

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

“Evaluación del Potencial Nutracéutico de Zarcamoras Silvestres y Mejoradas”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

Edith Oliva Cuevas Rodríguez

Director de Tesis:

Dr Octavio Paredes López

Santiago de Querétaro, Querétaro, Septiembre de 2011.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

“Evaluación del Potencial Nutracéutico de Zarzamoras Silvestres y Mejoradas”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

Edith Oliva Cuevas Rodríguez

Dirigido por:

Dr Octavio Paredes López

SINODALES

Dr Octavio Paredes López

Presidente

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña

Secretario

Dr. Pedro Antonio García Saucedo

Vocal

Dra. María Elena Valverde González

Suplente

Dr. Carlos Regalado González

Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio de 2011
México

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato y la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la asesoría y dirección del Dr. Octavio Paredes López y la colaboración del Dr José López Medina y el Dr Pedro Antonio García Saucedo de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Uruapan, Michoacán y la Dra. Mary Ann Lila del Department of Natural Resource and Environmental Science de la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, Illinois, USA y la Dra. Elvira de Mejía del Department of Food Science and Human Nutrition de la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, Illinois, USA.

RESUMEN

Las zarzamoras (*Rubus* spp) son frutos ricos en compuestos nutraceuticos (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y otros), reconocidos por su beneficio a la salud. El objetivo de esta investigación consistió en determinar el potencial alimentario y nutraceutico de una colección de zarzamoras silvestres y mejoradas de las regiones boscosas de Michoacán y compararlo con materiales comerciales. Como materiales de estudios se utilizaron seis genotipos de zarzamoras: cuatro silvestres (ZS-3, ZS-7, ZS-10 y ZS-11), una comercial “Tupy” y una línea mejorada (UM-601). A través de columnas empacadas con resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 se obtuvieron extractos y fracciones ricos en polifenoles. Análisis con HPLC y LC-ESI-MS revelaron que la principal antocianina en zarzamora mexicana fue cianidina-3-*O*-glucósido. También se identificaron proantocianidinas en forma de monómeros a hexámeros y elagitaninos. La concentración media de antocianinas para el genotipo comercial fue de 49.2 mg/g de fruto liofilizado (equivalentes de Cy-3-*O*-glu), las fracciones de genotipos silvestres y la línea mejorada tuvieron un intervalo de 361.3–494.9 mg/g de fruto liofilizado (equivalentes de Cy-3-*O*-glu). La concentración de proantocianidinas varió en los genotipos silvestres (417.5–1343.6 mg/g de fruto liofilizado, equivalentes de catequina). Asimismo, a los extractos obtenidos se les evaluó fenoles totales, capacidad antioxidante, potencial antimutagénico e inhibición de marcadores proinflamatorios (ON, iNOS, PGE-2 y COX-2) en macrófagos RAW 264.7. Las fracciones de proantocianidinas a una concentración de 100 µg/mL inhibieron fuertemente la mutagenicidad inducida por 1-nitropireno. Con 50 µM (equivalentes de Cy-3-glu o catequina) algunas fracciones inhibieron ($p < 0.05$) todos los marcadores. La fracción rica en antocianinas ZS-10 y la fracción rica en proantocianidinas UM-601 fueron los inhibidores más potentes de ON (IC_{50} =16.1 y 15.1 µM, respectivamente). Las fracciones ricas en proantocianidinas ZS-7 y mejorada mostraron la mayor inhibición en la expresión de iNOS (IC_{50} =8.3 µM). Las fracciones ricas en polifenoles ZS-7 y UM-601 fueron los inhibidores más potentes en expresión de COX-2 (IC_{50} =19.1 y 19.3 µM equivalentes de Cy-3-glu, respectivamente). Este estudio permitió demostrar que la utilización de resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex-LH-20 permite separar y caracterizar los polifenoles de zarzamora; además, se podrían sugerir a los genotipos de zarzamora silvestre Mexicana, como fuente rica en nutraceuticos, para ser utilizados en programas de fitomejoramiento para el desarrollo de nuevas variedades.

Palabras clave: zarzamora, antocianinas, proantocianidinas, antimutagénico, marcadores proinflamatorios.

ABSTRACT

Blackberries (*Rubus* spp) are fruits rich in nutraceutical compounds (flavonoids, tannins, etc.) and are recognized for their health benefits. The objective of this research was to determine the nutritional and nutraceutical potential of a collection of wild and improved blackberries from the forest regions of Michoacán and compared it with commercial materials. Six genotypes of blackberries were studied: wild (ZS-3, ZS-7, ZS-10 and ZS-11), commercial “Tupy” and an improved line (UM-601). Using columns packed with Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 resins, extracts and fractions rich in polyphenols were obtained. Analyses with HPLC and LC-ESI-MS showed that the principal anthocyanin in Mexican blackberries is cyaniding-3-*O*-glucoside. Proanthocyanidins were identified in the form of monomers to hexamers and ellagitannins. The average concentration of anthocyanins for commercial cultivar was 49.2 mg/g of lyophilized fruit; the wild and improved genotype fractions had a range of 361.3-494.9 mg/g of lyophilized fruit (equivalents of Cy-3-*O*-glu). The concentration of proanthocyanidins varied in the wild genotypes (417.5-1343.6 mg/g catechin equivalents). The extracts obtained were evaluated for total phenols, antioxidant capacity, antimutagenic potential and inhibition of proinflammatory markers (ON, iNOS, PGE-2 and COX-2) in RAW 264.7 macrophages. Fractions of proanthocyanidins at a concentration of 100 µg/mL strongly inhibited the mutagenicity induced by 1-nitropyrene. With 50 µM (equivalents of Cy-3-glu or catechin), some fractions inhibited ($p < 0.05$) all markers. The fraction rich in anthocyanins ZS-10 and the fraction rich in proanthocyanidins UM-601 were the most potent inhibitors of ON (IC_{50} =16.1 and 15.1 µM respectively). The fractions rich in proanthocyanidins ZS-7 and improved cultivar showed the highest inhibition in the iNOS expression (IC_{50} =8.3 µM). The fractions rich in polyphenols ZS-7 and UM-601 were the most potent inhibitors in the expression of COX-2 (IC_{50} =19.1 and 19.3 µM equivalents of Cy-3-glu, respectively). This study shows that the use of Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 resins can make possible the separation and characterization of blackberry polyphenols. It can also be suggested that the genotypes of wild Mexican blackberries, as a rich source of nutraceuticals, can be used in phytoimprovement programs for the development of new varieties.

Keywords: Blackberry, anthocyanins, proanthocyanidins, proinflammatory markers.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado para parte de las personas más importantes en mi vida, mi abuela (Domitila Rodríguez) y mi madre (Graciela Rodríguez) dos personas que con su enseñanza, trabajo, esfuerzo y perseverancia han logrado que siempre busque ser cada día mejor.

Muchas gracias por todo su amor.

.....Edith.....

ÍNDICE GENERAL

	Pag
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
A SALUD EN MÉXICO	4
1 Principales causas de muerte en México	4
B ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS	8
1 Generalidades	8
2 Clasificación de compuestos nutraceuticos	10
a Clasificación por fuente alimenticia	10
b Clasificación por mecanismo de acción	12
c Clasificación por naturaleza química	12
3 Polifenoles	12
a Clasificación de compuestos fenolicos	15
1) Ácidos fenolicos	15
2) Flavonoides	15
a) Antocianinas	17
b) Flavonas y flavonoles	21
3) Estilbenos	21
4) Taninos	22
a) Taninos condensados o proantocianidinas	24
b) Taninos hidrolizables	26
5) Diferuloilmetanos	27

	b	Propiedades antioxidantes de polifenoles	28
	c	Bioactividad de polifenoles	30
	d	Biodisponibilidad de polifenoles	36
C		FRUTILLAS	38
	1	Generalidades	38
	2	Producción mundial y nacional de frutillas	41
	3	Compuestos nutraceuticos de frutillas	44
	a	Propiedades antioxidantea de frutillas	50
	b	Efecto biológico de compuestos nutraceuticos de frutillas	54
		1) Efecto analgésico y antiinflamatorio	54
		2) Efecto antidiabético	58
		3) Efecto antibacteriano, antiparasitario antiviral	60
		4) Efecto antimutagénico de frutillas	60
		5) Efecto anticarcinogénico	61
		6) Otros efectos biactivos	63
III		JUSTIFICACIÓN	64
IV		OBJETIVOS	65
	A	OBJETIVO GENERAL	65
	B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
V		MATERIALES Y MÉTODOS	66
	A	MATERIALES	66
		1 Colecta de frutos de zarzamora	66
		2 Materiales químicos y biológicos	66
	B	MÉTODOS	67
		1 Composición proximal de los frutos de zarzamora	67
		2 Preparación de extractos de los frutos de zarzamora	67
		a Extracto crudo (EC)	67
		b Extracto concentrado de polifenoles (EP)	67

	c	Extracto de antocianinas (ERA) y proantocianidinas (ERP)	69
3		Caracterización y cuantificación de compuestos polifenólicos de zarzamora	70
	a	Análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de antocianinas y proantocianidinas	70
	b	Análisis de espectrometría de masas (LC-ESI-MS) de antocianinas y proantocianidinas	71
4		Contenido de polifenoles totales	71
5		Capacidad antioxidante por el método ORAC	72
6		Bioactividad de extractos de zarzamora	72
	a	Evaluación de actividad antimutagénica	72
		1) Microorganismo utilizado	72
		2) Construcción de la curva dosis-respuesta del 1-nitropireno	73
		3) Ensayo de microsuspensión (prueba de Ames modificada)	73
	i	Propagación de la bacteria	73
	ii	Preparación de la mezcla de cofactores	73
	iii	Preincubación	73
	iv	Preparación de agar de superficie y vaciado de placas	74
	v	Determinación de toxicidad o mutagenicidad	74
	vi	Evaluación de actividad antimutagénica	74
	b	Actividad antiinflamatoria de extractos de zarzamora	75
		1) Cultivo celular	75

	2)	Ensayo de viabilidad celular	75
	3)	Tratamiento	77
	4)	Medición de óxido nítrico (ON)	77
	5)	Medición de prostaglandinas (PGE ₂)	77
	6)	Medición de la expresión de la proteína ciclooxigenasa y óxido nítrico sintasa inducible (COX-2 y iNOS)	78
	7	Diseño y análisis estadístico	78
VI		RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
	A	COMPOSICIÓN PROXIMAL DE ZARZAMORAS	80
	B	CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN ZARZAMORA	82
	1	Separación de compuestos polifenólicos en zarzamoras	82
	2	Análisis de antocianinas en zarzamoras	82
	3	Análisis de proantocianidinas en zarzamoras	89
	4	Contenido de polifenoles totales en zarzamora	94
	5	Capacidad antioxidante en zarzamora	96
C		BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE ZARZAMORA	99
	1	Efecto de extractos de zarzamora sobre la actividad antimutagénica	99
	2	Efecto antiinflamatorio de extractos de zarzamora cultivada en México	103
	a	Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7	103
	b	Efecto de extractos polifenólicos de zarzamora sobre la producción de ON y expresión de iNOS	103
	1)	Correlación de capacidad antioxidante y % inhibición de óxido nítrico	110
	c	Efecto de extractos polifenólicos de zarzamora sobre la producción de PGE ₂ y expresión de COX-2	110

VII	CONCLUSIONES	118
VIII	PERSPECTIVAS	121
IX	BIBLIOGRAFÍA	122
X	APÉNDICE	156

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página.
1.	Principales causas de muerte en México	5
2.	Compuestos nutracéuticos agrupados por fuente alimenticia	11
3.	Compuestos nutracéuticos agrupados por mecanismo de acción	13
4.	Alimentos que contienen taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables	23
5.	Producción mundial de frutillas	42
6.	Producción nacional de frutillas	43
7.	Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos totales de algunas especies de frutillas cultivados en diferentes regiones del mundo	45
8.	Perfil de antocianinas de diferentes especies de frutillas	46
9.	Contenido de minerales presentes en algunas especies de frutillas	49
10.	Contenido de vitamina C en frutillas	51
11.	Capacidad antioxidante (ORAC) de diferentes especies de frutillas	53
12.	Escala antimutagénica de revertantes para evaluar el grado de antimutagenicidad de un extracto	76
13.	Análisis proximal de frutos de zarzamora silvestre, comercial y mejorada colectados en México	81
14.	Concentración de antocianinas en diferentes extractos y fracciones de zarzamora colectadas en México	84
15.	Porcentaje individual de antocianinas presentes en extractos crudos de zarzamora	87
16.	Concentración de proantocianidinas en diferentes extractos y fracciones obtenidas de zarzamoras colectadas en México	91
17.	Contenido de polifenoles totales de extractos de zarzamoras, silvestres, comercial y mejorada colectadas en México	95

18.	Capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de zarzamoras silvestres, comercial y mejoradas colectada en México	97
19.	Toxicidad/mutagenicidad de extractos de polifenoles de zarzamoras silvestres, comercial y mejorada cultivada en México	100
20.	Concentración inhibitoria de respuestas proinflamatorias (IC ₅₀ μM) para extractos de zarzamoras silvestres, mejoradas y comercial cultivadas en México	108
21.	Análisis de coeficiente de correlación (R ²) de la capacidad antioxidante e inhibición de óxido nítrico (%) para diferentes extractos de zarzamora silvestre, comercial y mejorada cultivada en México	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Descripción	Página.
1.	Clasificación de compuestos nutraceuticos agrupados por naturaleza química	14
2.	Clasificación de los polifenoles	16
3.	Estructura básica de antocianinas	18
4.	Estructuras moleculares de antocianinas generadas bajo diferentes condiciones de pH	20
5.	Estructuras simples de procianidinas diméricas (tipos de enlaces en taninos condensados)	25
6.	Bioactividad de polifenoles	32
7.	Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos sobre lípidos	33
8.	Metabolismo del ácido araquidónico	56
9.	Diagrama de flujo del procedimiento para obtener los extractos concentrados en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas a partir de zarzamora liofilizada	68
10.	Cromatograma de HPLC de las principales antocianinas presentes en extractos de zarzamora cultivadas en México	86
11.	Espectro de LC-ESI-MS de antocianinas presentes en la fracción 5 de Sephadex LH-20 para la especie Silvestre ZS-11	88
12.	Espectro de LC-ESI-MS de proantocianidinas presentes en la fracción 11 de extractos ricos en proantocinidinas del genotipo de zarzamora silvestre ZS-11	90
13.	Actividad antimutagénica de extractos de zarzamora.	101
14.	% inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 por los extractos de zarzamora ricos en polifenoles	105
15.	% inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de	106

	iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 por los extractos de zarzamora ricos en antocianinas	
16.	% inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 por los extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas	107
17.	% de inhibición de la expresión de COX-2 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacaridos (LPS) por los extractos de zarzamora ricos en polifenoles (A) y ricos en antocianinas (B)	113
18.	% de inhibición de la expresión de COX-2 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacaridos (LPS) de extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas	114
19.	% de inhibición de producción de prostaglandinas (PGE2) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS de extractos de zarzamora	117

I. INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, México está considerado como un país muy diverso, y gracias a su ubicación geográfica presenta una amplia variedad de climas y microclimas, que hacen posible la existencia de sistemas vegetales exclusivos. De manera particular, la zona Purépecha del Estado de Michoacán cuenta con características climáticas y edáficas propicias para el desarrollo y producción de “*berries o frutillas*”. Las frutillas comprenden especies de más de seis géneros y constituyen la mayor parte de lo que se conoce comúnmente como frutales menores. Dentro de estos géneros se encuentran: *Aronia*, *Aristotelia*, *Fragaria*, *Rubus*, *Ribes* y *Vaccinium*, entre otros. Este grupo podría ampliar en forma por demás interesante el mapa frutícola de México, tanto para el mercado de exportación como para el interno. Por otro lado, demanda un uso intensivo de mano de obra pues se requieren 900 jornaleros por hectárea, y los agricultores que envían en fresco estos productos para el consumidor internacional obtienen buenas ganancias, ya que, pueden alcanzar hasta un 300% más que lo que se logra exportándolos de manera congelada. Las exportaciones de frutillas mexicanas se realizan de octubre a enero, lo que representa una ventaja competitiva para el país, pues en dicho periodo es en el que se alcanzan los precios más altos en el mercado mundial debido a la escasa oferta (SAGARPA, 2009).

Las frutillas se utilizan ampliamente en la dieta de países desarrollados. Se han identificado y reportado numerosos compuestos polifenólicos con actividad nutracéutica (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros) en este tipo de frutos y han atraído mucho la atención debido al beneficio que generan en la salud humana como antioxidantes, anticolesterolémicos, antimutagénicos y anticarcinogénicos. En frutillas silvestres y comerciales se ha identificado una gran variabilidad en el contenido de polifenoles, así como en la concentración. Numerosos procedimientos analíticos se han empleado para la extracción y purificación de este tipo de compuestos (Elisia y col., 2007). En especies de zarzamora se han identificado una gran variedad de polifenoles, pero las concentraciones de cada compuesto están fuertemente influenciadas por las condiciones analíticas utilizadas, la especie, la variedad y las condiciones medioambientales en las que se desarrollaron los frutos (Foo y Porter, 1981; Lei y col., 2001; Scalzo y col., 2005; Koca y Karadeniz, 2009; Schreckinger y

col., 2010). Comúnmente para la separación e identificación de polifenoles se utiliza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); sin embargo, las técnicas de HPLC sólo son adecuadas para fraccionar cantidades relativamente pequeñas de extractos de plantas y se puede perder la actividad biológica de los compuestos (Schmidt y col., 2004). Tecnologías de adsorción, utilizando resinas como fases sólidas, pueden concentrar, purificar y recuperar metabolitos secundarios de plantas (Zhang y col., 2008). Por ejemplo, las antocianinas pueden ser separadas de carbohidratos, sales y otros compuestos solubles utilizando resinas Amberlite XAD-7, este tipo de resinas tienen una alta afinidad por antocianinas y proantocianidinas. Las resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 se han utilizado para aislar antocianinas de frambuesa (Zhang y col., 2008).

Los compuestos polifenólicos derivados de frutas, vegetales, cereales, leguminosas, té, vino y otros productos pueden proteger a los humanos contra enfermedades parasitarias, cáncer, enfermedades degenerativas, cardiovasculares, diabetes, inflamaciones crónicas y agudas, entre otras (Puupponen-Pimia y col., 2004; Smith y col., 2004; Duthie, 2007; Burns y col., 2008). Estos compuestos son atrapadores de una gran variedad de especies reactivas (superóxido, radicales hidroxilo, peróxido, ácido hipocloroso y peroxinitritos) dando como resultado una exposición menor a este tipo de compuestos, lo que puede contribuir a la prevención de enfermedades crónicas en humanos (Rao, 2004). Una gran variedad de medicamentos no esteroideos son utilizados como antiinflamatorios para tratar enfermedades relacionadas; sin embargo, estos medicamentos tienen efectos secundarios (Seung-Bin y col., 2010). Así, los fitoquímicos se pueden utilizar como agentes naturales preventivos y aquellos encontrados en frutillas podrían ser una buena alternativa para este fin. Sin embargo, poco se conoce sobre la actividad antiinflamatoria de los diferentes genotipos de zarzamora (Pérgola y col., 2006).

En algunas regiones de México se han identificado frutillas silvestres del género *Rubus* (zarzamora y frambuesa) que no han sido estudiadas de manera exhaustiva (Reyes-Carmona y col., 2005). Diversos investigadores han mostrado que las plantas silvestres son una fuente ideal de fitoquímicos que tienen influencia sobre la salud humana, especialmente porque éstos contienen niveles naturales de compuestos que no han sido influenciados por selección o cultivos comerciales (Lila, 2006). Por todo lo anterior, el propósito de este estudio fue evaluar

el potencial nutracéutico de cultivares silvestres y mejorados de zarzamoras seleccionadas de la zona tarasca de México para compararlas con materiales comerciales y así determinar si se pueden utilizar en futuros programas de fitomejoramiento para el desarrollo de variedades mexicanas competitivas para los mercados nacionales y extranjeros.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A SALUD EN MÉXICO

1 Principales causas de muerte en México

Durante las últimas décadas México ha generado y recibido los beneficios de una mejoría notable en las condiciones de salud. El mejor reflejo de ello se observa en la esperanza de vida, entre 1950 y 2005 el país ganó 27 años en este indicador, hoy las mujeres mexicanas pueden vivir casi 78 años y los hombres casi 73 años (SSA, 2010).

El perfil demográfico es causa y consecuencia del perfil epidemiológico del país. La estructura por edad muestra una población que envejece paulatinamente, con el desplazamiento ascendente de la edad mediana, una menor participación de la población infantil, y un crecimiento de los grupos de edad media, en edad productiva, así como el incremento acelerado de la población mayor de 65 años. También se observa un tránsito persistente de la población rural hacia el medio urbano y la migración hacia el extranjero ha cambiado el perfil demográfico de comunidades, incluso de entidades federativas. En consecuencia, las causas principales de muerte también se han modificado. Las infecciones comunes y los padecimientos ligados a la desnutrición y a la reproducción, que ocupaban los primeros sitios entre las causas de muerte, fueron desplazados por las enfermedades no transmisibles (enfermedades cardio y cerebrovasculares, diabetes, cáncer, enfermedades mentales y adicciones) y las lesiones accidentales e intencionales (SSA, 2010).

En el año 2008 se observó que en el país las principales causas de muerte entre hombres y mujeres eran similares; enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y tumores malignos (**Cuadro 1**). Las enfermedades del corazón son las primeras causas de muerte en la población del país, el 16.2% de las defunciones masculinas y 18.4% de las femeninas se deben a padecimientos de este tipo. La diabetes mellitus representa la segunda causa de muerte en los hombres con 11.9%, mientras que para las mujeres es 16.7%. La tercera causa de muerte entre la población corresponde a tumores malignos, en hombres 10.9% y en las mujeres 14.3%. En conjunto, las tres principales causas de muerte agrupan 38.9% de las defunciones masculinas y 49.5% de las femeninas (INEGI, 2010).

Cuadro 1. Principales causas de muerte en México.

Sexo y causas	Total	Porcentaje
Hombres	300,837	55.8%
Enfermedades del corazón	48,690	16.18
Diabetes mellitus	35,697	11.86
Tumores malignos	32,842	10.91
Accidentes	30,039	9.98
Enfermedades del hígado	23,258	7.73
Enfermedades cerebrovasculares	14,388	4.78
Agresiones	12,574	4.17
Enfermedades pulmonares obstructivas	9,155	3.04
Las demás causas	97,579	31.35
Mujeres	238,523	44.2%
Enfermedades del corazón	43,984	18.44
Diabetes mellitus	39,939	16.74
Tumores malignos	34,204	14.33
Enfermedades cerebrovasculares	15,857	6.65
Accidentes	8,823	3.69
Enfermedades del hígado	8,263	3.46
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	7,385	3.09
Las demás causas	75,981	33.6
Total (hombres y mujeres)	539, 530	100.0%

INEGI , 2010

De acuerdo a datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010), se ha establecido que ciertos factores desempeñan un papel importante en las probabilidades de que una persona padezca una enfermedad del corazón, diabetes mellitus o cáncer, y se les denomina “factores de riesgo”. Algunos claramente identificados son: hipertensión arterial, colesterol elevado, obesidad, sobrepeso, tabaquismo, alcohol, estrés, inactividad física y malnutrición.

En nuestro país estas enfermedades han aumentado de forma alarmante, pero falta enfrentar lo peor ya que la población mexicana ha optado por cambiar la dieta tradicional basada en cereales y leguminosas, por comidas rápidas (hamburguesas, pizzas y bebidas gaseosas) con grasas saturada, azúcares refinados y baja en fibra, vitaminas, minerales; además, ha aumentado el sedentarismo (Ávila, 2008; SSA, 2010).

En México este tipo de enfermedades se ha atribuido específicamente al alto índice de personas con problemas de obesidad y sobrepeso. De acuerdo con expertos del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), la obesidad es una situación alarmante en la población mexicana, especialmente por la deficiencia en la nutrición y por la falta de actividad física observada en todas las edades; si no se modifican estos hábitos de consumo en cinco años, el 90% de la población sufrirá de obesidad y sobrepeso (IMMS, 2010). El Instituto Nacional de Salud Pública calcula que en este momento más de 70 millones de mexicanos presentan problemas de sobrepeso y obesidad, más de 4 millones de niños entre 5 y 11 años y más de 5 millones de adolescentes sufren también este trastorno (INCan, 2010). México cuenta con bastantes personas obesas, pero todavía falta observar el impacto a la salud producido por esta enfermedad; como diabetes, aterosclerosis, accidentes vasculares y tumores malignos de colon, riñón, hígado, entre otros (Ávila, 2008).

Las causas más importantes de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer son los llamados "factores de riesgo modificables": dieta malsana, inactividad física y consumo de tabaco y alcohol. Los efectos de la dieta malsana y de la inactividad física pueden manifestarse como "factores de riesgo intermedios" en el aumento de la presión arterial, azúcar y lípidos de la sangre, sobrepeso y obesidad. Los principales factores de riesgo modificables son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular. También hay una serie de determinantes subyacentes de las enfermedades

crónicas, es decir, "las causas de las causas", que son un reflejo de las principales fuerzas que rigen los cambios sociales, económicos y culturales: la globalización, la urbanización y el envejecimiento de la población. Otros determinantes de enfermedades cardiovasculares y diabetes son la pobreza y el estrés (OMS, 2010).

Recientemente se ha sugerido el papel del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I y II y cáncer; actualmente es objeto de investigaciones extensivas. El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos, también llamados especies reactivas de oxígeno y la eliminación de estos últimos (por mecanismos protectores), son llamados antioxidantes (Reuter y col., 2010). En diabetes mellitus en animales experimentales y humanos está asociada con reducción en antioxidantes como ácido ascórbico, -tocoferol y glutatión, sugiriendo que el estrés oxidativo tiene un papel crítico en la patología de esta enfermedad. Se cree que la diabetes mellitus dependiente de insulina resulta de la destrucción de las células- β pancreáticas productoras de insulina por múltiples factores incluyendo virus, toxinas químicas y respuestas autoinmunes (Serrano y col., 2009).

Diversas investigaciones han probado que las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) originan daño de a las células- β a través de la inducción de apoptosis y la inhibición de biosíntesis de insulina. Además, las células pancreáticas particularmente susceptibles a los efectos de deterioro de las ROS por la baja expresión de genes de enzimas antioxidantes (Matsuoka y col., 1997; Hotamisligil, 2006; Kaneto y col., 2007).

Las ROS como productos del metabolismo celular normal, juegan un papel muy importante en la estimulación de las vías de señalización que están involucradas en una diversa gama de enfermedades (Fang y col., 2009; Reuter y col., 2010). Se han identificado numerosos agentes químicos que interfieren con estas vías de señalización redox, estos agentes incluyen compuestos nutraceuticos derivados de cereales, leguminosas, especias, frutas y vegetales (Rodríguez-Tellez y col., 2001; Surh y col., 2005; Grace y col., 2009; Nandakumar y col., 2008; Virgili y Marino, 2008; Coté y col., 2010; Schreckinger y col., 2010).

B ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

1 Generalidades

En los últimos años se ha reconocido que las enfermedades crónico degenerativas como diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y cáncer están afectando a una gran parte de la población mundial, no sólo en países desarrollados sino también en los países en vías de desarrollo donde existe malnutrición y no se satisface la demanda de alimento; además, es de baja calidad nutricional (FAO/WHO, 2010).

El ser humano siempre ha buscado una mejor forma de vivir, de tener una excelente salud y condición de vida. Los alimentos proveen de los macro y micronutrientes (carbohidratos, proteínas, fibras, vitaminas y minerales) necesarios para atender los requerimientos del organismo en cada una de sus funciones. Hipócrates, quien es considerado como el primer médico del mundo decía: “Que tu alimentación sea tu medicina”. Para obtener máximos beneficios para la salud con la dieta, expertos en nutrición recomiendan el consumo de una gran variedad de alimentos. Además de macro y micronutrientes se han encontrado otro tipo de compuestos potencialmente bioactivos o fitoquímicos que no están designados como nutrientes tradicionales; éstos se encuentran en alimentos de origen vegetal (frutas, vegetales, cereales, leguminosas, etc.). Diversas investigaciones de esos compuestos en plantas han mostrado que tienen muchas formas y producen una gran variedad de efectos biológicos. Diversas clases de alimentos de origen vegetal contienen diferentes combinaciones de fitoquímicos (Boucher., 1999; Raskin y col., 2002; Hannum., 2004).

En los años 70's con el progreso tecnológico aplicado a las ciencias de los alimentos muchos nuevos tipos de componentes alimenticios fueron descubiertos. Fue en Japón donde se empezaron a realizar estudios sobre los efectos fisiológicos de esos componentes en sistemas de células animales. Los componentes de los alimentos o sus derivados que ocasionaron algún efecto fisiológico positivo en quienes los consumieron fueron refinados y purificados además, se convirtieron en medicinas o suplementos dietarios. Estos últimos son productos que se ingieren oralmente y contienen ingredientes que intentan suplementar adecuadamente los nutrientes que pueden estar haciendo falta en la dieta y por lo tanto promueven la salud (FDA, 2011). Empezó así una intensa búsqueda de alimentos que tenían efectos positivos en la salud humana, así como la identificación de los ingredientes biológicamente activos que daban ese

efecto, llegando posteriormente al concepto de alimento nutraceutico (Hannum, 2004). También, como ya se mencionó anteriormente, se ha reportado un efecto benéfico en la salud (antiviral, antitumoral, anticarcinogénico, fortalecedores del sistema inmune, reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas por la disminución de los niveles de triglicéridos en la sangre, incremento en las lipoproteínas de alta densidad [colesterol bueno], control de la glucosa en sangre, entre otros) por la ingesta de una gran variedad de frutos o alimentos de origen vegetal (Zákany y col., 1980; Dong-Hyun y col., 2001; Cui y Chisti, 2003; Kaneno y col., 2004).

En la actualidad existen controversias entre los términos alimentos funcionales y nutraceuticos. Los alimentos funcionales se definen como “Cualquier alimento modificado o ingrediente alimenticio que pueda proveer un beneficio a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que los alimentos contengan” o FOSHU’s los cuales están legalmente identificados en Japón. Los FOSHU’s son alimentos procesados que además de nutrir al organismo contienen ingredientes que tienen una función específica en el cuerpo, estos ingredientes incluyen 11 categorías: (1) fibra dietaria, (2) oligosacáridos, (3) azúcar de alcohol , (4) ácidos grasos poliinsaturados, (5) péptidos y proteínas, (6) glucósidos, isoprenoides y vitaminas, (7) alcohol y fenoles, (8) colinas, (9) bacterias ácido lácticas, (10) minerales y (11) otros. Los FOSHU’s son evaluados por el Ministerio de Salud para dar un permiso que indique naturaleza y efectividad a la salud (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Boucher (1999) define a los alimentos nutraceuticos como “Alimentos que proveen beneficio para la salud, más allá de la nutrición básica”. Delgado-Vargas y Paredes-López (2003) definen a un alimento nutraceutico como “cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o parte de un alimento y provee beneficios médicos o a la salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades”. Desafortunadamente esos términos no están universalmente aceptados y pueden variar de país en país. El término nutraceutico no existe bajo la legislación de Estados Unidos de América ni de México; sin embargo, en esta propuesta se utilizará este término.

Los compuestos nutraceuticos no solamente han captado el interés de científicos y promotores de la salud y dependiendo del interés y/o antecedentes, el esquema organizacional para los nutraceuticos puede variar. Por ejemplo, los cardiólogos pueden estar más interesados

en aquellas sustancias nutraceuticas asociadas con la reduccion de enfermedades del corazon, especificamente su interes podria encontrarse en las sustancias que tengan influencia positiva en hipertension, hipercolesterolemia o para reducir la actividad de radicales libres (Beelwilder y col., 2005). Mientras tanto, los oncologos podrian estar mas interesados en aquellas sustancias con actividad anticarcinogenica que pueden estar asociadas con incrementos en desintoxicacion de sistemas microsomales y defensas antioxidantes que pudieran disminuir la existencia de cancer. Por otro lado, cientificos que trabajan sobre el desarrollo de alimentos funcionales podrian no solamente incluir las propiedades fisiologicas, sino tambien la estabilidad y las propiedades sensoriales, asi como costos (Wildman, 2001; 2006).

Los ingredientes nutraceuticos y funcionales de los alimentos se han mostrado como sustancias GRAS (Generalmente Reconocidos como Alimentos Seguros). Se han identificados una gran cantidad de alimentos o cultivos con potencial nutraceutico, tales como: amaranto, quinoa, frijol, soya, especias, cereales, ginseng, aguacate, chile, piña, nopal, jitomate, guayaba, fresa, zarzamoras, frambuesas, cerezas, entre otros (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1999; Lawrence y col., 1999, Wildman, 2001; 2006).

2 Clasificación de compuestos nutraceuticos

Dependiendo del interes, ya sea para la instruccion academica, diseno de ensayos clinicos, desarrollo de alimentos funcionales recomendaciones dietarias, los nutraceuticos se pueden organizar de varias maneras dependiendo del interes especifico. La propuesta siguiente nos permite clasificar a los nutraceuticos por fuente alimenticia, mecanismos de accion y naturaleza quimica (Wildman, 2001; 2006).

a Clasificación por fuente alimenticia

Uno de los modelos más amplios de la organización de nutraceuticos se basa en su potencial como fuente alimentaria. En esta clasificación los nutraceuticos pueden separarse en plantas, animales y microorganismos (bacterias y levaduras). Este modelo es más adecuado cuando hay interes en un compuesto nutraceutico particular o compuestos relacionados o cuando hay un interes en un alimento especifico por razones geograficas/agricolas, asimismo para el desarrollo de alimentos funcionales. El **Cuadro 2** proporciona una lista de nutraceuticos que son considerados unicos para ciertos alimentos o familia de alimentos (Wildman, 2006).

Cuadro 2. Compuestos nutraceuticos agrupados por fuente alimenticia

Compuestos	Plantas	Animales
Fibra		
Hemicelulosa	Todas las plantas	-
Lignina		-
Celulosa		-
Pectina	Cítricos, cacao, nopal, frutillas, otros	-
Flavonoides		
Quercitina	Frutas, verduras, té verde	-
Genisteína	Soya, frijol, garbanzo	-
Daidzeína	Soya, frijol, garbanzo	-
Ácido gálico	Tés, bayas, uvas, aceite de oliva, cocoa, nueces	-
Luteína	Coles, repollo, lechuga, espinacas, maíz y mostaza	-
Zeaxantina	Nopal, otros	-
Ácidos grasos		
Lecitina	Soya	-
Ácido linoleico conjugado (ALC)	Frutas, hortalizas, frutos secos, aceites cártamo, girasol, maíz, soya	-
Ácido eicosapentanoico		Aceites de pescado
Vitaminas		
Licopeno	Tomate, sandía	-
γ -tocotrienol	Tomate	-
Ácido ascórbico	Cítricos, frambuesa, zarzamora, hortalizas.	-
β -caroteno	Zanahoria, brócoli, tomate, papas y espinacas.	-
α -tocoferol	Nueces, avellanas, soya, aceite de palma, girasol	-
Minerales		
Potasio	Brócoli, habas, tomate, papas, kiwis, ciruelas, plátano.	Carnes rojas, pollo, pescado, salmón,
Zinc	Lentejas, soya, garbanzo, frijol, hortalizas	Productos lácteos
Selenio	Granos, hortalizas, ajo, germen de trigo	Pollo, hígado, huevos, carnes rojas, mariscos, pescado
Calcio	Brócoli, col, mostaza, repollo, almendras, nueces, naranja	Productos lácteos

Wildman, 2006

b Clasificación por mecanismo de acción

Otra manera de clasificar a los compuestos nutraceuticos es por su mecanismo de acción. Esta clasificación está basada en supuestas propiedades fisiológicas. Podrían ser antioxidantes, hipocolesterolémicos, antiagregado, antiinflamatorio, anticarcinogénico, osteoprotector, entre otras (**Cuadro 3**) (Wildman, 2001, 2006).

c Clasificación por naturaleza química

Otra forma de agrupar a los compuestos nutraceuticos es por su naturaleza química. Este enfoque permite que se clasifiquen bajo grupos moleculares elementales. Este modelo preliminar incluye varios grupos grandes que proveen una base para subclasificarlos o subagruparlos. Una de las formas es: derivados de isoprenoides, compuestos fenólicos, ácidos grasos y lípidos estructurales, carbohidratos y derivados, sustancias a base de aminoácidos, microbios y minerales (**Figura 1**) (Delgado-Vargas y col., 2003; Wildman y col., 2006)

3 Polifenoles

Los polifenoles son una amplia variedad de metabolitos secundarios sintetizados por plantas vasculares y abarcan más de 8000 compuestos fenólicos relacionados con una variedad de funciones fisiológica, tales como: absorción de nutrientes, fotosíntesis, actividad sensoriales (Hollman y col., 1997; Han y col., 2007b; Singh y col., 2009; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010).

Los compuestos fenólicos son sintetizados por un par de rutas biosintéticas, las vías predominantes son la ruta de aromáticos, iniciando con la producción de aminoácidos aromáticos a través de la vía del shikimato. Algunos aminoácidos aromáticos continúan la vía de fenilpropanoides, produciendo derivados del ácido cinámico, los cuales podrían unirse en la ruta de los flavonoides para dar lugar a una gran diversidad de compuestos flavonoides (De Bruyne y col., 1999). Estructuralmente, los compuestos fenólicos son derivados del benceno con uno o más grupos hidroxilo sustituyentes, frecuentemente acompañados de sustituciones funcionales, tales como: ésteres, ésteres metílicos, glicósidos y otros. (Visioli y col., 2000; Duthie, 2007; Han y col., 2007b; Szajdek y Borowska, 2008; Wang y col., 2008). Los polifenoles varían desde compuestos simples a complejos, peso molecular alto y bajo, de anillos aromáticos, sencillos a complejos, posición y número de glicósidos, taninos y

Cuadro 3. Compuestos nutracéuticos agrupados por mecanismo de acción.

Anticáncer	Influencia positiva sobre el perfil de lípidos en sangre	Antioxidantes	Antiinflamatorio	Osteogénico o protector de los huesos
Capsaicina	β -glucán	Ácido ascórbico	Ácido linolénico	CLA
Genisteína	γ -tocotrienol	β -caroteno	EPA	Proteína de soya
Daidzeína	δ -tocotrienol	Polifenoles	DHA	Genisteína
α -tocotrienol	MUFA	Tocoferoles	Capsaicina	Diadzeína
γ -tocotrienol	Quercetina	Tocotrienoles	Quercetina	Calcio
CLA	ω -3-PUFAS	Indol-3-carbanol	Curcumina	
	Resveratrol	α -tocoferol		
Esfingolípidos	Taninos	Ácido elágico		
Limoneno	β -citosterol	Licopeno		
Dialil sulfurado	Saponinas	Luteína		
Ajoeno		Glutación		
α -tocoferol		Hidroxitirosol		
Enterolactona		Luteolina		
Curcumina		Oleuropeína		
Ácido elágico		Catequinas		
Luteína		Gingerol		
Carnosol		Ácido clorogénico		
		Taninos		

CLA: ácido linoleico conjugado; EPA: ácido eicosahexanoico; DHA: ácido docohexaenoico; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Wildman, 2001; 2006.

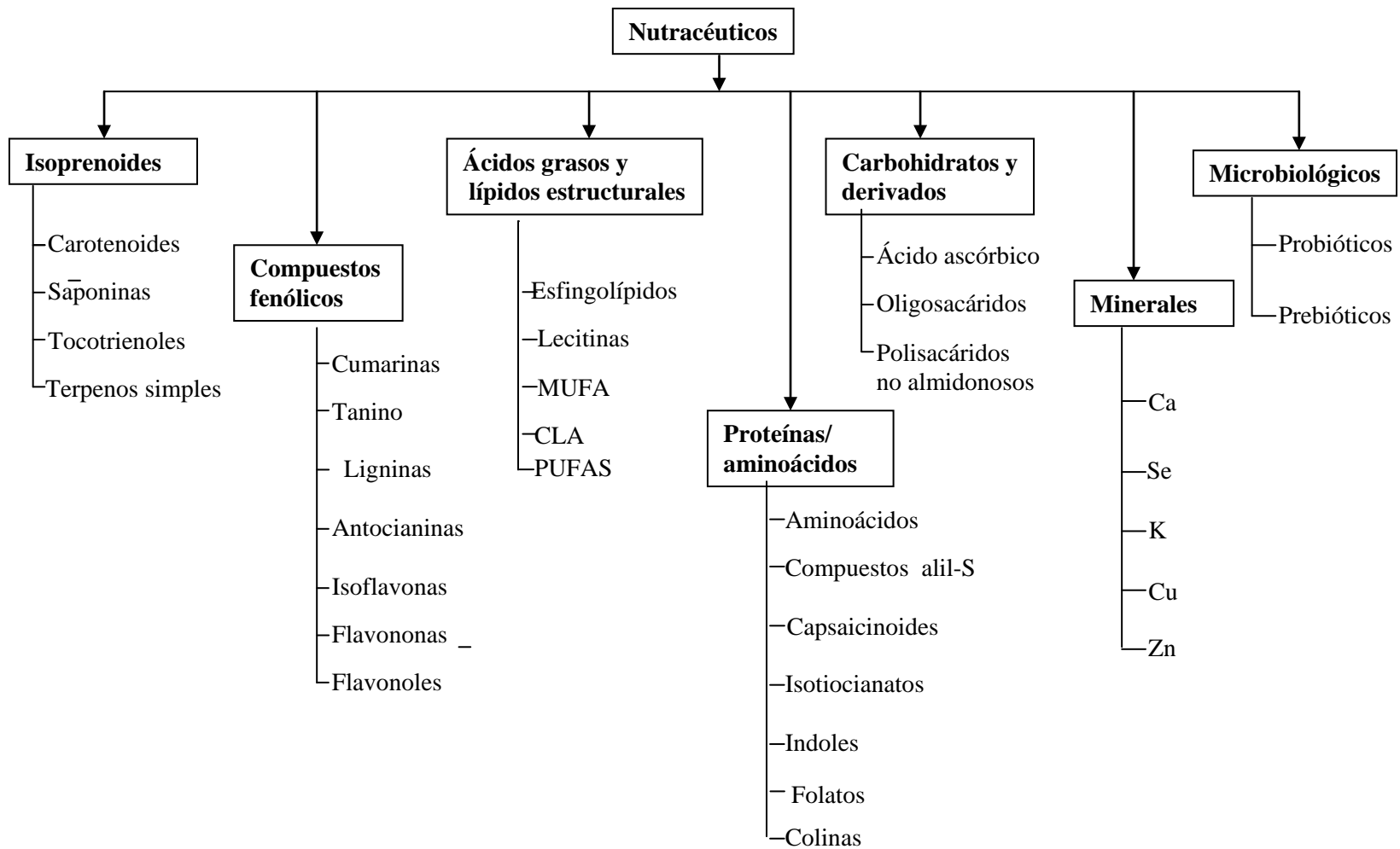


Figura 1. Clasificación de compuestos nutracéuticos agrupados por naturaleza química. CLA: ácido linoleico; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Wildman, 2006.

derivados fenólicos grandes (Han y col., 2007; Fernandez-Panchon y col., 2008; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010).

A Clasificación de compuestos fenólicos

Sobre la base de sus propiedades estructurales, los compuestos fenólicos podrían ser subdivididos en varios grupos (**Figura 2**) (1) ácidos fenólicos, (2) flavonoides, (3) estilbenos, (4) ligninas y taninos (Han y col., 2007; Paredes-López y col., 2010).

1) Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos están universalmente distribuidos en las plantas, su biodisponibilidad en la dieta es un factor importante en posibles beneficios a la salud de humanos y animales. Compuestos fenólicos simples se han encontrado con mucha frecuencia como resultado de la descarboxilación de ácidos fenólicos, degradación de ligninas o actividad microbiana (Sailendra y col., 2006). Del total de polifenoles que se encuentran en las plantas el 30% son ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico son ácido gálico, vanílico, protocatecuico y sirínico. Los ácidos fenólicos derivados de ácido hidroxicinámico incluyen ρ -cumárico, cafeico y ferúlico (Nichenametla y col., 2006). Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran más frecuentemente como ésteres simples con ácidos carboxílicos o glucosa y los hidroxibenzoicos están mayormente presentes en forma de glucósidos. El ácido cafeico es el principal representante de los ácidos hidroxicinámico y se presenta en los alimentos principalmente como ácido clorogénico, un éster del ácido cafeico y ácido químico. El ácido ferúlico es un monofenólico fenilpropanoide que se encuentra ampliamente en el reino vegetal (Rice-Evans y col., 1996; Clifford, 1999).

2) Flavonoides

Los flavonoides son de los grupos naturales más abundantes que se producen en el reino vegetal. La estructura básica de flavonoides es el núcleo flavan, que consta de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6), comúnmente conocido como A, B y C. El nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C permite distinguir las clases de flavonoides, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase se diferencian por sustituciones de los anillos A y B, que pueden incluir hidrogenación, hidroxilación,

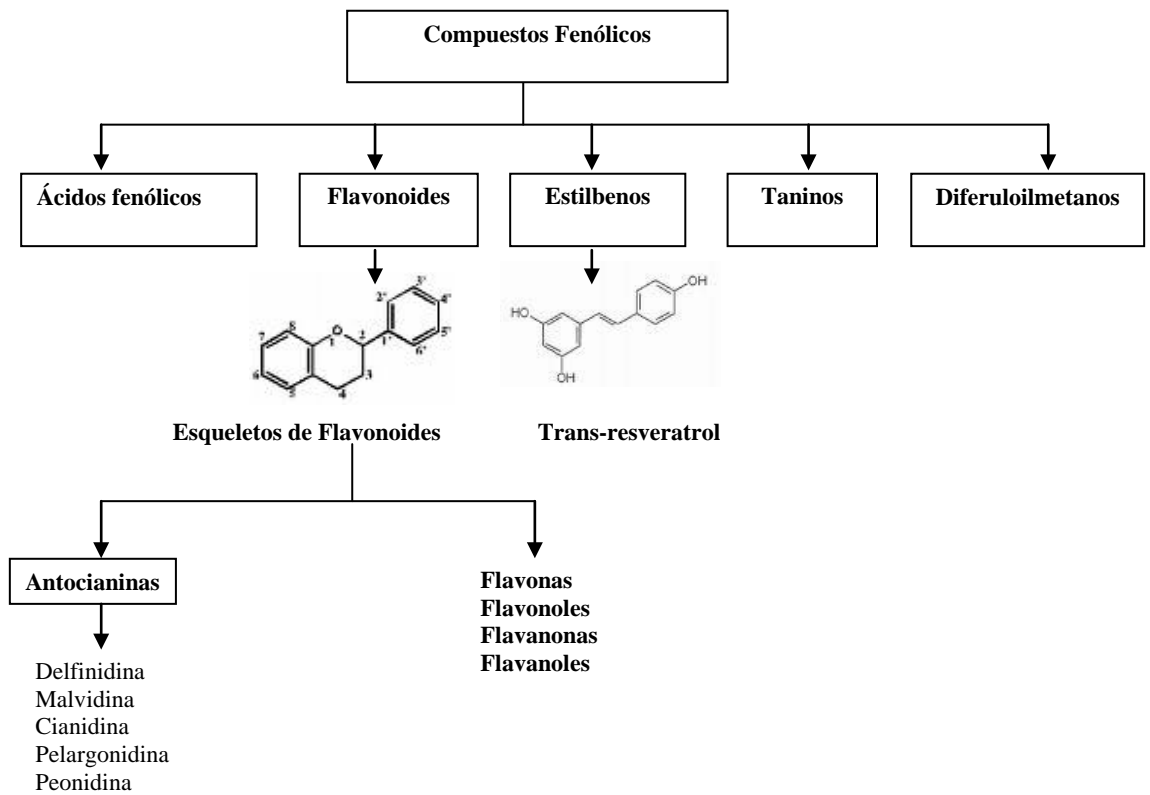


Figura 2. Clasificación de polifenoles
Han y col., 2007b; Paredes-López y col., 2010

metilación, sulfatación, y glicosilación (**Figura 3**). Además, el anillo C pirano también se puede abrir en forma de chalcona y reciclarse en un anillo furano (Cook y Samman, 1996).

Actualmente, el número exacto de flavonoides es difícil de saber; sin embargo, se han identificado más de 5000 diferentes flavonoides y se clasifican por lo menos en 10 grupos de productos químicos (Whiting y col., 2001); entre ellos los flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, catequinas, antocianidinas y las isoflavonas son particularmente comunes (Hannum, 2004; Lin y Weng, 2006).

a) **Antocianinas**

Las antocianinas son consideradas uno de los mayores e importantes pigmentos de plantas visibles para el ojo humano (Kong y col., 2003). Pertenecen al grupo de flavonoides y son glicósidos de derivados polihidroxiados y polymetoxi del 2-fenilbenzopirano o sales de flavilium. El catión flavilium constituye la parte principal de la molécula de las antocianinas (**Figura 3**) y contiene dobles enlaces conjugados responsables de la absorción de la luz alrededor de 500 nm, pigmentos que aparecen de diversos colores rojo, naranja, púrpura y azul (Markakis, 1974). Las agliconas, llamadas antocianidinas, son por lo general penta-(3,5,7,3, 4) o hexa- (3,5,7,3, 4, 5) sustituidos (Francis, 1989). Se han identificado más de veinte antocianidinas naturales; sin embargo, seis de ellas son las más comunes en los alimentos: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delphinidina (Dp) (Jurd, 1972).

Las antocianidinas rara vez se encuentran en la naturaleza como tal y se presentan más comúnmente en su forma glicosilada, como antocianinas, que son más solubles y estables en soluciones acuosas (Harborne, 1964). Fracciones comunes de glicósidos que podemos encontrar unido a la aglicona son: glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa; sin embargo, glicósidos complejos como rutinosa, soforosa y sambubiosa también puede estar presentes de forma natural (De Ancos y col., 1999). Asimismo, las antocianinas se pueden diferenciar por la naturaleza y el número de ácidos orgánicos unidos a las unidades glicosilo-antocianinas, normalmente ácidos fenólicos aromáticos o alifáticos dicarboxilo o una combinación de ambos. Los agentes acilantes más comunes incluyen derivados de los ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoico y una serie de ácidos alifáticos (Clifford, 2000)

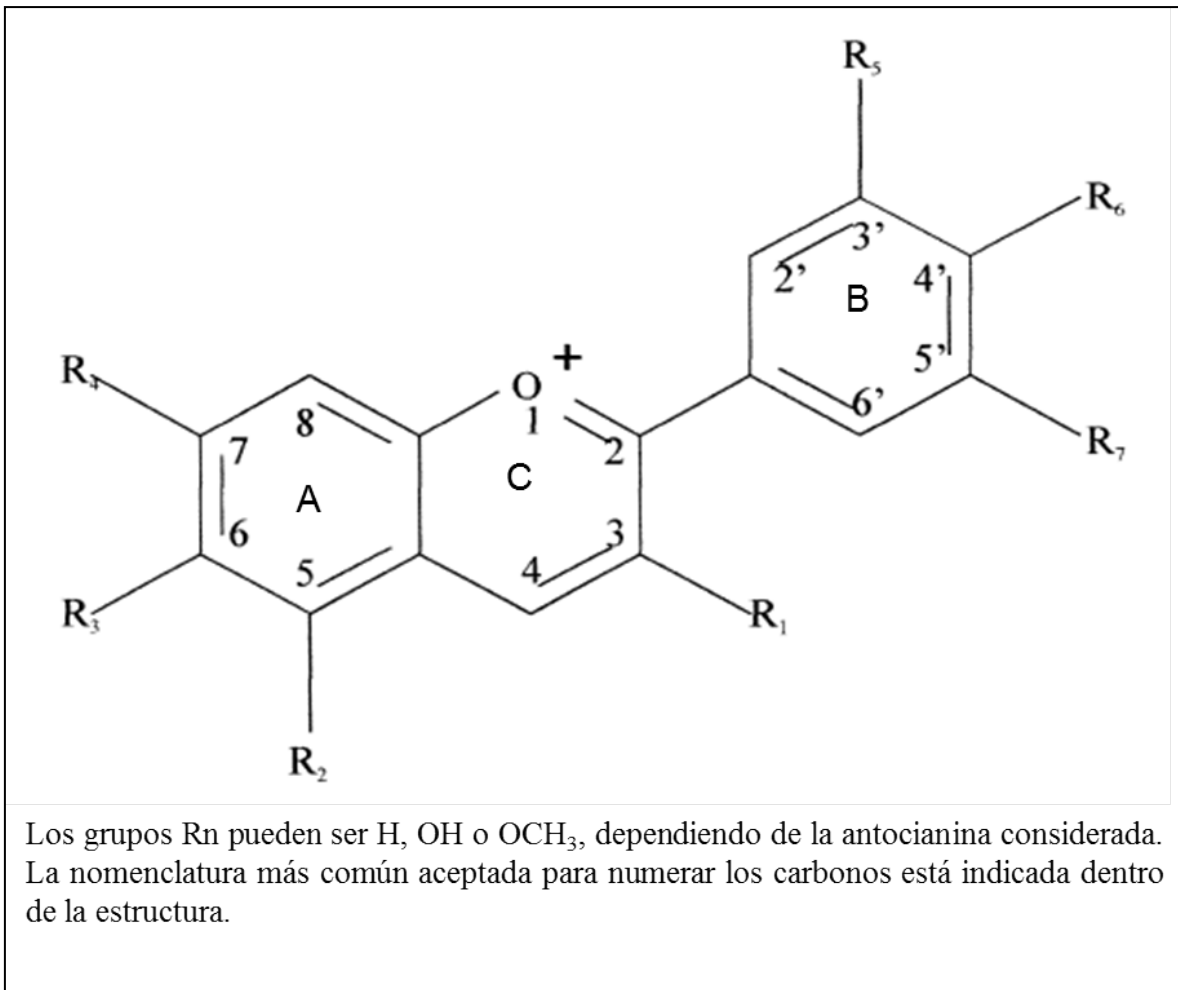


Figura 3. Estructura básica de antocianinas

Delgado-Vargas y col., 2000

Además de su papel como metabolitos secundarios en la pigmentación de las plantas, las antocianinas han adquirido un mayor interés como ingredientes funcionales para aplicaciones en alimentos y como potenciales agentes de protección contra el estrés oxidativo (Stintzing, y col., 2002a). Sin embargo, son deficientes en electrones, por lo que el núcleo flavilium es altamente reactivo y sufre cambios estructurales indeseables durante el almacenamiento y procesamiento (Jurd, 1972). La estabilidad del color de las antocianinas es fuertemente afectada por diversos factores, incluyendo estructura, concentración, pH, temperatura, luz, enzimas, oxígeno, copigmentos, iones metálicos, ácido ascórbico, azúcares y los productos de degradación (Rodríguez–Saona y col., 1999).

La estructura de la antocianina, sobre todo lo relacionado con el número y posición de las unidades glicosilo y grupos acilo unidos a la aglicona, influye significativamente en la reactividad de la molécula y en la estabilidad del color de la antocianina (Baublis y col., 1994; Turker y col., 2004). El incremento de la concentración de antocianinas también ha demostrado que promueve una mayor estabilidad del color a través de reacciones de auto-asociación entre antocianinas (Dao y col., 1998). Debido a la naturaleza iónica, las antocianinas se ven fuertemente influenciadas por los cambios en pH, lo que permite cambios estructurales dando como resultado diferentes colores y tonalidades en los diferentes valores de pH (Jurd, 1972, Clifford, 2000) (**Figura 4**). En medios muy ácidos se presenta un intenso color rojo del catión flavilium, la forma predominante, cuando el pH se incrementa produce la forma carbinol incolora y por lo tanto, la disminución de la intensidad del color. Además, el incremento del pH da lugar a la apertura del anillo del carbinol, obteniéndose una chalcona incolora (Markakis, 1974).

La temperatura y la presencia de oxígeno son factores importantes que influyen en las tasas de degradación de las antocianinas durante el almacenamiento y procesamiento. El incremento de las temperaturas se cree que induce la hidrólisis de enlaces glicosídicos en las moléculas de antocianinas, lo que conduce a la formación de agliconas inestables que se degradan rápidamente en sistemas acuosos (Maccarone y col., 1985). Los efectos indeseados y pérdidas aceleradas de antocianinas en presencia de oxígeno se han atribuido a reacciones de oxidación directa o indirecta (Jackman y col., 1987; Delgado-Vargas y col., 2000; Naczki y Shahidi, 2004).

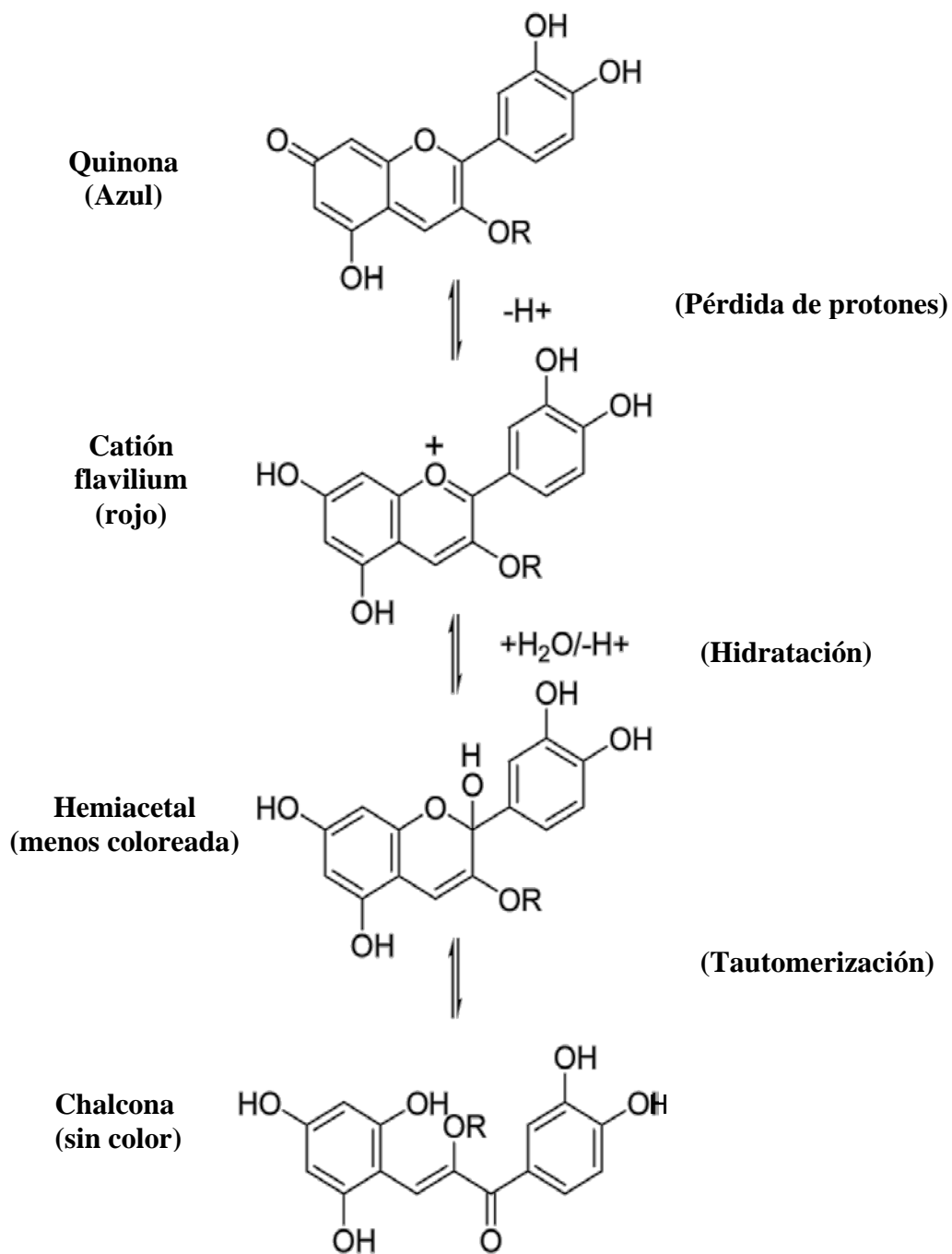


Figura 4. Estructuras moleculares de antocianinas generadas bajo diferentes condiciones de pH.

McGhie y Walton, 2007

Por otra parte, la presencia de ciertas enzimas comunes en sistemas alimentarios, incluyendo glucosidasas, peroxidadas y fenolasas aceleran la degradación de antocianinas. Las glucosidasas tienen la capacidad de romper los enlaces covalentes entre los residuos glicosilo y agliconas, lo que conduce a la rápida degradación de la aglicona inestable; mientras que peroxidadas y fenolasas puede oxidar los compuestos fenólicos (Poei-Langston y Wrolstad, 1981; Krifi y col., 2000; Kader y col., 2001; Naczki y Shahidi, 2004).

b) Flavonas y flavonoles

Las flavonas contienen un enlace doble entre las posiciones C2 y C3 en la estructura de flavonoides (anillo C) y una cetona en la posición C4. La mayoría de las flavonas de frutas y hortalizas tienen un grupo hidroxilo en la posición C5 del anillo A, mientras que la hidroxilación en otras posiciones, más a menudo en la posición C7 del anillo A o posiciones C3' y C4' del anillo B, puede variar en función de la clasificación taxonómica de una fruta o verdura en particular. Las agliconas flavona más generalizada son apigenina y luteolina, sin embargo los diversos patrones de sustitución hacen a este grupo más grande, con 309 agliconas en la última compilación de flavonoides (Valant-Vetschera y Wallenweber y col., 2006). La glicosilación se produce sobre todo en las posiciones C5 y C7, mientras que la metilación y acilación de grupos hidroxilo en el anillo B. Algunas flavonas son polimetoxiladas, como tangeretina y nobiletina, flavonas típicas que se encuentran en la cáscara de cítricos (Williams, 2006).

Los flavonoles tienen como única diferencia con las flavonas el grupo hidroxilo, un grupo en la posición C3 de éste último, el grupo hidroxilo en el carbono 3 también puede ser glicosilado y es quizás el más común en las frutas y hortalizas. Valant-Vetschera y Wallenweber (2006) reportaron 393 agliconas de flavonoles. De la misma manera que las flavonas, estas agliconas son muy diversas en los patrones de hidroxilación y metilación; por lo tanto, cuando los patrones de glicosilación son considerados, los flavonoles son quizás el subgrupo más numeroso. Las agliconas flavonoles más comunes son: quercetina y kaempferol, tienen 279 y 347 combinaciones diferentes de glucósidos, respectivamente (Williams, 2006).

3) Estilbenos

Los estilbenos están estructuralmente caracterizados por la presencia de un núcleo de 1,2-difeniletieno con grupos hidroxilo en los anillos aromáticos, existen en la forma de

monómeros y oligómeros. Éstos son sintetizados por la enzima estilbeno sintasa de una molécula de 4-cumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA como sustratos. El compuesto mejor conocido es el trans-resveratrol, que posee un esqueleto trihidroxiestilbeno (Riles y col., 2006). El resveratrol es un polifenol generado en respuesta al estrés en algunas plantas y se ha encontrado en mayor proporción en la piel de las uvas, cacahuete y vino tinto, así como en plantas no comestibles. Este compuesto es abundante en uvas utilizadas para la elaboración de vinos, pero se encuentra en concentraciones relativamente bajas en frutas y vegetales. El resveratrol es sintetizado preferencialmente en respuesta a infecciones fúngicas, pero también se ha visto en bayas maduras (Creasy y Coffe, 1997). En uvas se ha reportado un contenido de resveratrol de 1.04 mg/kg y en vino 1.67 mg/L (Riles y col., 2006). El resveratrol ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre radicales superóxido y peróxido de hidrógeno producidos por macrófagos que fueron estimulados por lipopolisacáridos (Martínez y Moreno, 2000). Se ha especulado que el resveratrol puede actuar como un antioxidante, promueve la producción de óxido nítrico, inhibe la agregación de plaquetas e incrementa la síntesis de colesterol de alta densidad y así, sirve como un agente cardioprotector (Bhat y col., 2001).

4) Taninos

Los taninos fueron definidos primeramente en 1962 por Bate-Smith y Swann como compuestos polifenólicos solubles en agua con pesos moleculares en una rango de 500 a 3000, posteriormente se reportó la identidad química y la capacidad para precipitar proteínas (Hasland, 1989). Sin embargo, algunos taninos son insolubles en agua; tienen pesos moleculares de 3,000 a 30,000 (Wursch y col., 1984) y pueden encontrarse asociados con polisacáridos de la pared celular (Saura-Calixto, 1987; Le Bourvellec y col., 2004; Serrano y col., 2009;). Son moléculas altamente hidroxiladas y son responsables de la astringencia en los alimentos debido a la precipitación de las enzimas en la saliva. Se clasifican en dos grupos: taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables. Una gran variedad de diferentes alimentos de origen vegetal contienen taninos (**Cuadro 4**) como té, vinos, granos y frutas (manzanas, mangos, plátanos, uvas, ciruelas, peras, duraznos, sorgo, mijo, cebada, chícharos y fresas) (Naczk y Shahidi, 2004; Han y col., 2007; Serrano y col., 2009; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010).

Cuadro 4. Alimentos que contienen taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables.

Grupo alimenticio	Condensados		Hidrolizables		Ref.
	Proantocianidinas	Elagitaninos	Galotaninos		
Cereales					
Cebada	X				1
Sorgo	X				2
Leguminosas					
Frijol	X				3
Garbanzo				X	4
Frutas					
Arándano	X		X		5, 6
Arándano rojos	X		X		7, 8
Cerezas	X		X		5, 9
Fresa	X		X		
Frambuesa	X		X		5, 6, 10
Mango			X	X	11
Maqui	X				12
Mortiño	X				12
Uva	X		X		5, 6, 9
Zarzamora	X		X		5, 6, 7,13
Nueces					
Almendras	X				5
Cacahuete	X		X		5, 13,14
Pistache	X				5

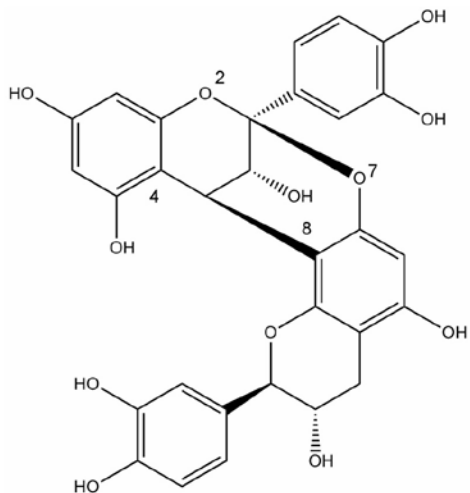
¹Bonoli y col., 2004; ²Brandon y col., 1980; ³Beninger y col., 2005; ⁴Baloyi y col., 2001; ⁵Gu y col., 2004; ⁶Amakura y col., 2000; ⁷Kahkonen y col., 2001; ⁸Hakkinen y col., 1999; ⁹Shahrzard y col., 1996; ¹⁰Seeram y col., 2006; ¹¹Soong y Barlow, 2006; ¹²Shrekinger y col., 2010; ¹³Lou y col., 1999; ¹⁴Lou y col., 2004.

a) **Taninos condensados o proantocianidinas**

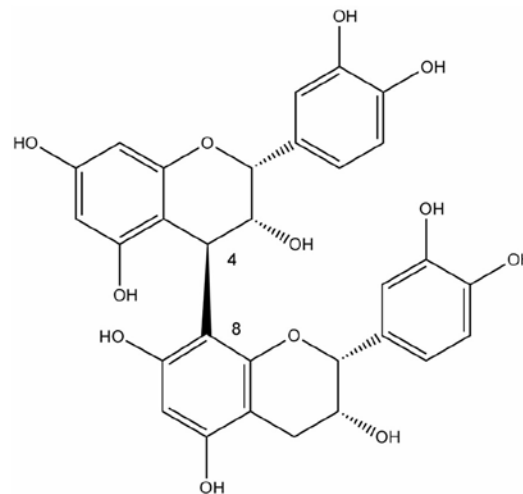
Los taninos condensados ó proantocianidinas, también se les conoce como oligómeros de proantocianidinas, pino-genoles o leucocianidinas, oligómeros de polímeros de flavanoles (Nandakumar y col., 2008). Son compuestos naturales que se encuentran muy distribuidos en frutas (arándanos rojos y morados, grosellas rojas y moradas), semillas de uvas, vino tinto, vegetales, nueces, semillas, flores, té negro y corteza de pinos y otras plantas (Yamakoshi y col., 2002; Nandakumar y col., 2008).

Son una clase de compuestos fenólicos que toman la forma de oligómeros o polímeros de unidades de polihidroxi-flavan-3-ol, tales como (+)-catequina y (-)-epicatequina (Nandakumar y col., 2008). Estructuralmente, los monómeros de las proantocianidinas están ligados por enlaces C-C entre sí, principalmente en la posición del C4-C8, pero también pueden existir las uniones entre el C4-C6 (**Figura 5**) (procianidinas Tipo B). En algunos compuestos de plantas también se han encontrado uniones en la posición C2-C7 (procianidinas tipo A) (**Figura 5**) (Joshi y col., 2001; Yamakoshi y col., 2002; Nandakumar y col., 2008). Las proantocianidinas formadas exclusivamente de unidades de epicatequina son llamadas procianidinas, que son muy abundantes en plantas. Las proantocianidinas menos comunes contienen subunidades de epigalocatequina y también son llamadas prodelfinidinas. Las subunidades de flavan-3-ols pueden tener grupos acilo sustituyentes como ácido gálico o grupos glicosilo ambos pueden estar unidos en la posición del C3 o C5 de los oligómeros (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

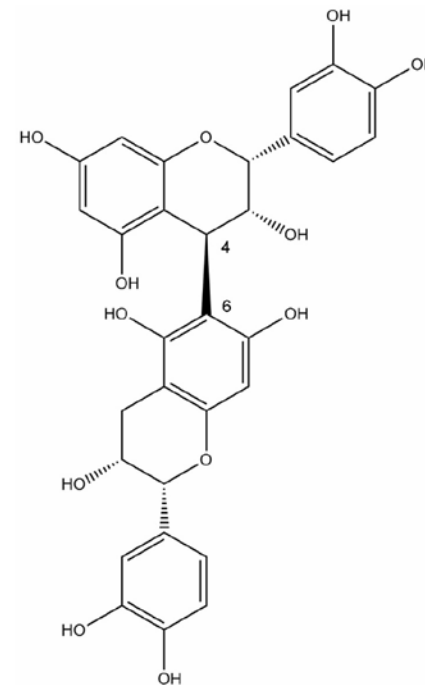
Por otro lado, las proantocianidinas forman complejos con proteínas de la saliva formando el carácter astringente de los frutos (uvas, duraznos, manzanas, peras, frutillas, etc) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.) y el amargor del chocolate. Esta astringencia cambia durante el transcurso de la maduración y comúnmente desaparece cuando los frutos alcanzan su madurez completa (Puupponen-Pimiä y col., 2005; Garras, 2009). Poca información está disponible en alimentos sobre la distribución y naturaleza de las proantocianidinas; sin embargo, el contenido de proantocianidinas en los alimentos varía, debido a la naturaleza de las muestras analizadas, variedad, estado de maduración, parte del alimento analizado, nivel de procesamiento o por el método analítico empleado, etc. (Santos-Buelga, y Scalbert, 2000; Pan y col., 2008; Nandakumar y col., 2008).



Procianidina A1
 Epicatequina-(2 β →O→ β 7, 4 β →8-catequina)



Procianidina B2
 Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina



Procianidina B5
 Epicatequina-(4 β →6)-catequina

Figura 5. Estructuras simples de procianidinas diméricas (tipos de enlaces en taninos condensados).
 Serrano y col., 2009

En 88 alimentos estudiados se encontró predominantemente taninos condensados, lo que sugirió que este tipo de polifenoles pueden ser de los compuestos polifenólicos más abundantes en la naturaleza (Shahidi y Naczk, 1995; Parr y Bolwell, 2000). Las semillas de uva (*Vitis vinifera*) son particularmente ricas de proantocianidinas, éstas son principalmente dímeros, trímeros y oligómeros altamente polimerizados de monómeros de catequinas (Silva y col., 1991; Yamakoshi y col., 2002; Nandakumar y col., 2008). Se ha demostrado que los taninos condensados o proantocianidinas son potentes atrapadores de radicales libres y poseen capacidad antioxidante, son más efectivos que el ácido ascórbico y vitamina E (Bagchi y col., 1997; Joshi y col., 2001).

Por otro lado, este tipo de compuestos además de su capacidad antioxidante poseen capacidad anticarcinogénica en humanos debido a la regulación de citocinas como IL-10 e IL-6 en diferentes modelos de tumores (Mittal y col., 2003; Singh y col., 2004; Mantena y col., 2006), además, inducen apoptosis (regulan expresión de Bax-2), estimulan el sistema inmune y reprimen la expresión de genes de COX-2 e iNOS (Dai y col., 2007; Nandakumar y col., 2008; Pan y col., 2008; Guo-Shu y col., 2010).

b) Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables, son poliésteres heterogéneos que se forman cuando el ácido elágico se esterifica y se liga con grupos hidroxilo de un carbohidrato poliol como la glucosa. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de otros azúcares como fructosa, xilosa, sacarosa y algunas estructuras al azar como hamamelosa (Serrano y col., 2009). Si el ácido es ácido elágico, los compuestos son llamados galotaninos. Ésteres con ácido hexahidroxidifénico (cuando se hidroliza el tanino y se forma ácido elágico + agua) son llamados elagitaninos. Dentro de los más estudiados se encuentran galotaninos, elagitaninos como castalagina, punicalagina. Se encuentran en cantidades traza en plantas (Parr y Bolwell., 2000; Serrano y col; 2009).

Un gran número de flavonoides de origen vegetal presentan actividad antiviral, por ejemplo los taninos presentes en fresas tienen la habilidad de inactivar el virus de polio, entérico y herpes (Konowalchuh y Spiers, 1976). En habas (*Vicia faba* L) los taninos son los compuestos fenólicos con mayor proporción y se ha encontrado una correlación negativa con los

compuestos fenólicos libres y el endurecimiento del grano durante almacenamiento prolongado (Nasar-Abba y col., 2008).

Se ha sugerido que el consumo regular de taninos puede ayudar a inducir el desarrollo de mecanismos de defensa en seres humanos y animales y que ayudan a disminuir los riesgos de cáncer (Lule y Xia., 2005). Además, se ha mostrado que los elagitaninos de frambuesas contribuyen significativamente en la actividad antioxidante y propiedades de vasodilatación (Mullen y col., 2002).

La actividad antioxidante de taninos en diferentes híbridos de soya sobre el radical DPPH (2-2-difenil-picrilhidracil) fue correlacionada positivamente, se obtuvieron porcentajes de inhibición de 21.9% hasta 52.7% (Malencic y col., 2009). Se ha reportado que un extracto de catechu (*Acacia catechu* L) rico en taninos se utilizó como astringente, además, dichos extractos mostraron un efecto supresor del crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 y este efecto lo atribuyeron a la presencia de taninos (Zhang y col., 2008). Extractos de uva y pino ricos en proantocianidinas con diferentes grados de polimerización y porcentaje de galoilación (porcentajes de ésteres de galato) mostraron una alta capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno cuando fueron probadas con células de cáncer de colon HT-29 humano (Lizarraga y col., 2007).

5) Diferuloilmetanos

Los compuestos diferuloilmetanos son un grupo pequeño de compuestos fenólicos con dos anillos aromáticos sustituidos con grupos hidroxilos y ligados por una cadena alifática conteniendo grupos carbonil (Schaffer y col., 2007). Los curcuminoides son el grupo de diferuloilmetanos aislados de raíz de cúrcuma (*Curcuma longa*) mayormente conocidos. Curcumina es el de mayor abundancia en la naturaleza y se ha reportado que ejerce una gran variedad de beneficios a la salud como: antioxidantes, antiinflamatorio, inhibidor de la agregación de plaquetas, formación de aductos en el DNA, detiene el ciclo celular induciendo apoptosis y tienen efectos anticarcinogénico (Joe y col., 2004). Además, la curcumina es un potente antagonista del activador metabólico S9 cuando se llevan a cabo ensayos de mutagenicidad (ensayo de Ames). Inhibiendo la mutagenicidad inducida por aminas heterocíclicas de alimentos cocinados, fritos o rostizados (Shishu y col., 2008).

b Propiedades antioxidantes de polifenoles

Además del papel fisiológico en las plantas, los polifenoles son importantes componentes de la dieta humana. Por otra parte, las dietas ricas en polifenoles se han asociado con una reducción en la incidencia de enfermedades de daño oxidativo, como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Visioli y col., 2000). Muchos de esos efectos se han atribuido a la capacidad de los polifenoles para inhibir las reacciones oxidativas *in vivo* (Chow y col., 2005). La acción antioxidante de los compuestos fenólicos incluye la supresión de enzimas y oligoelementos que participan en la producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS) ó nitrógeno y la protección de las defensas naturales de antioxidantes (Han y col., 2007b).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que contienen un átomo de oxígeno altamente reactivo como resultado de la presencia de un radical libre, o de un átomo de oxígeno donde hay más electrones de lo normal. Por ejemplo, como primera clase incluye radicales (OH^\cdot) y el radical superóxido (O_2^\cdot), mientras que como segunda clase a los iones peróxido (O_2^{2-}) e hipoclorito (ClO^\cdot). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) también es considerado como un ROS por su reactividad (Roginsky y Lissi, 2005; Velmerries y Nicholson, 2006). El radical hidroxilo es el más reactivo y el más conocido, por su habilidad de reaccionar con una gran cantidad de biomoléculas. Por ejemplo con lípidos y proteínas de la membrana celular especialmente con receptores que pueden llegar a formar parte de reacciones de radicales, afectando su función provocando que la membrana celular pueda colapsarse. Los organismos vivos han desarrollado diferentes mecanismos para tratar a los ROS, un mecanismo es la inactivación enzimática. La enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno (O_2) vía oxidación y H_2O_2 vía reducción. El H_2O_2 es removido a través de la acción de la enzima catalasa y glutatión peroxidasa. La conversión de H_2O_2 a agua y oxígeno se realiza a través de la catalasa (Velmerries y Nicholson, 2006).

Otro mecanismo comúnmente utilizado por los organismos vivos para inactivar los ROS es a través del uso de antioxidantes. Los antioxidantes pueden reaccionar con los radicales, convirtiéndose en otro radical, pero estas moléculas son relativamente más estables en presencia de otro radical libre. Como consecuencia, atrapan los radicales y detienen las reacciones en cadena y evitan más daños a nivel celular. La relativa estabilidad de los

antioxidantes que contienen radicales con electrones desapareados es generalmente el resultado de la presencia de enlaces conjugados y el electrón desapareado puede estar deslocalizado. Como consecuencia los compuestos aromáticos en general, y compuestos fenólicos en particular, son antioxidantes muy efectivos por la deslocalización de sus electrones (Roginsky y Lissi, 2005; Velmerries y Nicholson, 2006; Mc Ghie, 2007).

Numerosos estudios han mostrado que el consumo de frutas y vegetales está asociado con la reducción de riesgos a enfermedades que están relacionadas con niveles altos de estrés oxidativo. Los compuestos antioxidantes pueden disminuir el estrés oxidativo, minimizando la incidencia de enfermedades (La Vechia y col., 2001; Silalahi, 2002; Spada y col., 2008). Los polifenoles son de los compuestos antioxidantes presentes en frutas y vegetales los cuales se ha reportado que poseen una potente capacidad antioxidante actuando a través de mecanismos endógenos o exógenos (Han y col., 2007a).

El resveratrol ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre radicales superóxido y peróxido de hidrógeno producidos por macrófagos que fueron estimulados por lipopolisacáridos (Martínez y Moreno, 2000). Se ha especulado que el resveratrol puede actuar como un antioxidante, promoviendo la producción de óxido nítrico, inhibiendo la agregación de plaquetas e incrementando la síntesis de colesterol de alta densidad y así, servir como un agente cardioprotector (Bhat y col., 2001).

Por otro lado, las antocianinas (flavonoides) son responsables de la actividad antioxidante por la habilidad para atrapar especies reactivas de oxígeno, como oxígeno singulete, superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Wang y Jiao, 2000). Los efectos antioxidantes de las antocianinas *in vitro* se han demostrado utilizando diversos sistemas celulares incluyendo colon, endotelial, hígado y mama. (Renis y col., 2007; Singletary y col., 2007). En esos sistemas de cultivo las antocianinas han mostrado múltiples efectos antitóxicos y anticarcinogénicos atrapando directamente especies reactivas de oxígeno, incrementando la capacidad de absorber radicales oxígeno de las células, reduciendo la formación de aductos en el ADN y disminuyendo la peroxidación de lípidos, inhibiendo mutagénesis y reduciendo la proliferación celular por la modulación de transducción de señales (Kong y col., 2003). La capacidad de atrapar radicales de las antocianinas se ha atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3 del anillo C y también en la

posición 3', 4' y 5', en el anillo B de la molécula. En general, la capacidad de atrapar radicales de las antocianidinas (agliconas) es superior que la respectiva antocianina y ésta disminuye cuando el número de azúcares sustituyentes se incrementa (Wang y Stoner, 2008).

La actividad antioxidante de los polifenoles está relacionada con la prevención de cáncer en los estados iniciales. Boivin y col. (2009) realizaron un estudio donde evaluaron la capacidad antioxidante y la actividad antiproliferativa de diferentes líneas celulares de cáncer con diferentes vegetales encontrando que el ajo, calabaza y coles de bruselas tuvieron mayor capacidad antioxidante (41.1, 40.5 y 32.9 μmol equivalentes de Trolox/mL, respectivamente) mientras que otros vegetales como lechuga y pepino tuvieron considerablemente menor actividad (1.5 y 1.4 μmol equivalentes Trolox./mL, respectivamente). El polifenol curcumina y quercetina incrementan la actividad de diversas enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, o glutatión reductasa *in vivo* e *in vitro* y activan sistemas de defensa endógeno *in vitro* (Huang y col., 2004; Shen y col., 2007). La actividad antioxidante de taninos en diferentes híbridos de soya sobre el radical DPPH (2-2-difenilpicrilhidracil) fue correlacionada positivamente, se obtuvieron porcentajes de inhibición de 21.9% hasta 52.7% (Malencic y col., 2009).

Los polifenoles inhiben las enzimas responsables de la producción de radicales, incluyendo xantina oxidasa, proteína cinasa C, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, monooxidasa microsomal, glutatión tranferasa, succinato oxidasa microsomal y NADH oxidasa, así mismo son eficientes quelantes de metales traza que juegan un papel muy importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (Cos y col., 2003). Sin embargo, la actividad antioxidante se debe al atrapamiento de las especies reactivas a través de un átomo de hidrógeno, o a la donación de electrones (Shahidi y Wanasundara, 1992). De acuerdo a Rice-Evans y col. (1996) las propiedades estructurales de los polifenoles, en términos de disponibilidad de los grupos donantes de hidrógeno, determinan la actividad antioxidante, mientras que los sustituyentes en el anillo aromático afectan la estabilidad de los radicales fenólicos resultantes por lo tanto, la capacidad de extinción de radicales de los compuestos fenólicos.

c Bioactividad de polifenoles

Algunos fitoquímicos bioactivos que se encuentran en cantidades significativas en frutas y verduras, pueden proveer beneficios deseables a la salud más allá de la nutrición básica,

reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas (Pan y col., 2008). En la **Figura 6** se muestra la bioactividad propuesta para los polifenoles. Estos han sido estudiados por la inhibición de enzimas oxidantes, atrapando radicales libres, impactando el ciclo celular, induciendo enzimas endógenas antioxidantes y modulando la transducción de señales; lo que puede tener diferentes efectos biológicos (antiviral, anticarcinogénico, antidiabético, antiinflamatorio, antitumoral, inmunoprotector, entre otros) (Han y col., 2007b).

A nivel celular, se considera que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas, como: aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y cáncer. Con el fin de hacer frente a un exceso de radicales libres producidos por el estrés oxidativo, los humanos han desarrollado mecanismos endógenos y exógenos para mantener la homeostasis del potencial óxido-reducción. (Han y col., 2007b) ya sea por el incremento de enzimas antioxidantes endógenas o mejorando las defensas no enzimáticas a través de medios farmacológicos o dietarios (Wu-Yang y Yi Zhong, 2010).

Los polifenoles antioxidantes interfieren con la oxidación de lípidos por una donación rápida de un átomo de hidrógeno a los radicales lipídicos (**Figura 7**). El radical fenoxilo resultante por sí mismo no puede iniciar una nueva reacción de radicales libres ya que sufre una oxidación por una reacción en cadena. En este sentido, los antioxidantes fenólicos son excelentes donadores de electrones o moléculas de hidrógeno y además, los radicales intermediarios son relativamente estables debido a la resonancia deslocalizada de electrones y a la falta de sitios sustituibles para que pueda atacar una molécula de oxígeno (Shahidi y Naczk., 1995; Roginsky y Lissi, 2005; Velmerries y Nicholson, 2006; Mc Ghie y Walton, 2007).

La actividad antioxidante de derivados del dihidroxibenzoico se debe parcialmente al radical semiquinoide producido inicialmente y puede ser oxidado por quinonas por reacción con otro radical lipídico. La efectividad antioxidante de derivados del 1, 2-dihidroxibenzeno está dada por la estabilización de un radical a través de puentes de hidrógeno intramoleculares (Shahidi y Naczk. 1995; Velmerries y Nicholson, 2006). Polifenoles del té verde inhiben el transporte de glucosa, posiblemente por la inhibición de transportadores de glucosa dependientes de sodio en el intestino delgado de conejos (Koboyashi y col., 2000). En líneas

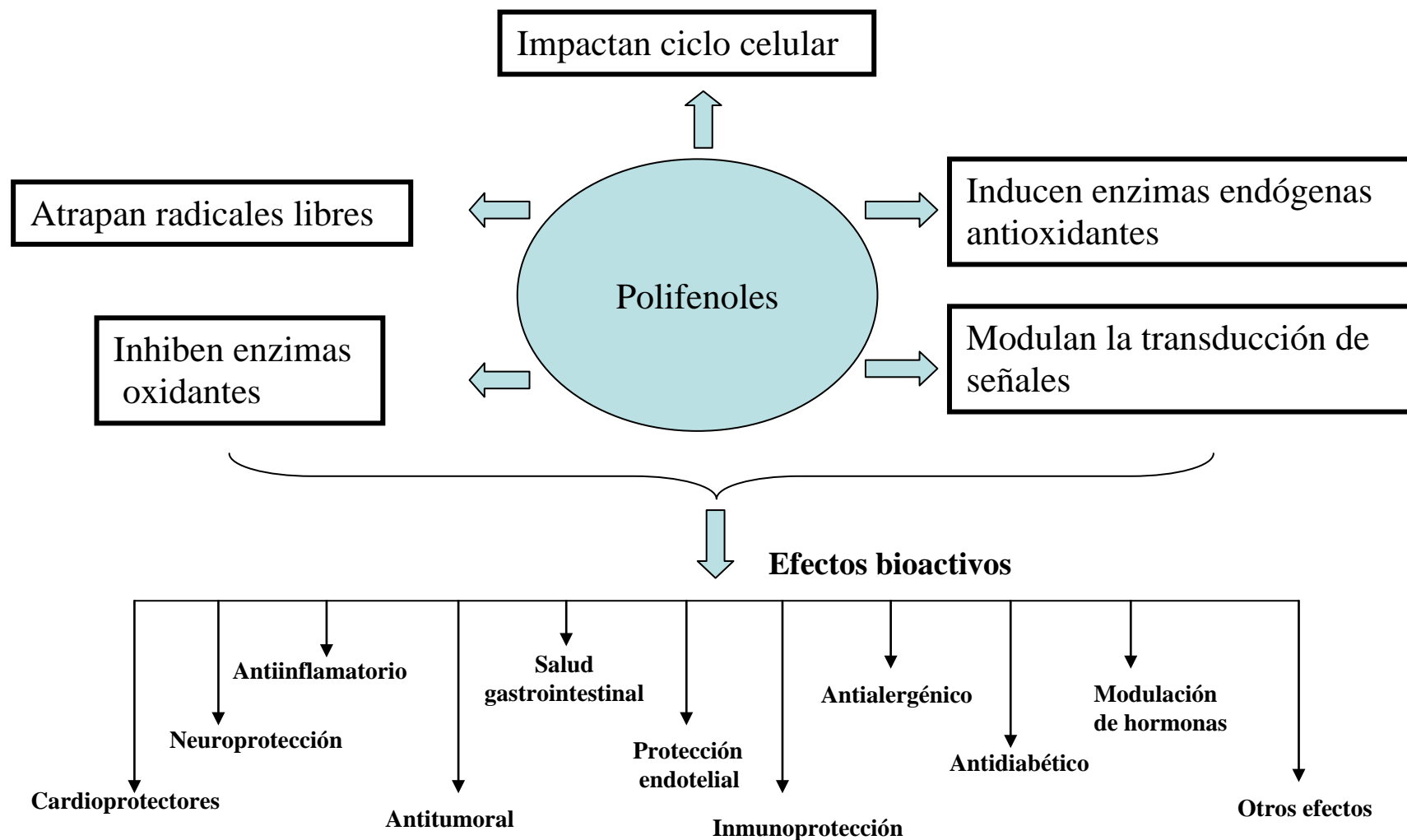


Figura 6. Bioactividad de polifenoles
Han y col., 2007b

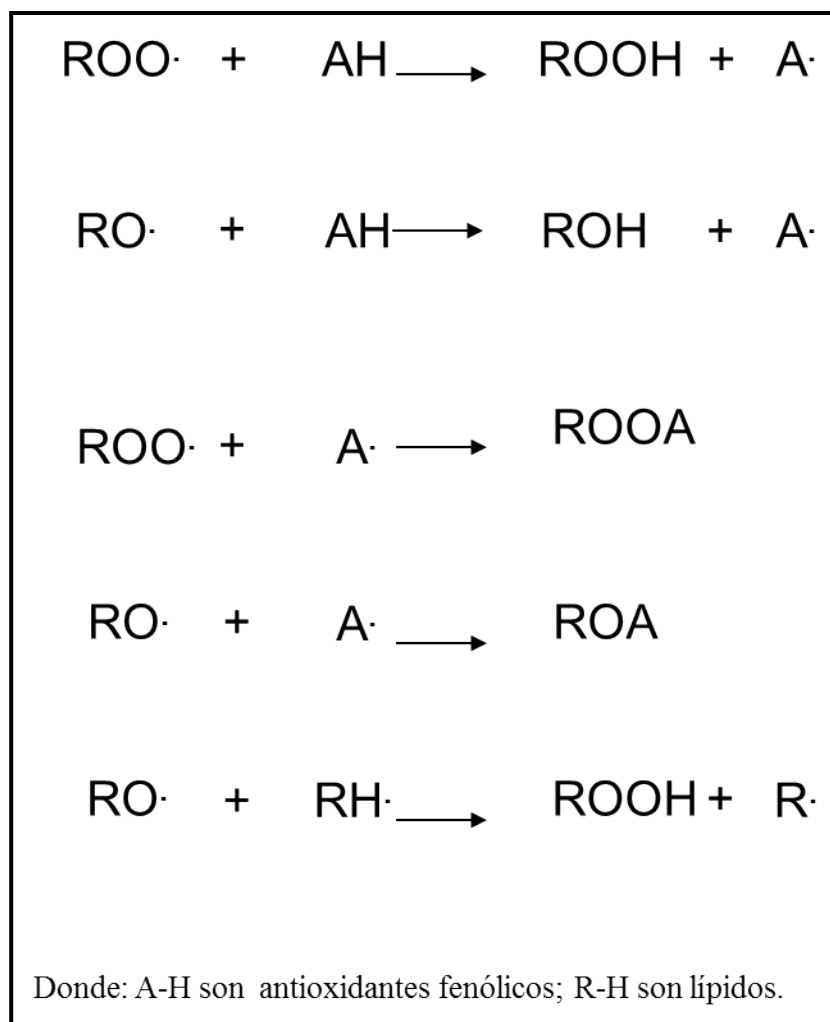


Figura 7. Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos sobre lípidos.

Fuente: Shahidi y Naczk, 1995.

celulares intestinales polarizadas Caco-2 se ha mostrado una actividad antidiabética de flavonoides glucosilados y polifenoles no glucosilados ya que inhiben la absorción de glucosa en las células bajo condiciones dependientes de sodio (Jhonston y col., 2005).

La quercetina, disminuye la peroxidación de lípidos en líneas celulares de hematoma HuH7 (Gouedard y col., 2004). Se ha reportado que la quercetina ejerce un efecto inhibitorio dosis dependiente en la línea celular HT-29 de cáncer de colon a concentraciones de 10nM hasta 10 μ M (Ranelletti y col., 1992). Además, se ha encontrado que la quercetina inhibe el crecimiento inducido de células cancerígenas de mama MCF-7 (Choi y col., 2001). Polifenoles como apigenina, luteolina, quercetina y galotaninos tienen un efecto antiinflamatorio, inhibiendo la respuesta inflamatoria por la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la adhesión de moléculas en macrófagos y células endoteliales NR8383 (Gerritsen y col., 1995; van-Meeteren y col., 2004; Seung-Bin y col., 2010). El polifenol curcumina ejerce actividad antitumoral por inhibición de proliferación celular y angiogénesis, bloqueando la progresión del ciclo celular tumoral e induciendo la muerte celular programada *in vivo* e *in vitro* (Kunnumakara y col., 2007).

El ácido dihidrocafeico es capaz de atrapar radicales libres (aniones superóxido, radicales dihidroxilo y peroxilo) en células endoteliales humanas EAH926 (Huang y col., 2004). Ésteres de ácido cafeico inhiben la actividad de HIV-1 integrasa, una enzima esencial para la replicación del virus del SIDA (Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida) (Fesen y col., 1994). Además, inhiben la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); enzima involucrada en inflamación y destrucción de tejidos autoinmunes (Song y col., 2002). En un tratamiento de células HT-29 con diferentes ésteres de ácido cafeico como metil cafeato (150 μ M), feniletil cafeato (20 y 30 μ M) se obtuvo una inhibición de ornitina descarboxilasa y de la proteína cinasa-c que están involucradas en la proliferación celular (Rao, 1992). Se ha comprobado que los ácidos fenólicos y los flavonoides presentan efectos de sinergia con otros antioxidantes, tales como ascorbato y tocoferol. Además, podrían tener un efecto protector sobre esas vitaminas, dependiendo de sus estructuras (Clifford, 1999).

Extractos de fracciones ricos en proantocianidinas de uvas y pino mostraron diferentes grados de polimerización y porcentajes de ésteres de galato; además cuando se variaron las concentraciones de las mezclas de extracto se obtuvieron diferencias en la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (probadas con células de cáncer de colon

HT-29 humano) (Lizarraga y col., 2007). Por otro lado, se mostró que este tipo de compuestos además de su capacidad antioxidante poseen capacidad anticarcinogénica a través de la regulación de citocinas como IL-10 e IL-6 en diferentes modelos de tumores (Mittal y col., 2003; Singh y col., 2004; Mantena y col., 2006) e inducen apoptosis (regulan expresión de Bax-2), estimulan el sistema inmune y reprimen la expresión de genes de COX-2 e iNOS (Dai y col., 2007; Pan y col., 2008; Nandakumar y col., 2008; Guo-Shu y col., 2010).

Un extracto de catechu (*Acacia catechu* L) rico en taninos se ha utilizado como astringente, además se ha reportado que ejerce un efecto supresor del crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 y este efecto lo atribuyen a la presencia de los polifenoles (Zhang y col., 2008). Estándares de antocianinas comerciales mostraron una inhibición en la actividad de COX-1 y COX-2 a concentraciones de 100 y 50 μ M, respectivamente en líneas celulares de cáncer de mama, colon, hígado y del sistema nervioso central, sugiriendo que este tipo de compuestos se pueden promover por su potencial beneficio a la salud (Seeram y col., 2003). El resveratrol puede disminuir *in vitro* la expresión de adhesión de células vasculares (Carluccio y col., 2003) además, el resveratrol tiene un impacto en las deficiencias cognitivas, activando la fosforilación de la proteína cinasa (Bastianetto y col., 2007).

El término antimutagénico se aplica a compuestos que actúan como agentes protectores en el organismo. Se evita la promoción o progresión de las etapas iniciales bloqueando los desarreglos al daño del ADN, evitando las mutaciones a nivel celular (Vayalil, 2002; Horn y Ferrao, 2008). La identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones ha llegado a ser un importante procedimiento para la evaluación de la seguridad de alimentos y fármacos (Mortelmans y Zeiger, 2000). Las mutaciones pueden ocurrir en genes, una simple base es modificada, o una o más bases pueden ser insertadas o eliminadas (Mortelmans y Zeiger, 2000).

Los ensayos con *Salmonella*/microsomal (ensayo de Ames) permiten una rápida detección de mutágenos y probablemente sustancias carcinogénicas a bajo costo (Mortelmans y Zeiger, 2000). El análisis de actividades antimutagénicas y mutagénicas se correlaciona con la presencia de compuestos fitoquímicos en plantas como: flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, estilbenos, alcaloides, entre otros (Horn y Ferrao, 2008). Se han reportado diferentes extractos de plantas ricos en polifenoles con actividad antimutagénica o mutagénica. Extractos de *Hibiscus sabdariffa* inhiben la actividad antimutagénica de *S.*

typhimurium inducida por aminas heterocíclicas y 1-nitropireno (Rosa y col., 2007; Olvera-García y col., 2008) lo cual se atribuye a la presencia de ácidos fenólicos. La mezcla de polifenoles de semillas de ajonjolí inhiben la mutagénesis inducida en especies de *Salmonella* TA100 y TA98 (Lazarou y col., 2007). En un ensayo (Ames) con la cepa *Salmonella* TA98, diferentes alimentos procesados contenían el polifenol curcumina estos, inhibieron la mutagenicidad inducida por 1-nitropireno en la cepa (Shishu y Kaur, 2008).

Otros estudios sobre actividad inhibitoria en células de cáncer con diferentes cultivos vegetales (papa, zanahoria, lechuga y tomate), reportaron poco efecto inhibitorio sobre la proliferación de líneas celulares transformadas. Sin embargo, utilizando crucíferas como: brócoli, coliflor, calabaza, rábano y calabaza morada encontraron potente actividad inhibitoria de células transformadas (Boivin y col., 2009).

Las uvas son ricas en polifenoles y el proceso de elaboración del vino da como resultado la concentración de polifenoles. Estos compuestos tienen efectos benéficos sobre enfermedades del corazón y aterosclerosis ya que reducen la susceptibilidad a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incrementan la capacidad antioxidante del suero sanguíneo (Cooper y col., 2004); este efecto se atribuye a flavonoides y flavanoles (Li y col., 2009). Los polifenoles tienen otros efectos bioactivos, como actividad antibacteriana, efecto positivo sobre células de VIH, células hepáticas y efecto angiogénico (Ray y col., 1999; Khanna y col., 2001; Nair y col., 2002).

d Biodisponibilidad de polifenoles.

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes que se pueden obtener por la dieta. Se ha mostrado una considerable diversidad estructural, que influye la biodisponibilidad (Manach y col., 2004). Las propiedades biológicas de los polifenoles dependen de la cantidad consumida y la biodisponibilidad (Manach y col., 2005). La biodisponibilidad parece que difiere grandemente entre los diferentes polifenoles y el o los más abundante en la dieta no son necesariamente aquellos que alcanzan las más altas concentraciones de metabolitos activos en los tejidos específicos (Manach., 2004).

Ciertos polifenoles, son conjugados a glucuronidatos, sulfatos y grupos metilos en la mucosa del intestino delgado y tejidos adyacentes. Los polifenoles no conjugados no se han encontrado en plasma. Estas reacciones facilitan la excreción y limitan la toxicidad potencial. La epigallocatequingalato (ECTG) y epicatequingalato (ECG) se encuentran presentes en

plasma (la mayoría en forma libre), mientras que epicatequina y epigallocatequina se presentan como glucoronidatos y sulfatos conjugados. Muy poco es conocido sobre el índice metabólico y biodisponibilidad de taninos (Serrano y col., 2009). Datos recientes sugieren que beta-glucósidos y posiblemente una lactasa en el intestino delgado son capaces de hidrolizar flavonoides glucosilados y esos compuestos son absorbidos como agliconas libres y no como glucósidos intactos. Alrededor del 98% de los hidroxitirosoles están presentes en plasma y orina en forma conjugada, principalmente como glucoronidatos, sugiriendo un primer paso metabólico intestinal/hepático de las formas primarias ingeridas. El 3-*O*-glucoronido del hidroxitirosol muestra una fuerte actividad como secuestrador de radicales libres, más que el hidroxitirosol solo (Boskov-Hansen y col., 2002; Manach y col., 2005; Han y col., 2007b).

Por otro lado, los polifenoles que alcanzan al colon son metabolizados por la microflora en ácidos fenólicos de bajo peso molecular. Las concentraciones de metabolitos totales en plasma son de 0 a 4 $\mu\text{mol/L}$ con una ingesta de 50 mg equivalentes de agliconas y la excreción urinaria relativa se ha reportado en un rango de 0.3 a 43% de la dosis ingerida, dependiendo del polifenol (Manach y col., 2005). Las propiedades biológicas de derivados conjugados y metabolitos microbianos pueden ser esenciales para evaluar mejor los efectos en la salud de los polifenoles. Alternativamente, algunos de los efectos en la salud de los polifenoles podrían no requerir absorción a través de la barrera del intestino delgado. El ácido tánico y la catequina interactúan con el intestino delgado pero solamente la catequina parece ser capaz de atravesarlo. Además, hay evidencias de que proteínas endógenas del lumen intestinal ligan ácido tánico y catequinas. Esto podría limitar su absorción en el intestino (Carbonaro y col., 2001).

Las isoflavonas y ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido gálico) son los mejor absorbidos, seguido de las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina, pero con diferentes cinéticas. (Manach y col., 2005). El ácido elágico fue detectado en plasma humano a una concentración máxima de 31.9 ng/mL después de 1 h de ingestión (Seeram y col., 2004). La absorción de flavanoles como la catequina de té verde fue mayor cuando se administró como suplemento en forma de cápsulas que cuando fue consumida como bebida en ausencia de alimentos. Además, se encontró un pequeño pero significativo incremento en la actividad antioxidante en plasma cuando se administró en forma de cápsula comparado con los polifenoles que fueron consumidos como té negro o té verde (Chow y col., 2005).

La absorción del hidroxitirosol, compuesto fenólico que se encuentra en mayor proporción en aceite de oliva, es dosis dependiente del aceite de oliva. Se sabe que el hidroxitirosol administrado vía intravenosa se elimina más fácilmente en la orina (dentro de 24 h) que cuando es administrado vía oral. Se estima que la biodisponibilidad del hidroxitirosol cuando es administrado vía oral en una solución de aceite de oliva es de 99% (Tuck y col., 2001).

El jugo de los frutos de aronia (*Aronia melanocarpa*) rico en antocianinas (cianidina-3-galactósido antocianina mayoritaria) fue suministrado a trece voluntarios sanos (0.8 mg de antocianina/kg de peso corporal), antes y después del consumo del jugo se tomaron muestras de orina y sangre de cada individuo, en los análisis encontraron ocho derivados de cianidina después del consumo del jugo. La concentración máxima de antocianina en plasma fue de 2.9 nmol/h (después de 0.1 h del consumo del jugo). En orina la concentración fue de 5.0 nmol/h (alcanzada después de 1h de consumo) (Wiczowski y col., 2010).

Los taninos condensados o proantocianidinas no son absorbidos como tales en el intestino (Manach y col., 2005). En dos estudios de plasma humano se detectó la presencia de dímeros B1 y B2 de proantocianidinas (Sano y col., 2003; Holt y col., 2005). La absorción de esos dímeros fue 100 veces más baja que los flavanoles monoméricos (Holt y col., 2005). Sin embargo se encontró que esos compuestos tienen efectos directos sobre las mucosas intestinales y las protegen del estrés oxidativo o de las acciones anticarcinogénicas. Además, el consumo de alimentos ricos en proantocianidinas como cocoa, vino tinto, o extractos de semillas de uvas, incrementan la capacidad antioxidante en plasma y tienen efectos positivos sobre las funciones vasculares, reduciendo la agregación de plaquetas en humanos (Rios y col., 2002; Holt y col., 2005).

C FRUTILLAS

1 Generalidades

Las “*berries o frutillas*” pertenecen a una pequeña familia de cultivos de frutas de alto valor comercial por el sabor único, texturas y colores que presentan. Aparte del consumo en fresco, estos frutos son ampliamente utilizados en bebidas, helados, yogur, batidos de leche, mermeladas, jaleas y otros productos alimenticios (Byamukama y col., 2005; Pupponen-Pimiä y col., 2005; SAGARPA, 2009). Asimismo, estos frutos son utilizados ampliamente por el potencial beneficio que representan para la salud humana. Contienen una

gran cantidad de fitoquímicos con propiedades biológicas tales como: actividad antioxidante, anticarcinogénica, antineurodegenerativa y antiinflamatoria (Nishimura y col., 1991; Wang y Lin, 2000; Asami y col., 2003; Puupponen-Pimia y col., 2005; Duthie, 2007; Alwerdt y col., 2008; Burns y col., 2008, Szajdek y Borowska., 2008; Paredes-López y col., 2010). Un amplio número de estudios han mostrado que las propiedades benéficas a la salud que poseen este tipo de frutos se debe principalmente al alto contenido de diversos fitoquímicos que presentan como flavonoides (antocianinas y flavonas), taninos, ácidos fenólicos y ligninas (Seeram y col., 2006).

Las especies que se agrupan en esta familia de *“berries o frutillas”* son: arándano, arándano rojo, bayas, frambuesa, fresa, mora, grosellas y zarzamoras, entre otros. Las frutillas comprenden especies de diferentes géneros y constituyen la mayor parte de lo que se conoce comúnmente como frutales menores. Los géneros a los que pertenecen son: *Aronia*, *Fragaria*, *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*, otros (Szajdek y Borowska., 2008; Paredes-López y col., 2010; Shreckinger y col., 2010).

Arándano, mejor conocido en el mercado como blueberry por su nombre en inglés, pertenece al género *Vaccinium* sección *Cyanococcus* en la tribu *Vaccinieae* de la subfamilia *Vaccinioideae* y la familia *Ericaceae* (Stevens, 1969). Es considerado un fruto falso ya que deriva del ovario inferior, a diferencia de los frutos verdaderos que derivan del ovario superior. El fruto es una baya casi esférica y dependiendo de la especie o cultivar puede variar de 0.7 a 1.5 cm de diámetro. Cuando el fruto está inmaduro es de color verde, después rojizo púrpura y finalmente de color azul claro y hasta negro al llegar a la madurez. La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas que le dan una terminación muy atractiva. Dentro del género *Vaccinium* las especies más conocidas se agrupan según sus características de crecimiento y requerimientos agroclimáticos: en arbusto alto o highsbush (arbustivo del norte; *V. corymbosum* y arbustivo del sur; híbridos inter específicos) y arbusto bajo o lowbush (*V. angustifolium*) y ojo de conejo o rabbiteye (*V. ashei*) (Stevens, 1969).

Aronia, el género aronia mejor conocido como *black chokeberry*, *red chokeberry*, *wild gooseberry* es un fruto que fue utilizado por americanos nativos Pontawatomi, quienes con los frutos hacían té para tratar el resfriado; además para preparar un alimento nutritivo llamado “penmican” a base de grasa, carne seca en polvo y frutas del noreste de USA. Además, este fruto era utilizado como astringente. El género *Aronia* pertenece a la familia

Rosaceae y subfamilia Maloideae, el género incluye dos especies *A. melanocarpa* y *A. arbutifolia*. Estas plantas son arbustos de 90 a 180 cm de alto, con frutos púrpura que se desarrollan en racimos de 14 frutos sobre pedicelos rojos. Estos frutos son muy populares en las regiones de los grandes lagos en USA, Polonia, República Checa, Eslovaquia y Ucrania. En 1976 fue introducida a Japón. Las variedades más comunes utilizadas para comercialización son Viking, Nero y Aron (Kokotkiewicz y col., 2010).

Frambuesa es llamada *raspberry* en inglés. Es una planta que se desarrolla en zonas boscosas, es de fácil cultivo y tiene tendencia a extenderse a menos que se mantenga controlada, es una planta colonizadora y oportunista. El fruto es una polidrupa roja de sabor fuerte, dulce. Se dice que existen alrededor de 180 tipos de frambuesas que no han sido catalogadas (Asami y col., 2003). Este fruto pertenece a la familia *Rosaceae* y al género *Rubus*. Las variedades que se cultivan en nuestro país son importadas de Estados Unidos y en orden de importancia son: Mailing Autumn Bliss, Summit y las variedades de la compañía Driscoll's (Asami y col., 2003).

Maqui (*Aristotelia chilensis*) es un fruto de la familia Elaeocarpaceae, crece típicamente en suelos húmedos, bien drenados en el suroeste de Chile y Argentina. Es un fruto comestible púrpura/oscuro de 5 mm de diámetro con tres o cuatro semillas. Estos frutos han sido utilizados en la medicina tradicional para curar enfermedades de la garganta, dolor de riñón, úlceras, fiebre, hemorroides, inflamación, diarrea, lesiones y migraña (Bhakuni y col., 1976; Shreckinger y col., 2010).

Zarzamora es llamada *blackberry* en inglés. Las variedades que comúnmente se comercializan son un producto híbrido del cruzamiento entre varios *Rubus* nativos de Norteamérica y de Europa. En el género *Rubus* existen alrededor de 250 especies distribuidas prácticamente por todo el mundo. Las plantas del género *Rubus* (zarzamora y frambuesa) son taxonómicamente complejas, pues a menudo existen dificultades en la división de las especies y mientras algunos autores describen unas 700, otros reconocen sólo alrededor de 250. Las especies de *Rubus* suelen ser muy variables, aparentemente como resultado de la frecuente reproducción apomítica e hibridación. Los componentes mexicanos del género necesitan de una profunda revaloración debido al gran número de colectas que se han hecho recientemente. Las plantas son herbáceas o leñosas, a veces provistas de espinas, en ocasiones trepadoras; hojas casi siempre alternas, simples o compuestas, flores solitarias o dispuestas en

inflorescencias; usualmente actinomorfas y hermafroditas, estambres de 1 a 10 o más, libres o casi libres (Rzedowski y Calderón, 2005).

En México esta planta se encuentra de manera silvestre en los estados de Querétaro, Puebla, Jalisco, Hidalgo y Michoacán. En las áreas boscosas y templadas de Michoacán se ha encontrado en los municipios de la zona Tarasca, entre ellos Uruapan, Morelia y Nahuatzen (Rzedowski y Calderón, 2005). Pacheco (1975) describe la presencia de cuatro especies silvestres de zarzamora (*Rubus coriifolius* Liebm; *Rubus humintratus* Steud; *Rubus adenotrichos* Schlecht; *Rubus tricomallus* Schlecht).

2 Producción mundial y nacional de frutillas

En 2008, se registraron 1.8 millones de hectáreas de cultivos de frutillas y una producción mundial de 6.3 millones de toneladas de diferentes frutillas (arándano, frambuesa, fresa, zarzamora, entre otras). La fresa es la frutilla más importante en el mundo en términos de producción (4.3 millones de ton), Estados Unidos de Norteamérica es el productor principal (1.4 millones de ton) y contribuye con el 27.7% de la producción total. Otros países productores de frutillas a nivel mundial son Turquía (5.2%), Polonia (4.6%), España (4.4%), Rusia (4.2%), México (4.1%), Italia (3.9%), entre otros (**Cuadro 5**).

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial con una producción total de 233,041 ton. Los principales estados productores de frutillas en México son: Michoacán, Jalisco, Baja California, Guanajuato, Edo. de México, Hidalgo, Colima, Puebla, Nayarit y Morelos. Las principales frutillas que se cultivan en nuestro país son fresa, zarzamora, frambuesa y en los últimos años en algunos estados como Jalisco, Puebla y Edo. de México se ha cultivado arándano (**Cuadro 6**).

Cabe destacar que aun cuando la producción de fresa (233,041 ton) es el doble de la producción de zarzamora (115,960 ton), el valor comercial que alcanza la zarzamora es mucho mayor (\$1,953,475.00 vs \$2,781,955.00 respectivamente); aunque este fruto tiene un potencial más rentable para el productor mexicano (**Cuadro 6**). Además, los agricultores que comercializan estos frutos en fresco para el mercado internacional obtienen excelentes ganancias, ya que pueden alcanzar hasta un 300% más de lo que se logra exportando el producto congelado. Las exportaciones de frutillas mexicanas se realizan en el periodo de octubre a enero, este periodo representa una ventaja competitiva al país, debido a la escasa oferta mundial ya que los precios de los frutos alcanzan precios más altos (SAGARPA, 2009).

Cuadro 5. Producción mundial de frutillas.

País	Producción de frutillas (ton)				Otras* frutillas	Contribución (%)
	Arándano	Arándano rojo	Frambuesa	Fresa		
Afganistán					57,000	0.9
Alemania	4,116		5,334	150,854		2.6
Azerbaiyán		2,200	9,500			0.2
Bangladesh					24,000	0.4
Belarús		4,300				0.7
Canadá	95,516	72,688	11,825			2.87
China					45,000	0.7
Egipto				200,254		3.2
España			10,000	267,500		4.4
EUA	158,032	356,797	53,342	1,144,405	22,952	27.7
Rusia	1,600		110,000	145,000		4.1
Inglaterra			14,000			0.2
Irán					175,000	2.8
Italia	1,500			155,583	87,200	3.9
Japón				190,700		3.0
Corea				203,227		3.2
México	123		11,477	207,485	37,000	4.1
Nueva Guinea					125,000	2.0
Polonia	7,857		81,552	200,723	46,927	4.6
Serbia			84,299			1.3
Turquía				261,078	67,190	5.2
Ucrania			26,100			0.4
Vietnam					123,000	2.0
Otros	37,639	3,449	66,191	1,005,543	89,577	20.4
Total	306,383	439,434	483,620	4,132,352	899,846	100

Total de producción de frutillas = 6,261,635 ton. *Otras frutillas incluye: zarzamora (*Rubus fruticosum*), híbridos de *Rubus* × *loganobaccus*, (*Myrtus communis*); frutillas de diversas plantas del género *Ericaceae*. <http://faostat.fao.org>, 2010.

Cuadro 6. Producción nacional de frutillas.

Estado	Producción nacional de frutillas (ton)			
	Arándano	Frambuesa	Fresa	Zarzamora
Baja California Norte		2,875	82,087	
Baja California Sur			6,763	
Colima				1,448
Edo de México	3	225	5,459	340
Guanajuato			20,527	
Hidalgo		324		
Jalisco	1,408	6,743	3,267	1,604
Michoacán		3,356	114,784	112,310
Morelos				72
Nayarit				88
Puebla	184			
Otros	-	35.99	1543	98.94
Total	1,595.00	13, 558.99	233,041.30	115, 960.94
Valor comercial total (\$)	10,746.00	590,255.00	1,953,475.00	2,781,955.00

http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp,2010.

3 Compuestos nutracéuticos en frutillas

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar el contenido de compuestos presentes en frutillas y en especial los compuestos bioactivos de zarzamora (*Rubus* sp), frambuesa (*Rubus idaeus* L.), arándano (*Vaccinium* sp), fresa (*Fragaria ananassa*) y otros (Mass y col., 1991; Prior y col., 1998; Wang y col., 1997; Wang y Lin, 2000; Kalt y col., 2001; Clark y col., 2002). Debido a las condiciones climáticas, las frutillas frescas generalmente se encuentran disponibles para su consumo en diferentes épocas del año dependiendo de la región, sin embargo, la composición de compuestos bioactivos en frutas y vegetales son afectados por diferentes factores como prácticas culturales, condiciones de precosecha (clima, temperatura, humedad), maduración, manejo post-cosecha y procesamiento (Prior y col., 1998; Kalt y col., 1999; Kalt y col., 2001; Clark y col., 2002; Wang y Mazza., 2002; Singh y col., 2006). Se han observado variaciones considerables en este tipo de frutos (fresa, arándano, grosellas, frambuesas y zarzamora) en el contenido de compuestos bioactivos (Singh y col., 2006).

Las frutillas se caracterizan por tener una gran diversidad de compuestos fenólicos, el contenido de estos compuestos varía dependiendo del cultivar, condiciones de crecimiento, grado de maduración y manejo post-cosecha. La variabilidad podría deberse también a las diferentes metodologías utilizadas en los análisis (Duthie, 2007). Los compuestos fenólicos difieren en la estructura y peso molecular y son constituidos por ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y ácido cinámico), taninos, estilbenos y flavonoides tales como antocianinas, flavonoles y flavanoles (catequinas); la concentración de polifenoles normalmente es más alta en la epidermis que en la parte central de los frutos (Wang y Lin, 2000; Puupponen-Pimia y col., 2005; Szajdeck y Borowska, 2008). Se ha reportado un alto contenido de polifenoles en aronia (*Aronia melanocarpa*), arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubus fruticosum*) (**Cuadro 7**). Las antocianinas ocupan un lugar especial en el grupo de polifenoles presentes en frutillas. Se han observado altas concentraciones de antocianinas en aronia, arándano y zarzamora (**Cuadro 7**) (Naczk y Shahidi, 2004; Puupponen-Pimiä y col., 2005; Duthie, 2007; Szajdeck y Borowska, 2008; Paredes-López y col., 2010). El tipo de antocianinas varía en las frutillas y dependiendo de la especie es el tipo

de antocianina predominante en el fruto (**Cuadro 8**) (Wang y col., 2000; Szajdeck y

Cuadro 7. Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos totales de algunas especies de frutillas cultivadas en diferentes regiones del mundo.

Frutilla/especie	Antocianinas *(mg/100 g)	Fenoles totales **(mg EAG/100 g)	Ref.
Arándano (<i>Vaccinium corimbosium</i>)	18- 327	77 - 585	1, 2, 3, 4
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	87- 197	288 - 912	4
Arándano rojo (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	9	78	3, 5
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	311-461	2377	6,7
Frambuesa morada (<i>Rubus occidentalis</i>)	5 -197	267 - 512	7,8
Frambuesa roja (<i>Rubus idaeus</i>)	3 – 140	192 – 2116	8, 9,10, 11, 12
Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	24 - 84	16 - 280	13, 14, 15,16
Grosella roja (<i>Ribes rubrum</i>)	16 - 36	207- 418	19
Grosella espinosa (<i>Ribes hirtellum</i>)	2 – 43	1257 - 1321	18
Grosella morada (<i>Ribes nigrum</i>)	230 - 342	653 - 1155	18, 19
Uva (<i>Vitis vinífera</i> L.)	156.9	475	20
Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>)	66 - 256	417- 2349	4, 9, 17, 18, 19, 21

Los valores, son expresados como: ***antocianinas**: mg/100 g equivalentes de cianidina-3-glucósido peso fresco; **fenoles totales**: **EAG/g : equivalentes de ácido gálico/ 100 g de fruto fresco. ¹Grace y col., 2009; ²Karadeniz y col., 2009; ³Zhen y Wang, 2003; ⁴Sellapan y col., 2002; ⁵Wang y col., 2000a; ⁶Borowska y Szajdek, 2003; ⁷Skupien y Oszmianski, 2004; ⁸Wang y col., 2000b; ⁹Pantelidis y col., 2007; ¹⁰Anttonen y col., 2005; ¹¹Chanjirakuy y col., 2006; ¹²Deigton y col., 2000; ¹³Cheel y col., 2007; ¹⁴Vasco y col., 2008; ¹⁵Aaby y col., 2005; ¹⁶Rekika y col., 2005; ¹⁷Siriwoharn y col., 2005; ¹⁸ Pantelidis y col., 2006; ¹⁹Plessi y col., 2007; ²⁰Hogan y col., 2010; ²¹Acosta-Montoya y col., 2010.

Cuadro 8. Perfil de antocianinas de diferentes especies de frutillas.

Frutilla/especie	Perfil de antocianinas	Antocianina	
		dominante	Ref.
Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Dp-3-gal, Mv-3-gal, Mv-3-glu, Ml-3-ara, Dp-3-ara.	Mv-3-gal	1, 2, 3
Arándano (<i>Vaccinium angustifolium</i>)	Dp-3-gal, Dp-3-glu, Dp-3-ara, Cy-3-gal, Cy-3-gal, Cy-3-ara, Pt- 3-glu, Pn-3-gal, Pt-3-ara, Mv-3- gal, Mv-3-glu, Mv-3-ara, Dp-6- acetil-3-glu, Cy-6-acetil-3-glu, Mv-6-acetil-gal, Pt-6-acetil-3- glu, Mv-6-acetil-3-glu.	Mv-3-gal	2
Arándano rojo (<i>Vaccinium macrocarpum</i>)	Cy-3-glu, Cy-3-ara, Dp-3-ara, Pn-3-glu, Pn-3-ara.	Pn-3-gal	3
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	Cy-3-gal, Cy-3-glu, Cy-3-xil, Cy-3-ara, Pg-3-ara, Pg-3-gal.	Cy-3-gal	4
Baya (<i>Empetrum nigrum</i>)	Cy-3-glu, Cy-3-gal, Cy-3-glu, Cy-3-ara, Dl-3-ara, Dp-3-gal, Mv-3-ara, Mv-3-gal, Mv-3-glu, Pn-3-ara, Pn-3-gal, Pn-3-glu.	Pn-3-glu	5
Cerezo de Virginia (<i>Prunus virginiana</i>)	Cy-3-glu/gal, Cy-3-malonil-glu, Cy-3-rut, Cy-3,5-di-glu, Cy-3- <i>p</i> - coumaroil-glu, Dp-3-glu/gal, Dp- 3,5-di-glu, Pg-3-ara, Pg-3-glu, Pg-3-malil-glu, Pg-3-rut, Pg-3,5- di-glu, Pt-3,-acetil-di-glu.	NR	6,7
Frambuesa roja (<i>Rubus idaeus</i>)	Cy-3-sof, Cy-3-glu, Cy-3-glu- rut, Cy-3-rut, Cy-3,5-di-glu, Pg- 3-glu, Pg-3-sof.	Cy-3-sof	3, 8,9,10
Frambuesa morada (<i>Rubus occidentalis</i>)	Cy-3-glu, Cy-3-sam, Cy-3- xilossil-rut, Cy-3-rut, Pg-3-rut.	NR	3, 11

Fresa (<i>Fragaria X ananassa</i>)	Cy-3-glu, Cy-3-glu-malonato, Pg-3-glu, Pg-3-rut, Pg-3-glu-malonato, Pg-3-acetil-glu, Pg-3-malonil-glu.	Pg-3-glu	12
Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	Cy-3-sam, Cy-3-glu, Cy-3-sam-5-glu, Dp-3-glu, Dp-3-sam, Dp-3,5-di-glu, Dp-3-sam-5-glu.	Dp-3-glu	13, 14
Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i>)	Cy-3-ara, Cy-3-gal, Cy-3-glu, Dp-3-ara, Dp-3-gal.	Cy-3-gal	14
Uva (<i>Vitis vinifera</i> L)	Cy-3-glu, Cy-3-acetil-glu, Cy-3-(ρ -cumaroil)glu, Dp-3-glu, Dp-3,5-di-glu, Dp-3-(ρ -cumaroil)glu, Mv-3-glu, Mv-3-acetil-glu, Mv-3-(ρ -cumaroil)glu, Pn-3-glu, Pt-3-glu, Pt-3-acetil-glu.	Mv-3-glu	15
Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>)	Cy-3-glu, Cy-3-gal, Cy-3-ara, Cy-3-xil, Cy-3-rut; Cy-3-malonil-glu, Cy-3-dioxalil-glu, Dp-3-glu, Dp-3-xil, Pn-3-glu.	Cy-3-glu	3, 16, 17, 18, 19, 20

Cy: cianidina; Dp: delfinidina; Ml: malvidina; Pg: pelargonidina; Pn: peonidina; Pt: petunidina. ara: arabinósido; glu: glucósido; gal: galactósido; rut: rutinósido; sof: soforósido; sam: sambubiósido; xil: xilósido. NR: no reportado. ¹Szajdeck y Borowska., 2008; ²Grace y col., 2009; ³Seeram y col., 2006; ⁴Kokotkiewicz y col., 2010; ⁵Kellogg y col., 2010; ⁶Burns y col., 2008; ⁷Lopez da Silva y col., 2007; ⁸Beelwilder y col., 2005; ⁹McDougall y col., 2005b; ¹⁰Szajdeck y col., 2008; ¹¹Tiang y col., 2006; ¹²Aaby y col., 2005; ¹³Céspedes y col., 2010; ¹⁴Schreckinger y col., 2010; ¹⁵Cho y col., 2000b; ¹⁶Wang y Mazza, 2002; ¹⁷Stintzing y col., 2002b; ¹⁸Pergola y col., 2006; ¹⁹Mertz y col., 2007; ²⁰Dai y col., 2007.

Borowska, 2008). La antocianina que se encuentra en mayor concentración en zarzamora (*Rubus fruticosus*) es cianidina-3-*O*-glucósido (Wang y Jiao, 2000; Puupponen-Pimiä y col., 2005; Seeram y col., 2006; Elisia y col., 2007; Acosta-Montoya y col., 2010).

McGhie y Walton (2007) identificaron la presencia de cianidina-3-[2-(glucosil) glucósido] y cianidina-3-[2-(glucosil)-6-(ramnósido)glucósido] en zarzamora (*Rubus loganbaccus* y *Rubus baileyanus*) variedad Britt. Otros investigadores (Tian y col., 2006) identificaron una nueva antocianina (pelargonidina-3-rutinósido) en zarzamora (*Rubus occidentalis*) cultivada en Ohio, EUA. En frutos de arándanos (*Vaccinium ovalifolium*) silvestres de Alaska, se identificó la presencia de delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido y petunidina-3-galactósido (Kellogg y col., 2010). Diversas investigaciones de frambuesa morada han identificado y cuantificado la presencia de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiósido, cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-xilosilrutinósido (Maas y col., 1991; Wang y Mazza, 2002; Asami y col., 2003; Tian y col., 2006). Las frutillas son atractivas para el consumidor por el aroma y color característico, así como la presencia de cantidades considerables de micronutrientes como Cu, K, Mg, Mn, Na y Zn (**Cuadro 9**), y minerales como Ca, K y Mg (Plessi y col., 2007) se encuentran en mayor proporción. Asimismo se ha registrado la presencia de folatos (9 - 36 µg/250 gr fruto fresco), vitamina A (17 - 308 UI) y fibra (3 - 7.6 g/250g fruto fresco). Por otro lado, estudios previos han mostrado que algunos de estos frutos poseen pequeñas cantidades de carotenoides (Heinonnen y col., 1989). Los frutos de *Aronia melanocarpa* son fuentes ricas en carotenoides, los cuales alcanzan un promedio de 48.6 mg/kg de peso fresco. En estos frutos se han identificado licopeno, β-caroteno, ζ-caroteno, β-criptoxantina, luteína, 5,6-epoxiluteína, trans-violaxantina, cis-violaxantina y neoxantina así como vitamina B₁, B₂ y B₆ (Razungles y col., 1989; Kokotkiewicz y col., 2010). De la misma manera que el contenido de compuestos fenólicos, el ácido ascórbico también es (vitamina C, soluble en agua) importante en frutos y vegetales. El contenido de vitamina C en frutillas está determinado por diversos factores, incluyendo especie, variedad, condiciones de cultivo, estado de maduración, clima, región y tiempo (Prior y col., 1998; Deighton y col., 2000; Hakala y col., 2003). Los frutos de grosella negra son fuentes ricas de vitamina C dentro de las distintas especies de frutillas. También se ha reportado un contenido relativamente alto de vitamina C en fresas y aronia

Cuadro 9. Contenido de minerales (mg/100 g fruto seco) presentes en algunas especies de frutillas.

Frutilla/especie	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Arándano <i>(Vaccinium myrtillus)</i>	-	13.22	85.40	6.18	0.15	2.00	-
Frambuesa <i>(Rubus idaeus)</i>	42.15	1.98	201.68	33.88	0.46	2.31	1.08
Grosellas moradas <i>(Ribes nigrum)</i>	60.14	1.45	375.02	29.78	0.26	3.47	0.84
Grosellas rojas <i>(Ribes rubrum)</i>	44.39	1.56	291.44	21.92	0.22	4.44	0.52
Zarzamora <i>(Rubus fruticosus)</i>	46.32	1.61	195.05	33.44	0.60	4.72	0.55

Plessi y col., 2007

cultivadas en diferentes regiones del mundo (Hakala y col., 2003; Vasco y col., 2008; Kokotkiewicz y col., 2010) (**Cuadro 10**).

a Propiedades antioxidantes de frutillas

Los factores genéticos juegan un papel importante en la determinación de la capacidad antioxidante de los cultivos. Existen una gran variedad de genotipos en los distintos cultivos y por lo tanto existe la posibilidad de variabilidad genética en relación con la capacidad antioxidante. La influencia de la variedad en el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las frutillas del género *Vaccinium*, *Ribes*, *Rubus* y *Aronia* han sido estudiadas por un importante grupo de investigadores (Velioglu y col., 1998; Prior, 2003; Deighton y col., 2000).

La capacidad antioxidante de estos frutos en gran medida se ha atribuido a la presencia de fitoquímicos como compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, antocianinas, y otros flavonoides). Estos compuestos pueden actuar de forma independiente o en conjunto como agentes anticancer o cardioprotectores por una variedad de mecanismos.

Cuadro 10. Contenido de vitamina C en frutillas

Fruto/especie	Vitamina C (mg/100 g peso fresco)	Ref.
Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	12.4 -13.1	1
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	14.1	2
Arándano rojo (<i>Vaccinium macrocarpum</i>)	13.3	3
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	8.4 - 13.1	1, 3
Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i>)	15.4 - 37.7	4, 5,6, 7
Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	23.8 - 84.7	1, 7, 9,10
Grosella espinosa (<i>Ribes grossularia</i>)	20.3 – 25.4	8
Grosella negra (<i>Ribes nigrum</i>)	125.2 - 151.1	11
Grosella roja (<i>Ribes rubrum</i>)	17- 40.0	8, 11
Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>)	10.1 – 17.5	1, 8, 12

¹Benvenuti y col., 2004; ²Smith y col., 2004; ³USDA, 2011; ⁴Skupien y Oszmianski; ⁵De Ancos y col., 2000; ⁶Deighton y col., 2000; ⁷Haffener y col., 2002; ⁸Proteggente y col., 2002; ⁹Pantelidis y col., 2007; ¹⁰Hakala y col., 2003; ¹¹Vasco y col., 2008; ¹²Wang y Zheng, 2001.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a las propiedades óxido- reducción de estos compuestos y pueden desempeñar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres, desactivación de oxígeno singulete y triplete, o en descomposición de peróxido de hidrógeno (Deighton y col., 2000).

Diversos estudios han mostrado que las frutillas son una fuente importante de antioxidantes naturales (Sellapan y col., 2002; Chanjirakul y col., 2006; Pantelidis y col., 2007; Szajdek y Borowska., 2008). La capacidad antioxidante no solamente se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos, sino al efecto sinérgico entre estos y algún otro compuesto como vitaminas antioxidantes C y E, o β -caroteno. En el **Cuadro 11** se muestran los valores de las medias de la capacidad antioxidante de frutillas cultivadas en diferentes regiones del mundo utilizando el método ORAC; las frutillas de grosellas negras y zarzamora son las que proporcionan mayor capacidad antioxidante cuando son evaluados por este método (Mass y col., 1991; Kalt y col., 2001; Wang y Mazza, 2002; Singh y col., 2006). Wang y Lin (2000b) reportaron que el contenido de antocianinas en fresa se incrementa con el grado de maduración y el contenido de ciertos compuestos fenólicos disminuye; esto se refleja con la disminución de la capacidad antioxidante. En frambuesas, zarzamoras, grosellas y cerezas recolectadas en la región del Mediterráneo se evaluó la capacidad antioxidante de extractos metanólicos, encontrando que estos frutos poseen una alta capacidad antioxidante; esta actividad varía dependiendo del cultivar. Además, el contenido de algunos compuestos fenólicos disminuye lo cual se ve reflejado en la capacidad antioxidante, además se correlacionó positivamente con el contenido de polifenoles (Pantelidis y col., 2007). Deighton y col., (2000) evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes especies de *Rubus* silvestres colectadas en China y se reportaron valores desde 0 a 25.3 μmol equivalentes de Trolox/g de muestra (TEAC) o de 190 a 66,000 μmol de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).

Además encontraron que el ácido ascórbico contribuye mínimamente al potencial antioxidante de los jugos de los materiales evaluados, así como la existencia de una correlación lineal entre la capacidad antioxidante y los fenoles totales. El contenido de flavonoides totales en diferentes variedades de fresas (*Fragaria* spp) mostró una mejor correlación para el efecto de atrapar radicales libres que las antocianinas aisladas de dichos materiales (Cheel y col., 2007).

Cuadro 11. Capacidad antioxidante (ORAC) de diferentes especies de frutillas.

	ORAC (μmol ET/g)	Ref.
Arándano (<i>Vaccinum corimbosum</i>)	4.6 – 42.3	1, 2
Arándano (<i>Vaccinum myrtillus</i>)	44.6	1
Arándano rojo (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	8.2 – 18.5	3, 4
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	160.2	4
Frambuesa morada (<i>Rubus idaeus</i> Var. Jewel)	28.2	3
Frambuesa roja (<i>Rubus idaeus</i> Var. Autumn Blis, Canby, Sentry y Summit)	15.9 - 18.5	3, 5
Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	102 - 443.4	3, 6, 7
Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	45	8
Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i>)	1.2	8, 9
Uva (<i>Vitis vinífera</i> L)		
Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>)	14.8 - 555	3, 5, 6, 9, 10, 11,12, 13,14, 15

ORAC: Capacidad de absorber radicales oxígeno expresados como: micromol equivalentes de Trolox/g fruto fresco (μ mol ET/g). ¹Prior y col., 1998; ²Ehlenfeldt y Prior, 2001; ³Wang y Jiao, 2000a; ⁴Zheng y col., 2007; ⁵Pantelidis y col., 2007; ⁶Seeram y col., 2006; ⁷Zheng y col., 2007; ⁸Schreckinger y col., 2010; ⁹Vasco y col., 2009; ¹⁰Jiao y col., 2000; ¹¹Asami y col., 2003; ¹²Elisia y col., 2007; ¹³Dai y col., 2007; ¹⁴Vasco y col., 2008; ¹⁵Acosta-Montoya y col., 2010.

En frutos de frambuesa colectados en diferentes estados de maduración se ha observado que la actividad antioxidante varía durante el estado de desarrollo de los frutos. Algunas antocianinas, elagitaninos y proantocianidinas tipo taninos se sintetizan en diferentes etapas de la maduración, por lo que se sugiere que el contenido de compuestos promotores de la salud varía significativamente en frambuesa (Beekwilder y col., 2005). Por otro lado, en 11 cultivares de zarzamora colectados en Oregon, EUA se evaluó la actividad antioxidante determinada por la capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC) y el ensayo para reducir al hierro (FRAP), y se encontraron valores de 37.6 a 75.5 μmol equivalentes de Trolox y 63.5 a 91.5 μmol equivalentes de Trolox/g de muestra respectivamente (Siriwoharn y col., 2005). Una alta capacidad antioxidante (ORAC) se ha encontrado en extractos de frutos verdes de zarzamora y fresa así como en hojas; la frambuesa presentó mayor capacidad antioxidante en estado maduro (Wang y Lin, 2000b). Concentraciones de 8.11 a un máximo de 38.29 μmol de Trolox por gramo de muestra fueron reportadas para zarzamoras y arándanos colectados en Georgia, EUA; la capacidad antioxidante de estos frutos se atribuyó a la presencia de flavonoides, fenilpropanoides y ácidos fenólicos (Sellappan y col., 2002). Frambuesas colectadas en EUA fueron analizadas durante 14 días de almacenamiento y mostraron alta capacidad antioxidante expresada como capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC) (Chanjirakul y col., 2006).

b Efectos biológicos de compuestos nutracéuticos de frutillas

1) Efecto antiinflamatorio y analgésico

La inflamación se define como la primera respuesta del sistema inmune a las infecciones o a la irritación. La inflamación se caracteriza por la presencia de enrojecimiento, sensación de calor, hinchazón, dolor y disfunción del órgano afectado (Hotamisligil, 2006). En respuesta al daño del tejido u órgano, se inicia la activación de la cascada de señales químicas en diferentes células y órganos que preparan al organismo para proteger y aliviar la zona afectada. En este proceso se involucra la activación y migración de los leucocitos desde el sistema circulatorio al sitio o zona afectada. Se ha observado que periodos largos de inflamación son dañinos (Coussens y Werb, 2002; Hotamisligil, 2006), como en el caso de las enfermedades metabólicas. Gran número de mediadores de rutas metabólicas están relacionados con obesidad, diabetes; padecimientos que muestran las características clásicas de inflamación (Mantovani y col., 2008; Pan y col., 2008).

En algunos tipos de cáncer se presentan condiciones inflamatorias antes de que ocurran alteraciones malignas; en otros un cambio oncogénico induce un microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo de tumores (Mantovani y col., 2008). Estudios epidemiológicos han mostrado que la inflamación crónica predispone a los individuos a varios tipos de cáncer. Se estima que fundamentalmente las infecciones y respuestas inflamatorias son ligadas al 15-20% de todas las muertes por cáncer a nivel mundial. Existen muchos iniciadores de inflamación crónica que incrementan el riesgo de desarrollo de cáncer, por ejemplo: infecciones microbianas (infección con *Helicobacter pylori*, asociada a cáncer gástrico y linfoma de mucosas gástricas), enfermedades autoinmunes (inflamación del intestino, asociada con cáncer de colon) y condiciones de inflamación de origen desconocido (prostatitis, asociada con cáncer de próstata) (Mantovani y col., 2008).

Las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos son compuestos derivados del ácido araquidónico (ácido graso poliinsaturado). Los leucotrienos son formados por la acción de lipooxigenasas y las ciclooxigenasas que actúan como catalizadores de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Rodríguez-Téllez y col., 2001). La ciclooxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina H sintasa o prostaglandina endoperóxido sintasa, es una enzima bifuncional que unida a la membrana cataliza el paso limitante en la producción de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TX) (**Figura 8**), mediadores químicos en la inflamación y otros procesos. Se han identificado dos tipos de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2 (Süleyman y col., 2007; Rodríguez-Téllez y col., 2001; García-Lafuente y col., 2009). COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de las diferentes especies animales incluyendo el sistema gastrointestinal, hígado, riñón, musculatura lisa vascular y plaquetas (García-Lafuente y col., 2009). Las PGs derivadas de COX-1 se han considerado responsables de preservar funciones fisiológicas. COX-2 es una enzima limitante y es constitutivamente sobreexpresada en prácticamente todas las condiciones de inflamación y condiciones malignas y premalignas de células de colon, hígado, páncreas, mamas, piel, estómago, cabeza, cuello y esófago en respuesta a varios mitógenos, promotores de tumores, citocinas, factores de crecimiento y en respuesta a radiaciones UV (Khanapure y col., 2007; Nandakumar y col., 2008; García-Lafuente y col., 2009). En situaciones normales es indetectable en la mayoría de los tejidos y células, excepto en el riñón, placenta, cerebro y en

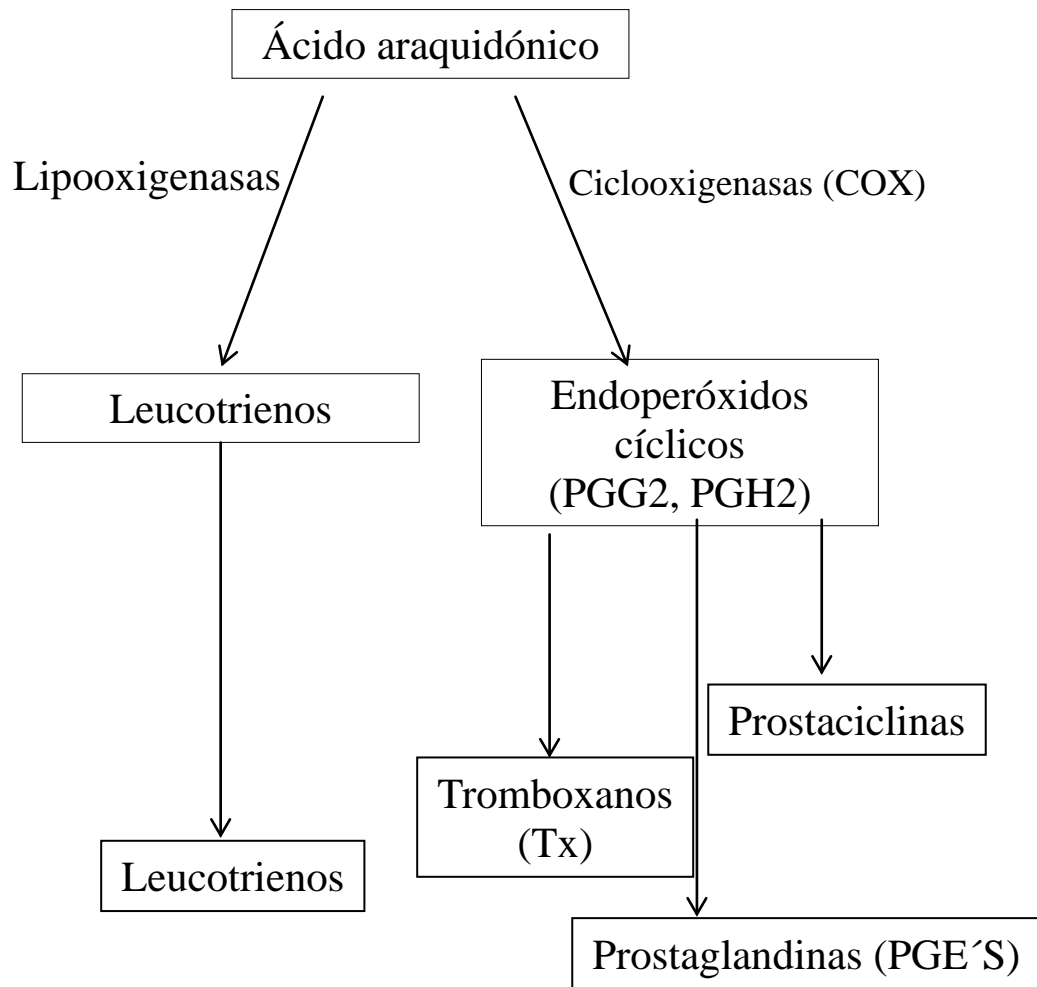


Figura 8. Metabolismo del ácido araquidónico

Rodríguez-Tellez y col., 2001

las plaquetas de nueva formación, en los que hay una expresión basal constitutiva, pero se expresa en respuesta a estímulos proinflamatorios (Rodríguez-Téllez y col., 2001). El mecanismo de acción por el que los antiinflamatorios no esteroideos ejercen sus efectos radica en la inhibición de las ciclooxigenasas (Guo-Shu y col., 2010).

Diversos extractos de frutos se han estudiado para comprobar el efecto antiinflamatorio (Wang y col., 1999; Seeram y col., 2006; Thole y col., 2006) y se ha observado que algunos extractos de zarzamora, frambuesa, arándano y fresa inducen apoptosis a través de la inhibición de la expresión de la enzima COX-2 en líneas celulares de cáncer de colon HT-29 (Seeram y col., 2006). Estándares de antocianinas y catequinas comerciales han mostrado una inhibición en la actividad de COX-1 y COX-2 a concentraciones de 100 y 50 μM , respectivamente, en líneas celulares de cáncer de mama, colon, hígado y del sistema nervioso central, sugiriendo que este tipo de compuestos pueden ser propuestos por su potencial beneficio a la salud (Seeram y col., 2003).

En extractos de zarzamora ricos en antocianinas inhibieron la actividad enzimática de COX-2 y actuaron como moduladores en la respuesta inmune de macrófagos activados vía inducción del factor de necrosis tumoral (Wang y col., 1999). En extractos de bayas de *Sambucus nigra* (bayas) a concentraciones de 10 $\mu\text{L/mL}$ de antocianinas se mostró una inhibición de la actividad de 87% y 86% de las enzimas COX-2 y COX-1, respectivamente (Thole y col., 2006). Por otro lado, Burns y col. (2008) reportaron variaciones en el efecto antiinflamatorio de extractos de frutillas (*A. alnifolia*, *V. trilobum*, *P. virginiana* y *S. argentea*) vía inhibición en la expresión de genes de COX-1 y COX-2 *in vitro*. Las diferencias encontradas entre estas frutillas pueden ser atribuidas a las variaciones en la naturaleza de sus constituyentes bioactivos y/o variación en la cantidad de aquellos constituyentes presentes en las muestras.

Diversos estudios han mostrado que la inflamación de varios tejidos es acompañada por una alta expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual es capaz de producir un exceso de óxido nítrico (ON) durante un tiempo prolongado. El óxido nítrico (ON) es una molécula biológica de señalización involucrada en una multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Por ejemplo: en condiciones fisiológicas normales el ON es producido por células endoteliales y es esencial para la regulación de la proliferación y relajamiento del músculo liso vascular, regulación de la presión sanguínea, además, participa

en la regulación de agregación de plaquetas, angiogénesis, trombosis, neurotransmisión, actividad antimicrobiana, regulación redox de la célula y apoptosis (Wu y col., 2004; Oviedo y col., 2005; Sharma y col., 2007). Sin embargo, como oxidante e inhibidor de enzimas que contienen centros hierro-azufre, el exceso de ON es perjudicial para los tejidos y funciones cardiovasculares. En los últimos años se ha mostrado que muchos factores dietarios afectan la salud y contribuyen a la patogénesis de enfermedades crónicas parcialmente a través de la modulación de síntesis de ON (Wu y col., 2004; Sharma y col., 2007; Ridnour y col., 2008). En muchas células de mamíferos, el ON es sintetizado de la L-arginina y O₂ por óxido nítrico sintasa (NOS) (EC 1.14.13.39). Existen tres diferentes isoformas identificadas de NOS (nNOS, iNOS o eNOS), las cuales son codificadas por diferentes genes y difieren en propiedades inmunológicas, catalíticas y moleculares, distribución celular, regulación de actividad y sensibilidad a inhibidores (Wu y Meiningner, 2002; Sharma y col., 2007; Reuter y col., 2010). nNOS (también conocida como tipo I, NOS-I o NOS-1) fue la primera que se identificó como constitutiva en tejido neuronal. iNOS (también conocida como tipo II, NOS-II o NOS-2) fue identificada como inducible por citosinas inflamatorias y lipopolisacáridos (LPS) en macrófagos y hepatocitos. eNOS (también conocida como como tipo III, NOS-III o NOS-3) fue originalmente identificada como constitutiva de células endoteliales vasculares. nNOS y eNOS son colectivamente denominadas constitutivas (cNOS). Sin embargo, todavía no está muy claro como puedan ser inducidas por diferentes y apropiados estímulos y mecanismos a nivel transcripcional y postranscripcional, y como puedan ser constitutivamente expresadas en algunos tejidos o células. Además, las tres isoformas pueden ser encontradas en el citosol o en compartimentos particulares de la célula o en ambos (Bredt, 1999; Alderton y col., 2001; Kleinert y col., 2003).

En células de cáncer humano de vejiga, próstata, boca y esófago se ha encontrado un incremento de la expresión de iNOS y menos consistente en estómago, colon y mama (Bredt, 1999; Chung y col., 2001; Crowell y col., 2003). Extractos ricos en fenoles, antocianinas y proantocianidinas de *Aristotelia chilensis* y *Vaccinium floribundum* mostraron un efecto inhibitorio en la producción de ON y expresión de iNOS (Schreckinger y col., 2010).

2) Efecto antidiabético

La enzima aldosa reductasa (EC 1.1.1.21) cataliza la reacción de reducción de glucosa a sorbitol e incrementa la producción de sorbitol en un estado diabético hiperglicémico debido a

que el nivel del sustrato es elevado. Esta síntesis elevada de sorbitol se ha ligado a complicaciones microvasculares diabéticas como retinopatía, neuropatía y nefropatía. Por lo tanto, la inhibición de aldosa reductasa es un mecanismo antidiabético reconocido (Nishimura y col., 1991). Los terpenos encontrados en extractos de frutillas (*Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginiana* y *Shepherdia argentea*) nativas de Norte América han mostrado una fuerte inhibición de aldosa reductasa. Además, una fracción de acetato de etilo de dichas frutillas presentaron compuestos como carotenoides, que también inhibieron la enzima aldosa reductasa, lo cual podría sugerir a estos frutos como fuentes potenciales de compuestos nutraceuticos, inhibiendo la enzima aldosa reductasa y por esta vía proteger contra las complicaciones diabéticas (Burns y col., 2008). Por otro lado, un extracto de arándano (*Vaccinium angustifolium*) rico en antocianinas (malvidina-3-glucósido, presente en mayor proporción) provocó una disminución de los niveles elevados de glucosa en sangre de ratones diabéticos tipo 2, esto es importante para mitigar los síntomas de la hiperglicemia (Grace y col., 2009).

Los taninos pueden actuar en la diabetes mediante dos vías: (i) disminuyendo los niveles de glucosa al retrasar la absorción de glucosa intestinal y la insulina como un efecto en tejidos sensibles a la insulina y (ii) retrasando el inicio de la diabetes mellitus dependiente de insulina por la regulación del medio ambiente antioxidante de las células pancreáticas- β . Los extractos de varias plantas ricos en taninos han mostrado una efectiva capacidad inhibitoria efectivos de enzimas intestinales. La inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa ha sido reportada por varios autores (Matsuoka y col., 1977). En extractos de frambuesa y fresa se ha reportado efecto inhibitorio de amilasas pancreáticas y saliva, la alta inhibición de α -glucosidasa se atribuyó a la presencia de antocianinas, mientras que la inhibición de la actividad de α -amilasa se atribuyó a las cantidades apreciables de taninos solubles (McDougall y col., 2005b).

3) **Efecto antibacteriano, antiparasitario y antiviral**

El uso de una gran diversidad de plantas en la medicina tradicional para el tratamiento de diarrea en el mundo es muy conocido. Fracciones de elagitaninos de mora ártica (*Rubus chamaemorus* L.) y frambuesa inhibieron eficientemente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Puupponen-Pimia y col., 2004). Jugos de frambuesa y grosellas negras (*Rubus nigrum* L.) mostraron una importante actividad antibacteriana contra diferentes especies de *Enterococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus* (Cavanagh y col., 2003). La adhesión de bacterias a las superficies de las mucosas intestinales es considerada un prerequisite muy importante para la colonización e infección y se ha demostrado que las frutillas tienen un efecto antibactericida debido a la actividad antiadherente. Jugos de arándano rojo han mostrado un efecto antiadherente en uroepitelio e inhibición del crecimiento de *E. coli* (Ofek y col., 1991; Reid y col., 2001). Se ha demostrado que esta actividad se debe a la presencia de proantocianidinas en el jugo de arándano rojo (Reid y col., 2001; Reed y col., 2003). Reed y col. (2003) compararon proantocianidinas de arándano rojo y de otros frutos (uvas, manzanas), encontrando que solamente el jugo de arándano rojo tenía actividad antiadherente en las vías urinarias humana después del consumo.

Extractos de epicatequina aislada de *Rubus corifolius silvestre* han mostrado propiedades anti-giardia *in vitro*, una actividad 8 a 10 veces mayor comparada con controles positivos como metronidazol y emetina; por otro lado, el camferol mostró una actividad similar a los controles, lo cual sugiere que estos extractos crudos o fracciones de esta especie silvestre de *Rubus* pueden ser utilizados para el desarrollo de medicamentos naturales, para combatir este tipo de infección (Barbosa y col., 2006). La utilización de compuestos fenólicos de frutillas como agentes antimicrobianos ofrece muchas oportunidades para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica. El desarrollo de medicamentos alternativos a partir de compuestos de frutillas para la prevención y control de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos es un tema muy importante de investigación en el futuro (Paredes-López y col., 2010).

4) **Efecto antimutagénico de frutillas**

Diversos sistemas *in vivo* e *in vitro* han sido utilizados para determinar el potencial antimutagénico y anticarcinogénico de frutillas, así como la identificación de sus principales

componentes (Duthie, 2007). En un estudio se evaluaron jugos de fresa, arándano y frambuesa fueron evaluados para conocer su habilidad para inhibir la mutación por mutágenos directos como metilmetanosulfonato (MMS) y el procarcinógeno benzopireno. El jugo de fresa mostró una inhibición significativa de mutagénesis (37%) y carcinogénesis (76%) causada por ambos carcinógenos, las otras especies fueron menos efectivas (Smith y col., 2004). La eficacia de la inhibición parece ser altamente dependiente de la especie y de la variedad de frutilla (Duthie, 2007). El jugo y diversos preparados de zarzamora de diferentes cultivares redujeron mutagénesis (90%) inducida por 2-aminoantraceno en bacterias (Tate y col., 2003; Tate y col., 2006).

En otro estudio se analizaron ocho cultivares de zarzamoras para la identificación de la habilidad de inhibir mutaciones inducidas con irradiación UV por medio de un ensayo de Ames. Todos los materiales fueron cultivados y cosechados bajo las mismas condiciones. Se encontró que dos de ellos inhibieron fuertemente la mutagénesis, dos no tuvieron efecto sobre los niveles de mutación y los cuatro restantes tuvieron efecto intermedio (Tate, 2006). El ensayo de Ames es un buen indicador del potencial mutagénico *in vivo* e *in vitro*, con un 90% de correlación entre una respuesta positiva en el ensayo y carcinogenicidad en modelos animales (Mortelans y Zeiger, 2000; Tate y col., 2003; Tate, 2006; Duthie, 2007).

5) Efecto anticarcinogénico

Es debidamente aceptado que el consumo de una dieta alta en alimentos de origen vegetal está asociada con una disminución de riesgos de cáncer (Shureiqi y col., 2000; Tate y col., 2003; Duthie, 2007; Alwerdt y col., 2008). Extractos y fitoquímicos individuales de frutillas pueden actuar y alterar la estabilidad genómica de un número de puntos subsecuentes de transformaciones malignas, modulando la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Diversos sistemas *in vivo* e *in vitro* han sido utilizados para determinar el potencial antimutagénico y anticarcinogénico de estos frutos y sus principales componentes (Duthie, 2007).

En fracciones de extractos de arándanos silvestres (*Vaccinium angustifolium* Ait.) colectados en EUA y algunas regiones de Europa se han identificado inhibidores de topoisomerasa, dichos inhibidores constituyen una clase de agentes quimopreventivos que inhiben la vía de carcinogénesis, su acción antiproliferativa y diferenciación celular (Alwerdt y col., 2008). Muchos agentes quimopreventivos han demostrado ser inhibidores catalíticos de

topoisomerasa II, la cual provee una estrategia muy útil para seleccionar agentes quimopreventivos que pueden ser efectivos en los estados de promoción y progresión de células cancerígenas. Especialmente la topoisomerasa II ha emergido como un quimopreventivo clave para un diverso grupo de agentes antitumorales (Cho y col., 2000a; Shureiqi y col., 2000). Cuando las células diferenciadas expresan bajos niveles de topoisomerasa II, y las células tumorales altos niveles, comúnmente expresan de 25 a 300 veces niveles más altos que aquellos de las células quiescentes (Cho y col., 2000a). Diversos ensayos se han desarrollado para evaluar la habilidad de un compuesto que module eventos bioquímicos de los cuales se presume que está ligado a carcinogénesis (Shureiqi y col., 2000). El resveratrol es uno de los agentes quimopreventivos que tiene efectiva inhibición de la actividad catalítica de topoisomerasa II en mamíferos (Cho y col., 2000a).

A mediados de 1980 se reportó que el ácido eláxico (polifenol) inhibe tumores de esófago inducidos por carcinógenos químicos en ratas, cuando es administrado en sus dietas (Wildman, 2001). Se ha estimado que la ingesta de antocianinas en dietas de países desarrollados excede los 200 mg/día. Las antocianinas son abundantes en frutillas, alcanzando concentraciones de 10 g/kg en algunos cultivares. Sin embargo, las antocianinas pueden modificar biomarcadores de cáncer *in vitro*, disminuyendo el daño del ADN en células normales en humanos y también inhiben el crecimiento de células cancerígenas en cultivos celulares (Shureiqi y col., 2000; Cho y col., 2000). Diversos estudios han reportado el efecto antiproliferativo de extractos, fracciones, antocianinas o proantocianidinas de frutillas sobre células de cáncer de colon humano, células de la cavidad oral y piel (Jang y Pezzuto, 1998; Kuo y col., 2002; Pozzo-Guisado y col., 2004; Gossé y col., 2005; Han y col., 2007). Estudios histopatológicos extensivos en ratas alimentadas con una dieta incluyendo 5-10% de frambuesa y fresa liofilizada por un periodo de nueve meses, no mostraron cambios en ningún órgano o tejido y presentaron una reducción de 10% de colesterol en sangre (Stoner, 2007). Extractos de frambuesas probados a una concentración ≥ 20 mg/mL tuvieron fuerte actividad inhibitoria en relación al control ($p < 0.01$), sobre células cancerígenas humanas de hígado HepG₂ (Liu y col., 2002). Células de cáncer de colon humano (Caco-2) fueron tratadas con jugo de aronia (*A. melanocarpa*) rico en polifenoles y se observó un efecto antiproliferativo *in vitro*; además, se detectaron cambios en los niveles de ARNm en diversos marcadores típicos

de tumores de cáncer de colon y proteínas involucradas en la proliferación y ciclo celular las cuales pueden estar asociados con el tratamiento (Bermúdez-Soto y col., 2007).

6) Otros efectos bioactivos

Diversos extractos de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpum*) modulan la actividad de enzimas producidas por patógenos periodontales y bacterias cariogénicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*) (Bodet y col., 2006). Extractos fenólicos de frutillas como *Aristotelia chilensis* y *Vaccinium floribundum* inhiben la acumulación de lípidos y la adipogénesis (Schreckinger y col., 2010). Céspedes y col., (2010) reportaron que un extracto metanólico de *Aristotelia chilensis* (10 ppm/kg de peso) protege el corazón de daños inducidos por reperfusión en ratas.

A pesar de que las frutillas contienen una gran variedad de fitoquímicos con propiedades biológicas y efectos benéficos a la salud humana; especialmente como actividades antioxidantes, antimicrobiana, anticarcinogénicas, antineurodegenerativas y antiinflamatorias es difícil que se consuman en países subdesarrollados ya que estos frutos son de muy alto costo para el consumidor (Seeram y col., 2006; Duthie, 2007). Por lo que, es necesario estudiar los materiales silvestres y mejorados con los que actualmente cuenta nuestro país, para desarrollar variedades que permitan reducir costos de producción y por lo tanto, los costos para los consumidores.

III. JUSTIFICACION

Los fruto de zarzamora, a menudo denominados zarzas o moras, pertenecen a la familia de las rosáceas género *Rubus*. Estas frutillas son ricas en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (antocianinas), ácidos fenólicos y taninos. Numerosos estudios han mostrado que estos compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes así como una gran diversidad de funciones biológicas como antidiabéticas, anticancerígenas, antineurodegenerativas, antiinflamatorios entre otras.

Los descubrimientos de los beneficios en la salud de este tipo de frutos han impulsado al rápido crecimiento de la producción de arándanos, frambuesa, fresas y zarzamora para los mercados nacionales e internacionales como productos frescos, procesados y con propósito nutracéutico.

Para satisfacer el mercado mundial en expansión, los cultivares de frutillas con características diferentes que respondan a las demandas de los mercados como productos frescos y de procesamiento se hace necesario la implementación de estudios que contribuyan a conocer el potencial de las frutillas que se desarrollan en nuestro país.

En diferentes regiones de México se ha identificado una gran cantidad de genotipos silvestres de zarzamora que no han sido estudiados de manera extensiva, y actualmente en el programa de fitomejoramiento de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana se ha obtenido una selección avanzada de zarzamora a través de cruza tradicionales con la finalidad de liberar la primera variedad de zarzamora de origen mexicano en un futuro cercano. Sin embargo, en estos estudios no se ha tenido en consideración el efecto que tienen factores como el genotipo, localidad de siembra y condiciones de estrés sobre las características nutracéuticas que podrían impactar de manera directa sobre la calidad del fruto de zarzamora.

Por ello es importante generar nuevas variedades de zarzamora, que combinen los mejores atributos agronómicos, fisicoquímicos, valor nutricional y nutracéutico de las zarzamosas comerciales, silvestres y mejoradas existentes y sería deseable tomar en consideración la información generada en la presente investigación.

De esta manera generar variedades de zarzamosas que puedan ser accesibles a la población mexicana y éstas puedan también ser más atractivas al consumidor internacional para generar nuevas alternativas para productores de frutos.

IV. OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial alimentario y nutracéutico de una colección de zarzamoras silvestres y mejoradas de las regiones boscosas de Michoacán y compararlo con materiales comerciales.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Realizar análisis proximal de algunas zarzamoras cultivadas en México.
- 2 Establecer un método eficaz para aislamiento, separación y caracterización de polifenoles de zarzamoras cultivadas en México utilizando la combinación de tecnología de adsorción (resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20) con técnicas de HPLC y LC-ESI-MS.
- 3 Obtener extractos metanólicos crudos, ricos en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas de una colección mexicana de zarzamoras silvestres y mejoradas cultivadas en México.
- 4 Determinar y caracterizar antocianinas y proantocianidinas en los extractos (EP, ERA y EPA) de zarzamoras por HPLC y LC-ESI-MS y MS/MS.
- 5 Evaluar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de extractos crudos, ricos en polifenoles, ricos en antocianinas y ricos en proantocianidinas.
- 6 Evaluar la actividad antimutagénica de extractos ricos en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas (EP, ERA y EPA) de zarzamora.
- 7 Evaluar las inhibición de las respuestas pro-inflamatorias (producción ON y PG₂ y expresión de COX-2 e iNOS) con extractos (EP, ERA y EPA) de zarzamora en macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolisacáridos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1. Colecta de frutos de zarzamora

Una colección de seis genotipos de zarzamora (*Rubus* spp.), cuatro genotipos de zarzamora silvestres, una variedad comercial y una línea mejorada se utilizaron para la realización de este estudio. Los frutos de zarzamora silvestre (ZS-11, ZS-10, ZS-3, ZS-7) se recolectaron en la primavera de 2008 en Uruapan, Michoacán, México. Los frutos de zarzamora comercial (variedad “Tupy”) se cosecharon en el invierno de 2008, en la localidad de Los Reyes, Michoacán, México. Los frutos de la línea mejorada (UM-601) fueron proporcionados por el Laboratorio de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, México y se cosecharon en el invierno de 2008. La línea mejorada se seleccionó por su color y sabor a través de un programa de fitomejoramiento para desarrollar cultivares superiores adaptados a las condiciones de medio ambiente de Michoacán y otras localidades del centro de México. Después de las colectas las frutillas se limpiaron, lavaron y almacenaron en congelador (-80 °C) durante 24 h y posteriormente se liofilizaron. Finalmente, se empacaron en bolsas de polietileno y se almacenaron (-20 °C) hasta su uso.

2. Materiales químicos y biológicos

Estándares comerciales de antocianinas y proantocianidinas y otros flavonoides se utilizaron para la caracterización de los polifenoles. Los estándares de antocianinas (cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina y malvidina glucósidos) se obtuvieron de los Laboratorios Polyphenols (Sandness, Norway) y los monómeros de proantocianidinas (incluyendo catequina y epicatequina), dímeros, camferol, quercetina y glucósidos de mirecetina de Chromadex (Laguna Hills, CA, EUA); el piruvato de sodio (100 mM), penicilina (1000 unidades/mL), estreptomina (1000 unidades/mL), nitrito de sodio, N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato, y el LPS de *Escherichia coli* O55:B5 fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), así como el NADP, GDP y el 1-NP. *Salmonella typhimurium* YG1024 fue proporcionada por el Dr. Takehiko Nohmi de la división de genética y mutagénesis, Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, Japón. El Oxoid No 2 fué de Oxoid LTD., Hants, England. El medio DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) y los macrófagos murinos RAW 264.7 se compraron en American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA,

EUA) y el suero fetal bovino (FBS) en Gibco BRL (Rockville, MD, EUA), los anticuerpos monoclonales (COX-2, iNOS) en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) , el anticuerpo secundario conjugado anti-raton IgG peroxidasa de rábano en GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) y el kit monoclonal- de prostaglandinas E2 (No. 414010), Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA. Todos los otros reactivos químicos utilizados se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) a menos que se especifique.

B MÉTODOS

1 Composición proximal de los frutos de zarzamora

Se utilizaron métodos de la AOAC (1999) para evaluar la composición proximal: secado a 105 °C por 24 h para humedad (método 925.098); incineración a 550 °C para cenizas (método 923.03); desgrasado en equipo Soxhlet con éter de petróleo (método 920.39 C) y microKjeldhal para proteína (método 960.52). El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia del total de muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2 Preparación de los extractos de los frutos de zarzamora

El proceso utilizado para preparar fracciones enriquecidas de antocianinas y proantocianidinas en frutos de zarzamora se ilustra en la **Figura 9**.

a Extracto crudo (EC)

Para la extracción de los compuestos fenólicos en zarzamora se utilizó el método descrito previamente por Burns y col. (2008). Se tomaron 10 g de cada muestra y se mezclaron con disolución de 100 mL de metanol al 80% (v/v) durante 24 h a 4 °C, la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se recolectó y se almacenó a 4 °C. El proceso de extracción se repitió dos veces como se describió anteriormente. Todos los sólidos se recolectaron y los solventes se evaporaron en un rotavapor Büchi R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a controlador de vacío V-850 (Büchi Corp, New Castle, DE, EUA). Los extractos crudos de zarzamora obtenidos se liofilizaron y almacenaron a – 20 °C hasta su utilización. Las extracciones de muestras de cada genotipo de zarzamora se realizaron por triplicado.

b Extractos concentrados de polifenoles (EP)

Para la obtención de extractos concentrados de polifenoles (EP) se utilizó la metodología propuesta por Grace y col. (2009) con algunas modificaciones. 100 g de zarzamora liofilizada

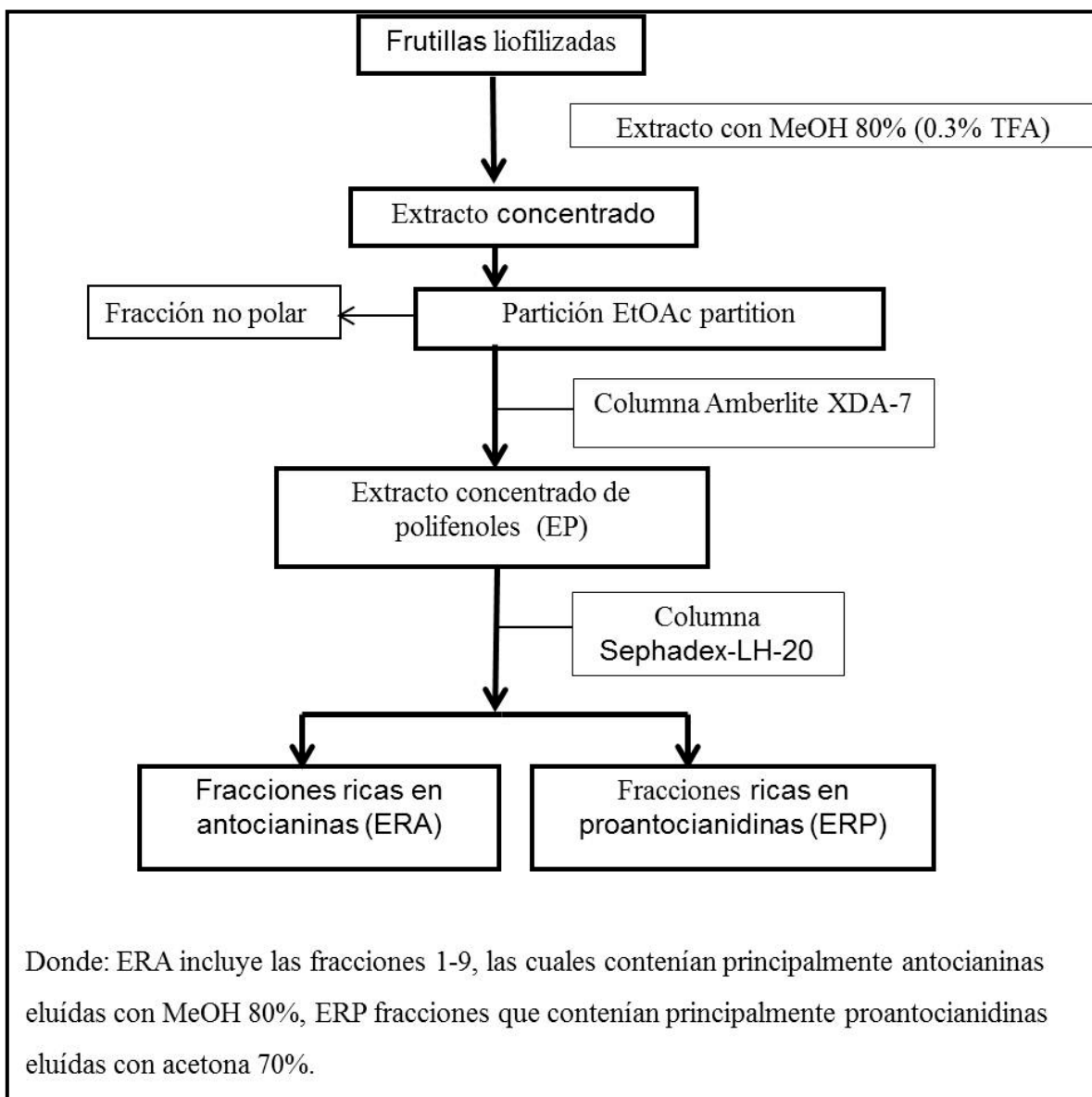


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento para obtener los extractos concentrados en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas a partir de zarzamora liofilizada.

se mezclaron en un frasco con 500 mL de metanol al 80% acidificado [0.3% de ácido trifluoroacético (ATA) (1:5, p/v)] y se filtró tres veces a través de capas múltiples de algodón para separar el pigmento púrpura de la pulpa. La mezcla resultante se filtró primero en papel Whatman's # 4 y luego con papel #1 (Florham Park, NJ, EUA en condiciones de oscuridad. El extracto hidroalcohólico colectado se concentró por evaporación rotatoria < 40 °C para remover el metanol. El concentrado acuoso restante se diluyó con acetato de etilo (4 : 120 mL) para remover los compuestos liposolubles y el extracto fue de nuevo concentrado para remover el acetato de etilo. La fracción acuosa (~120 mL) se aplicó en la parte superior de una columna cromatográfica (30 X 10 cm, Vineland, NJ, EUA) empacada con resina Amberlite XDA-7 (tamaño del grano, 20-60 mesh, Sigma Life Science, CO, EUA), previamente acondicionada con agua acidificada (0.3% ATA), donde la mezcla de polifenoles se adsorbió y se lavó en agua acidificada (0.3% ATA) para remover los azúcares libres, pectinas y otras impurezas. El extracto de mezcla de polifenoles (EP) se eluyó de la columna con metanol acidificado (1000 mL) como fase móvil. El metanol se evaporó en un rotavapor Büchi modelo R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a un controlador de vacío V-850 (Büchi Corp) y posteriormente se liofilizó utilizando una liofilizadora modelo VL-61010 (Labconco Inc., Kansas City, MO, EUA) para asegurar que los restos de humedad fueran removidos, y finalmente los extractos ricos en polifenoles (EP) se almacenaron en botellas de vidrio color ámbar en congelador (- 20 °C) hasta su uso. Las extracciones de muestras de cada genotipo de zarzamora se realizaron por triplicado.

c Extractos de antocianinas (ERA) y proantocianidinas (ERP)

La extracción de antocianinas se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Grace y col. (2009) con modificaciones menores. Extractos ricos en polifenoles (2.0 g) se disolvieron en 5 mL de metanol al 80 % (v/v) con sonicación para facilitar la disolución y después se aplicaron a la parte superior de una columna cromatográfica empacada con resina Sephadex-LH-20 (3 X 30 cm), previamente preacondicionada con una disolución de metanol [80% (v/v), 0.3% ATA]. Se utilizaron dos sistemas de disolventes para eluir los compuestos polifenólicos de la columna Sephadex: metanol [80% (v/v), 0.3% ATA] y acetona [70% (v/v)]. Un total de 12 fracciones (50 mL cada una) se colectaron, iniciando cuando el material púrpura comenzó a eluir de la columna. Las primeras nueve fracciones fueron ricas en antocianinas (ERA) y se utilizó metanol [80% (v/v), 0.3% ATA] como fase móvil para eluir el

extracto rico en antocianinas. Para eluir las fracciones ricas en proantocianidinas (EPA) de la columna Sephadex-LH-20 se utilizó como fase móvil acetona [70% (v/v)]. Los solventes orgánicos de todas las fracciones se evaporaron con un rotavapor Büchi modelo R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a un controlador de vacío V-850 (Büchi Corp.) y posteriormente se liofilizaron utilizando una liofilizadora modelo VL-61010 (Labconco Inc., Kansa City) y finalmente, ambos extractos ricos en antocianinas (ERA) y en proantocinidinas (ERP) se almacenaron en botellas de vidrio color ámbar en un congelador (- 20 °C) hasta su uso. Las extracciones de muestras de cada genotipo de zarzamora se realizaron por duplicado.

3 Caracterización y cuantificación de compuestos polifenólicos de zarzamora

a Análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de antocianinas y proantocianidinas

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) con un detector de arreglo de diodos, inyector automático, columnas de compartimiento a temperatura controlada y software ChemStation 3D para el procesamiento de datos. La separación de antocianinas y proantocianidinas se realizó con una columna de fase reversa Supelcosil LC-18 (250 mm x 4.6 mm, 5µm; Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Un gradiente de elución de la fase móvil para antocianinas consistió en 5% de ácido fórmico en agua grado HPLC (A) y 100% metanol (B). El flujo (1 mL/min) fue constante durante el análisis de HPLC, con un gradiente de paso de 10, 15, 25, 30, 60, 10, y 10% de solvente B a 0, 5, 15, 20, 25, 45, 47, y 60 min, respectivamente, a una temperatura constante de 25 °C. Para proantocianidinas, la fase móvil consistió de 5% y 0.1% de ácido fórmico en agua grado HPLC (A) y 5 agua grado HPLC y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). Como gradiente de paso se utilizó 0, 5, 30, 60, 90, 90, y 0% de solvente B a 0, 40, 45, 50, 55, 60, y 70 min, respectivamente. Las muestras de cada extracto de zarzamora se prepararon disolviendo 5 mg en metanol (1 mL) y se filtraron a través de filtro de nylon 0.22 µm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) y posteriormente se inyectaron 10 µL al sistema de HPLC. Tres concentraciones de cianidina-3-*O*-glucósido o catequina se prepararon como estándares externos para antocianinas y proantocianidinas, respectivamente, a 1.0, 0.5 y 5.0 mg/mL, donde se inyectaron 10 µL. La cuantificación de las

antocianinas y proantocianidinas se llevó a cabo con el área bajo la curva obtenida a 520 y 280 nm, respectivamente. Todos los extractos de zarzamora se analizaron por duplicado.

b Análisis por espectrometría de masas (LC-ESI-MS) de antocianinas y proantocianidinas

Los análisis de LC-MS se llevaron a cabo con un espectrómetro de masas, LCQ Deca XP (Thermo Finniga Corp., San José, CA, EUA), MS versión 1.3 SRI, la ionización por electrospray (ESI) se llevó a cabo en el modo de ion positivo (m/z 200-2000) con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) (200-600 nm), versión 1.2 inyector automático y un software Xcalibur para el procesamiento de datos. El voltaje de pulverización fue de 10 kV y la temperatura de capilaridad de 250 °C. La separación en HPLC se llevó a cabo en una columna de fase reversa C-18 (150 mm, 2.1 mm diámetro interno, 5 μ m tamaño de partícula, 90 Å) (VYDAC, Western Analytical, Murrieta, CA, EUA). El análisis de LC-MS se llevó a cabo utilizando la misma fase móvil y gradientes descritos anteriormente (análisis de HPLC), con 0.1 % de ácido fórmico, flujo de 200 μ L/min y volumen de inyección de 5 μ L por muestra o estándar. La temperatura de la columna y las muestras se mantuvieron a 20 °C. El análisis de LC-MS/MS se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción asistida por matriz (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Los datos de MS/MS se obtuvieron a través del software MassLynx versión 4.0. Se disolvieron estándares comerciales como referencia (0.25 mg/mL) y muestras (5 mg/mL) en 1 mL de metanol al 100% y se filtraron [filtros de 0.22 μ m de politetrafluoroetileno (PTFE)] antes de inyectarse en el HPLC y LC-MS para comparar los tiempos de retención y valores m/z de los polifenoles en todos los extractos y fracciones.

4 Contenido de polifenoles totales

Para determinar la concentración de fenólicos totales de los extractos de zarzamora se utilizó el método colorimétrico modificado de Folin-Ciocalteu descrito por Nurmi y col. (1996). Brevemente, disoluciones diluidas apropiadas de extractos (50 μ g/mL) se mezclaron con 0.5 mL 1N del reactivo de Folin-Ciocalteu se agitó durante 2-5 min y a continuación se adicionó 1 mL de Na₂CO₃ al 20%, posteriormente, la solución se dejó en reposo por 10 min. Finalmente, la absorbancia se midió en el rango de UV-Visible con un espectrofotómetro SpectraMax® Plus (Sunnyvale, CA, EUA) a 765 nm. El contenido total de polifenoles se

calculó a partir de la curva estándar de ácido gálico y se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto en base seca (bs).

5 Capacidad antioxidante por el método ORAC

La determinación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo por el método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés), adaptados a partir de los métodos publicados por Davalos y col., (2004) y Prior y col., (2003). Este ensayo se basa en el grado de inhibición de la fluorescencia de fluoresceína por los antioxidantes que atrapan los radicales peróxido (ROO^{\bullet}), generados a partir de la degradación térmica del compuesto 2,2'-azobis amidinopropano (AAPH). Se preparó una solución madre de fluoresceína (1.2 mM) pesando 39.87 mg de fluoresceína, disolviéndolo en 100 mL de amortiguador de fosfato (75 mM, pH 7.4) y luego se almacenó en la oscuridad en condiciones de refrigeración. A partir de la solución madre (10 μM) se preparó por dilución una segunda solución de fluoresceína a partir de la cual se elaboraron diariamente por dilución de 0.25 mL de la segunda solución en 25 mL de amortiguador de fosfato (75 mM, pH 7.4). La solución del radical AAPH (200 mM) se preparó pesando 207 mg del reactivo y se aforó en matraz volumétrico de 5 mL con amortiguador de fosfato (pH 7.4). Como estándar de referencia se utilizó una solución de Trolox (1 mM) que se preparó con amortiguador de fosfato a partir de la solución stock (5 mM) manteniéndose en el congelador a -20°C . Alícuotas de 25 μL de extractos de zarzamora diluido con amortiguador de fosfato (pH 7.4) se transfirieron a una placa de 96 celdas (Fisher # 07-200-590), la placa con las muestras se colocó en el lector de placas Lx800tbi (Bio-TEK, Winooski, VT, EUA), donde se agregó 150 μL de fluoresceína (0.1 μM), se mezcló y se incubó a 37°C durante 30 min, a continuación se adicionaron 25 μL de AAPH. La reacción se realizó a 37°C y la fluorescencia (485 nm de excitación y 538 nm de emisión) se midió a intervalos de 2 min durante 60 min. Los datos se recolectaron con el software acoplado al equipo y el cálculo del efecto antioxidante de las muestras y el control se integraron por el área neta bajo la curva sobre la pérdida de la fluorescencia (AUC) $[\text{AUC}_{\text{AOX}} - \text{AUC}_{\text{no AOX}}]$. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por gramo de muestra en base seca (bs).

6 Bioactividad de extractos de zarzamora

a Evaluación de actividad antimutagénica

1) Microorganismo utilizado

Se utilizó la cepa *Salmonella typhimurium* YG1024, proporcionada por el Dr. Takehiko Nohmi de la división de genética y mutagénesis, Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, Japón.

2) Construcción de la curva dosis-respuesta del 1-nitropireno

Con el propósito de elegir la concentración de 1-nitropireno a utilizar en el ensayo de mutagenicidad, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones (300, 200, 100, 50, 25, y 0 ng/tubo). El 1-nitropireno se disolvió en DMSO ya que es insoluble en agua; el mutágeno se incorporó utilizando 10 µL por tubo y se utilizaron testigos negativos con DMSO (Espinosa, 1980). Se realizaron dos experimentos independientes con tres repeticiones.

3) Ensayo de microsuspensión (ensayo de Ames modificado por Kado y col., 1983 y 1986)

i Propagación de la bacteria

La cepa de *S. typhimurium* YG1024 se cultivó en un medio líquido nutritivo Oxoid No 2 (Oxoid LTD) hasta alcanzar una densidad de 1×10^9 bacterias/ mL. El cultivo se realizó en tubos a 37 °C (aproximadamente entre 16-20 h) en un baño metabólico modelo 3540 (Lab-Line Instruments, INC., USA). Las bacterias se cosecharon por centrifugación ($3,645 \times g/4$ °C/10 min). Posteriormente se resuspendieron en un amortiguador de fosfatos salino (0.15M PBS, pH 7.4), utilizando un volumen suficiente para concentrarlas a 1×10^{10} bacterias/mL.

ii Preparación de la mezcla de cofactores

Para el procedimiento de Ames (Maron y Ames, 1983) se utilizó una mezcla de cofactores o cóctel. Los ingredientes del cóctel se adicionaron en el siguiente orden: 435 µL de agua, 500 µL de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M pH 7.4 (NAP), 20 µL de una mezcla de cloruro de magnesio 0.4 M y cloruro de potasio 1.65 M ($MgCl_2/KCl$), 40 µL de NADP 0.1 M y 5 µL de glucosa-6-fosfato 1 M (G6P). Para este ensayo el orden de adición fue el siguiente: 420 µL de agua, 500 µL de NAP (0.2 M pH 7.4), 20 µL de $MgCl_2/KCl$, 40 µL de NADP 0.1M y 5 µL de G6P (1 M).

iii Preincubación

Para preparar la mezcla a evaluar, en tubos de ensayo estériles de 12 x 75 mm colocados en un baño de hielo se adicionaron los ingredientes en el siguiente orden: 100 µL de cóctel, 100 µL de bacteria concentrada en solución salina amortiguadora de sodio y fosfato (1

X 10^{10} bacterias/mL PBS), 10 μ L de extracto de zarzamora (concentración de 100 μ g/tubo), 10 μ L de mutágeno (1-NP) a 200 ng/tubo o 10 μ L de DMSO. Las mezclas se incubaron a 37°C con agitación por 90 min, posteriormente los tubos se colocaron en un baño de hielo, hasta el momento de adicionar el agar de superficie.

iv Preparación del agar de superficie y vaciado a cajas petri

Para la mezcla de cofactores o cóctel se utilizó el procedimiento de Ames (Maron y Ames, 1983). Los ingredientes del cóctel se adicionaron en el siguiente orden: 435 μ L de agua, 500 μ L de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M pH 7.4 (NAP), 20 μ L de una mezcla de cloruro de magnesio 0.4 M y cloruro de potasio 1.65 M ($MgCl_2/KCl$), 40 μ L de NADP 0.1 M y 5 μ L de glucosa-6-fosfato 1 M (G6P). Para este ensayo el orden de adición fue el siguiente: 420 μ L de agua, 500 μ L de NAP (0.2 M pH 7.4), 20 μ L de $MgCl_2/KCl$, 40 μ L de NADP 0.1 M, 5 μ L de G6P (1 M).

v Determinación de la toxicidad o mutagenicidad

Con el propósito de determinar si los extractos de zarzamora eran tóxicos o mutagénicos para la cepa de prueba YG1024, la bacteria se colocó en contacto con 10 μ L de la muestra a evaluar a la concentración de 100 μ g/tubo. En los controles negativos se empleó DMSO. Se realizaron dos experimentos independientes con tres repeticiones. Las muestras se filtraron utilizando filtros Millipore (No. SLGS033SS, 33 mm, 0.22 μ m). Una muestra tóxica disminuye el número de revertantes, en tanto que una mutagénica lo incrementa en al menos dos veces en relación al número de revertantes espontáneas (Espinosa, 1980). Fernández y Vargas (2003) consideran que un compuesto es tóxico si el número de revertantes en presencia de la muestra a evaluar es menor del 60% de las revertantes espontáneas y si MI (Mutación Inducida, MI) es ≥ 0.6 y < 2 para que no exista toxicidad ni mutagenicidad en las muestras evaluadas. Los resultados negativos para la toxicidad/mutagenicidad fueron los indicadores para evaluar la antimutagenicidad de las muestras de estudio.

vi Evaluación de actividad antimutagénica

Se mezclaron 95 μ L de cóctel, 100 μ L de bacteria, 10 μ L de la muestra a evaluada y 5 μ L de 1-NP [200 ng/tubo]; el volumen total fue de 210 μ L/tubo. En el control negativo se utilizaron 15 μ L de DMSO estéril y en el control positivo se adicionaron 10 μ L de DMSO y 5 μ L de 1-NP a una concentración de 200 ng/tubo. Se realizaron al menos dos experimentos

independientes con tres repeticiones por experimento. En caso de presentar efectos antimutagénicos, la muestra evaluada bloquea el efecto del agente mutagénico (1-NP) y se observaba una disminución en el número de revertantes (colonias). El porcentaje de inhibición fue calculado como:

$$\text{Porcentaje de inhibición de la mutagenesis} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

Donde: A fue el número de revertantes observadas en presencia de la fracción evaluada junto al agente mutagénico y B fue el número de revertantes obtenidas en presencia del agente mutagénico (control positivo). La actividad antimutagénica fue clasificada como antimutagénica positiva basada en el % de inhibición de la mutagenicidad del 1-nitropireno de la escala establecida por Wall y col. (1988) (**Cuadro 12**).

b Actividad antiinflamatoria de extractos de zarzamora

1) Cultivo celular

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 se cultivó en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina, 1% piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino y mantenido en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37 °C.

2) Ensayo de viabilidad de células

El ensayo de viabilidad de células se realizó utilizando soluciones de ensayo para la proliferación de las células CellTiter 96® AQueous One que contiene un nuevo compuesto denominado tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, MTS) y un reactivo captador de electrones, [fenazina etosulfato, (PSA)] (Promega Corp., Madison, WI, EUA) el cual, mejora la estabilidad química permitiendo combinar MTS para la formación de una solución estable. Una dilución de 5 x 10⁴ células se sembraron en cada celda en una placa de 96 pozos y el volumen total se ajustó a 200 µl con medio de cultivo. Las células se incubaron por 24 h a 37°C en 5% CO₂/95% de aire, a continuación, las células se trataron con diferentes concentraciones de extractos de zarzamoras (0.5, 5 y 50 µM equivalentes de cianidina-3-O-glucósido para EP y ERA y equivalente de catequina para ERP) durante otras 24 h. Después de 24 h de tratamiento, el medio de crecimiento fue reemplazado por 100 µL de medio de cultivo nuevo y 20 µl MTS/PES en cada

Cuadro 12. Escala de número de revertantes para evaluar el grado de antimutagenicidad de un extracto.

Escala antimutagénica	% inhibición
60-90	fuerte
40-60	positivo
20-40	débil
0-20	negativa
> 90	sospecha de toxicidad

Wall y col., 1988.

celda. Después de incubar la placa durante 2 h a 37°C, se midió la absorbancia a 515 nm con un lector de placa de 96 pozos (BioTek Instruments®, Winooksi, VA, EUA). Los porcentajes de viabilidad celular se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = ABS_t, 515 \text{ nm} / ABS_c, 515 \text{ nm} * 100$$

Donde: ABS_t es la absorbancia de las células tratada y ABS_c es la absorbancia de las células no tratadas.

3) Tratamiento

El tratamiento de las células de macrófagos RAW 264.7 se llevó a cabo mediante la siembra de 2×10^5 células/pozo en una placa de 6 pozos y las células se dejaron crecer durante 48 h a 37°C en 5% CO_2 /95% aire. Posteriormente, las células se trataron con extractos ricos en polifenoles (EP), ricos en antocianinas (ERA) y ricos en proantocinidinas (ERP) de zarzamora (0.5, 5.0 y 50.0 μ M equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido para EP y ERA y equivalente de catequina para ERP) y 1 mg/mL de lipopolisacárido (LPS) durante 24 h. El medio de cultivo se recolectó y se analizó para determinar ON y PGE_2 . Los lisados celulares se utilizaron para estudiar el efecto de los extractos fenólicos en la expresión de COX-2 e iNOS.

4) Medición de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (ON) se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Dia y col. (2009). Cultivos de células con tratamiento e inducción por LPS se incubaron durante 24 h, a continuación se centrifugaron y el sobrenadante del cultivo se colectó. Posteriormente, alícuotas (100 μ l) del sobrenadante del medio de cultivo se colocaron en una placa de 96 pozos y se añadió una cantidad similar de reactivo de Griess (1% sulfanilamida y 0.1% N-1-(naptil)-etilendiamina diclorhidrato en 2.5% H_3PO_4). La placa se incubó durante 5 min y la absorbancia se midió en el rango de UV-visible con un espectrofotómetro SpectraMax® Plus (Sunnyvale, CA, EUA) a 550 nm. La cantidad de ON se calculó mediante la utilización de una curva estándar de nitrito de sodio ($y = 0.13x + 0.12$, $R^2 = 0.99$).

5) Medición de prostaglandinas

La producción de la prostaglandinas (PGE_2) se determinó de acuerdo a las instrucciones del kit descritas por la compañía Cayman (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Se cultivaron células inducidas con lipopolisacárido (LPS) y con tratamiento de

extractos durante 24 h, posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante del cultivo se colectó. Posteriormente, alícuotas (50 μ l) del sobrenadante del medio de cultivo se colocaron en una placa de 96 pozos, los cuales estaban recubiertos con anticuerpos antiratón IgG y se incubaron por 18 h a 4 °C. Después de la incubación, la placa se lavó con el amortiguador y el color fue revelado mediante la adición de 200 μ L de reactivo de Ellman, al cabo de 60 a 90 min en la oscuridad la cantidad de PGE₂ se calculó utilizando una curva estándar de PGE₂.

6) Medición de la expresión de la proteína ciclooxigenasa y óxido nítrico sintasa inhibitoria (COX-2 e iNOS)

Las expresiones enzimáticas COX-2 e iNOS se determinaron mediante la técnica de Western blot en lisados celulares. Las células tratadas se lavaron con DMEM frío y la solución amortiguadora de fosfato salina fría, a continuación se trató con 200 μ L de solución amortiguadora Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 35% glicerol, 0.01% azul de bromofenol; BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) con 5% de β -mercaptoetanol como solución de lisis. Los lisados celulares se hirvieron por 5 min y aproximadamente 25 μ g de proteína se cargaron en geles de 4-20% Tris-HCl (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) para la separación de proteínas. Las proteínas separadas se transfirieron a una membranas de nitrocelulosa y difloruro de polivinilideno (PVDF) y se bloquearon una solución de leche en polvo desgrasada al 5% y 0.1% de solución amortiguadora salina Tris Tween 20 (TBST) por 1 h a 4 °C. Después del bloqueo, la membrana se lavó con TBST 0.1% (5 veces, 5 min cada uno) y se incubó con anticuerpos monoclonales de ratón para COX-2 o iNOS (1:1,000) a 4 °C durante 16 h. La membrana se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado antiratón IgG peroxidasa de rábano por 3 h a temperatura ambiente. Después de la incubación y el lavado repetido, la expresión de COX-2 e iNOS se visualizó usando un reactivo quimioluminiscente (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. La foto de la membrana se tomó con una estación Kodak Image 440 CF (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, EUA).

7) Diseño y análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos dos veces con resultados consistentes. A menos que se indique lo contrario, los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de dos vía, el software SAS versión 4.2 (1999) se utilizó para realizar el análisis estadístico. Las comparaciones entre tratamientos se

realizaron con la prueba de separación de medias LSD y las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0.05$. La concentración para inhibir 50% (IC₅₀) la producción de ON y PGE₂ y la expresión de COX-2 e iNOS se determinó mediante regresión no lineal (ajuste de curva) utilizando el Software GraphPad Prism versión 4.0 (GaphPad software, San Diego, CA, EUA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A COMPOSICIÓN PROXIMAL DE ZARZOMARAS

El **Cuadro 13** muestra la composición proximal de los seis genotipos de zarzamoras silvestres, comerciales y mejoradas. El contenido de proteína varió de 6.3 a 7.8 mg/100 g bs, se puede observar que los genotipos silvestres ZS-7 (7.8 mg/100 g bs) y ZS-11 (7.7 mg/100g bs) tuvieron valores mayores ($p < 0.05$) que el resto de los materiales, seguidos de los genotipos silvestre ZS-10 > “Tupy” > mejorada UM-601 > silvestre ZS-3. Estos resultados son similares a los reportados por Acosta-Montoya y col. (2010), quienes obtuvieron un contenido de proteína de 5.9-7.0% en zarzamora comercial cultivadas en Costa Rica en tres diferentes estados de maduración.

Respecto al contenido de grasa, éste varió de 2.7-5.7 mg/100 g bs en todos los materiales de zarzamoras, los materiales silvestres ZS-10 (5.6 mg/100 bs) y ZS-11 (5.5 mg/100 bs) fueron los que presentaron los valores mayores ($p < 0.05$) seguidos de la zarzamora comercial “Tupy” > mejorada UM-601 > silvestre ZS-3 y silvestre ZS-7. En la variedad comercial “Marion” de zarzamoras, se ha mostrado que la composición de ácidos grasos comprende: 62.7% de ácido linoleico (18:2), 15.1% de ácido oleico (18:1), 3.4% ácido palmítico (16:0) y 3.4% de ácido esteárico (18:0) (Bushman y col., 2004).

En relación al contenido de ceniza en los seis genotipos de zarzamora, se encontró una variación de 3.6 a 7.0 mg/100 g bs. La zarzamora silvestre ZS-3 (7.0 mg/100 g bs) presentó el valor mayor ($p < 0.05$), mientras que la zarzamora mejorada UM-601 (3.6 mg/100 g bs) y “Tupy” (3.7 mg/100 g bs) mostraron los valores menores ($p < 0.05$). Estos resultados coinciden con reportes previos de diversos investigadores (Hassimoto y col., 2008; Acosta-Montoya y col., 2010); quienes encontraron contenido de cenizas en un rango de 2.7 a 4.5 mg/100 g bs en zarzamoras comerciales cultivadas en Brasil y Costa Rica. En otras frutillas como arándanos morados y rojos, frambuesas, fresas, grosellas rojas y moradas, el contenido de cenizas reportados están en un rango de 1 – 4 mg/100 g bs y estos frutos son considerados fuente de potasio, calcio, magnesio y escasas cantidades de sodio (Kahlon y Smith, 2007; Plessi y col., 2007). El contenido de carbohidratos totales en los materiales de zarzamora varió entre 81.0 y 85.2 mg/100 g bs. Kahlon y Smith, (2007) reportaron en frutillas como

Cuadro 13. Análisis proximal de frutos de zarzamora silvestre, comercial y mejorada colectados en México.

Análisis proximal de zarzamoras (mg/100 g bs)				
Genotipo	Proteína	Grasa	Cenizas	CHO
ZS-10	7.5 ± 0.04 ^b	5.6 ± 0.14 ^a	5.8 ± 0.72 ^b	81.0 ± 0.38 ^d
ZS-7	7.8 ± 0.53 ^a	2.7 ± 0.17 ^d	4.5 ± 0.84 ^c	85.0 ± 0.26 ^a
ZS-11	7.7 ± 0.02 ^a	5.5 ± 0.41 ^a	4.5 ± 0.62 ^c	82.3 ± 0.19 ^c
ZS-3	6.3 ± 0.24 ^d	2.9 ± 0.22 ^d	7.0 ± 0.31 ^a	83.2 ± 0.05 ^b
Tupy	7.1 ± 0.21 ^c	4.9 ± 0.26 ^b	3.7 ± 0.10 ^d	84.4 ± 0.12 ^a
Mejorado	7.3 ± 0.46 ^c	4.0 ± 0.05 ^c	3.6 ± 0.48 ^d	85.2 ± 0.07 ^a

Medias por columnas, diferentes letras significa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los materiales evaluados; ZS: se refiere a genotipo silvestre; comercial: variedad Tupy; Mejorado; genotipo mejorado UM-601; CHO: contenido de carbohidratos totales.

arándanos, fresas y cerezas contenidos de carbohidratos totales de 84.9, 87.2 y 91.8%, respectivamente. Asimismo, otras investigaciones han mostrado en frutos de zarzamoras cultivadas en Brasil y EUA que sus azúcares predominantes son: glucosa y fructuosa; además, en algunas variedades de zarzamora se ha encontrado presencia de sacarosa y trazas de sorbitol (Hassimoto y col., 2008; Fan-Chiang y Wrolstad, 2010).

B CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN ZARZAMORA

1 Separación de compuestos polifenólicos en zarzamoras

El uso de solventes metanólicos acidificados (0.3% ATA) facilita la extracción de polifenoles en frutillas y previene la degradación de antocianinas durante el proceso de extracción, purificación y análisis (Dugo y col., 2001; Grace y col., 2009). La resina Amberlite XAD-7 es un polímero típico utilizado para remover azúcares, sales, pectinas y otros de compuestos fenólicos en extractos de productos naturales de plantas (Zhang y col., 2004; Grace y col., 2009), mientras que con la resina Sephadex LH-20, con apropiadas mezclas de solventes, se pueden separar mezclas de polifenoles como antocianinas y proantocianidinas, facilitando la identificación de polifenoles por HPLC. Kraemer-Schafhalter y col. (1998) evaluaron 16 tipos de resinas y concluyeron que la resina Amberlite XAD-7 fue la mejor, utilizada para aislar antocianinas de jugo de *Aronia melanocarpa* var Nero. Por otro lado, Zhang y col (2008) reportaron que las antocianinas de frambuesas fueron aisladas a través de la resina Amberlite XAD-7 y separadas de una mezcla de ellas a través de una columna empacada con la resina Sephadex LH-20. En este estudio los dos pasos de separación de polifenoles dieron como resultado fracciones ricas en antocianinas y proantocianidinas, lo que facilitó la caracterización y cuantificación de estos compuestos en las zarzamoras (**Figura 9**).

2 Análisis de antocianinas presentes en zarzamoras

El análisis con HPLC en extractos crudos reveló que todos los genotipos de zarzamora contenían una mezcla compleja característica de polifenoles. Debido a que los extractos crudos de zarzamora contienen principalmente antocianinas y proantocianidinas, y que ambos fitoquímicos poseen absorción a 280 nm en el espectro UV, se requirió de separaciones con columnas cromatográficas empacadas con resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 para el análisis de los compuestos polifenólicos que estaban presentes.

En los extractos crudos de los materiales de zarzamora estudiados se presentaron valores de contenido de antocianinas que variaron de 3.4 a 9.2 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs (**Cuadro 14**). En los espectros de HPLC se observó que el cultivar silvestre ZS-10 exhibió el valor mayor de concentración de antocianinas (9.2 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs), seguido por la mejorada UM-601 (9.1 mg), ZS-11 (8.8 mg), ZS-7 (8.7 mg), ZS-3 (6.6 mg), mientras que el cultivar comercial “Tupy” mostró menor concentración de antocianinas (3.4 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs). De acuerdo a los resultados anteriores se puede observar que la mayoría de los genotipos de zarzamoras silvestres Mexicanas excepto ZS-3, presentan más de dos veces el contenido de antocianinas en comparación con la variedad comercial “Tupy”. Hager y col (2008) reportaron que el contenido de antocianinas (2.6 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs) en cultivares de zarzamora “Apache” fue similar al obtenido en la variedad comercial “Tupy”. Otros investigadores encontraron contenidos de antocianinas en un rango de 7.9 a 18.1 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs en frutos de zarzamora comercial (Reyes-Carmona y col., 2005; Puupponen-Pimia y col., 2005).

Posteriormente al proceso de purificación en la columna de cromatografía, empacada con resina Amberlite XAD-7, de los extractos metanólicos obtenidos de los materiales de zarzamora, se obtuvieron extractos con mezcla de compuestos polifenólicos, estos extractos polifenólicos presentaron mayor concentración de antocianinas, alrededor de 13 veces mayor en promedio con respecto a los extractos crudos. Es interesante destacar que en todos los genotipos de zarzamora silvestre se observaron concentraciones de antocianinas en los extractos polifenólicos desde 0.65 a 2.6 veces mayores, comparados con el genotipo comercial “Tupy” (**Cuadro 14**).

Con respecto a las fracciones (1-9), denominados extractos ricos en antocianinas de zarzamora, obtenidas a través de la columna de cromatografía empacada con resina Sephadex LH-20, se observó una tendencia general similar. La concentración de antocianinas de los extractos de zarzamora se incrementó alrededor de 4 veces en relación a la contraparte en los extractos ricos en polifenoles. De nuevo se observó que el genotipo comercial “Tupy” presentó la menor concentración de antocianinas (49.2 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs), mientras en los otros genotipos la concentración varió desde 362.5 a 494.9 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs (**Cuadro 14**).

Cuadro 14. Concentración de antocianinas en diferentes extractos y fracciones de zarzamora colectadas en México.

Muestra/Genotipos	Concentración antocianina [mg equivalente cianidina 3-O glucósido/g base seca (bs)]					
	ZS-10	ZS-7	ZS-11	ZS-3	Tupy ^b	Mejorada ^c
Extracto crudo (EC)	9.2	8.7	8.8	6.6	3.4	9.1
Extracto rico en polifenoles (EP)	131.7	114.3	89.5	59.6	36.2	132.7
Extractos rico en antocianinas (ERA)^d						
Fracción 1	273.0	836.4	91.3	70.3	16.1	117.2
Fracción 2	55.5	52.1	52.3	535.5	219.6	248.2
Fracción 3	300.7	138.9	270.6	513.0	53.1	712.0
Fracción 4	418.1	119.3	602.3	358.2	28.6	762.2
Fracción 5	678.1	765.4	551.9	445.8	10.7	372.5
Fracción 6	570.0	727.2	546.9	520.1	ND	ND
Fracción 7	55.1	507.7	541.8	639.1	ND	274.6
Fracción 8	756.8	728.9	607.0	133.0	11.7	ND
Fracción 9	155.1	577.9	131.1	104.5	4.97	37.4
Promedio	362.5	494.9	377.2	368.8	49.2	631.3

^a ZS: Genotipos de zarzamora silvestre; ^b Variedad comercial “Tupy”; ^c Zarzamora mejorada (línea UM-601); ^d Fracciones separadas con columna de cromatografía Sephadex LH-20; ND: No detectada.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

Asimismo, se encontró que algunas fracciones (3, 4, 5 y 8) ricas en antocianinas tuvieron en promedio concentraciones de alrededor de 750 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs (75% de la fracción fue rica en antocianinas), lo cual facilitó la identificación y caracterización de las mismas (**Cuadro 14**).

En el análisis de cromatogramas de HPLC de las fracciones ricas en antocianinas obtenidas a través de Sephadex LH-20, se observó la presencia principalmente de cuatro antocianinas en los genotipos de zarzamora estudiados (**Figura 10**). Las cuatro principales antocianinas identificadas fueron cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido, cianidina-3-*O*-arabinósido y cianidina-3-*O*-(6-*O*-malonil)-glucósido, el compuesto más abundante fue la cianidina-3-*O*-glucósido; este patrón es consistente con reportes previos en diversos cultivares de zarzamora (Siriwoharn y col., 2005; Seeran y col., 2006; Mertz y col., 2007; Elisia y col., 2007; Acosta-Montoya y col., 2010). Además, se observaron perfiles típicos para zarzamora pero con distribuciones relativas diferentes para cada antocianina individual. Asimismo, se observó que cada genotipo contiene un perfil único con diferentes porcentajes relativos de cada antocianina individual. En el **Cuadro 15** se muestra que la antocianina cianidina-3-*O*-glucósido se encuentra en mayor porcentaje (79 %) en el material silvestre ZS-10, mientras el menor porcentaje (34.6 %) correspondió para el material comercial “Tupy”. Pero inesperadamente, en la antocianina cianidina-3-*O*-rutinósido, el mayor porcentaje (26.7%) correspondió al genotipo comercial “Tupy” y el menor (6.1%) para el genotipo silvestre ZS-10.

Los análisis realizados a través de HPLC y LC-MS de los compuestos principales se caracterizaron de acuerdo a los valores de m/z , espectro característico de absorción UV y tiempo de retención (TR), comparado con estándares comerciales y datos publicados (Dugo y col., 2001; Kammerer y col., 2005; Seeram y col., 2006; Mertz y col., 2007; Hager y col., 2008; Kellogg y col., 2010; Schreckinger y col., 2010). La **Figura 11** muestra el espectro representativo de LC-ESI-MS de la fracción 5 de extractos ricos en antocianinas del genotipo silvestre ZS-11, fundamentado en los iones totales. Dicho espectro manifiesta que en la mayoría de la fracción se encontraban presentes antocianinas (**Figura 11A**) que mostraron todos los iones de los compuestos presentes en la fracción y la absorción máxima de UV-VIS a 520 nm (**Figura 11B**). Las antocianinas individuales fueron comprobadas sobre la base del espectro LC-MS (**Figura 11C**), basado en la razón de carga/ión (m/z) y tiempo de retención

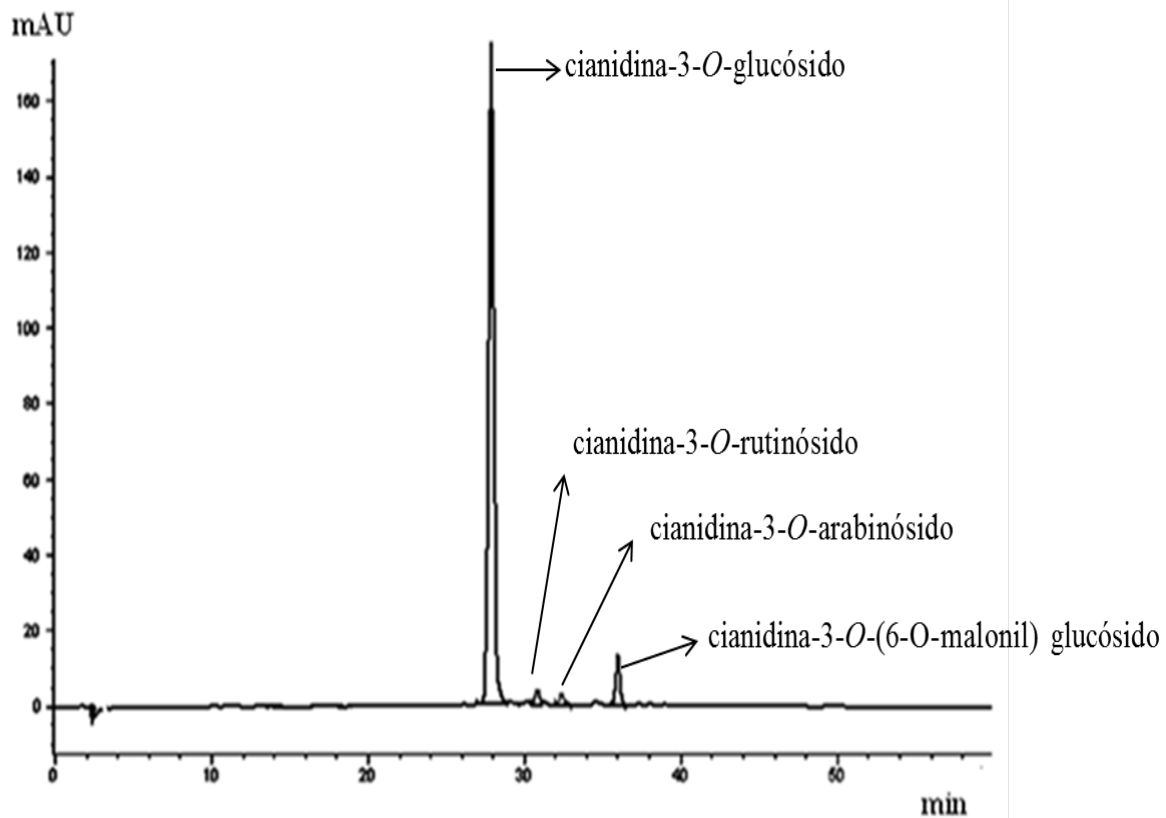


Figura 10. Cromatograma de HPLC de las principales antocianinas presentes en extractos de zarzamoras cultivadas en México.

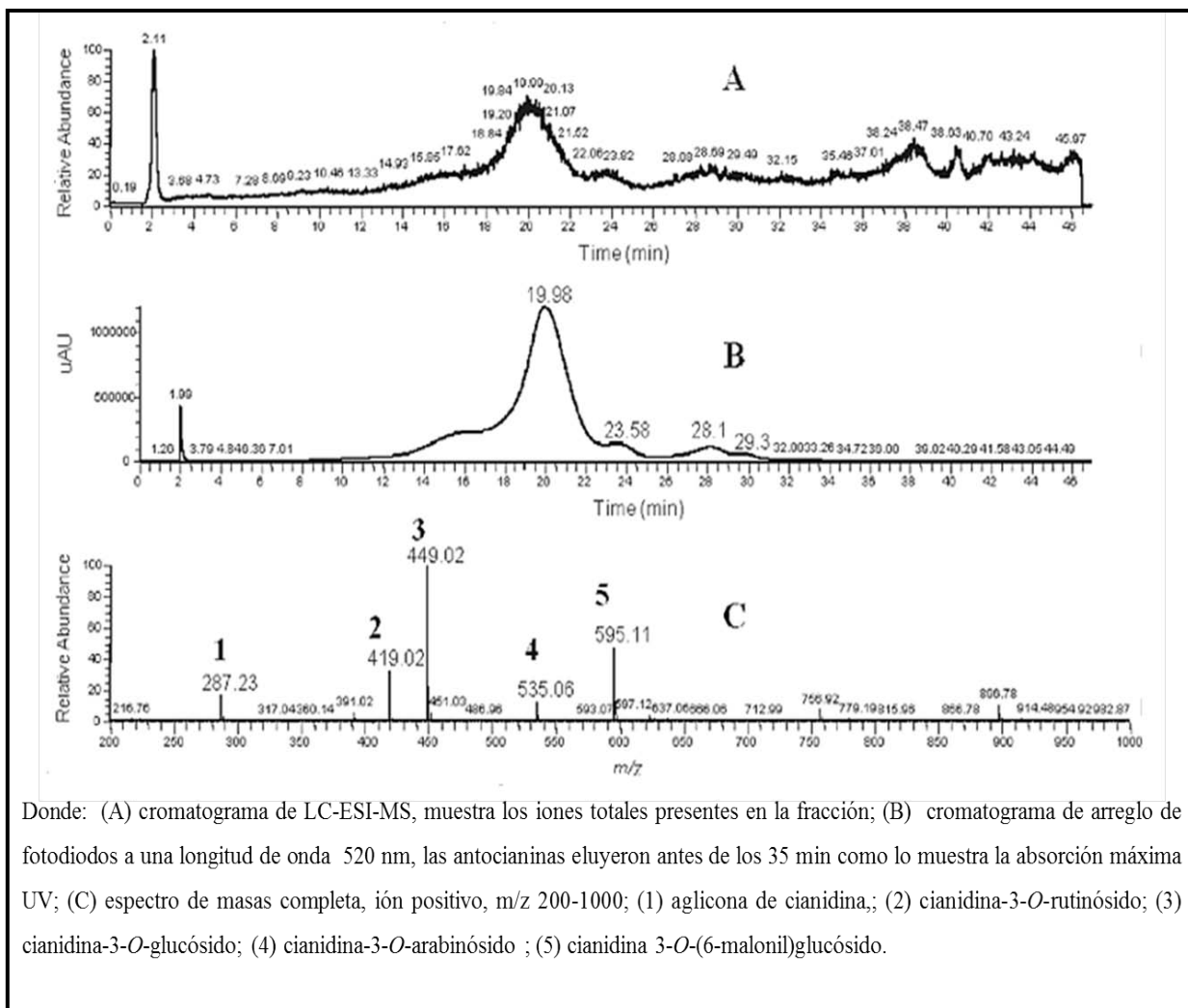
Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

Cuadro 15. Porcentaje de antocianinas individuales de extractos crudos de genotipos de zarzamora

Antocianina ^a	Genotipo de zarzamora ^b					
	ZS-10	ZS-7	ZS-11	ZS-3	Tupy	Mejorada
1	79.2	77.0	77.3	79.4	34.6	71.1
2	6.1	6.2	5.7	9.1	26.7	19.4
3	5.8	10.2	5.7	11.5	17.7	9.4
4	9.0	6.6	11.3	ND	20.9	ND

Donde: antocianinas identificadas y su distribución relativa (%) en genotipos de zarzamora Mexicana. ^a1: cianidina-3-*O*-glucósido; 2: cianidina-3-*O*-rutinósido; 3:cianidina-3-*O*-arabinósido; 4: cianidina-3-*O*-(6-*O*-malonil) glucósido; ^bZS: zarzamora silvestre, variedad comercial “Tupy”, zarzamora mejorada (línea UM-601).

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a



Donde: (A) cromatograma de LC-ESI-MS, muestra los iones totales presentes en la fracción; (B) cromatograma de arreglo de fotodiodos a una longitud de onda 520 nm, las antocianinas eluyeron antes de los 35 min como lo muestra la absorción máxima UV; (C) espectro de masas completa, ión positivo, m/z 200-1000; (1) aglicona de cianidina,; (2) cianidina-3-O-rutinósido; (3) cianidina-3-O-glucósido; (4) cianidina-3-O-arabinósido ; (5) cianidina 3-O-(6-malonil)glucósido.

Figura 11. Espectro de LC-ESI-MS de antocianinas presentes en la fracción 5 de extractos ricos en antocianinas del genotipo de zarzamora silvestre ZS-11.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

(TR). Donde la cianidina estuvo presente en forma de aglicona (m/z 287), asimismo los glucósidos: cianidina-3-*O*-glucósido (m/z 449.02; TR, 19.98), cianidina-3-*O*-rutinosido (m/z 595.11; TR, 23.58), cianidina-3-*O*-arabinósido (m/z 419.02; TR, 28.10) y cianidina 3-*O*-(6-*O*-malonil) glucósido (m/z 535.06; TR, 29.3). La longitud de onda máxima de absorción (**Figura 11B**, a 520 nm) mostró claramente que cianidina-3-*O*-glucósido eluyó a un tiempo de retención (TR) de 19.98 min, principal antocianina presente en las fracciones (1-9) de los extractos ricos en antocianinas. Diversas investigaciones en frutos de zarzamora cultivados en diferentes regiones del mundo, han mostrado que la principal antocianina presente es cianidina-3-*O*-glucósido (Stintzing y col., 2002; Wang y Mazza, 2002; Seeram y col., 2006; Pergola y col., 2006; Dai y col., 2007; Mertz y col., 2007).

3 Análisis de proantocianidinas presentes en zarzamoras

Los análisis en HPLC y LC-MS durante las etapas de extracción y fraccionamiento revelaron que todos los genotipos de zarzamora estudiados presentan una mezcla compleja de proantocianidinas (**Figura 12**). En las etapas iniciales de extracción y fraccionamiento fue imposible caracterizar la mezcla de antocianinas y proantocianidinas porque los extractos presentaban mayor proporción de antocianinas y debido a que ambos fitoquímicos presentan absorción a 280 y 520 nm. Cuando se realizó el análisis del cromatograma de UV a 280 nm, se observó como las proantocianidinas fueron sobrepuestas con las antocianinas, razón principal que no permitió estimar de manera precisa las proantocianidinas en los extractos de zarzamora. Solamente después de la separación a través de la columna de cromatografía empacada con resina Sephadex-LH-20 y con el solvente acetona (70%) se logró obtener fracciones (10-12) ricas en proantocianidinas de los materiales de zarzamora y esto permitió caracterizar las proantocianidinas. En dichas fracciones (10-12) ricas en proantocianidinas se estimaron las concentraciones de proantocianidinas como equivalentes de catequina y se muestran a través del **Cuadro 16**.

El contenido promedio de proantocianidinas total en todas las fracciones de los genotipos de zarzamora varió de 417.5 a 1,343.6 mg equivalentes de catequina/g bs, los genotipos silvestre ZS-7 y mejorado UM-601 mostraron menor y mayor valor, respectivamente. Los genotipos silvestres ZS-3 (1213.7 mg/g) > ZS-10 (768.0 mg/g) > ZS-11 (733.3 mg/g) > comercial “Tupy” (579.2 mg equivalentes de catequina/g bs). Cabe mencionar

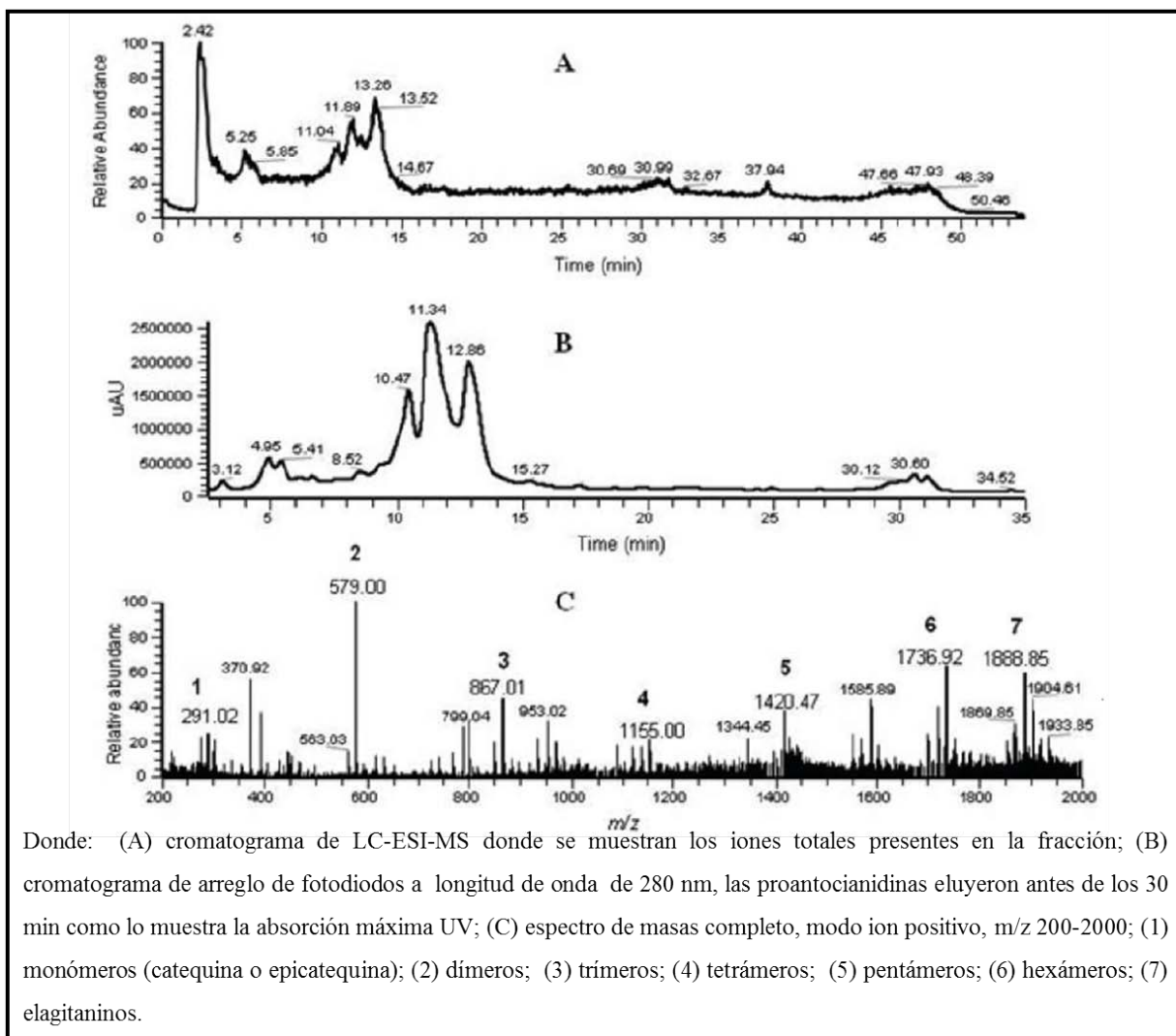


Figura 12. Espectro de LC-ESI-MS de proantocianidinas presentes en la fracción 11 de extractos ricos en proantocinidinas del genotipo de zarzamora silvestre ZS-11.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

Cuadro 16. Concentración de proantocianidinas en diferentes extractos y fracciones de zarzamoras colectadas en México.

Muestra/Genotipos	Concentración proantocianidinas					
	[mg equivalente catequina/g base seca (bs)]					
	ZS-10^a	ZS-7	ZS-11	ZS-3	Tupy^b	Mejorada^c
Extracto crudo (EC)	ND ^e	ND	ND	ND	ND	ND
Extracto rico en polifenoles (EP)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Extractos^d rico en proantocianidinas (EPA)						
Fracción 10	778.1	118.3	749.9	1,203.2	510.2	1,323.4
Fracción 11	758	716.7	716.7	1,224.2	919.8	1,363.8
Fracción 12	ND	ND	ND	ND	307.6	ND
Promedio	768.0	417.5	733.3	1,213.7	579.2	1,343.6

^a Genotipos de zarzamora silvestre; ^b Variedad comercial “Tupy”; ^c Línea UM-601 zarzamora cultivada no comercial; ^d Fracciones separadas con columna de cromatografía Sephadex LH-20; ^e ND = No detectada.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

que los cultivares de zarzamora silvestres tuvieron contenidos similares de antocianinas (**Cuadro 14**), pero variaron significativamente en el contenido de proantocianidinas acumuladas (**Cuadro 16**). Las zarzamoras silvestres ZS-3 y mejorado UM-601 mostraron, en promedio, el doble del contenido de proantocianidinas que la zarzamora silvestre ZS-7, ZS-10, ZS-11 y comercial “Tupy”.

El espectro representativo de LC-ESI-MS y los iones totales de las fracciones 10-12 expresaron que las proantocianidinas constituyen la mayoría de polifenoles (**Figura 12A**) presentes en estas fracciones, con una absorción máxima en el espectro UV de 280 nm (**Figura 12B**). En los espectros de masas LC-MS obtenidos en un rango de m/z entre 200 a 2000 (**Figura 12C**) se observaron la presencia de iones moleculares para monómeros de proantocianidinas, los cuales incluyen catequina y/o epicatequina (m/z 291.02), dímeros de catequina/epicatequina (m/z 579.00) y una serie de compuestos con alto grado de polimerización, conteniendo trímeros (m/z 867.01), tetrámeros (m/z 1155.00), pentámeros (m/z 1420.47) y hexámeros (m/z 1736.92). Asimismo, fueron identificados una serie de elagitaninos. Diversos estudios (Gu y col., 2004; Mullen y col., 2003; Mertz y col., 2007) han mostrado que frutos de zarzamora y frambuesa contienen taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos). Los galotaninos son compuestos de ácido gálico, mientras los elagitaninos son polímeros de ácido hexahidroxidifénico (HHDP), una forma dimérica de ácido gálico que puede espontáneamente lactonizarse para formar ácido elágico. Los galotaninos, elagitaninos, ácido gálico y elágico son esterificados a una o varias glucopiranosas para formar diversos tipos de polímeros (Haslam, 1989).

La caracterización de los compuestos de elagitaninos en los genotipos de zarzamora fue un reto debido a la complejidad de su estructura, diversidad y partícula de tamaño grande. Para la identificación de los iones positivos predominantes se recurrió a un procedimiento subsecuente de fragmentación de MS/MS de las masas moleculares de los elagitaninos y ácidos elágicos conjugados en las muestras. Cada vez que fue viable, se utilizaron tiempos de retención y datos de la literatura para soportar la identificación de los compuestos.

En los análisis de MS/MS fueron identificados diversos elagitaninos en las fracciones de zarzamora obtenidas en los extractos ricos en proantocianidinas. Además de ácido elágico (m/z 303), se observaron elagitaninos que a continuación se describen. Isómeros de pedunculagina con ión $[M+H]^+$ de m/z 801.56 y espectro de masas MS/MS mostró un patrón

de fragmentación de m/z 766.01 (M -35, pérdida de dos moléculas de agua) y m/z 464.56 (M-302, pérdida de una molécula de HHDP). Este compuesto podría estar relacionado con una serie de compuestos que tienen adición de moléculas de agua (Hager y col., 2008). Sanguina H-10, con ión $[M+H]^+$ de m/z 1586.32 y patrón de iones principales en MS/MS de m/z 1568.15 (M - 18, pérdida de una molécula de agua), m/z 1398.23 (M - 170, pérdida de una unidad de galato), m/z 1079.41 (M- 319, pérdida de un grupo HHDP y una molécula de agua), m/z 917.10 (M - 162, pérdida de un grupo glucosil), m/z 767.43 (M - 150, pérdida de un grupo galoil), m/z 615.21 (M - 152, pérdida de un grupo galoil) y m/z 453.12 (M - 162, pérdida de un grupo glucosil). Sobre la base del espectro de MS/MS y datos publicados (Mullen y col., 2003) para frutos de frambuesa, este pico puede ser tentativamente reconocido como Sanguina H-10.

Nobotanina A/Malabatrina B con ión $[M+H]^+$ en MS de 1736.01 produjo fragmentos en MS/MS de m/z 1720 (M - 169, pérdida de un grupo galato), m/z 1417.21 (M -302, pérdida de un grupo HHDP), m/z 1085.22 (M -332, pérdida de un grupo glucosil y un grupo galoil) y m/z 783 (M - 150, pérdida de un grupo galoil). Diversos investigadores (Yoshida y col, 1992; Mullen y col., 2003) reportaron resultados similares en la caracterización de elagitaninos y concluyeron que este compuesto puede ser Nobotanina A/Malabatrina B.

Sanguina H-6/Lambertianina A con ión $[M+H]^+$ a m/z 1888.85. El patrón de fragmentación en MS/MS de Sanguina H-6 incluyeron m/z 1869.85 (M - 18, pérdida de una molécula de agua), m/z 1569.89 (M -301, pérdida de un grupo HHDP) y un m/z de 1230.56 (M - 339, pérdida de un grupo glucosil y un galoil). Los fragmentos restantes fueron m/z de 933.17 y 633.45. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en frutos de *Rubus idaeus* (Haddonck y col., 1982; Mullen y col., 2003). Isómeros de ácido elágico mostraron iones $[M+ M]^+$ de m/z 479.22 y un patrón de fragmentación en MS/MS de m/z 303.45 (M - 160, pérdida de una hexosa), m/z 257.22 y m/z de 229.25, esta molécula se identificó tentativamente como ácido elágico con una molécula ligada de hexosa. Este compuesto ha sido reportado previamente en jugo de granada (*Punica granatum*) (Gil y col., 2000). Una fragmentación por MS/MS sobre ión de m/z 301.00 mostró patrón de m/z de 271.14 y 299.00, los cuales previamente se establecieron como iones de ácido elágico (Mullen y col., 2003; Vrhovsek y col; 2006). Sobre la base de los datos espectrales y la literatura, fueron observados iones con doble carga en las fracciones (10-12) de extractos ricos en

proantocianidinas, contribuyendo a la complejidad en la identificación de los elagitaninos en los frutos de zarzamora (Mullen y col., 2003).

Recapitulando, para caracterizar los extractos de zarzamora fue necesario repetir las etapas de fraccionamiento utilizando resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20. El uso de HPLC-ESI-MS/MS facilitó la identificación y cuantificación de los principales grupos de polifenoles en los genotipos de zarzamora. Los resultados obtenidos indicaron que la combinación de las columnas cromatográficas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 permitió la purificación de antocianinas, proantocianidinas y otros flavonoides en zarzamora silvestres mexicanas y presenta una cuantificación reproducible y confiable se puede validar como un excelente método para la purificación de estos compuestos.

4 Contenido de polifenoles totales en zarzamora

Los polifenoles son compuestos con uno o más anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilo (Stoner y col., 2008). Recientemente se han considerado de especial importancia debido a que podrían coadyuvar a disminuir problemas de inflamación (Rossi y col., 2003).

El contenido de polifenoles totales derivado en los extractos de zarzamora colectadas en México se muestra en el **Cuadro 17**. El contenido de polifenoles totales de extractos crudos en zarzamora varió de 14.2 a 25.5 mg EAG/g bs, donde los genotipos de zarzamora silvestres ZS-3 (25.5 mg EAG/ g bs) y ZS-11 (23.6 mg EAG/g bs) presentaron el mayor contenido de polifenoles totales ($p < 0.05$) seguidos en orden descendente por los materiales mejorado UM-601(22.4 mg EAG/g bs) > silvestre ZS-10 (19.2 mg EAG/g bs) > silvestre ZS-7 (184 mg EAG/g bs) > comercial “Tupy” (14.2 mg EAG/g bs). Diversos investigadores (Wang y col., 2000; Seeram y col., 2006; Dai y col., 2007; Pantelidis y col.; 2007; Hassimoto y col., 2008; Vasco y col., 2008) han estimado el contenido de compuestos fenólicos totales en un rango de 12.1 a 23.5 mg equivalentes de AG/g bs en zarzamoras comerciales variedades Choktaw, Thornless y Triple Crown. La variación en contenido de polifenoles en frutillas podría atribuirse al genotipo y exposición de la planta a estrés biótico y abiótico, tales como: temperatura, radiaciones solares, herbívoros e infecciones patogénicas (Kalt y col., 2001; Puupponen-Pimiä y col., 2005; Reyes-Carmona y col., 2005).

Posteriormente del procedimiento de purificación a través de las resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20, que permitieron lograr extractos ricos en polifenoles, en

Cuadro 17. Contenido de polifenoles totales de extractos de zarzamoras silvestres, comerciales y mejoradas colectadas en México.

Genotipos	Contenido de polifenoles totales [mg equivalente ácido gálico (EAG)/g (bs)]			
	<u>Extractos de zarzamora</u>			
	Crudo (EC)	Polifenoles (EP)	Antocianinas (ERA)	Proantocianidinas (EPA)
ZS-10	19.2 ± 0.7 ^c	134.3 ± 2.7 ^b	318.1 ± 10.8 ^a	495.4 ± 32.1 ^{cd}
ZS-7	18.4 ± 1.1 ^c	187.2 ± 10.9 ^a	211.4 ± 8.1 ^d	565.6 ± 16.6 ^b
ZS-11	23.6 ± 1.1 ^{ab}	92.7 ± 1.8 ^e	250.7 ± 5.0 ^b	454.9 ± 27.9 ^d
ZS-3	25.5 ± 1.1 ^a	95.7 ± 3.0 ^e	237.8 ± 6.2 ^c	598.0 ± 10.5 ^a
Tupy	14.2 ± 0.4 ^d	111.8 ± 4.5 ^c	221.5 ± 9.7 ^{cd}	521.7 ± 4.1 ^c
Mejorada	22.4 ± 0.2 ^b	103.6 ± 1.7 ^d	294.6 ± 11.6 ^a	526.3 ± 19.4 ^c

Medias por columnas, diferentes letras significa diferencia significativa ($p < 0.05$); $n = 6$; ZS: Genotipos de zarzamora silvestre; Variedad comercial “Tupy”; Línea UM-601 zarzamora mejorada; bs: base seca.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010a

antocianinas y en proantocianidinas, el contenido de polifenoles totales de todos los extractos se concentró desde un promedio de 20.5 mg EAG/g bs para extractos crudos hasta 120.9, 255.7 y 527.0 mg EAG/g bs en los extractos ricos en polifenoles, en antocianinas y en proantocianidinas, respectivamente (**Cuadro 17**).

Dentro de los extractos ricos en polifenoles (**Cuadro 17, EP**), el contenido en materiales de zarzamora estudiados varió de 92.7 a 187.2 mg EAG/g bs. La zarzamora silvestre ZS-7 (187.2 EAG/g bs) presentó mayor contenido de polifenoles totales ($p < 0.05$), seguidas en orden descendente por los materiales silvestre ZS-10 (134.3 mg EAG/g bs) > comercial “Tupy” (111.8 mg EAG/g bs) > mejorado UM-601 (103.6 mg EAG/g bs) > silvestre ZS-3 (92.7 mg EAG/g bs) y silvestre ZS-11 (95.7 mg EAG/g bs).

Con respecto a los extractos ricos en antocianinas (**Cuadro 17, ERA**), la zarzamora silvestre ZS-10 (318.1 mg EAG/g bs) mostró la mayor ($p < 0.05$) concentración de polifenoles totales y las menores ($p < 0.05$) concentraciones fueron para extractos de zarzamora silvestre ZS-7 (211.4 mg EAG/g bs) y comercial “Tupy” (221.5 mg EAG/g bs). Asimismo, para extractos ricos en proantocianidinas se observó que el contenido de polifenoles totales varió de 454.9 mg EAG/g bs para genotipo de zarzamora silvestre ZS-11 a 598.0 mg EAG/g bs para genotipo silvestre ZS-3 (**Cuadro 17**). De acuerdo con las tendencias de los datos obtenidos para el parámetro de contenido de polifenoles, se observó que la utilización de resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 permitió la concentración de polifenoles en los extractos de zarzamoras colectas en México.

5 Capacidad antioxidante en zarzamora

Entre los métodos más comúnmente empleados para evaluar la capacidad antioxidante total se encuentra el método ORAC que recurre a la fluoresceína como la molécula blanco (Wu y col., 2004). La capacidad antioxidante de los extractos crudos, ricos en polifenoles (EP), ricos en antocianinas (ERA) y ricos en proantocianidinas (ERP) es mostrada en el **Cuadro 18**. La capacidad antioxidante de extractos crudos en los genotipos de zarzamora se encontró de 169.9 a 361.9 $\mu\text{mol ET/g bs}$. El genotipo de zarzamora silvestre ZS-3 tuvo la mayor ($p < 0.05$) capacidad antioxidante mientras que, en el genotipo comercial “Tupy” se observó la menor capacidad antioxidante en este estudio. Los valores de ORAC obtenidos en nuestros extractos crudos son similares a los rangos (139.1 a 432.4 $\mu\text{mol ET/g bs}$) reportados para otras variedades de zarzamoras comerciales cultivadas en diferentes regiones de EUA y

Cuadro 18. Capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de zarzamora silvestre, comercial y mejorada colectada en México.

Genotipo	Capacidad antioxidante (ORAC) ($\mu\text{mol ET/g}$ base seca (bs))			
	Extractos de zarzamora			
	Crudo (EC)	Polifenoles (EP)	Antocianinas (ERA)	Proantocianidinas (EPA)
ZS-10	271.9 \pm 12.2 ^d	4,038.5 \pm 71.4 ^a	5,761.3 \pm 154.6 ^a	4,201.4 \pm 2.4 ^c
ZS-7	240.8 \pm 12.2 ^d	2,407.4 \pm 130.2 ^c	3,562.3 \pm 264.3 ^c	3,512.4 \pm 50.6 ^e
ZS-11	261.5 \pm 12.0 ^c	2,524.8 \pm 65.2 ^c	2,381.5 \pm 346.2 ^d	4,395.7 \pm 9.5 ^c
ZS-3	361.9 \pm 7.7 ^a	2,534 \pm 130.2 ^c	3,430.8 \pm 225.1 ^c	3,926.1 \pm 18.8 ^d
Tupy*	169.9 \pm 7.1 ^e	3,367.7 \pm 122.6 ^b	5,205.6 \pm 282.1 ^b	4,686.3 \pm 173.2 ^b
Mejorada**	287.5 \pm 14.0 ^b	4,158.7 \pm 92.6 ^a	3,519.3 \pm 189.8 ^c	5,161.93 \pm 6.6 ^a

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$), $n = 4$, ORAC: capacidad de atrapar radicales oxígeno, $\mu\text{mol ET}$: micromoles equivalentes de Trolox; EC: extracto crudo, EP: extracto rico en polifenoles, ERA: extracto rico en antocianinas, EPA: extracto rico en proantocianidinas, ZS = genotipos de zarzamoras silvestres, *variedad comercial “Tupy”; **Mejorada = Línea de zarzamora mejorada UM-601.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

México (Reyes-Carmona y col., 2005; Acosta-Montoya y col., 2010). Sin embargo, nuestros extractos presentan valores de ORAC mayores a los reportados por otros investigadores (Hanger y Prior, 2008) de 56.7 a 97.2 $\mu\text{mol ET/g bs}$ en zarzamoras cultivadas en el este de EUA.

La capacidad antioxidante de los extractos de zarzamora purificados (EP, ERA y ERP) se incrementó ($p < 0.05$) significativamente, en comparación con los extractos crudos correspondientes (**Cuadro 18**). El procedimiento de purificación permitió concentrar los polifenoles, lo que dió lugar a un incremento significativo en la capacidad antioxidante de los extractos concentrados. Los extractos ricos en polifenoles de los genotipos de zarzamora mostraron valores de ORAC entre 8.3 a 19.8 veces mayor que los encontrados en los extractos crudos.

La capacidad antioxidante de los extractos ricos en polifenoles de zarzamora varió de 2,407.4 a 4,158.7 $\mu\text{mol ET/g bs}$, siendo los materiales de zarzamora mejorada UM-601 y silvestre ZS-10 quienes tuvieron los valores de ORAC más altos ($p < 0.05$). Mientras que, actividad antioxidante de extractos de zarzamora ricos en antocianinas fue de 9.1 a 60.6 veces superior a los extractos crudos, el extracto de zarzamora silvestre ZS-10 mostró mayor ($p < 0.05$) capacidad antioxidante comparado con todos los otros materiales. La misma tendencia se observó en extractos de zarzamora rica en proantocianidinas, mostrando capacidades antioxidante entre 10.8 a 27.6 veces superior a la de los extractos crudos correspondientes. La capacidad antioxidante en extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas varió de 3,512.4 a 5,161.9 $\mu\text{mol ET/g bs}$, el extracto de zarzamora mejorada UM-601 fue el que tuvo mayor ($p < 0.05$) capacidad antioxidante entre las zarzamoras evaluadas.

Es interesante observar que las concentraciones de polifenoles totales en los extractos de zarzamora purificados fueron aproximadamente de 6.2, 12.8 y 26.6 veces mayor que el extracto de zarzamora crudo, respectivamente (**Cuadro 18**). La capacidad antioxidante (valores ORAC) de extractos de zarzamora (ricos en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas) de la mayoría de los genotipos fue comparable. Esto se puede deber a la presencia de otros compuestos fenólicos en los extractos y las proporciones de compuestos que son antioxidantes activos que pueden tener actividad antioxidante aditiva o sinérgica con antocianinas y proantocianinas (Prior y Gu, 2005). La capacidad antioxidante varía de manera significativa entre los diferentes cultivares de frutillas, y ésta, se ha correlacionado con el

contenido de compuestos fenólicos (Pantelidis y col., 2007). Los compuestos fenólicos más comunes en frutillas son: antocianinas, ácidos fenólicos, proantocianidinas, elagitaninos, vitamina C que en conjunto son los principales responsables de la capacidad antioxidante (Prior y col., 1998; Ehlenfeldt y Prior, 2001; Seeram y col., 2006; Pantelidis y col., 2007; Stoner y col., 2008; Vasco y col., 2009; Acosta-Montoya y col., 2010; Schreckinger y col., 2010). El presente estudio nos permite indicar que las zarzamoras cultivadas en México son una fuente rica en compuestos fenólicos y antioxidantes, sugiriendo el uso potencial de estos frutos como un aditivo alimenticio.

C BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE ZARZAMORA

1 Efecto de extractos de zarzamora sobre la actividad antimutagénica.

El ensayo antimutagénico de Ames es una prueba de tiempo corto y se utiliza para determinar el efecto mutagénico o antimutagénico de un compuesto y para explicar el mecanismo de acción de compuestos potencialmente tóxicos. El sistema de reversión *Salmonella typhimurium* (his), es un ensayo microbiológico que mide la reversión de histidina- a histidina+ inducida por agentes químicos (mutágenos). El sistema induce cambios de pares de bases o del marco de lectura en el genoma del microorganismo y las cepas pueden crecer en un medio de cultivo carente de histidina.

La actividad mutágena de los extractos de zarzamora se evaluó contra cambios de pares de bases o corrimiento del marco de lectura de *Salmonella typhimorium* sin activación metabólica (**Cuadro 19**). El número de colonias revertantes en el control negativo varió de 28.5 a 37.7 para todos los extractos de los genotipos de zarzamora evaluados en este estudio. No se observaron diferencias significativas entre el control negativo y las células tratadas con extractos de zarzamora (en todos los genotipos), lo que indicó que dichos extractos no fueron mutagénicos contra la cepa del ensayo a una concentración de 10 μ M en ausencia de activación metabólica. Estos resultados permitieron mostrar que los extractos obtenidos a través del proceso de purificación con las resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 de los genotipos de zarzamora no causaron genotoxicidad *in vitro* en *Salmonella typhimorium*.

El efecto de la actividad antimutagénica de los extractos ricos en polifenoles, ricos en antocianinas y ricos en proantocianidinas de los genotipos de zarzamora colectadas en México se muestran en la **Figura 13**. Como se puede observar los extractos de zarzamora (EP, ERA y

Cuadro 19. Toxicidad/mutagenicidad de extractos de polifenoles de zarzamoras silvestres, comercial y mejorada cultivadas en México.

Genotipo	Mutagenicidad de extractos de zarzamora					
	EP No. revertantes	MI	ERA No. Revertantes	MI	ERP No. revertantes	MI
ZS-3	31.5 ± 7	0.9	33.5 ± 7	1.0	32.2 ± 3	0.9
ZS-7	33.6 ± 7	1.0	34.7 ± 3	1.0	32.3 ± 5	0.9
ZS-10	32.8 ± 6	0.9	37.7 ± 5	1.1	30.8 ± 4	0.9
ZS-11	32.0 ± 5	0.9	33.5 ± 8	1.0	31.0 ± 2	0.9
Tupy	32.8 ± 5	1.0	33.8 ± 4	1.0	28.5 ± 3	0.8
Mejorado	30.8 ± 6	0.9	34.7 ± 2	1.0	32.3 ± 7	0.9

Los valores son expresados como No. revertantes espontáneas/ placa, media ± SD n = 2. El número de revertantes espontáneas en el control negativo fue de 33.83 ± 7.70. MI: índice mutagénico. ZS = genotipos de zarzamoras silvestres, comercial: variedad comercial “Tupy”, mejorada: Línea de zarzamora mejorada UM-601. EP: extracto rico en polifenoles, ERA: extracto rico en antocianinas, ERP: extracto rico en proantocianidinas.

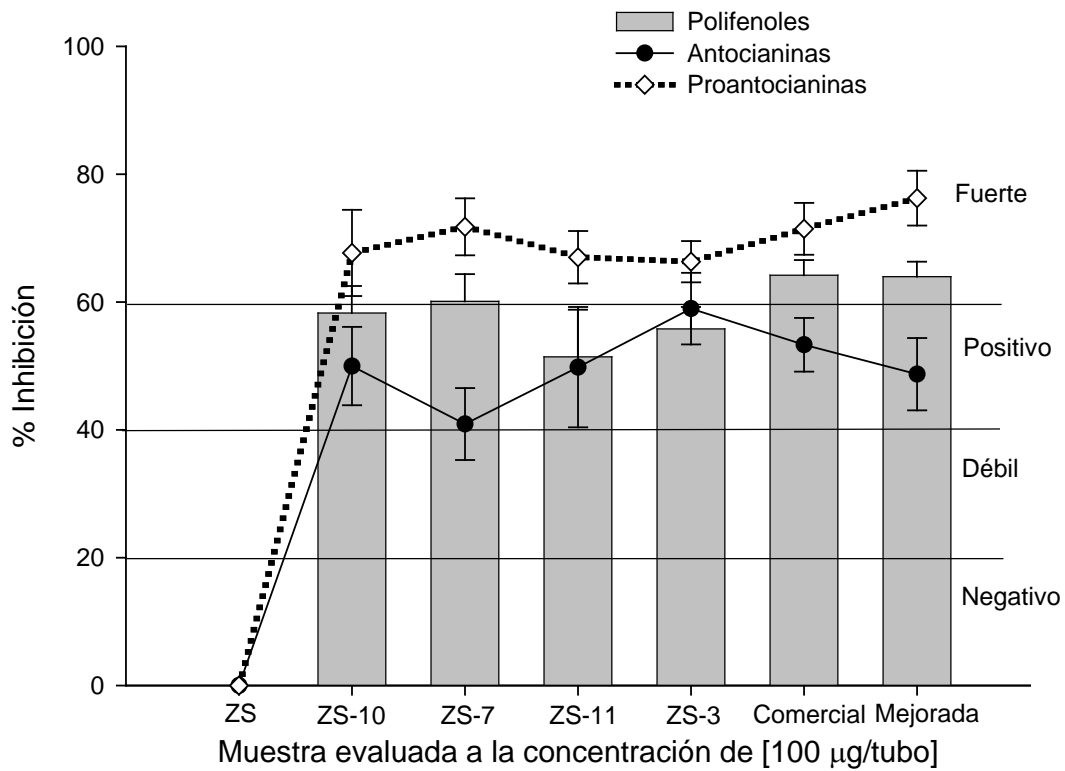


Figura 13. Actividad antimutagénica de extractos de zarzamora.

EPA) inhiben la mutagenicidad inducida por el mutágeno 1-nitropireno en la cepa de *Salmonella typhimorium* YG1024, esta mutagenicidad varió desde una inhibición moderada (positiva) a fuerte, dependiendo del tipo de extracto. Un efecto inhibitorio fuerte se mostró en los extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas, seguido por una inhibición moderada de extractos de zarzamora ricos en polifenoles y ricos en antocianinas de acuerdo a la escala reportada por Wall y col (1998).

La actividad antimutagénica de los genotipos de zarzamora de extractos ricos en polifenoles estuvieron en un rango de 51 a 64%, los genotipos de zarzamora comercial “Tupy” y mejorado UM-601 mostraron mayor ($p<0.05$) actividad antimutagénica. Mientras que en extractos ricos en antocianinas el efecto antimutagénico varió de 41 a 59%, mostrando la mayor ($p<0.05$) actividad antimutagénica para el extracto del genotipo de zarzamora silvestre ZS-3. Con respecto a los extractos ricos en proantocianidinas la actividad antimutagénica se presentó en un rango de 66 a 76%, donde el extracto rico en proantocianidinas de zarzamora mejorada UM-601 mostró la mayor ($p<0.05$) actividad, seguido de zarzamora comercial “Tupy” y silvestre ZS-7.

Los nitroarenos como 2-nitrofluoreno, 1-8 dinitropireno y 1-nitropireno son potentes mutágenos presentes en diesel, emisiones de gasolina, partículas de ceniza, humo de cigarro condensado, emisiones de calentadores caseros y la atmósfera urbana. Se ha establecido que este tipo de compuestos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos, los cuales son capaces de oxidar biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (Sing y col., 2009); estas oxidaciones juegan un papel muy significativo en el desarrollo de enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Kuroda y Hara, 1999; Dai y col., 2007; Pan y col., 2008; Fernández-Panchón y col., 2008; Sing y col., 2009). La actividad antimutagénica se ha asociado con el contenido de compuestos polifenólicos como ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ferúlico, cafeico, siríngico, vanílico, gentísico, saponinas, antocianinas y taninos presentes en alimentos (Belicova y col., 2001; Smith y col., 2004; Birosova y col., 2005). En estudios *in vivo* Stoner y col., (1995) indicaron que el ácido elágico es uno de los compuestos fenólicos presentes en frutillas y que este compuesto es activo en carcinomas de esófago. En un extracto rico en taninos hidrolizables de fresa se reportó una inhibición de la mutagenicidad del 65% en una cepa de *Salmonella typhimorium* TA100 (Smith y col., 2004).

Los datos son consistentes con diversos reportes donde muestran que los elagitaninos pueden ser inhibidores efectivos de tumores en las etapas de iniciación y promoción de diversos tipos de cánceres humanos (Barch y col 1996; Smith y col., 2004).

Por otro lado, en extractos ricos en antocianinas de variedades comerciales de fresa y arándanos se inhibió la mutagenicidad inducida por MMS (metil-metanosulfonato) 83, 24 y 43%, respectivamente a una concentración de mutágeno:extracto de 1:12. Asimismo, otro estudio de extractos ricos en antocianinas de arándanos inhibieron la mutagenicidad 49 y 48% inducida por benzo[a]pireno en la cepa *Salmonella typhimorium* TA100 a una concentración de mutágeno:extracto de 1:27 (Smith y col., 2004).

Los extractos ricos en proantocianidinas en la presente investigación mostraron la mayor efectividad inhibiendo las mutaciones inducidas con 1-nitropireno. Estos resultados indican que los compuestos fenólicos presentes en los diferentes extractos de zarzamora pueden revertir efectivamente mutaciones inducidas por el mutágeno 1-nitropireno en cepas de *Salmonella typhimorium* YG1024 y la presencia de antocianinas, proantocianidinas y las mezclas de ellos, podría explicar el efecto antimutagénico.

2. Efecto antiinflamatorio de extractos de zarzamora colectadas en México

a Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7

Los extractos de zarzamora, a una concentración de 100 μ M equivalentes de cianidina-3-glucósido y catequina, no afectaron la viabilidad de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7, debido a que el porcentaje de viabilidad fue semejante al control negativo (solución amortiguadora de fosfatos). Datos no mostrados. Por lo tanto, los efectos inhibitorios no fueron atribuidos a la citotoxicidad.

b Efecto de extractos polifenólicos de zarzamora sobre la producción de ON y expresión de iNOS

El óxido nítrico es un radical libre implicado en carcinogénesis, obesidad, diabetes, entre otras enfermedades. Es un radical de corta vida (6-9 segundos) sintetizado a partir de L-arginina (Mantovani y col., 2008; Reuter y col., 2010) por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS, las isoformas constitutivas neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) que producen cantidades pequeñas de óxido nítrico, el cual actúa como un neurotransmisor y vasodilatador, respectivamente (Wu y Meininger, 2002; Kolb-Bachofen y col., 2006; Reuter y col., 2010). Sin embargo, la isoforma inducible (iNOS) produce

concentraciones mucho más elevadas de óxido nítrico, el cual puede producir especies reactivas de nitrógeno. iNOS enzima que solamente es expresada durante la inflamación y puede ser inducida por citosinas como interferon- γ , IL-1 y lipopolisacáridos (LPS) (Xie y col., 1994; Sharma y col., 2007).

Algunos compuestos flavonoides y otros polifenólicos han mostrado que tienen un efecto sobre la síntesis de óxido nítrico y la expresión de iNOS (Chen y col., 2001). Por lo tanto, evaluamos los efectos de extractos de zarzamora sobre la síntesis de ON y la expresión de la proteína iNOS en macrófagos, estimulados con LPS. Diversos extractos de zarzamora (EP, ERA y ERP) (**Figura 14A, 15A y 16A**) inhibieron la producción de ON hasta 22% a concentraciones de 0.5 y 5 μ M. A concentraciones de 50 μ M, la inhibición de ese marcador proinflamatorio para todos los extractos de zarzamora se incrementó significativamente ($p < 0.05$) comparada con los macrófagos estimulados con LPS (control positivo).

En la **Figura 14A** se observa que los extractos ricos en polifenoles a concentraciones de 0.5, 5 y 50 μ M inhibieron la producción de ON en un rango de -13.9 a 71.8%, los extractos de zarzamora ZS-10 a concentraciones de 0.5 y 50 μ M (equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido) mostraron la menor y mayor inhibición de ON. La concentración inhibitoria (IC_{50}) de extracto rico en polifenoles sobre la producción de ON fue de 17.5 a 39.9 μ M, el extracto de la zarzamora comercial “Tupy” mostró el menor IC_{50} (**Cuadro 20**). Mientras tanto, la inhibición de la expresión de iNOS por los extractos ricos en polifenoles de zarzamora mostraron un rango de inhibición de la expresión de iNOS de 4.8 a 81.4% (**Figura 14 B**), con un IC_{50} de 15.9 μ M para el extracto de la zarzamora comercial “Tupy” y de 28.3 μ M para el extracto ZS-3 (**Cuadro 20**). El extracto rico en polifenoles de la zarzamora mejorada tuvo el menor IC_{50} sobre la inhibición de iNOS.

Para los extractos ricos en antocianinas de los diferentes genotipos se encontró una inhibición de ON de 7.2 a 92.0% (**Figura 15 A**), el extracto de la zarzamora mejorada UM-601 (0.5 μ M) mostró la menor inhibición de ON y el extracto de la zarzamora ZS-3(50 μ M) el mayor porcentaje de inhibición en los macrófagos estimulados con LPS. El índice de concentración inhibitoria (IC_{50}) de estos extractos fue de 16.1 a 25.5 μ M equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido, el extracto de la zarzamora silvestre ZS-10 fue la que mostró el menor IC_{50} (**Cuadro 20**) sobre la inhibición de producción de ON. Para la inhibición de la expresión de la enzima iNOS, los extractos ricos en antocianinas mostraron un porcentaje de

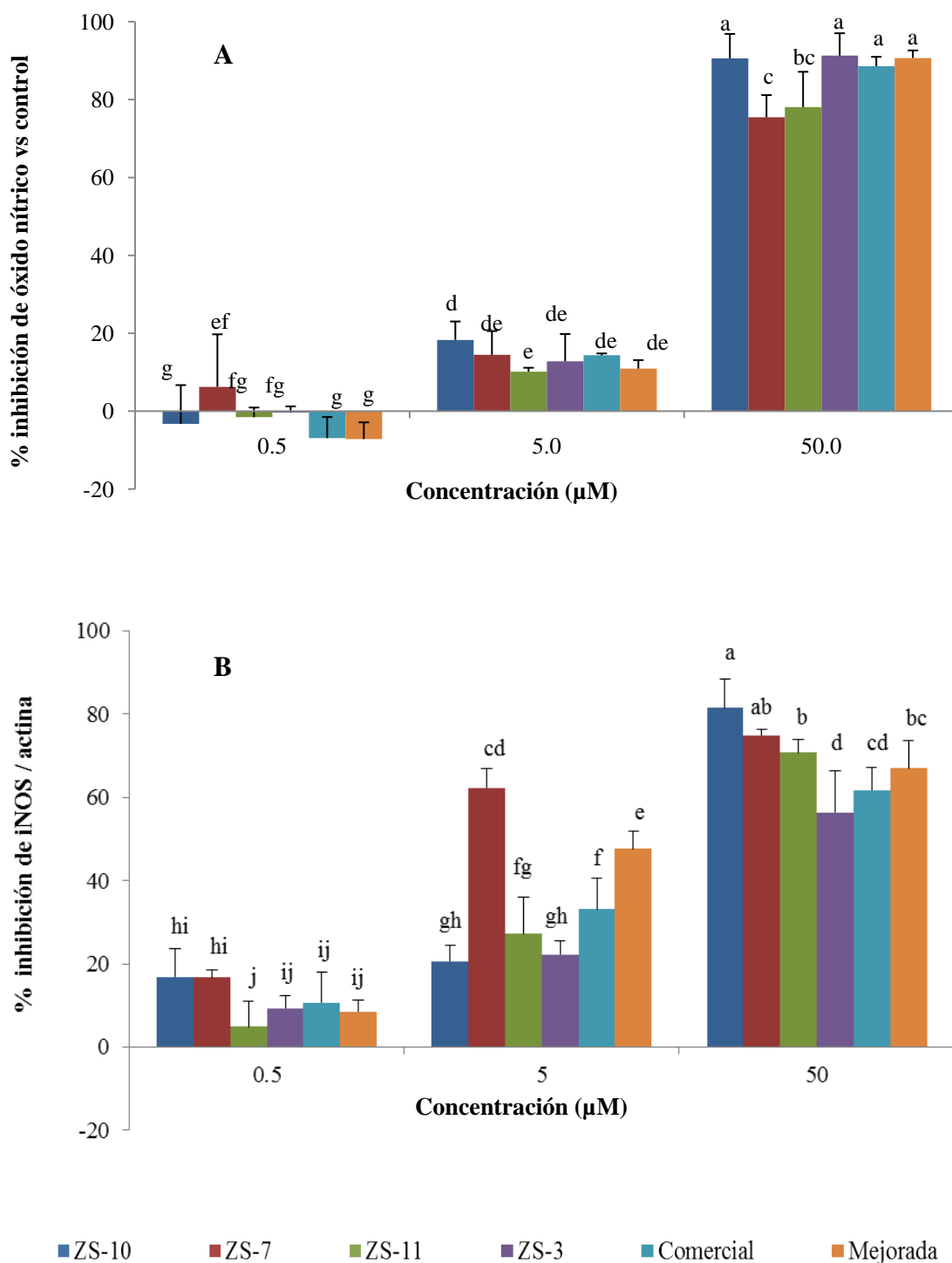


Figura 14. Porcentaje de inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 de extractos de zarzamora ricos en polifenoles. Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

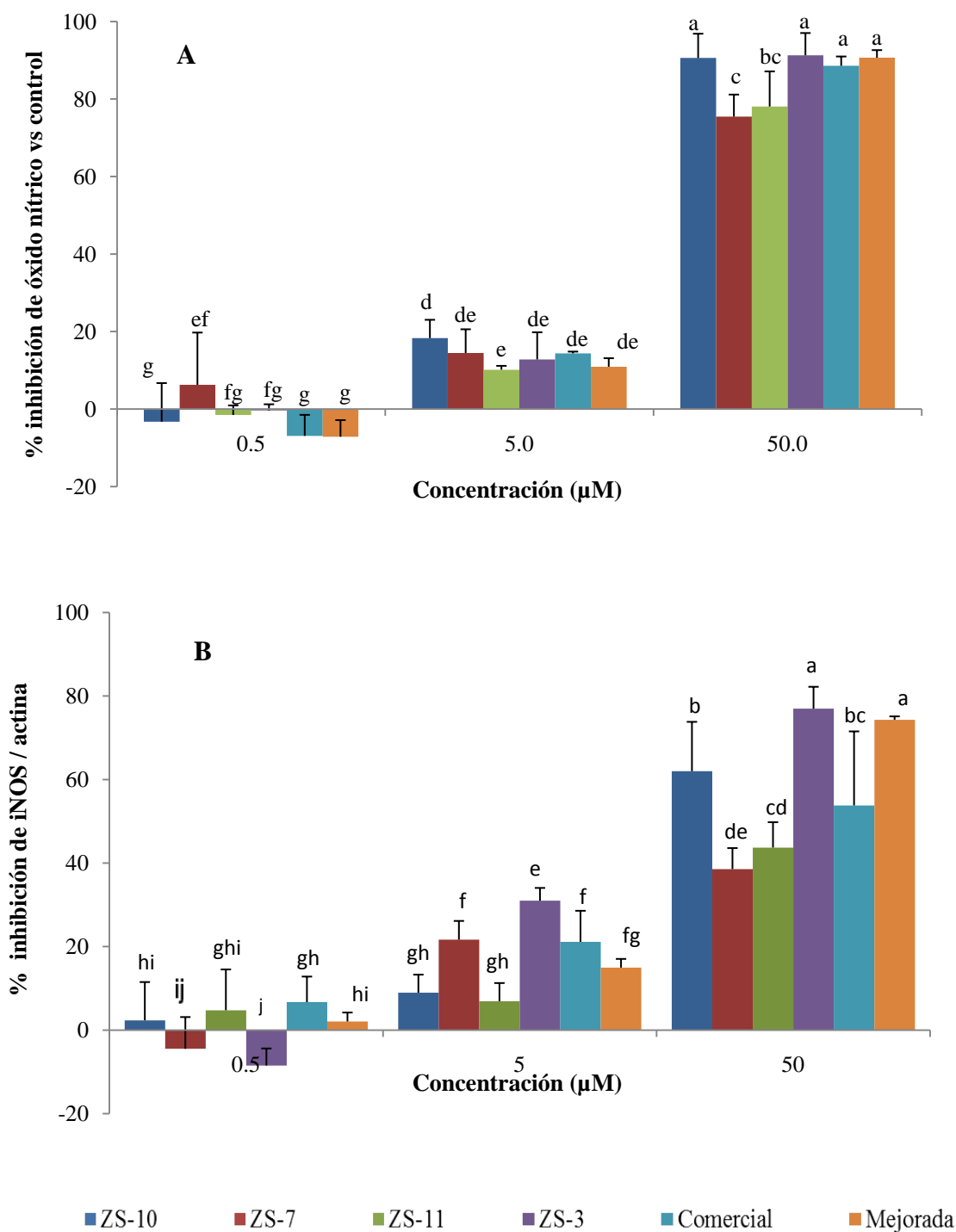


Figura 15. % inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 de extractos de zarzamora ricos en antocianinas.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

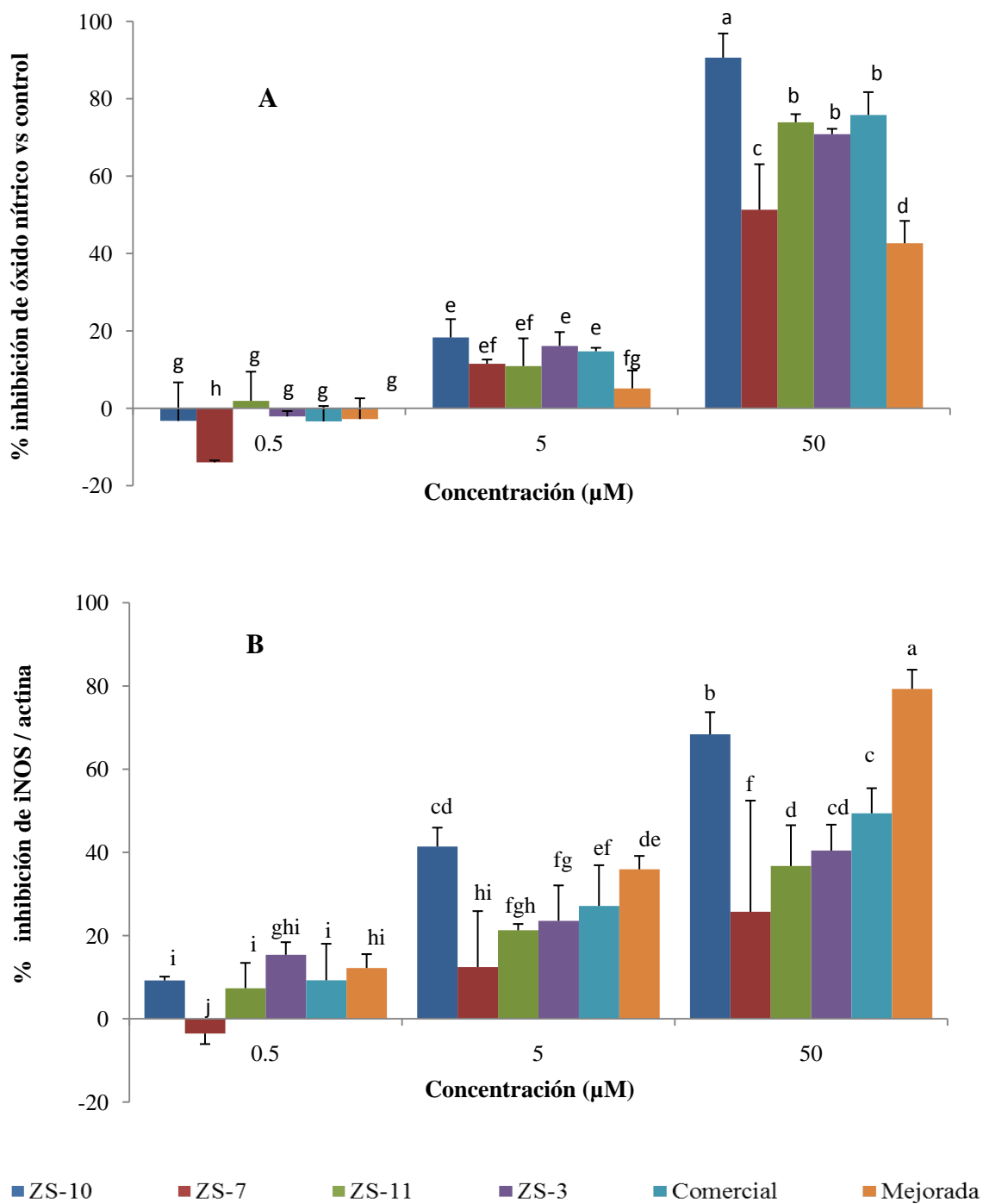


Figura 16. % inhibición de producción de óxido nítrico (A) y expresión de iNOS (B) en macrófagos RAW 264.7 de extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

Cuadro 20. Concentración inhibitoria de respuestas proinflamatorias (IC₅₀) para extractos de zarzamoras silvestres, mejorada y comercial cultivada en México.

Muestra	IC ₅₀ [μM equivalente C3G (EP y ERA) o equivalente catequina (ERP)]								
	Extractos ricos en polifenoles (EP)			Extractos Ricos en antocianinas (ERA)			Extractos ricos en proantocianidinas (ERP)		
	ON	iNOS	COX-2	ON	iNOS	COX-2	ON	iNOS	COX-2
ZS-10	28.8	21.8	25.0	16.1	36.3	32.3	19.0	8.3	45.7
ZS-7	28.2	24.5	19.1	27.5	38.9	>50	33.1	>50	>50
ZS-11	30.9	28.2	22.0	24.7	> 50	>50	29.5	>50	>50
ZS-3	39.9	28.3	35.0	22.3	> 50	>50	21.4	>50	>50
Tupy	17.5	19.0	20.0	17.8	10.6	22.5	20.9	48.9	28.9
Mejorada	26.7	15.9	19.3	19.8	24.5	28.6	15.1	25.1	34.6

IC₅₀: Concentración (μM) que muestra el 50% de reducción/expresión de respuestas proinflamatorias, n=4. ON= oxido nítrico; iNOS= óxido nítrico sintasa inducible; COX-2= ciclooxigenasa-2; Comercial: Variedad Tupy; Mejorada: UM-601 ZS: se refiere a los genotipos silvestres. La concentración de polifenoles en extractos crudos (EC) fue muy baja y no se observaron efectos para los ensayos incluidos.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

inhibición de la expresión de la proteína de -8.5 a 76.9% (**Figura 15 B**). La menor inhibición de la expresión de iNOS a concentración de 50 μM fue para el extracto de la zarzamora ZS-7, seguido en orden ascendente por ZS-11, comercial “Tupy”, ZS-10, cultivada UM-601 y ZS-3. Para estos extractos la menor concentración inhibitoria (IC_{50}) calculada fue para el extracto de la zarzamora comercial “Tupy” (10.6 μM) mientras que el IC_{50} de los extractos ZS-11 y ZS-3 fue mayor de 50 μM (**Cuadro 20**). La inhibición de la producción de ON en los macrófagos podría ser explicado por la interferencia de cianidina-3-*O*-glucósido con la vía de señalización de la inflamación, debido a la capacidad de atrapamiento de especies reactivas de oxígeno que tiene esta antocianina (Hori y col., 2001).

Con respecto a los extractos ricos en proantocianidinas, los porcentaje de inhibición de ON a concentraciones de 0.5, 5 y 50 μM variaron de -13.9 a 90.6%, los extractos de las zarzamoras ZS-7 y ZS-10 fueron las que presentaron menor y mayor porcentaje de inhibición a 0.5 y 50 μM , respectivamente (**Figura 16A**). Los valores de IC_{50} fueron desde 15.1 μM equivalentes de catequina para la zarzamora mejorada UM-601 a 33.1 μM para la zarzamora ZS-7 (**Cuadro 20**). Para el proceso de inhibición de la expresión de iNOS de estos extractos, los rangos variaron de -5.5 a 79.3% (**Figura 16B**) en las concentraciones probadas, los extractos de las zarzamoras ZS-7 y mejorada UM-601 mostraron el menor y mayor porcentaje de inhibición de expresión de iNOS, respectivamente. Además, se encontró que el menor valor de IC_{50} fue de 8.3 μM para el extracto ZS-10 (**Cuadro 20**), mientras que los extractos ZS-7, ZS-11 y ZS-3 obtuvieron valores de IC_{50} mayores de 50 μM equivalentes de catequina.

La expresión de iNOS puede producir más de 1000 veces ON, molécula de señalización que juega un papel clave en la patogénesis de la inflamación y es considerada como mediador proinflamatorio cuando hay una sobreproducción en situaciones anormales (Awargal., 2009; Dia y col., 2009; Yoon y col., 2005). Pergola y col. (2006) reportaron que al menos una parte de la actividad antiinflamatoria de extractos ricos en antocianinas de zarzamora se debió a la inhibición de producción de ON llevada a cabo por cianidina-3-*O*-glucósido ya que fue el principal polifenol presente en los extractos de zarzamoras. Debido a que iNOS es una enzima responsable de la sobreproducción de ON durante la inflamación (Agarwal y col., 2009; Dia y col., 2009; García-Lafuente y col., 2009; Wang y col., 2002),

los compuestos que son capaces de disminuir la producción de ON sin afectar las isoformas eNOS o nNOS (isoformas de la enzima NOS) podrían ser deseables como agentes antiinflamatorios (García-Lafuente y col., 2009).

1) Correlación de capacidad antioxidante y porcentaje (%) de inhibición de óxido nítrico

La capacidad antioxidante y la inhibición de la producción de ON fueron correlacionadas significativamente para algunos de los extractos ricos en polifenoles (**Cuadro 21**), lo que indica que varias clases de compuestos fenólicos de extractos de zarzamora presentan la capacidad de atrapar radicales peróxido y radicales anión superóxido. Los valores de ORAC en extractos ricos en antocianinas (ERA) fueron altamente correlacionados con la producción ON, por ejemplo, zarzamora silvestre ZS-11 ($R^2 = 0.91$), comercial “Tupy” ($R^2 = 0.91$) y mejorada UM-601 ($R^2 = 0.96$). Para los extractos ricos en proantocianinidas una alta correlación solamente se observó para tres genotipos, ZS-3 ($R^2 = 0.96$), comercial “Tupy” ($R^2 = 0.86$) y mejorada UM 601 ($R^2 = 0.96$).

Cuando los flavonoides son utilizados como antioxidantes, las especies reactivas de oxígeno son atrapados y por lo tanto ya no pueden reaccionar con el ON, dando como resultado un menor daño celular. Además, las moléculas de ON pueden ser vistas como un radical, las cuales, se han reportado que podrían ser atrapadas directamente por flavonoides (Pergola y col., 2006). Wang y Mazza (2002) reportaron una correlación significativa entre la inhibición de ON con el contenido de categorías individuales de compuestos fenólicos presentes en frutillas.

c Efecto de extractos polifenólicos de zarzamora sobre la producción de PGE₂ y expresión de COX-2

Las ciclooxigenasas (COX) son enzimas que producen prostaglandinas (PGE₂) y tromboxanos a partir del metabolismo del ácido araquidónico en muchas células (Rodríguez-Tellez y col., 2001). La ciclooxigenasa existe en dos isoformas COX-1 y COX-2. COX-1, es una enzima constitutiva existente en casi todo tipo de célula, mientras que COX-2 es una enzima inducible que produce grandes cantidades de prostaglandinas y es altamente expresada en células relacionadas con la inflamación cuando éstas son estimuladas por citosinas proinflamatorias y/o lipopolisacáridos bacterianos (García-

Cuadro 21. Análisis de coeficiente de correlación (R^2) de la capacidad antioxidante e (%) inhibición de óxido nítrico para diferentes extractos de zarzamora silvestre, comercial y mejorada cultivada en México, a una concentración de 50 μ M.

	Capacidad antioxidante/ Inhibición de ON		
	EP	ERA	ERP
ZS-10	0.826*	0.658	0.287
ZS-7	0.812**	0.848	0.466
ZS-11	0.578	0.918*	0.778
ZS-3	0.823*	0.410	0.966*
Comercial	0.996**	0.918*	0.865*
Mejorada	0.941**	0.960**	0.966*

Dentro de una columna, valores de R^2 con * y ** son significativos a $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. EP: extracto rico en polifenoles (extracto post-Amberlite); ERA: extracto rico en antocianinas; ERP: extracto rico en proantocianidinas; ZS: se refiere a los genotipos silvestres; Comercial: variedad “Tupy”, Mejorada: UM-601.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

Lafuente y col., 2009). Algunos flavonoides como: luteolina, morina, galangina fueron los primeros flavonoides que se describieron como inhibidores de COX (Bauman y col., 1980). Los efectos de extractos de zarzamora a diferentes concentraciones (0.5, 5 y 50 μM) sobre la inhibición de la expresión de COX-2, en macrófagos RAW 264.7 inducida por LPS son mostrados en la **Figura 17 y 18**. Para los extractos ricos en polifenoles a concentraciones 0.5 y 5 μM , la inhibición de la expresión de la proteína COX-2 varió de 2.61 a 50.9 % (**Figura 17 A**). Los macrófagos tratados con extractos de zarzamora ricos en polifenoles con una concentración 50 μM del extracto mostraron incrementos significativos ($p < 0.05$) en la inhibición de expresión de COX-2 (**Figura 17 B**), donde la inhibición de la proteína COX-2 fue de 49.8 a 75.6%. EL extracto de zarzamora comercial y ZS-10 mostraron mayor y menor inhibición de la expresión de COX-2, respectivamente (**Figura 17A**). El extracto del cultivar silvestre ZS-7 mostró la menor concentración inhibitoria contra COX-2 con un $\text{IC}_{50} = 19.1 \mu\text{M}$ equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido (**Cuadro 20**), seguido de la zarzamora mejorada UM-601 ($\text{IC}_{50} = 19.3 \mu\text{M}$ equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido), comercial (20.0 μM) mientras que los demás cultivares obtuvieron un IC_{50} mayor de 22 μM (**Cuadro 20**).

Dentro de los extractos ricos en antocianinas a concentración 50 μM , la inhibición de COX-2 fue de 33.1 a 60.8 % (**Figura 17 B**), siendo extracto de zarzamora ZS-10 quien llevó a cabo la mayor inhibición de la expresión de COX-2. El índice de concentración inhibitoria para los extractos ricos en antocianinas estuvo en un rango de 22.5 a <50 μM , la zarzamora mejorada fue quien presento menor IC_{50} mientras que los genotipos ZS-7, ZS-11 y ZS-3 tuvieron IC_{50} mayores de 50 μM (**Cuadro 20**).

En los extractos ricos en proantocianinas a concentraciones de 0.5 y 5 μM el porcentaje de inhibición de la expresión de COX-2 estuvo en un rango de 7.1 a 39.9%, sin embargo a 50 μM , la expresión de la proteína varió de 44.6 % a 71.7 % (**Figura 18**). La concentración inhibitoria de estos extractos se encontró en un rango de 28.9 a >50 μM . El extracto rico en proantocianidinas de la zarzamora comercial “Tupy” presentó menor IC_{50} (**Cuadro 20**). Estudios previos han mostrado que las antocianinas tienen un efecto inhibitorio sobre COX 1 y COX-2. La aglicona cianidina tiene un efecto superior sobre la actividad de COX-1 y COX-2 comparada con las antocianinas cianidina-3-glucosilrutinosido y cianidina-3-rutinosido. Además, se ha mostrado que el estándar de

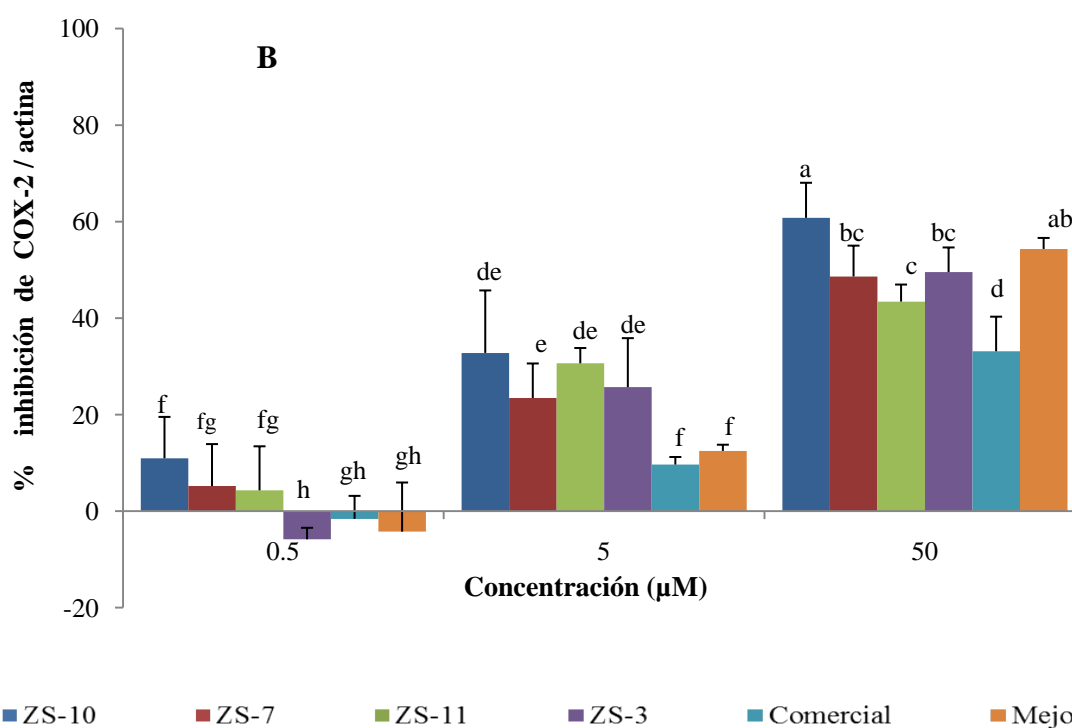
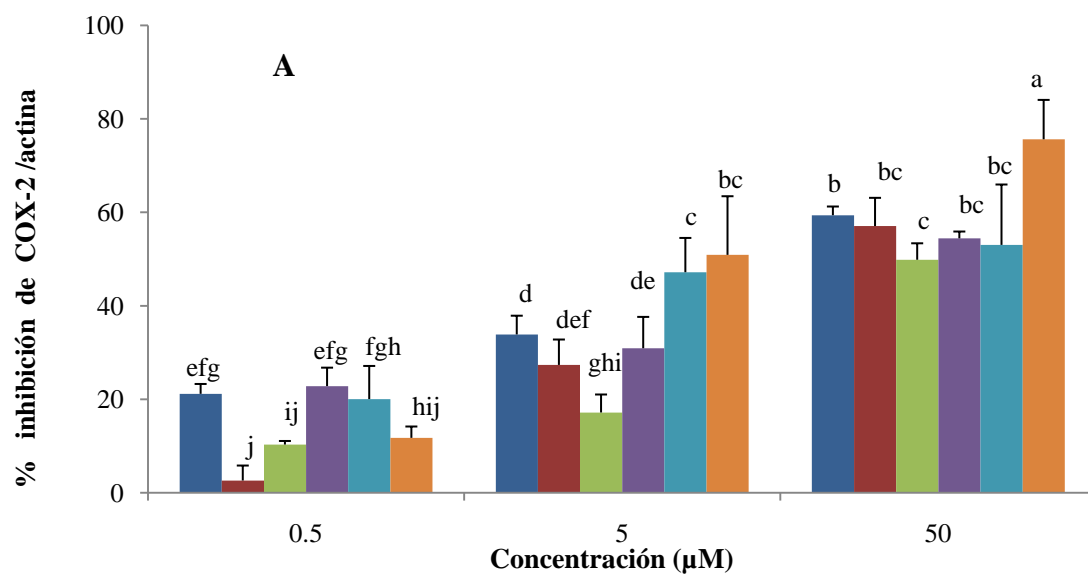


Figura 17. % de inhibición de la expresión de COX-2 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS de extractos de zarzamora ricos en polifenoles (A) y ricos antocianinas (B).

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

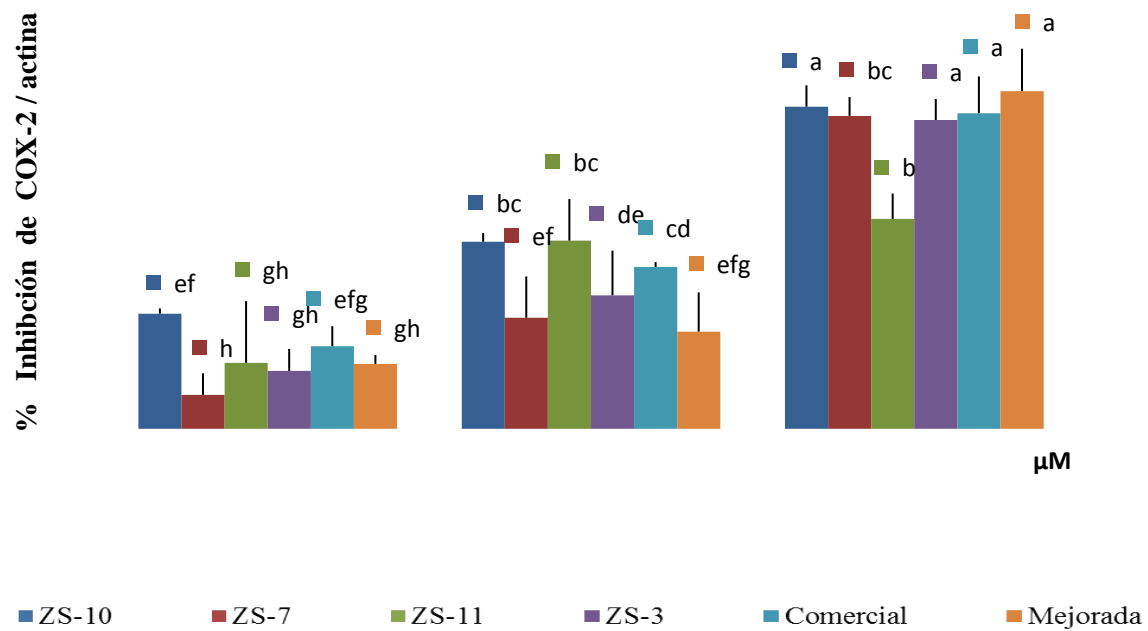


Figura 18. % de inhibición de la expresión de COX-2 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS de extractos de zarzamora ricos en proantocianidinas.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

cianidina es más activo sobre la inhibición de COX-1 y COX2 cuando es comparado con malvidina, peonidina, pelargonidina y delphinidina (Wang y col., 1999; Seeram y col., 2001; Seeram y col., 2003).

Los efectos de los extractos de zarzamora a una concentración de 50 μ M sobre la inhibición de producción de prostaglandinas (PGE_2) en macrófagos RAW 264.7 inducida por LPS se muestran en la **Figura 19**. Para los extractos de zarzamora ricos en polifenoles, la inhibición de producción de PGE_2 varió de 28.0 a 51.6%. Los extractos ricos en antocianinas de zarzamora mejorada UM-601, comercial “Tupy” y silvestre ZS-10 mostraron mayor inhibición de producción de PGE_2 comparados con los demás extractos (ZS-3, ZS-7, ZS-11, extractos ricos en polifenoles y proantocianidinas) de zarzamora. Los extractos ricos en proantocianidinas fueron los que presentaron la menor inhibición de producción de prostaglandinas sobre los macrófagos (**Figura 19**). Diversas evidencias sugieren una asociación entre cáncer y COX-2 ya que, las prostaglandinas son mediadores de la inflamación y la presencia de inflamaciones crónicas predisponen a carcinogénesis (Marnett y Dubois, 2002). Estos hallazgos han mostrado un marcado incremento de COX-2 durante los procesos de inflamación (Lauritsen y col., 1989; Seril y col., 2003; Agarwal y col., 2009). Las isoenzimas COX están involucradas en el control de las reacciones de inflamación y catalizan la conversión del ácido araquidónico a PGH_2 (precursor de prostaglandinas) (Seeram y col., 2003). COX-1 es una enzima constitutiva y COX-2 es altamente inducible por estímulos inflamatorios, la inhibición de COX-1 puede dar como resultado la presencia de úlceras gástricas, así que, se ha incrementado la demanda de compuestos que inhiban selectivamente COX-2 con pocos efectos secundarios (Hori y col., 2001). Las antocianinas y proantocianidinas están implicadas con beneficios a la salud, estudios previos han mostrado que ejercen actividad antioxidante y antiinflamatorio *in vitro*, comparables a medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (Wang y col., 1999; Seeram y col., 2003; Mantovani y col., 2008). Las fracciones ricas en polifenoles de los genotipos silvestre ZS-7 y mejorado UM-601 fueron los inhibidores más potentes en la expresión de COX-2. Los resultados en este estudio muestran la capacidad de los diferentes extractos de polifenoles de zarzamora para inhibir las respuestas proinflamatorias en macrófagos (RAW 264.7) inducido por LPS, sugiriendo que estos compuestos de

zarzamora podrían ser utilizados para investigaciones posteriores por su potencial beneficio a la salud.

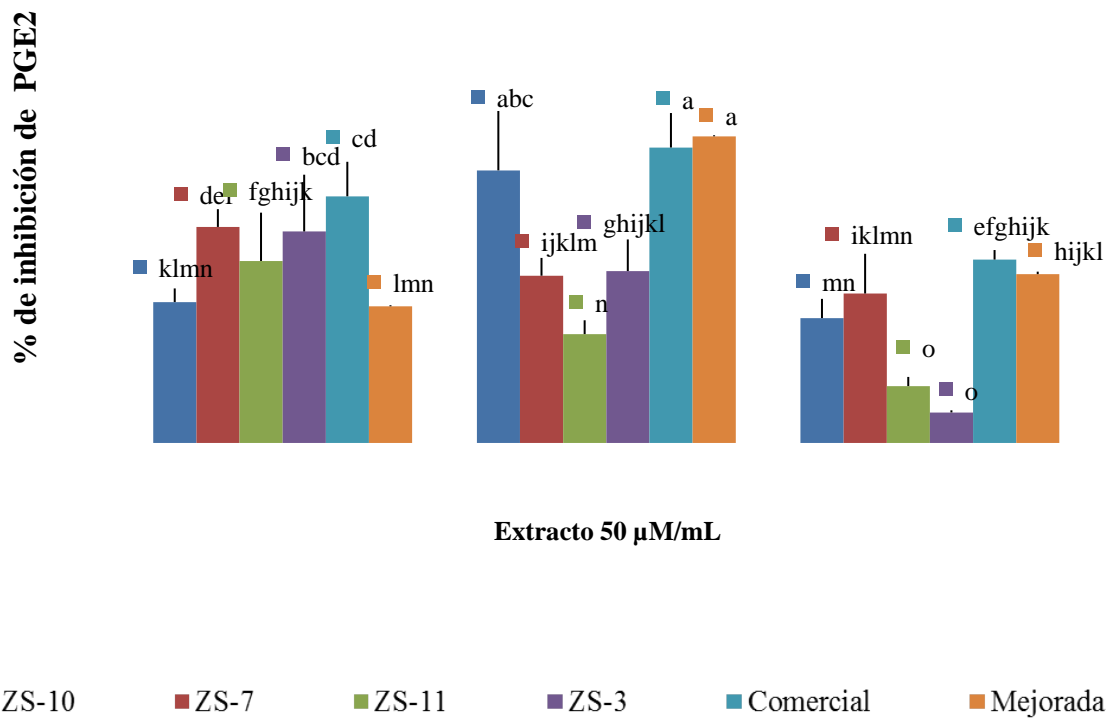


Figura 19. % de inhibición de producción de prostaglandinas (PGE2) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS de extractos de zarzamora.

Cuevas-Rodríguez y col., 2010b

VII. CONCLUSIONES

- ♣ Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron validar la metodología utilizada. En una primera etapa se logró el aislamiento y separación eficaz de polifenoles utilizando la tecnología de adsorción (columnas de fase sólida, resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20).
- ♣ Se logró la semipurificación de antocianinas, proantocianidinas y otros flavonoides de zarzamoras con la combinación de HPLC, LC-ESI-MS y MS/MS, técnicas que coadyuvaron a la separación, caracterización y cuantificación reproducible y confiable de los polifenoles presentes en las zarzamoras silvestres colectadas en México.
- ♣ Después de la purificación con Amberlite, las antocianinas se concentraron en promedio 12 veces en los extractos ricos en polifenoles con respecto a los extractos crudos.
- ♣ Después del proceso de separación con la resina Sephadex en los extractos ricos en antocianinas, estos compuestos procedentes de los materiales silvestres se concentraron entre 7.4 a 10.1 veces más, comparadas con el extracto del material comercial “Tupy”.
- ♣ Algunas de las fracciones (3,4, 5 y 8) ricas en antocianinas tuvieron concentraciones iguales y/o mayores de 750 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido/g bs (75% de la fracción fue de antocianinas), lo que facilitó la identificación y caracterización de las antocianinas.
- ♣ El análisis de HPLC y LC-MS/MS revela la presencia de cuatro principales antocianinas identificadas en los genotipos de zarzamora: cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido, cianidina-3-*O*-arabinósido y cianidina-3-*O*-(6-*O*-malonil)-glucósido; cianidina-3-*O*-glucósido fue el compuesto más abundante.
- ♣ El contenido promedio de proantocianidinas en las fracciones 10-12 de todos los genotipos de zarzamora silvestre varió entre 579.2 a 1,343.5 mg equivalentes de catequina/g bs.

- ♣ Las zarzamoras silvestres ZS-3 y mejorada UM-601 mostraron en promedio el doble del contenido de proantocianidinas en comparación con las zarzamoras silvestres ZS-7, ZS-10, ZS-11 y comercial “Tupy”.
- ♣ Los análisis de LC-MS/MS permitieron la identificación de diversos elagitaninos en las fracciones ricas en proantocianidinas (EPA) en todos los materiales de zarzamora, dichos compuestos incluyen: isómeros de pedunculagina, sanguina H-10, nobotanina A/malabatrina B, sanguina H-6/lambertianina A.
- ♣ Después del procedimiento de purificación a través de las resinas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20, la concentración de polifenoles totales en los extractos de zarzamora ricos en polifenoles, antocianinas y proantocianidinas en los seis cultivares de zarzamora evaluados se concentraron 5.9, 12.5 y 25.7 veces, respectivamente.
- ♣ En el ensayo ORAC la actividad antioxidante de los extractos semipurificados en todos los genotipos de zarzamora Mexicana se incrementó ($p < 0.05$) significativamente, para extractos ricos en polifenoles (9.9-11.2 veces), antocianinas (9.9-15.9 veces) y protoantocinidinas (14.3-16.3 veces) en comparación con los extractos crudos correspondientes.
- ♣ Los extractos ricos en proantocianidinas son los que presentaron mayor capacidad antimutagénica en la cepa de *Salmonella typhimorium* YG1024.
- ♣ Los extractos de compuestos fenólicos de zarzamora inhiben la producción de ON y prostaglandinas y la expresión de iNOS y COX-2 en macrófagos RAW 264.7 inducidos por lipopolisacáridos.
- ♣ Las fracciones ricas en polifenoles de los materiales ZS-7 y mejorado (UM-601) fueron los inhibidores más potentes en la expresión de COX-2.
- ♣ Los resultados combinados de este estudio sugieren que el consumo de zarzamoras en la dieta puede reducir el estrés oxidativo generado por ON y la expresión de proteínas proinflamatorias como iNOS y COX-2, incrementando así una protección del cuerpo humano contra enfermedades relacionadas con oxidación-inflamación.

♣ Las fracciones ricas en polifenoles de zarzamora podrían ser atractivas como agentes nutraceuticos. Debe tenerse en cuenta la fuerte bioactividad mostrada por las zarzadoras silvestres Mexicanas, así como el material mejorado UM-601.

♣ La principal aportación de este estudio es que detalla la caracterización de compuestos polifenólicos en diferentes materiales de zarzamora, después de la separación en tres principales grupos de polifenoles, conocidos por su potente bioactividad *in vivo* e *in vitro* y el posible potencial nutraceutico de estos materiales.

♣ Este estudio demostró que los cuatro materiales silvestres de zarzamora tienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos y que pueden ser utilizados como fuentes de polifenoles para programas de fitomejoramiento con el objetivo de desarrollar nuevos cultivares/variedades con elevado potencial nutraceutico.

VIII. PERSPECTIVAS

Se propone realizar más bioensayos para comprobar otros efectos benéficos a la salud de estos frutos, como por ejemplo: antimicrobiano, antihipertensivo, anticolesterolémico, antidiabéticos. Además se propone realizar ensayos *in vivo* para probar los compuestos obtenidos. También, puede llevarse a cabo la búsqueda de otros compuestos con actividad nutracéutica (minerales, ácidos grasos, fibra dietaria).

Con toda la información obtenida, proponer a las zarzamoras silvestres de la zona Tarasca de Michoacán como un alimento nutracéutico más atractivo al consumidor nacional y a los mercados internacionales, además promover los materiales silvestres con potencial nutracéutico para utilizarlos como base en futuros programas de fitomejoramiento y comercialización.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Aaby, K.;** Skrede, G; Wrolstad, E.R. Phenolic composition and antioxidante activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 53, 4032-4040.
- Acosta-Montoya, O.;** Vaillant, F.; Cozzano, S.; Mertz, C.; Perez, M. A.; Castro, V. Marco. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chem.* 2010, 119, 1497-1501.
- Agarwal, S.;** Reddy, G. V.; Reddanna, P. Eicosanoids in inflammation and cancer: the role of COX-2. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2009, 5, 145–165.
- Alderton, W. K.;** Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001, 357:593–615.
- Alwerdt, L. J.;** Seigler, S. D.; González de Mejia, E.; Yousef, G. G.; Lila, M. A. Influence of alternative liquid chromatography techniques on the chemical complexity and bioactivity of isolated proanthocyanidin mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 1896-1906.
- Amakura, Y.;** Okada, M.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. Chromatogr. A.* 2000, 896, 87–93.
- Anttonen, M. J.;** Karjalainen, R. O. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J. Food Comp. Anal.* 2005, 18, 759–769.
- AOAC.** Official Methods of Analysis 16° ed. Harla, Association of Official Analytical Chemists. 1999, St. Paul, MN, EUA.
- Asami, D. K.;** Hong, Y. J.; Barret, D. M.; Mitchel, A. E. Comparison of the total phenolic and ascorbic content of freeze-dried and air-dried Marion berry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustaintable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1241-1267.
- Asenstorfer, R. P.;** Illand, P. G.; Tate, M. E.; Jones, G. P. Charge equilibrium and pKa of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Anal. Biochem.* 2003, 318, 291-299.

- Ávila**, A. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMMS). “La Bomba de Obesidad en México”. Ciencia y Tecnología. 2008, BBC Mundo, Enero.
- Bagchi**, D.; Garg, A.; Krohn, R.L.; Bagchi, M.; Tran, M.X.; Stohs, S.J. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1997, 95, 179–189.
- Bhakuni**, D. S.; va, M.; Matlin, S. A.; Sammes, P. G. Aristoteline and aristotelone, unusual indole alkaloids from *Aristolelia Chilensis*. *Phytochemistry.* 1976, 15, 574-575.
- Baloyi**, J. J.; Ngongoni, N. T.; Topps, J. H.; Acamovic, T.; Hamudikuwanda, H. Condensed tannin and saponin content of *Vigna unguiculata* L. grown in Zimbabwe. *Crop. Anim. Health Prod.* 2001, 33, 57 – 66.
- Barbosa**, E.; Calzada, F.; Campos, R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J. Ethn.* 2006, 34, 178-184.
- Barch**, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Stoner, G.D.; Pillay, N.S.; Rosche, W.A. Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis.* 1996, 17, 265–269.
- Bastianetto**, S.; Brouillette, J.; Quirion, R. Neuroprotective effects of natural products: interaction with intracellular kinases, amyloid peptides and a possible role for transthyretin. *Neurochem. Res.* 2007, 35, 1258-1265.
- Bate-Smith**, E. C.; Swain, T.; in: Florkin, M., Mason, H. S. (Eds.). *Flavonoid Compounds*, Academic Press, 1962. New York., pp. 75–809.
- Baublis**, A.; Spomer, A.; Berber-Jimenez, M. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.* 1994, 59, 1219-1233.
- Beelwilder**, J.; Jonker, H.; Meester, P.; Hall, R. D.; Van der Meer, I. M.; Rice de Vos, C. H. Antioxidants in raspberry: On-line links antioxidant activity to diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3313-3320.
- Belicova**, A.; Krizkova, L.; Nagy, M.; Krajcovic, J.; Ebringer, L. Phenolic acids reduce the genotoxicity of acridine orange and ofloxacin in *Salmonella typhimurium*. *Folia Microbiol.* 2001, 46, 511–514.

- Beninger, C. W.;** Gu, L.; Prior, R. L.; Junk, D. C. Changes in polyphenols of the seed coat during the alter darkening process in pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7777–7782.
- Benvenuti, S.;** Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.* 2004, 69, FCT164–FCT169.
- Bermúdez-Soto, M. J.;** Larrosa, M.; García-Cantalejo, J.; Espín, J. C.; Tomás-Barberan, A. F.; García-Conesa, T. M. Transcriptional changes in human Caco-2 colon cáncer cells following exposure to a recurrent non-toxic dose of polyphenols rich chokeberry juice. *Genes Nutr.* 2007, 2, 11-113.
- Bhat, P. L.;** Krishna, K. I.; Pezzuto, M. J. Biological effects of resveratrol. *Antiox. Redox Sign.* 2001, 3, 1041-1064.
- Birosova, L.;** Mikulasova, M.; Vaverkova, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. *Biomed. Pap.* 2005, 149, 489–491.
- Bodet, C.;** Piche, M.; Chandad, F.; Grenier, D. Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57, 685-690.
- Boivin, D.;** Lamy, S.; Lord-Dufour, S.; Jackson, J.; Beaulieu, E.; Coté, M.; Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D.; Beliveau, R. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chem.* 2009, 112, 374-380.
- Bonoli, M.;** Marconi, E.; Caboni, M. F. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1057, 1–12.
- Borowska, J.;** Szajdek, A. Antioxidant activity of berry fruits and beverages. *Pol. J. Natur. Sc.* 2003, 14, 521-528.
- Boskov-Hansen, B.;** Andreasen, M. F.; Nielsen, M.; Larsen, L. M.; Bach-Knudsen, K. E.; Meyer, A. S.; Christense, L. P.; Hansen, A. Changes in dietary fiber, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread making. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 33-42.

- Boucher**, F. Los productos nutraceuticos. Oportunidades para los recursos naturales autóctonos. El papel de los investigadores. 1999. Fascículo técnico No. 18. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Centro Regional Andino.
- Brandon**, M. J.; Foo, L. Y.; Porter, L. J.; Meredith, P. Proanthocyanidins of barley and sorghum: composition as a function of maturity of barley ears. *Phytochemistry*. 1980, 21, 2953–2957.
- Bredt**, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 1999, 31, 577–596.
- Brouillard**, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin-3-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 8461-8468.
- Bushman**, S. B.; Phillips, B.; Isbell, T.; Ou, B.; Crane, M. J.; Knapp, J. S. Chemical composition of cranberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7982-7987.
- Byamukama**, R.; Kiremire, T. B.; Andersen, M.; Oyvind, S. Short communication. anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *J. Food Comp. Anal.* 2005,18, 599-605.
- Burns**, K. T. F.; Dey, M.; Rogers, B. R.; Ribnicky, M. D.; Gipp, M. D.; Cefalu, T. W.; Rasking, I.; Lila, M. A. Phytochemical composition and metabolic performance-enhancing activity of dietary berries traditionally used by native north Americans. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 654-660.
- Carbonaro**, M.; Grant, G.; Puzstai, A. Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur. J. Nutr.* 2001, 40, 84-90.
- Carluccio**, M. A.; Siculella, L.; Ancora, M. A.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Storelli, C.; Visioli, F.; Distante, A.; De Caterina, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterios. Tharom. Vasc. Biol.* 2003, 23, 622-629.

- Castellucio, C.;** Bolwell, G. P.; Gerrish, C.; Rice-Evans, C. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem. J.* 1996, 316, 691-694.
- Cavanagh, H. M.;** Hipwell, M.; Wikilson J. M. Antibacterial activity of berry fruits used for culinary purposes. *J. Med. Food.* 2003, 1, 57-61.
- Cervantes-Ceja, M. L.** Potencial nutracéutico de cultivos de arándano seleccionados en México. Tesis de Maestría. Programa de Posgrado del Centro de la República. Universidad Autónoma de Querétaro. Octubre de 2009.
- Céspedes, L. C.;** Valdez-Morales, M.; Avila, G. J.; El-Hafidi, M.; Alarcón, J.; Paredes-López, O. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocappaceae*). *Food Chem.* 2010, 110, 886-895.
- Chanjirakul, K.;** Wang, Y. S.; Wang, Y. C.; Siriphanich, J. Effect of natural volatile compounds on antioxidant capacity and antioxidant enzymes in raspberries. *Postharv. Biol. Technol.* 2006, 40, 106-115.
- Cheel, J.;** Theoduloz, C.; Rodríguez, A. J.; Caligari, S. P. D.; Schmeda-Hirshmann, G. Free radical scavenging activity and phenolic contents in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp., *Chiloensis*, *F. vesca*, and *F. x ananassa* cv Chandler. *Food Chem.* 2007, 102, 36-44.
- Chen, Y.;** Shen, S.; Chen, L.; Lee, T.; Yang, L. Wogonin baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61, 1417-1427.
- Cho, K. H.;** Pezzuto, J. M.; Bolton, J. L.; Steele, V. E.; Kelloff, G. J.; Lee, S. K.; Constantino, A. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. *Eur. J. Cancer.* 2000a, 36, 2146-2156.
- Cho, M. J.;** Howard, L. R.; Prior, R. L.; Clark, J. R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 2000b, 585, 2149-2158.

- Choi, J. A.;** Kim, J. Y.; Lee, J. Y. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int. J. Oncol.* 2001, 19, 8067-8072.
- Chow, H. H.;** Hakim, I. A.; Vining, D. R.; Crowell, J. A.; Ranger-Moore, J.; Chew, W. M.; Celaya, C. A.; Rodney, S. R.; Hara, Y.; Alberts, D. S. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 4627-4633.
- Clark, J. R.;** Finn, C. E. Blackberry. In: W.R. Okie (ed.). Register of new fruit and nut varieties, List 41. *HortScience.* 2002, 37, 251-258.
- Clifford, M. N.** Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 362-372.
- Clifford, M. N.** Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1063-1072.
- Cook, N.;** Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, 7, 66-76.
- Cooper, K. A.;** Chopra, M.; Thurnham, D. I. Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutr. Res. Rev.* 2004, 17, 111-129.
- Cos, P.;** De Bruyne, T.; Hermans, N.; Apers, S.; Vanden-Berghe, D.; Vlietinck, A. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Med. Chem.* 2003, 10, 1345-1359.
- Coté, J.;** Cailet, S. Doyon, G.; Sylvain, J. F.; Lacroix, M. Analyzing cranberry bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010, 50, 872-888.
- Coussens, L. M.;** Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002, 420, 860-867.
- Creasy, L. L.;** Coffe, M. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1997, 113, 230-234.
- Cuevas-Rodríguez, E. O.;** Yousef, G.G.; García-Saucedo, P.; López-Medina, J.; Paredes-López, O.; Lila, M.A. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp). *J. Agric. Food Chem.* 2010a, 58, 7458-9464.
- Cuevas-Rodríguez, E. O.;** Dia, P. V.; Yousef, G.G.; García-Saucedo, P.; López-Medina, J.; Paredes-López, O.; González de Mejía, E.; Lila, M.A. Inhibition of

- proinflammatory responses and antioxidant capacity of blackberry (*Rubus* spp) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2010b, 58, 9542-9548.
- Cui J.**; Chisti Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol. Adv.* 2003, 21, 109-122.
- Dai, J.**; Patel, J. D.; Mumper, R. J. Characterization of blackberry extract and antiproliferative and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food.* 2007, 10, 258–265.
- Dai, J.**; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 837-847.
- Daniel, E. M.**; Krupnick, A. S.; Heur, Y. H.; Blinzler, J. A.; Nims, R.W.; Stoner, G. D. Extraction, stability, and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts. *J. Food Comp. Anal.* 1989, 2, 338-349.
- Dao, L.**; Takeoka, G.; Edwards, R.; Berrios, J. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3564-3569.
- Dávalos, A.**; Gomez-Cordovez, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 48–54.
- De Ancos, B.**; Gonzales, E.; Cano, M. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Food Res. Technol.* 1999, 208, 33-38.
- De Ancos, B.**; González, E. M.; Cano, M. P. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4565–4570.
- De Bruyne, T.**; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Sys. Ecol.* 1999, 27, 445-459.
- Deighton, N.**; Brennan, R.; Finn, C.; Davies, H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 201, 1307–1313.

- Delgado, V. F.;** Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural pigments, anthocyanins, and betalains- characterization, biosynthesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2000, 40, 173-289.
- Delgado, V. F.;** Paredes, L. O. Natural Colorants for Foods and Nutraceuticals. Uses. 2003. CRC Press, Boca Ratón. pp: 1-57, 167-182.
- Dia, V. P.;** Wang, W.; Oh, V. L.; de Lumen, B. O.; de Mejia, G. E. Isolation, purification and characterization of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* 2009, 114, 108–115.
- Ding, M.;** Feng, R.; Wang, S. Y.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B. H.; Shi, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 17359-17368.
- Dong-Hyun, K.;** Byung-Keun, Y.; Sang-Chul, J.; Jun-Bo, P.; Sung-Pill, Ch.; Surajit, D.; Jong-Won, Y.; Chi-Hyun, S. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 513-517.
- Dugo, P.;** Mondello, L.; Errante, G.; Zappia, G.; Dugo, G. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3987-3992.
- Duthie, S. J.** Berry phytochemical, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 665-674.
- Ehlenfeldt, M. K.;** Prior, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2222–2227.
- Elisia, I.;** Hu, C.; Popovich, D.G.; Kitts, D.D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.* 2007, 101, 1052-1058.
- Espinosa, J.** Método para la evaluación de mutaciones génicas en *Salmonella typhimurium*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. 1980, 131- 47.

- Fang, J.;** SEki, T.; Maeda, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 290-302.
- Fang-Chiang, Ho-Ju.;** Wrolstad, E.R. Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *J. AOAC Intern.* 2010, 93, 956-965.
- FAO/WHO:** Organización Mundial de la Salud. 2010.
<http://www.who.int/topics/cancer/es/index.html>
- FAO/STAT:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- FDA :** Food and Drugs Administration. Overview of dietary supplements. 2011.
<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/ConsumerInformation/ucm110417.html>
- Felgines, C.;** Talavera, S.; Gonthier, M. ; Texier, O.; Scarbert, A.; Lamaison, J. L.; Rémesy. C. *J. Nutr.* 2003, 133, 1296-1301.
- Felgines, C.;** Talavera S.; Texier, O.; Gil, I. A.; Lamaison, J. L.; Remesy C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7721-7727.
- Fernandes, F. B. J.;** Vargas, F. M. V. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. *Phytotherapy Res.* 2003. 17, 269-273.
- Fernandez-Panchon, M. S.;** Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008, 48, 649-671.
- Fesen, M. R.;** Pommier, Y.; Leteurtre, F. Inhibition of HIV-1 integrasa by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 595-608.
- Foo, L. Y.;** Porter, L. J. The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.* 1981, 32, 711-716.
- Francis, F.** Food colorants: anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1989, 28, 273-314.

- García-Alonso**, M.; de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* 2004, 84, 13-18.
- Garras**, E. H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *Food Sci. Technol.* 2009, 44, 2512-2518.
- Garcia-Lafuente**, A.; Guillaman, E.; Villares, A.; Rostagno, M.; Martinez, J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 2009, 58, 537–552.
- Gerritsen**, M. E.; Carley, W. W.; Ranges, G. E.; Schen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* 1995, 147, 278-292.
- Gil**, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4581-4589.
- Gonzalez**, E. M.; de Ancos, B.; Cano, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5459-5464.
- Gossé**, F.; Guyot, S.; roussi, S.; Lobstein, A.; Fischer, B.; Seiler, N. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005, 26, 12291-12295.
- Gouedard**, C.; Barouki, R.; Morel, Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 2004, 24, 5209-5222.
- Grace**, M. H.; Ribnicky, D. M.; Kuhn, P.; Poulev, A.; Logendra, S.; Yousef, G. G.; Raskin, I.; Lila, M. A. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine.* 2009, 16, 406-415.
- Graham**, T. L. A rapid high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites. *Plant Physiol.* 1991, 95, 584-593.

- Gu, L.;** Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G. Concentration of proanthocyanidins in common foods and estimation of normal consumption. *J. Nutr.* 2004, 134, 613 – 617.
- Guo-Shu, H.;** Ching-Ya, T.; Chiang-Her, L.; Sui-Long, S.; Heng-Sheng, L. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on cyclooxygenase 2, PGE2, and IL-8 expression induced by IL-1 β in human synovial fibroblasts. *Rheumatol. Int.* 2010, 30, 1197-1203.
- Guzmán-Maldonado, S. H. y** Paredes-López, O. Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop plants. En: Paredes-López O (ed). *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. 1999. CRC, Press, Boca Ratón. pp: 553-620.
- Haddock, E. A.;** Gupta, R. K.; M. K. Al-Shafi, S.; Layden, K.; Haslam, E.; Magnolato, D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry*. 1982, 21, 1049-1062.
- Haffner, K.;** Rosenfeld, H. J.; Skrede, G.; Wang, L. Quality of red raspberry *Rubus idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 2002, 24, 279–289.
- Hager, T. J.;** Howard, L. R.; Liyanage, R.; Lay, J. O.; Prior, R. L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2008a, 56, 661-669.
- Hager, T. J.;** Howard, L. R.; Prior, R. L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *J. Agric. Food Chem.* 2008b, 56, 689-695.
- Hakala, M.;** Lapveteläinen, A.; Huopalahti, R.; Kallio, H.; Tahvonen, R. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *J. Food Comp. Anal.* 2003, 16, 67–80.
- Hakkinen, S.;** Heinonen, M.; Karenlampi, S.; Mykkanen, H. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Inter.* 1999, 32, 345 –353.
- Han, J.;** Ye, M.; Xu, M.; Sun, J.; Wang, B.; Guo, D. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 2007a, 848, 355–362.

- Han, X.;** Shen, T.; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2007b, 8, 950-988.
- Hannum, M. S.** Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Review Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 1-17.
- Harborne, J.** Plant polyphenols. XI. Structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry.* 1964, 3, 151-160.
- Harttig, U.;** Hendricks, J. D.; Stoner, G. D.; Bailey, G. S. Organ specific, protocol dependent modulation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary ellagic acid. *Carcinogenesis.* 1996, 17, 2403–2409.
- Haslam, E.** Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1989, pp 230.
- Hassimoto, A. N. M.;** da Mota, V. R.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. *Ciênc. Technol. Aliment.* 2008, 28, 702-708.
- Hawksworth, G.;** Drasar, B. S.; Hilla, M. J. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J. Med. Microbiol.* 1971, 4, 451-459.
- Heinonen, M. I.;** Ollilainen, V.; Linkola, E. K.; Varo, P. T.; Koivistoinen, P. E. Carotenoid in finish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 655-659.
- Herrman, K.** On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1988, 10, 186-190.
- Hogan, S.;** Canning, C.; Sun, S.; Sun, X.; Zhou, K. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 11250-11256.
- Hollman, P. C.;** de Vries, J. H.; van Leeuwen, S. D. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 1276-1282.
- Hollman, P. C.;** van Trijp, J. M.; Buysman, M. N.; van der Gaag, M. S.; Mengelers, M. J.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 1997, 418, 152-156.

- Holt**, R. R.; Lazarus, S. A.; Sullards, M. C.; Zhu, Q. Y.; Schramm, D. D.; Hammerstone, J. F.; Fraga, C. G.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavan-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 798-804.
- Hori**, M.; Kita, M.; Torihashi, S.; Miyamoto, S.; Won, K.; Sato, K.; Ozaki, H.; Karaki, H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, 280, 930-938.
- Horn**, R. C., Ferrao, V. M. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. *Toxicol in vitro.* 2008, 22, 1043-1049.
- Hotamisligil**, S. G. Inflammation and metabolic disorder. *Nature.* 2006, 444, 860-866.
- Huang**, J.; de Paulis, T.; May, J. M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15, 722-729.
- Hudson**, E. A.; Dinh, P. A.; Kokubun, T. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth on human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.* 2000, 9, 1163-1170.
- IMMS.** Instituto Mexicano del Seguro Social. 2010, www.imss.gob.mx/NR/.../0/GRR_TratamientodelaObesidadAdulto.pdf
- INCan.** Instituto Nacional de Cancerología. Cáncer de colon. 2010. <http://www.incan.gob.mx>.
- INEGI.** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. “Mujeres y Hombres, México, 2010. <http://www.inegi.gob.mx>.
- Jackman**, R. L.; Yada, R. Y.; Tung, M. A.; Speers, R. A. Anthocyanins as food colorants-a review-. *J. Food Biochem. Soc.* 1987, 11, 201-270.
- Jang**, M.; Pezzuto, J. M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Lett.* 1998, 134, 81-89.
- Jhonston**, K.; Sharp, P.; Clifford, M.; Morgan, L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 2005, 579, 1653-1657.

- Johnson, I. T.;** Lund, K. E. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Theraph.* 2007, 26, 161-181.
- Jiao, H.;** Wang, S. Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5672–5676.
- Joe, B.;** Vijaykumar, M.; Lokesh, R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 97-111.
- Joshi, S. S.;** Kuszynski, C. A.; Bagchi, D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2001, 2, 187–200.
- Jurd, L.** Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Advances Food Res. Suppl.* 1972, 3, 123-142.
- Kader, F.;** Irmouli, M.; Nicolas, J.; Metche, M. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. *Food Chem.* 2001, 75, 139-144.
- Kahlon, T. S.;** Smith, G. E. In vitro binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria X ananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). *Food Chem.* 2007, 100, 1182-1187.
- Kahkonen, M. P.;** Hopia, A. I.; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4076–4082.
- Kalt, W.;** Forney, C. F.; Martín, A.; Prior, R. L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolic, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4638-4344.
- Kalt, W.;** Ryan, D. A. J.; Duy, J. C.; Prior, R. L.; Ehlenfeldt, M. K.; Vander Kloet, S. P. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4761–4767.
- Kammerer, D.;** Gajdos K., J.; Carle, R.; Schieber, A. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *Eur. Food Res. Technol.* 2005, 220, 431-437.

- Kaneno**, R.; Fontanari L. M.; Santos S. A.; Di-Stasi, L. C.; Rodrigues-Filho, E.; Eira, A. F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 909-916.
- Kaneto**, H.; Katakami, N.; Kawamori, D.; Miyatsuka, T. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 2007, 9, 355–366.
- Karadeniz**, K. L. Kainulainen, S. P.; Hayirlioglu-Ayaz, S.; Ayaz, A. F.; Riihinen, R. K. Characterization of anthocyanins in caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57, 5244-5249.
- Katarzyna**, S.; Oszmianski, J. The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agric. Food Sci.* 2007, 16, 46-55.
- Khanapure**, S. P.; Garvey, D. S.; Janero, D. R.; Letts, L. G. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007, 59, 311-340.
- Khanna**, S.; Roy, S.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C. K. Up-regulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 38-42.
- Kellogg**, J.; Wang, J.; Flint, C.; Ribnicky, D.; Kuhn, P.; Gonzales de Mejia, E.; Raskin, I.; Lila, M. A. Alaskan wild berries resources and human health under the cloud of climate change. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 3884-3900.
- Kleinert**, H.; Schwarz, P. M.; Forstermann, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* 2003, 384, 1343–1364.
- Kobayashi**, Y.; Susuki, M.; Hideo, S.; Arai, S.; Yukihiro, H.; Susuki, K.; Miyamoto, Y.; Shimizu, Y. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5618-5623.
- Kobuchi**, H.; Virgill, F.; Packer, L. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. En: *Methods in Enzymology*; Kobuchi, H., Virgill, F., Packer, L., ed.; Academic Press: New York, 1999, 301, pp 504-513.

- Koca, I.;** Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the black sea region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 2009, 121, 447-450.
- Kokotkiewicz, A.;** Jaremicz, Z.; Luczkiewicz, M. Aronia Plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J. Med. Food*. 2010, 13, 255-269.
- Kolb-Buchofen, V.;** Kuhhn, A.; Suschac, C. V. The role of nitric oxide. *Rheumatol*. 2006, 45, 17-19.
- Kong, J.;** Chia, L.; Goh, N.; Chia, T.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003, 64, 923-933.
- Konowalchuk, J.;** Speirs, J. Antiviral activity of fruits extracts. *J. Food Sci*. 1976, 41, 1013-1019.
- Kraemer-Schafhalter, A.;** Fuchs, H.; Pfannhauser, W. Solid-phase (SPE)-a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J. Sci. Food Agric*. 1998, 78, 435-440.
- Krifi, B.;** Chouteau, F.; Boudrant, J.; Metche, M. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2000, 35, 275-283.
- Kunnumakkara, A. B.;** Guha, S.; Krishhnan, S.; Diagaradjane, P.; Gelovani, J.; Agarwal, B. B. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor kappaB-regulated gene products. *Cancer Res*. 2007, 67, 3853-3861.
- Kuo, P. L.;** Chun, K. S.; Kim, S. O.; Surh, Y. J. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in HepG2 cells. *Life Sci*. 2002, 72, 23-24.
- Kuroda, Y.;** Hara, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mut. Res*. 1999, 436, 69-97.
- La Vecchia, C.;** Altieri, A.; Tavani, A. Vegetables, fruits, antioxidant and cancer: a review of Italian studies. *Eur. J. Nutr*. 2001, 40, 261-267.
- Lauritsen, K.;** Laursen, L. S.; Bukhave, K.; Rask-Madsen, J. Inflammatory intermediaries in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989, 4, 75-90.

- Laurence**, H. K.; Meyer K. A.; Jacobs, D. R. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70, 451S-458S.
- Lazarou**, D.; Grougnet, R.; Papadopoulos, A. Antimutagenic properties of a polyphenols-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Res.* 2007, 634, 163-171.
- Lei**, Z.; Jervis, J.; Helm, R. F. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1165-1168.
- Le Bourvellec**, C.; Guyot, S.; Renard, C. M. G. Non-covalent interactions between procyanidins and apple cell wall material. Part I: Effect of some environmental parameters. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1672, 192–202.
- Lesca**, P. Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis.* 1983, 4, 1651-1653.
- Li**, H.; Wang, X.; Li, Y.; Li, P.; Wang, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chem.* 2009, 112, 454-460.
- Lin**, K. J.; Weng, S. M. Chapter 8 “Flavonoids as Nutraceuticals” in *The Science of Flavonoids*. 2006.. Groteworld, Ed. Springer, New York, NY. pp 213-238.
- Lin**, Y.; Lin, J. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide- induced activity of transcription factor nuclear factor-B. *Mol. Pharmacol.* 1997, 52, 465–472.
- Lila**, M. A. The nature-versus-nurture debate on bioactive phytochemicals: the genome versus *terroir*. *J. Sci. Food Agric.* 2006, 86, 2510-2515.
- Liu**, M.; Li, X. Q.; Weber, G.; Lee, C. Y.; Brown, J.; Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2926-2930.
- Lizarraga**, D.; Lozano, C.; Briedé, J. J.; van Delft, J. H.; Touriño, S.; Centelles, J. J.; Torres, J. L.; Cascante, M. The importance of polymerization and galloyllation for the antiproliferative properties of procyanidin natural extracts. *FEBS J.* 2007, 274, 4802-4811.

- Lopes da Silva**, F.; Escribano-Bailón, T.; Pérez, A. J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2007, 56:1125-1129.
- Lou**, H.; Yuan, H.; Ma, B.; Ren, D. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry*. 2004, 65, 239 –2399.
- Lou**, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Uchida, M. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*. 1999, 51, 297–308.
- Lule**, U, S.; Xia, W. Food Phenolics, pros and cons: a review. *Food Review Int.* 2005, 21, 367-388.
- Maccarone**, E.; Maccarone, A.; Rapisarda, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J. Food Sci.* 1985, 50, 901-904.
- Malencic**, D.; Maksimovic, Z.; Popovic, M.; Miladinovic, J. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technol.* 2009, 99, 6688-6691.
- Manach**, C.; Scarbet, A.; Monard, C.; Rémesy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727-747.
- Manach**, C.; Williamson, G.; Monard, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 230S-242S.
- Mantena**, S. K.; Baliga, M.S.; Katiyar, S. K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006, 27 1682–1691.
- Mantovani**, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454, 436–444.
- Markakis**, P. Anthocyanins and their stability in food. *Crit. Rev. Food Technol.* 1974, 4, 437- 456.
- Marnett**, L. J.; Dubois, R. N. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42, 55-80.
- Maron**, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.* 1983, 113, 173-215.

- Martínez, J.;** Moreno, J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 59, 865-870.
- Mass, J. L.;** Galleta, G. J.; Stoner, G. D. Ellagic acid an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. *HortScience.* 1991, 26, 10-14.
- Matsuoka, T. A.;** Kajimoto, Y.; Watada, H.; Kaneto, H. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HTcells. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 144 –150.
- Mazza, G.;** Miniati, E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. 1993. CRC Press, Boca Ratón.
- McDougall, J. G.;** Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *J. Agric. Food Chem.* 2005a, 53, 5896-5904.
- McDougall, J. G.;** Shapiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit amylase and α -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 2005b, 53, 2760 –2766.
- McGhie, K. T.;** Walton C. M. The bioavailability and absorption of anthocyanins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 702-713.
- Mertz, C.;** Cheynier, V.; Gánata, Z.; Brat, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8616-8624.
- Mertz, C.;** Gancel, A.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A. M.; Ruales, J.; Brat, P. Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Comp. Anal.* 2009, 22, 381-387.
- Mittal, A.;** Elmets, C. A.; Katiyar, S. K. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis.* 2003, 24, 1379–1388.
- Mortelmans, K.;** Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mut. Res.* 2000, 455, 29-60.

- Mullen**, W.; Yokota, T.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Analysis of ellagitannins and conjugate of ellagic acids and quercetin in raspberry fruits by LC-MS. *Phytochemistry*. 2003, 64, 617-624.
- Naczek**, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. Review. *J. Chromatography A*. 2004, 1054, 95-111.
- Nair**, M. P.; Kandaswami, C.; Mahajan, S.; Nair, H. N.; Chawda, R.; Shanahan, T.; Schwartz, S. A. Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry co-receptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cell. *Biol. Res*. 2002, 35, 421-431.
- Nandakumar**, V.; Sing, T.; Katiyar, K. S. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. Mini-review. *Cancer Letters*, 2008, 269, 378-387.
- Nasar-Abba**, M. S.; Plummer, A. J.; Siddique, H. M.; Kadambot. L.; White, P.; Harris, D.; Dod, K. Cooking quality of faba bean after storage at high temperature and the role of lignins and other phenolics in bean hardening. *Lebens. Wiss. Technol*. 2008, 41, 1260-1267.
- Nichenametla**, S. S.; Taruscio, G. T. A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2006, 46, 161-183.
- Nishimura**, C.; Yamaoka, T.; Minzutani, M.; Yamashita, K.; Acera, T.; Tanimoto, T. Purification and characterization of the recombinant human aldosa reductase expressed in baculovirus system. *Biochem. Biophys. Acta*. 1991, 1078, 171-178.
- Nguyen**, T.; Brunson, D.; Crespi, C. L.; Penman, B. W.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1992, 89, 3030–3034.
- Nurmi**, K. I.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Kalevi, P. Phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* spp. *tortuosa*). *J. Chem. Ecol*. 1996, 22, 2023–2040.
- Ofek**, I.; Goldhar, J.; Zafiriri, D.; Lis, H.; Adar, R.; Sharon, N. Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices. *N.E.J. Med*. 1991, 324:1599-1607.
- Olthof**, M. R.; Hollman, P. C.; Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr*. 2001, 131, 66-71.

- OMS.** Organización Mundial de la Salud. Día Mundial de la Diabetes. 2010. <http://www.worlddiabetesday.org/es>.
- Olvera-García, V.;** Castaño-Tostado, E.; Rezendiz-Lopez, R. I.; Reynoso-Camacho, R.; González de Mejía, E., Elizondo, G.; Loarca-Piña, G. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. *J. Food Sci.* 2008, 73, T75-T81.
- Oviedo, C. I. T.;** Ramírez, A.; Martínez, V. M. Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J. Pharmacol.* 2005, 34:1087-1091.
- Pacheco, S. P.** Frambuesa y zarzamora. Folleto de Divulgación. 1975. No 17. CONAFRUT. México, DF. pp.38
- Pan, M. H.;** Ghai, G.; Ho, C. T. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 43–52.
- Pantelidis, G. E.;** Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A.; Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 2007, 102, 777-783.
- Parr, A. J.;** Bolwell, G. P. Phenols in the plant and in human. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content and profile. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 985-1021.
- Paredes-López, O.;** Cervantes-Ceja, M. L.; Vigna-Pérez, M.; Hernández-Pérez, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life— review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2010, 65, 299–308.
- Pergola, C.;** Rossi, A.; Dugo, P.; Cuzzocrea, S.; Sautebin, L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide.* 2006, 15, 30–39.
- Plessi, M.;** Bertelli, D.; Albasini, A. Distribution of metal and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. *Food Chem.* 2007, 100, 419-427.
- Poei-Langston, M.;** Wrolstad, R. Color degradation of ascorbic-anthocyanin- flavanol model system. *J. Food Sci.* 1981, 46, 1218-1222.

- Pozo-Guisado**, E.; Lorenzo-Benayas, M. J.; Fernández-Salguero, P. M. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *Int. J. Cancer*. 2004, 109, 167-173.
- Prior**, R. L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G.; Mainland, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2686–2693.
- Prior**, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Luke, H.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3273–3279.
- Prior**, R. L.; Gu, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*. 2005, 66, 2264-2280.
- Proteggente**, A. R.; Pannala, A. S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van-De, P. F.; Dacombe, C. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free. Radic. Res.* 2002, 36, 217–233.
- Puupponen-Pimiä**, R.; Aura, A. M.; Karppinen, S; Oksman-Caldentey, K. M.; Poutanen, K. Interactions between plant bioactive food ingredients and intestinal flora—effects on human health. *Biosci. Microflora*. 2004, 23, 67-80.
- Puupponen-Pimiä**, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H.; Oksman-Caldentey, K. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 67, 8-18.
- Ranelletti**, F. O.; Ricci, R.; Larocca, L. M. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int. J. Cancer*. 1992, 50, 486-492.
- Rao**, C. V. D. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Interact.* 1992, 84, 277-290.
- Rao**, C. V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2004, 555, 107–119.

- Raskin, I.**; Ribnicky D. M.; Komarnytsky S.; Nebojsa I.; Poulev A.; Borisjuk N.; Brinker A.; Moreno D. A.; Ripoll, Ch.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor I.; Fridlender B.. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS Biotechnol.* 2002, 20, 522-531.
- Ray, S. D.**; Kumar, M. A.; Bagchi, D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases *in vivo* Bcl-XL expression and prevents aceraminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 369, 42-58.
- Razungles, A.**; Oszmianski, J.; Sapis, J. C. Determination of carotenoids in fruits of *Rosa* sp (*Rosa canina* and *Rosa rugosa*) and chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J. Food Sci.* 1989, 54, 774-775.
- Reed, J.**; Howell, A.; Cunningham, D.; Krueger, C. Differences in structure and bacterial anti-adhesion activity of cranberry proanthocyanidins compared to proanthocyanidins from other foods. Proceedings of the 1st International conference on polyphenols and health. 2003, 18–21 November 2003, Vichy, France. Poster abstract P28.
- Reid, G.**; Hsieh, J.; Potter, P.; Mighton, J.; Lam, D.; Warren, D.; Stephenson, J. Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. *Spinal Cord.* 2001, 39, 26–30.
- Rekika, D.**; Khanizadeh, S.; Deschenes, M. Antioxidant capacity and phenolic content of selected genotypes. *Hortscience.* 2005, 40, 1777-1781.
- Renis, M.**; Calandra, L.; Scifo, C.; Tomasello, B.; Cardile, V.; Vanella, L. Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins. *Br. J. Nutr.* 2007. III, 1-9.
- Reuter, B. K.**; Asfaha, S.; Buret, A.; Sharkey, K. A.; Wallace, J. L. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 2076–2085.
- Reuter, S.**; Gupta, Carwal, S.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 1603-1616.

- Reyes-Carmona, J.;** Yousef, G.G.; Martínez-Peniche, R.A.; Lila, M.A. Antioxiada capacity of fruits extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* 2005, 70, S497-S503.
- Rice-Evans, C. A.;** Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 933-956.
- Ridnour, L. A.;** Thomas, D. D.; Switzer, C.; Flores-Santana, W.; Isenberg, S. J.; Ambs, S.; Roberts, D. D.; Wink, A. D. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide.* 2008, 19, 73-76.
- Riles, L. W.;** Sanjay, N. J. E.; Atten, M. J.; Attar, B. M.; Holian, O. Resveratrol engages selective apoptotic signal in gastric adenocarcinoma cell. *World J. Gastroent.* 2006, 21, 5628-5634.
- Rios, Y.;** Bennett, R. N.; Lazarus, S. A.; Remesy, C.; Scalbert A.; Williamson; G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 1106–1110.
- Robbins, R.** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2666-2687.
- Rodríguez-Saona, L.;** Guisti, M.; Wrolstad, R. Color and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *J. Food Sci.* 1999, 64, 451- 456.
- Rodríguez-Téllez, M.;** Arguelles, F.; Herrerias, M. J.; Ledro, D.; Herrerias, M. J. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. *Curren. Pharm. Desing.* 2001, 7, 951-976.
- Roginsky, V.;** Lissi, A. E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 2005, 92, 235-254.
- Rosa, M. R.;** Moura, J. D.; Melecchi, S. M. I.; dos Santos, R.; Rchter, M. F.; Bastos, C. E.; Pegas, H. J.; Lia de Paula, R. A.; Saffi, J. Protective against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol. in vitro.* 2007, 21, 1442-1452.
- Rossi, A.;** Serraino, I.; Dugo, P.; Paola, R. D.; Mondello, L.; Genovese, T.; Morabito, D.; Dugo, G.; Sautebin, L.; Caputi, A.; Cuzzocrea, S. Protective effects of

- anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Res.* 2003, 37, 891–900.
- Rzedowski, J.;** Calderón, G. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. 2005. Fascículo 135. pp 1-2, 123-132. Michoacán, México.
- SAGARPA.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Anuario: 2009. <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Sailendra, N. N.;** Todd, G. T. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46,161-183.
- Sano, A.;** Yamakoshi, J.; Tokutake, S.; Tobe, K.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extracts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, 67, 1140-1143.
- Santos-Buelga, C.;** Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1094–1117.
- SAS Institute.** SAS User’s Guide, Statistics, 8th ed.; SAS Institute: Cary, NC, 1999.
- Saura-Calixto, F.** Dietary fiber complex in a sample rich in condensed tannins and uronic acids. *Food Chem.* 1987, 23, 95–103.
- Scalzo, J.;** Politi, A.; Pellegrini, N.; Mezzetti, B.; Battino, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition.* 2005, 21, 207-213.
- Schafer, S.;** Podstawa, M.; Visioli, F.; Bogani, P.; Muller, W. E.; Eckert, G. P. Hydroxytyrosol- rich olive mill wastewater extract protects brain cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 5043-5049.
- Schmidt, B.;** Howell, A. B.; McEniry, B.; Knight, C. T.; Seigler, D. S; Erdman, J. W.; Lila, M. A. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6433-6442.
- Schreckinger, M. E.;** Lotton, J.; Lila, M. A.; Gonzalez de Mejia, E. Berries from South America: a comprehensive review of chemistry, health potential, and commercialization. *J. Med. Food.* 2010, 13, 233-246.

- Seeram**, N. P.; Momin, R. A.; Nair, M. G.; Bourquin, L. D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyaniding glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 2001, 362-369.
- Seeram**, N. P.; Yanjun, Z.; Muraleedharan, G. N. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr. Cancer*. 2003, 46, 101-106.
- Seeram**, N. P.; Lee, R.; Heber, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin. Chim. Acta*. 2004, 348, 63-68.
- Seeram**, N. P.; Lee, R.; Scheuller, H. S.; Heber, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem*. 2006, 97, 1-11.
- Sellappan**, S.; Akoh, C. C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem*. 2002, 50, 2432-2438.
- Seril**, D. N.; Liao, J.; Yang, G.; Yang, C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 353-362.
- Serrano**, C.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, Anna-Marja.; Saura-Calixto, F. Tannins: current knowledge of foods sources, intake bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009, 53, S310-S329.
- Seung-Bin**, P.; Mi-Sun, K.; Sang, L. H.; Ho, L. S.; Sang-Hyun K. 1,2,3,6-tetra-*O*-gaññoyl- β -D-Allopyranose gallotannins isolated, from *Euphorbia jolkini*, attenuates LPS-induced nitric oxide production in mcrophages. *Phytother. Res*. 2010, 24, 1329-1333.
- Shahidi**, F.; Wanasundara, P. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 1992, 32, 67-103.
- Shahidi**, F.; Naczk, M. Food phenolics. Source, Chemistry, Cffects, Applications. Technomic Publishing, CO. Lancaster, PA, USA. 1995. pp 75-110.

- Shahrzad**, S.; Bitsch, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1996, 741, 223 – 231.
- Sharma**, J. N.; Al-Omran, A.; Parvarthy, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007, 15, 252-259.
- Shen**, S. Q.; Zhang, Y.; Xiang, J. J.; Xiong, C. L. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J. Gastr.* 2007, 13, 1953-1961.
- Shin**, K.; Kim, I.; Park, Y.; Ha, J.; Choi, J.; Park, H.; Lee, Y. S.; Lee, K. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-R production. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 2327–2336.
- Shishu**, I.; Kaur P. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: the structural requirement. *Food Chem.* 2008, 111, 573-579.
- Shureiqi**, I.; Reddy, P.; Brenner, D. E. Chemoprevention: general perspective. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000, 33, 157-167.
- SIAP**. Servicio de Información Alimentaria y Pesquera. 2010. www.siap.gob.mx.
- Silalahi**, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2002, 11, 79-89.
- Silva**, R. C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Chemina, A. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry.* 1991, 30, 1259–1264.
- Singh**, R. P.; Tyagi, A. K.; Dhanalakshmi, S. R.; Agarwal, C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int. J. Cancer.* 2004, 108, 733–740.
- Singh**, R.; Sharma, R. R.; Goyal K. R. Interactive effects of planting time and mulching on “Chandler” strawberry. *Sci. Hortic.* 2006, 56, 322-328.
- Singh**, N. B.; Singh R. B.; Singh L. R.; Prakash, D.; Sarma, P. D.; Upadhyay, G.; Singh, B. H. Polyphenols from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel

- with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 1161-1167.
- Singletary**, W. K.; Jung, J. K.; Giusti, M. Anthocyanin-rich-grape extracts block breast cell DNA damage. *J. Med. Food.* 2007, 10, 244-251.
- Siriwoharn**, T.; Wrolstad, R. E.; Finn, C. E.; Pereira, C. B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L.* hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 52, 8021-8030.
- Skerget**, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.; Simonic, M.; Knez, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 2005, 89, 191-198.
- Skupien**, K.; Oszmianski, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 219, 66-70.
- Smith**, H. S.; Tate, L. P.; Huang, G.; Magee, B. J.; Meepagala, M. K.; Wedge, E. D.; Larcom, L. L. Antimutagenic activity of berry extracts. *J. Med. Food.* 2004, 7, 450-455.
- Song**, Y. S.; Park, E. H.; Hur, G. M. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Lett.* 2002, 175, 53-61.
- Soong**, Y. Y.; Barlow, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem.* 2006, 97, 524 –530.
- Spada**, D. S.; Nunes de Souza, G.; Bortolini, V. G.; Henriques, P. A.; Salvador, M. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of frozen fruits. *J. Med. Food.* 2008, 11, 144-151.
- SSA**. Secretaria de Salud, México. Estadísticas en Salud. 2010. <http://www.salud.gob.mx>
- Stahl**, W.; Van den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, M. R.; Gartner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; Kelly, J. F.; Williamson, G.; Astley, B. S. Bioavailability and metabolism of antioxidants. *Mol. Aspects Med.* 2002, 23, 39-100.
- Stevens**, P. F. 1969. Taxonomic studies in the Ericaceae. PhD. Thesis. University of Edinburg, Scotkand. UK.

- Stintzing**, F.; Stintzing, A.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* 2002a, 50, 6172- 6181.
- Stintzing**, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Wrolstad, R. E. A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Wild). *J. Agric. Food Chem.* 2002b, 50, 396-399.
- Stoner**, G. D.; Mukhtar, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1995, 22, 169–180.
- Stoner**, G. D.; Morse, M. A. Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Lett.* 1997, 114, 113-119.
- Stoner**, D. G.; Wang, S. Li.; Zikri, N.; Chen, T.; Hecht, S. S.; Huang, C.; Sardo, C.; Lechner, F. J. Cancer prevention with freeze-dried berries and berry components. *Seminars Cancer Biol.* 2007, 17, 403-410.
- Stoner**, G. D.; Wang, L.; Casto, B. C. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, 2008, 29, 1665–1674.
- Süleyman**, H.; Demircan, B.; Karagoz, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 2007, 59, 247-258.
- Surh**, Y. J.; Kundu, J. K.; Na, H. K.; Lee, J. S. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J. Nutr.* 2005, 135, 2993S – 3001S.
- Szajdek**, A.; Borowska J. E. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2008, 63, 147–156
- Taruscio**, G. T.; Barney, L. D.; Exon, J. Content and profile of flavonoid and phenolic acid compound in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest berries. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3169-3176.
- Tate**, P.; Kuzmar A.; Smith S.; Wedge D. E. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimorium* TA100, comparative effects of eight varieties of blackberry on mutagenesis. *Nutr. Res.* 2003, 23, 971-979.

- Tate**, P.; Stanner A.; Shields K.; Smith S.; Larcom, L. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimorium* TA 100. *Nutr. Res.* 2006, 26, 100-104.
- Thole**, M. J.; Burns, F. T.; Kraft, B.; Sueiro, L. A.; Kang, Y.-H.; Gills, J. K.; Cuendet, M.; Pezzuto, M. J.; Seigler, S. D.; Lila, M. A. A comparative evaluation of the anticancer properties of european and american elderberries fruits. *J. Med. Food.* 2006, 9, 498-504.
- Tian**, Q.; Giusti, M. M.; Stoner, G. D.; Schwartz, S. J. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2006, 94, 465-468.
- Tuck**, K. L.; Freeman, M. P.; Hayball, P. J.; Stretch, G. L.; Stupans, I. The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J. Nutr.* 2001, 131, 1993-1996.
- Turker**, N.; Aksay, S.; Ekiz, I. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota.*) beverage: Shalgam. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3807-3813.
- USDA**, United State Department of Agriculture. Nutrient Database.
- Valant-Vetschera**, K. M.; Wallenweber E. Flavones and flavonols. En: Anderson, O. M.; Markham K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2006, pp. 618-748.
- Van-Meeteren**, M. E.; Hendriks, J. J.; Dijkstra, C. D.; van Tol, E. A. Dietary compounds prevent oxidative damage and nitric oxide production by human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa-*B*. *J. Nutr.* 2004, 134, 1013-1019.
- Vasco**, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 2008, 111, 816-823.
- Vasco**, C.; Rihnen, K.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Chemical composition and phenolic compound profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 8274-8281.

- Vattem**, D. A.; Jang, H. D.; Levin, R.; Shetty, K. Synergism of cranberry phenolics with ellagic acid and rosmarinic acid for antimutagenic and DNA protection functions. *J. Food Biochem.* 2006, 30, 98-116.
- Vayalil**, K. P. Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. *Arecaceae*). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 610-617.
- Velioglu**, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4113-4117.
- Velmerries**, W.; Nicholson, R. Phenolic compounds biochemistry. Springer Editorial, Netherlands, UK. 2006, pp 58-62, 235-248.
- Virgili**, F.; Marino, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 1205-1216.
- Visioli**, F.; Borsani, L.; Galli, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Res.* 2000, 47, 419-425.
- Vrhovsek**, U.; Palchetti, A.; Reniero, F.; Guillou, C.; Masuero, D.; Mattivi, F. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4469-4475.
- Wall**, E. M.; Wani, C. M.; Hughes, J. T.; Taylor, H. Plant antimutagenic agents. General bioassay and isolation procedure. *J. Nat. Prod.* 1988, 51, 866-873.
- Walle**, T.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Wilson, F. A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J. Nut.* 2000, 130, 2658-2661.
- Wang**, S. Y.; Cao, G.; Prior, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 140-146.
- Wang**, H.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M.; Chang, Y. C.; Booren, A. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 294-296.
- Wang**, S. Y.; Jiao, H. Scavenging capacity of berry crops on super-oxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5677-5684.

- Wang, S. Y.; Lin, H. S.** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 140-146.
- Wang, S.Y.; Zheng, W.** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4977–4982.
- Wang, J.; Mazza, G.** Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- α -activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 850–857.
- Wang, W. D.; Xu, S. Y.** Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J. Food Engineer.* 2007, 82, 271-275.
- Wang, L. S.; Stoner, D. G.** Anthocyanins and their role in cancer prevention. Mini-review. *Cancer Letter.* 2008, 6, 119-128.
- Wargovich, M. J.; Jiménez, A.; McKee, K.** Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis.* 2000, 21, 1149-1155.
- Weidner, S.; Amarowicz, R.; Karama'c, M.; Da-Browski, G.** Phenolic acids in caryopses of two cultivars of wheat, rye and triticale that display different resistance to pre-harvest sprouting. *Eur. Food Res. Technol.* 1999, 210,109-113.
- Whiting, D.** Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of a century's chemistry. *Natural Prod. Report.* 2001, 18, 583-606.
- Wiczowski, W.; Romaszko, E.; Piskula, K. M.** Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 12130-12136.
- Wildman, E. C. Robert.** Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2001. CRC Press. Boca Ratón. pp 8-25.
- Wildman, E. C. R.** Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Second edition. 2006. CRC Press. Boca Ratón. pp 15-62.
- Williams, C. A..** Flavone and flavonol *O*-glycosides. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. (edi). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. 2006. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. pp. 749–856.
- Wu, G.; Mininger, J. C.** Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu. Rev.*

- Nutr.* 2002, 22, 61-86.
- Wu, X.;** Gu, L.; Prior, R.L.; McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia* and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7846-7856.
- Wu-Yang, H.;** Yi-Zhong, C. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 2010, 62, 1-10.
- Wursch, P.;** del Vedovos, S.; Rosset, J.; Smiley, M. The tannin granules from ripe carbo pod. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1984, 17, 351–354.
- Yamakoshi, J.;** Saito, M.; Kataoka, S.; Kikuchi, M. Safety evaluation of proanthocyanidins-rich extract from grape seeds. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 599–607.
- Yi, W.;** Akoh, C. C.; Fischer, J.; Krewer, G. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food Res. Int.* 2006, 39, 628-638.
- Yoon, J.;** Baek, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* 2005, 46, 585–596.
- Yoshida, T.;** Nakata, F.; Hosotani, K.; Nitta, A.; Okudat, T. Dimeric hydrolyzables tannins of *Melastoma malabathricum*. *Phytochemistry.* 1992, 31, 2829-2833.
- Zakány, J.;** Chihara G.; Fachel, J. Effect of lentinan on the production of migration inhibitory factor induced by syngeneic tumor in mice. *Int. J. Cancer.* 1980, 26, 783-788.
- Zhang, Z. Z.;** Yang, C.; Jo, Z. L. Purification and structural analysis of anthocyanins from lichi pericarp. *Food Chemistry.* 2004. 84, 601-604.
- Zhang, Y.;** Barred, S. K., Nair, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci.* 2005, 76, 1465-1472.
- Zhang, Y.;** Liao, X.; Chen, F.; Wu, J.; Hu, X. Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, 395-403.

Zheng, Y.; Wang, S. Y. ; Wang, C. Y., Zheng, W. Changes in strawberries phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2007, 40, 49-57.

X. APÉNDICE

Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Wild and Domesticated Mexican Blackberries (*Rubus* spp.)

EDITH O. CUEVAS-RODRÍGUEZ,[†] GAD G. YOUSEF,[‡] PEDRO A. GARCÍA-SAUCEDO,[§]
JOSÉ LÓPEZ-MEDINA,[§] OCTAVIO PAREDES-LÓPEZ,^{||} AND MARY ANN LILA^{*,†,‡,§}

[†]Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, Mexico, [‡]Plants for Human Health Institute, North Carolina State University, Kannapolis, North Carolina 28081, [§]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, Mexico, ^{||}Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Guanajuato, Mexico, and ^{*}Department of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois, Urbana, Illinois 61802

This study was designed to characterize and compare wild, commercial, and noncommercial cultivated blackberry genotypes grown in Michoacán, Mexico. Six genotypes, including WB-3, WB-7, WB-10, and WB-11 (all wild blackberry types), Tupy (a commercial cultivar), and UM-601 (a cultivated breeding line), were selected and profiled for anthocyanins and proanthocyanidins by separating extracts over Amberlite XAD-7 resin and Sephadex LH-20 columns. Subsequent high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (LC–ESI–MS) analyses revealed that the major anthocyanin for all genotypes was cyanidin 3-*O*-glucoside. The proanthocyanidins (condensed tannins) were present in mono- to hexamer forms. Also, hydrolyzable tannins, ellagitannins, were characterized in the blackberry fruits. The average anthocyanin concentration in Sephadex LH-20 fractions was 49.2 mg/g in the commercial cultivar Tupy, while in the wild genotypes and the breeding line, the range was 361.3–494.9 mg/g (cyanidin 3-*O*-glucoside equivalent). The proanthocyanidin concentration varied widely among wild genotypes (417.5–1343.6 mg/g, catechin equivalent). This study demonstrated that the use of Amberlite XAD-7 followed by Sephadex LH-20 chromatography, with subsequent HPLC and LC–ESI–MS analyses, was able to effectively separate and characterize the diverse polyphenolics in blackberry genotypes. These results suggest that recommendations for dietary intake of blackberries for human health benefits need to take into account the source, because of the wide inherent variation in bioactive polyphenolic content in different blackberry genotypes.

KEYWORDS: Anthocyanin; proanthocyanidin; ellagitannins; *Rubus*; HPLC–ESI–MS

INTRODUCTION

The *Rubus* genus (Rosaceae family), which includes the blackberry, is cultivated worldwide but primarily concentrated in the northern hemisphere. The blackberry was among the earliest fruits used for medicinal purposes; as early as the 16th century, blackberry juice was used in Europe to treat infections of the mouth and eyes (*1*). Recent studies have demonstrated very high antioxidant capacity in blackberries and their enhanced potential to reduce risks of cancer and cardiovascular diseases (*2–5*) compared to other fruits and vegetables (*6*). The genotype, species, environment, and cultivation conditions have all been shown to exert a profound influence on the content of bioactive compounds in berries (*7–9*). Wild berries may provide a preferred resource for investigating phytochemicals that can improve human health, because they contain natural inherent levels of compounds that have not been influenced by commercial breeding and selection (*10*).

In addition to their fiber content, wild berries are rich in vitamins, minerals, various organic acids, and phenolic compounds (*11*). Because blackberries can contain a unique and intense complement of polyphenolic compounds, research on their composition has grown. The major polyphenolic compounds in berries are anthocyanins, hydrolyzable tannins (gallo- and ellagitannins), flavonols, and flavan-3-ols, including proanthocyanidins (*1, 3*). Anthocyanins are the predominant group of flavonoids present in berries (*11, 12*). They are water-soluble glycosides and acylglycosides, which are polyhydroxy and polymethoxy derivatives of the 2-phenylbenzopyrylium (flavylium) cation (*13*). Flavan-3-ols, better known as proanthocyanidins or condensed tannins, are polymers of flavan-3-ols and/or flavan-3,4-diol mixtures (*14*). These compounds give a characteristic astringent or bitter taste to many berries (*11*). They are ubiquitous in nature and are the second most abundant group of natural phenolics after lignin (*15*). Anthocyanins and proanthocyanidins are found in a wide range of common foods, including cereals, legumes, fruits, vegetables, and wines, and affect texture, color, and taste. These polyphenolics are also of

*To whom correspondence should be addressed. Telephone: 704-250-5407. E-mail: mlila@ncsu.edu.

interest in nutrition and medicine because of their potent antioxidant capacity and human health-protective effects against chronic disease risks, including cardiovascular diseases and cancers (15, 16).

Numerous analytical procedures have been employed to extract and characterize polyphenolics from different plant sources (17). Several polyphenolics have been detected in *Rubus* species, but the relative amounts reported were strongly influenced by the analytical conditions used by different researchers (18, 19). Commonly, high-performance liquid chromatography (HPLC) is used for the separation and identification of polyphenolics. However, HPLC techniques are only suitable for fractionating relatively small quantities of plant extracts and can result in the loss of the biological activity of fractions (20). Adsorber technologies, using solid-phase resins, can concentrate, purify, and recover bioactive plant secondary metabolites (21). For example, anthocyanins were effectively separated from carbohydrates, salts, and other soluble compounds using Amberlite XAD-7 resin, which exhibited a high affinity for anthocyanins and proanthocyanidins. Amberlite XAD-7 resin was also found best suited for isolating anthocyanins from black chokeberry juice among 16 different solid-phase extractions (22). Both Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 resins were previously used to isolate anthocyanins in red raspberry, but other polyphenolics were not taken into account (21).

The objectives of this study were (1) to establish an efficient isolation, separation, and characterization method for polyphenolics in blackberry using adsorber technology (with solid-phase columns, Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20) in combination with HPLC and liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (LC–ESI–MS) techniques and (2) to assess the relative variations and characterize in depth the anthocyanin and proanthocyanidin content in six Mexican blackberries: four wild genotypes and two domesticated genotypes (both a commercial cultivar and a noncommercialized breeding line).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Six blackberry genotypes (*Rubus* spp.), including four wild blackberries, one commercial cultivar, and a noncommercialized breeding line were used for this study. Fruits from the four Mexican wild blackberries (WB-3, WB-7, WB-10, and WB-11) were collected in the spring of 2008, in Uruapan, Michoacán, Mexico. The commercial blackberry (Tupy cultivar) fruits were collected in the winter of 2008, in Los Reyes, Michoacán, Mexico. This variety was originally developed by crossing the wild trailing blackberries of Uruguay with the commercial variety Comanche (23) and is widely grown by farmers in Mexico. Fruits from a cultivated/domesticated breeding line (UM-601) were provided by the Laboratorio de Agrobiología de Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, Mexico, in the winter of 2008. The UM-601 line was selected for its color and flavor through a breeding program aiming to develop superior cultivars adapted to the environmental conditions of Michoacán and other locations in central Mexico. Immediately after harvest, all fruits were washed, stored at -80°C , lyophilized, and kept at -20°C for further analysis.

Chemicals. Authentic commercial standards of anthocyanins, proanthocyanidins, and other flavonoids were used for polyphenolic characterization in blackberries. The anthocyanin standards (cyanidin, delphinidin, petunidin, and malvidin glycosides) were obtained from Polyphenols Laboratories (Sandnes, Norway) and proanthocyanidin monomers (including catechin and epicatechin) and dimers, kaemferol, quercetin, and myricetin glycosides were obtained from Chromadex (Laguna Hills, CA).

Preparation of the Polyphenolic Extract. Freeze-dried blackberries (100 g) were blended in a flask with 500 mL of acidified 80% methanol [0.3% trifluoroacetic acid (TFA)] (1:5, w/v) and filtered first through multiple layers of cotton 3 times to separate the purple pigment from the pulp. The resulting slurry was filtered through Whatman's filter paper number 4 and then number 1 (Florham Park, NJ) with the aid of light

suction. The collected hydro-alcoholic extract was concentrated by rotary evaporation at $<40^{\circ}\text{C}$ to remove the methanol. The remaining aqueous concentrate (120 mL) was partitioned against ethyl acetate (4×120 mL). The aqueous fraction was loaded onto an Amberlite XAD-7 (Sigma Life Science, CO) column (30×10 cm), preconditioned with acidified water (0.3% TFA), where the polyphenolic mixture was adsorbed onto the Amberlite XAD-7 resin. The resin was then washed thoroughly with acidified water (0.3% TFA) to remove free sugars, pectins, and other impurities. The polyphenolic mixture was then eluted from the column with 1 L of methanol (0.3% TFA), and this post-Amberlite extract (PAE) was evaporated and freeze-dried to yield ~ 4 g of concentrated polyphenolic extract containing mainly anthocyanins and proanthocyanidins.

Isolation of Anthocyanins and Proanthocyanidins. The freeze-dried (2.0 g) polyphenolic extract (PAE) was completely dissolved in 5 mL of MeOH and applied to a column packed with Sephadex LH-20 (3×30 cm) preconditioned with 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (0.3% TFA). Two solvent systems were used to elute the polyphenolic compounds off the Sephadex LH-20 column: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (80:20) with 0.3% TFA and 70% acetone. A total of 12 fractions (50 mL each) were collected, starting when the colored material began to elute from the column. The first nine fractions were rich in anthocyanins and eluted with the $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ solvent. The last three fractions were eluted from the Sephadex LH-20 column with the 70% acetone solvent and mainly contained proanthocyanidins. Organic solvents for all fractions were evaporated ($<40^{\circ}\text{C}$), and then the aqueous partition was immediately frozen at -80°C and freeze-dried. A flow chart illustrating the procedures applied to extract and isolate anthocyanins and proanthocyanidins is shown in **Figure 1**. Polyphenolics in all extracts and fractions were identified and quantified at each step of the isolation procedures by HPLC and LC–ESI–MS systems (detailed below), compared to their commercial standards when available and also to published data.

HPLC–Diode Array Detector (DAD) Analysis. The HPLC analyses were conducted using 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) with a DAD, an autosampler, a controlled-temperature column compartment, and Chemstation as a system controller and for data processing. Anthocyanin and proanthocyanidin separations were performed using a reversed-phase Supelcosil LC-18 column, 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA). The mobile phase for anthocyanins consisted of 5% formic acid in H_2O (A) and 100% methanol (B). The flow rate was constant during HPLC analysis at 1 mL/min, with a step gradient of 10, 15, 20, 25, 30, 60, 10, and 10% of solvent B at 0, 5, 15, 20, 25, 45, 47, and 60 min, respectively, with a 25°C constant column temperature. For proanthocyanidins, the mobile phase consisted of 5% acetonitrile and 0.1% formic acid in H_2O (A) and 5% H_2O and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The step gradient used was 0, 5, 30, 60, 90, 90, and 0% of solvent B at 0, 40, 45, 50, 55, 60, and 70 min, respectively. Samples were prepared by dissolving 5 mg in 1 mL of methanol and filtering through 0.22 μm nylon filters (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) before injecting 10 μL into the HPLC system. Three concentrations of cyanidin-3-*O*-glucoside or catechin were prepared as external standards for anthocyanins or proanthocyanidins, respectively, at 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL, where 10 μL was injected. Quantification of anthocyanins and proanthocyanidins was performed from the peak areas recorded at 520 and 280 nm, respectively. All blackberry extracts and fractions were analyzed in duplicates.

LC–ESI–MS Analysis. The LC–MS analyses were made with a LCQ Deca XP mass spectrometer (Thermo Finnigan Corp., San Jose, CA), MS version 1.3 SRI, ESI in the positive-ion mode (m/z 200–2000), with a photodiode array (PDA) detector (200–600 nm), version 1.2, autosampler, version 1.2, and Xcalibur software for data processing. The spray voltage was 10 kV, and the capillary temperature was 250°C . The HPLC separations were carried out on a C-18 reversed-phase column (150 mm, 2.1 mm inner diameter, 5 μm particle size, 90 Å) (VYDAC, Western Analytical, Murrieta, CA). The LC–MS analysis was carried out using the same mobile phase and gradients described above (HPLC–DAD analyses), except with formic acid at 0.1%, the flow rate at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the injection volume at 5 μL per sample or standard. The column temperature and the samples were kept at 20°C . The LC–MS/MS analysis was carried out using a LC–time-of-flight (TOF) Ultima mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA). Acquisition of MS/MS data

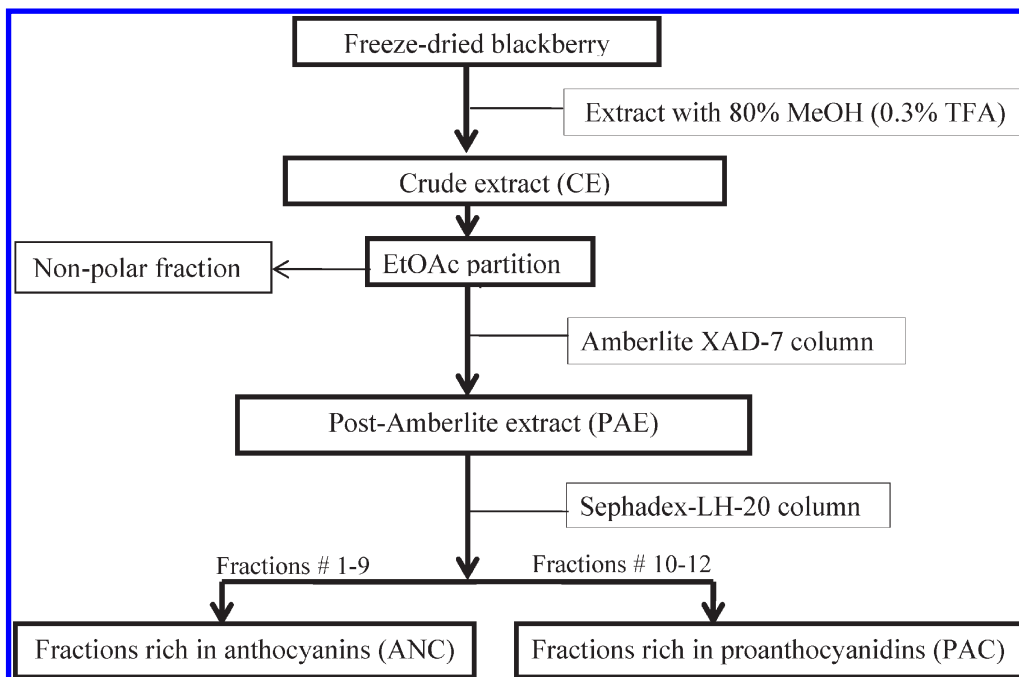


Figure 1. Flow chart illustrating the procedures applied to extract and isolate anthocyanins (ANC) and proanthocyanidins (PAC) in blackberry freeze-dried fruits. PAE contained a mixture of polyphenolics. ANC including fractions 1–9 mainly contained anthocyanins eluted with 20% MeOH. PAC including fractions 10–12 mainly contained proanthocyanidins eluted with 70% acetone.

was performed with MassLynx 4.0 software (Waters Corporation). Commercial standard references (0.25 mg/mL) and samples (5 mg/mL) were dissolved in 1 mL of 100% MeOH and filtered [0.22 μm polytetrafluoroethylene (PTFE)] before injection to compare retention time (Rt) and m/z values for polyphenolics in all extracts and fractions. The chemical structures for the basic units of anthocyanins, proanthocyanidins, and ellagitannins in blackberries are presented in **Figure 2**.

RESULTS AND DISCUSSION

Separation of Polyphenolics. The use of acidified methanolic solvent (0.3% TFA) facilitated the extraction of polyphenolics in blackberry and prevented the anthocyanins from degradation during the separation and subsequent analyses (24, 25). The use of Amberlite XAD-7 resin polymer is typically used to remove sugars and pectins from phenolic compounds in plant natural product extracts (24), while Sephadex LH-20 resin, with appropriate solvent mixtures, can further separate anthocyanins and proanthocyanidins present in the PAE, facilitating HPLC identification of polyphenolics. The two steps of separation resulted in fractions that were enriched in either anthocyanins or proanthocyanidins, which greatly facilitated characterization and quantification (**Figure 1**).

Analyses of Blackberry Anthocyanins. HPLC analyses of crude extracts (CEs) revealed that all of the blackberry genotypes had characteristically complex mixtures of polyphenolics. Because the CEs contained both anthocyanins and proanthocyanidins, which both had UV absorption of 280 nm, further separation using Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 columns was required before proanthocyanidins could be analyzed. The content of anthocyanins in the CE ranged from 3.4 to 9.2 mg/g of dry weight (cyanidin 3-*O*-glucoside equivalent) (**Table 1**). After the clean up procedure on Amberlite XAD-7 resin, the concentration of anthocyanins increased an average of 13 times across all blackberry genotypes. HPLC spectra for the commercial cultivar (Tupy) revealed a low anthocyanin concentration (3.4 mg/g) in the CE. The same general trend was observed in the nine Sephadex anthocyanin fractions (**Table 1**), where the concentration was

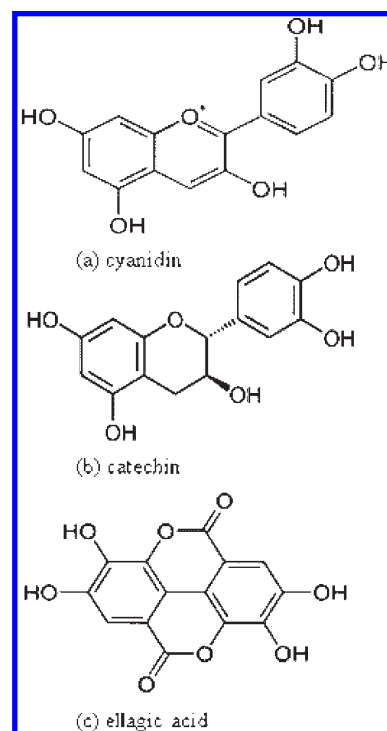


Figure 2. Basic chemical structures for anthocyanins, proanthocyanidins, and ellagitannins characterized in six Mexican blackberry fruits. (a) Cyanidin: anthocyanin. (b) Catechin: proanthocyanidin. (c) Ellagic acid: ellagitannin.

elevated by about 4 times compared to PAE. The concentration was 49.2 mg/g with Tupy, while in the other genotypes, it ranged from 362.5 to 494.9 mg/g (**Table 1**). Some of the Sephadex LH-20 fractions contained concentrations of over 750 mg/g (75% anthocyanin-enriched fractions), which expedited their identification and characterization.

Table 1. Concentration of Anthocyanins in Freeze-Dried Samples in Different Extracts and Fractions from Six Mexican Blackberries

sample/genotype	anthocyanin concentration (mg/g of dry weight) (cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside equivalent)					
	Tupy ^a	WB-3 ^b	WB-7	WB-10	WB-11	UM-601 ^c
CE	3.4	6.6	8.7	9.2	8.8	9.1
PAE	36.2	59.6	114.3	131.7	89.5	132.7
Sephadex LH-20 fractions ^d						
fraction 1	16.1	70.3	836.4	273.0	91.3	117.2
fraction 2	219.6	535.5	52.1	55.5	52.3	248.2
fraction 3	53.1	513.0	138.9	300.7	270.6	712.0
fraction 4	28.6	358.2	119.3	418.1	602.3	762.2
fraction 5	10.7	445.8	765.4	678.1	551.9	372.5
fraction 6	ND ^e	520.1	727.2	570.0	546.9	ND
fraction 7	ND	639.1	507.7	55.1	541.8	274.6
fraction 8	11.7	133.0	728.9	756.8	607.0	ND
fraction 9	4.97	104.5	577.9	155.1	131.1	37.4
average	49.2	368.8	494.9	362.5	377.2	361.3

^aTupy = commercial cultivar. ^bWB = wild blackberry genotypes. ^cUM-601 = cultivated noncommercial blackberry line. ^dSephadex LH-20 fractions 1–9 were designated as anthocyanin-enriched fractions. ^eND = not detected.

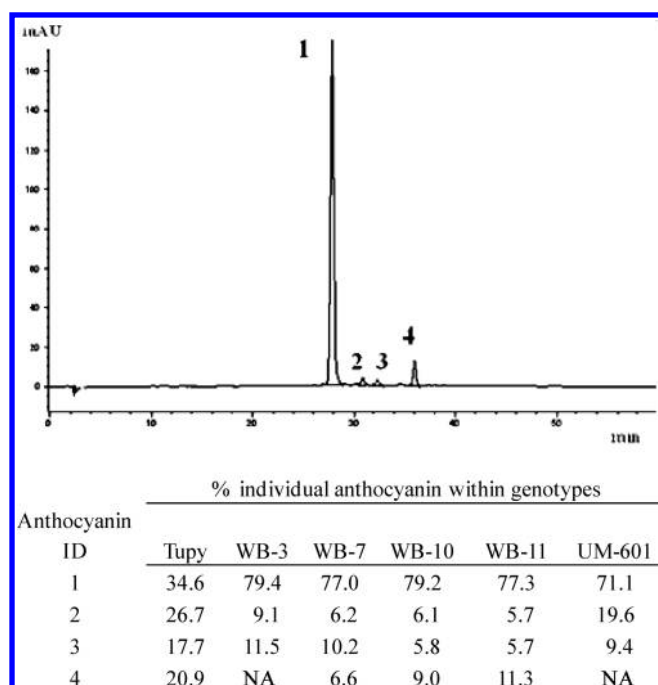


Figure 3. Representative HPLC chromatogram showing identified anthocyanins and their relative distribution (%) within blackberry genotypes. Anthocyanin separation was performed using a LC-18 reversed-phase (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) column, at 520 nm. Peak identification: (1) cyanidin 3-*O*-glucoside, (2) cyanidin 3-*O*-rutinoside, (3) cyanidin 3-*O*-arabinoside, and (4) cyanidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glucoside. Tupy, commercial cultivar; UM-601, cultivated noncommercial blackberry line; WB, wild blackberry genotypes, ND; not detected. The percentage of individual anthocyanin values were calculated in the CE for each genotype.

Sephadex LH-20 fractions revealed the presence of four major anthocyanins (Figure 3). The HPLC chromatogram and LC–MS analysis of all extracts showed profiles typical for blackberries but with different relative distributions of individual anthocyanins. Data showed that each genotype contained a unique profile with compounds represented at different percentages for each individual anthocyanin among genotypes (Figure 3). The four major anthocyanins identified were cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-rutinoside, cyanidin 3-*O*-arabinoside, and cyanidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glucoside, with the first compound as the most abundant; this pattern was consistent with previous reports on blackberry (1).

The major compounds were characterized according to their *m/z* value, UV spectrum absorbance characteristics, Rt as compared to commercial standards, and a comparison to published polyphenol data (1, 22, 25, 26). Representative LC–ESI–MS spectra of anthocyanins from Sephadex LH-20 fraction 5 for the WB-11 genotype are shown in Figure 4. The spectra illustrated that the majority of the fraction was anthocyanins based on the total ion current (Figure 4A), which showed all compound ions in the fraction and the UV maximum absorption at 520 nm (Figure 4B). The individual anthocyanins were further verified on the basis of the LC–MS spectra (Figure 4C) based on the ion-charge ratio (*m/z*) and Rt. The cyanidin was present in the aglycone form (*m/z* 287), in addition to its glycosides: cyanidin 3-*O*-glucoside (*m/z* 449.02; Rt, 19.98), cyanidin 3-*O*-rutinoside (*m/z* 595.11; Rt, 23.58), cyanidin 3-*O*-arabinoside (*m/z* 419.02; Rt, 28.1), and cyanidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glucoside (*m/z* 535.06; Rt, 29.3). The maximum wavelength absorption (Figure 4B, at 520 nm) demonstrated clearly that cyanidin-3-*O*-glucoside, eluted at Rt of 19.98 min, comprised the majority of the anthocyanins in the Sephadex LH-20 column fractions 1–9.

Analysis of Proanthocyanidins in Blackberries. HPLC and LC–MS analysis during the extraction and fractionation steps revealed the proanthocyanidin complexity in all six blackberry genotypes (Figure 5). In the earlier steps of extraction and fractionation procedures, the mixture of anthocyanins and proanthocyanidins was almost impossible to characterize; only after Sephadex LH-20 column chromatography could the proanthocyanidin compounds be separated and characterized using LC–MS, because of the dominance of co-occurring anthocyanins in the extracts and their mutual absorption of light wavelengths at both 280 and 520 nm. In the UV 280 nm chromatogram, proanthocyanidins were overshadowed by anthocyanins, and therefore, it was not feasible to have accurate estimates for them in the CE or PAE. In the Sephadex LH-20 fractions 10–12, proanthocyanidins were estimated as catechin equivalents and are presented in Table 2. The proanthocyanin estimates ranged from 118.3 to 1363.8 mg/g (catechin equivalent) in the individual fractions from the six blackberry genotypes. The average total proanthocyanidin content across all fractions and species ranged from 579.2 to 1343.6 mg/g, and cultivar Tupy was the lowest. The UM-601 (cultivated non-commercial line) had the highest proanthocyanidin content followed by WB-3 (1213.7 mg/g, catechin equivalent). While all four WB samples contained similar anthocyanin content (Table 1), they varied significantly in accumulated proanthocyanidins (Table 2). The WB-3 and UM-601 contained, on average, double the amount

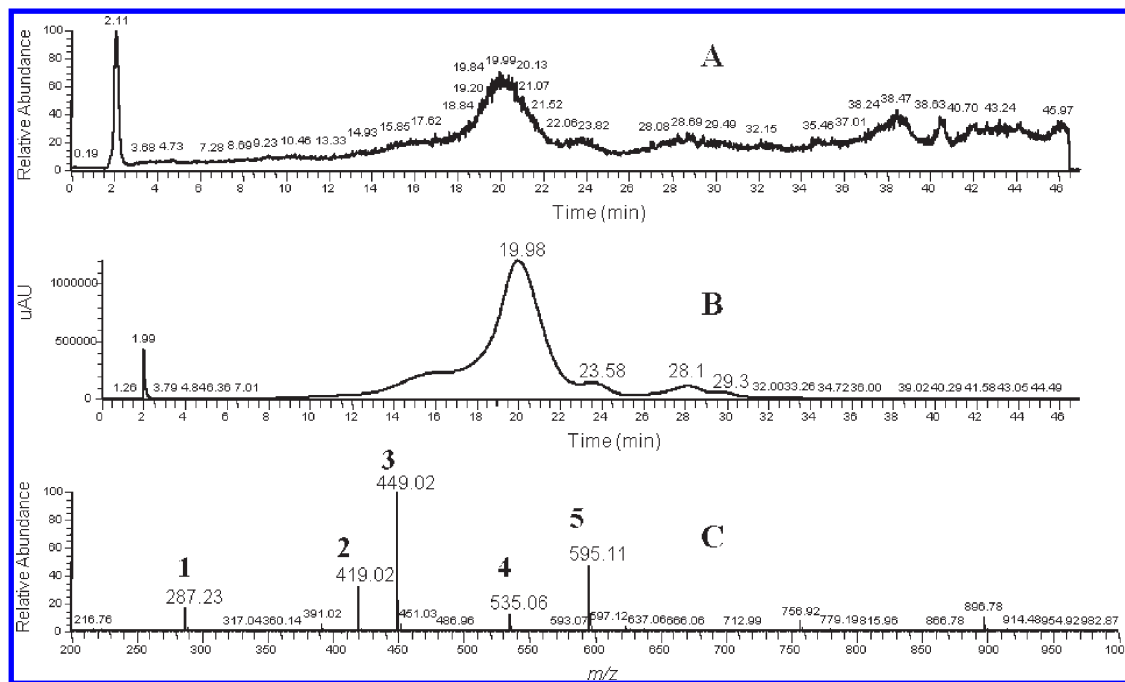


Figure 4. Representative LC–ESI–MS output spectrum, positive ion, of anthocyanins in Sephadex LH-20 fraction 5 for WB-11 genotype. (A) LC–ESI–MS output showing the total ion current, (B) photodiode array chromatograph at 520 nm wavelength, and (C) full mass spectrum, positive mode, m/z 200–1000. Anthocyanins were eluted before 35 min, as shown by UV maximum absorption, and included (1) cyanidin aglycone, (2) cyanidin 3-*O*-glucoside, (3) cyanidin 3-*O*-glucoside, (4) cyanidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glucoside, and (5) cyanidin 3-*O*-rutinoside.

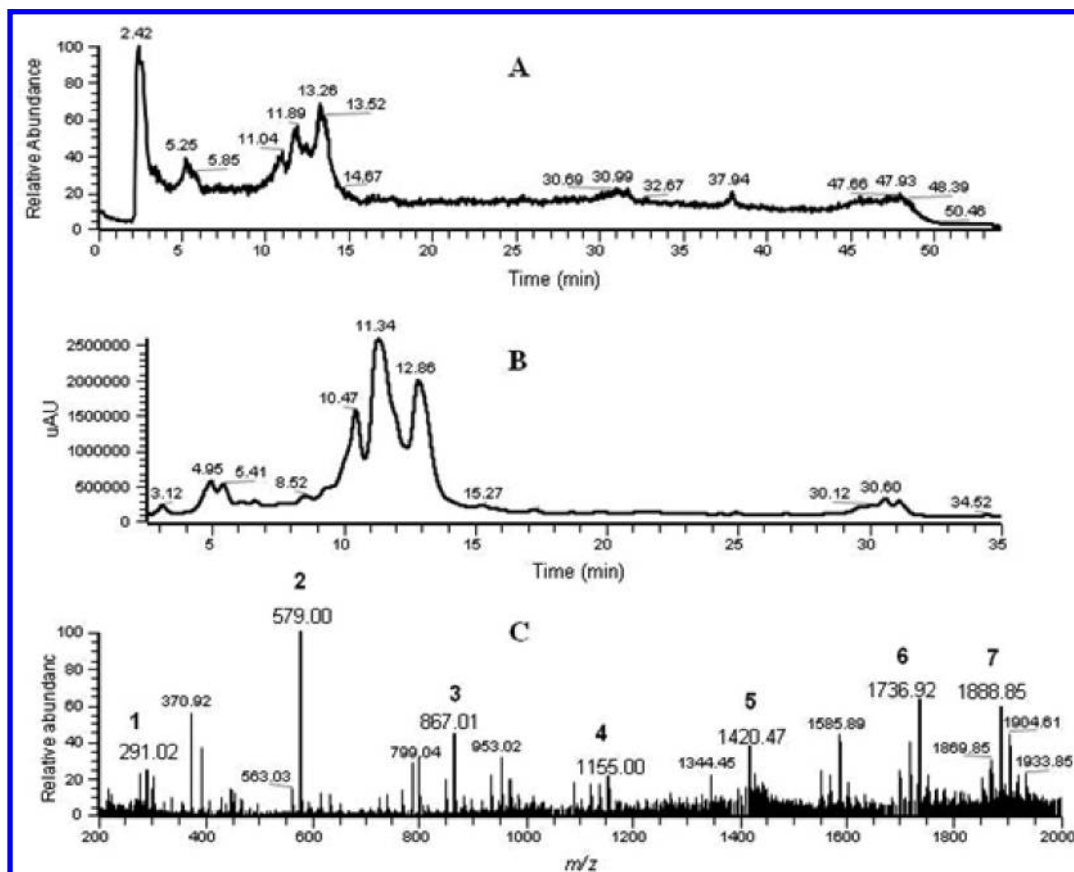


Figure 5. Representative LC–ESI–MS output spectrum, positive ion, of proanthocyanidins in Sephadex LH-20 fraction 11 for WB-11 genotype. (A) Total ion current, (B) photodiode array chromatogram, 280 nm, and (C) ESI full mass spectrum, positive mode, m/z 200–2000. Proanthocyanidins were eluted before 30 min as shown by UV maximum absorption: (1) monomer (catechin or epicatechin), (2) dimer, (3) trimer, (4) tetramer, (5) pentamer, (6) hexamer, and (7) ellagitannins.

of proanthocyanidins compared to WB-7, WB-10, and WB-11 blackberry genotypes.

The total ion current for Sephadex LH-20 fractions 10–12 showed that the proanthocyanidins constituted the majority of

Inhibition of Pro-inflammatory Responses and Antioxidant Capacity of Mexican Blackberry (*Rubus* spp.) Extracts

EDITH O. CUEVAS-RODRÍGUEZ,^{†,‡,Δ} VERMONT P. DIA,[§] GAD G. YOUSEF,[#]
PEDRO A. GARCÍA-SAUCEDO,[⊥] JOSÉ LÓPEZ-MEDINA,[⊥] OCTAVIO PAREDES-LÓPEZ,[⊗]
ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA,[§] AND MARY ANN LILA^{*,#,#,Δ}

[†]Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro, Mexico 36821, [‡]Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, Mexico, [§]Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana–Champaign, Urbana, Illinois 61801, [#]Plants for Human Health Institute, North Carolina State University, Kannapolis, North Carolina 28081, [⊥]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, Mexico 60190, [⊗]Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Guanajuato, Mexico 36821, and ^ΔDepartment of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana–Champaign, Urbana, Illinois 61801

Total polyphenolic and anthocyanin- and proanthocyanidin-rich fractions from wild blackberry genotypes (WB-3, WB-7, WB-10, and WB-11), a domesticated noncommercial breeding line (UM-601), and a commercial cultivar (Tupy) were evaluated for inhibition of pro-inflammatory responses [nitric oxide (NO) production, inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, and prostaglandin E₂ (PGE₂)] in RAW 264.7 macrophages stimulated by lipopolysaccharide (LPS). At 50 μM [cyanidin-3-O-glucoside (C3G) or catechin equivalent], most fractions significantly (*P* < 0.05) inhibited all markers. The anthocyanin-rich fraction from WB-10 and the proanthocyanidin-rich fraction from UM-601 exhibited the highest NO inhibitory activities (IC₅₀ = 16.1 and 15.1 μM, respectively). Proanthocyanidin-rich fractions from the wild WB-10 showed the highest inhibition of iNOS expression (IC₅₀ = 8.3 μM). Polyphenolic-rich fractions from WB-7 and UM-601 were potent inhibitors of COX-2 expression (IC₅₀ = 19.1 and 19.3 μM C3G equivalent, respectively). For most of the extracts, antioxidant capacity was significantly correlated with NO inhibition. Wild genotypes of Mexican blackberries, as rich sources of polyphenolics that have both antioxidant and anti-inflammatory properties, showed particular promise for inclusion in plant improvement programs designed to develop new varieties with nutraceutical potential.

KEYWORDS: Inflammation; wild blackberries; polyphenolic-rich fractions (PAE); antioxidant capacity; anthocyanins (ANC); proanthocyanidins (PAC); *Rubus*

INTRODUCTION

Chronic inflammation is associated with several human pathologies and causes the up-regulation of several pro-inflammatory proteins in affected tissues. Among the numerous pro-inflammatory enzymes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) produce nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages and in other stimulated cells (1, 2). These enzymes are involved in initiating obesity, cardiovascular disease, neurodegenerative disease, diabetes, and cancer (1, 3, 4). Cancers may arise from chronic irritation and inflammation or, conversely, an oncogenic change can induce an inflammatory microenvironment that promotes the development of tumors (1).

Natural bioactive compounds including polyphenolic phytochemicals from fruits, vegetables, grains, legumes, tea, wine, and other plant-derived products may protect against cancer, degenerative

diseases, and chronic and acute inflammation (5). Polyphenols are non-nutritive constituents produced by secondary metabolism in plants. These include several classes of phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids), flavonoids (anthocyanins, flavanols, and flavonols), condensed tannins (proanthocyanins), stilbenoids, and hydrolyzable tannins (ellagitannins and gallotannins) (6, 7). Polyphenols are scavengers of a wide variety of reactive species such as superoxide, hydroxyl radical, peroxy radical, hypochlorous acid, and peroxyxynitrous acid, resulting in less reactive radicals (8, 9). Polyphenols in fruits such as blueberry, gooseberry, lingonberry, and blackberries can act effectively as free radical inhibitors (10). Scavenging of free radicals and inhibition of inflammation may contribute to the prevention of chronic human diseases (11).

Currently, a variety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs are used to treat chronic inflammatory diseases; however, these drugs have notable side effects. Thus, phytochemicals that can be used as natural preventive agents, for example, those found in

*Corresponding author [phone (704) 250-5407; e-mail mlila@ncsu.edu].

fruits and vegetables, are an attractive alternative (12, 13). Both the polyphenolic content and antioxidant activity of berries (9, 14–18) are conditioned by the genotype of fruit (species and variety), environmental conditions, and production techniques (13, 19). However, little is known about the anti-inflammatory activity of different blackberry genotypes (20). Thus, the objectives of this study were to evaluate the inhibition of pro-inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS after treatment with extracts rich in polyphenols, anthocyanins, and proanthocyanidins from wild and cultivated Mexican blackberries and to compare their antioxidant capacities.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials. Four Mexican wild blackberries (*Rubus* spp.), designated WB-3, WB-7, WB-10, and WB-11, were collected in the spring of 2008 in Uruapan Michoacán, Mexico. These wild genotypes (commonly called frutillas or moras) are popular sources of food and pigments and are commonly wildcrafted in the region; leaves are typically used in teas to alleviate stomach pain. WB-3 and WB-10 were selections of the wild species *Rubus adenotrichus*, WB-7 was from *Rubus corifolius*, and WB-11 was from *Rubus glaucus*. A commercial blackberry (Tupy cultivar) and a domesticated noncommercial breeding line (UM-601) were collected in Los Reyes, Michoacan, Mexico, by the Agrobiologic Laboratory of Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, Mexico, in the winter of 2008. Immediately after harvest, all fruits were washed and frozen at -80°C . The samples were then lyophilized and stored at -20°C until use in bioassays.

Chemicals. Sodium pyruvate solution (100 mM), penicillin (1000 units/mL), streptomycin (1000 units/mL), sodium nitrite, sulfanilamide, *N*-1-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, and LPS from *Escherichia coli* O55:B5 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and macrophage RAW 264.7 cell line were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and fetal bovine serum (FBS) was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY). COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) monoclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and anti-mouse IgG horseradish peroxidase secondary antibody was purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, U.K.). All other chemicals were purchased from Sigma unless otherwise specified.

Polyphenolic (PAE), Anthocyanin (ANC), and Proanthocyanidin (PAC) Extracts. Freeze-dried blackberries (100 g) were blended in a flask with 500 mL of acidified 80% methanol (0.3% trifluoroic acid, TFA) (1:5 w/v) and filtered through cotton three times to separate purple pigment from pulp, using a protocol recently described by Cuevas-Rodríguez et al. (21). Briefly, the extract was partitioned with ethyl acetate (EtOAc) (1:5) to remove lipophilic material, and after solvent removal, the aqueous portion (120 mL) was loaded on an Amberlite XAD-7 column (30 × 10 cm) and washed thoroughly with acidified water (0.3% TFA) to remove free sugars, pectins, and other impurities. One liter of methanol (0.3% TFA) was added to the column to elute the pigmented polyphenolic mixture. Methanol was evaporated, and the polyphenolic mixture was lyophilized to yield ~4 g of dry powder, rich in total polyphenolics, which was designated post-Amberlite extract (PAE). Subsequently, 2.0 g of the PAE was dissolved in 5 mL of MeOH and applied to a column packed with Sephadex LH-20 (30 × 3 cm) preconditioned with H₂O/MeOH 80:20 (0.3% TFA). Twelve fractions (50 mL each) were collected starting when the colored material began to elute from the column. Using two consecutive solvents (20% MeOH and 70% acetone), anthocyanin-rich fractions (fractions 1–9) and proanthocyanidin-rich fractions (fractions 10–12) were eluted from the Sephadex LH-20 column. Solvents were evaporated ($\leq 40^{\circ}\text{C}$), and then the fractions were immediately frozen at -80°C and freeze-dried. On average, across all genotypes, Sephadex LH-20 fractions 2 and 11 had the most abundant dry mass and were assigned as fractions rich in anthocyanins (ANC) and proanthocyanidins (PAC), respectively, for comparative bioactivity analysis along with the parent PAE and crude extracts (CE).

Total Polyphenol Content (TPC). The TPC of each of the blackberry extracts (CE, PAE, ANC, and PAC) was measured according to a

modified Folin–Ciocalteu method (22). Briefly, 0.5 mL of 1 N Folin–Ciocalteu reagent was added to 0.5 mL of diluted blackberry extract (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and this mixture was allowed to stand for 2–5 min before the addition of 1 mL of 20% Na₂CO₃. The solution was then allowed to stand for an additional 10 min before reading at 765 nm in a SpectraMax Plus spectrophotometer (Sunnyvale, CA). The polyphenol content was estimated using a standard curve of gallic acid and was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry weight extract (DW).

Antioxidant Capacity. Total antioxidant capacity was estimated using the oxygen radical absorbance (ORAC) assay (23, 24) by measuring the protection by the extracts from free radicals generated by β -phycoerythrin (b-PE) in the presence of 2,2'-azobis(2-methylpropanimidamide) (AAPH). The assay was carried out in black-walled 96-well microplates (Fisher Scientific, Hanover Park, IL). Each well had a final volume of 200 μL . The following reactants were added in this order: 20 μL of 75 mM phosphate buffer, pH 7; 20 μL of either Trolox standard (1 mM final concentration) or sample (1.0–3.0 μg equiv C3G or (+)-catechin/mL); 120 μL of b-PE (70 nM final concentration); and 60 μL of AAPH (12 mM final concentration). As a blank, 25 μL of 75 mM phosphate buffer, pH 7, was added instead of Trolox or samples. Immediately after the addition of AAPH, plates were placed in an FL ×800 fluorescence plate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT), set with excitation filter 485 nm and emission 582 nm and then read every 2 min for 3 h until 95% loss of fluorescence was reached. Final fluorescence measurements were expressed relative to the initial reading. Results were calculated on the basis of the differences in the area under the fluorescence decay curve between the blank, standard, and a sample and expressed as micromoles of Trolox equivalents (TE) per gram of DW. Trolox (4–153 μM) was used as a standard ($y = 0.20x + 0.81$, $R^2 = 0.99$).

Cell Culture, Treatment, and Cell Viability. The macrophage cell line RAW 264.7 was cultured in growth medium containing DMEM, 1% penicillin/streptomycin, 1% sodium pyruvate, and 10% fetal bovine serum at 37°C in 5% CO₂/95% air. Cell treatment was conducted by seeding 2×10^5 cells in a six-well plate, and the cells were allowed to grow for 48 h at 37°C in 5% CO₂/95% air. The cells were treated with blackberry PAE, ANC, and PAC extracts (0.5, 5.0, and 50 μM equivalents of cyanidin-3-O-glucoside for PAE and ANC and catechin for PAC) and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ LPS, added together at the same time, for 24 h. Cell viability was determined using the CellTiter 96 Aqueous One Solution proliferation assay using the novel tetrazolium compound 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS), and an electron coupling reagent, phenazine ethosulfate (PES) (Promega Corp., Madison, WI). Briefly, 5×10^4 cells were seeded in a 96-well plate, and the total volume was adjusted to 200 μL with growth medium. The cells were allowed to grow for 24 h at 37°C in 5% CO₂/95% air. After treatment, the growth medium was replaced by 100 μL of fresh growth medium, and 20 μL of MTS/PES [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inert salt, and an electron coupling reagent, phenazine ethosulfate (PES)] (Promega Corp.) was added to each well. The plate was incubated for 2 h at 37°C , and the absorbance was read at 515 nm. The percentage of viable cells was calculated with respect to cells treated with dimethyl sulfoxide. Concentrations that allowed >90% cell viability were used to determine markers of inflammation.

Nitrite Measurement. NO production was measured after 24 h of cell treatment and LPS induction. A 100 μL aliquot of the culture supernatant was plated in a 96-well plate, and an equal amount of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% *N*-1-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄) was added. The plate was then incubated for 5 min at room temperature and the absorbance measured at 550 nm. The amount of NO was calculated using a sodium nitrite standard curve ($y = 0.13x + 0.12$, $R^2 = 0.99$).

Prostaglandin E₂ Measurement. After 24 h of cell treatment and LPS induction, the culture supernatant was collected. PGE₂ was measured using a PGE₂ EIA monoclonal kit following the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Briefly, 50 μL of diluted cell supernatant was plated in a 96-well goat anti-mouse IgG coated plate and incubated for 18 h at 4°C . After incubation, the plate was washed using the provided wash buffer, and the color was developed by adding 200 μL of Ellman's reagent and shaking the plate for 60–90 min in the dark.

Table 1. Total Polyphenolic Content (TPC) in Various Extracts from Wild, Commercial, and Domesticated Breeding Lines of Mexican Blackberries^a

	TPC (mg of GAE/g of DW)			
	CE	PAE	ANC	PAC
WB-3	25.5 ± 1.1a	95.7 ± 3.0e	237.8 ± 6.2c	598.0 ± 10.5a
WB-7	18.4 ± 1.1c	187.2 ± 10.9a	211.4 ± 17.1d	565.6 ± 16.6b
WB-10	19.2 ± 0.7c	134.3 ± 2.7b	318.1 ± 18.8a	495.4 ± 32.1cd
WB-11	23.6 ± 1.1ab	92.67 ± 1.8e	250.7 ± 5.0b	454.9 ± 27.9d
Tupy	14.2 ± 0.4d	111.8 ± 4.5c	221.5 ± 11.7cd	521.7 ± 4.1c
UM-601	22.4 ± 0.2b	103.6 ± 1.7d	294.6 ± 11.6a	526.3 ± 19.4c

^a Values are expressed as mean ± SD, $n = 6$. Different letters within columns show significant differences at $P < 0.05$ using LSD multiple-range test. TPC, total polyphenolic content; DW, dry weight; GAE, gallic acid equivalent; CE, crude extract; PAE, extract rich in polyphenols (post-Amberlite extract); ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; Tupy, commercial cultivar; UM-601, domesticated noncommercial blackberry breeding line; WB, wild blackberry species.

The amount of PGE₂ was calculated using the PGE₂ standard curve ($y = -37.29x + 108.6$, $R^2 = 0.98$).

Measurement of iNOS and COX-2 Protein Expression. iNOS and COX-2 enzyme expressions were determined in the cell lysates using the Western blot technique. Briefly, treated cells were washed with ice-cold DMEM and ice-cold phosphate-buffered saline before treatment with 200 μ L of Lamemli buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with 5% β -mercaptoethanol as the lysing buffer. The cell lysates were boiled for 5 min, and approximately 25 μ g of protein was loaded in 4–20% Tris-HCl ready gels (Bio-Rad Laboratories) for protein separation. Separated proteins were transferred to a PVDF membrane and blocked with 5% nonfat dry milk in 0.1% Tris-buffered saline Tween 20 (TBST) for 1 h at 4 °C. The membranes were washed with 0.1% TBST (five times, 5 min each) and incubated with either COX-2 or iNOS mouse monoclonal antibody (1:200) at 4 °C overnight. The membrane was washed again and incubated with anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate secondary antibody for 3–4 h at room temperature. After incubation, the expression of COX-2 and iNOS was visualized using chemiluminescent reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.) following the manufacturer's instructions. The membrane was imaged with a Kodak Image Station 440 CF (Eastman Kodak Co., New Haven, CT).

Statistical Analysis. Experiments were repeated at least three times for consistency. Unless otherwise stated, the data are expressed as mean ± SD. The data obtained were analyzed using two-way ANOVA, SAS Institute (25), to compare experimental treatments with control values. The comparisons between treatments were performed using LSD mean separation, and differences were considered to be significant at $P < 0.05$. The concentration to inhibit 50% (IC₅₀) of NO and PGE₂ production and COX₂ and iNOS expression was determined by nonlinear regression (curve fit) using GraphPad Prism software version 4.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

Total Polyphenolic Content. Phenolics are compounds with one or more aromatic rings and one or more hydroxyl groups (7). They are of particular importance because their consumption may ameliorate inflammation (17). The TPC of the blackberry fractions from all six genotypes is presented in **Table 1**. The TPC for blackberry crude extracts ranged from 14.2 ± 0.4 to 25.5 ± 1.1 mg of GAE/g of DW, where WB-3 and WB-11 had the highest TPC and were significantly higher than the commercial cultivar (Tupy) ($P < 0.05$). Polyphenolic content in a berry can be conditioned not only by genotype but by exposure of the plant to abiotic and biotic stresses such as temperature, irradiation, herbivore, and pathogenic infection (14, 16). The TPCs reported in this study were within the ranges of those reported for other *Rubus* spp. (9, 10, 26–28). After a cleanup procedure using Amberlite XAD-7 resin, the average TPC across all genotypes was increased from an average of 20.5 mg of GAE/g in CE to

Table 2. Antioxidant Capacity (ORAC) of Various Extracts from Wild, Commercial, and Domesticated Breeding Lines of Mexican Blackberries^a

	ORAC of extracts (μ mol of TE/g of DW)			
	CE	PAE	ANC	PAC
WB-3	361.9 ± 76.5a	2534 ± 130.2c	3430.8 ± 225.1c	3926.1 ± 18.8d
WB-7	240.8 ± 122.4d	2407.4 ± 130.2c	3562.3 ± 264.3c	3512.4 ± 50.6e
WB-10	272.0 ± 122.4d	4038.5 ± 71.4a	5761.3 ± 154.6a	4201.4 ± 2.4c
WB-11	261.5 ± 120.6c	2524.8 ± 65.2c	2381.5 ± 346.2d	4395.7 ± 9.5c
Tupy	169.9 ± 71.2e	3367.7 ± 122.6b	5205.6 ± 282.1b	4686.3 ± 173.2b
UM-601	287.5 ± 140.6b	4158.7 ± 92.6a	3519.3 ± 189.8c	5161.9 ± 6.6a

^a Different letters within columns indicate treatments were statistically different ($P \leq 0.05$), $n = 4$. ORAC, oxygen radical absorbance capacity; TE, Trolox equivalent; DW, dry weight; CE, crude extract; PAE, extract rich in polyphenols (post-Amberlite extract); ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; Tupy, commercial cultivar; UM-601, domesticated noncommercial breeding line of blackberry; WB, wild blackberry genotypes.

120.9, 255.7, and 527.0 mg of GAE/g of DW in the PAE, ANC, and PAC blackberry extracts, respectively. The ANC contained mainly cyanidin 3-*O*-glucoside, in addition to cyanidin 3-*O*-rutinoside, cyanidin 3-*O*-arabinoside, and cyanidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)-glucoside, whereas PAC contained monomeric and polymeric forms of proanthocyanidins as well as ellagitannins such as pedunculagin, sanguins H-6 and H-10, nobotanin A, malabathrin B, and lambertianin A (21). Ellagitannins have previously been reported in blackberry and raspberry species and were associated with antimicrobial bioactivities (6, 29, 30).

Antioxidant Capacity. Among the most commonly employed methods to evaluate a total antioxidant capacity is the ORAC method, which employs fluorescein as the target molecule (31). The most prevalent compounds in berries are anthocyanins, proanthocyanidins, and ellagitannins, which collectively are responsible for much of their antioxidant capacity (7). The antioxidant capacities of CE, PAE, ANC, and PAC extracts are shown in **Table 2**. The antioxidant capacities for crude extracts for all genotypes ranged from 169.9 to 361.9 μ mol of TE equiv/g of DW. The CE antioxidant capacity for WB-3 was significantly higher than for all other genotypes, whereas the commercial Tupy cultivar had the lowest antioxidant capacity ($P < 0.05$). These ORAC value ranges were similar to those previously reported for blackberries cultivated in different regions of the United States and Mexico (14). The antioxidant capacities of all semipurified blackberry extracts (PAE, ANC, and PAC) in all genotypes increased significantly ($P < 0.05$) compared to the corresponding crude extracts (**Table 2**). The cleanup procedure that yielded fractions with much higher polyphenolic concentrations also resulted in significant increases in the antioxidant capacity across all fractions. PAE blackberry extracts exhibited ORAC values 8.3–19.8 times higher than those found with the crude extracts. The antioxidant capacity for PAE extracts ranged from 2407.4 to 4158.7 μ mol of TE equiv/g of DW. PAE fractions from both UM-601 and WB-10 blackberries had the highest ORAC values ($P < 0.05$). The antioxidant capacity for blackberry extracts rich in anthocyanins (ANC) was 9.1–30.61 times higher than those for crude extracts. WB-10 exhibited significantly greater ($P < 0.05$) antioxidant activity than all other genotypes. The same trend was observed with PAC, which showed antioxidant capacities 10.8–27.6 times higher than those of the corresponding crude extracts. The range of antioxidant activity for blackberry PAC extracts was from 3512.4 to 5161.9 μ mol of TE equiv/g of DW. The domesticated UM-601 blackberries had the highest antioxidant activity among the PAC fractions of all of the blackberries tested ($P < 0.05$). It is of interest that the concentrations of total polyphenols in the PAE, ANC, and PAC extracts were approximately 6.2, 12.8, and 26.6 times greater than that of the crude

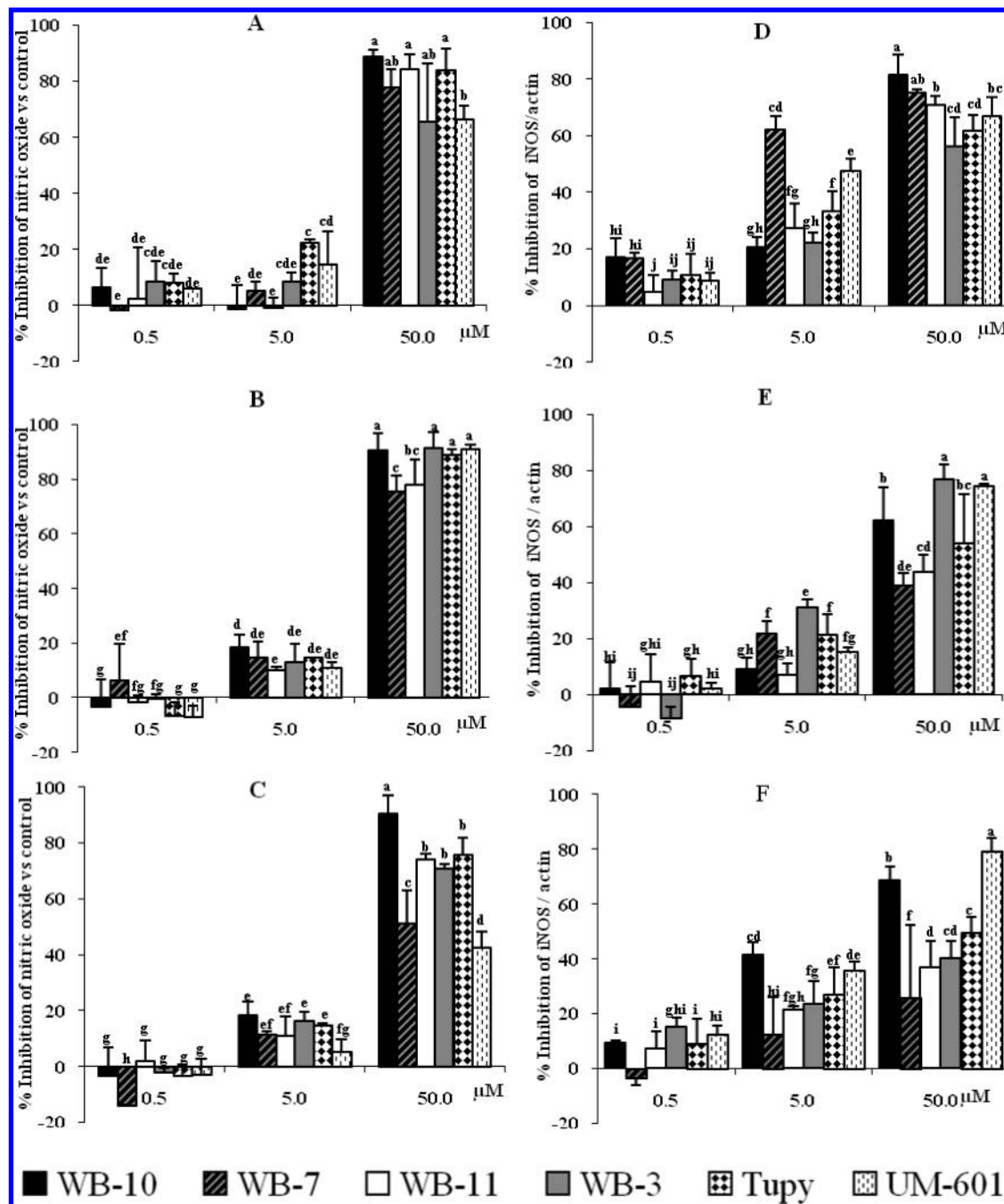


Figure 1. Inhibition of NO production and expression of iNOS by RAW 264.7 macrophages induced by LPS after treatment with extracts (0.5, 5.0, and 50 μ M equivalents of cyanidin 3-O-glucoside) from wild, commercial, and domesticated breeding lines of Mexican blackberries: inhibition (%) of NO with PAE (A), ANC (B), and PAC (C); inhibition (%) of iNOS expression with PAE (D), ANC (E), and PAC (F). PAE, extract rich in polyphenolics; ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; WB, wild blackberry species; UM-601, domesticated breeding line of blackberry; Tupy, commercial cultivar. Inhibition was calculated relative to macrophages treated with 1 μ g/mL LPS alone. Data represent the mean \pm SD from two independent experiments and at least triplicate analysis, at $P < 0.05$.

extract, respectively. The antioxidant capacities (ORAC values) of ANC, PAC, and PAE of most genotypes were comparable. This may be due to the presence of other phenolic compounds in PAE, which are active antioxidants, that may have additive or synergistic antioxidant activity with anthocyanins and proanthocyanidins (32).

Effect of Extracts on NO Production and iNOS Expression.

Some flavonoids and other polyphenolic compounds have been shown to exhibit inhibitory effects on NO production and iNOS expression (33). Therefore, we tested the effects of blackberry extracts on NO production and iNOS protein expression in LPS-

stimulated macrophages. Blackberry extracts did not affect the viability of RAW 264.7 cell up to 50 μ M (data not shown); thus, the inhibitory effects were not attributable to cytotoxic effects. Several of the PAE, ANC, and PAC extracts (Figure 1A–C) inhibited NO production up to 22% at 0.5 and 5 μ M concentrations. At 50 μ M concentration, the inhibition of these proinflammatory markers by all of the PAE, ANC, and PAC extracts was increased significantly ($P < 0.05$) compared with untreated LPS-stimulated macrophages. The ANC extract for the wild WB-10 genotype exhibited the highest activity against LPS-induced NO production with an IC_{50} value of 16.1 μ M, followed by the

Table 3. Inhibitory Concentration of Pro-inflammatory Responses (IC_{50}) for Various Extracts from Wild, Commercial, and Domesticated Breeding Lines of Mexican Blackberries^a

	IC_{50} [μ M C3G equivalent (PAE and ANC) or catechin equivalent (PAC)]								
	PAE			ANC			PAC		
	NO	iNOS	COX-2	NO	iNOS	COX-2	NO	iNOS	COX-2
WB-3	39.9	28.3	35.0	22.3	>50	>50	21.4	>50	>50
WB-7	28.2	24.5	19.1	27.5	38.9	>50	33.1	>50	>50
WB-10	28.8	21.8	25.0	16.1	36.3	32.3	19.0	8.3	45.7
WB-11	30.9	28.2	22.0	24.7	>50	>50	29.5	>50	>50
Tupy	17.5	19.0	20.0	17.8	10.6	22.5	20.9	48.9	28.9
UM-601	26.7	15.9	19.3	19.8	24.5	28.6	15.1	25.1	34.6

^a IC_{50} , the concentration (μ M) that resulted in 50% reduction of production/expression of pro-inflammatory responses, $n = 4$. PAE, extract rich in polyphenols (post-Amberlite extract); ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; NO, nitric oxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; Tupy, commercial cultivar; UM-601, domesticated blackberry breeding line; WB, wild blackberry species. Because the concentration of polyphenolics in the crude extracts (CE) was very low and no effect was observed in this assay, it was not included in this table.

commercial blackberry Tupy ($IC_{50} = 17.8 \mu$ M) and the domesticated breeding line UM-601 ($IC_{50} = 19.8 \mu$ M), whereas other genotypes possessed moderate activity (Table 3). In PAC extracts, UM-601 and WB-10 blackberries displayed the most potent effect against NO production with $IC_{50} = 15.1 \mu$ M and 19.0μ M, respectively, followed by Tupy ($IC_{50} = 20.9 \mu$ M) and WB-3 ($IC_{50} = 21.4 \mu$ M), whereas other genotypes possessed moderate activity (Table 3).

The iNOS expression in macrophages exposed to different blackberry extracts are shown in Figure 1D–F and followed the same trend as with NO inhibition. The potency of each of the blackberry extracts tested for the expression of iNOS is shown in Table 3. With PAE extracts, UM-601 showed the highest inhibition of iNOS expression ($IC_{50} = 15.9 \mu$ M), followed by Tupy ($IC_{50} = 19.0 \mu$ M). For ANC extracts, Tupy displayed more potent iNOS expression in the RAW 264.7 macrophage cells induced by LPS than ANC from any other genotype, with an IC_{50} value of 10.6μ M. However, the PAC for WB-10 showed the highest inhibition of iNOS expression ($IC_{50} = 8.3 \mu$ M) as compared to the PAC for all other blackberry genotypes. It was reported that iNOS can produce >1000-fold of NO, a signaling molecule that plays a key role in the pathogenesis of inflammation and is considered to be a pro-inflammatory mediator, when overproduced in abnormal situations (3, 4, 34). Aberrant activation of cyclooxygenase/prostaglandin signaling is widespread in human neoplasia. NO has also been shown to cause DNA damage as well as mutations in vivo (35). The formation of carcinogenic *N*-nitrosamines, resulting from elevated NO formation, has been demonstrated in cell cultures and in vivo (35, 36).

Antioxidant capacity and inhibition of NO production were significantly correlated in the PAE extracts for most of the genotypes (Table 4), indicating that various classes of phenolics in the PAE extracts had the ability to scavenge peroxy and superoxide anion radicals. The ORAC values in ANC extracts were highly correlated with NO production, for example, WB-11 ($R^2 = 0.918$), cultivar Tupy ($R^2 = 0.918$), and UM-601 ($R^2 = 0.960$). For PAC extracts high correlations were observed for only three of the genotypes: WB-3 ($R^2 = 0.966$), Tupy ($R^2 = 0.865$), and UM-601 ($R^2 = 0.966$). When flavonoids are used as antioxidants, ROS are scavenged and therefore they can no longer react with nitric oxide, resulting in less cellular damage. Also, NO can be viewed as a radical itself, and it has been reported that nitric oxide molecules are directly scavenged by flavonoids (20). Wang and Mazza (37) reported that inhibitory effects on NO

Table 4. Correlation Coefficient (R^2) Analysis of Antioxidant Capacity and Inhibition of Nitric Oxide for Various Extracts from Wild, Commercial, and Domesticated Breeding Lines of Mexican Blackberries at 50μ M Concentration^a

	antioxidant capacity/NO inhibition (%) of extracts		
	PAE	ANC	PAC
WB-3	0.823*	0.410	0.966*
WB-7	0.812**	0.848	0.466
WB-10	0.826*	0.658	0.287
WB-11	0.578	0.918*	0.778
Tupy	0.996**	0.918*	0.865*
UM-601	0.941**	0.960**	0.966*

^a Within a column, R^2 values with * and ** are significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. PAE, fraction rich in polyphenols (post-Amberlite extract); ANC, fraction rich in anthocyanins; PAC, fraction rich in proanthocyanidins. Tupy, commercial cultivar; UM-601, domesticated noncommercial breeding line of blackberry; WB, wild blackberry genotypes.

production significantly correlated with the content of individual categories of phenolic compounds present in berries.

The inhibition of NO production in macrophages could be explained by C3G interfering with the signal pathway for inflammation, due to the ROS scavenging capacity of C3G (38). Pergola et al. (20) reported that at least some part of the anti-inflammatory activity of the anthocyanin fraction of blackberry was due to suppression of NO production by C3G, which was the main polyphenol present in the blackberry extracts (21). Inflammation is a critical factor in tumor progression. Cells undergoing inflammation produce various pro-inflammatory responses that can damage DNA, leading to tumor initiation and promotion (1, 3, 34). Several studies have shown that the induction of iNOS produces large amounts of NO during endotoxemia and under inflammatory conditions. Therefore, compounds that inhibit iNOS expression and/or enzyme activity may be beneficial in averting inflammatory diseases caused by an overproduction of NO.

Effect of Extracts on PGE₂ Production and COX-2 Expression.

The effects of different concentrations of blackberry extracts on COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages induced by LPS are shown in Figure 2. For blackberry PAE extracts (0.5 and 5μ M), inhibition of COX-2 protein expression ranged from 4.3 to 50.9%. Cells treated with PAE at 50μ M showed significantly ($P < 0.05$) increased COX-2 inhibition. For blackberry PAE extracts at 50μ M concentrations (Figure 2A), inhibition of COX-2 ranged from 50.9 to 76.6%. WB-7 exhibited the highest activity against COX-2 with an IC_{50} value of 19.1μ M, followed by the UM-601 blackberries ($IC_{50} = 19.3 \mu$ M), whereas other genotypes possessed moderate activity (Table 3). For ANC extracts at the 50μ M concentrations, the inhibition of COX-2 was 33.1–60.8% (Figure 2B). The PAC extracts at 50μ M concentrations inhibited COX-2 expression by 44.9–75.6% (Figure 2C).

The effects of blackberry extracts (50μ M) on the inhibition of PGE₂ production in RAW 264.7 macrophages induced by LPS are presented in Figure 3. For PAE extracts, inhibition ranged from 28.0 to 51.6%. The ANC extracts from UM-601, Tupy, and WB-10 blackberries provided higher inhibition of PGE₂ production than any of the PAE or PAC extracts (Figure 3). The results in this study show the capability of different polyphenol extracts to inhibit pro-inflammatory responses in macrophages (RAW 264.7) induced by LPS. During inflammation, iNOS and COX-2 are overexpressed, and some studies have indicated that there might be cross-talking between the COX-2 and iNOS genes in macrophages and that such relationships are complex and cell-type specific (38). Because iNOS is an enzyme responsible for the overproduction of NO during inflammation (3, 34, 37, 39), compounds that are able to reduce NO production without affecting

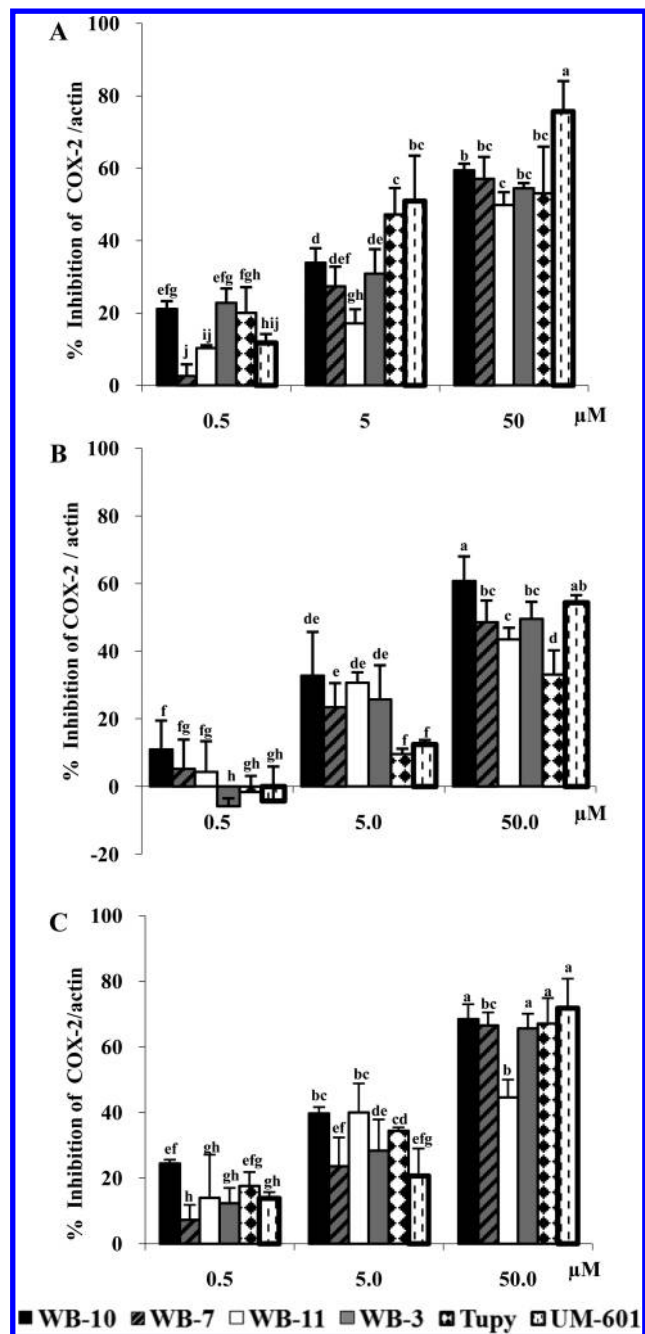


Figure 2. Inhibition of COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages induced by LPS after treatment with extracts (0.5, 5.0, and 50 μ M equivalents of cyanidin 3-*O*-glucoside) from wild, commercial, and domesticated breeding line of Mexican blackberry extracts: inhibition (%) of COX-2 expression with PAE (A), ANC (B), and PAC (C) extracts. PAE, extract rich in polyphenolics; ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; WB, wild blackberry species; UM-601, domesticated breeding line of blackberry; Tupy, commercial cultivar. Inhibition was calculated relative to macrophages treated with 1 μ g/mL LPS alone. Data represent the mean \pm SD from two independent experiments and at least a duplicate analysis, at $P < 0.05$.

eNOS or nNOS (isoforms of NOS) may be desirable anti-inflammatory agents (39). In this context, it has been reported that the high affinity of polyphenols for proteins and a possible subsequent conformational change of the enzyme might be associated with the inhibitory effect on iNOS enzymatic activity (40). On the other hand, elevated prostaglandin levels are exhibited in many human cancers due to the up-regulation of

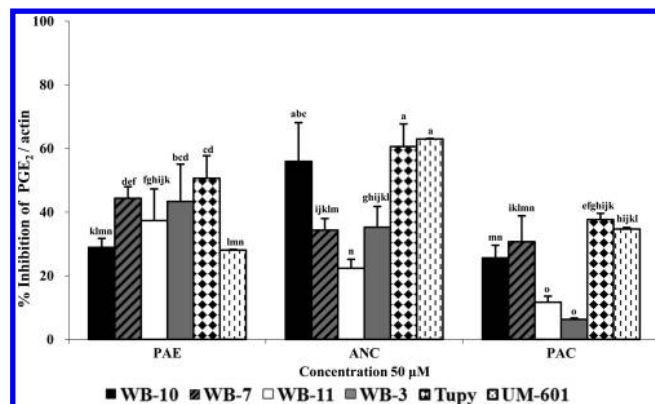


Figure 3. Inhibition of prostaglandins (PGE_2) production in RAW 264.7 macrophages induced by LPS after treatment with extracts (50 μ M equivalents of cyanidin 3-*O*-glucoside for PAE and ANC, and 50 μ M equivalents of catechin for PAC) from wild, commercial, and domesticated breeding line of Mexican blackberry extracts: inhibition (%) of prostaglandins with PAE, ANC, and PAC extracts. PAE, extract rich in polyphenolics; ANC, extract rich in anthocyanins; PAC, extract rich in proanthocyanidins; WB, wild blackberry species; UM-601, domesticated breeding line of blackberry; Tupy, commercial cultivar. Inhibition was calculated relative to macrophages treated with 1 μ g/mL LPS alone. Data represent the mean \pm SD from two independent experiments and at least duplicate analysis, at $P < 0.05$.

COX-2. Aberrant activation of cyclooxygenase/prostaglandin signaling is widespread in human neoplasia, and increased expression of COX-2 was also demonstrated in animal models of colitis and in human inflammatory bowel diseases (1, 41). These findings demonstrated a marked increase in COX-2 during the inflammatory process and led to the notion that COX-2 alone is involved in inflammation (34, 42). Polyphenolic-rich PAE fractions from the wild WB-7 and the domesticated breeding line UM-601 were the most potent inhibitors of COX-2 expression.

The combined results from this study suggest that dietary consumption of blackberries may reduce the oxidative stress generated by NO and the expression of pro-inflammatory proteins such as COX-2 and iNOS, thus increasing the body's protection against oxidation-inflammation-related diseases and, further, that polyphenolic-rich fractions from blackberry may be attractive targets for use as nutraceutical agents. Given the particularly strong bioactivities demonstrated by the wild Mexican blackberries, including the UM-601 breeding line derived from wild parents, we conclude that these genotypes may be useful in plant-breeding programs designed to obtain new varieties with enhanced nutraceutical potential.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Uruapan, Mexico, for donating the blackberry breeding line.

LITERATURE CITED

- (1) Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444.
- (2) Shin, K.; Kim, I.; Park, Y.; Ha, J.; Choi, J.; Park, H.; Lee, Y. S.; Lee, K. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E₂, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2327–2336.
- (3) Dia, V. P.; Wang, W.; Oh, V. L.; de Lumen, B. O.; de Mejia, E. G. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* **2009**, *114*, 108–115.

- (4) Yoon, J.; Baek, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* **2005**, *46*, 585–596.
- (5) Pan, M. H.; Ghai, G.; Ho, C. T. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 43–52.
- (6) Mertz, C.; Cheynier, V.; Ganata, Z.; Brat, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8616–8624.
- (7) Stoner, G. D.; Wang, L.; Casto, B. C. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1665–1674.
- (8) Mertz, C.; Gancel, A.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A. M.; Ruales, J.; Brat, P. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 381–387.
- (9) Wang, S. Y.; Jiao, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5677–5684.
- (10) Pantelidis, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A.; Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**, *102*, 777–783.
- (11) Rao, C. V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *555*, 107–119.
- (12) Lin, Y.; Lin, J. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 465–472.
- (13) Koca, I.; Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. *Sci. Hortic.* **2009**, *121*, 447–450.
- (14) Reyes-Carmona, J.; Yousef, G. G.; Martínez-Peniche, R. A.; Lila, M. A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, S497–S503.
- (15) Siritworn, T.; Wrolstad, R. E.; Finn, C. E.; Pereira, C. B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8021–8030.
- (16) Kalt, W.; Ryan, D. A. J.; Duy, J. C.; Prior, R. L.; Ehlenfeldt, M. K.; Vander Kloet, S. P. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanoceus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4761–4767.
- (17) Rossi, A.; Serraino, I.; Dugo, P.; Paola, R. D.; Mondello, L.; Genovese, T.; Morabito, D.; Dugo, G.; Sautebin, L.; Caputi, A.; Cuzzocrea, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Res.* **2003**, *37*, 891–900.
- (18) Deighton, N.; Brennan, R.; Finn, C.; Davies, H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *2010*, 1307–1313.
- (19) Scalzo, J.; Politi, A.; Pellegrini, N.; Mezzetti, B.; Battino, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* **2005**, *21*, 207–213.
- (20) Pergola, C.; Rossi, A.; Dugo, P.; Cuzzocrea, S.; Sautebin, L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide* **2006**, *15*, 30–39.
- (21) Cuevas-Rodríguez, E. O.; Yousef, G. G.; García-Saucedo, P. A.; Medina-García, J.; Paredes-López, O.; Lila, M. A. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7458–7464.
- (22) Nurmi, K. I.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Kalevi, P. Phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* spp. *tortuosa*). *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22*, 2023–2040.
- (23) Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Luke, H.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273–3279.
- (24) Dávalos, A.; Gomez-Córdovez, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54.
- (25) SAS Institute. *SAS User's Guide, Statistics*, 8th ed.; SAS Institute: Cary NC, 1999.
- (26) Gonzalez, E. M.; de Ancos, B.; Cano, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5459–5464.
- (27) Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* **2008**, *111*, 816–823.
- (28) Dai, J.; Patel, J. D.; Mumper, R. J. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food* **2007**, *10*, 258–265.
- (29) Hager, T. J.; Howard, L. R.; Liyanage, R.; Lay, J. O.; Prior, R. L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 661–669.
- (30) Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H. L.; Oksman-Caldentey, K. M. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 8–18.
- (31) Wu, X.; Gu, L.; Prior, R. L.; McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7846–7856.
- (32) Prior, R. L.; Gu, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2264–2280.
- (33) Chen, Y.; Shen, S.; Chen, L.; Lee, T.; J-F.; Yang, L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 1417–1427.
- (34) Agarwal, S.; Reddy, G. V.; Reddanna, P. Eicosanoids in inflammation and cancer: the role of COX-2. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2009**, *5*, 145–165.
- (35) Seril, D. N.; Liao, J.; Yang, G.; Yang, C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 353–362.
- (36) Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C. L.; Penman, B. W.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 3030–3034.
- (37) Wang, J.; Mazza, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 850–857.
- (38) Hori, M.; Kita, M.; Torihashi, S.; Miyamoto, S.; Won, K.; Sato, K.; Ozaki, H.; Karaki, H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *280*, G930–G938.
- (39) García-Lafuente, A.; Guillaman, E.; Villares, A.; Rostagno, M.; Martínez, J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 537–552.
- (40) Kobuchi, H.; Virgill, F.; Packer, L. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. In *Methods in Enzymology*; Kobuchi, H., Virgill, F., Packer, L., Ed.; Academic Press: New York, 1999; Vol. 301, pp 504–513.
- (41) Lauritsen, K.; Laursen, L. S.; Bukhave, K.; Rask-Madsen, J. Inflammatory intermediaries in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1989**, *4*, 75–90.
- (42) Reuter, B. K.; Asfaha, S.; Buret, A.; Sharkey, K. A.; Wallace, J. L. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2076–2085.

Received for review July 6, 2010. Revised manuscript received August 4, 2010. Accepted August 6, 2010. We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for partially supporting this work and the Ph.D. scholarship allowing the first author the opportunity to conduct research at the University of Illinois, Universidad de Querétaro, and Cinvestav-IPN-Irapuato.

Table 2. Concentration of Proanthocyanidins (mg/g, Catechin Equivalent) in Freeze-Dried Samples in Different Extracts and Fractions from Six Mexican Blackberries^a

sample/genotype	proanthocyanidins (mg/g of dry weight) (catechin equivalent)					
	Tupy ^b	WB-3 ^c	WB-7	WB-10	WB-11	UM-601 ^d
CE	ND ^e	ND	ND	ND	ND	ND
PAE	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sephadex LH-20 fractions ^f						
fraction 10	510.2	1203.2	118.3	778.1	749.9	1323.4
fraction 11	919.8	1224.2	716.7	758.0	716.7	1363.8
fraction 12	307.6	ND	ND	ND	ND	ND
average	579.2	1213.7	417.5	768.0	733.3	1343.6

^aDetection of proanthocyanidin in the CE and PAE was not possible because of interference of co-eluting anthocyanins, which had the same absorption in UV at 280 nm as proanthocyanidins. ^bTupy = commercial cultivar. ^cWB = wild blackberry genotypes. ^dUM-601 = cultivated noncommercial blackberry line. ^eND = not detected. ^fSephadex LH-20 fractions 10–12 were designated as proanthocyanidin-enriched fractions.

the polyphenolics (**Figure 5A**), with the maximum absorption of UV at 280 nm (**Figure 5B**). Detailed LC–MS ESI mass spectra recorded at the m/z range from 200 to 2000 (**Figure 5C**) showed the presence of molecular ions for proanthocyanidin monomers, including catechin and/or epicatechin (m/z 291.02), dimers of catechin/epicatechin (m/z 579.00), and a series of higher degrees of polymerization, including trimers (m/z 867.01), tetramers (m/z 1155.00), pentamers (m/z 1420.47), and hexamers (m/z 1736.92). In addition, a series of ellagitannins were identified in the Sephadex LH-20 fractions for all blackberry species using LC–MS/MS. Very limited work characterizing proanthocyanidins in different blackberry species have been previously reported (27); however, recent studies have shown that blackberry and raspberry contain gallotannins and ellagitannins (hydrolyzable tannins) (1, 28). Gallotannins are composed of gallic acid, whereas ellagitannins are polymers of hexahydroxydiphenic (HHDP) acid, which is a dimeric form of gallic acid that can spontaneously lactonize to form ellagic acid. For both gallotannins and ellagitannins, the gallic or HHDP acids are esterified to one or multiple glucopyranosides to form diversified polymers (14).

Characterization of ellagitannin compounds in blackberry genotypes was challenging because of their complexity, diversity, and large molecular size. Subsequent MS fragmentation procedures for the predominant positive ions in MS/MS were used to identify the molecular masses of ellagitannins and conjugates of ellagic acid in the samples. Whenever possible, chromatographic retention and literature data were used to support the identifications of compounds. In the analysis of MS/MS, several ellagitannins were identified in blackberry fractions obtained through Sephadex LH-20. The identified ellagitannins, in addition to the ellagic acid (m/z 303.01), included compounds described hereafter. Pedunculagin isomers had a $[M + H]^+$ at m/z 801.56, and the MS/MS spectrum showed fragments at m/z 766.01 ($M - 35$, loss of two water molecules) and m/z 464.56 ($M - 302$ loss of HHDP). This compound could be a series of structurally related compounds with the addition of a water molecule (26). Sanguiin H-10 had a $[M + H]^+$ at m/z 1586.32, and the major ions in MS/MS were at m/z 1568.15 ($M - 18$, loss of a water molecule), m/z 1398.23 ($M - 170$, loss of a gallate unit), m/z 1079.41 ($M - 319$, loss of a HHDP group and water molecule), m/z 917.10 ($M - 162$, loss of a glucosyl group), m/z 767.43 ($M - 150$, loss of a galloyl group), m/z 615.21 ($M - 152$ loss of a galloyl group), and m/z 453.12 ($M - 162$, loss of a glucosyl group). On the basis of the MS/MS spectra and published data, this peak was tentatively identified as Sanguiin H-10 (28) in raspberry fruits. Nobotanin A/Malabathrin B had a $[M + H]^+$ at m/z 1736.01; it produced fragments by MS/MS,

including m/z 1720.02 ($M - 169$, loss of a gallate group), m/z 1417.21 ($M - 302$, loss of a HHDP group), m/z 1085.22 ($M - 332$, loss of glucosyl and galloyl groups), and m/z 783.32 ($M - 150$, loss of a galloyl group). Similar conclusions for ellagitannin characterization have been previously reported (28, 29). Sanguiin H-6/Lambertianin A had a $[M + H]^+$ at m/z 1888.85. The MS/MS fragmentation patterns of Sanguiin H-6 included m/z 1869.85 ($M - 18$, loss of a water molecule), m/z 1569.89 ($M - 301$, loss of a HHDP group), and m/z 1230.56 ($M - 339$, loss of glucosyl and galloyl groups). The remaining fragments were m/z 933.17 and 633.45. These findings were in agreement with earlier reports in *Rubus idaeus* (28, 30). Ellagic acid isomers had a $[M + H]^+$ at m/z 479.22 with a fragmentation pattern of m/z 303.45 ($M - 160$, loss of a hexose), m/z 257.22, and m/z 229.25 and were tentatively identified as ellagic acid hexosides, previously detected in pomegranate juices (31). MS/MS on m/z 301.00 ion afforded ions at m/z 257.14 and 229.00, which have been established as ellagic-acid-like ions. On the basis of our spectral data and literature, doubly charged ions (half of the m/z value for the parent ion) were observed in Sephadex LH-20 fractions 10–12 spectra, contributing to the complexity in identifying ellagitannins in blackberry fruits.

To characterize the extracts from blackberries, it was necessary to repeatedly perform fractionation steps using Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 resins. The use of HPLC–ESI–MS/MS facilitated the identification and quantification of the major polyphenolic groups in blackberry genotypes. The data indicated that the combination of Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 column chromatography was a suitable method for the purification of anthocyanins, proanthocyanidins, and other flavonoids in the wild Mexican blackberries and provided reproducible and reliable quantification. Polyphenolic groups identified in this study, including anthocyanins and condensed and hydrolyzable tannins, varied widely among the six blackberry genotypes. The commercial Tupy cultivar had a relatively low anthocyanin content as compared to the wild genotypes and domesticated noncommercial line (UM-601). Considerable variability in the proanthocyanidin content was also observed in the HPLC spectra.

Previous reports have indicated difficulty in both achieving adequate separation of anthocyanin and proanthocyanidin classes of phytochemicals and accurate identification and quantification in general (13). In this study, the main polyphenolic groups in blackberry were isolated, categorized, and characterized separately, which permitted a more rigorous estimation of polyphenol content. Most previously published data have been reported on the basis of the estimation of the total phenolics in berries and other fruits using Folin–Ciocalteu and other colorimetric methods and have estimated the total phenolics in the range of 12.1–23.5 mg/g of dry weight (gallic acid equivalent) in commercial blackberry cultivars, such as Choktaw, Thornless, and Triple Crown (4, 12, 32, 33). In another report (26), the anthocyanin content in the blackberry cultivar “Apache” was estimated at 2.6 mg/g, which was comparable to the Mexican cultivar “Tupy” evaluated in this study. However, the wild and cultivated Mexican berries (except WB-3) contained more than twice the anthocyanin content compared to the commercial cultivar (Tupy). Other researchers have reported anthocyanins in the range of 7.94–18.1 mg/g of dry weight (cyanidin 3-*O*-glucoside equivalent) in commercial blackberry fruits (8, 12). Gu et al. (27) reported 0.27 mg/g of fresh weight (catechin equivalent) proanthocyanidins in blackberries. Proanthocyanidins were not quantified in CEs in this study but were easily characterized in the enriched fractions 10–12 at high concentrations.

Although blackberries as analyzed in this study contained mainly anthocyanins (cyanidin 3-*O*-glucoside), condensed

(proanthocyanidin) and hydrolyzable tannins were observed in appreciable amounts. To the best of our knowledge, this was the first report that details the characterization of polyphenolics in a number of Mexican blackberry genotypes, after separation into three main polyphenolic groups known for their potent *in vivo* and *in vitro* bioactivities. This study demonstrated that the four Mexican wild blackberry genotypes exhibit high polyphenolic concentrations and can be used as a plant source rich in polyphenolics for breeding programs aimed at developing new cultivars/varieties with elevated polyphenolic content.

LITERATURE CITED

- Mertz, C.; Cheyner, V.; Gánata, Z.; Brat, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8616–8624.
- Ding, M.; Feng, R.; Wang, S. Y.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B. H.; Shi, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17359–17368.
- Mertz, C.; Gancel, A.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A. M.; Ruales, J.; Brat, P. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 381–387.
- Pantelidis, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A.; Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**, *102*, 777–783.
- Fernandez-Panchon, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 649–671.
- Garcia-Alonso, M.; de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* **2004**, *84*, 13–18.
- Koca, I.; Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. *Sci. Horticult.* **2009**, *121*, 447–450.
- Reyes-Carmona, J.; Yousef, G. G.; Martínez-Peniche, R. A.; Lila, M. A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, S497–S503.
- Scalzo, J.; Politi, A.; Pellegrini, N.; Mezzetti, B.; Battino, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* **2005**, *21*, 207–213.
- Lila, M. A. The nature-versus-nurture debate on bioactive phytochemicals: The genome versus terroir. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2510–2515.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H.; Oksman-Caldente, K. Bioactive berry compounds—Novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 8–18.
- Wang, S. Y.; Lin, H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 140–146.
- Wu, X.; Gu, L.; Prior, R. L.; McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7846–7856.
- Haslam, E. *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1989; pp 230–235.
- Prior, R. L.; Gu, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2264–2280.
- Dai, J.; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R. J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 837–847.
- Elisia, I.; Hu, C.; Popovich, D. G.; Kitts, D. D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1052–1058.
- Foo, L. Y.; Porter, L. J. The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.* **1981**, *32*, 711–716.
- Lei, Z.; Jervis, J.; Helm, R. F. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1165–1168.
- Schmidt, B. A.; Howell, B.; McEniry, B.; Knight, C. T.; Seigler, D. S.; Erdman, J. W.; Lila, M. A. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6433–6442.
- Zhang, Y.; Liao, X.; Chen, F.; Wu, J.; Hu, X. Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 395–403.
- Kammerer, D.; Gajdos Kljusuric, J.; Carle, R.; Schieber, A. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 431–437.
- Okie, W. R. Register of new fruit and nut varieties. *HortScience* **2002**, *37*, 251.
- Grace, M. H.; Ribnicky, D. M.; Kuhn, P.; Poulev, A.; Logendra, S.; Yousef, G. G.; Raskin, I.; Lila, M. A. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 406–415.
- Dugo, P.; Mondello, L.; Errante, G.; Zappia, G.; Dugo, G. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3987–3992.
- Hager, T. J.; Howard, L. R.; Liyanage, R.; Lay, J. O.; Prior, R. L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC–ESI–MS and MALDI–TOF–MS. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 661–669.
- Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* **2003**, *134*, 613–617.
- Mullen, W.; Yokota, T.; Lean, M. J.; Crozier, A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSⁿ. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 617–624.
- Yoshida, T.; Nakata, F.; Hosotani, K.; Nitta, A.; Okudat, T. Dimeric hydrolysable tannins from *Melastoma malabathricum*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2829–2833.
- Haddock, E. A.; Gupta, R. K.; Al-Shafi, M. K.; Layden, S.; Haslam, K.; Magnolato, E. D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: Biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1049–1062.
- Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4581–4589.
- Dai, J.; Patel, J. D.; Mumper, R. J. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food* **2007**, *10*, 258–265.
- Hassimoto, A. N. M.; Mota, R. V.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. *Cienc. Technol. Aliment.* **2008**, *28*, 702–708.

Received for review April 19, 2010. Revised manuscript received May 11, 2010. Accepted May 17, 2010. The authors thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for partially supporting this work and the Ph.D. scholarship allowing the first author the opportunity to conduct research at the University of Illinois, Universidad de Querétaro, and Cinvestav-IPN-Irapuato. We also thank the Universidad Michoacana of San Nicolas de Hidalgo, Uruapan, Mexico, for donating the blackberry breeding line.