellow mombin	Ciruela verde-amarillo	<i>Spondias purpurea</i> L.	Pulp+peel
Red mombin	Ciruela roja		
Mamey sapote	Mamey	<i>Pouteria sapota</i> Jacq.	Pulp
White sapote	Zapote blanco	<i>Lucuma hypoglauca</i> Stanley	Pulp
Green sugar apple	Saramuyo verde	<i>Annona squamosa</i> L.	Pulp
Purple sugar apple	Saramuyo morado		
Sapodilla	Chicozapote	<i>Manilkara sapota</i> L.	Pulp
Dragon fruit	Pitahaya	<i>Hylocereus undatus</i> Haworth	Pulp+seed
Yellow nance	Nance amarillo	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Pulp+peel
Green nance	Nance verde		
Red nance	Nance rojo		
Ilama	Anona	<i>Annona diversifolia</i>	Pulp
Custard apple	Anona roja	<i>Annona reticulata</i>	Pulp
Mamoncillo	Uaya	<i>Melicoccus bijugatus</i> (Jacq.)	Pulp
Black sapote	Zapote negro	<i>Diospyros digyna</i>	Pulp

6.3.3.3. Extraction of carotenoids

Extraction of carotenoids was carried out according to the method developed by Chen *et al.* [10]. 10 g of edible portion of each fruit were placed in a vessel, protected from light, and mixed with 50 mL of extraction solvent (hexane/acetone/ethanol: 70:15:15, v/v/v). The mixture was stirred for 1 h using an orbital shaker. Afterwards, 5 mL of 40% KOH in methanolic solution were added, and the solution was saponified at 25°C in the dark for 2 h. Subsequently, 30 mL of hexane were added, the mixture was shaken vigorously and the upper layer was collected. The lower layer was extracted twice and the supernatant was also collected and filtered through sodium sulphate powder to remove traces of water. The supernatant obtained was pooled and stored at -80°C under nitrogen atmosphere (99.9% purity) in the dark until analysis.

6.3.3.3.1. Total carotenoids

Total carotenoid content in the extracts was determined spectrophotometrically at 450 nm in a UV–Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. A calibration curve (0–50 ppm) was prepared using β -carotene in hexane as the standard and hexane as the blank. The results were expressed as mg β -carotene/100 g of edible portion.

6.3.3.3.2. Antioxidant activity determinations

6.3.3.3.2.1. DPPH radical-scavenging assay

DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was conducted according to the Brand-Williams *et al.* [11] method with some modifications. The stock solution was prepared by mixing 2.5 mg of DPPH radical with 100 mL of methanol. The solution absorbance was adjusted at 0.7 ± 0.02 in 515 nm using an UV–Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. 3.9 mL of DPPH radical were placed in a test tube and 100 μ L of carotenoids extract or standard were added (methanol was used as blank). The decrease in absorbance at 515 nm was measured at 1 min intervals for the first 10 min, and then at 5 min intervals until stabilization. Based on a

preliminary study, the time required to obtain DPPH readings of each fruit were as follows: 15 min (green nance); 10 min (red cashew and dragon fruit) and 5 min (green star apple, purple star apple, yellow cashew, green–yellow mombin, red mombin, mamey sapote, white sapote, green sugar apple, purple sugar apple, sapodilla, yellow nance, red nance, ilama, custard apple, mamoncillo and black sapote). Calibration curve was prepared using Trolox as standard and results are expressed as μM Trolox equivalents/100 g of edible portion.

6.3.3.3.2.2. ABTS radical-scavenging activity

The ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid) assay was conducted according to Miller *et al.* [12]. ABTS^{•+} cation was generated through the interaction of 19.2 mg of ABTS dissolved in 5 mL of HPLC-grade water and 88 μL of 0.0378 g/mL potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). The cation was incubated in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS activated radical was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After the addition of 30 μL of carotenoids extract or standard to 2970 μL of diluted ABTS solution, absorbance was recorded 7 min after mixing. Calibration curve was prepared using Trolox as a standard and results are expressed as μM Trolox equivalents/100 g of edible portion.

6.3.3.4. HPLC analysis of individual carotenoids

Identification and quantification of carotenoid pigments were carried out using HPLC-1220 Agilent equipped with a UV–Visible detector at 476 nm. Extracts were prepared as mentioned previously (Section 6.3.3.3) and were evaporated at 35°C using a rotary evaporator (Buchi R-205, Labortechnik, Switzerland). The residue was reconstituted in 1.5 mL of solvent (methanol/methylene chloride: 50:50, v/v) [13]. An aliquot was filtered through a 0.45 μm membrane and aliquots of 20 μL were injected in the HPLC system. A 250 x 4.6 mm i.d., 5 μm , Nucleosil C18 column was used (operated at 25°C). Mobile phase consisted of acetonitrile:1-butanol (7:3, v/v, A) and methylene chloride (B), at a flow rate of 1.0 mL/min. Elution gradient was 99% (A) and 1% (B) initially, increasing to 4% (B) in 20 min and then

returned to 1% (B) in 22 min [13]. Identification of compounds was achieved by comparing the retention times and the spectra as well as by the addition of standards. The concentrations of pigments were calculated with the help of corresponding external standards.

6.3.3.5. Statistical analysis

All extraction assays were carried out in triplicate and a duplicate of each extract was analysed. Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was carried out by Statgraphics Plus software, version 2.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA). The comparison of means was performed by Tukey test. Statistical differences were considered to be significant ($P \leq 0.05$).

6.3.4. RESULTS AND DISCUSSION

6.3.4.1. Total carotenoids content in tropical fruits

Some of the fruits selected for the present study are unknown outside their natural range, some are barely known and some are well known and marketed in Mexico.

The important role of plant-derived carotenoids in the prevention of a number of human health problems such as certain types of cancer, heart disease and age-related macular degeneration [14] has motivated the interest in studying these pigments found in tropical fruits grown in Yucatan, Mexico. The tropical climate of Yucatan favors the occurrence of a wide variety of carotenogenic fruits. Normally, fruits are exposed to sunlight during their growth, which favours the breakdown of chlorophyll and induction of carotenogenesis.

In this work, the total carotenoids content in the edible portion of a group of tropical fruits grown in Yucatan, Mexico was determined (Table 6.11). According to the results obtained in this study, the total carotenoids content of the 19 fruits under study, expressed as mg of β carotene/100 g of edible portion varied between 0.70 and 36.41 mg/100 g. Among the fruits evaluated, the mamey sapote presented the highest total carotenoids content, while the green sugar apple obtained the lowest amount of this compound. These results indicate that the mamey sapote is the most important source of total carotenoids.

The total carotenoids content reported for the mamey sapote was higher than those reported for 14 non-traditional fruits of Malaysia (values ranging from 1.41 to 19.83 mg of β -carotene/100 g of edible portion) [15] and for 12 tropical fruits native to Cerrado, Brazil (0.021-1.362 mg of β -carotene/100 g of edible portion) [7], which are considered to be good sources of carotenoids and other bioactive compounds. This difference could be attributed to a number of factors such as, genotype, maturity stage, temperature and light intensity of each geographical region. [14].

Table 6.11. Content of total carotenoids of tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Fruit	Total carotenoids (mg of β -carotene/100 g of edible portion)
Mamey sapote	36.4 \pm 0.01
Yellow cashew	29.3 \pm 0.01
White sapote	19.7 \pm 0.04
Red mombin	17.9 \pm 0.01
Red cashew	17.3 \pm 0.01
Green-yellow mombin	10.3 \pm 0.01
Green nance	9.7 \pm 0.01
Yellow nance	9.0 \pm 0.01
Red nance	8.2 \pm 0.01
Mamoncillo	4.1 \pm 0.01
Purple star apple	4.0 \pm 0.05
Black sapote	2.5 \pm 0.01
Ilama	1.6 \pm 0.01
Purple sugar apple	1.5 \pm 0.02
Custard apple	1.2 \pm 0.01
Sapodilla	1.0 \pm 0.06
Green star apple	1.0 \pm 0.04
Dragon fruit	0.8 \pm 0.01
Green sugar apple	0.7 \pm 0.03

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

For the other fruits under study, total carotenoids content was found to be lower than those obtained for mamey sapote: yellow cashew (between 20 and 30 mg of β -carotene/100 g of edible portion); white sapote, red mombin, red cashew and green-yellow mombin (between 10 and 20 mg of β -carotene/100 g of edible portion); green nance, yellow nance and red nance (between 5 and 10 mg of β -carotene/100 g of edible portion); mamoncillo, purple star apple, black sapote, ilama, purple sugar apple, custard apple, sapodilla, green star apple, dragon fruit and green sugar apple (values below 5 mg/100 g of edible portion). The fruits with concentrations below 5 mg of β -carotene/100 g are comparable to the results obtained from the pulp of five tropical fruits grown in Cerrado, Brazil [16].

6.3.4.2. Antioxidant activity of carotenoids extract from the tropical fruits evaluated.

Table 6.12 shows the antioxidant activity of carotenoids extract from the edible portion of the group of tropical fruits evaluated, expressed as antioxidant capacity equivalent to Trolox (CAET) (μ M Trolox/100 g of edible portion), using ABTS and DPPH assays. Trolox (a water soluble analogue of α -tocopherol) is known for its high antioxidant capacity and is therefore used as a reference compound. Trolox is a compound with greater antioxidant capacity in comparison with ascorbic acid, quercetin, gallic acid and rutin [17]; thus it was used as the standard.

When the ABTS assay was used, the antioxidant capacity of the carotenoids extract found in the fruits evaluated varied from 1.38 to 70.80 μ M Trolox/100 g. Among the fruits studied, the red mombin, green sugar apple, green-yellow mombin, yellow cashew, purple sugar apple and green nance (values ranging from 60 to 80 μ M Trolox/100 g of edible portion) showed greater antioxidant activity.

Table 6.12. Antioxidant activity of carotenoid extracts of tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Fruit	$\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g of edible portion}$	
	ABTS ^{•+}	DPPH [•]
Red mombin	70.8 \pm 5.1	3.5 \pm 0.8
Green sugar apple	69.0 \pm 2.5	9.6 \pm 0.5
Green-yellow mombin	66.8 \pm 10.9	14.9 \pm 2.2
Yellow cashew	65.3 \pm 9.7	5.4 \pm 0.1
Purple sugar apple	61.5 \pm 4.7	8.5 \pm 0.4
Green nance	61.1 \pm 4.8	23.9 \pm 2.2
Green star apple	53.0 \pm 2.5	15.6 \pm 0.6
Yellow nance	50.7 \pm 5.0	12.5 \pm 1.1
Ilama	50.6 \pm 5.1	9.1 \pm 0.6
White sapote	38.5 \pm 3.7	1.4 \pm 0.0
Red cashew	35.9 \pm 3.0	13.8 \pm 2.5
Purple star apple	33.5 \pm 12.2	13.0 \pm 1.1
Red nance	28.3 \pm 3.6	16.4 \pm 1.2
Custard apple	27.3 \pm 0.3	15.8 \pm 3.2
Mamoncillo	27.1 \pm 4.4	5.5 \pm 0.9
Mamey sapote	19.8 \pm 2.8	2.8 \pm 0.0
Black sapote	11.1 \pm 1.4	14.8 \pm 2.6
Dragon fruit	8.9 \pm 0.1	11.41 \pm 0.70
Sapodilla	1.3 \pm 0.0	8.48 \pm 0.79

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

For the remainder of the fruits analysed, the antioxidant activity values obtained ranged from 40 to 60 $\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ (green star apple, yellow nance and ilama), from 20 to 40 $\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ (white sapote, red cashew, purple star apple, red nance, custard apple and mamoncillo), and from 0 to 20 $\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$ (mamey sapote, black sapote, dragon fruit and sapodilla).

When the DPPH method was used to measure the antioxidant activity of the carotenoids extract from the fruits under study, the edible portion of green nance presented greater antioxidant activity (23.9 $\mu\text{M Trolox}/100 \text{ g}$).

Most of the fruits included in this study showed an antioxidant activity of carotenoids extract ranging from 8 to 20 μM Trolox/100 g (sapodilla, purple sugar apple, ilama, green sugar apple, dragon fruit, yellow nance, purple star apple, red cashew, black sapote, green-yellow mombin, green star apple, custard apple and red nance). The antioxidant activity values of these pigments in the rest of the tropical fruits were lower than 8 μM Trolox/100 g (mamoncillo, yellow cashew, red mombin, mamey sapote and white sapote).

According to these results, the carotenoids extracts of fruits evaluated showed lower antioxidant activity values using the DPPH assay in comparison with the values obtained from the ABTS assay. A possible explication for this could lie in the fact that the DPPH assay was measured at 515 nm (visible region wavelength) and coloured compounds such as the carotenoids present in the fruits show an absorption spectrum similar to that of the DPPH, which can cause interference in the measurement [6]. This result was also reported in a study carried out on the peel, pulp and seeds of the fruit *Canarium odontophyllum* [13].

The antioxidant activity values of carotenoids extract obtained in this work for the 19 fruits evaluated with both assays (ABTS and DPPH) are similar to or lower than those reported by Kljak and Grbeša [18] and Zanfini *et al.* [19] for carotenoid extracts from six varieties of corn (*Zea mays L.*), a high yielding hybrid produced in Croatia (values between 58.7 and 89 μM Trolox/100 g of edible portion) and for lipophilic extracts of three varieties of tomato commercialized in a local market of Siena, Italy: Naomi, Ikram and Eroe (values between 9 and 28 μM Trolox/100 g of edible portion), respectively.

It is important to note that the antioxidant activity values of the carotenoids extract from the fruits analysed by both methods, DPPH and ABTS, were found to be lower than the values obtained from the antioxidant activity of soluble phenolic compounds in these same fruits evaluated by Moo-Huchin *et al.* [6] (values ranging from 359.6 to 684.78 μM Trolox/100 g and from 113 to 380.66 μM Trolox/100 g, for the ABTS and DPPH assays, respectively). However, this result confirms that both bioactive compounds (phenolic and carotenoid compounds) contribute to the antioxidant activity of the fruits grown in Yucatan, Mexico.

6.3.4.3. Composition of individual carotenoids from the tropical fruits studied.

In this research paper, four carotenoids (two xanthophyll's and two carotenes) were identified and quantified by HPLC in the edible portion of a group of tropical fruits grown in Yucatan, Mexico (Table 6.13). According to the chromatogram of carotenoid standards and fruit samples evaluated, the elution order and retention time of these pigments was: lutein (3.3 min), β -cryptoxanthin (6.3 min), lycopene (7.5 min) and β -carotene (13.5 min) (Figure 6.2).

The yellow cashew presented the highest level of β -carotene, with a concentration of 17,441.8 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion (Table 4). Lutein, classified as xanthophylls, was detected in all the fruits studied and was also the most abundant pigment found in yellow nance (551.66 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion). Scientific research has revealed that low levels of lutein in blood plasma have been associated with a greater risk of cardiac arrest [20]. Other reports indicate that lutein is responsible for maintaining a normal visual function of the macula in the human eye [21]. In the macula, lutein and zeaxanthin absorb blue light and mitigate the effects of the photo-oxidation caused by excessive blue light, thereby reducing chromatic anomalies of the eye. In people over 64 years of age, visual sensitivity depends directly on the concentrations of lutein and zeaxanthin in the retina [22]. Since lutein cannot be synthesized by humans and must be obtained through the ingestion of foods containing this compound, consumption of the 19 fruits included in this study is recommended given their high content of this pigment.

Table 6.13. Carotenoids contents of nineteen tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Fruit	Xanthophylls		Carotenes		Vitamin A
	Lutein ($\mu\text{g}/100\text{ g}^*$)	β -cryptoxanthin ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Lycopene ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	β -carotene ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	RE ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Custard apple	11.0 \pm 0.3	n.d	12.7 \pm 0.0	64.1 \pm 1.8	10.7 \pm 0.3
Ilama	11.7 \pm 0.2	n.d	n.d	80.6 \pm 1.7	13.4 \pm 0.2
Purple star apple	3.9 \pm 0.0	n.d	2.6 \pm 0.1	151.8 \pm 20.7	25.3 \pm 3.4
Green star apple	1.1 \pm 0.0	n.d	3.4 \pm 0.2	93.3 \pm 17.2	15.5 \pm 2.8
Sapodilla	2.9 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	58.8 \pm 8.7	9.8 \pm 1.4
Red mombin	530.2 \pm 8.7	13.7 \pm 0.0	29.6 \pm 0.1	3661.5 \pm 34.7	611.4 \pm 5.7
Green-yellow mombin	390.7 \pm 7.1	19.7 \pm 0.7	n.d	3367.5 \pm 143.6	562.9 \pm 23.9
Mamey sapote	14.3 \pm 0.1	4.1 \pm 0.0	720.3 \pm 4.9	2022.9 \pm 4.2	337.5 \pm 0.7
Yellow cashew	11.7 \pm 2.0	11.5 \pm 0.5	66.5 \pm 0.4	17441.8 \pm 448.3	2907.9 \pm 74.6
Red cashew	22.4 \pm 1.4	6.5 \pm 0.0	n.d	11995.0 \pm 69.1	1999.7 \pm 11.5
Yellow nance	551.6 \pm 50.4	n.d	94.4 \pm 10.6	1402.4 \pm 109.8	233.7 \pm 18.3
Red nance	288.3 \pm 16.3	n.d	8.5 \pm 0.3	1147.6 \pm 114.8	191.2 \pm 19.1
Green nance	406.2 \pm 8.9	n.d	11.0 \pm 2.1	2311.8 \pm 35.0	385.3 \pm 5.8
Dragon fruit	30.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.0	3.2 \pm 0.6	209.1 \pm 0.1	34.9 \pm 0.0
Purple sugar apple	4.3 \pm 0.0	n.d	0.6 \pm 0.0	n.d	0.0 \pm 0.0
Green sugar apple	4.1 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	57.6 \pm 5.4	9.6 \pm 0.9
Mamoncillo	61.6 \pm 1.2	3.5 \pm 0.6	n.d	7598.5 \pm 442.0	1266.7 \pm 73.7
White sapote	10.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	352.1 \pm 22.7	58.7 \pm 3.8
Black sapote	34.2 \pm 3.0	9.3 \pm 0.9	2.1 \pm 0.1	290.4 \pm 22.8	49.1 \pm 3.8

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

*Edible portion

n.d: not detected

RE= Retinol equivalent ($\mu\text{g } \beta$ -carotene/6) + ($\mu\text{g } \beta$ -cryptoxanthin/12)

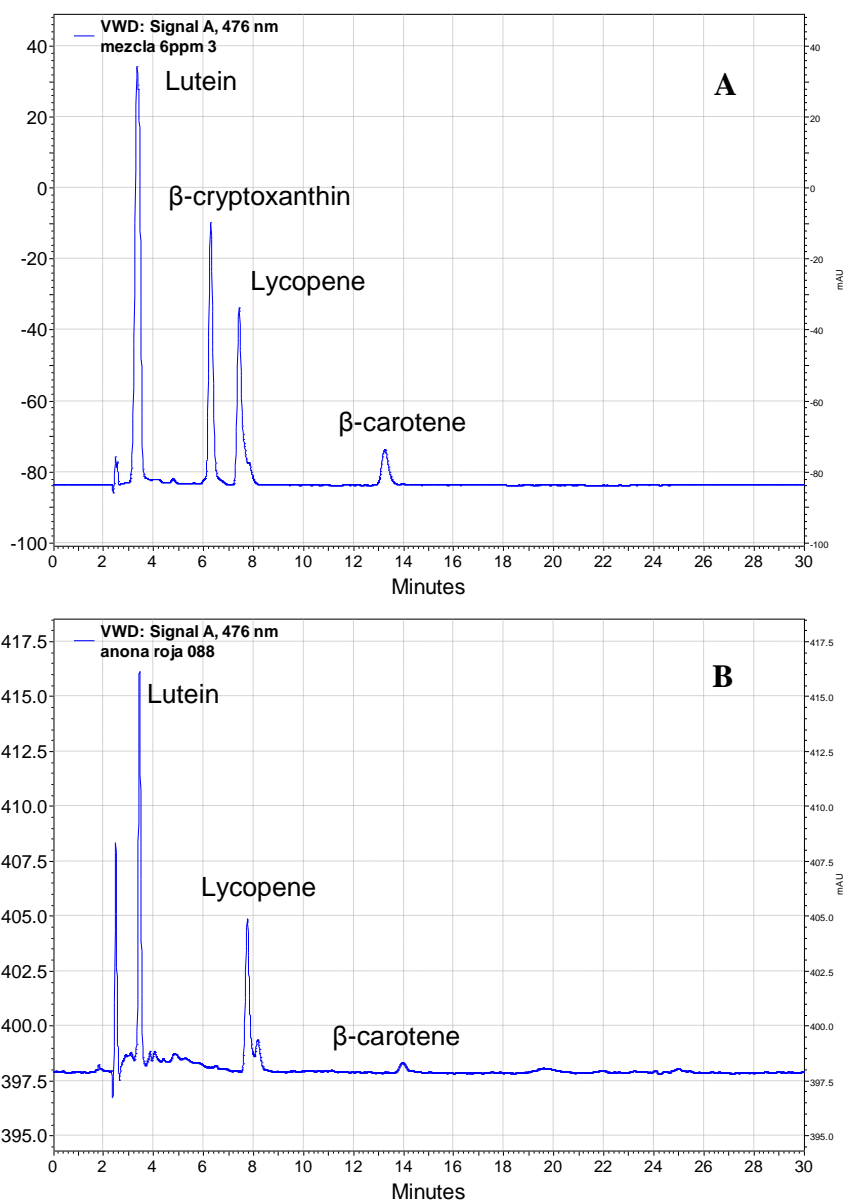


Figure 6.2. HPLC chromatograms for carotenoids. Carotenoid standards (A); Custard apple (B).

β -cryptoxanthin, a xanthophyll, was detected in 11 of the 19 fruits (values ranging from 0.25 to 19.74 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion), and was the predominant pigment in the green-yellow mombin.

β -carotene, classified as carotenes, was found in 18 of the 19 fruits (values between 57.60 and 17,441.88 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion), and was the most abundant compound in the yellow cashew.

Carotenoids such as β -carotene, α -carotene, γ -carotene and β -cryptoxanthin, are precursors of vitamin A, a potent antioxidant, and regulate the pathogenesis of various chronic degenerative diseases. Structurally, the vitamin (retinol) is half of the β -carotene molecule. This carotenoid is the most potent provitamin A and is widely distributed in many foods [23].

Furthermore, among the group of carotenes, lycopene was found in 15 of the 19 fruits analysed. The mamey sapote presented the highest lycopene content (720.35 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion), in comparison with all the other fruits studied herein.

Lycopene does not exhibit provitamin A activity and several studies have demonstrated its capacity to eliminate singlet oxygen [24]. A number of studies have shown that lycopene has a protective effect on lipids, low density lipoproteins (LDL), proteins and DNA molecules against the attack of free radicals, playing an essential role in protecting against diseases caused by oxidative stress [25].

The carotenoids composition of the 19 fruits studied is comparable to those reported for 75 fresh fruits consumed in Japan, such as watermelon, guava, papaya cv., fruit tower, grapefruit cv., star ruby grapefruit, melon, loquat cv., Fusahikari, Mexican mango, etc. [26].

Similarly, the levels of lutein, β -cryptoxanthin, lycopene and β -carotene reported in this paper are comparable to those of fruits and vegetables of Brazil, such as acerola, camu-camu, yellow cashew, red cashew, guava, mango, melon, papaya, watermelon, chili pepper, pumpkin, tomato and lettuce, among others [27]. These results indicate that the fruits studied in this work are a source of the main carotenoids of importance for human health. The information generated in this paper facilitates available data, which could be of use in estimating the intake of carotenoids from fruits grown in Yucatan, Mexico.

It is important to note that the individual carotenoid composition of the tropical fruit reported in this work, such as yellow nance and mamey, differ from those reported by Mariutti *et al.* [28] and Murillo *et al.* [8] for the same fruit. This difference could be attributed to the use of

different types of HPLC columns for the separation of pigments and the pore size of the column [29]. Khachik *et al.* [30] report that C18 columns (as used in this study) affect selectivity and show poor resolution in the separation of geometric isomers of carotenoids; whereas C₃₀ polymeric columns favor high resolution in the separation of carotenoid isomers [31].

In this study, no correlation was observed between the content of each carotenoid and the antioxidant activity measured with the DPPH assay; while the contents of β -cryptoxanthin ($R=0.31$, $P\leq 0.05$) and lutein ($R=0.41$, $P\leq 0.05$) showed low correlation with the antioxidant activity measured with the ABTS assay. These results suggest that β -cryptoxanthin and lutein contents can contribute to the antioxidant activity of the carotenoids of the fruits under study. However, it is possible that other bioactive substances present in the fruit extract or the synergic interaction between individual carotenoids and other antioxidants may be contributing to the antioxidant activity.

Vitamin A deficiency (VAD) is one of the most common and most devastating deficiencies in the world, particularly in developing tropical countries. Recent reports have indicated that around 4 million children suffer from severe VAD, including 250,000-500,000 who experience xerophthalmia and partial or total blindness as a result of VAD [32].

In this work, significant levels of β -cryptoxanthin and β -carotene were found in the fruits analysed and both possess provitamin A activity; therefore, the biological activity of vitamin A for these carotenoids was calculated and expressed in terms of equivalent to μg of retinol (RE)/100 g of edible portion (Table 4). Vitamin A activity was calculated in terms of retinol equivalents based on the *in vivo* conversion factor proposed by the WHO and NRC [33, 34], in which $1 \text{ RE} = 1 \mu\text{g}$ of retinol = $6 \mu\text{g}$ of β -carotene or $12 \mu\text{g}$ of β -cryptoxanthin.

Provitamin A activity of the carotenoids from the fruits under study was found in a range of 0-2,907.94 RE in 100 g of edible portion. Of all the fruits studied, the purple sugar apple was found to have no carotenoids with provitamin A activity. The mamoncillo ($1,266.72 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ of edible portion), red cashew ($1,999.72 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ of edible portion) and yellow cashew ($2,907 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ of edible portion) obtained high RE values in comparison with the other fruits.

Red nance, yellow nance, mamey sapote, green nance, green-yellow mombin and red mombin showed moderate RE values (ranging from 191.27 to 611.41 $\mu\text{g}/100$ g of edible portion). All of these results are higher than those found for different cultivars of banana in India (values from 1.91 to 106.0 $\mu\text{g RE}/100$ g of edible portion) [35].

Green sugar apple, sapodilla, custard apple, ilama, green star apple, purple star apple, dragon fruit, black sapote and white sapote exhibited values below 60 $\mu\text{g RE}/100$ g of edible portion. This last group of fruits showed higher RE values in comparison with those reported for 94 cultivars of fruits of the species *Artocarpus* [36].

These results suggest that the group of fruits studied herein show considerable levels of retinol equivalents that could represent a significant contribution to vitamin A requirements in the diet of the local population.

6.3.5. CONCLUSIONS

In this study, significant levels of carotenoids with antioxidant activity were found in 19 tropical fruits from Yucatan, Mexico. These pigments not only contribute to the attractive colour of the fruits but also are also important due to the provitamin A activity of some of the compounds.

Lutein, β -cryptoxanthin, β -carotene and lycopene were the most abundant pigments in yellow nance, green-yellow mombin, yellow cashew and mamey sapote, respectively.

There was a positive correlation between antioxidant activity and β -cryptoxanthin and lutein by the ABTS.

Generally speaking, it is possible to conclude that these results indicate a perspective for the exploitation and use of these tropical fruits in the diet, given their antioxidant activity and the content of specific carotenoids most beneficial in conserving human health.

6.3.6. REFERENCES

1. Wei X., Chen C., Yu Q., Gady A., Yu Y., Liang G. and Gmitter Jr F., Comparison of carotenoid accumulation and biosynthetic gene expression between Valencia and Rohde Red Valencia sweet oranges, *Plant. Sci.*, 2014; **227**:28–36.
2. Han R.M., Zhang J.P. and Skibsted L.H., Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants, *Molecules*, 2012; **17**:2140–2160.
3. Stahl W., Nicolai S., Briviba K., Hanusch M., Broszeit G., Peters M., Martin H.D. and Sies H., Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap functional communication and singlet oxygen quenching, *Carcinogenesis*, 1997; **18**:89–92.
4. Bertram J.S. and Vine A.L., Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; **1740**:170–178.
5. Cantrell A., McGarvey D.J., Truscott T.G., Rancan F. and Böhm, F., Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003; **412**:47–54.
6. Moo-Huchin V.M., Estrada-Mota I., Estrada-León R., Cuevas-Glory L., Ortiz-Vázquez E., Vargas M.L., Betancur-Ancona D. and Sauri-Duch E., Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico, *Food Chem.*, 2014; **152**:508–515.
7. Siqueira E.M., Rosa F.R., Fustinoni A.M., De Sant’Ana L.P. and Arruda S.F., Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional Red Delicious apple, *PLoS ONE*, 2013; **8**:1–7.
8. Murillo E., Giuffrida D., Menchaca D., Dugo P., Torre G., Meléndez-Martínez A. J. and Mondello L., Native carotenoids composition of some tropical fruits, *Food Chem.*, 2013; **140**: 825–836.
9. Moo-Huchin V.M., Estrada-Mota I.A., Estrada-Leon R.J., Ortiz-Vázquez E., Pino-Alea J., Quintanar-Guzman A., Cuevas-Glory L. and Sauri-Duch E., Responses of sapodilla

- fruit (*Manilkara zapota* [L.] P. Royen) to postharvest treatment with 1-methylcyclopropene, *Afr. J. Agric. Res.*, 2013; **8**:1050–1058.
10. Chen J.P., Tai C.Y. and Chen B.H., Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.), *J Chromatogr. A*, 2004; **1054**:261–268
 11. Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. and Techol.*, 1995; **28**: 25–30
 12. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V. and Milner A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 1993; **84**: 407–412.
 13. Prasad K.N., Yee L., Khoo H.E., Yang B., Azlan A. and Ismail A., Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. Fruit, *Food Chem.*, 2011; **124**:1549–1555.
 14. Jáuregui M.E., Carrillo M.C. and Pérez-Gil F., Carotenoides y su función antioxidante: Revisión, *Arch. Latinoam. Nut.*, 2011; **61**:233–241.
 15. Khoo H.E., Ismail A., Mohd-Esa N. and Idris S., Carotenoid content of underutilized tropical fruits, *Plant Foods Hum. Nut.*, 2008; **63**:170–175.
 16. Souza V.R., Pereira P.A., Queiroz F., Borges S.V. and Carneiro J.D., Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits, *Food Chem.*, 2012; **134**:381–386.
 17. Rodríguez E., Mariutti L. R., Chiste R. C. and Mercadante A. Z., Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure–activity relationship, *Food Chem.*, 2012; **135**: 2103–2111.
 18. Kljak K. and Grbeša D., Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids, *Food Chem.*, 2015; **167**:402–408.
 19. Zanfini A., Corbini G., Rosa C. and Dreassi E., Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2010; **43**:67–72.

20. Street D.A., Comstock G.W., Salkeld R.M., Schuep W. and Klag M., Serum antioxidants and myocardial infarction: Are low levels of carotenoids and α -tocopherol risk factors for myocardial infarction?, *Circulation*, 1994; **90**:1154–1161.
21. Le M. and Xiao-Ming L., Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health, *J. Sci. Food Agric.*, 2010; **90**:2–12.
22. Landrum J.T. and Bohne R., Luteín, zeaxanthin and the macular pigment, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001; **385**:28–40.
23. Niizu P.Y. and Rodríguez-Amaya D.B., New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables, *J. Food Comp. Anal.*, 2005; **18**:739–749.
24. Krinsky N.I., Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998; **218**:95–97.
25. Agarwal S. and Rao A.V., Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases, *Can. Med. Assoc. J.*, 2000; **163**:739–744.
26. Yano M., Kato M., Ikoma Y., Kawasaki A., Fukazawa Y., Sugiura M., Matsumoto H., Oohara Y., Nagao A. and Ogawa K., Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan, *Food Sci. Technol. Res.*, 2005; **11**:13–18.
27. Rodríguez-Amaya D.B., Kimura M., Godoy H.T. and Amaya-Farfan J., Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition, *J. Food Comp. Anal.*, 2008; **21**:445–463.
28. Mariutti L. R., Rodrigues E. and Mercadante A. Z., Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals, *J. Food Comp. Anal.*, 2013; **31**:155–160.
29. Epler K. S., Sander L. C., Ziegler R. G., Wise S. A. and Craft N. E., Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids, *J. Chromatogr. A.*, 1992; **595**: 89–101.
30. Khachik F., Beecher G. R. and Whitaker N. F., Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of

- several green vegetables by liquid chromatography, *J. Agr. Food Chem.*, 1986; **34**:603–616.
31. Sander L. C., Sharpless K. E., Craft N. E. and Wise S. A., Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers, *Anal. Chem.*, 1994; **66**: 1667–1674.
 32. WHO, Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. *World Health Organization*, Technical report series No. 672: Report of a joint WHO/UNICEF/Helen Keller International/IVACG meeting, 1982.
 33. WHO, Global Prevalence of Vitamin A Deficiency in Populations At Risk 1995-2005. *WHO Global Database on Vitamin A Deficiency*. The World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2009.
 34. National Research Council, In *Recommended dietary allowances*. Washington, DC: National Academy Press, 10 ed., 1989.
 35. Lokesh V., Divya P., Puthusseri B. and Manjunatha G., Profiles of carotenoids during post-climacteric ripening of some important cultivars of banana and development of a dry product from a high carotenoid yielding variety, *LWT-Food Sci. and Techol.*, 2014; **55**:59–66.
 36. Jones A.M., Baker R., Ragone D. and Murch S.J., Identification of pro-vitamin A carotenoid-rich cultivars of breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae), *J. Food Comp. Anal.*, 2013; **31**:51–61.

6.4. Phenolic compounds, classification and cytotoxic activity of tropical fruits

Víctor M. Moo-Huchin^{a*}, Gustavo A. González-Aguilar, Luis Cuevas-Glory^b, Elizabeth Ortiz-Vázquez^b, María de Lourdes Vargas y Vargas^b, Enrique Sauri-Duch^b

^aInstituto Tecnológico Superior de Calkiní, Av. Ah-Canul, C.P. 24900, Calkiní, Campeche, México. ^bInstituto Tecnológico de Mérida, C.P. 97118, km 5 Mérida-Progreso, Mérida, Yucatán, México.

En preparación para Journal of Food Research

***Corresponding author**

E-mail address: vmoo@itescam.edu.mx

6.4.1. Abstract

The tropical ecosystem of Yucatan, located in the Southeast of Mexico, is rich in edible fruits which are widely consumed in rural areas; however, little is known of their bioactive phenolic compound content and toxicity. The aim of this study was to determine the content of individual phenolic compounds, toxicity and the classification of fruits (according to their functional characteristics) (star apple, cashew, mombin, mamey sapote, white sapote, sugar apple, sapodilla, dragon fruit, nance, ilama, custard apple, mamoncillo and black sapote) cultivated in the rural communities of Yucatan, Mexico. Twelve phenolic compounds were identified in the fruits (four hydroxycinnamic acids, two hydroxybenzoic acids, two flavanols and four flavonols), in which the red nance contained the highest level of caffeic acid, with a concentration of 596.8 mg/100 g of edible portion. Cytotoxic activity revealed that the fruits did not present toxicity for the cell. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) facilitated the classification of the fruits into four groups, where the first group corresponded to fruit with high antioxidant activity and a high content of total phenolic compounds. The results suggest that the fruits cultivated in Yucatan, Mexico can be considered as a source of natural antioxidants for the diet and for the development of new products given the presence of diverse phenolic compounds and their non-toxic properties.

Keywords: Phenolic compounds, tropical fruits, antioxidant activity

6.4.2. Introduction

Extensive epidemiological studies have established that a balanced diet including plentiful consumption of fresh fruits and vegetables helps in maintaining a healthy life (Pierson et al., 2012).

Nowadays, the consumption of tropical fruits is increasing in both domestic and international markets due to growing recognition of its nutritional and therapeutic value (Cardoso, Martino, Moreita, Ribeiro, & Sant'ana, 2011). The global consumers demand and are prepared to pay for new appealing and exotic foods, tropical fruits are now being more intensively investigated (Pierson et al., 2012).

Fruits are important components of our daily diet that contain various bioactive nutraceuticals, which enhance our body's strength to fight various illnesses. Various ethnically and geographically specific fruits are used in traditional therapies for treatment of various health problems (Devalaraja et al., 2011).

The tropical ecosystem of Yucatan, located in the Southeast of Mexico, is rich in edible fruits which are widely consumed in rural areas; however, little is known of their content of bioactive phenolic compounds and toxicity.

Yucatan, Mexico possesses a geographical region with suitable climatic conditions for a large number of native fruits (star apple, cashew, mombin, mamey sapote, white sapote, sugar apple, sapodilla, dragon fruit, nance, ilama, custard apple, mamoncillo, black sapote, entre otros) that may possess an excellent agro-industrial potential, thus representing an interesting economic income for local growers. The evaluation of their bioactive properties will thus strengthen its position in the market, reaching either specific markets created by consumers' demand for new products able to maintain health and preventing diseases, as well as the growing market of functional ingredients (Paz et al., 2015).

Polyphenols and major classes of compounds like flavonoids or carotenoids are ubiquitously present in tropical fruits. Bioactivity studies of compounds specific to tropical fruit plants may lead to new drug discoveries, while the synergistic action of the wide range of

diverse compounds contained in plant extracts underlies nutritional and health properties of tropical fruits and vegetables (Pierson et al., 2012).

High polyphenol intake from fruits and vegetables has been associated with decreased risk for cardiovascular disease and other developing degenerative diseases, as suggested by several epidemiologic and intervention studies (Carvalho et al., 2010; Ibrahim, Ismail, Al-Sheraji, Azlan, & Abdul Hamid, 2013). This is because fruits and vegetables contain antioxidant compounds, such as flavonoids, carotenoid, and polyphenols, which have protective effects to human body (Ashraf, Maah, & Yusoff, 2010). These compounds help our body to balance out the ratio with free radical by scavenging free radicals, decomposing peroxides, and making complex of redox-catalytic metal ions (de Oliveira et al., 2009).

Fruits have been the subject to several studies conducted around the world, reporting in their nutritional values, data especially in relation to the evaluation of antioxidant activity (Almeida et al., 2011; Contreras-Calderón, Calderón-Jaimes, Guerra-Hernández, & García-Villanova., 2011; Paz et al., 2015).

A review of the literature has revealed very few studies focusing on the local fruits of Yucatan, in relation to their bioactive phenolic content and toxicity. Moreover, although the content of bioactive compounds and antioxidant activity has been reported by our research group (Moo-Huchin et al., 2014), the fruits have yet to be classified, based on their functional characteristics, in order to identify their potential as functional food and functional ingredients. Therefore, the main objectives of this study were: (i) to quantify polyphenols present in edible portion of a group of tropical fruits from Yucatan, Mexico using High Performance Liquid Chromatography (HPLC); (ii) to apply multivariate statistical analysis, to classify the fruits according to the data of potential bioactive previously reporter by our working group; (iii) to assess the cytotoxicity of extracts of fruits studied.

6.4.3. Materials and methods

6.4.3.1. Samples

Nineteen fruits, which are commonly cultivated and consumed in Yucatan, Mexico, were chosen for this study (Table 6.14). About 5 kg of each species fruits (except sapodilla) were purchased at eating ripeness from the local markets in Yucatan, Mexico during 2012.

5 kg of sapodilla fruits were harvested from a single tree from an orchard located in the municipality of Cansahcab, in Yucatan, Mexico and were identified according to quality based on the stage of physiological maturity and determined by the absence of latex. The fruits were stored at 25°C to reach an eating ripeness according to Moo-Huchin et al. (2013).

The fruits without blemishes or damage were selected and sent to the laboratory for edible parts extraction. After the fruits had been cleaned with tap water, edible part were extracted manually with a knife and then were then mixed in a blender, stored in sealed plastic bags at -20°C until the time of analyses.

Table 6.14. List of the species tropical fruits from Yucatan included in the study and parts analyzed.

English name	Common name	Scientific name	Used edible part
Custard Apple (1)	Anona roja	<i>Annona reticulata</i>	Pulp
Ilama (2)	Anona	<i>Annona diversifolia</i>	Pulp
Purple star apple (3)	Caimito morado	<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	Pulp
Green star apple (4)	Caimito verde	<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	Pulp
Sapodilla (5)	Chicozapote	<i>Manilkara sapota</i> L.	Pulp
Red mombin (6)	Ciruela roja	<i>Spondias purpurea</i> L.	Pulp+peel
Green-yellow mombin (7)	Ciruela verde-amarillo	<i>Spondias purpurea</i> L.	Pulp+peel

Mamey sapote (8)	Mamey	<i>Pouteria sapota</i> Jacq.	Pulp
Yellow cashew (9)	Marañón amarillo	<i>Anacardium occidentale</i>	Pulp
Red cashew (10)	Marañón rojo	<i>Anacardium occidentale</i>	Pulp
Yellow nance (11)	Nance amarillo	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Pulp+peel
Red nance (12)	Nance rojo	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Pulp+peel
Green nance (13)	Nance verde	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Pulp+peel
Dragon fruit (14)	Pitahaya	<i>Hylocereus undatus</i> Haworth	Pulp+seed
Purple sugar apple (15)	Saramuyo morado	<i>Annona squamosa</i> L.	Pulp
Green sugar apple (16)	Saramuyo verde	<i>Annona squamosa</i> L.	Pulp
Mamoncillo (17)	Uaya	<i>Melicoccus bijugatus</i> (Jacq.)	Pulp
White sapote (18)	Zapote blanco	<i>Lucuma hypoglauca</i> Stanley	Pulp
Black sapote (19)	Zapote negro	<i>Diospyros digyna</i>	Pulp

6.4.3.2. Analysis of antioxidant compounds

6.4.3.2.1. Determination of total soluble phenols (TSP) and total flavonoids

The 80% methanol has been used to assure the maximum extraction of soluble phenols and flavonoids of tropical fruits such as mature green mangos cv. ‘Ataulfo’ and Irwin mango (Robles-Sánchez, et al., 2011; Shivashankara, Isobe, Al-Haq, Takenaka, & Shiina, 2004). TSP and flavonoid compounds were extracted using 1 g of edible part of each fruit, which was homogenized in 10 mL of 80% methanol (Moo-Huchin et al., 2014). The homogenated extract was sonicated for 30 min at 40°C and centrifuged in an Eppendorf centrifuge, model 5702 R, at 1200 x g for 10 min at room temperature. The supernatant was collected, and the sediment was subjected to an additional extraction using the same procedure. Both supernatants were mixed and stored at -20°C until analysis. Total soluble phenols were determined according to

Singleton and Rossi (1965). Briefly, 50 μL of extracts were mixed with 3 mL of deionized water and 250 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1N). After 8 min of equilibrium, 750 μL of 20% Na_2CO_3 and 950 μL of H_2O were added to the extracts; after incubation for 30 min at room temperature, the absorbance was read at 765 nm with a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total soluble phenols compound was calculated using a standard curve of aqueous solutions of gallic acid (0-10 ppm) and expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g fresh weight (FW).

Flavonoid content was determined according to methods described by González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Martínez-Téllez, Gardea, and Ayala-Zavala (2007). 1 mL from each extracted sample was mixed and equilibrated with 4 mL of deionized water and 300 μL 5% NaNO_2 for 5 min. After equilibrium, 300 μL of 10% AlCl_3 (methanolic solution) were added; the mixture was allowed to sit for 1 min and then 2 mL of 1 M NaOH were added. The last volume was completed to 10 mL with H_2O , stirred, and readings were taken. Mixture absorbance was determined at 415 nm, using a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. Concentration of total flavonoids of fruits was calculated using a standard curve of quercetin (0-60 ppm) and expressed as mg quercetin equivalents (QE)/100 g of FW.

6.4.3.2.2. Total anthocyanins

Anthocyanins were extracted from 1 g of edible parts of each fruit with 30 mL of 95% ethanol/1.5 M HCL (85:15, v:v) (Moo-Huchin et al., 2014). The extract was transferred to a 50 mL volumetric flask, completing the volume with 1.5 M ethanol-HCL and stored for 12 h at 4°C. After filtration, the absorbance was measured in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11 at 535 nm. The total anthocyanin content was determined applying the Lambert-Beer law, calculated as mg/100 g of FW, through the formula: $A_{535} \times \text{dilution factor} / E_{1\text{cm},535}^{1\%}$; where A_{535} is the absorbance in the diluted sample and $E_{1\text{cm},535}^{1\%}$ is the values factor (98.2) of molar absorptivity for the acid-ethanol solvent and it refers to the absorption of a mixture of cranberry anthocyanins in acid-ethanol, measured in a 1 cm-cell at 535 nm, at a concentration of 1% (w/v).

6.4.3.2.3. Total carotenoids

Extraction of carotenoids was carried out according to the method developed by Chen, Tai, and Chen (2004). 10 g of edible parts of each fruit were mixed with 50 mL of hexane:acetone:ethanol (70:15:15, v/v/v) containing 0.05% BHT. The mixture was stirred for 1 h using an orbital shaker. Afterwards, 5 mL of 40% KOH in methanolic solution were added, and the solution was saponified at 25°C in the dark for 2 h. Subsequently, 30 mL of hexane were added, the mixture was shaken vigorously and the upper layer was collected. The lower layer was extracted twice and the supernatant was also collected and filtered through sodium sulphate powder to remove traces of water. The supernatant obtained was pooled and taken for analysis. Total carotenoid content was determined spectrophotometrically at 450 nm in a UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. A calibration curve (0-50 ppm) was prepared using β -carotene in hexane as the standard and hexane as the blank. The results were expressed as mg β -carotene/100 g of FW.

6.4.3.2.4. Vitamin C

For vitamin C determination the titrimetric method with 2,6-dichlorophenolindophenol reagent (AOAC-Association of Official Analytical Chemists, 1995) with some modifications was applied. 5 g of homogenized edible part fruits was mixed with 100 mL of a solution of oxalic acid (4%). The mixture was homogenized and filtered. 5 mL of filtrated solution were diluted to 10 mL with 4% oxalic acid solution. This solution was titrated with 0.01% of 2,6-dichloro-phenol-indophenol solution. The end point was considered to be when the solution had attained a pink color which persisted for 15 s. The calibration of 2,6-dichlorophenolindophenol solution was performed with 0.05% ascorbic acid solution. Results were expressed as mg of ascorbic acid equivalents per 100 g of FW.

6.4.3.3. Antioxidant capacity (AOC)

Extraction of antioxidant compounds was done according to the method of Moo-Huchin et al. (2014). 5 g of edible parts of each fruit were homogenized in 10 mL of acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v), sonicated for 30 min in an ultrasonic bath Grant

XB3 (Boekel Scientific, Inc, Pennsylvania Blvd.) and then centrifuged for 15 min at 15,000 g. The supernatant was collected, and the sediment was subjected to an additional extraction using the same procedure. Both supernatants were mixed and these constituted the extracts for AOC analysis and analysis of phenolic compounds. According to Kajdžanoska, Petreska, and Stefova (2011), this extraction method enables the collection of soluble phenols, flavonoid glycosides, procyanidins, and certain oligomeric and polymeric proanthocyanidins from strawberries.

DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was conducted according to the Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) technique with some modifications. The stock solution was prepared by mixing 2.5 mg of DPPH radical with 100 mL of methanol. The solution absorbance was adjusted at 0.7 ± 0.02 in 515 nm using an UV-Vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 11. 3.9 mL of DPPH radical were placed in a test tube and 100 μ L of the antioxidants extract or standard were added (methanol was used as blank). The decrease in absorbance at 515 nm was measured at 1 min intervals for the first 10 min, and then at 5 min intervals until stabilization. Based on a preliminary study, the time required to obtain DPPH readings of each fruit peel was 30 min. Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as standards and results (AOC) are expressed as μ M Trolox equivalents/100 g of FW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of FW.

The ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) assay was conducted according to Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, and Milner (1993). ABTS \bullet^+ cation was generated through the interaction of 19.2 mg of ABTS dissolved in 5 mL of HPLC-grade water and 88 μ L of 0.0378 g/mL potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) The cation was incubated in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS activated radical was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After the addition of 30 μ L of antioxidants extract or standard to 2970 μ L of diluted ABTS solution, absorbances were recorded 6 min after mixing. Two calibration curves were prepared using Trolox and ascorbic acid as a standard and results (AOC) are expressed as μ M Trolox equivalents/100 g of FW and ascorbic acid equivalents in mg/100 g of FW.

6.4.3.4. Analysis of phenolic compounds

Identification and quantification of individual phenolics were carried out using HPLC-1220 Agilent equipped with a UV-visible detector at 280 nm (Moo-Huchin et al., 2015). Extracts were prepared as mentioned previously (section 6.4.3.3) and were evaporated at 40°C using a rotary evaporator (Buchi R-205, Labortechnik, Switzerland). The residue was reconstituted in 5 mL of methanol and taken to 10 mL with HPLC water. An aliquot was filtered through a 0.45 µm membrane and aliquots of 20 µL were injected in the HPLC system. A 250 x 4.6 mm i.d., 5µm, Nucleosil C18 column was used (operated at 25°C). Mobile phase consisted of 1% formic acid (98%) (A) and acetonitrile (2%) (B), at a flow rate of 0.5 mL/min. Elution gradient was 2 to 100% (B) from 0 to 70 min (Yahia, Gutierrez-Orozco, & Arvizu-De Leon, 2011). The following individual phenolic standards were purchased from Sigma Aldrich: gallic, caffeic, ellagic, trans-cinnamic, quercetin, catechin, epicatechin, ferulic, myricetin, sinapic, *p*-hydroxybenzoic and kaempferol. Calibration curves for each standard were prepared for quantification.

6.4.3.5. Assessment of cytotoxicity

The SRB assay was performed to assess growth inhibition by a colorimetric assay that estimates cell number indirectly by staining total cellular protein with SRB dye (Rahman *et al.*, 2001). To obtain the raw extracts, the residue obtained from the evaporation (in vacuo) of the extract from the antioxidant compounds described in section 6.4.3.4 was subjected to freezing at -70°C and dried by lyophilization. For subsequent use, the dry extracts were weighed and diluted in dimethylsulphoxide in order to obtain concentrated solutions.

Cytotoxic activity of the extracts was evaluated on Vero cell lines. The line was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, sigma) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 10,000 U of penicillin, 10 mg/mL of streptomycin and 2.5 µg/mL of amphotericin B. The cell cultures were maintained in an atmosphere with 95% humidity and 5% CO₂ at 37 °C.

The bioassay was performed in 96-well tissue culture plates; 100 μ L of the medium with 5% of FBS was added to each well with a cellular density of 50,000 cells/mL and incubated for 24 hrs, after which the medium was removed and 100 μ L of new medium without FBS was added. A further 100 μ L of medium was added to the solutions in which the extracts were previously dissolved and finally serial dilutions were made, evaluating the extracts in a range of 25-3.125 μ g/mL. The plates were then incubated for 48 hrs after which the medium was discarded and the cells were fixed with 50 μ L of trichloroacetic acid at 10%, followed by an incubation period of 30 min at 4°C. The supernatant was removed and 50 μ L of a dilution of sulforhodamine (0.1% sulforhodamine in acetic acid at 1%) was added and left to react for 15 min. Finally, the supernatant was discarded and four rinses were performed with a solution of acetic acid at 1%. The tincture was dissolved with 100 μ L of a tris-base solution (10 mM) and optical density (OD) was determined at 540 nm. Cytotoxic activity was determined using the following formula $(OD \text{ control} - OD \text{ extract} / OD \text{ control}) \times 100$. Evaluations on the cell line were performed in quadruplicate and the cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) was determined with the GraphPad Prim 4 program.

6.4.3.6. Statistical analysis

All extraction assays were carried out in triplicate and a duplicate of each extract was analyzed. Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). Two multivariate exploratory techniques, Principal Components Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), were applied to classify the tropical fruits using Statgraphics Plus, version 5.1, 2000. For PCA, the antioxidant compounds and antioxidant activity were used as variables in the derivation of the principal components. The HCA hierarchical tree was obtained considering the same variables of PCA, and the fruits were grouped by unweighted pair-group average as the linkage rule considering the Euclidian distance as the coefficient of similarity.

6.4.4. Results and discussion

6.4.4.1. Composition of individual phenolic compounds from evaluated tropical fruits.

Phenolic compounds are plant secondary compounds that are quite widespread in nature (Silva et al., 2011). Their antimicrobial, antioxidant and anticancer activities, between many others, are well known and widely documented (Cheng et al., 2007; Russo, 2007). In this paper, twelve phenolic compounds were identified and quantified in the edible portion from tropical fruits studied (table 6.15). From these, four were hydroxycinnamic acids (ferulic, caffeic, trans-cinnamic and sinapic); two were hydroxybenzoic acids (gallic and ellagic); two were flavanols (epicatechin and catechin) and four were flavonols (Kaempferol, quercetin, myricetin and isorhamnetin). A typical chromatogram of the detected phenolic compounds of red cashew and green-yellow mombin is shown in figure 6.3.

By comparing the phenolic compounds to all fruits, the red nance contained the highest level of caffeic acid, with concentration of 596.8 mg/100 g of edible portion. Caffeic acid is extremely abundant in many fruits and has shown to possess potent antioxidant activity (The antioxidant activity of caffeic acid is 2.33 times higher than that of ascorbic acid) (He & Liu, 2008).

Ferulic, trans-cinnamic and isorhamnetin were the most abundant phenolic compounds in the red cashew. Myricetin and catechin were the most abundant phenolic compound in mamey sapote and red mombin, respectively. Ellagic and gallic were the most abundant phenolic compound in green-yellow mombin. Epicatechin and kaempferol were the most abundant phenolic compound in dragon fruit. Quercetin and sinapic acid were the most abundant phenolic compounds found in red nance and green nance, respectively. These phenolic compounds found in the edible portion from tropical fruits were identified in *Solanum torvum* fruits, Açai fruits and *Dracaena draco* fruit (Ramamurthy et al., 2012; Gordon et al., 2012; Silva et al., 2011).

All the phenolic compounds reported in this work are of particular importance given that the fruits containing these bioactive substances are consumed in the local communities of the

Mexican Southeast; however, there is a need to promote the cultivation and consumption of these fruits grown in Yucatan in order to reach new markets.

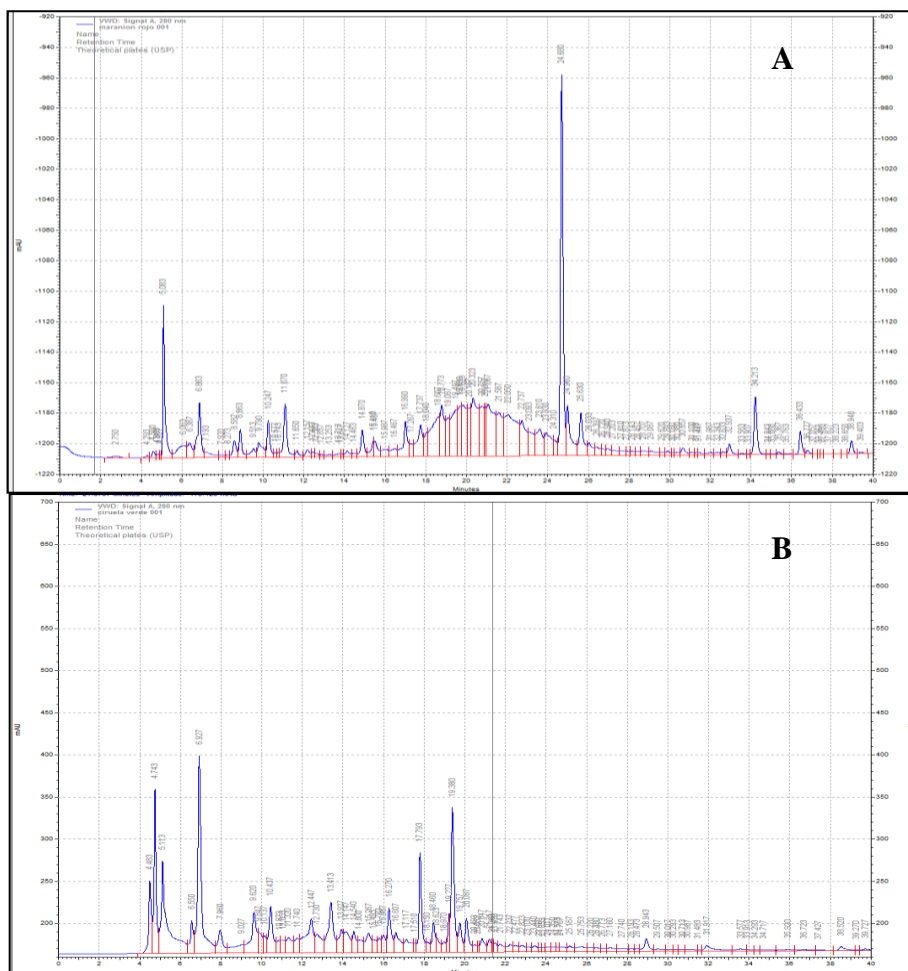


Figure 6.3. HPLC chromatograms for phenolic compounds. Red cashew (A); green-yellow mombin (B).

Tabla 6.15. Contents of individual phenolic compounds (mg/100 g of edible portion) in tropical fruits from Yucatan, Mexico.

Phenolic compounds	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ferulic acid	0.7±0.0	0.4±0.0	0.02±0.0	0.17±0.01	0.03±0.00	nd	1.03±0.03	nd	0.5±0.0	7.3±0.0	nd	Nd	nd	nd	0.07±0.00	0.08±0.00	1.03±0.03	nd	0.78±0.01
Caffeic acid	386.9±4.3	449.7±0.3	367.6±3.3	548.9±1.5	313.7±1.8	329.8±0.2	308.7±1.7	313.8±1.5	307.5±2.0	349.1±1.2	325.1±6.9	596.8±4.5	nd	369.5±0.5	346.4±5.0	357.2±3.8	319.6±0.4	397.9±2.9	375.8±5.8
Trans-cinammic acid	Nd	0.4±0.0	0.3±0.0	nd	0.3±0.0	nd	0.4±0.0	nd	nd	0.7±0.0	0.6±0.0	0.38±0.02	0.4±0.0	nd	nd	0.38±0.02	0.38±0.02	0.39±0.01	nd
Sinapic acid	Nd	nd	Nd	2.4±0.1	0.7±0.0	1.7±0.1	nd	nd	0.3±0.0	nd	0.5±0.0	8.5±0.5	nd	nd	3.4±0.0	nd	nd	nd	1.3±0.1
Gallic acid	4.7±0.0	5.3±0.1	66.4±0.6	5.1±0.0	5.8±0.0	63.8±0.1	114.5±0.6	nd	14.8±0.0	25.3±0.1	13.9±0.1	65.8±0.1	27.1±0.0	4.5±0.1	3.8±0.0	4.07±0.03	4.8±0.0	7.5±0.2	4.2±0.0
Ellagic acid	Nd	10.9±0.0	6.6±0.4	8.0±0.1	5.7±0.3	7.8±0.1	60.5±0.7	5.9±0.1	6.7±0.3	7.7±0.3	6.9±0.0	10.9±0.1	11.9±0.0	8.2±0.3	5.5±0.0	10.9±0.0	6.7±0.3	8.7±0.3	6.2±0.3
Epicatechin	13.7±0.4	8.7±0.1	4.9±0.0	0.4±0.0	8.7±0.0	4.9±0.1	nd	6.4±0.3	nd	nd	1.4±0.0	20.4±0.6	21.2±1.7	41.7±0.4	nd	nd	2.1±0.0	20.8±1.2	11.4±0.6
Catechin	3.2±0.2	8.4±0.0	3.3±0.2	5.8±0.2	0.6±0.0	36.9±0.1	5.5±0.5	4.0±0.1	nd	14.1±0.2	1.3±0.0	27.5±2.2	nd	2.7±0.1	12.6±0.9	nd	1.5±0.1	13.5±0.7	2.8±0.2
Kaempferol	Nd	nd	Nd	nd	0.5±0.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	4.8±0.1	0.16±0.00	nd	nd	nd	nd
Quercetin	Nd	nd	Nd	nd	0.8±0.0	nd	1.2±0.1	0.5±0.0	nd	nd	nd	0.2±0.0	1.3±0.1	nd	nd	nd	nd	nd	0.3±0.0
Myricetin	10.7±0.4	3.7±0.2	0.6±0.0	2.1±0.0	3.7±0.3	0.9±0.0	0.7±0.0	17.5±0.6	0.4±0.0	nd	nd	Nd	nd	nd	1.1±0.0	nd	nd	nd	9.7±0.3
Isorhamnetin	10.6±0.5	5.6±0.4	8.6±0.4	7.5±0.6	7.0±0.2	8.5±0.5	6.1±0.1	nd	6.7±0.4	15.0±0.1	7.9±0.0	6.9±0.1	5.9±0.0	7.7±0.3	5.7±0.2	6.6±0.5	5.7±0.3	5.9±0.1	nd

*Identifier of each fruit described in Table 6.14.

nd-not detected. Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

6.4.4.2. Classification of tropical fruits by multivariate statistical analysis

The content of antioxidant compounds (vitamin C, total anthocyanins, total phenolic compounds, total flavonoids and total carotenoids) and antioxidant activity of fruits cultivated in Yucatan (Tables 6.16 and 6.17) has already been widely discussed by Moo-Huchin et al. (2014). In the present work, a multivariate statistical analysis is applied taking into consideration the data pertaining to the bioactive compound content and antioxidant activity of these fruits for their classification based on their functional characteristics.

Table 6.16. Content of bioactive compounds in the edible part of tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	mg of vitamin C/100 g FW	Total anthocyanins (mg AT/100 g FW)	Total phenolic compounds (mg of GAE/100 g FW)	Total flavonoids (mg of quercetin/100 g FW)	Total carotenoids (mg of β -carotene/100 g FW)
Custard apple	23.02 \pm 1.94	1.55 \pm 0.01	358.25 \pm 17.04	418.24 \pm 3.73	2.25 \pm 0.40
Ilama	26.98 \pm 2.46	1.31 \pm 0.01	246.29 \pm 62.06	230.53 \pm 3.57	1.57 \pm 0.62
Purple star apple	21.43 \pm 4.99	3.24 \pm 0.02	14.91 \pm 0.19	35.76 \pm 1.46	2.97 \pm 0.64
Green star apple	26.19 \pm 2.61	0.18 \pm 0.07	18.10 \pm 4.46	1.25 \pm 0.61	4.25 \pm 1.45
Sapodilla	21.43 \pm 2.61	1.16 \pm 0.02	15.35 \pm 0.73	0.18 \pm 0.14	1.69 \pm 0.06
Red mombin	36.51 \pm 2.46	1.77 \pm 0.10	115.53 \pm 6.41	38.31 \pm 18.57	17.16 \pm 0.89
Green-yellow mombin	33.33 \pm 3.01	1.67 \pm 0.09	130.73 \pm 10.08	152.35 \pm 4.08	25.07 \pm 0.04
Mamey sapote	29.37 \pm 3.58	5.57 \pm 0.07	14.21 \pm 3.08	65.24 \pm 4.49	36.12 \pm 1.24
Yellow cashew	92.06 \pm 4.92	1.17 \pm 0.01	186.29 \pm 18.19	59.27 \pm 10.0	13.99 \pm 0.75
Red cashew	131.75 \pm 4.92	1.84 \pm 0.03	287.28 \pm 5.38	344.61 \pm 4.30	11.62 \pm 0.67
Yellow nance	116.67 \pm 3.98	0.37 \pm 0.02	240.76 \pm 16.61	127.27 \pm 12.31	14.54 \pm 0.42
Red nance	148.41 \pm 3.58	0.91 \pm 0.01	266.26 \pm 13.39	131.98 \pm 7.41	14.22 \pm 0.29
Green nance	116.67 \pm 4.99	1.17 \pm 0.11	195.35 \pm 23.80	98.80 \pm 1.83	12.82 \pm 0.28
Dragon fruit	37.30 \pm 3.58	0.36 \pm 0.01	58.89 \pm 11.79	25.51 \pm 5.26	2.93 \pm 0.73
Purple sugar apple	50.0 \pm 3.98	1.15 \pm 0.01	81.78 \pm 19.31	78.73 \pm 1.55	1.30 \pm 0.01
Green sugar apple	50.79 \pm 4.92	0.47 \pm 0.02	207.60 \pm 17.85	200.92 \pm 3.83	1.44 \pm 0.11
Mamoncillo	44.44 \pm 3.89	0.32 \pm 0.01	295.35 \pm 17.54	275.76 \pm 8.08	3.85 \pm 0.08
White sapote	64.29 \pm 4.99	1.91 \pm 0.01	373.27 \pm 26.68	341.88 \pm 1.43	15.86 \pm 2.40
Black sapote	59.52 \pm 7.22	14.19 \pm 0.01	158.48 \pm 1.02	376.04 \pm 72.29	7.99 \pm 0.38

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

Table 6.17. Antioxidant activity, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) (by ABTS and DPPH methods) in tropical fruits cultivated in Yucatan, Mexico.

Fruit	TEAC ($\mu\text{m}/100 \text{ g FW}$)		VCEAC ($\text{mg}/100 \text{ g FW}$)	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Custard apple	649.69 \pm 21.89	376.30 \pm 2.29	189.66 \pm 6.44	81.10 \pm 0.49
Ilama	674.59 \pm 6.30	357.83 \pm 16.97	196.98 \pm 1.85	77.11 \pm 3.67
Purple star apple	649.63 \pm 15.73	366.56 \pm 8.04	189.64 \pm 4.63	79.00 \pm 1.74
Green star apple	684.78 \pm 6.90	332.72 \pm 6.58	199.98 \pm 2.03	71.69 \pm 1.42
Sapodilla	404.75 \pm 45.03	208.04 \pm 14.79	117.62 \pm 13.24	44.76 \pm 3.20
Red mombin	662.67 \pm 35.34	332.91 \pm 12.88	193.47 \pm 10.39	71.73 \pm 2.78
Green-yellow mombin	624.58 \pm 74.33	348.97 \pm 9.60	182.27 \pm 21.86	75.20 \pm 2.07
Mamey sapote	393.81 \pm 0.36	113.06 \pm 26.45	114.40 \pm 0.11	24.24 \pm 5.71
Yellow cashew	642.06 \pm 38.17	345.15 \pm 15.17	187.41 \pm 11.23	74.37 \pm 3.38
Red cashew	618.47 \pm 6.41	273.69 \pm 0.54	180.48 \pm 1.88	58.94 \pm 0.12
Yellow nance	661.79 \pm 35.0	372.91 \pm 4.05	193.22 \pm 10.29	80.37 \pm 0.88
Red nance	661.68 \pm 22.91	375.54 \pm 2.66	193.18 \pm 6.74	80.94 \pm 0.57
Green nance	669.48 \pm 16.12	380.66 \pm 6.96	195.48 \pm 4.74	82.05 \pm 1.50
Dragon fruit	359.69 \pm 14.61	198.97 \pm 14.12	104.36 \pm 4.30	42.80 \pm 3.05
Purple sugar Apple	655.71 \pm 31.55	357.88 \pm 22.01	191.43 \pm 9.28	77.12 \pm 4.75
Green sugar Apple	646.25 \pm 12.15	368.55 \pm 8.33	188.64 \pm 3.57	79.43 \pm 1.80
Mamoncillo	665.38 \pm 20.96	322.36 \pm 14.40	194.27 \pm 6.17	69.45 \pm 3.11
White sapote	661.03 \pm 18.94	349.21 \pm 19.70	192.99 \pm 5.57	75.25 \pm 4.26
Black sapote	559.78 \pm 23.53	118.44 \pm 13.32	163.21 \pm 6.92	25.40 \pm 2.88

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

With the cluster analysis, it was possible to classify the fruits under study into four groups, as can be seen in Figure 6.4. The first group corresponds to red cashew, green mombin, yellow cashew, green sugar apple, purple star apple, custard apple, purple sugar apple, white sapote, red nance, yellow nance, red mombin, mamoncillo, green nance, ilama, and green star apple characterized by their high antioxidant activity (measured with both assays, ABTS and DPPH), which can probably be attributed to the high content of total phenolic compounds, total flavonoids and vitamin C. The second group, represented by dragon fruit and sapodilla,

showed low antioxidant activity, probably attributable to the low level of total phenolic compounds, total flavonoids, total anthocyanins and total carotenoids. In the third group, mamey sapote obtained a moderate level of total anthocyanins and a high content of total carotenoids. The last group (black sapote) showed a moderate level of vitamin C and a high content of total anthocyanins.

The principal component analysis (Figure 6.5) separated the samples according to the contents of vitamin C, total anthocyanins, total phenolic compounds, total flavonoids, total carotenoids and antioxidant activity, forming four groups, as with the cluster analysis. The first principal component (component 1, 40.1%) correlated with the content of total anthocyanins and total carotenoids, while the second component (component 2, 65.4%) correlated with the content of total phenolic compounds, total flavonoids, vitamin C and antioxidant activity (Figure 6.6).

Barreto et al. (2009) and Vissoto et al. (2013) also applied the multivariate statistical analysis which permitted the classification of 18 fruits of Brazil into 5 and 3 groups, respectively, based on their functional characteristics.

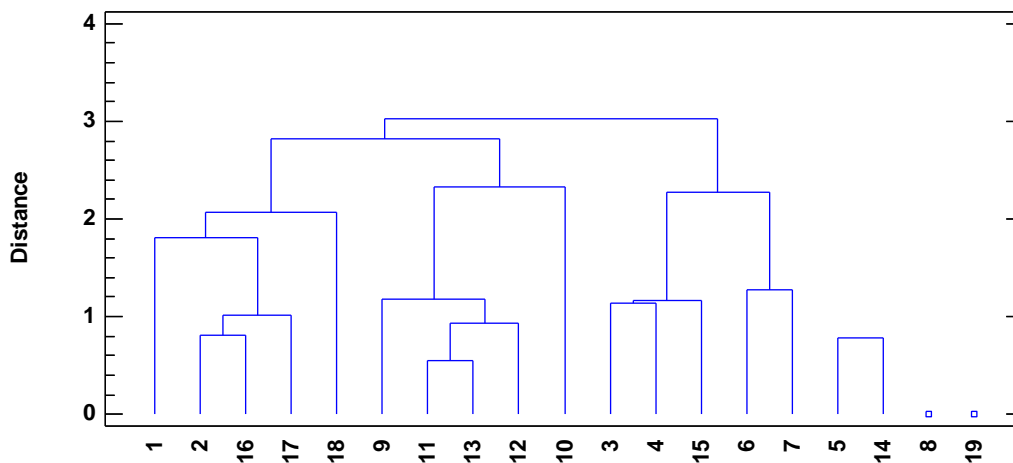


Figure 6.4. Dendrogram taking into consideration contents of total phenolic compounds, total flavonoids, vitamin C, total anthocyanins, total carotenoids and antioxidant activity measured with the DPPH and ABTS assays.

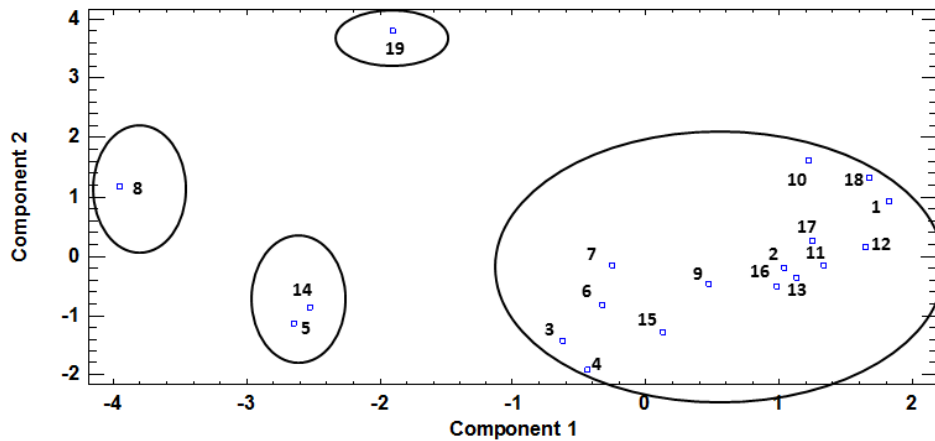


Figure 6.5. General projection of the samples obtained by means of the principal components analysis based on the contents of total phenolic compounds, total flavonoids, vitamin C, total anthocyanins, total carotenoids and antioxidant activity measured with the DPPH and ABTS assays.

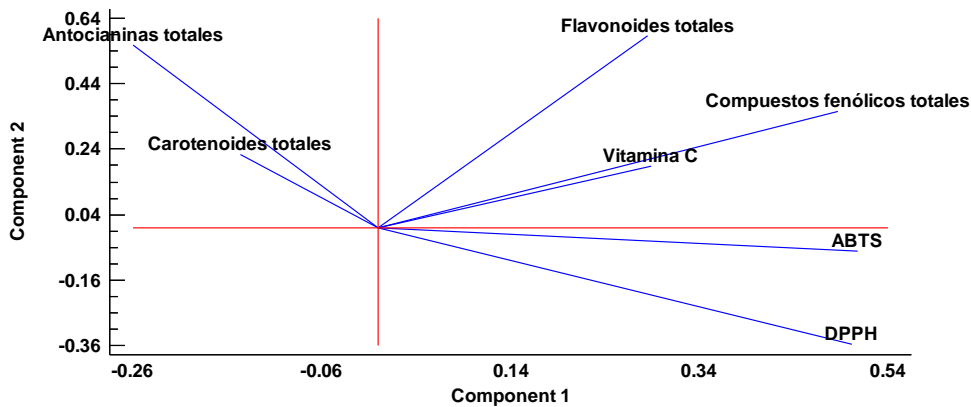


Figure 6.6. Projection of variables obtained by the principal components analysis based on the contents of total phenolic compounds, total flavonoids, vitamin C, total anthocyanins, total carotenoids and antioxidant activity measured with the DPPH and ABTS assays.

6.4.4.3. Cytotoxic activity

The present work evaluated the effect of antioxidant extracts from 19 fruits cultivated in Yucatan on the VERO cell line (kidney cells of the green monkey: *Cercopithecus aethiops*), which was incubated with different concentrations of each extract (25-1.56 µg/mL) (Table 6.18). Caamal-Fuentes et al. (2015) suggest a classification of the cytotoxic activity of plant extracts as the concentration of compound that killed 50% of cells (CC_{50} = µg/mL): <5 (very strong), 5-10 (strong), 10-20 (moderate, 20-100 (poor) and >100 (Without activity). Based on this classification, in the present work, 52.6% of the fruit extracts corresponded to a CC_{50} value (values ranging from 19.54 to 91.9 µg/mL) which is associated with poor toxicity; 42% of the fruit extracts reached higher values (CC_{50}) at 100 µg/mL, corresponding to the criterion without activity. Only the ilama obtained a CC_{50} value classified as moderate toxicity.

In general, it can be suggested that the fruits cultivated in the rural areas of the Mexican Southeast represent a food product which is non-toxic for kidney cells of the green monkey and can be used as a source of bioactive compounds with antioxidant activity.

Table 6.18. Cytotoxic activity (CC_{50}) of antioxidant extracts from fruits cultivated in Yucatan.

Fruit extract	CC_{50} (µg/mL)
Custard apple	27.69
Ilama	19.54
Purple star apple	>100
Green star apple	84.51
Sapodilla	91.95
Red mombin	22.78
Green-yellow mombin	35.88
Mamey sapote	>100
Yellow cashew	>100
Red cashew	>100

Yellow nance	>100
Red nance	84.49
Green nance	81.09
Dragon fruit	>100
Purple sugar apple	58.87
Green sugar apple	33.49
Mamoncillo	56.48
White sapote	>100
Black sapote	>100

6.4.5. Conclusions

This study was able to provide relevant and useful information on a group of fruits grown in rural communities of Yucatan, Mexico.

The edible parts of fruits cultivated within the tropical ecosystem of Yucatan, Mexico represent a significant reservoir of phenolic compounds (12 compounds identified) which are of great importance for health conservation. The suggestion for consumers, therefore, is to increase their intake of these fruits. With the aid of a multivariate statistical analysis and taking into consideration the contents of bioactive compounds and antioxidant activity, it was possible to classify the fruits into four groups, where the first group corresponded to 15 fruits characterized by their high content of total phenolic compounds and antioxidant activity.

The antioxidant extracts of the fruits under study presented non-toxic activity for a normal Vero cell line.

The results demonstrate that the fruits cultivated in Yucatan, Mexico represent a bioactive potential which allows them to be considered as a functional ingredient for the development of new products with significant health benefits.

6.4.6. Acknowledgments

The General Directorate of Higher Education and Technology and Foundation Pablo Garcia of the State of Campeche for the support provided.

6.4.7. References

AOAC Association of official analytical chemists (1995). Vitamin C (Ascorbic acid) in vitamin preparations and juices. 2,6-Dichloroindophenol titrimetric method. *Procedure No. 967.21*. In *AOAC Official Methods of Analysis* (pp.1058-1059). (15th ed). Arlington, VA: Association of the Official Analytical Chemists.

Ashraf, M. A., Maah, M. J., & Yusoff, I. (2010). Estimation of antioxidant phytochemicals in four different varieties of durian (*Durio zibethinus murray*) fruit. *Middle-East journal of scientific research*, 6(5), 465-471.

Atta-ur-Rahman, Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. (2001). *Bioassay techniques for drug development* (Vol. 16). The Netherlands: Harwood academic publishers.

Barreto, G. P., Benassi, M. T., & Mercadante, A. Z. (2009). Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the brazilian chemical society*, 20(10), 1856-1861.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.

Caamal-Fuentes, E. E., Peraza-Sánchez, S. R., Torres-Tapia, L. W., & Moo-Puc, R. E. (2015). Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from *Aeschynomene fascicularis*, a Mayan Medicinal Plant. *Molecules*, 20(8), 13563-13574.

Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., & Silva, B. M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 441-447.

Chen, J. P., Tai, C. Y., & Chen, B. H. (2004). Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Chromatography A*, 1054, 261-268.

Cheng, J. C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. *Food Chemistry*, *104*(1), 132-139.

de Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., de Barros, M. P., Mano, C. M., & Goulart, M. O. F. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, *115*(2), 469-475.

Devalaraja, S., Jain, S., & Yadav, H. (2011). Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. *Food Research International*, *44*(7), 1856-1865.

González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, *72*, s197-s202.

Gordon, A., Cruz, A. P. G., Cabral, L. M. C., de Freitas, S. C., Taxi, C. M. A. D., Donangelo, C. M., ... & Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food chemistry*, *133*(2), 256-263.

He, X., & Liu, R. H. (2008). Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(21), 9905-9910.

Ibrahim, D., Hazali, N., Jauhari, N., Yahya, M. N., Ahmed, I. A., Mikail, M. A., & Ibrahim, M. (2013). Sub-chronic toxicological evaluation of the *Baccaurea angulata* (Belimbing Dayak) fruit juice in rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, *6*(4), 23-32.

Kajdžanoska, M., Petreska, J., & Stefova, M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5272-5278.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I. A., Estrada-León, R. J. Ortiz-Vazquez, E., Pino-Alea, J., Quintanar-Guzman, A., Cuevas-Glory, L. F., & Sauri-Duch, E. (2013). Responses of sapodilla fruit (*Manilkara zapota* [L.] P. Royen) to postharvest treatment with 1-methylcyclopropene. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 1050-1058.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas y Vargas, M. L., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–515.

Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17-22.

Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., ... & Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462-468.

Pierson, J. T., Dietzgen, R. G., Shaw, P. N., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Gidley, M. J. (2012). Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(3), 357-387.

Ramamurthy, C. H., Kumar, M. S., Suyavaran, V. S. A., Mareeswaran, R., & Thirunavukkarasu, C. (2012). Evaluation of Antioxidant, Radical Scavenging Activity and Polyphenolics Profile in *Solanum torvum* L. Fruits. *Journal of food science*, 77(8), C907-C913.

Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., A de la Rosa, L., Yepiz-Plascencia, G., González-Aguilar, G. (2011).

Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44, 1386–1391

Russo, G. L. (2007). Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 74(4), 533-544.

Shivashankara, K., Isobe, S., Al-Haq, M., Takenaka, M., & Shiina, T. (2004). Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1281–1286.

Silva, B. M., Santos, R. P., Mendes, L. S., de Pinho, P. G., Valentão, P., Andrade, P. B., ... & Carvalho, M. (2011). *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. *Food Research International*, 44(7), 2182-2189.

Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Vissotto, L. C., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Benassi, M. D. T., & Mercadante, A. Z. (2013). Correlation, by multivariate statistical analysis, between the scavenging capacity against reactive oxygen species and the bioactive compounds from frozen fruit pulps. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 57-65.

Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F., & Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Research International*, 44, 2210–2216.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Las frutas menores se refieren a las especies que tienen un valor comercial de producción y mercado muy pequeño comparado con los principales productos agrícolas (Gruère *et al.*, 2006), tales como anona (*Annona reticulata*), caimito (*Chrysophyllum cainito* L.), chicozapote (*Manilkara sapota* L.), ciruela (*Spondias purpurea* L.), mamey (*Pouteria sapota* Jacq.), marañón (*Anacardium occidentale*), nance (*Byrsonima crassifolia*), pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth), saramuyo (*Annona squamosa* L.), uaya (*Melicoccus bijugatus* (Jacq.)), zapote blanco (*Lucuma hypoglauca* Stanley), zapote negro (*Diospyros digyna*) entre otros, las cuales son producidas en la Península de Yucatán. Estas frutas requieren mucho esfuerzo para definir sus condiciones generales de mejoramiento genético, agronómico y manejo post-cosecha con el propósito de obtener altos rendimientos (Galán-Saúco, 1996).

Las frutas producidas en la Península de Yucatán son un componente muy importante de la dieta diaria para las comunidades rurales, pero las condiciones de comercialización son pobres, lo cual da lugar a frutas sub-utilizadas en términos económicos.

Es importante destacar que también los estudios se han orientado a las nuevas estrategias para la revalorización de bio-productos de las frutas tropicales como piel, cáscara, semillas, hojas, huesos y otras fracciones no comestibles o partes desechadas sin poco valor. Estos sub-productos dan lugar a problemas ambientales debido a las cantidades que se generan al año derivado del consumo y procesamiento de frutas tropicales; además su alta actividad de agua promueve el desarrollo microbiano (Pérez-Jiménez & Viuda-Martos, 2015).

Durante los últimos años se ha publicado numerosas investigaciones que describen el perfil de compuestos bioactivos y actividad biológica de frutas tropicales y sus sub-productos (Pérez-Jiménez & Viuda-Martos, 2015; Yahia *et al.*, 2011; Robles-Sánchez *et al.*, 2011). Todos estos esfuerzos en la investigación científica se han traducido en la comercialización de ingredientes bioactivos que se incorporan en matrices alimentarias o como alimento funcional a través del procesamiento de las frutas en jugos, bebidas y panes (GenesisToday, 2015; appleboost, 2015). Este hecho cobra mucha importancia en la promoción y potencialización de cultivos de frutas nativas de las diferentes regiones tropicales del mundo, como consecuencia

trae beneficios económicos a las localidades y además se puede contribuir en la explotación sustentable de especies frutícolas de la región.

Actualmente, el consumidor prefiere alimentos funcionales porque previenen algunas enfermedades degenerativas y mantienen la buena salud, lo que ha ocasionado gran interés de los investigadores para estudiar el contenido de compuestos bioactivos con actividad antioxidante en frutas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se aborda el estudio de un grupo de frutas tropicales (19 frutas) que se cultivan en las localidades de la Península de Yucatán en relación al estudio de compuestos antioxidantes de la pulpa y la cáscara como sub-producto para valorar su potencial bioactivo y como alimento funcional. Acorde a los resultados encontrados, las características físico-químicas resultaron diferentes entre las frutas estudiadas; lo cual esto pone de manifiesto la amplia variabilidad que se tiene en la calidad de las especies frutícolas. De manera general, las frutas de la Península de Yucatán se caracterizaron por mostrar un contenido de sólidos solubles totales, acidez y color similar a otras especies de frutas, lo cual son atributos que distinguen la calidad de una fruta tropical y que se relaciona con su sabor (De Souza *et al.*, 2012).

El trabajo revela que la parte comestible de zapote blanco y zapote negro se distinguieron por tener un alto valor de fibra insoluble y fibra soluble, respectivamente. Este hallazgo permite incrementar el valor agregado de estas frutas, atribuido a las propiedades reportadas de estas fibras como elemento prebiótico. Asimismo, las cáscaras de caimito morado, marañón amarillo y marañón rojo son ricos en fibra insoluble. Un resultado destacable fue que la cáscara de caimito morado resultó superior en fibra soluble, insoluble y total cuando se comparó con las cáscaras de las otras frutas evaluadas, lo cual hace factible el uso de esta cáscara en la formulación de productos alimenticios como yogurt, galletas, panes entre otros. Las fibras dietéticas alcanzan el intestino grueso y son atacadas por la microflora colónica, dando como productos de fermentación ácidos de cadena corta, hidrógeno, dióxido de carbono y metano. Los ácidos grasos de cadena corta representan no solo una forma de recuperación de energía, sino que van a estar implicados en otras funciones beneficiosas para

el organismo humano (Escudero-Alvarez & González-Sánchez, 2006). La ingesta de fibra a través de las frutas tropicales o sus subproductos estudiadas podrían jugar un papel en todas las funciones del sistema digestivo desde la masticación hasta la evacuación de heces, lo cual hace conveniente continuar con las investigaciones futuras en relación a los efectos fisiológicos de la fibra de estas frutas.

Los compuestos fenólicos y otros compuestos como los flavonoides o carotenoides están ampliamente presentes en las frutas tropicales. Los estudios de bioactividad de estos compuestos pueden conducir a nuevos hallazgos en el potencial bioactivo de las frutas tropicales (Pierson *et al.*, 2012).

Existe un consenso general de que la actividad antioxidante debe ser evaluado a través de diferentes métodos que difieren en los mecanismos de reacción (Prior *et al.*, 2005). Entonces en este trabajo de tesis se consideró cuatro protocolos diferentes con el propósito de evaluar la capacidad antioxidante de las frutas: método de Folin-Ciocalteu, flavonoides totales, actividad antioxidante mediante los ensayos ABTS y DPPH.

Los compuestos fenólicos con su capacidad de donar hidrógenos o electrones para formar radicales estables, son considerados como los principales metabolitos antioxidantes activos a partir de plantas (Koolen *et al.*, 2013).

En este trabajo, las partes comestibles de las frutas estudiadas y las cáscaras como subproductos son ricos en vitamina C, antocianinas totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y carotenoides totales; además se caracterizaron por su alta actividad antioxidante medidos con los dos ensayos ABTS y DPPH. Es importante destacar que la comparación de estos resultados con otros trabajos resulta difícil atribuido a los diferentes procedimientos de extracción realizados en otras investigaciones, además las diferencias pueden estar relacionados con prácticas agronómicas, composición del suelo, condiciones climatológicas y ciertos factores fisiológicos como la maduración (Morales-Soto *et al.*, 2014).

A través de la correlación analizada se puede sugerir que los compuestos fenólicos solubles son las principales sustancias que contribuyen en la actividad antioxidante de las partes comestibles y cáscaras de las frutas evaluadas. Aunque también se ha reportado esta

relación entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos en otras frutas tropicales (Silva *et al.*, 2007), los efectos sinérgicos y antagonista de los compuestos antioxidantes dentro de los extractos no se deben descartar, por lo que se sugiere una estrategia más fina para evaluar las contribuciones de cada compuesto con la actividad antioxidante de las pulpas y cáscaras de frutas cultivadas en Yucatán.

En lo general, en las zonas de clima tropical como el sureste de México, favorece la ocurrencia de una amplia variedad de frutas carotenogénicas. Este hecho puede ser explicado por la alta exposición de las frutas a la radiación del sol durante todas las etapas de su crecimiento. En este trabajo resultó que la pulpa de mamey es un gran reservorio de carotenoides totales (36.4 mg de β -caroteno/100 g de porción comestible). Además, un hallazgo interesante fue que el contenido de β -criptoxantina y luteína contribuyen significativamente en la actividad antioxidante de las partes comestibles de las frutas.

Acorde al perfil cromatográfico de carotenoides individuales de la porción comestible de las frutas, se identificó cuatro carotenoides abundantes en nance amarillo, ciruela verde-amarillo, marañón amarillo y mamey (luteína, β -criptoxantina, β -caroteno y licopeno, respectivamente), de las cuales, dos compuestos tienen actividad de provitamina A, un potente antioxidante y que se ha reportado que regulan la patogénesis de varias enfermedades crónicas degenerativas. Las partes comestibles de las frutas estudiadas mostraron niveles más altos de equivalente a retinol comparado a otras frutas de clima tropical (Lokesh *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2013), lo que podría representar una gran contribución de requerimientos de vitamina A en la dieta de la población local.

Las partes comestibles de las frutas resultaron ser un reservorio de diversas estructuras de compuestos fenólicos, de los cuales, cuatro fueron ácidos hidroxicinámicos, dos fueron hidroxibenzoicos, dos fueron flavanoles y por último dos flavonoles. Estos compuestos identificados y cuantificados son de gran interés principalmente por su potente actividad antioxidante y su relación entre el consumo y la prevención de algunas enfermedades (Haminiuk *et al.*, 2012).

Para alcanzar una extracción máxima de los compuestos fenólicos de las frutas estudiadas, se sugiere realizar un estudio involucrando diferentes parámetros como tipo de solvente, agitación, tiempo de extracción, proporción soluto/solvente, temperatura, eficiencia en la transferencia de masa, tamaño de partícula, entre otros. La evaluación de estos factores pueden resultar en la obtención de mayor cantidad y diversidad de estructuras de compuestos fenólicos, como consecuencia mayor potencial bioactivo (Haminiuk et al., 2012).

En la literatura existe muy poca información relacionado con la toxicidad de extractos de frutas tropicales y en este trabajo se reportó que los extractos de antioxidantes de las partes comestibles de 19 frutas resultaron con actividad no-tóxica para las células normales de la línea Vero. Este hallazgo puede sentar las bases para estudios futuros en modelos que evalúen a los antioxidantes de las frutas como agente anti-proliferativo celular. Además para complementar este trabajo se sugiere evaluar los extractos de frutas sobre células tumorales en la línea celular de mieloma murino. Esta contribución esta relacionado al uso y consumo seguro de vegetales y frutas ricos con antioxidantes.

En este trabajo se aplicó en análisis estadístico multivariado, considerando los contenidos de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante y resultó la formación de cuatro grupos de frutas tropicales de la Península de Yucatán. El grupo que correspondió a 15 frutas tropicales (marañón rojo, ciruela verde, marañón amarillo, saramuyo verde, caimito morado, anona roja, saramuyo morado, zapote blanco, nance rojo, nance amarillo, ciruela roja, uaya, nance verde, anona amarillo y caimito verde) se caracterizó por su alto contenido de compuestos fenólicos y su alta actividad antioxidante. La ingesta de estas frutas pueden impartir beneficios saludables al consumidor más ahí de su aportación a la nutrición básica.

Como perspectiva se propone la investigación de nuevas metodologías para un mayor conocimiento de las estructuras y mecanismos de los compuestos antioxidantes en las frutas tropicales de Yucatán. Asimismo, se debe establecer y consolidar las bases de datos de los compuestos fenólicos de frutas de clima tropical porque en un futuro puede ser información valiosa para establecer investigaciones epidemiológicas. Se debe estudiar los mecanismos de absorción y profundizar en temas de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de polifenoles,

enfocando la acción de la microflora colónica sobre el metabolismo de diversos compuestos fenólicos.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral contribuye en aportar conocimientos en la ciencia básica respecto al estudio de diversas estructuras químicas y bioactividad de sustancias antioxidantes encontradas en frutas tropicales poco conocidos en el mercado internacional. Este hallazgo puede promover y potencializar el uso extendido de estas frutas en el mercado internacional y además se puede dar lugar a un aprovechamiento integral del fruto como aditivo en el desarrollo de nuevos productos.

8. CONCLUSIONES GENERALES

En base a los objetivos del presente trabajo de investigación se obtuvieron las siguientes conclusiones:

I. Las partes comestibles y la cáscara de las frutas tropicales cultivadas en la Península de Yucatán son materiales ricos en compuestos bioactivos con propiedades útiles para la salud (vitamina C, antocianinas totales, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, fibra soluble, fibra insoluble y fibra dietética total).

II. En lo general, el contenido de compuestos bioactivos de las partes comestibles y de la cáscara de las frutas son superiores a otras frutas producidas y consumidas en varias regiones del mundo.

III. Las frutas tropicales (cáscaras y partes comestibles) respondieron al mecanismo de capacidad secuestradora de radicales libres DPPH y ABTS, lo cual dio lugar a una alta actividad antioxidante.

IV. De manera pre-eliminar y acorde a la matriz de correlación se puede sugerir que los compuestos fenólicos y algunos carotenoides como luteína y β -criptoxantina son las sustancias que contribuyen en la actividad antioxidante de las frutas tropicales; sin embargo, no se descarta efectos sinérgicos y antagonista entre los compuestos fenólicos o entre otros compuestos con capacidad antioxidante.

V. En las partes comestibles y en las cáscaras se destaca la presencia de diversas estructuras de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos, flavanoles y flavonoles) y carotenoides (luteína, β -caroteno, β -criptoxantina y licopeno), cuyas propiedades biológicas ya han sido demostrados en la literatura.

VI. El grupo de frutas estudiadas resultó con actividad no tóxica para las células normales de la línea vero, lo cual da lugar a una seguridad de su ingesta para aprovechar sus propiedades beneficiosas a la salud.

VII. Las frutas fueron clasificados en cuatro grupos acorde al análisis estadístico multivariado considerando el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante.

VIII. Estos hallazgos soportan información valiosa que pueden proporcionar interés en ampliar el cultivo, incrementar el consumo y favorecer el procesamiento de las partes comestibles y cáscaras como bio-productos de las frutas nativas de la Península de Yucatán, ya que son fuente importante de antioxidantes naturales con actividad no-tóxica para la dieta y pueden ser usados como ingredientes funcionales para el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria.

REFERENCIAS

- Appleboost (2015). The power is in the peel. Available from <http://appleboost.com/>
- de Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Queiroz, F., Borges, S. V., & Carneiro, J. D. D. S. (2012). Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, *134*(1), 381-386.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, *21*, 61-72.
- Galán Saúco, V. (1996, July). Current situation, trends and future of agronomic research on tropical fruits. In *Proceedings International Conference on Tropical Fruits*. Kuala Lumpur, Malaysia (pp. 23-26).
- Genesisistoday (2015). Plant-based nutrition. Available from <http://www.genesisistoday.com/>
- Gruère, G. P., Giuliani, A., & Smale, M. (2006). Marketing underutilized plant species for the benefit of the poor: a conceptual framework. *IFPRI Environmental and Protection Technology (EPT) Discussion Paper*, (154).
- Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(10), 2023-2044.
- Jones, A. M. P., Baker, R., Ragone, D., & Murch, S. J. (2013). Identification of provitamin A carotenoid-rich cultivars of breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). *Journal of Food Composition and Analysis*, *31*(1), 51-61.

Koolen, H. H., da Silva, F. M., Gozzo, F. C., de Souza, A. Q., & de Souza, A. D. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, *51*(2), 467-473.

Lokesh, V., Divya, P., Puthusseri, B., Manjunatha, G., & Neelwarne, B. (2014). Profiles of carotenoids during post-climacteric ripening of some important cultivars of banana and development of a dry product from a high carotenoid yielding variety. *LWT-Food Science and Technology*, *55*(1), 59-66.

Morales-Soto, A., García-Salas, P., Rodríguez-Pérez, C., Jiménez-Sánchez, C., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International*, *58*, 35-46.

Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., ... & Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food chemistry*, *172*, 462-468.

Pérez-Jiménez, J., & Viuda-Martos, M. (2015). Introduction to the special issue Byproducts from agri-food industry: New strategies for their revalorization. *Food Research International*, *73*, 1-2.

Pierson, J. T., Dietzgen, R. G., Shaw, P. N., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Gidley, M. J. (2012). Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(3), 357-387.

Prior, R. L., Wu, X., & 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.

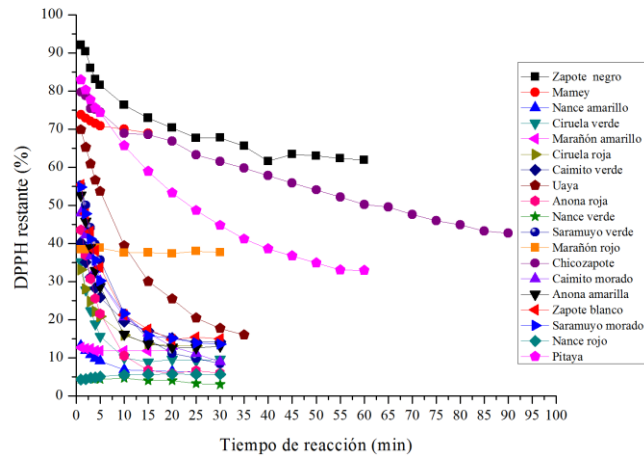
Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., A de la Rosa, L., Yepiz-Plascencia, G., González-Aguilar, G. (2011). Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44, 1386–1391.

Salinas-Moreno, Y., Pérez-Alonso, J. J., Vázquez-Carrillo, G., Aragón-Cuevas, F., & Velázquez-Cardelas, G. A. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Agrociencia*, 46(7), 693-706.

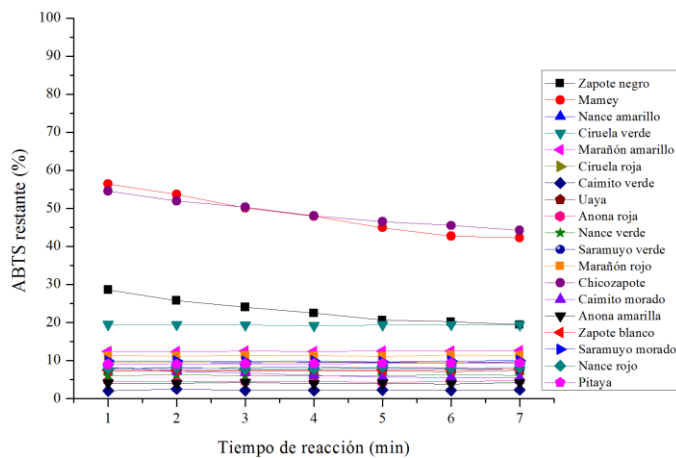
Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018.

Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F., & Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Research International*, 44, 2210–2216.

ANEXO 1

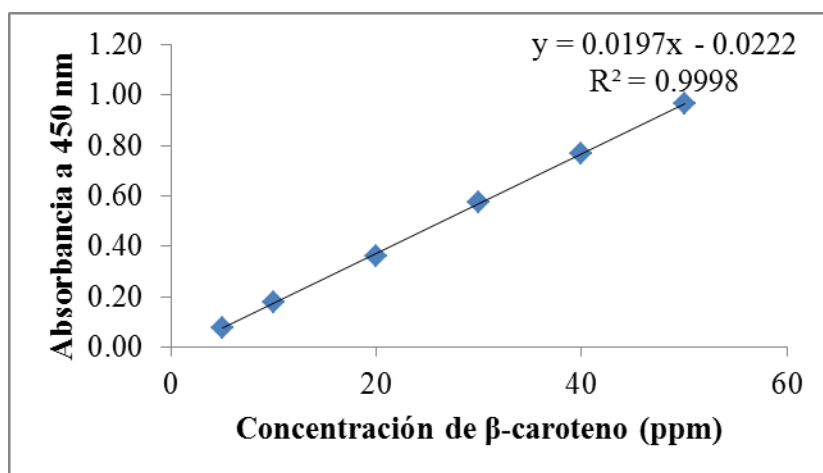


Comportamiento cinético entre la reacción del radical libre DPPH con los compuestos antioxidantes de las frutas estudiadas.

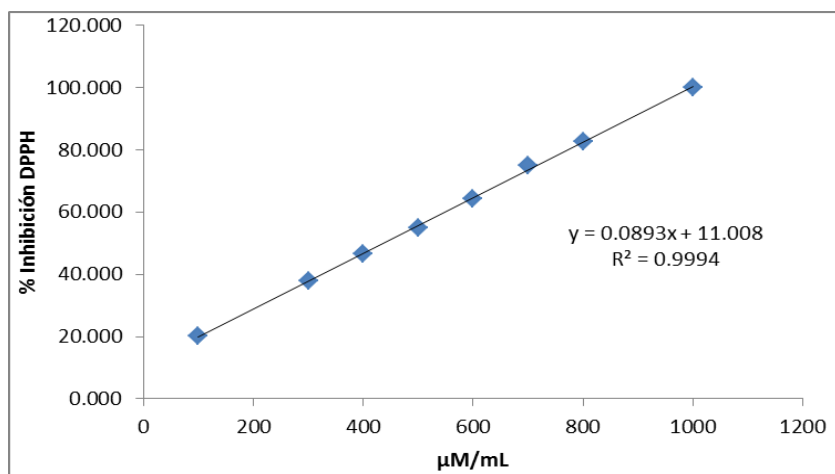


Comportamiento cinético entre la reacción del radical libre ABTS con los compuestos antioxidantes de las frutas estudiadas.

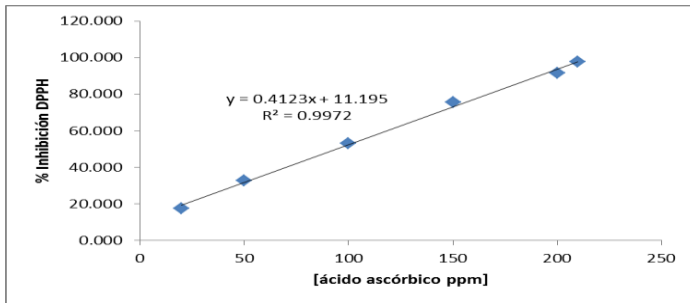
ANEXO 2



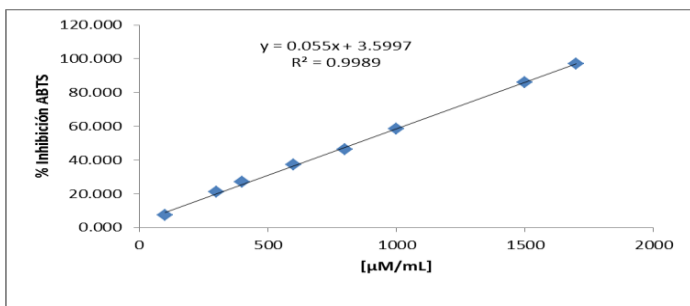
Curva de calibración de diferentes concentraciones de β-caroteno vs. Absorbancia a 450 nm.



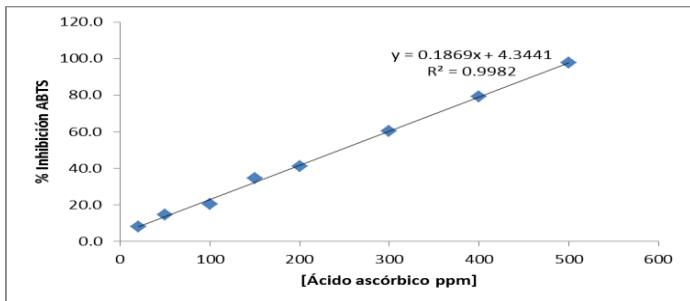
Curva de calibración de diferentes concentraciones de Trolox vs. Porcentaje de inhibición de DPPH.



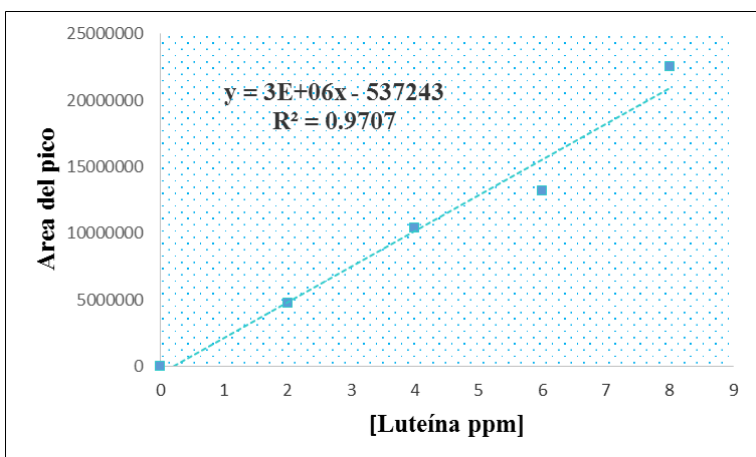
Curva de calibración de diferentes concentraciones de ácido ascórbico vs. Porcentaje de inhibición de DPPH.



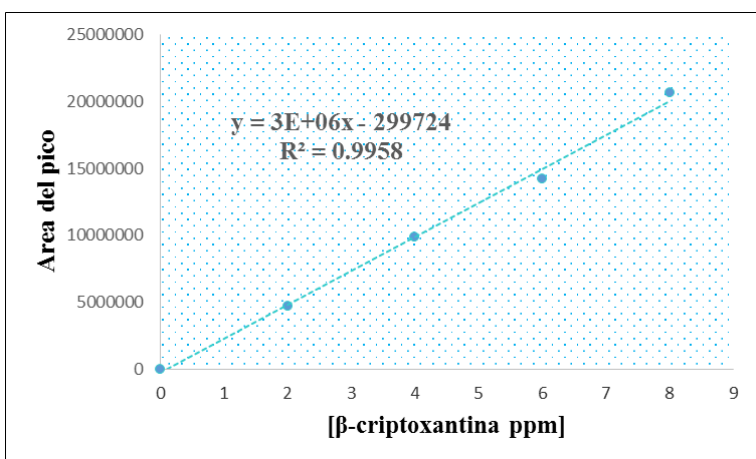
Curva de calibración de diferentes concentraciones de Trolox vs. Porcentaje de inhibición de ABTS.



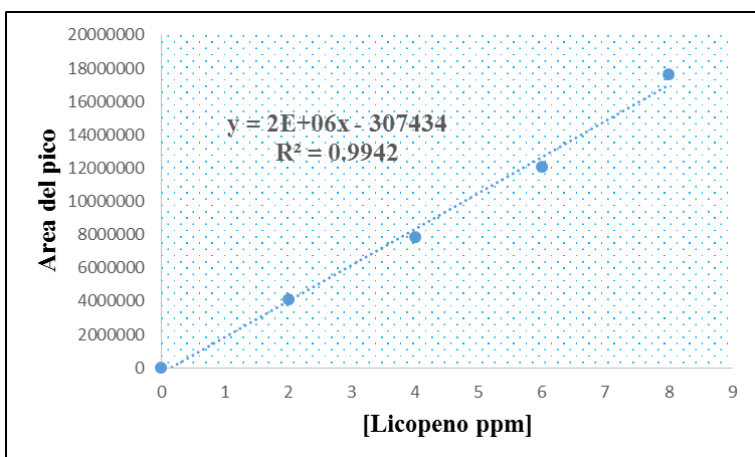
Curva de calibración de diferentes concentraciones de ácido ascórbico vs. Porcentaje de inhibición de ABTS.



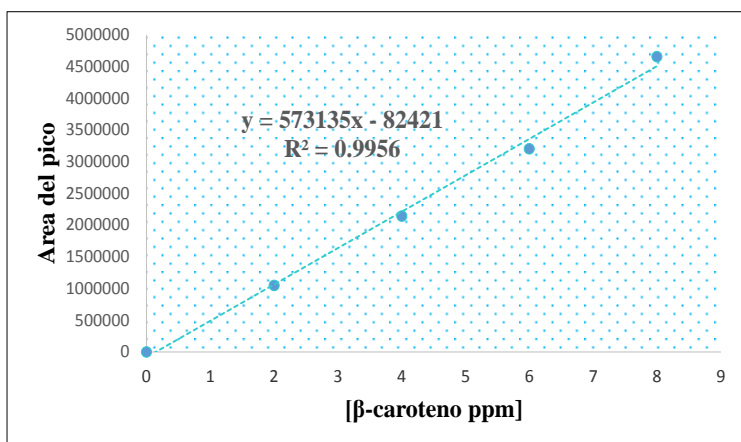
Curva de calibración de diferentes concentraciones de luteína vs. Área del pico cromatográfico.



Curva de calibración de diferentes concentraciones de β-criptoxantina vs. Área del pico cromatográfico.



Curva de calibración de diferentes concentraciones de licopeno vs. Área del pico cromatográfico.



Curva de calibración de diferentes concentraciones de β-caroteno vs. Área del pico cromatográfico.

ANEXO 3



a) Pitahaya



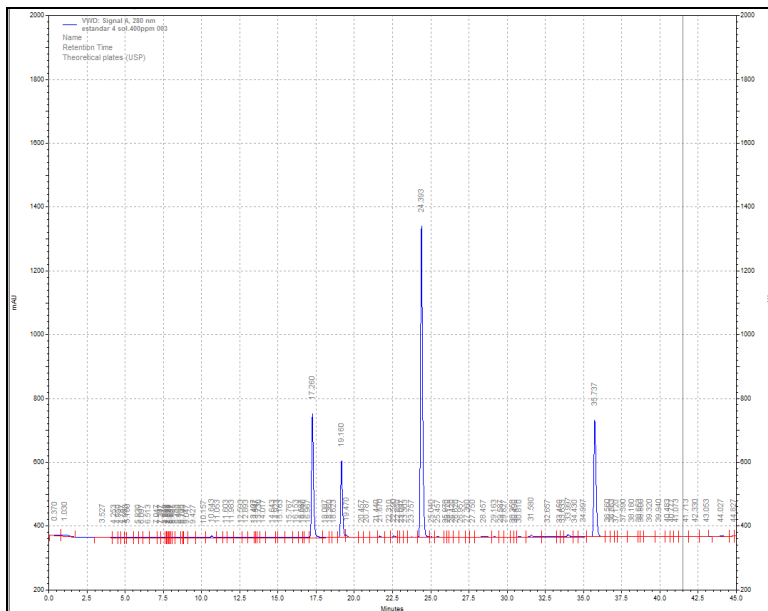
b) Marañón amarillo



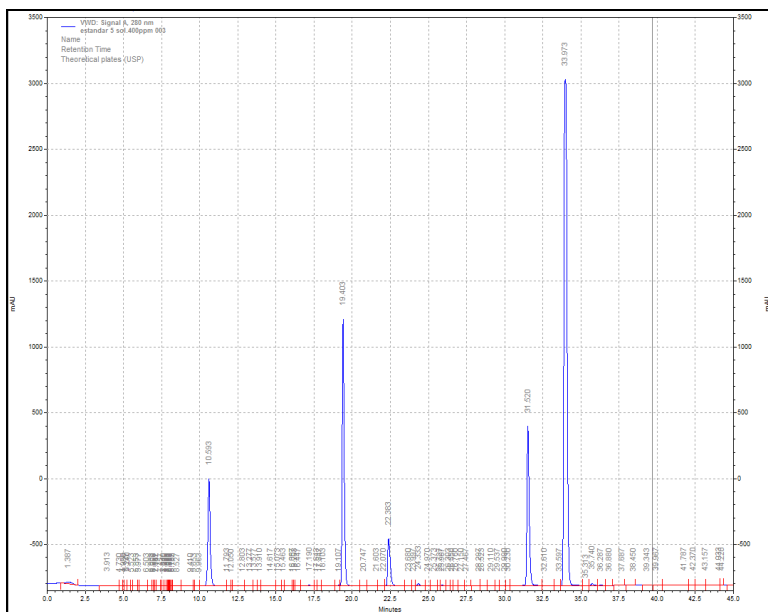
c) Ciruela rojo

Algunas frutas tropicales cultivadas en la Península de Yucatán.

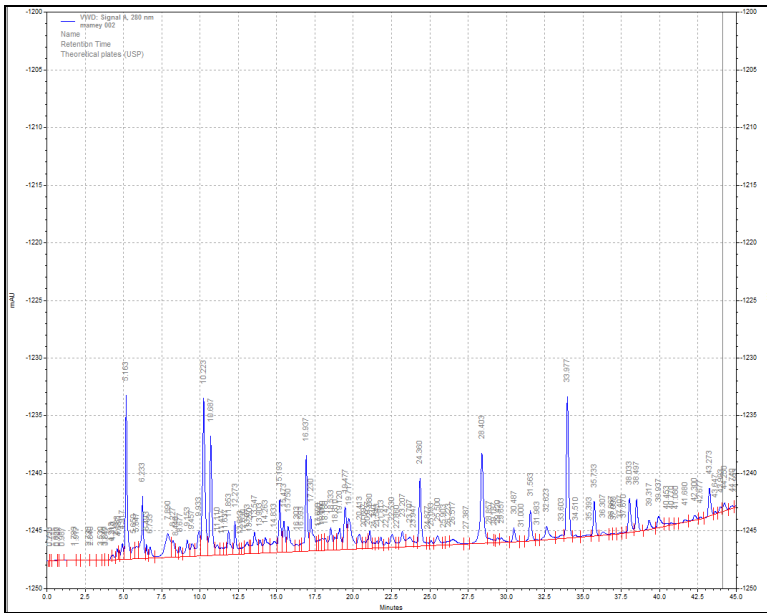
ANEXO 4



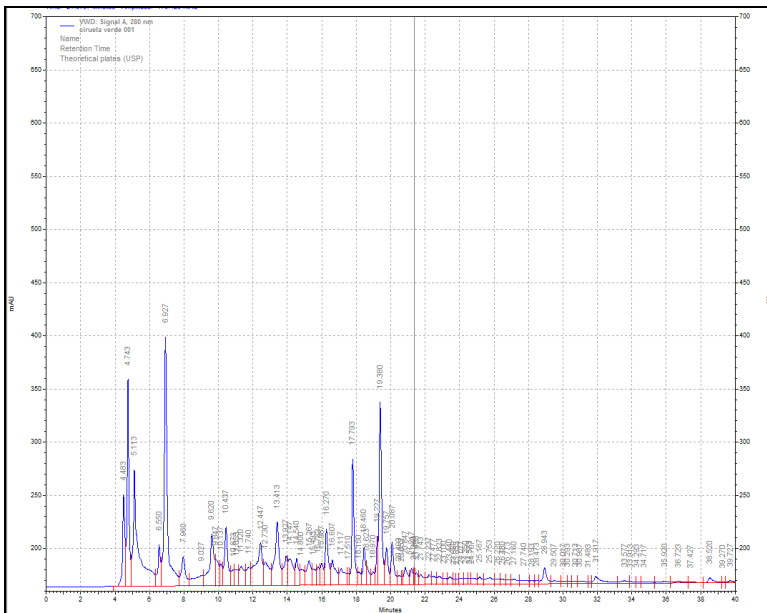
Perfil cromatográfico de 4 estándares de compuestos fenólicos (Catequina, Epicatequina, Ácido ferulico, Kaempferol).



Perfil cromatográfico de 5 estándares de compuestos fenólicos (Ácido gálico, Ácido cafeico, Ácido elágico, Quercetina, Ácido Trans-cinamico).

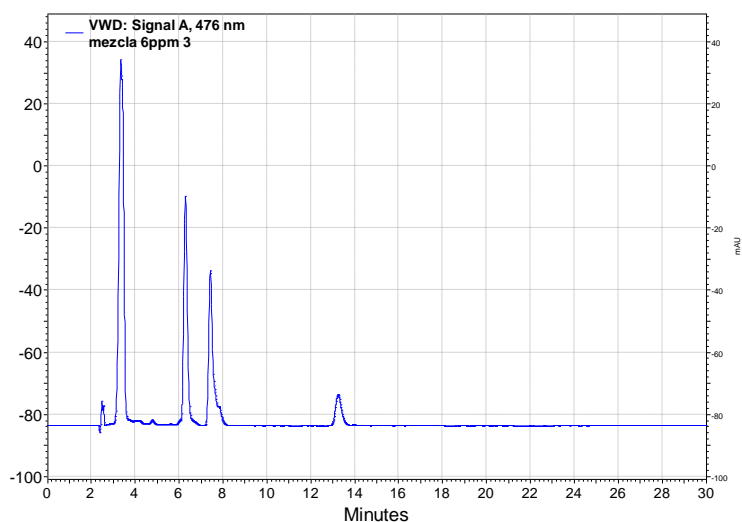


Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos de mamey.

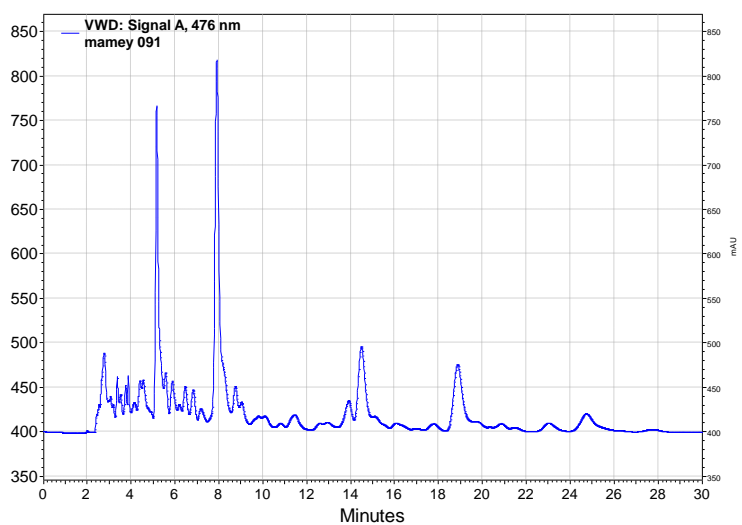


Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos de ciruela verde.

ANEXO 5

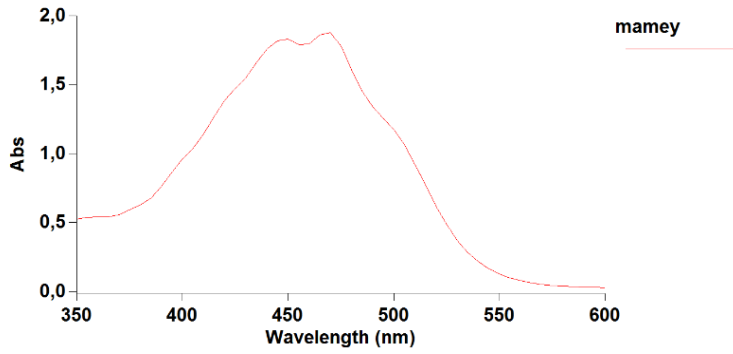


Perfil cromatográfico de carotenoides individuales (luteína, β -criptoxantina, licopeno, β -caroteno).

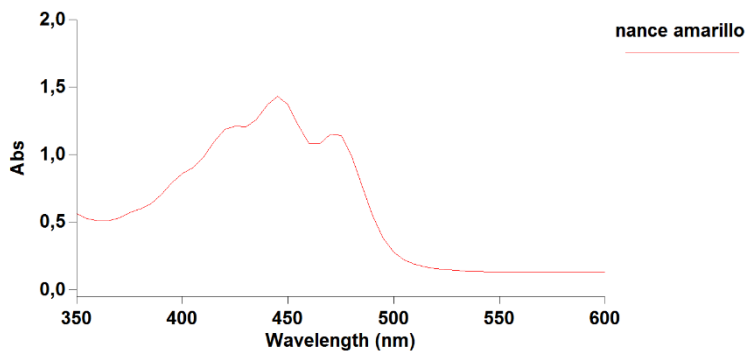


Perfil cromatográfico de carotenoides individuales de mamey.

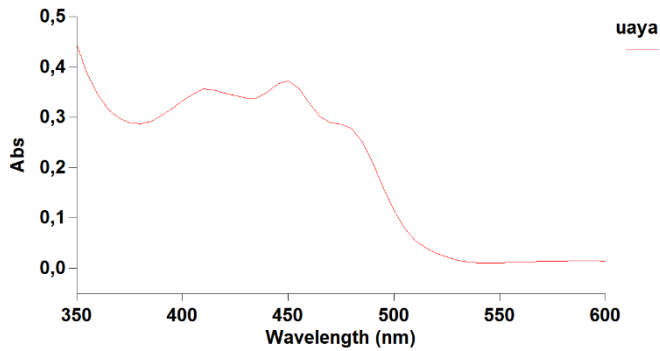
ANEXO 6



Espectro de absorción de carotenoides de mamey



Espectro de absorción de carotenoides de nance amarillo



Espectro de absorción de carotenoides de uaya.