



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE  
ALIMENTOS TÍPICOS DE MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**BLANCA MAR HERNÁNDEZ MONROY**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>M. en C. Lucía Cornejo Barrera</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Dr. José Pedraza Chaverri</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Dra. Nimbe Torres y Torres</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Dr. Jorge Arturo Aburto Anell</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Dra. Iliana Elvira González Hernández</b>

**INSTITUTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**DEPTO. FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Nimbe Torres y Torres

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Azalia Ávila Nava

### **SUSTENTANTE:**

Blanca Mar Hernández Monroy

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Especies reactivas.	3
1.1.1. Mecanismo de formación de las ERO.	5
1.1.1.1. Anión superóxido.	6
1.1.1.2. Peróxido de hidrógeno.	7
1.1.1.3. Radical hidroxilo.	8
1.1.1.4. Anión peroxinitrito.	9
1.1.1.5. Ácido hipocloroso.	9
1.1.1.6. Oxígeno singulete.	10
1.1.1.7. Peroxilo.	10
1.1.1.8. Ozono.	10
1.2. Estrés oxidativo.	11
1.2.1. Estrés oxidativo y biomoléculas.	12
1.2.1.1. Oxidación de los ácidos nucleicos.	12
1.2.1.2. Oxidación de lípidos.	13
1.2.1.3. Oxidación de proteínas.	14
1.2.2. Estrés oxidativo y enfermedades.	15
1.2.2.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo II.	15
1.2.2.2. Obesidad.	17
1.3. Antioxidantes.	18
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.	19
1.3.2. Antioxidantes en alimentos de origen vegetal.	20
1.3.2.1. Polifenoles.	21
1.3.2.2. Vitamina C.	21
1.4. Alimentos nativos de México.	22

1.4.1. Vainilla.	22
1.4.2. Chocolate.	25
1.4.3. Nopal.	28
<b>2. Antecedentes.</b>	<b>29</b>
<b>3. Objetivos.</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivos específicos.	31
<b>4. Hipótesis.</b>	<b>32</b>
<b>5. Metodología.</b>	<b>32</b>
5.1. Alimentos evaluados.	32
5.2. Tratamiento de las muestras.	33
5.3. Extracción de polifenoles totales.	33
5.4. Comparación de la actividad antioxidante con diferentes alimentos.	34
5.4.1. Actividad antioxidante: método de DPPH.	34
5.4.2. Actividad antioxidante: método ORAC.	34
5.5. Actividad antioxidante in vitro.	35
5.5.1. Atrapamiento del radical hidroxilo (HO <sup>•</sup> ).	35
5.5.2. Atrapamiento del anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ).	37
5.5.3. Atrapamiento del peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	38
5.5.4. Atrapamiento del anión peroxinitrito (ONOO <sup>-</sup> ).	40
5.5.5. Atrapamiento del ácido hipocloroso (HOCl).	41
5.6. Cuantificación de polifenoles totales.	41
5.7. Determinación de la actividad antioxidante de la vainilla en humanos sanos.	42
5.7.1. Actividad antioxidante in vivo por el método DPPH.	44
5.7.2. Actividad antioxidante in vivo por el método ORAC.	44
5.8. Determinación de vitamina C.	44
<b>6. Resultados.</b>	<b>46</b>
6.1. Determinación de la actividad antioxidante de distintos alimentos.	46
6.1.1. Resultados por el método ORAC.	46
6.1.2. Resultados por el método DPPH.	48

6.2. Determinación del porcentaje de atrapamiento del chocolate y la vainilla de distintas especies reactivas.	50
6.3. Contenido de polifenoles totales en la vainilla	53
6.4. Actividad antioxidante de vainilla in vivo.	53
6.5. Comparación de la actividad antioxidante de nopal tras distintos tratamientos térmicos.	54
6.6. Comparación del contenido de polifenoles del nopal tras distintos tratamientos térmicos.	55
6.7. Comparación de contenido de vitamina C en nopal tras distintos tratamientos térmicos.	57
<b>7. Discusión de resultados.</b>	<b>58</b>
<b>8. Conclusiones.</b>	<b>64</b>
<b>9. Referencias bibliográficas.</b>	<b>65</b>
<b>10. Anexo.</b>	<b>72</b>

## TABLAS

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno y su estructura.

**Tabla 2.** Composición química de la vainilla.

**Tabla 3.** Composición química del chocolate.

**Tabla 4.** Composición química del nopal.

**Tabla 5.** Propiedades del nopal, chocolate y vainilla.

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para llevar a cabo el ensayo de determinación de la actividad atrapadora del radical hidroxilo.

**Tabla 7.** Mezcla general de reacción para método enzimático. Generación del anión superóxido mediante el sistema xantina- xantina oxidasa.

**Tabla 8.** Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora del peróxido de hidrógeno.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora de peroxinitrito.

**Tabla 10.** Dieta ejemplo de 1800 kcal para determinación de la actividad antioxidante conferida por la vaina de vainilla.

**Tabla 11.** Valores de IC<sub>50</sub> para las distintas ERO evaluadas.

## FIGURAS

**Figura 1.** Reducción univalente del oxígeno.

**Figura 2.** Reducción del oxígeno por la NADPH oxidasa formando el anión radical superóxido.

**Figura 3.** Reducción del oxígeno por la XO formando el anión radical superóxido.

**Figura 4.** Dismutación del anión superóxido por la SOD generando peróxido de hidrógeno.

**Figura 5.** Reacción de Haber-Weiss generando el radical hidroxilo.

**Figura 6.** Formación del radical hidroxilo a partir de la reducción univalente de ácido hipocloroso.

**Figura 7.** Conversión de peróxido de hidrógeno a ácido hipocloroso catalizada por la MPO.

**Figura 8.** Formación de ozono por la fotodisociación del oxígeno.

**Figura 9.** Causas del estrés oxidativo.

**Figura 10.** Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y el EO aunado a tres rutas: poliol, diacilglicerol y AGE.

**Figura 11.** Antioxidantes enzimáticos.

**Figura 12.** Flor de vainilla , etapas en la maduración del fruto, corte de vaina.

**Figura 13.** Estructuras químicas de algunos compuestos en la vainilla.

**Figura 14.** Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos del nopal.

**Figura 15.** Reacción de Fenton en la que se genera el radical hidroxilo. En esta reacción se utiliza como catalizador al hierro (II).

**Figura 16.** Determinación de actividad atrapadora del  $\cdot\text{OH}$  mediante método fluorométrico.

**Figura 17.** Reacción del sistema xantina- xantina oxidasa.

**Figura 18.** Reacción del rojo amplex con peroxidasa en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Figura 19.** Determinación de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

**Figura 20.** Reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DI).

**Figura 21.** Oxidación del ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico.

**Figura 22.** Comparación de la actividad antioxidante de varios extractos de alimentos mediante el método ORAC.

**Figura 23.** Comparación de la actividad antioxidante de varios extractos de alimentos mediante el método DPPH.

**Figura 24.** Actividad atrapadora de la vainilla y los diferentes chocolates hacia diferentes especies reactivas ( $\text{IC}_{50}$ ).

**Figura 25.** Contenido de polifenoles totales en vainilla.

**Figura 26.** Evaluación de la actividad antioxidante en plasma de sujetos sanos por los métodos de ORAC y DPPH.

**Figura 27.** Actividad antioxidante de nopal sometido a diferentes tiempos de cocción al vapor.

**Figura 28.** Contenido de polifenoles totales en nopales sometidos a distintos tiempos de cocción al vapor.



**Figura 29.** Contenido de ácido ascórbico en nopales sometidos a distintos tiempos de cocción al vapor.

**Figura 30.** Actividad atrapadora de la vainilla y los diferentes chocolates hacia diferentes especies reactivas (% de atrapamiento).

## ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	Dicloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida).
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AOPPs</b>	Productos de la oxidación avanzada de proteínas.
<b>Cat</b>	Catalasa.
<b>DCD-FDA</b>	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína.
<b>2,6-DI</b>	2,6 diclorofenol indofenol.
<b>DMTU</b>	Dimetiltiourea.
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2.
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial.
<b>EO</b>	Estrés oxidante.
<b>ER</b>	Especies reactivas.
<b>ERB</b>	Especies reactivas de bromo.
<b>ERC</b>	Especies reactivas de cloro.
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno.
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>ERS</b>	Especies reactivas de azufre.
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa.
<b>GR</b>	Glutación reductasa.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso.

<b>IC<sub>50</sub></b>	Cantidad necesaria para tener el 50% de la actividad antioxidante.
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal.
<b>MDA</b>	Malondialdehído.
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa.
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio.
<b>NQO1</b>	NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1, o bien DT-diaforasa.
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorbanza de los radicales de oxígeno.
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Anión superóxido.
<b>·OH</b>	Radical hidroxilo.
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anión peroxinitrito.
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica.
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica.
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Radical peroxilo.
<b>U</b>	Actividad enzimática.
<b>XO</b>	Xantina oxidasa.

## RESUMEN

**Introducción.** El chocolate, la vainilla y el nopal son alimentos originarios de México en los que se ha identificado la presencia de compuestos bioactivos benéficos para la salud con propiedades antioxidantes. Esta propiedad es de importancia terapéutica en fisiopatologías cuya progresión está asociada al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), el cual genera estrés oxidativo (EO), lo que provoca daño celular generalizado. Ejemplo de estas enfermedades son la obesidad y la diabetes tipo II.

**Justificación.** Existen reportes respecto a algunas propiedades del chocolate, la vainilla y el nopal. Sin embargo aún falta información sobre las propiedades antioxidantes.

**Hipótesis.** La vainilla, el chocolate y el nopal poseen compuestos que presentan actividad antioxidante por lo que atraparán diversas especies reactivas *in vitro*. El consumo de vainilla aumentará la capacidad antioxidante del plasma de sujetos sanos. El tratamiento térmico disminuirá el contenido de vitamina C y la actividad antioxidante en nopales.

**Metodología.** La actividad antioxidante, el atrapamiento de especies reactivas y el contenido polifenólico fueron determinados por pruebas fluorométricas y espectrofotométricas. El contenido de vitamina C fue determinado por titulación y la actividad antioxidante *in vivo* fue medida en el plasma de sujetos sanos con un índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 25. **Resultados.** El nopal, la vainilla y el chocolate presentaron una actividad antioxidante considerable al compararlos con alimentos como el café, el té y la zarzamora. *In vitro*, el chocolate y la vainilla presentan actividad antioxidante directa contra las especies reactivas siguientes:

Chocolate:  $\cdot\text{OH} > \text{O}_2\cdot^- > \text{ONOO}^- > \text{HOCl}$

Vainilla:  $\text{H}_2\text{O}_2 > \cdot\text{OH} > \text{HOCl}$

La vainilla tuvo un efecto antioxidante directo al aumentar la capacidad antioxidante en plasma en seres humanos. Los tratamientos térmicos y la eliminación del mucílago del nopal reduce la concentración de ácido ascórbico, polifenoles y por ende su actividad antioxidante. **Conclusión.** El nopal, el chocolate y la vainilla provenientes de México son antioxidantes directos de varias

especies reactivas y podrían ayudar a mantener el balance entre la formación de especies reactivas y la capacidad antioxidante producida por ingerir alimentos ricos en antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Especies reactivas.

Las especies reactivas (ER) son aquellas moléculas que por su estructura son altamente inestables por lo que tienen una corta vida media, reaccionando con cualquier molécula que esté a su alcance; éstas pueden presentarse en forma de radicales o no radicales.

Un radical libre se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006, Lobo et al., 2010) y pueden o no tener una carga negativa o positiva (Wallace, 1997) dependiendo del proceso de su generación:

- Pérdida de un electrón de un no radical.  $X \rightarrow e^- + X \cdot^+$
- Ganancia de un electrón de un no radical.  $Y + e^- \rightarrow Y \cdot^-$
- Ruptura homolítica de una molécula.  $A:B \rightarrow A \cdot + B \cdot$

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y suele ser más inestable que su correspondiente no radical. En la mayor parte de los casos tienen un tiempo de vida menor a 1  $\mu$ s y se combinan para generar moléculas más estables (Halliwell y Gutteridge, 2007). Además pueden comportarse como oxidantes o reductores al donar o aceptar electrones (Lobo et al., 2010). Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

La formación de radicales libres ocurre continuamente en la célula como consecuencia tanto de reacciones enzimáticas como no enzimáticas (Lobo et al., 2010). Existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los

más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno (Rajendran et al., 2014) y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y del carbono, así como los formados por los metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). En muchos casos la reacción con un radical libre conduce a una serie de reacciones en cadena. Por ejemplo, la xantina oxidasa es una molibdoenzima que produce anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); los aldehídos producto de oxidación lipídica son sustratos para la xantina oxidasa, lo que conlleva a más producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Wallace, 1997).

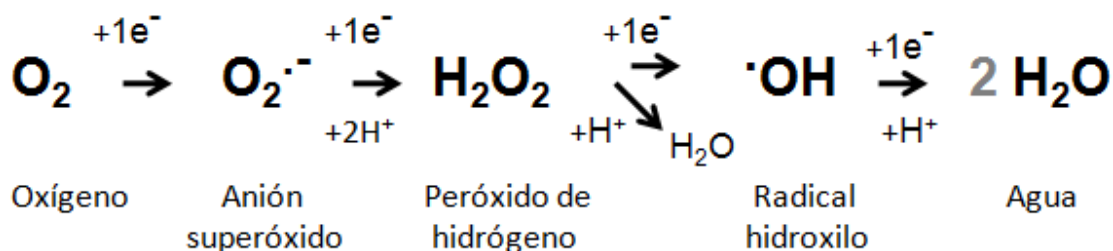
Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico, esto se puede explicar por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: las que se producen por la ruptura o excitación de oxígeno (oxígeno atómico, ozono y oxígeno singulete) y las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Hansberg, 2002). Además de las ERO, existen especies reactivas de nitrógeno (ERN), azufre (ERS), bromo (ERB) y cloro (ERC) que pueden o no ser radicales libres y se producen en forma continua como parte del metabolismo (Cárdenas-Rodríguez et al., 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007). En bajas concentraciones, son esenciales para varios procesos fisiológicos, incluyendo la fosforilación de proteínas, la activación del factor de transcripción, la diferenciación celular, la esteroidogénesis, la inmunidad celular, y la defensa celular contra microorganismos (Miller y Brzezinska-Slebozinska, 1993, Rajendran et al., 2014).

### 1.1.1. Mecanismo de formación de las ERO.

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno y su estructura (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)			
Radicales		No Radicales	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
Hidroxilo	$HO^{\cdot}$	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Perhidroxilo	$HOO^{\cdot}$	Ácido hipobromoso	$HOBr$
Peroxilo	$ROO^{\cdot}$	Ozono	$O_3$
Alcoxilo	$RO^{\cdot}$	Oxígeno singulete	$^1O_2$
		Peróxidos orgánicos	$ROOH$
		Peroxinitrito	$ONOO^{\cdot}$
		Peroxinitrato	$O_2NOO^{\cdot}$
		Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
		Nitrosoperoxicarbonato	$ONOCO^{2-}$
		Peroxomonocarbonato	$HOOCO^{2-}$

Una de las formas de generación de ERO es mediante la reducción univalente del oxígeno (Fig. 1).



**Figura 1.** Reducción univalente del oxígeno. Se le conoce así a la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno el cual es el mecanismo de formación de las especies reactivas de oxígeno a través de la ganancia de electrones (Galatro et al., 2006). Las ERO al combinarse con compuestos nitrogenados forman ERN, como el peroxinitrito.

Las ER tienen un origen tanto endógeno, como exógeno (Martínez, 2007). Entre las fuentes endógenas destacan:

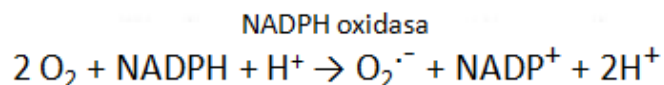
1. La cadena respiratoria.
2. Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos).
3. La autooxidación de compuestos de carbono tales como aminoácidos, proteínas, lípidos, glicósidos y ácidos nucleicos.
4. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

Las fuentes exógenas pueden ser (Lobo et al., 2010, Martínez, 2007):

1. Ambientales. Radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.
2. Farmacológicas. Xenobióticos, drogas, etc.
3. Nutricionales. Contaminantes, aditivos, pesticidas, etc.

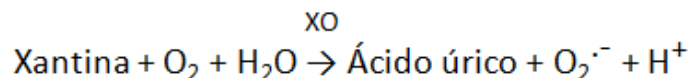
#### 1.1.1.1. Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

La formación del  $O_2^{\cdot-}$  ocurre por la reducción univalente del oxígeno (Fig. 1). El  $O_2^{\cdot-}$  tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en procesos inmunológicos de defensa (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006). Se genera por la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa, localizado en la membrana citoplasmática de las células fagocíticas, el cual reduce parcialmente el oxígeno de la siguiente forma:



**Figura 2.** Reducción del oxígeno por la NADPH oxidasa formando el  $O_2^{\cdot-}$ .

De la misma forma, la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir la molécula de oxígeno para dar el  $O_2^{\cdot-}$  de acuerdo a la siguiente reacción:



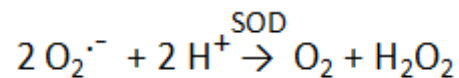


**Figura 3.** Reducción del oxígeno por la XO formando el  $O_2^{\cdot-}$ .

De acuerdo con Hansberg (2002), alrededor del 1% del  $O_2$  consumido en la respiración genera  $O_2^{\cdot-}$ , con el ejercicio el consumo de  $O_2$  aumenta y por lo tanto la generación de  $O_2^{\cdot-}$ . Este también se puede formar a partir de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y las tetrahidropterinas reducidas.

#### 1.1.1.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La mayor parte del  $H_2O_2$  proviene principalmente de la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  ocasionada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), su papel principal es combatir al  $O_2^{\cdot-}$ ; en los seres vivos se encuentra en el citosol, mitocondrias y en el líquido extracelular.



**Figura 4.** Dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  por la SOD generando  $H_2O_2$ .

Aunque no es un radical libre y por sí sólo es poco reactivo, tiene una gran lipofiliidad que le permite atravesar membranas celulares y reaccionar con el  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de metales de transición, para generar el  $HO^{\cdot}$ . Por ésta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

En condiciones fisiológicas, la producción de  $H_2O_2$  se estima que representa aproximadamente 2% de la absorción total de oxígeno por el organismo (Rochette et al., 2014).

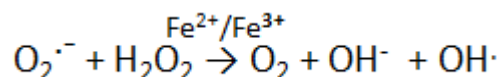
El  $H_2O_2$  reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NADPH, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a

concentraciones milimolares, sin embargo si reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el  $\alpha$ -cetoglutarato (Hansberg, 2002).

### 1.1.1.3. Radical hidroxilo (HO $\cdot$ ).

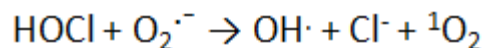
El HO $\cdot$  es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su corta vida media y alta reactividad, suele actuar en los sitios cercanos a donde se produce (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acepta un electrón desapareado se fragmenta y forma el HO $\cdot$  y el ión hidroxilo (HO $^-$ ) (reacción de Fenton). Este último es inocuo, protonándose para formar agua. La estimulación de la reacción de Fenton con el O<sub>2</sub> $^{\cdot-}$  es la reacción de Haber-Weiss (Fig. 5) ya que sólo ocurre en presencia de trazas de un metal de transición (Hansberg, 2002, Wallace, 1997).



**Figura 5.** Reacción de Haber-Weiss generando el HO $\cdot$ .

Otra vía de generación del HO $\cdot$  implica la reducción univalente de ácido hipocloroso por O<sub>2</sub> $^{\cdot-}$  o por un complejo de hierro (II) (Wallace, 1997).



**Figura 6.** Formación del HO $\cdot$  a partir de la reducción univalente de ácido hipocloroso.

Un exceso en la producción de O<sub>2</sub> $^{\cdot-}$  puede contrarrestar los efectos vasodilatadores del NO $\cdot$  induciendo vasoconstricción.

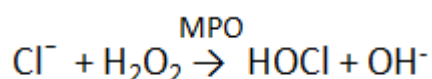
### 1.1.1.4. Anión peroxinitrito (ONOO $^-$ ).

En condiciones fisiológicas, en presencia de sustrato (L-arginina) y co-factores (tetrahidrobiopterina: BH<sub>4</sub>), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) produce óxido nítrico (NO·), el cual tiene potentes propiedades vasodilatadoras, anti-inflamatorias y anti-trombóticas (Rochette et al., 2014). El NO· es un radical libre que reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos o con los sulfhidrilos de algunas enzimas. En cambio, reacciona rápidamente con compuestos, como con el O<sub>2</sub> generando NO<sub>2</sub>·, y con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> generando ONOO<sup>-</sup>. Ambos compuestos son más oxidantes que el NO· (Hansberg, 2002).

El ONOO<sup>-</sup> es un potente oxidante que induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad. Se ha encontrado involucrado en varios estados patológicos (Cárdenas-Rodríguez et al., 2006).

#### 1.1.1.5. Ácido hipocloroso (HOCl).

Las peroxidasa son un grupo de enzimas que remueven el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar a otro sustrato. Una peroxidasa de gran importancia inmunológica es la mieloperoxidasa (MPO). La MPO presente en altas concentraciones en los gránulos de los neutrófilos, cataliza la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a HOCl de acuerdo a la siguiente reacción:



**Figura 7.** Conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a HOCl catalizada por la MPO.

La MPO también cataliza la oxidación de los iones Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> y SCN<sup>-</sup>.

El sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl ha sido estudiado ampliamente, porque la reacción de HOCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede producir oxígeno singulete (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

#### **1.1.1.6. Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ).**

El  $\text{O}_2$  es un dirradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Esta es la razón por la cual el  $\text{O}_2$  no es muy reactivo. El oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) se forma cuando uno de los dos electrones libres del  $\text{O}_2$  capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre (Hansberg, 2002).

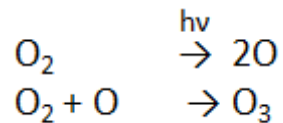
El  $^1\text{O}_2$  también se forma por la dismutación espontánea del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o de los ácidos hipohalogenosos. También los lipoperóxidos, generados por algunos radicales, pueden liberar  $^1\text{O}_2$ , el cual es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce (Hansberg, 2002).

#### **1.1.1.7. Peroxilo ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ).**

Estos radicales se forman durante la ruptura de los peróxidos orgánicos y durante la reacción de radicales con átomos de carbono con oxígeno ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), participando principalmente en la lipoperoxidación (Hansberg, 2002).

#### **1.1.1.8. Ozono ( $\text{O}_3$ ).**

El  $\text{O}_3$  es producido por la fotodisociación de la molécula de oxígeno lo que genera dos átomos de oxígeno monoatómicos, los cuales posteriormente reaccionan con el dióxígeno.

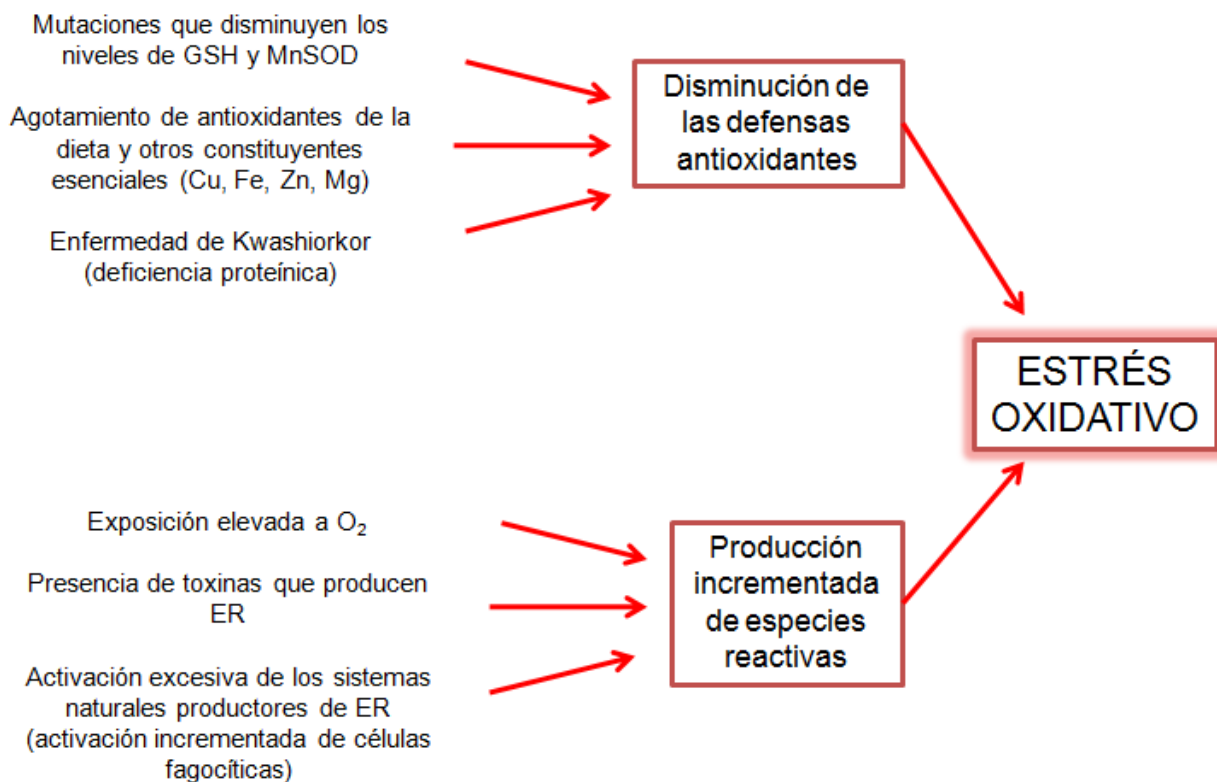


**Figura 8.** Formación de O<sub>3</sub> por la fotodisociación del oxígeno.

El ser humano también está expuesto al O<sub>3</sub> pues este se puede formar por las reacciones fotoquímicas entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos. Ya que es un poderoso agente oxidante reacciona con las proteínas, los lípidos, entre otros y puede producir inflamación y daño pulmonar (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006; Hansberg, 2002).

### **1.2. Estrés oxidativo (EO).**

La exposición a los radicales libres de una variedad de fuentes así como la producción de las ERO ha llevado a los organismos aerobios a desarrollar mecanismos de defensa en forma de agentes antioxidantes, los cuales implican mecanismos de prevención, mecanismos de reparación y defensas antioxidantes (Carocho y Ferreira, 2013). Los mecanismos antioxidantes son muy diversos y en cada organismo, célula o tejido predominan algunos sobre otros (Hansberg, 2002). Por diversas causas puede perderse el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes (Rajendran et al., 2014). Lo anterior puede deberse a un aumento en la producción de ERO o bien, o una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación, o a una combinación de estos factores; lo que conlleva a daños en las macromoléculas. A tal condición se le denomina estrés oxidativo (EO) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006). El equilibrio entre la oxidación y anti-oxidación es fundamental en el mantenimiento de un sistema biológico saludable y dosis bajas de antioxidantes pueden ser favorables a este sistema, sin embargo grandes cantidades también podrían alterar el equilibrio (Rajendran et al., 2014).



**Figura 9.** Causas del estrés oxidativo (Rojas- López, 2010).

### **1.2.1. Estrés oxidativo y biomoléculas.**

Cuando se genera estrés oxidativo se puede inducir daño a diversas biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN; lo que podría provocar alteraciones en el funcionamiento celular (Rajendran et al., 2014).

#### **1.2.1.1. Oxidación de los ácidos nucleicos.**

Las ERO dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. Por ejemplo, en muchas células se generan modificaciones en las bases del ADN cuando se les añade  $H_2O_2$ ; esto se debe en gran parte a los metales de transición (fundamentalmente al  $Fe^{2+}$ ) que se encuentran unidos al ADN y que en presencia del  $H_2O_2$  generan  $HO\cdot$ , el cual modifica las bases del mismo. El  $HO\cdot$  puede atacar tanto las purinas como las

pirimidinas, así como la desoxirribosa y además generar rupturas en el ADN (Hansberg, 2002).

El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis e incluso enfermedades hereditarias (Martínez, 2007). Se ha observado que en presencia de las ERO se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas), ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción génica.

Existen mecanismos de reparación del ADN que se activan al momento en que este sufre modificaciones oxidativas. Cuando las ERO alcanzan el núcleo o se generan dentro de este por la reacción de Fenton, estos mecanismos de reparación funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN y en caso de existir alguna mutación ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases reparan el daño causado (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

#### **1.2.1.2. Oxidación de lípidos.**

La lipoperoxidación es el efecto que se produce al contacto de los lípidos de las membranas con un agente oxidante, como cualquiera de las ERO. Los lípidos, en particular aquellos que al ser poliinsaturados son propensos a la oxidación, son unos de los sustratos más susceptibles al daño por radicales libres; considerándose a los biomarcadores de peroxidación lipídica los mejores indicadores de estrés oxidativo. En la reacción de lipoperoxidación, el radical libre formado oxida una cadena insaturada de lípido, dando la formación de un lípido

hidroperoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo una acción que se repite. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad (Hansberg, 2002, Martínez, 2007). La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN (Rajendran et al., 2014). Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasas (GPx) de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A2, que aumenta durante el estrés oxidativo (Hansberg, 2002).

Cabe mencionar que la lipoperoxidación es un proceso identificado en enfermedades vasculares. Uno de los procesos importantes es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, efecto que se ha correlacionado con la aterosclerosis (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

### **1.2.1.3. Oxidación de proteínas.**

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. A diferencia de los ácidos nucleicos, los sistemas de reparación de las proteínas sólo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

Los efectos de las ERO sobre las proteínas son: la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006). La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el HO<sup>·</sup>, el cual reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se



encuentra un metal de transición como ya se ha mencionado (Hansberg, 2002). Se ha vinculado una amplia diversidad de enfermedades con la presencia de las proteínas oxidadas, algunas de esas son: la enfermedad de Alzheimer y la artritis reumatoide (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

### **1.2.2. Estrés oxidativo y enfermedades.**

En las últimas décadas se han descrito un gran número de patologías donde se ha asociado la presencia y el aumento de las ERO y las ERN como fuentes que contribuyen de forma importante al desarrollo de enfermedades como Alzheimer, Huntington, artritis reumatoide, carcinogénesis, hipertensión, inflamación crónica, diabetes *mellitus* tipo II y obesidad (Cárdenas-Rodríguez et al., 2006; Rajendran et al., 2014). Estas últimas de gran importancia debido a la prevalencia de las mismas a nivel mundial.

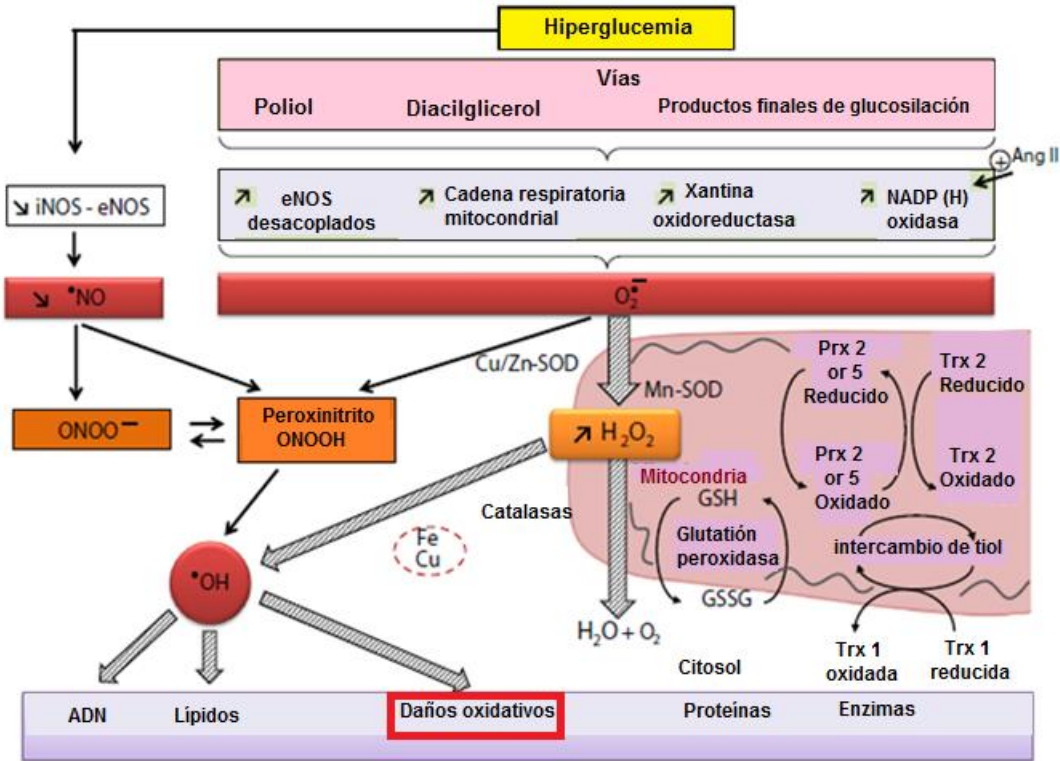
En la clínica se han desarrollado diversos métodos para evaluar las condiciones de estrés oxidativo basados en la acumulación de productos oxidados (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006). Los productos de la oxidación avanzada de proteínas (AOPPs por sus siglas en inglés) son productos de las proteínas expuestas a radicales libres y surgen de la reacción entre proteínas plasmáticas y oxidantes clorinados, mediados por la MPO, dando lugar a la formación de residuos de ditirosina y consecuentemente el entrecruzamiento, agregación y precipitación de proteínas; en humanos estos productos se asocian con enfermedades tales como la diabetes *mellitus* y la obesidad (Krzystek-Korpicka et al., 2008).

#### **1.2.2.1. Diabetes *mellitus* tipo II.**

La diabetes *mellitus* tipo II (DT2) es una enfermedad crónica caracterizada por niveles de glucosa en sangre elevados, resultado de ya sea una deficiencia en

producción de insulina o resistencia a la insulina, y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Juárez-Reyes et al., 2015). Aproximadamente 230 millones de personas en todo el mundo tenían diabetes en el 2010. Este número se espera que incremente a 333 millones de personas en el 2025 y 430 millones en 2030. La obesidad, la cual es un importante problema de salud pública en todo el mundo, incrementa el riesgo de tener DT2 (Rochette et al., 2014).

El estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia puede explicar la patogénesis de las complicaciones diabéticas. Las ER se forman de manera desproporcionada en la diabetes por oxidación de la glucosa, glucosilación no enzimática de las proteínas y su posterior degradación oxidativa (Rajendran et al., 2014). La membrana mitocondrial interna contiene cardiolipina; que es un fosfolípido insaturado localizado específicamente en este compartimiento. Se ha observado que los niveles de cardiolipina disminuyen cuando la peroxidación lipídica es prominente como en el envejecimiento y la diabetes. El aumento del estrés oxidativo asociado con la peroxidación de lípidos en las células endoteliales puede ser una de las principales causas de las complicaciones diabéticas provocadas por hiperglucemia (Fig. 10). El estrés oxidativo en plasma se incrementó en pacientes con DT2 (Rochette et al., 2014). La mayoría de los estudios analizados por Rajendran et al. (2014) apoyan un posible papel de la suplementación con antioxidantes en la reducción de complicaciones diabéticas.



**Figura 10.** Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo aunado a tres rutas: poliol, diacilglicerol y AGE (productos finales de glucosilación). eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; Trx: tiorredoxina; Prx: peroxirredoxina.

### 1.2.2.2. *Obesidad.*

La obesidad es un desorden metabólico asociado con un mayor riesgo para desarrollar diversas patologías como hipertensión, dislipidemia, DT2 o enfermedades cardiovasculares. A pesar de la creciente toma de conciencia de los efectos perjudiciales de la obesidad, su prevalencia está alcanzando proporciones epidémicas incluso entre los niños (Krzystek-Korpaczka et al., 2008).

La evidencia científica sugiere que la obesidad podría ser vista como un estado de estrés oxidativo crónico, de manera similar a otras enfermedades basadas en inflamación. En consecuencia, la formación acelerada de ERO y la acumulación de macromoléculas modificadas oxidativamente se ha demostrado en sujetos con

sobrepeso y obesidad. Por lo tanto, con el fin de prevenir el desarrollo de trastornos secundarios, las intervenciones para combatir la obesidad deben centrarse en la atenuación del estrés oxidativo (Krzystek-Korpicka et al., 2008).

Krzystek-Korpicka et al. (2008) realizaron estudios en los cuales asocian el incremento de AOPPs en sujetos con sobrepeso y obesidad. Los sujetos llevaron así mismo una dieta y realizaron ejercicio físico y se observó que una reducción de masa corporal clínicamente significativa tiende a asociarse con una disminución más pronunciada en AOPPs.

### **1.3. Antioxidantes.**

Debido a las alteraciones que se generan a partir del exceso de ER, se han buscado estrategias para disminuir el estrés oxidativo. Una de ellas es el consumo de antioxidantes.

Los antioxidantes se han definido como cualquier sustancia, que a concentraciones bajas, inhibe, retarda, previene o remueve significativamente procesos oxidativos (Rochette et al., 2014) y por lo tanto el daño oxidativo a alguna molécula (Halliwell, 2007) por diversos mecanismos de acción, ya sea directamente atrapando ERO y ERN siendo oxidadas ellas mismas frecuentemente (Rajendran et al., 2014), o indirectamente regulando la expresión de las defensas antioxidantes o inhibiendo la producción de ERO y ERN (Khlebnikov et al., 2007).

Un antioxidante también debe tener la habilidad, después de atrapar a un radical libre, de formar un nuevo radical que sea estable a la oxidación, a través de la unión intramolecular de hidrógeno (Carocho y Ferreira, 2013).

Dentro del sistema antioxidante endógeno se encuentran enzimas como catalasas (Cat), glutatión peroxidasas (GPx), glutatión reductasas (GR) y superóxido dismutasas (SOD), que se encargan de mantener los niveles de las ER, sin embargo, a pesar de su eficiencia, el sistema antioxidante endógeno no es suficiente, y los humanos dependen de varios tipos de antioxidantes presentes en



compuesto por cisteína, glicina y glutamato; carotenoides, una familia de pigmentos presentes en frutas y vegetales formados por largas cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces conjugados; el ácido úrico, el producto final del catabolismo de purinas en el humano; ácido fólico y ácido lipoico (Rochette et al., 2014; Cárdenas-Rodríguez et al., 2006; Martínez, 2007).

### **1.3.2. Antioxidantes en alimentos de origen vegetal.**

El efecto benéfico de los antioxidantes sobre el mantenimiento de la salud humana se ha convertido en un tema importante que ha involucrado a muchos científicos alrededor del mundo durante la última década, por lo que se les ha considerado como nutraceuticos importantes (Sharma y Bhat, 2009). Se les confiere importancia en términos de su capacidad para proteger contra el daño celular oxidativo que puede conducir a condiciones patológicas como las ya mencionadas.

El consumo de alimentos es una fuente importante de antioxidantes exógenos y se ha estimado que una dieta típica proporciona más de 25,000 componentes bioactivos de los alimentos como nutrientes y muchos de estos pueden modificar una multitud de procesos que están relacionados con diferentes enfermedades. Generalmente, los antioxidantes son abundantes en frutas y hortalizas aunque también se encuentran en los cereales integrales, guisantes, legumbres, frutos secos y otros productos alimenticios.

Se ha especulado que la disminución en la ingesta de alimentos nutritivos y ricos en antioxidantes puede aumentar las posibilidades de estrés oxidativo que puede conducir a daño celular, por lo tanto, la ingesta de estos antioxidantes naturales puede dar efecto protector contra las enfermedades inducidas por radicales libres (Matsuzawa y Ichijo, 2008, Rajendran et al., 2014).

Los antioxidantes principalmente de frutas y verduras están conformados por compuestos carotenoides como el licopeno, la luteína y el  $\beta$ -caroteno, los cuales debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen son excelentes

desactivadores del  $^1\text{O}_2$ , así como también reaccionan con los radicales  $\text{ROO}\cdot$  y el  $\text{NO}_2\cdot$  estabilizándolos (Hansberg, 2002); también son ricos en compuestos fenólicos como los flavonoles, flavonas, flavononas, antocianidinas y fenilpropanoides, principalmente (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006; Moo-Huchin et al., 2015).

#### **1.3.2.1. Polifenoles.**

Los polifenoles son un grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen la facilidad de donar electrones y estabilizarse, ya que por su estructura química, compuesta por anillos aromáticos, tienen la capacidad de deslocalizar el electrón desapareado (resonancia) (Vaya y Aviram, 2001). Los polifenoles presentes en plantas y frutos han recibido especial atención debido a sus propiedades funcionales como anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacteriales, así como antioxidantes (Chávez-Rivera y Ordóñez-Gómez, 2013) y su efecto en la prevención del estrés oxidativo (Moo-Huchin et al., 2015), ya que se ha asociado su consumo con la disminución de enfermedades cardiovasculares y otras manifestaciones crónicas (Wang et al., 2008).

#### **1.3.2.2. Vitamina C.**

Vitamina C es el término genérico para todos los compuestos que exhiben la actividad biológica de ácido L-ascórbico. Los ácidos L-ascórbico y L-dehidroascórbico son las principales fuentes dietarias de vitamina C.

La vitamina C es considerada como un compuesto antioxidante natural proveniente de la dieta (Moo-Huchin et al., 2015), los humanos tienen que cumplir con sus requerimientos diarios a través de vegetales frescos y frutas y/o suplementos, so pena de padecer escorbuto (Hansberg, 2002).

Es un antioxidante hidrosoluble que se encuentra en el citosol y fluido extracelular, el cual al tener dos hidroxilos ionizables, que hacen de él un excelente agente reductor, puede interactuar directamente con radicales libres, previniendo así daño

oxidativo. Se ha observado una fuerte relación entre bajos niveles de vitamina C y enfermedades cardiovasculares (Boyacioglu et al.,2014), se cree que tiene la mayor importancia para la protección contra enfermedades y procesos degenerativos causados por el estrés oxidativo siendo efectiva en el atrapamiento del  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $^1O_2$  y  $NO^{\cdot}$ . La vitamina C es un excelente antioxidante siempre y cuando no esté en presencia de hierro o de cobre, pues en esas condiciones se genera el  $HO^{\cdot}$ , transformándose así en un prooxidante (Hansberg, 2002).

#### **1.4. Alimentos nativos de México.**

##### **1.4.1. Vainilla.**

De acuerdo a los datos históricos, las primeras noticias que se tienen de la vainilla datan de los años 1427-1440, período durante el que los aztecas conquistaron el imperio totonaca, recibiendo como parte del tributo ofrecido la vainilla (Quintero-López, 2014).

Por más de tres siglos, México permaneció como el único productor de vainilla para consumo mundial, fue hasta 1836 que el botánico Charles Morren de Liege descubrió que las flores requieren ayuda para ser polinizadas en forma natural por insectos, esto condujo al desarrollo de un método de polinización artificial de las flores de la vainilla. A mediados del siglo XIX llegó a Madagascar, país que con los años se convertiría en el principal productor de vainilla del mundo (Maruenda et al., 2013).

La vainilla es una orquídea tropical perteneciente a la familia Orchidaceae y es el único género de esta familia de plantas cuyas especies producen un fruto.

Es una enredadera que alcanza hasta 50 m de longitud y florece entre el tercer y cuarto año de ser plantada. La planta no efectúa la autofecundación debido a la fisiología de su flor por lo que es necesario llevar a cabo la polinización artificial



durante el periodo en que las flores permanecen abiertas (seis a ocho horas) para la fertilización y posterior desarrollo del fruto (Rojas- López, 2010).

El desarrollo subsecuente del fruto verde a un fruto maduro y cosechable toma aproximadamente entre 7 y 9 meses. Tras la cosecha, los frutos se someten a un proceso de curado largo (5-8 meses) para finalmente convertirse en el producto de sabor y aroma que se conoce (Maruenda et al., 2013). En estado de maduración total las vainas son de color amarillo verdoso, cilíndricas de 10 a 25 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de ancho, tienen una sección transversal triangular, con una cavidad central que contiene miles de minúsculas semillas (Fig.12) (Rojas- López, 2010).

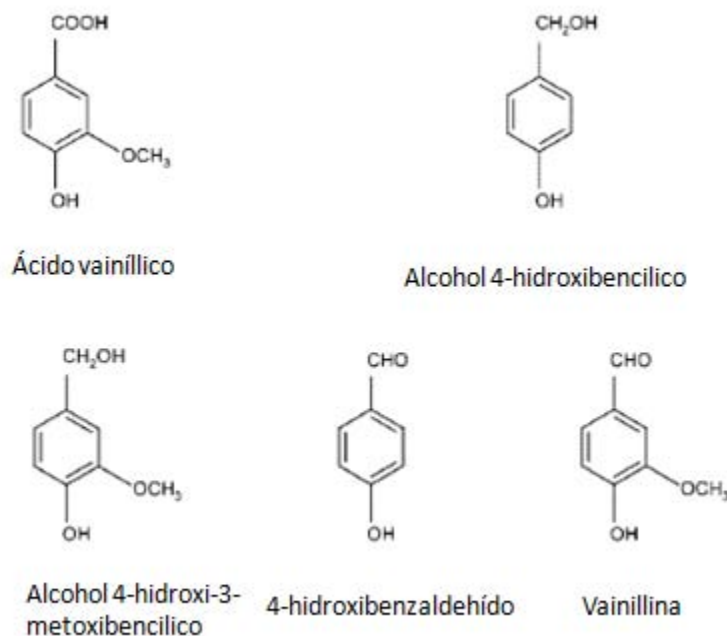


**Figura 12.** Flor de vainilla, etapas en la maduración del fruto, corte de vaina (semillas en su interior).

**Tabla 2 .** Composición química de la vainilla (Rao y Ravishankar, 2000).

<b>Componente</b>	<b>g/100g de vaina</b>
Vainillina	2
Ácido vainílico	0.1
P-hidroxibenzaldehído	0.2
Ácido p-hidroxibenzoico	0.02
Azúcares	25
Lípidos	15
Celulosa	15-30
Minerales	6
Agua	35

En la composición química de la vainilla curada se han identificado más de 300 compuestos. Veinticinco compuestos fenólicos con concentraciones mayores a 1 ppm se han señalado como responsables del característico aroma y sabor de la vainilla. Entre ellas, las más destacadas son la vainillina, alcohol vainílico, ácido vainílico, alcohol 4-hidroxibencílico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol anisilo, anisaldehído y ácido anísico (Fig. 13) (Sinha et al., 2007).



**Figura 13.** Estructuras químicas de algunos compuestos en la vainilla.

Entre los constituyentes no volátiles que imparten su característico sabor a vainilla se encuentran taninos, polifenoles, aminoácidos libres y resinas. En tanto que dentro de los compuestos volátiles responsables del aroma y sabor se pueden mencionar carbonilos, alcoholes aromáticos y alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, fenoles, lactonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, terpenoides, heterociclos, etc. (Rojas- López, 2010).

La vainilla es valorada por su sabor, ya que imparte un aroma delicado, rico y suave con notas leñosas, dulces y picantes. Sus extractos son ampliamente usados en la industria alimentaria para elaborar helados, chocolate, pasteles y galletas (Murcia et al., 2004).

#### **1.4.2. Chocolate.**

Se denomina cacao al fruto extraído del árbol *Theobroma cacao*, fermentado o no y secado. El cacao contiene cerca de 300 compuestos volátiles incluyendo

ésteres, hidrocarbocilactonas, monocarbonilos, pirroles y otros. Se ha dicho que los importantes componentes del sabor son ésteres alifáticos, carbonilos aromáticos insaturados, pirazinas, teobromina y polifenoles. En cuanto a los últimos podemos mencionar como ejemplo más importante a la epicatequina la cual tiene la propiedad de inhibir la oxidación lipídica en el plasma sanguíneo , dada su capacidad de unirse a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (López-Munguía, 2011). El cacao también contiene cerca de 18% de proteínas, 55% de grasas, 0.5 a 2.7% de aminos alcaloides, 0.25 a 1.43% de cafeína, taninos, fosfolípidos entre otros, además de ser fuente de minerales como el potasio, fósforo, magnesio, calcio y vitaminas. Las plantaciones más fecundas en México las tenemos en las regiones costeras del Golfo de México: Tabasco, Veracruz, Chetumal y la costa del Pacífico: Chiapas y Oaxaca (Mugüerza- Medina, 2013).

El chocolate tiene sus orígenes en las antiguas civilizaciones maya y olmeca, consideradas las primeras que cultivaron el árbol del cacao. Los hallazgos arqueológicos señalan que los mayas tomaban chocolate desde el año 600 A.C. El chocolate llegó a España desde México en 1520 a través de monjes que viajaban en la expedición de Hernán Cortés, en Alemania fue introducido en 1646, y en Suiza hasta 1711.

El chocolate es un producto altamente procesado de cacao, del que se sabe es rico en flavonoides. El contenido fenólico de los productos elaborados de cacao depende en gran medida de varios factores que incluyen tanto la calidad de la materia prima y la formulación así como los parámetros tecnológicos adoptados durante la elaboración. La transformación de cacao consiste de un proceso de múltiples pasos que, a partir de granos de cacao fermentados, incluye el secado, tostado, molienda y refinación, conchado y templado. Conchado es la operación unitaria basada en la agitación de la masa de chocolate a altas temperaturas (por encima de 50°C) y es un paso esencial para el desarrollo de la viscosidad adecuada y la obtención de la textura final y el sabor.

Por lo general es un proceso de dos pasos que tiene como objetivo disminuir el contenido de humedad, expulsar los residuos volátiles indeseables de la fermentación y cubrir todas las superficies de las partículas sólidas con la grasa. En la segunda etapa, se añaden más grasa y emulsionantes para obtener una pasta homogeneizada líquida. Las diferentes combinaciones de tiempo / temperatura se seleccionan de acuerdo con el producto final a fabricar: en chocolates oscuros se pueden usar temperaturas que van de 70 a 90°C; variaciones de combinaciones de tiempo / temperatura de conchado obviamente modifican la viscosidad, textura final y el sabor del chocolate. La elección de la combinación de tiempo / temperatura es uno de los parámetros más importantes del proceso y se puede utilizar a menudo con el fin de modular e incrementar las propiedades funcionales de algunos alimentos, como el café. Se ha reportado que la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de chocolates se reducen significativamente por el efecto combinado de alta concentración alcalina y la temperatura de conchado (Di Mattia et al., 2014).

**Tabla 3.** Composición química del chocolate. Adaptado de (USDA) National Nutrient Database for Standard Reference.

<b>Chocolate oscuro ( 45- 59% sólidos de cacao)</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>g/ 100 g</b>
Agua	0.97
Proteína	4.88
Lípidos	31.28
Carbohidratos	61.17
Fibra dietaria	7
Calcio	0.056
Magnesio	0.146
Fósforo	0.206
Potasio	0.559

### 1.4.3. Nopal.

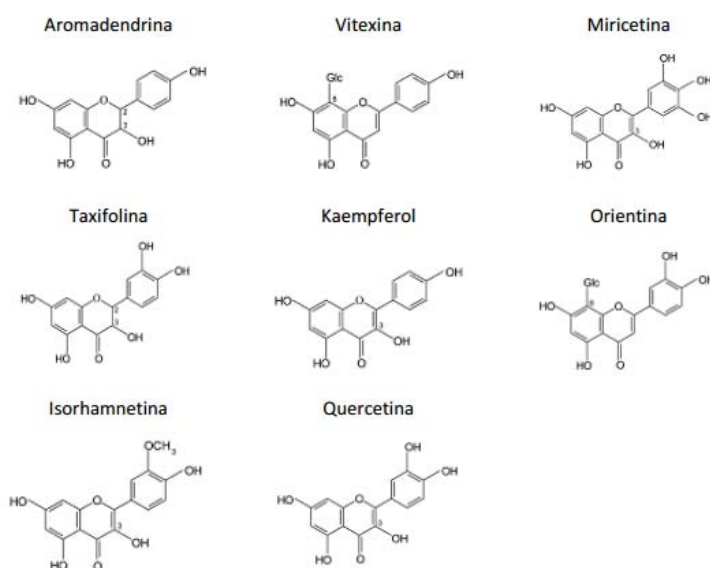
El nopal es una cactácea endémica del continente americano, la cual crece en regiones áridas y semiáridas de nuestro país. Por ello esta especie posee adaptaciones que le permiten almacenar y conservar el agua en sus tejidos (Ávila-Nava et al., 2014).

La composición química es difícil de exponer, ya que en esta existen variaciones debido a la etapa de madurez y época de siembra (Tabla 4).

**Tabla 4.** Composición química del nopal (Arroyo Hernández, 2014)

Componente	g/100 g
Agua	88-95
Carbohidratos	3-7
Fibra	1-2
Proteína	0.5-1
Lípidos	0.2

Dentro de la composición química del nopal se han identificado diversos compuestos polifenólicos (Fig. 14).



**Figura 14.** Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos del nopal.

## 2. ANTECEDENTES FUNCIONALES DEL CHOCOLATE, LA VAINILLA Y EL NOPAL.

La siguiente tabla presenta algunas de las propiedades que han sido atribuidas a los tres alimentos de los que se discutió anteriormente:

**Tabla 5.** Propiedades del nopal (Arroyo Hernández, 2014; Ávila-Nava et al., 2014; López-Romero et al., 2014), chocolate (Allgrove y Davison, 2014; Lettieri-Barbato et al., 2012) y vainilla (Cerruti y Alzamora, 1996; Shyamala et al., 2007).

<b>Nopal</b>	<b>Chocolate</b>	<b>Vainilla</b>
Antioxidante	Antioxidante	Antioxidante
Fuente de polifenoles	Fuente de polifenoles	Fuente de polifenoles
Antihiper glucémico	Disminuye presión arterial	Antimicrobiano
Anti-inflamatorio	Mejora función plaquetaria	Antimutagénico
Fuente de ácido ascórbico		

### **Nopal**

- Antioxidante: Además de estudios in vitro que señalan su actividad antioxidante, se realizó un estudio en humanos donde se observó que tras un consumo de nopal aumentó la actividad antioxidante en plasma (Ávila-Nava, 2012).
- Antihiper glucémico: Estudios con pacientes con DT2 y DT1 tras una dieta que incluía nopal disminuyeron los picos posprandiales de glucosa e insulina dentro de los niveles normales, debido a una reducción en la absorción de azúcar posprandial (Jimenez Carrillo, 1998, López-Romero et al., 2014).
- Anti-inflamatorio: Se ha informado que una dosis de 300 µL/mL de un extracto de nopal administrada vía oral a ratas provoca la disminución de enzimas de lisosoma que se relacionan con el proceso inflamatorio (Ávila-Nava, 2012).

- Hipolipidémico: En varios estudios se ha demostrado que las pectinas aisladas del nopal provocan una disminución de lípidos en sangre de cobayos (Ávila-Nava, 2012).
- Analgésico. Se encontró que una dosis de 300 a 600 mg/kg peso corporal de un extracto etanólico del nopal indujo un efecto analgésico similar a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal de ácido acetilsalicílico administrado en ratones (Arroyo Hernández, 2014).

## **Chocolate**

- Antioxidante. Estudios de intervención realizados en humanos tras el consumo de chocolate revelan una disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) séricas y un aumento en la actividad antioxidante del plasma (Lettieri-Barbato et al., 2012).
- Efecto sobre función plaquetaria. Se ha demostrado el efecto benéfico del chocolate sobre la función plaquetaria revelando una reducción de la agregación, una disminución del volumen plaquetario y una reducción de la degranulación de las plaquetas (medida como liberación de ADP) tras el consumo de chocolate negro (Gómez-Juaristi et al., 2011).
- Disminución de la presión arterial. El consumo de chocolate se relaciona con la disminución de la presión arterial y la vasodilatación periférica. Se ha detectado una reducción de la presión arterial sistólica (PAS) hasta 4.1 mm Hg y presión arterial diastólica (PAD) entre 1.8 y 8.5 mm Hg consumiendo 100 g de chocolate negro durante 2 semanas en personas sanas o ligeramente hipertensas (Gómez-Juaristi et al., 2011).



## Vainilla

- Antioxidante. Se han realizado estudios *in vitro* que señalan su actividad antioxidante (Shyamala et al., 2007). Sin embargo no se han realizado estudios *in vivo*.
- Antimutagénico. En estudios realizados con cepas de *E. coli* con mutaciones se observó que hubo una mayor tasa de sobrevivencia en los medios que contenían vainillina, lo que puede indicar un efecto Antimutagénico (Ohta et al., 1988).
- Antimicrobiano. Se ha demostrado que en algunos productos alimenticios, como puré de frutas, el crecimiento de levaduras que producen descomposición en el alimento fue inhibido en las muestras que contenían vainillina, el cual es el compuesto que se encuentra en mayor parte en la vainilla (Cerruti y Alzamora, 1996).

Como se observa no hay estudios *in vivo* que demuestren los beneficios del consumo de vainilla en humanos ni en modelos animales, por lo que en este trabajo se llevó a cabo el estudio *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS.

- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de alimentos de alto consumo en México.
- Determinar la actividad antioxidante *in vivo* de la vainilla en sujetos sanos.

#### 3.1. *Objetivos específicos.*

- Determinar la actividad antioxidante de la vaina de la vainilla, del nopal con distintos tratamientos térmicos y del chocolate mexicano y extranjero.
- Comparar la actividad antioxidante de la vainilla, el nopal y el chocolate con diferentes alimentos.
- Determinar el contenido de vitamina C en las muestras de nopal.

- Determinar el contenido de polifenoles en la vainilla y el nopal.
- Determinar la actividad antioxidante de la vainilla y los chocolates contra las siguientes especies reactivas: radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido, anión peroxinitrito y ácido hipocloroso.
- Determinar la actividad antioxidante en plasma de sujetos sanos después del consumo de una dosis de vainilla.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La vainilla y el chocolate poseen compuestos que presentan actividad antioxidante por lo que atraparán diversas especies reactivas in vitro.

El consumo de vainilla aumentará la capacidad antioxidante del plasma de sujetos sanos.

El tratamiento térmico disminuirá el contenido de vitamina C y la actividad antioxidante en nopales.

#### **5. METODOLOGÍA.**

##### **5.1. Alimentos evaluados.**

En este trabajo se evaluaron distintos alimentos los cuales se mencionan a continuación:

1. Vainas de vainilla provenientes de Papantla, Veracruz. Se estudio tanto la vaina completa, como la corteza (parte exterior) y las semillas (parte interior)
2. Chocolate con 47% de cacao, producido artesanalmente, proveniente de Oaxaca.
3. Chocolate con 70% y 100% de cacao, producidos artesanalmente, provenientes de Chiapas.
4. Chocolate comercial con 73% de cacao, proveniente de Alemania.
5. Chocolate comercial con 70% de cacao, proveniente de Suiza.
6. Nopal proveniente del Estado de México.

## 7. Granos de cacao provenientes de Tabasco.

El resto de los alimentos fueron adquiridos en un supermercado local ubicado en el Distrito Federal, se eligieron únicamente los alimentos que se encontraban en buen estado.

Ciruela, fresa, zarzamora, limón, manzana, chía, jitomate, aguacate, mango, papaya, té verde, té negro, café soluble y café de grano.

### **5.2. Tratamiento de las muestras.**

Los diferentes alimentos se deshidrataron en una estufa al vacío a una temperatura de 50°C, excepto en el caso del nopal con distintos tratamientos térmicos, para facilitar su comparación eliminando así la variable de humedad, la cual es distinta para cada alimento modificando la cantidad de compuestos antioxidantes presentes por gramo de muestra. Posteriormente se molió cada alimento utilizando N<sub>2</sub> líquido.

Para la comparación de la actividad antioxidante del nopal tras distintos tratamientos térmicos (Fig. 27) el nopal fresco se sometió a distintos tiempos de cocción al vapor y posteriormente se realizaron los extractos.

### **5.3. Extracción de polifenoles totales.**

Para llevar a cabo la extracción, se colocó 1 g de cada alimento en un tubo de 15 mL, se adicionaron 4 mL de agua destilada. Se mezcló con agitación continua durante 15 min y posteriormente se centrifugó 1000 x g durante 10 min. Se recolectó el sobrenadante en un nuevo tubo. Se adicionaron posteriormente 2 mL de agua destilada seguidos de 15 min de agitación continua y se volvió a centrifugar a 1000 x g por 10 min. Se recolectó el sobrenadante. Se repitieron ambos pasos utilizando 4 y 2 mL de acetona, respectivamente. Los sobrenadantes recolectados formaron los extractos que se utilizaron en las determinaciones (Gillespie et al., 2007). La mezcla de disolventes (agua y acetona), extrae todo tipo de polifenoles (Ávila-Nava, 2012).

## **5.4. Comparación de la actividad antioxidante con diferentes alimentos.**

### **5.4.1. Actividad antioxidante determinada mediante el método de DPPH.**

#### **Fundamento**

El método de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto o de una mezcla. Se basa en la reducción del DPPH, un radical libre que por su electrón desapareado en un puente de su átomo de nitrógeno (Sharma y Bhat, 2009) presenta absorbancia a 517 nm (púrpura) y en presencia de un antioxidante (donador de hidrógeno o electrones) la absorbancia disminuye.

#### **Ensayo**

En un tubo eppendorf se colocaron 25  $\mu$ L de muestra y se agregaron 1.48 mL de DPPH 100  $\mu$ M. La mezcla se agitó y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 517 nm. De manera paralela se realizó una prueba utilizando como atrapador específico el ácido ascórbico (vitamina C) bajo las mismas condiciones en que se realizó la mezcla de la muestra (Govindarajan et al. 2003; Ávila-Nava et al., 2014).

A partir del ensayo con DPPH se obtiene la concentración efectiva ( $IC_{50}$ ) que se define como la concentración a la cual se disminuye en un 50% la concentración inicial de DPPH.

### **5.4.2. Actividad antioxidante determinada mediante el método ORAC.**

#### **Fundamento**

El ensayo ORAC (Capacidad de absorbancia de los radicales libres de oxígeno, por sus siglas en inglés) se basa en la capacidad de atrapamiento del radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ), el cual se genera mediante la reacción entre el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH). El  $ROO\cdot$  oxida a la fluoresceína y ésta emite fluorescencia, la cual es monitoreada a lo largo de

90 min. Durante este tiempo se registran los cambios de intensidad de fluorescencia, lo que permite calcular el área bajo la curva de la caída de la fluorescencia (Ávila-Nava, 2012).

## Ensayo

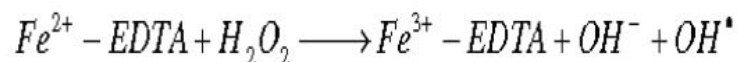
Para éste método se colocaron en una placa negra de 96 pozos 150  $\mu$ L de fluoresceína 40 nM, 25  $\mu$ L de AAPH (Huang et al., 2002). Se leyó la fluorescencia en un curso temporal durante 90 min en espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a longitudes de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

### 5.5. Actividad antioxidante in vitro.

#### 5.5.1. Atrapamiento del radical hidroxilo (HO $\cdot$ ).

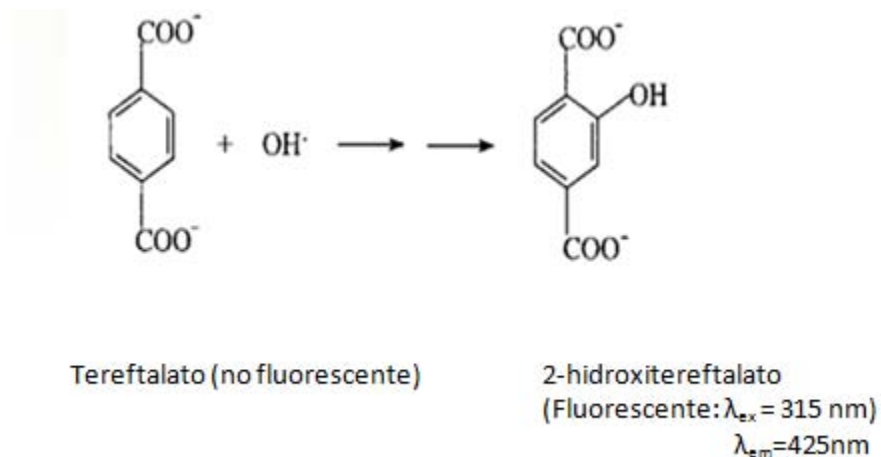
#### Fundamento

El radical hidroxilo es generado mediante la reacción de Fenton.



**Figura 15.** Reacción de Fenton en la que se genera el radical hidroxilo. En esta reacción se utiliza como catalizador al hierro (II).

Uno de los métodos para detectar especies reactivas es el uso de compuestos fluorescentes, como lo es el tereftalato, el cual es un compuesto específico para identificar al  $\cdot$ OH. Cuando el tereftalato interactúa con el radical hidroxilo presenta fluorescencia, la cual disminuye en presencia de un compuesto antioxidante, ya que disminuyen los radicales hidroxilo que reaccionan con este (Ávila-Nava, 2012).



**Figura 16.** Determinación de actividad atrapadora del ·OH mediante método fluorométrico.

### Ensayo

Se realizó la mezcla de reacción descrita en la Tabla 6 usando como diluyente amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Los reactivos se colocaron en el orden en el que se presentan en dicha tablas (Ávila-Nava, 2012; Qu et al., 2000). La determinación se llevó a cabo en una placa negra de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 22.2 μL de muestra y posteriormente 200 μL de mezcla de reacción, de manera paralela se realizó un ensayo utilizando el atrapador específico de esta especie: dimetiltiourea (DMTU), en las mismas condiciones en que se analizó la muestra.

En este método fluorométrico se hicieron lecturas cada minuto durante 30 minutos. Estas mediciones se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT, se utilizaron las longitudes de excitación de 326 nm y de emisión de 432 nm.



oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina en ácido úrico. El  $O_2^{\cdot -}$  formado reacciona con el nitroazul de tetrazolio formando así el cromógeno formazán.

## Ensayo

Para esta metodología se preparó una mezcla de reacción, la cual se presenta en la Tabla 7 (Ávila-Nava, 2012; Medina-Campos et al., 2007).

**Tabla 7.** Mezcla general de reacción para método enzimático. Generación del anión superóxido mediante el sistema xantina- xantina oxidasa.

<b>Mezcla de reacción general</b>		
	Concentración	Volumen (mL)
<b>Xantina</b>	0.3 mM	6
<b>NBT</b>	150 $\mu$ M	3
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	400 mM	1.5
<b>EDTA</b>	0.6 mM	3
<b>Volumen total</b>		13.5

Se colocaron 41  $\mu$ L de muestra y posteriormente se agregaron 300  $\mu$ L de la mezcla anterior en cada pozo y 10  $\mu$ L de xantina oxidasa 156 U (Sigma) para iniciar la reacción. Como compuesto de referencia se utilizó Tiron (Maldonado et al., 2005).

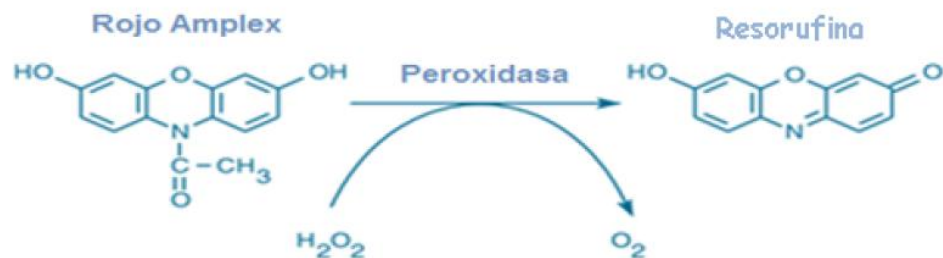
Se midió la absorbancia durante 3 min cada min en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a una longitud de onda de 560 nm.

### 5.5.3. Atrapamiento del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### Fundamento

El método se basa en la emisión de fluorescencia producida por la reacción entre la mezcla de peroxidasa de rábano, rojo amplex y peróxido de hidrógeno. El producto de esta reacción se determina fluorométricamente (Ávila-Nava, 2012).





**Figura 18.** Reacción del rojo amplex con peroxidasa en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuyo producto de reacción es la resorufina.

### Ensayo

Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 8).

**Tabla 8.** Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora del peróxido de hidrógeno.

Mezcla de reacción	
	Concentración
<b>Amplex red</b>	10 mM
<b>Peroxidasa de rábano</b>	10 U/mL
<b>Amortiguador de fosfatos pH7.4</b>	50 mM

En una placa negra de 96 pozos se colocaron 100 µL de mezcla de reacción, 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µM) y 20 µL de muestra. Se incubó 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la lectura del punto final en espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT, utilizando longitudes de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm. Como atrapador específico se utilizó al piruvato (Medina-Campos et al., 2007).

#### 5.5.4. Atrapamiento del anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

##### Fundamento

El fundamento de éste método se basa en la determinación de la fluorescencia emitida por el diacetato de 2'7' diclorodihidrofluoresceina (DCD-FDA) el cual se desacetila en un medio básico formando 2'7'-dihidrofluoresceina, el cuál en presencia de ER como el peroxinitrito se oxida y se forma la 2'7'diclorofluoresceina la cual emite fluorescencia. En presencia de un compuesto antioxidante que atrape al anión peroxinitrito, la fluorescencia emitida disminuye (Crow, 1997).

##### Ensayo

Para llevar a cabo éste ensayo se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 9.) Los volúmenes especificados en la tabla se colocaron en una placa negra de 96 pozos (Ávila-Nava et al., 2014). Se utilizaron como compuestos de referencia penicilamina y ácido ascórbico. Se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la lectura del punto final en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a longitudes de excitación de 595 nm y de emisión de 528 nm.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora de peroxinitrito. DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético).

	Concentración (mM)	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	-	180
Muestra	-	20
DTPA	1	6.66
ONOO-	0.62	6.66
DCF-FDA	3.5	6.66
Volumen Total		220

### **5.5.5. Atrapamiento del ácido hipocloroso (HOCl).**

#### **Fundamento**

Esta técnica se basa en la emisión de fluorescencia por el ácido p-aminobenzoico, el cual al reaccionar con HOCl forma el ácido 3-cloro-4aminobenzoico, el cual no presenta fluorescencia. Por lo que se detecta una mayor señal cuando hay un mayor atrapamiento del HOCl por el alimento (Van Antwerpen y Ne`ve, 2004).

#### **Ensayo**

Se preparó HOCl inmediatamente previo a su uso usando 1 mL de NaOCl al 5% y diluyendo con 3.3 mL de amortiguador de fosfatos 75 mM, pH 7.4. Se ajustó a pH 6.4 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 M. La concentración de HOCl se determinó a una longitud de onda de 235 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de 100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Maldonado et al., 2005). A partir de dicha solución se preparó HOCl 0.5 mM.

El ensayo se llevó a cabo en una placa negra de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 25 µL de muestra, 25 µL de HOCl 0.5 mM, 25 µL de ácido aminobenzoico 1 mM y 150 µL de amortiguador de fosfatos 75 mM, pH 7.4. Se utilizaron como compuestos de referencia ácido ascórbico y ácido lipoico.

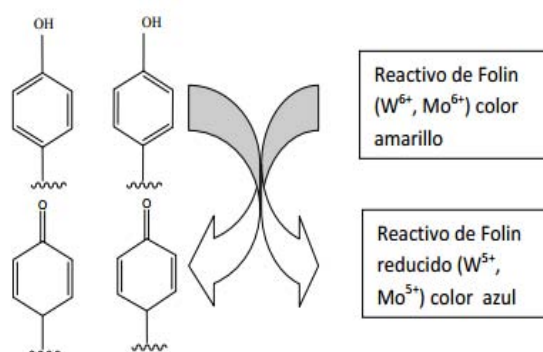
Se realizó la lectura de punto final en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a longitudes de excitación de 280 nm y de emisión de 340 nm.

### **5.6. Cuantificación de polifenoles totales.**

#### **Fundamento**

El método Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales; se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico- fosfotúngstico (Ávila-Nava, 2012). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico formando óxidos

que son cromógenos de tungsteno ( $W_5O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) de color azul intenso (Julkunen-Tiitto, 1985).



**Figura 19.** Determinación de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

## Ensayo

Para la determinación de polifenoles en las muestras de alimentos se utilizó la metodología descrita por Koren et al. (2010). En un tubo eppendorf se colocaron 50  $\mu$ L de muestra y 250  $\mu$ L de reactivo Folin, se mezclaron y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  al 20% se mezcló nuevamente y se dejó 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se determinó la absorbancia a 760 nm en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT. Como estándar para el ensayo se utilizó una curva estándar de ácido gálico (Sigma) cuyo rango de concentración fue entre 1 a 50 mg/L.

### 5.7. Determinación de la actividad antioxidante de la vainilla en humanos sanos.

#### Fundamento

Una de las propiedades más importantes de una sustancia antioxidante es, además de presentar actividad antioxidante in vitro, que tenga acción in vivo sobre sustratos oxidados que se generan de manera fisiológica o en la enfermedad. Debido a ello se determinó la actividad antioxidante en plasma de

sujetos sanos después del consumo de 3 cápsulas de 500 mg de vaina de vainilla en polvo. Para observar sólo el efecto de la vainilla, los sujetos fueron sometidos a una dieta libre de antioxidantes (Tabla 10) dos días previos al consumo de las cápsulas de vainilla.

La dieta libre de antioxidantes se ajustó a los requerimientos energéticos de cada participante. El único criterio de inclusión para el estudio fue que el índice de masa corporal (IMC) se encontrara dentro del rango 18.5 a 25. En esta dieta se eliminó el consumo de alimentos a los que se les ha atribuido tener actividad antioxidante como frutas, verduras, café, chocolate, entre otros. (Maurya y Devasagayam, 2010; Shivashankara et al., 2012; Ávila-Nava et al., 2014).

**Tabla 10.** Dieta ejemplo de 1800 kcal para determinación de la actividad antioxidante conferida por la vaina de vainilla.

Dieta de 1800 kcal “SIN ANTIOXIDANTES”	
<i>Desayuno</i>	*3 <b>Tortillas de maíz</b> [De tortillería] *120g de <b>queso panela</b>
<i>Colación</i>	*3 <b>salchichas de pavo</b> crudas o cocida. [NO se puede agregar nada a la salchicha]
<i>Comida</i>	*1/2 taza de <b>Arroz</b> cocido [solo se puede agregar sal, NO se puede agregar consomé de pollo, condimentos, verduras, aceite o margarina]. *120 g <b>Pollo asado</b> [NO se puede agregar nada, ni limón, ni salsas, ni cilantro, ni perejil, solamente sal]. *4 <b>tortillas de maíz</b> [De tortillería].
<i>Colación</i>	* 2 paletas <b>tutsi pop</b> . *2 <b>salchichas de pavo</b> crudas o cocida [NO se puede agregar nada a la salchicha].
<i>Cena</i>	* 120 g de <b>queso panela</b> *3 <b>tortillas de maíz</b> [De tortillería].

## **Ensayo**

Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 500 x g por 5 min para obtener el plasma. Posteriormente se determinó la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ORAC.

### **5.7.1. Actividad antioxidante in vivo por el método DPPH.**

## **Ensayo**

En tubos eppendorf se colocaron 50  $\mu$ L de solución salina, seguido de 25  $\mu$ L de muestra de plasma y 50  $\mu$ L de DPPH (1 mM). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de etanol absoluto, se mezcló y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1,500 x g por 2 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia del sobrenadante a 517 nm en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Ávila-Nava, 2012).

### **5.7.2. Actividad antioxidante in vivo por el método ORAC.**

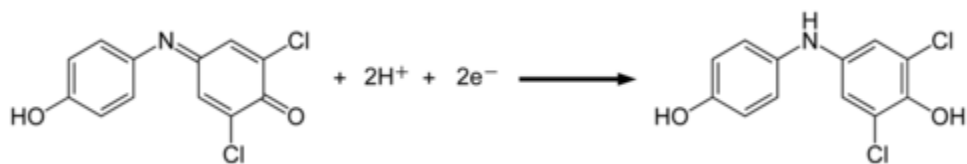
## **Ensayo**

Se realizaron diluciones (1/250) de las muestras de plasma y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para las muestras de alimentos (ver punto 5.4.2.).

## **5.8. Determinación de vitamina C.**

### **Fundamento**

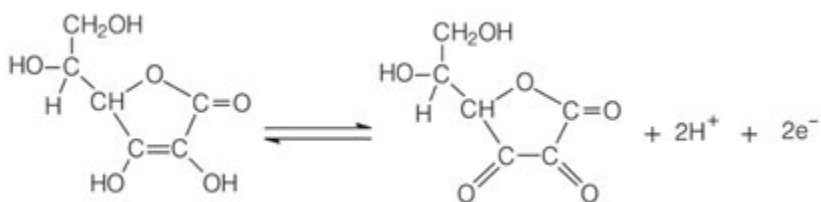
Éste método se basa en el poder de reducción que tiene el ácido L-ascórbico y el uso del indicador 2,6- diclorofenol-indofenol (2,6-DI), el cual es un compuesto químico usado normalmente como indicador redox. En su estado oxidado el 2,6-DI es de color azul, bajo condiciones ácidas se vuelve rosa; cuando se encuentra en su estado reducido es incoloro (Fig. 9). El ácido ascórbico por lo tanto es oxidado a ácido dehidroascórbico (Fig. 10) y 2,6-DI es reducido.



2,6-DI (azul) + H<sup>+</sup> → 2,6 DIH (rosa)

2,6-DI (rosa)+ Vit C → 2,6 DIH<sub>2</sub> (incoloro)

**Figura 20.** Reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DI).



**Figura 21.** Oxidación del ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico.

### Ensayo

El ensayo se realizó en base a la AOAC 1990 (con algunas modificaciones).

Se preparó una solución de ácido acético al 5%, una solución estándar de ácido ascórbico (1 mg/mL) y una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DI) valorada: pesando 100 mg de 2,6-DI con 50 mg de bicarbonato de sodio y aforando con agua destilada hasta obtener 1 litro de solución.

Valoración de la solución indicadora (2,6-DI)

Se colocó una alícuota de 1 mL de la solución estándar y se adicionaron 9 mL de solución de ácido acético al 5%, ésta mezcla se tituló con la solución 2,6-DI hasta que persistió el color rosado por 10 segundos. La cantidad utilizada se consideró como el volumen de 2,6-DI necesario para oxidar un miligramo de ácido ascórbico.

## Valoración de la muestra

Se evaluó el contenido de vitamina C en muestras de nopal fresco molido (muestra sólida) y en los extractos de nopal realizados (muestra líquida), a su vez se realizó la evaluación en guayaba fresca molida (muestra sólida) y en jugo de naranja recién exprimido (muestra líquida), usados como estándares.

Se pesaron aproximadamente 700 mg de muestra de nopal y 1000 mg de guayaba, respecto a las muestras líquidas se tomaron 10 mL de extracto de nopal y 30 mL de jugo de naranja, cada muestra se colocó en matraces Erlenmeyer.

Inmediatamente se homogeneizó cada muestra con 50 mL de ácido acético al 5%. Se llevó al aforo de 100 mL con agua destilada, se dejó sedimentar el material insoluble y se decantó obteniendo el sobrenadante. Se tomaron alícuotas de 10 mL las cuales se titularon inmediatamente con la solución valorada de 2,6-DI hasta que persistió el color rosa por 10 segundos.

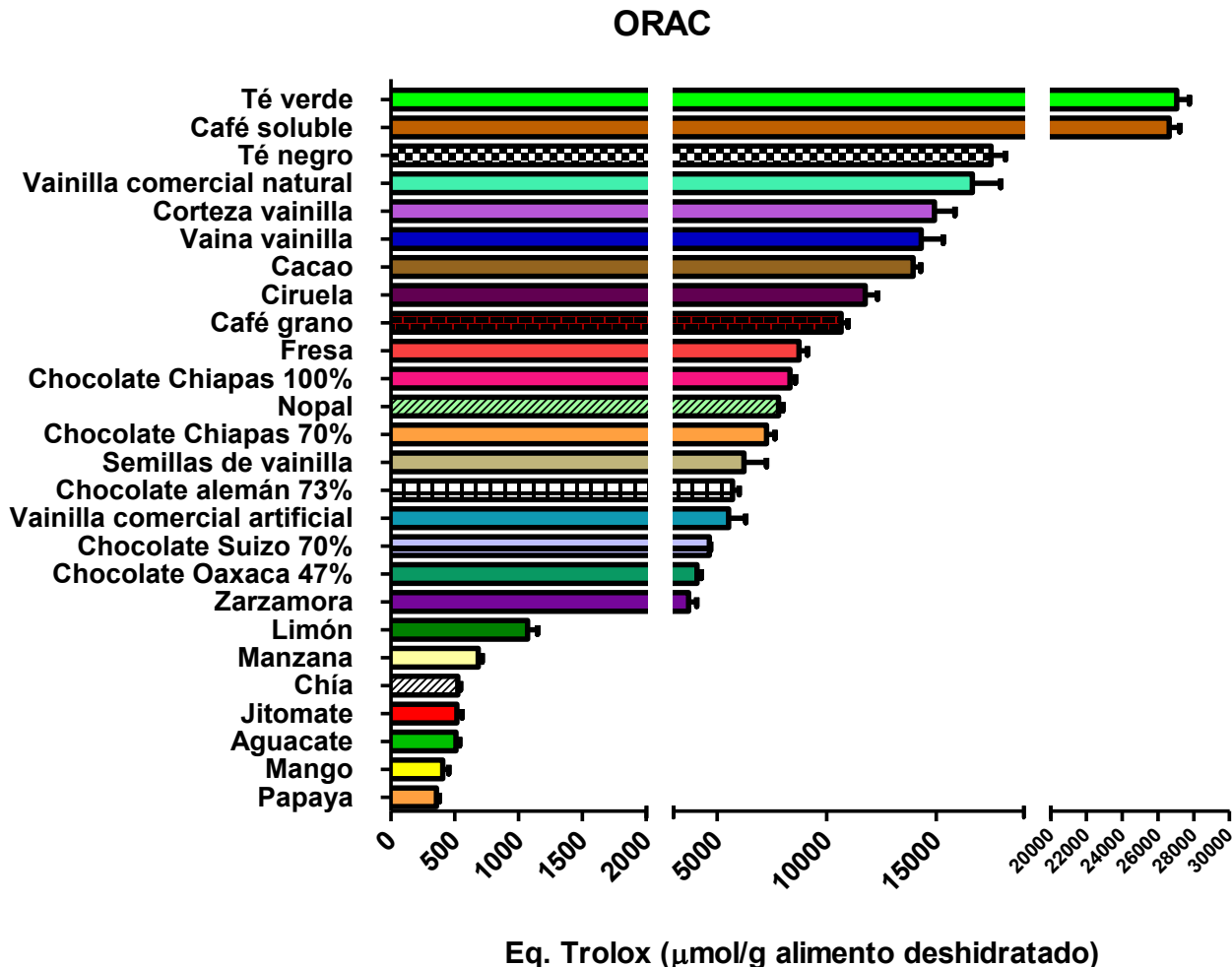
## **6. RESULTADOS.**

### **6.1. Determinación de la actividad antioxidante de distintos alimentos.**

#### **6.1.1. Resultados por el método ORAC.**

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos mediante el método ORAC, los resultados se informan como equivalentes trolox. El trolox es un análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y debido a la actividad antioxidante que presenta se ha utilizado como estándar para diferentes ensayos como ORAC.





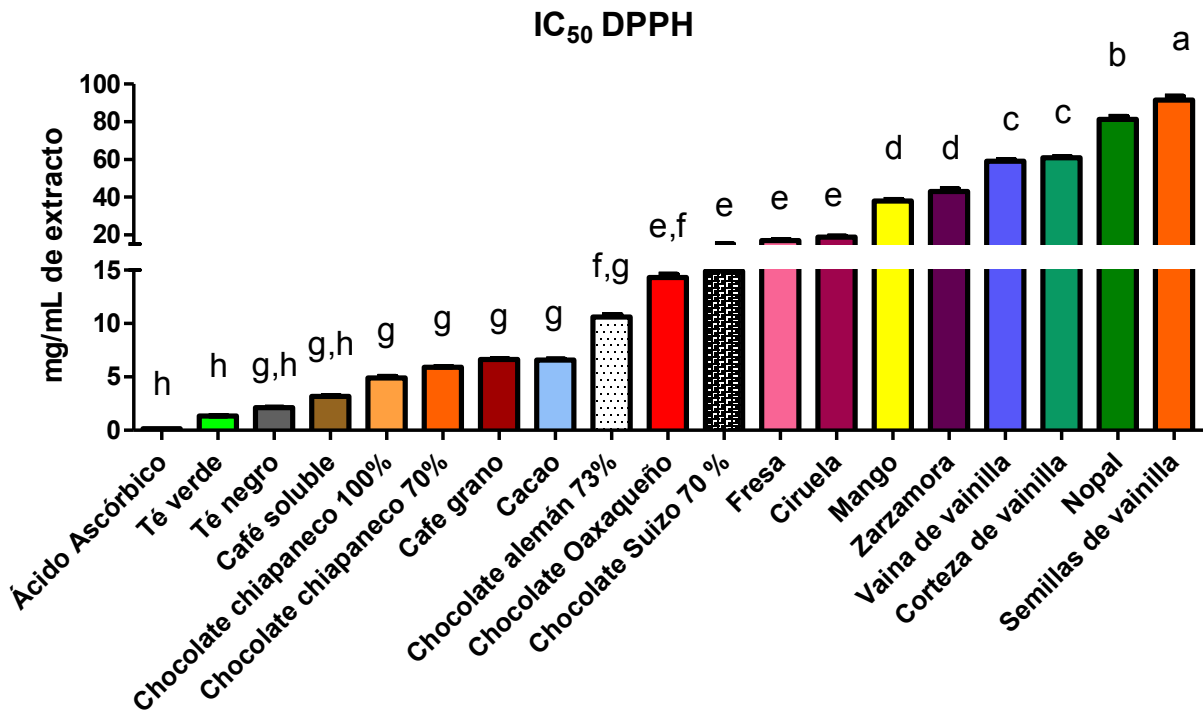
**Figura 22.** Comparación de la actividad antioxidante de varios extractos de alimentos mediante el método ORAC. Los resultados se expresan como equivalentes trolox (µmoles) / g de alimento deshidratado. Los datos se reportan como promedio ± EEM, n=3.

Tal como lo revela la figura anterior los resultados obtenidos se resumen en un orden decreciente de acuerdo a su actividad antioxidante in vitro, expresados en µmol trolox / g de alimento deshidratado: Té verde 27,041±1,992, Café soluble 26,633±1,638, Té negro 17,514±1,867, Vainilla comercial natural 16,657±1,694, Corteza de vainilla 14,924±1,626, Vaina de vainilla 14,325±2,180, Cacao 13,891±831, Ciruela 11,768±1,356, Café de grano 10,664±908, Fresa 8,436±723, Chocolate Chiapaneco (100% cacao) 8,509±63, Nopal 7,909±535, Chocolate Chiapaneco (70% cacao) 7,179±855, Semillas de vainilla 6,219±811, Chocolate

Alemán (73% cacao) 5,702±454, Vainilla comercial artificial 5,529±295, Chocolate Suizo (70% cacao) 4,637±23, Chocolate Oaxaqueño (47% cacao) 4,082±312, Zarzamora 3,582±630, Limón 1,070±30, Manzana 685±56, Chía 524±50, Jitomate 512±28, Aguacate 510±41, Mango 403±76, Papaya 356±38.

### 6.1.2. Resultados por el método DPPH.

Los mismos extractos se evaluaron también por el método de DPPH, que como ha sido mencionado es un radical libre. Apartir de su porcentaje de atrapamiento por las muestras a distintas concentraciones se calculó el IC<sub>50</sub>, es decir, la concentración de muestra requerida para atrapar al 50% de los radicales DPPH. Éste método no dio resultados para ciertos alimentos, debido a que no se alcanzó el atrapamiento del 50% con los extractos realizados.



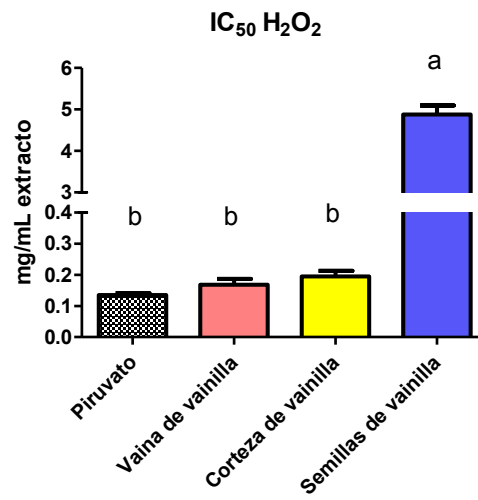
**Figura 23.** Comparación de la actividad antioxidante de varios extractos de alimentos mediante el método DPPH. Los resultados se expresan como IC<sub>50</sub> (mg/mL de extracto). Los datos se informan como promedio ± EEM, n=3. ANOVA P<0.05. Las letras diferentes implican valores con diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados de la figura anterior se describen en orden decreciente de  $IC_{50}$  ( a un valor menor de  $IC_{50}$  mayor es su actividad antioxidante) expresados en mg / mL de extracto: Semillas de vainilla  $91.51 \pm 1.97$ , Nopal  $81.25 \pm 1.48$ , Corteza de vainilla  $60.87 \pm 0.50$ , Vaina de vainilla  $59.01 \pm 0.84$ , Zarzamora  $42.89 \pm 1.36$ , Mango  $37.96 \pm 0.73$ , Ciruela  $18.70 \pm 0.59$ , Fresa  $16.98 \pm 0.38$ , Chocolate Suizo (70% cacao)  $14.92 \pm 0.19$ , Chocolate Oaxaqueño (47% cacao)  $14.31 \pm 0.29$ , Chocolate Alemán (73% cacao)  $10.60 \pm 0.22$ , Cacao  $6.59 \pm 0.07$ , Café de grano  $6.63 \pm 0.06$ , Chocolate chiapaneco (70% cacao)  $5.90 \pm 0.06$ , Chocolate chiapaneco (100% cacao)  $4.91 \pm 0.13$ , Café soluble  $3.16 \pm 0.06$ , Té negro  $2.13 \pm 0.34$  y Té verde  $1.34 \pm 0.01$  y ácido ascórbico  $0.1429 \pm 0.0019$ , el cual es el compuesto de referencia utilizado.

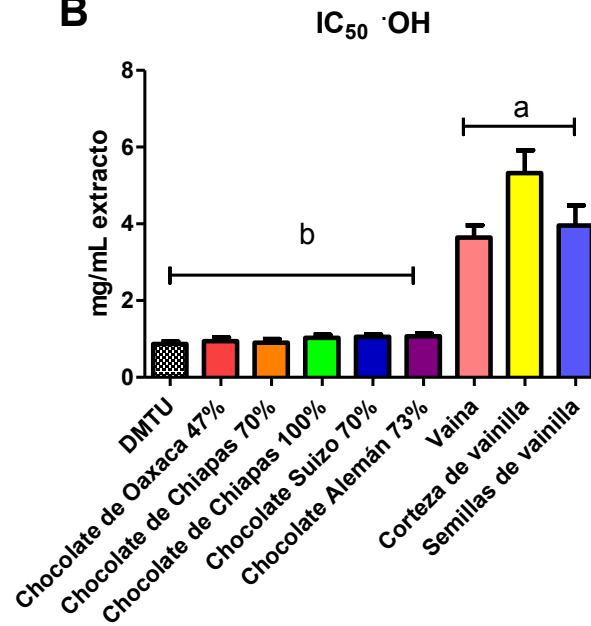
El café soluble, té negro y té verde no presentaron diferencia significativa respecto al atrapamiento del DPPH con el ácido ascórbico, por lo que se infiere que son muy buenos antioxidantes, mientras que los chocolates chiapanecos de 70 y 100% cacao, respectivamente, así como los granos de cacao también poseen un  $IC_{50}$  considerablemente bajo.

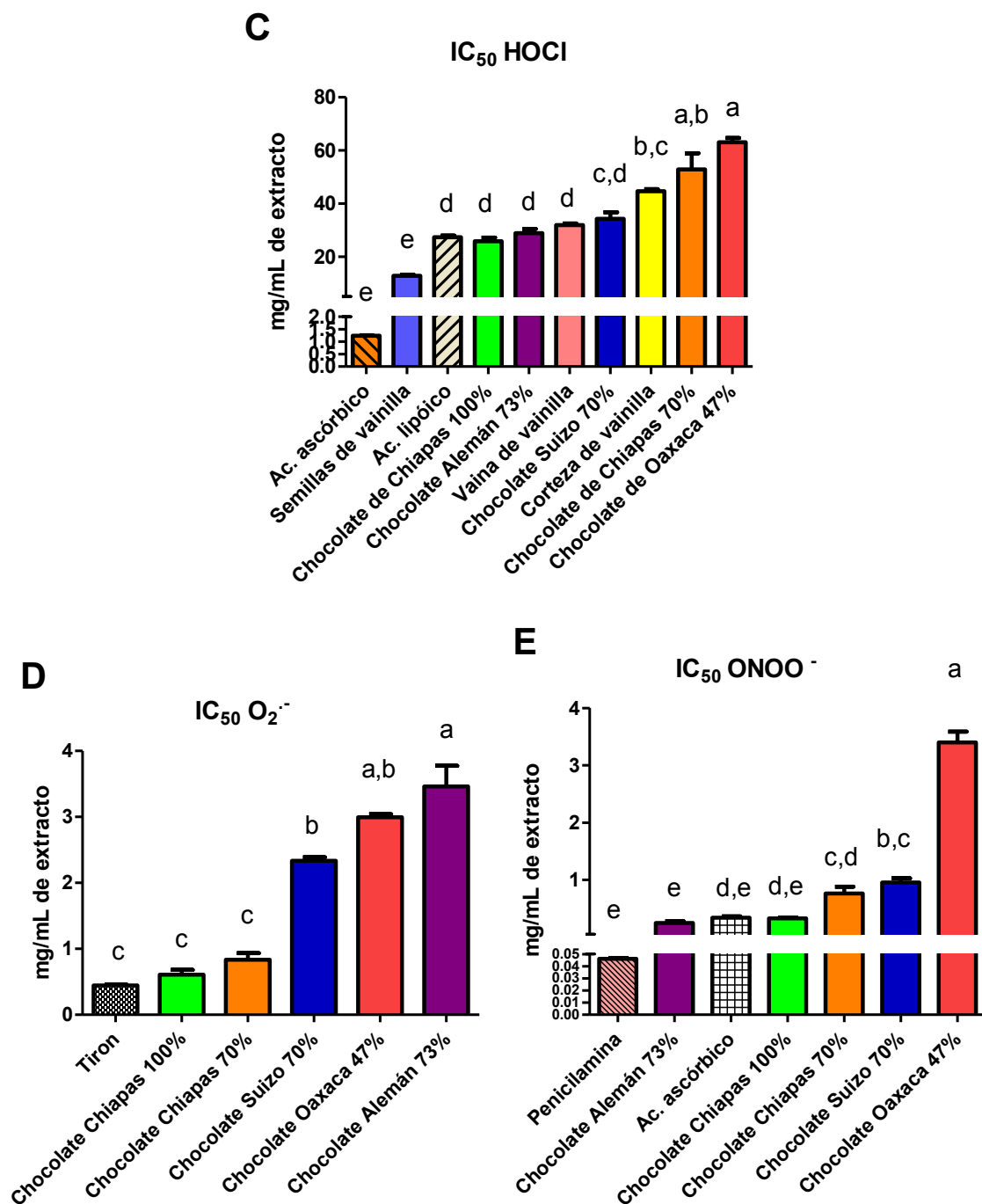
6.2. Determinación del porcentaje de atrapamiento del chocolate y la vainilla de distintas especies reactivas.

**A**



**B**





**Figura 24.** Actividad atrapadora de la vainilla y los diferentes chocolates hacia diferentes especies reactivas. IC<sub>50</sub> (mg/mL de extracto) para (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) ·OH (C) HOCl (D) O<sub>2</sub><sup>-</sup> y (E) ONOO<sup>-</sup>. Los datos se informan como promedio ± EEM, n=3. ANOVA, P<0.05. Las letras diferentes implican valores con diferencia estadísticamente significativa.

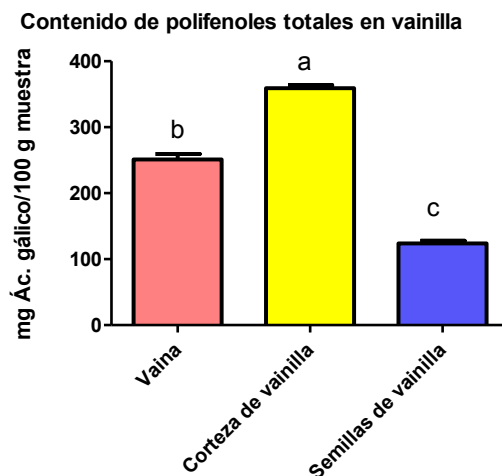
Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Valores de IC<sub>50</sub> para las distintas ERO evaluadas. Los datos se informan como promedio ± EEM, n=3.

			IC <sub>50</sub> mg/mL extracto							
			Vainilla			Chocolates				
ERO	Compuesto de referencia	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Vaina	Corteza	Semillas	Oaxaca 47% cacao	Chiapas 70% cacao	Chiapas 100% cacao	Suizo 70 % cacao	Alemán 73% cacao
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Piruvato	0.1350 ± 0.0057	0.1684 ± 0.0183	0.1947 ± 0.0185	4.8806 ± 0.2162	–	–	–	–	–
·OH	DMTU	0.8669 ± 0.0603	3.6412 ± 0.3206	5.3259 ± 0.5936	3.9583 ± 0.5272	0.9406 ± 0.0945	0.9064 ± 0.0879	1.0275 ± 0.0823	1.0617 ± 0.0545	1.0673 ± 0.0705
HOCl	Vitamina C  Ác lipoico	1.2370 ± 0.0221  27.326 ± 0.6462	31.92 ± 0.60	44.69 ± 0.72	12.82 ± 0.43	63.05 ± 1.66	52.88 ± 6.03	25.82 ± 1.32	34.26 ± 2.47	28.88 ± 1.59
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Tiron	0.4463 ± 0.0117	–	–	–	2.9933 ± 0.0488	0.8377 ± 0.1003	0.6067 ± 0.0768	2.34 ± 0.0498	3.4616 ± 0.312
ONOO <sup>-</sup>	Vitamina C  Penicilamina	0.3410 ± 0.0213  0.0461 ± 0.0007	–	–	–	3.4000 ± 0.190	0.7600 ± 0.116	0.3310 ± 0.0161	0.9499 ± 0.0706	0.2477 ± 0.0319

La Figura 30 localizada en el anexo muestra las curvas de % de atrapamiento vs. logaritmo de la concentración de los extractos, utilizadas para obtener el valor de IC<sub>50</sub> para cada ER.

### 6.3. Contenido de polifenoles totales en la vainilla.

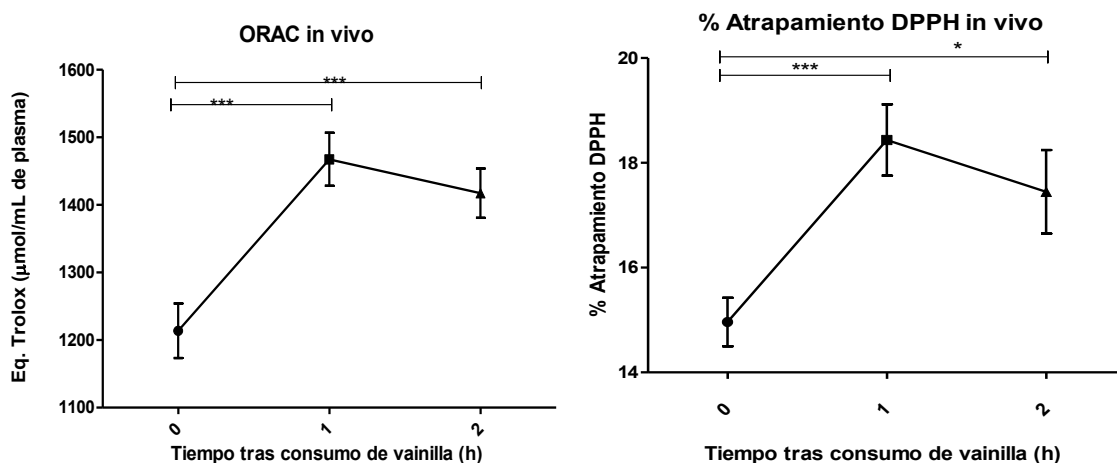


**Figura 25.** Contenido de polifenoles totales en vainilla en mg de ácido gálico / 100 g muestra, los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$ . ANOVA,  $P<0.05$ .

Los resultados se expresan como mg de ácido gálico / 100 g de muestra, en orden decreciente: Corteza de vainilla  $359.09 \pm 4.81$ , Vaina de vainilla  $251.18 \pm 8.46$ , Semillas  $123.92 \pm 4.02$ . Observándose que la corteza es la parte de la vainilla que tiene mayor contenido de polifenoles.

### 6.4. Actividad antioxidante de vainilla in vivo.

La importancia de la actividad antioxidante de una molécula presente en un alimento, no sólo reside en condiciones in vitro. Esta actividad antioxidante debe reflejarse en el incremento de la actividad antioxidante después del consumo del mismo. Por ello se determinó el efecto sobre la actividad antioxidante en plasma de sujetos sanos después del consumo de 3 cápsulas de 500 mg de vainilla cada una.



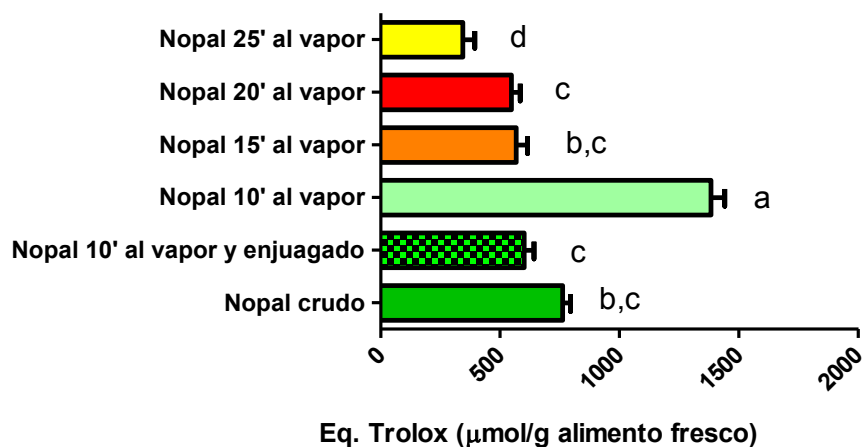
**Figura 26.** Evaluación de la actividad antioxidante en plasma de sujetos sanos por los métodos de ORAC ( $\mu\text{mol}$  trolox/mL de plasma) y DPPH (% atrapamiento de DPPH). Los resultados se reportan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=10$ . \*\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

### 6.5. Comparación de la actividad antioxidante de nopal tras distintos tratamientos térmicos.

El nopal fresco se sometió a distintos tiempos de cocción al vapor y posteriormente se realizaron los extractos, en la Fig. 27 se presenta la actividad antioxidante de cada muestra, los resultados resumidos en orden decreciente de eq. trolox ( $\mu\text{mol}$  trolox / g de alimento fresco, promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$ ) se presentan a continuación : 10 minutos al vapor  $1,383 \pm 45$ , Nopal crudo  $761 \pm 12$ , 10 minutos al vapor y enjuagado  $600 \pm 22$ , 15 minutos al vapor  $568 \pm 36$ , 20 minutos al vapor  $547 \pm 25$ , 25 minutos al vapor  $344 \pm 21$ . Se observa que el nopal sometido a 10 minutos al vapor presenta la mayor actividad antioxidante.



### ORAC Nopal con distintos tratamientos térmicos

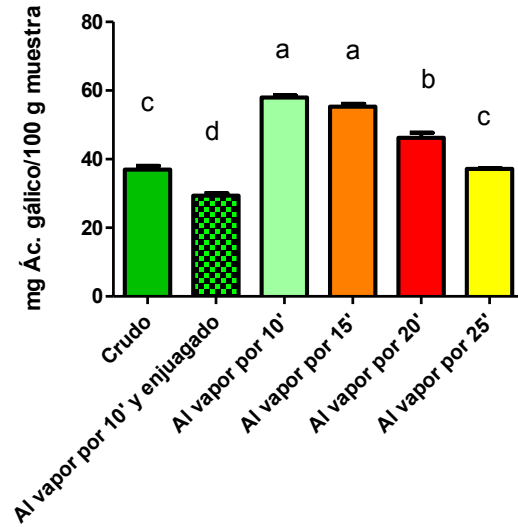


**Figura 27.** Actividad antioxidante de nopal sometido a diferentes tiempos de cocción al vapor. Los valores están expresados como equivalentes trolox ( $\mu\text{moles}$ ) / g de alimento fresco. Los datos se informan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$ . ANOVA,  $P<0.05$ .

#### 6.6. Comparación del contenido de polifenoles del nopal tras distintos tratamientos térmicos.

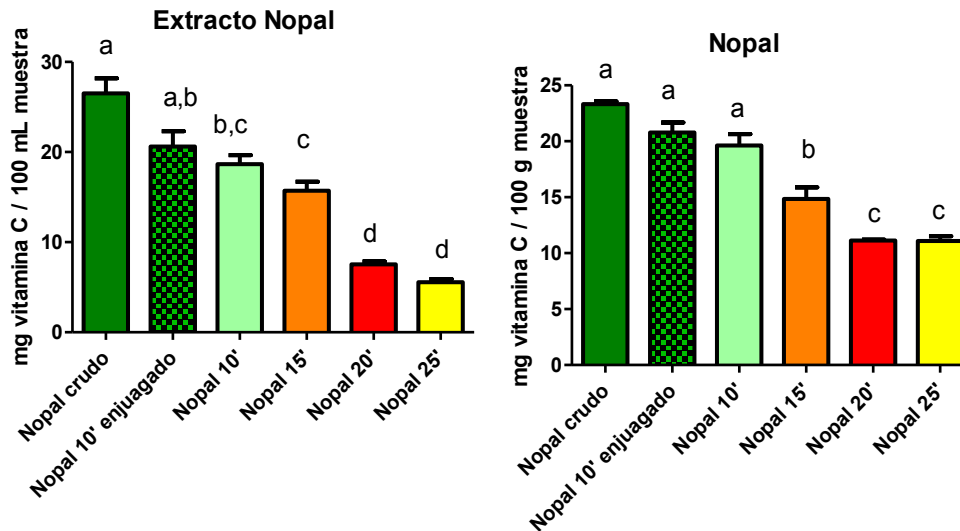
El contenido de polifenoles totales en nopal se resume a continuación en orden decreciente, los valores se expresan en mg de ácido gálico/ 100 g de muestra (promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$ ): 10 minutos al vapor  $57.97\pm 0.56$ , 15 minutos al vapor  $55.30\pm 0.78$ , 20 minutos al vapor  $46.25\pm 1.47$ , 25 minutos al vapor  $37.16\pm 0.23$ , crudo  $36.98\pm 1.02$ , 10 minutos al vapor y enjuagado  $29.35\pm 0.67$ . Se observa que hay una mayor cantidad de polifenoles totales en el nopal tratado por 10 minutos al vapor.

Contenido de polifenoles totales en nopal



**Figura 28.** Contenido de polifenoles totales en nopales sometidos a distintos tiempos de cocción al vapor en mg de ácido gálico / 100 g muestra, los valores se expresan como promedio±EEM, n=3. ANOVA, P<0.05.

### 6.7. Comparación de contenido de vitamina C en nopal tras distintos tratamientos térmicos.



**Figura 29.** Contenido de ácido ascórbico en nopales sometidos a distintos tiempos de cocción al vapor en mg de ácido ascórbico/100 g ó mL de muestra, los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$ . ANOVA,  $P<0.05$ .

Se realizó la medición de vitamina C tanto para el nopal con los distintos tratamientos como para los extractos realizados a partir de ellos. Se observó una tendencia a que el contenido de ácido ascórbico en el nopal disminuye a mayor tiempo sometido al tratamiento térmico. Los estándares a los que se les cuantificó el contenido de vitamina C dieron los siguientes resultados: guayaba  $270.06 \pm 3.40$  mg de ácido ascórbico / 100 g de muestra y jugo de naranja  $65.54 \pm 0.32$  mg de ácido ascórbico/ 100 mL de muestra.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Actualmente el interés sobre el efecto que tienen diversos compuestos bioactivos encontrados en alimentos ha ido en aumento. Dentro de los compuestos que presentan efectos benéficos sobre el organismo se encuentran la fibra, los polifenoles, la vitamina C y los  $\beta$ -carotenos (Arts y Hollman, 2005, Moo-Huchin et al., 2015).

Dichos compuestos se encuentran presentes en alimentos de origen mexicano como el nopal, el chocolate y la vainilla (Allgrove y Davison, 2014, López-Romero et al., 2014, Shyamala et al., 2007); sin embargo, no existe mucha información sobre ellos. Debido a esto, el presente estudio generó evidencia científica para fomentar el consumo de alimentos mexicanos en la población y con ello poder contribuir posiblemente a disminuir la prevalencia de diversas enfermedades y/o complicaciones en las mismas, como la diabetes y la obesidad (Krzystek-Korpicka et al., 2008, Rochette et al., 2014).

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* del chocolate, la vainilla y el nopal mediante dos métodos: DPPH y ORAC. De los resultados obtenidos se observó que el método ORAC es más sensible ya que se requiere una concentración menor de los extractos para determinar su actividad antioxidante comparado con el método DPPH (Fig. 23). Además el método ORAC permite obtener resultados expresados en  $\mu$ moles trolox / g muestra, permitiendo llevar a cabo una comparación cuantitativa de todos los alimentos analizados (Fig.22).

Se comparó la actividad antioxidante *in vitro* de los alimentos mexicanos con alimentos que se han asociado con una alta actividad antioxidante, dentro de los cuales se encuentran dos de las bebidas más populares del mundo: el café y el té. El café soluble y en grano, así como el té verde y negro, se usaron como referencia debido a que presentan una elevada actividad antioxidante, ya que en su composición química presentan flavonoides y ácidos fenólicos los cuales han presentado capacidad de atrapar diversas especies reactivas (Ávila-Nava, 2012).

En la Figura 22 se puede observar cómo la vaina de vainilla, al igual que la corteza de vainilla, poseen alta actividad antioxidante, semejante al té negro y al grano de cacao, así como superior a la ciruela y al café de grano. Los chocolates chiapanecos presentaron una mayor actividad antioxidante a su vez comparados con los chocolates provenientes de Suiza y Alemania, y una actividad antioxidante muy parecida a la que posee el nopal, el cual a su vez exhibió un contenido de equivalentes trolox / g muestra semejante a la fresa. Tanto el nopal, la vainilla y los chocolates tienen una mayor actividad antioxidante que la zarzamora, la manzana y el mango.

La diferencia entre chocolates mexicanos y europeos puede deberse a varios factores, incluyendo la región de origen del cacao, así como los tratamientos a los que se somete este para obtener los productos comerciales. De acuerdo con Chávez- Rivera y Ordóñez Gómez (2013) el contenido de polifenoles totales del cacao decrece conforme se llevan a cabo tratamientos como lo son el tostado del grano, molido del grano, hasta la obtención de licor de cacao y posteriormente polvo de cacao, procesos que se llevan a cabo en la elaboración de chocolate.

Es importante señalar que los tres chocolates mexicanos evaluados se producen artesanalmente por lo que probablemente el tiempo y temperatura a los que se someten en el proceso de su elaboración (Di Mattia et al., 2014) sean distintos; influyendo así en la conservación tanto de polifenoles como de compuestos que les confieren ésta actividad antioxidante.

El análisis de la vainilla se realizó en la vaina completa, en la corteza y en las semillas. De esta manera se pudo discriminar cuál de sus componentes es el que presenta mayor actividad antioxidante. Los resultados revelan que la corteza posee mayor actividad antioxidante que las semillas (localizadas en su interior). Lo anterior podría asociarse directamente con la concentración de polifenoles (Fig. 25) presentes en cada parte. De acuerdo con Shyamala et al. (2007) de los compuestos polifenólicos presentes en la vainilla el alcohol 4-hidroxi-3-metoxi bencílico presentó la mayor actividad antioxidante a comparación de la vainillina, el ácido vainillico y el alcohol 4-hidroxi bencílico.

Una vez que se determinó la actividad antioxidante de los diferentes alimentos mexicanos se realizaron estudios, a la vainilla y al chocolate, de actividad atrapadora de diferentes ER como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{ONOO}^-$ . Estas especies son algunas de las principales ER asociadas con el estrés oxidativo y se producen en forma constitutiva (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006, Halliwell y Gutteridge, 2007).

En este análisis todos los chocolates evaluados resultaron buenos atrapadores del  $\cdot\text{OH}$  ya que no presentaron diferencias significativas con respecto al DMTU, el cual se usó como compuesto de referencia por su bajo  $\text{IC}_{50}$ . La actividad antioxidante específica contra esta especie es de gran importancia; debido a que el  $\cdot\text{OH}$  es la ER que produce mayor daño oxidativo debido a su alta reactividad y vida media corta (Halliwell y Gutteridge, 2007). Respecto a la actividad atrapadora del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , se observó que los chocolates chiapanecos presentaron valores de  $\text{IC}_{50}$  similares al del tiron (compuesto de referencia); sin embargo los chocolates suizo y alemán requirieron una mayor concentración para atrapar al 50% del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  formado. Es importante recordar que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  además de ser oxidante puede participar en la formación de  $\cdot\text{OH}$  (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). En cuanto al atrapamiento de  $\text{ONOO}^-$  tanto los chocolates de Chiapas como los de Suiza y Alemania presentaron atrapamiento similar al ácido ascórbico y penicilamina (compuestos de referencia), sin embargo el chocolate de Oaxaca presentó menos actividad atrapadora para esta especie. El  $\text{ONOO}^-$  es un potente oxidante que induce entre otras cosas nitración de tirosina y lipoperoxidación (Cárdenas-Rodríguez et al., 2006). Finalmente todos los chocolates evaluados atraparon a la especie  $\text{HOCl}$ , aunque con  $\text{IC}_{50}$  muy altos a comparación con las demás ERO evaluadas. Hasta el momento no se han descrito estudios de actividad atrapadora para estas ER en el chocolate; sin embargo, los estudios de actividad antioxidante le atribuyen esta actividad a compuestos polifenólicos como la catequina y la epicatequina, así como a las procianidinas y las antocianinas presentes en el chocolate (Wollgast y Anklam, 2000).

En cuanto al fruto de vainilla, los resultados revelaron que la corteza exhibió un mayor atrapamiento del  $H_2O_2$ . Sin embargo las semillas presentaron un mayor atrapamiento de  $\cdot OH$ , así como de HOCl, el HOCl comúnmente participa en la producción de oxígeno singulete, otra especie oxidante (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006). Estos resultados indican que la vaina, la cual posee tanto corteza como semillas, es un mejor antioxidante, ya que presenta una actividad alta similar a la corteza, aunado a que es un buen atrapador de  $H_2O_2$  de acuerdo con Murcia, Egea et al. (2004), pues no presenta diferencia significativa con el piruvato (compuesto de referencia), lo que es importante debido a que el  $H_2O_2$  por su lipofilicidad atraviesa membranas celulares y puede contribuir a la formación de  $\cdot OH$  (Hansberg, 2002). Inclusive, la vaina de vainilla es un buen atrapador de  $\cdot OH$  y muestra actividad atrapadora de HOCl similar a la que tiene el ácido lipoico (compuesto de referencia).

A excepción del  $H_2O_2$ , los chocolates, por sus componentes, fueron mejores atrapadores específicos para las ER con las que se llevaron a cabo las determinaciones.

Además de determinar la actividad antioxidante *in vitro*, se debe generar evidencia de que esta actividad antioxidante pueda llegar al sitio de acción y actuar *in vivo* y como consecuencia atenuar o prevenir el estrés oxidativo que da lugar a la oxidación de biomoléculas presentes en el organismo.

Se seleccionó a la vainilla, que fue el alimento mexicano que presentó mayor actividad antioxidante *in vitro*, para la determinación de la actividad *in vivo*.

En la determinación *in vivo* se observó que el consumo de 1.5g de vainilla (dividida en 3 cápsulas de 500 mg) presentó un aumento de la actividad antioxidante en el plasma de sujetos sanos. Este aumento puede deberse al tipo de polifenoles presentes en la vainilla, los cuales tras su digestión pueden ser irrigados a la circulación (Mizuma et al., 1994). Se ha demostrado que los polifenoles unidos a glúcidos pueden jugar un papel en la absorción de los mismos (Hollman y Katan, 1997). El metabolismo de este tipo de compuestos es a través de una hidrólisis de los glucósidos a lo largo del tracto digestivo, como el intestino

delgado o las células epiteliales intestinales, y posteriormente los polifenoles son absorbidos como sus agliconas (Walle, 2004). Después de la digestión de estos compuestos pueden ser irrigados a la circulación, siendo así como presentan aumento en la actividad antioxidante en el plasma (Ávila-Nava, 2012). El aumento de la actividad antioxidante en el plasma sugiere que podría producir un efecto benéfico en condiciones patológicas, como el desequilibrio producido por condiciones como disminución del sistema antioxidante endógeno o activación de vías pro-inflamatorias (Ávila-Nava, 2012).

El nopal tiene un gran contenido de agua por lo que aporta pocas calorías, contiene compuestos polifenólicos, vitamina C y  $\beta$ -carotenos que le confieren actividad antioxidante. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado la actividad antioxidante que confiere el consumo del nopal (Ávila-Nava et al., 2014, López-Romero et al., 2014).

El consumo del nopal ocurre principalmente en México, sin embargo no es un alimento vegetal que usualmente se ingiera crudo como es el caso de la lechuga, las espinacas o la zanahoria. Usualmente para su aceptación sensorial el nopal se somete a tratamientos térmicos, ya sea asado, hervido o al vapor. Debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el asado y el hervido, lo que más se recomienda es la cocción al vapor para conservar en la medida de lo posible los componentes como los polifenoles y vitaminas, los cuales se ha descrito que son sensibles a tratamientos térmicos (Spínola et al., 2013).

Debido a ello, es de gran importancia determinar cómo se modifica la cantidad de estos compuestos y la actividad antioxidante del nopal después de diferentes tiempos de cocción, en este trabajo se utilizó nopal crudo, nopal cocido al vapor por 10 minutos y enjuagado, nopal cocido al vapor por 10, 15, 20 y 25 minutos sin enjuagar. Se encontró que el nopal es una buena fuente de vitamina C (Fig.29). La vitamina C es un compuesto termolábil, por lo que su contenido disminuye al someterse a un mayor tiempo de cocción (Barros et al., 2011).



Un componente importante del nopal es la parte que éste exuda: el mucílago o típicamente llamado “baba del nopal”, es un hidrocoloide el cual es rico en fibra soluble (Abraján Villaseñor, 2008). Usualmente las personas que consumen nopal lo enjuagan lo suficiente para quitarle la mayor parte del mucílago presente, sin embargo lo que se observó es que el mucílago está compuesto considerablemente a su vez por polifenoles, por lo que se notó diferencia entre el nopal que tras el mismo tiempo de cocción (10 min) fue enjuagado previamente. Así mismo se observa en la Fig. 28 que el nopal que recibió tratamiento térmico presentó mayor contenido polifenólico que el nopal crudo, esto podría deberse a la conformación del nopal, ya que hay una mayor liberación de mucílago tras calentamiento leve a comparación del nopal crudo, por lo que a su vez podrían liberarse los polifenoles presentes tanto en el tejido como en el mucílago (Abraján Villaseñor, 2008). Esto se ve reflejado en la determinación de actividad antioxidante, ya que se observa que el nopal que fue cocido al vapor por 10 min sin enjuagarse es el que presenta mayor actividad atrapadora y el de menor actividad resulta el nopal cocido por 25 minutos; lo cual indica que a un mayor tiempo de cocción disminuye su actividad antioxidante, su contenido de vitamina C y su cantidad de polifenoles.

## 8. CONCLUSIONES.

- El método ORAC resultó ser más sensible para la determinación de actividad antioxidante a comparación del método DPPH.
- La vaina de vainilla posee alta actividad antioxidante *in vitro*, semejante al té negro.
- Los chocolates chiapanecos presentaron una mayor actividad antioxidante *in vitro* comparados con los chocolates provenientes de Suiza y Alemania.
- El nopal exhibió actividad antioxidante *in vitro* semejante a la fresa y mayor a la zarzamora.
- *In vitro*, el chocolate y la vainilla presentan actividad antioxidante directa contra las especies reactivas siguientes:

Chocolate:  $\cdot\text{OH} > \text{O}_2^{\cdot-} > \text{ONOO}^- > \text{HOCl}$ .

Vainilla:  $\text{H}_2\text{O}_2 > \cdot\text{OH} > \text{HOCl}$ .

- La vainilla presentó un efecto antioxidante directo al aumentar la capacidad antioxidante en plasma en seres humanos.
- Los tratamientos térmicos y la eliminación del mucílago del nopal reduce la concentración de ácido ascórbico, polifenoles y, por lo tanto, su actividad antioxidante.
- El consumo de nopal, chocolate y vainilla podría ayudar a mantener el balance entre la formación de especies reactivas y la capacidad antioxidante producida por ingerir alimentos ricos en antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abraján Villaseñor, M.A. (2008) Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis Doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Pp. 195.
- Allgrove, J. y Davison, G. (2014) Chapter 19 – Dark Chocolate/Cocoa Polyphenols and Oxidative Stress. Polyphenols in Human Health and Disease. Academic Press. Pp. 241–251.
- Arroyo Hernández, A. (2014) Estudios de preformulación y formulación de extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en polvo dispersable como tratamiento alternativo para la diabetes mellitus. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 95.
- Arts, I.C. y Hollman, P.C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 317S- 325S.
- Ávila-Nava, A. (2012) Determinación de la actividad antioxidante del nopal (*Opuntia ficus indica*): estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 86.
- Ávila-Nava, A., Calderón-Oliver, M., Medina-Campos, O.N., Zou, T., Gu, L., Torres, N., Pedraza-Chaverrí, J. (2014) Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* y enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Functional Foods* 10: 13-24.
- Barros, A.I., Nunes, F.M., Goncalves, B., Bennett, R.N., y Silva, A.P. (2011) Effect of cooking on total vitamin C content and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 128: 165-172.
- Boyacioglu, M.; Sekkin, S.; Kum, C.; Korkmaz, D.; Kiral, F.; Yalinkilinc, H.S.; Ak, M.O. y Akar, F. (2014) The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66: 407-413.

- Cárdenas-Rodríguez, N., Chirino, Y.I., y Pedraza-Chaverrí, J. (2006) El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno: aspectos básicos e importancia biológica. *Educación Química* 17: 443-451.
- Cárdenas-Rodríguez, N. y Pedraza-Chaverrí, J. (2006) Especies Reactivas de Oxígeno y Sistemas Antioxidantes: Aspectos Básicos. *Educación Química* 17: 164-173.
- Carocho, M. y Ferreira, I.C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 51: 15-25.
- Cerruti, P. y Alzamora, S.M. (1996) Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *International Journal of Food Microbiology* 29: 379-386.
- Crow, J.P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine are Sensitive indicators of Peroxynitrite *in vitro*: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1: 145-157.
- Chávez-Rivera, R.E. y Ordóñez-Gómez, E.S. (2013) Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. *ECIPerú: Revista del Encuentro Científico Internacional* 10(1): 42-50.
- Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Beheydt, B., Mastrocola, D., y Pittia, P. (2014) Effect of different conching processes on procyanidin content y antioxidant properties of chocolate. *Food Research International* 63: 367-372.
- Galatro, A., Rousseau, I., y Puntarulo, S. (2006) Análisis de la concentración en estado estacionario del radical ascorbilo en plántulas de soja determinado por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 75: 7-20.

- Gillespie, K.; Chae, J.; Ainsworth, E. (2007) Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* 2(4): 867-867.
- Gómez-Juaristi, M., González-Torres, L., Bravo, L., Vaquero, M.P., Bastida, S., y Sánchez-Muniz, F.J. (2011) Beneficial effects of chocolate on cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria* 26: 289-292.
- Govindarajan, R.; Rastogi, S.; Vijayakumar, M.; Shirwaikar, A.; Rawat, A.; Mehrotra, S.; Pushpangadan, P. (2003) Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26(10): 1424-1427.
- Halliwel, B. (2007) Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochemical Society Transactions* 35: 1147-1150.
- Halliwel, B. y Gutteridge, J.M. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>o</sup> ed. Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-856869-8. Pp. 30-80.
- Hansberg, W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26: 19-54.
- Hollman, P. y Katan, M. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51: 305-310.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., y Prior, R.L. (2002) High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4437-4444.
- Jiménez Carrillo, R.M. (1998) Efecto agudo de *Opuntia streptacantha* Lemaire en la curva de tolerancia a la glucosa en diabéticos tipo I. Tesis de especialidad en medicina interna. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 3-10.
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverrí, J., Bye, R., Linares, E., y Mata, R. (2015) Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of ethnopharmacology* 161: 36-45.

- Julkunen-Tiitto, R. (1985) Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 213-217.
- Khlebnikov, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., y Quinn, M.T. (2007) Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic and cellular systems. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15: 1749-1770.
- Koren, E., Kohen, R., y Ginsburg, I. (2010) Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Experimental biology and medicine* 235: 689-699.
- Krzystek-Korpaczka, M., Patryn, E., Boehm, D., Berdowska, I., Zielinski, B., and Noczynska, A. (2008) Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clinical biochemistry* 41: 943-949.
- Lettieri-Barbato, D., Villaño, D., Beheydt, B., Guadagni, F., Trogh, I., y Serafini, M. (2012) Effect of ingestion of dark chocolates with similar lipid composition y different cocoa content on antioxidant and lipid status in healthy humans. *Food Chemistry* 132: 1305-1310.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chyra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118-126.
- López-Munguía, Agustín. (2011) El chocolate: un arsenal de sustancias químicas. *Revista Digital Universitaria* 12(4): 3xx-10xx.
- López-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Ávila-Nava, A., Vázquez-Manjarrez, N., Tovar, A.R., Pedraza-Chaverrí, J., y Torres, N. (2014) The Effect of Nopal (*Opuntia Ficus Indica*) on Postprandial Blood Glucose, Incretins, and Antioxidant Activity in Mexican Patients with Type 2 Diabetes after Consumption of Two Different Composition Breakfasts. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114: 1811–1818.

- Maldonado, P., Rivero-Cruz, I., Mata, R., y Pedraza-Chaverrí, J. (2005) Antioxidant activity of A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *Journal of Agricultural y Food Chemistry* 53: 1996-2001.
- Martínez, J. (2007) Evaluación de la actividad antioxidante de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca. Pp. 4-20.
- Maruenda, H., Vico Mdel, L., Householder, J.E., Janovec, J.P., Canari, C., Naka, A., y Gonzalez, A.E. (2013) Exploration of Vanilla pompona from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry* 138: 161-167.
- Matsuzawa, A. y Ichijo, H. (2008) Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1780: 1325-1336.
- Maurya, D.K. y Devasagayam, T.P. (2010) Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic y caffeic acids. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 48: 3369-3373.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P.D., Mendoza-Patino, N., y Pedraza-Chaverrí, J. (2007) S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2030-2039.
- Miller, J.K. y Brzezinska-Slebozinska, E. (1993) Oxidative Stress, Antioxidants and Animal Function. *Journal of Dairy Science* 76: 2812-2823.
- Mizuma, T., Ohta, K., y Awazu, S. (1994) The beta-anomeric and glucose preferences of glucose transport carrier for intestinal active absorption of monosaccharide conjugates. *Biochimica et biophysica acta* 1200: 117-122.
- Moo-Huchin, V.M., Moo-Huchin, M.I., Estrada-Leon, R.J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I.A., Ortiz-Vazquez, E., Betancur-Ancona, D. y 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.
- Mugüerza- Medina, P. (2013) Estudio de emulgentes comerciales en la formulación de chocolate amargo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 5-52.
- Murcia, M.A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jiménez, A.M., y Martínez-Tomé, M. (2004) Antioxidant Evaluation in Dessert Spices Compared with Common Food Additives. Influence of Irradiation Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1872-1881.
- Ohta, T., Watanabe, M., Shirasu, Y., y Inoue, T. (1988) Post-replication repair and recombination in uvrA umuC strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound. *Mutation Research* 201: 107-112.
- Qu, X., Kirschenbaum, L.J., y Borish, E.T. (2000) Hydroxyterephthalate as a Fluorescent Probe for Hydroxyl Radicals: Application to Hair Melanin *Photochemistry y Photobiology* 71: 307-313.
- Quintero-López, K.A. (2014) Estudio de la beta-glucosidasa en condiciones de curado de vainilla. Tesis de Licenciatura. Departamento de *Química Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 55.
- Rajendran, P., Nyakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasiah y U., Nishigaki, I. (2014) Antioxidants and human diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 436C: 332-347.
- Rao, S.R. y Ravishankar, G.A. (2000) Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 289-304.
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., y Vergely, C. (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1840: 2709-2729.
- Rojas- López, A. (2010) Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de vainilla. Tesis de Licenciatura. Departamento de *Química Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 87.

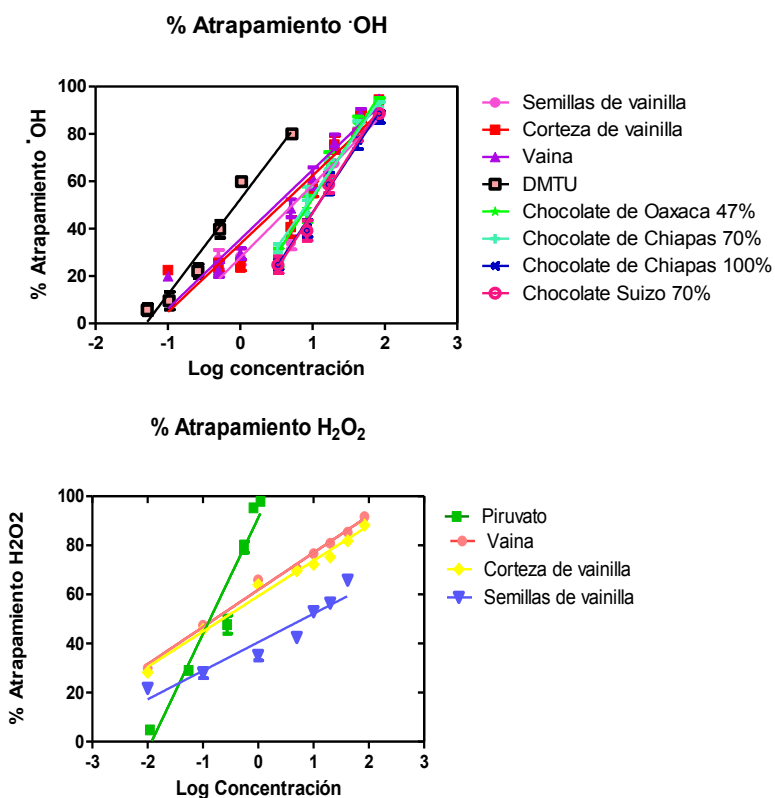


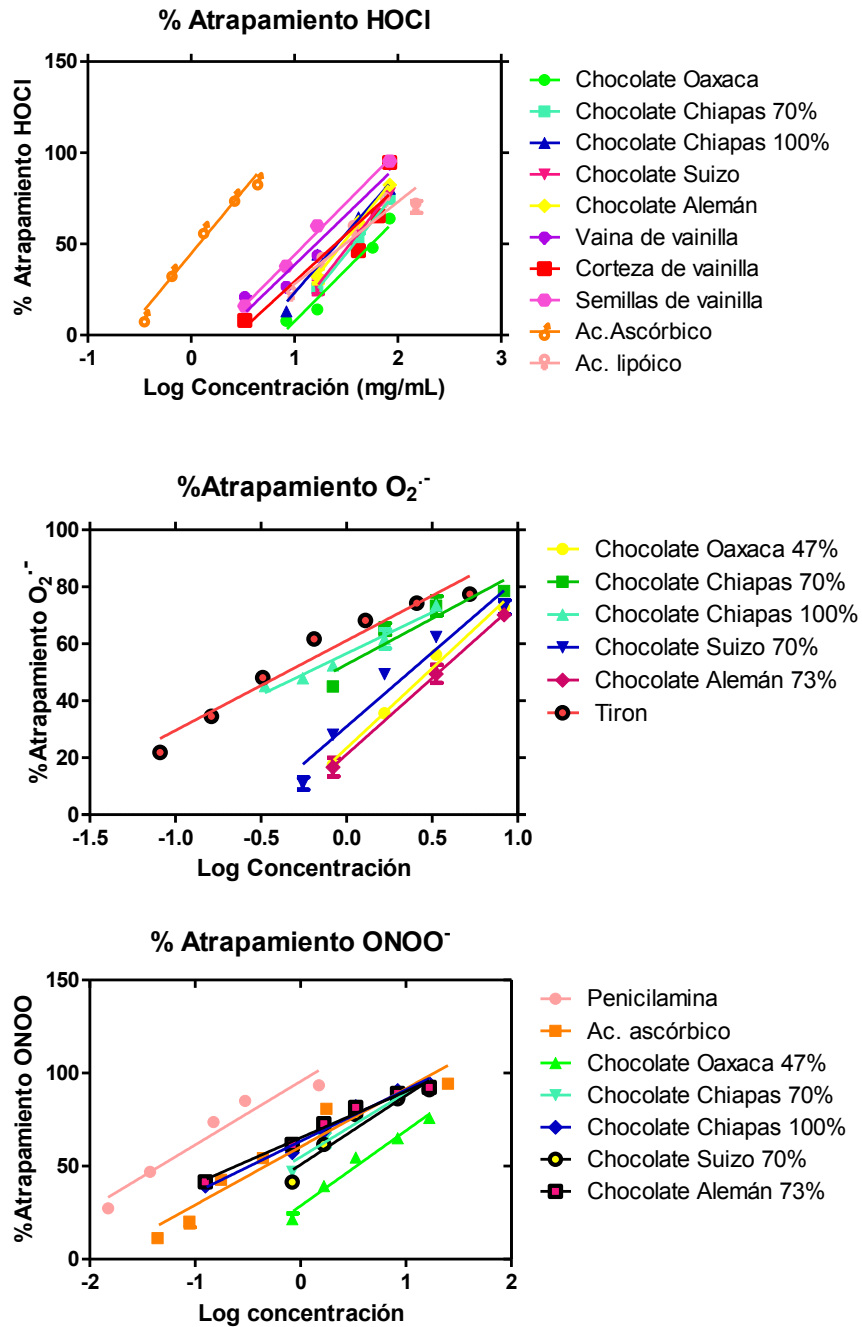
- Sharma, O.P. y Bhat, T.K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
- Shivashankara, A.R., Azmidah, A., Haniadka, R., Rai, M.P., Arora, R., y Baliga, M.S. (2012) Dietary agents in the prevention of alcohol-induced hepatotoxicity: preclinical observations. *Food&Function* 3: 101-109.
- Shyamala, B.N., Naidu, M.M., Sulochanamma, G., y Srinivas, P. (2007) Studies on the Antioxidant Activities of Natural Vanilla Extract and Its Constituent Compounds through in vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7738-7743.
- Sinha, A.K., Verma, S.C., y Sharma, U.K. (2007) Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science* 30: 15-20.
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J.S., y Castilho, P.C. (2013) Effect of time y temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT - Food Science and Technology* 50: 489-495.
- USDA, N.N.D.f.S.R. Basic Report : 19902, Chocolate, dark, 45-59% cacao solids. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6403?fg=&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=chocolate>.
- Van Antwerpen, P. y Ne`ve, J. (2004) In vitro comparative assessment of the scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam and sulfoanilide families. *European Journal of Pharmacology* 496: 55-61
- Vaya, J. y Aviram, M. (2001) Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry* 1: 99-117.
- Wallace, K.B. (1997) Free Radical Toxicology: Target Organ Toxicology Series. Taylor & Francis.Pp. 3-25.
- Walle, T. (2004) Absorption and Metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 829-837.

Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., y Yao, W.B. (2008) In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit. *Food Chemistry* 106: 888-895.

Wollgast, J. y Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423-447.

## ANEXO





**Figura 30** . Actividad atrapadora de la vainilla y los diferentes chocolates hacia diferentes especies reactivas. % de atrapamiento para (A)  $H_2O_2$  (B)  $\cdot OH$  (C)  $HOCl$  (D)  $O_2^{\cdot-}$  y (E)  $ONOO^{\cdot-}$ . Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=3.