

Efecto de la extracción de los compuestos antioxidantes de la cáscara de manzana con solventes, sobre la bioactividad y su capacidad antioxidante.

Effect of the extraction solvent on the bioactivity and antioxidant capacity of apple peel extracts

Elizabeth Bustos-Hipólito^{1,3}, Ana Victoria Legorreta-Siañez², Ana Luisa Jofre Garfias²,
Leandro Rodrigo González-González^{1,2}, Francisco Jesús Arenas-Huertero^{2,3},
Fernando García-Gil de Muñoz² y José Francisco Buenrostro-Zaga^{1,2}

¹Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México

²Universidad Simón Bolívar, México

³Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

ana.vilesi@gmail.com, ajofre@bolivar.usb.mx,
rodrigo@hotmail.com, farenashuertero@yahoo.com.mx,
ambiental@usb.edu.mx, fbzagal@bolivar.usb.mx

Recepción: 14 de junio de 2012

Aceptación: 30 de noviembre de 2012

(pp. 123-130)

Resumen

Es conocido que la cáscara de manzana tiene concentraciones importantes de compuestos antioxidantes, sin embargo, estas concentraciones de compuestos polifenólicos y su capacidad antioxidante en la cáscara de manzana Red Delicious se modifica en función del disolvente utilizado durante su extracción. Los ensayos de extracción se realizaron utilizando 4 disolventes diferentes: metanol (80%), etanol (80%), agua en su punto de ebullición y a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas para su capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C (VCEAC), contenido de fenoles totales (TPC), contenido total de flavonoides (TFC), contenido total de antocianina (TAC) y en ensayos in vitro de células epiteliales bronquiales humanas normales (línea celular NL-20) y células humanas de adenocarcinoma de pulmón epiteliales (línea celular A549) en un intervalo de concentración de 10-5 a 10-2 mg de extracto / ml. Con TAC como una excepción, el agua hirviendo demuestra tener los niveles más altos en todas las pruebas químicas realizadas, seguido por el metanol y el etanol, aunque la última tuvo los más altos niveles de TAC. En cuanto a los ensayos de células se refiere, los extractos acuosos y metanólico indujeron la proliferación de células NL-20 hasta un 50%. En las células A549, los extractos de etanol y de ebullición de agua tenían un ligero efecto proliferativo.

Palabras clave: Cáscara de manzana, proliferación celular, capacidad antioxidante

Abstract

As it is known, apple peels have high concentrations of antioxidant compounds; however, these concentrations of polyphenolic compounds and their antioxidant capacity in Red Delicious apples peels differ with the solvents used during their extraction. Extraction assays

were performed using 4 different solvents: methanol (80%), ethanol (80%), boiling and room temperature water. The samples were tested for Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC), total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC) and *in vitro* cell assays in normal human bronchial epithelial cells (cell line NL-20) and human lung adenocarcinoma epithelial cells (cell line A549) in a concentration range of 10-5-10-2 mg of extract/ml. With TAC as an exception, boiling water proved to have the highest levels in all the chemical tests performed, followed by methanol and ethanol, though the latest had the highest TAC levels. As far as the cell assays are concerned, aqueous and methanolic extracts induced proliferation of NL-20 cells up to a 50%. On A549 cells; ethanol and boiling water extracts had a slightly proliferative effect.

Key Words: Apple peels, cell proliferation, antioxidant capacity

Introducción

Desde hace tiempo, el consumo regular de manzanas se ha relacionado con un efecto promotor de la salud. Varios estudios vinculan su consumo con la reducción del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas, como el cáncer de pulmón en mujeres (Boyer, 2004). Por otro lado, esta creencia se ha visto respaldada por numerosos estudios realizados en los últimos años, es decir, las actividades antiproliferativas analizadas de los extractos de manzana contra HepG2 (células humanas de cáncer de hígado), (He, 2007; Wolfe, *et.al*, 2003 y Wolfe, 2003) MCF-7 (células de cáncer de mama), (He, 2007) y Caco-2 (células de cáncer de colon) (He, 2007). Por el contrario, hay pocos documentos que evalúan las actividades de proliferación en cultivos de células sanas (Okada, 2007).

Esta actividad antiproliferativa de la manzana ha sido asociada a los compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, que va de un contenido fenólico de 110 a 357 mg/100 g de manzana fresca (Wolfe, 2003).

De la misma manera, se han observado diferencias entre la naturaleza y la distribución de estos compuestos en la pulpa y la cáscara y que deben ser considerados. En realidad, la pulpa de manzana es rica en catequinas, procianidinas, phloridzin y esteroides de los ácidos hidroxycinámicos entre otros compuestos, mientras que las cáscaras de manzana no sólo contienen estos fitoquímicos, también se encuentran glucósidos flavonoides adicionales, como la quercetina y cianidinas (Wolfe, *et.al*, 2003).

Tradicionalmente, para evaluar las actividades antioxidantes y antiproliferativas de los compuestos polifenólicos se lleva a cabo la extracción con disolventes, tales como disolventes polares, soluciones acuosas de metanol, etanol, acetona y acetato de etilo principalmente, se emplean para recuperar los polifenoles dentro de una matriz vegetal (Sultana, 2009). No obstante, la composición, los rendimientos y las respuestas observadas son notablemente influenciados tanto por la naturaleza del disolvente como por las condiciones de extracción. Además la temperatura y el pH juegan un papel esencial ya que podrían facilitar la accesibilidad a la compleja estructura tisular (Spigno, 2007).

Por lo tanto, una importante cuestión está implícita cuando no hay acuerdo sobre la metodología de extracción, se han hecho y documentado comparaciones entre los estudios y la incertidumbre se hace evidente cuando se trata de hacerse la prueba *in vitro* y no es igual (Wolfe, 2003; He, 2007; Sun, *et.al*, 2002).

Objetivo

Para probar esta afirmación, este trabajo compara la respuesta de diferentes extractos de cáscara de manzana y a la capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C (VCEAC), contenido de fenoles totales (TPC), contenido total de flavonoides (TFC) y contenido de antocianina total (TAC). Así como su bioactividad en ensayos de células *in vitro* en condiciones normales para células epiteliales bronquiales (línea celular NL-20) y de células humanas con adenocarcinoma de pulmón (línea de células epiteliales A549).

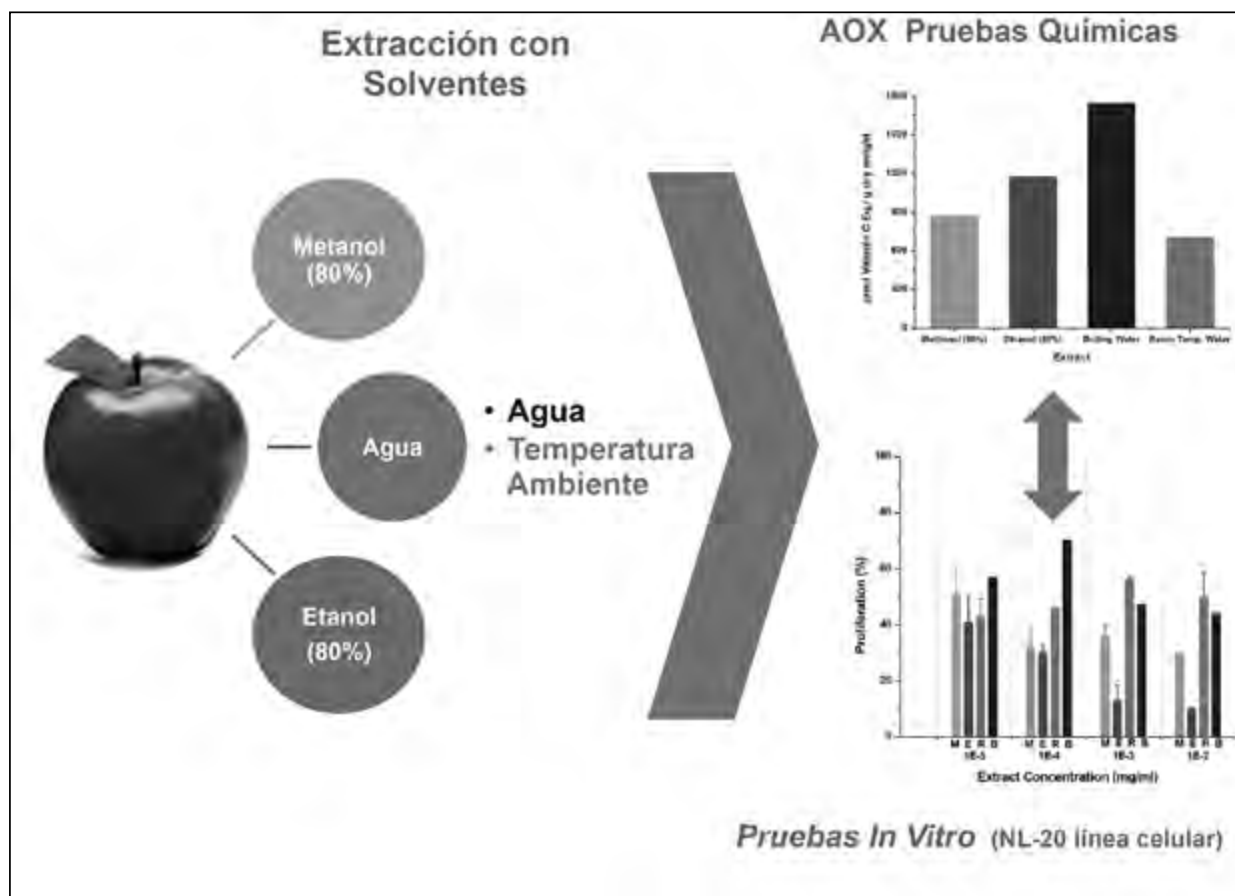
Método

Preparación de la muestra y extracción

Un lote elegido al azar de 20 manzanas *Red Delicious* fue adquirido en un mercado local. Los frutos se lavaron, se secaron y su recubrimiento de cera fue removido mecánicamente. Todas las manzanas se pelaron manualmente y las cáscaras (considerada como la zona epidérmica de las manzanas) se secaron en una bandeja durante 18 horas a 35 ° C. La mezcla de cáscaras fue almacenada en refrigeración hasta su análisis.

Los compuestos fenólicos de cáscara de manzana se extrajeron por triplicado con 4 disolventes diferentes: solución de metanol al 80%, solución de etanol al 80%, agua hirviendo y a temperatura ambiente en una proporción de 1:10 (w/v) de cáscara seca/disolvente. Las muestras fueron sometidas a un baño de ultrasonido durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los extractos resultantes se liofilizaron a sequedad para eliminar cualquier resto de disolvente (véase figura 1).

Figura 1. Metodología de extracción



Ensayo Químico

Cada extracto fue probado para la capacidad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) utilizando el ensayo con ABTS•+, (Ayse, 2009; Nenadis, 2004). El contenido de fenoles totales (TPC) por el método de Folin Ciocalteu, (Kumar, 2008; Ya-Qin, 2008). El contenido total de flavonoides (TFC) con el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio (Kumar, 2008) y el contenido total de antocianinas (TAC) por el método del pH diferencial (Lee, 2005).

Ensayo de cultivo celular

Las células bronquiales epiteliales normales (línea celular NL-20) y las células humanas de adenocarcinoma de pulmón (línea de células epiteliales A549) se expusieron a los extractos de cáscara de manzana en un rango de concentración de 10⁻⁵-10⁻² mg / ml en un arreglo factorial.

Las células NL-20 se mantuvieron en medio de cultivo HamF12 que contenía 4% de suero fetal bovino, 1,5 g / l de bicarbonato de sodio, glucosa 2,7 g / l, 0,1 mM aminoácidos, 2 mM de L-glutamina, 5 g / l de insulina, 10 ng / ml factor de crecimiento epidérmico, 1 mg / ml de transferrina, 500 hidrocortisona ng / ml y antibióticos 1X.

Las células A549 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal antibióticos y 1X.

Un total de 1,8 x 10⁴ células en medio de crecimiento se colocaron en cada pozo de una placa de cultivo de 96 con fondo plano. Después de 24 h de incubación a 37 °C en 5% de CO₂, el medio de crecimiento fue sustituido por los medios que contienen las diferentes concentraciones de extracto.

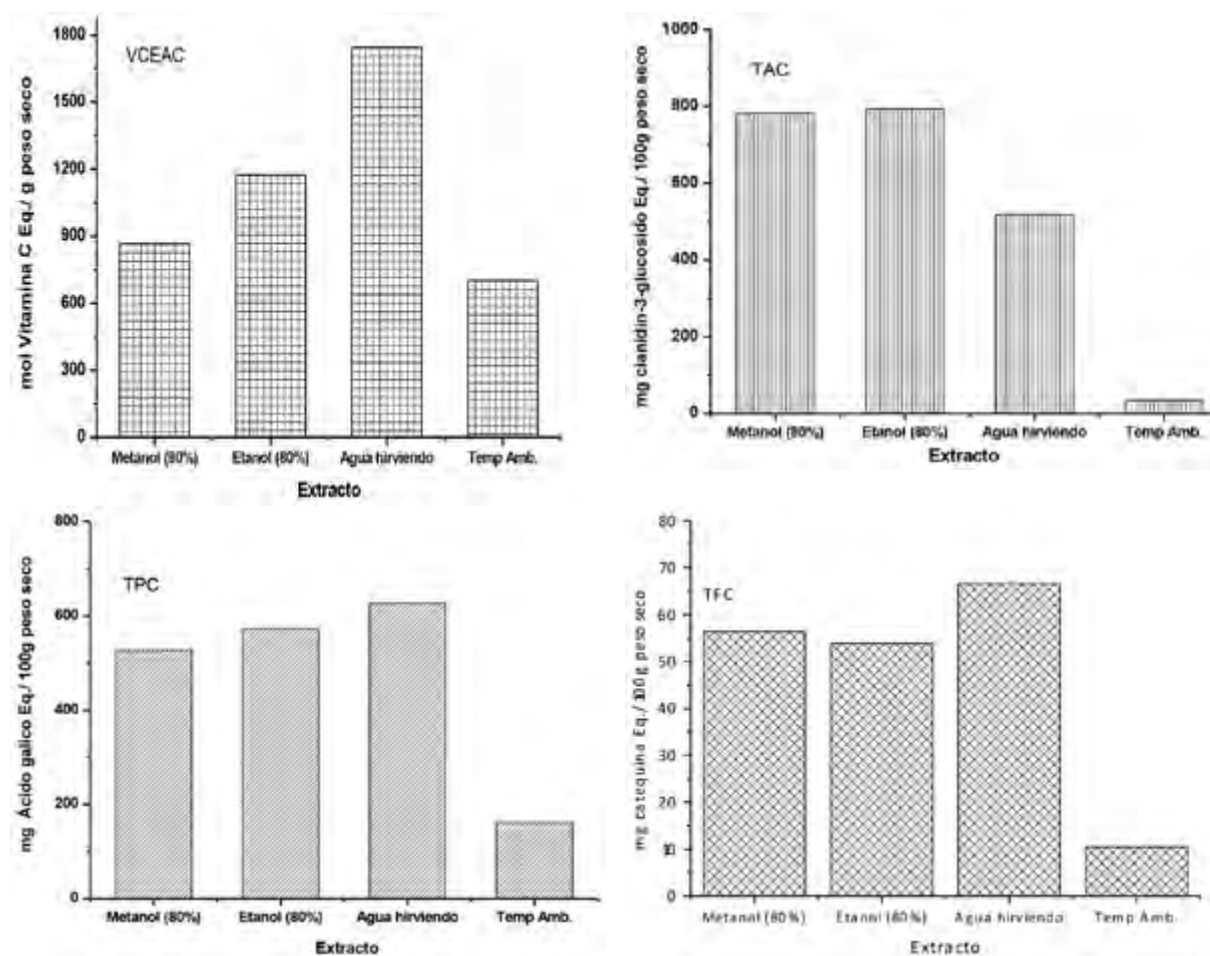
Después de 24 h de incubación, las medidas de viabilidad celular se realizaron con ensayo de Cristal Violeta (ACV), descrito por (Castro-Garza *et al*, 2007).

Resultados y discusión

Ensayo Químico

La figura 2 resume los resultados del análisis de la capacidad antioxidante realizado con los 4 diferentes extractos de cáscara de manzana. Con agua hirviendo mostró los niveles más altos de VCEAC y TPC (1743,7 mol equivalente de vitamina C por gramo de peso seco, 626,5 mg de ácido gálico equivalente/100 g de peso seco), seguido de etanol (1173,9 μmol equivalentes de vitamina C /g de peso seco, 572,9 mg equivalente de ácido gálico/100 g de peso seco), metanol (864,4 mol de vitamina C equivalente por gramo de peso seco, 527,5 mg equivalente de ácido gálico/100 g de peso seco) y agua a temperatura ambiente (701,3 μmol equivalentes de vitamina C / g de peso seco, 161,8 mg equivalente de ácido gálico/100 g de peso seco). Los flavonoides solubles de cáscara de manzana se determinaron también, observando que el contenido de flavonoides (TFC) extraídos fue de 66,5 mg, 56,4, 53,9 y 10,4 mg equivalentes de catequina/100 g de peso seco para agua hirviendo, metanol, etanol y agua temperatura ambiente, respectivamente. Los resultados de este estudio fueron consistentes con estudios previos (Kunradi Vieira, *et. al*, 2009; Wolfe, *et. al*, 2003)

Figura 2. Respuesta a la Capacidad Antioxidante Equivalente a la vitamina C (VCEAC), contenido de fenoles totales (TPC), contenido total de flavonoides (TFC) y contenido de antocianina total (TAC) en los 4 diferentes extractos de cáscara de manzana



El agua hirviendo extrajo altas concentraciones de compuestos polifenólicos que tienen respuesta a estas pruebas, tales como epicatequina y procianidina (Tsoo, 2005). Este efecto mejorado en la extracción podría ser debido a la alta temperatura, ya que facilita la infiltración del disolvente en el interior del tejido de piel de manzana y aumenta la solubilidad de estos compuestos.

El contenido de antocianinas de la cáscara de manzana tiene que ver con su apariencia. Las manzanas *Red Delicious* son manzanas rojas con genotipos ricos en antocianinas, debido a la presencia de cianidina 3-galactosido (Kunradi, 2009).

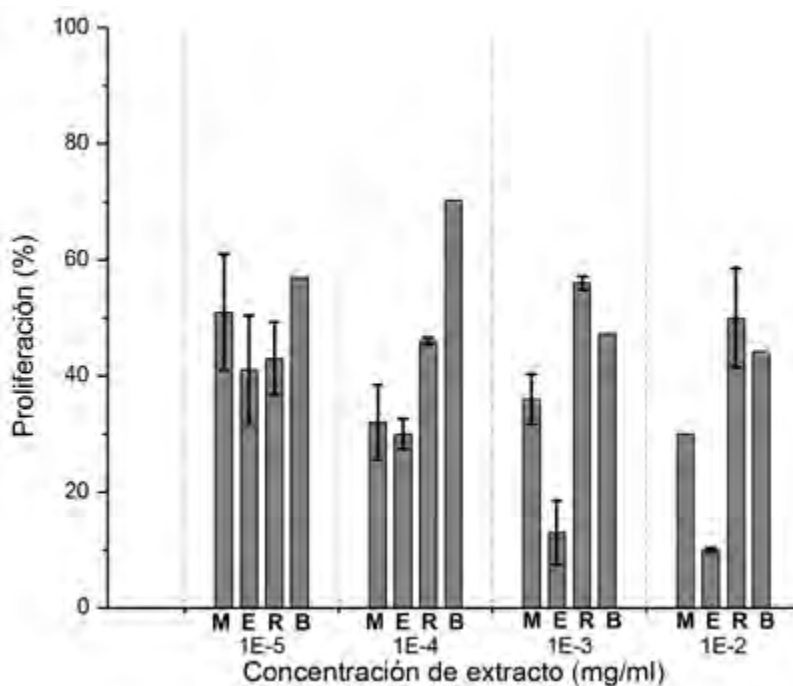
Al cuantificar el contenido de antocianinas en los diferentes extractos, el etanólico demostró tener la mayor respuesta (793,8 mg de cianidina 3-glucósido equivalentes/100g de peso seco) y la menor respuesta fue dada por agua a temperatura ambiente (34,8 mg de cianidina 3-glucósido equivalente/100 g de peso seco). Por lo tanto, las antocianinas específicamente la cianidina 3-galactosido tiene más afinidad por los disolventes alcohólicos, que son ligeramente menos polares que el agua (Kunradi, 2009).

Ensayo con cultivo celular

La figura 3 representa el efecto de los extractos de cáscara de manzana sobre el crecimiento de células NL-20 *in vitro*. Como puede verse, todos los extractos obtenidos con los 4 diferentes disolventes ensayados promovieron el crecimiento celular *in vitro* de células NL-20 epiteliales bronquiales humanas normales en cada concentración ensayada.

En este rango de concentración, los extractos obtenidos con agua hirviendo tenían actividades proliferativas relativamente potentes (hasta 70%) sobre el crecimiento celular NL-20. La respuesta proliferativa a los extractos de agua a temperatura ambiente permaneció constante en un 50% a través de todo el rango de concentración ensayada, incluso cuando la respuesta de este extracto acuoso a las pruebas químicas realizadas era pobre. Esto podría ser crucial para nuevos estudios sobre la regeneración celular y la reparación de tejidos.

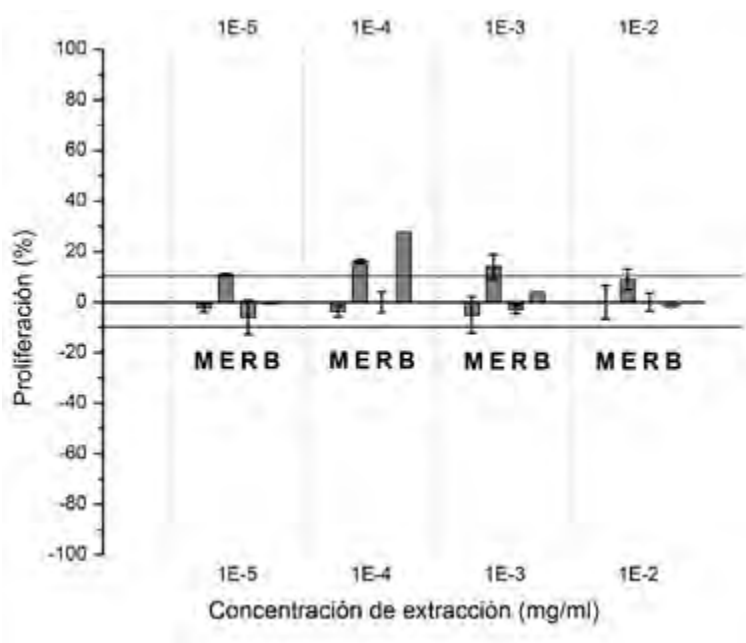
Figura 3. La proliferación celular normal de las células epiteliales bronquiales (NL-20) inducida por extractos de cáscara de manzana. M: metanólico, E: etanólico, R: agua a temperatura ambiente, B: agua en ebullición. El cultivo control fue tomado como línea base



Un hallazgo interesante fue que a pesar de que los extractos etanólicos mostraron respuestas muy altas para las pruebas químicas realizadas, indujeron a los niveles más bajos en la proliferación celular y de crecimiento celular, disminuyendo de manera dependiente a la dosis.

Además, que no tiene efecto significativo sobre el crecimiento de las células A549 epiteliales de pulmón humanos con adenocarcinoma *in vitro*, mostrados para los 4 extractos obtenidos en este estudio (ver figura 4). Sin embargo, un comportamiento contrario al esperado fue mostrado para los extractos etanólicos y de agua en ebullición con un ligero efecto proliferativo, alcanzando hasta un 16% y 27%, respectivamente.

Figura 4. La proliferación celular de las células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón (A549) inducidos por extractos de cáscara de manzana. M: metanólico, E: etanólico, R: agua a temperatura ambiente, B: agua hirviendo. El cultivo control fue tomado como línea base



Teniendo en cuenta estos hallazgos, será necesario evaluar el efecto de estos extractos con otras líneas celulares y otros rangos de concentración. Además, los compuestos bioactivos específicos de cada extracto se deben identificar.


Conclusión

Con la excepción del TAC, el agua hirviendo demuestra tener los más altos niveles en todas las pruebas químicas realizadas. De acuerdo con esto, este disolvente podría representar una alternativa viable debido a su bajo costo y ser inocuo a la extracción, con una buena capacidad de extracción de compuestos antioxidantes

Comparando entre disolventes alcohólicos y el acuoso a la misma temperatura, se observó una diferencia notable en la respuesta a los ensayos químicos.

En el caso de los ensayos *in vitro*, se observó que todos los extractos obtenidos inducen la proliferación de la línea celular NL-20. Sin embargo, esta actividad es dependiente de la naturaleza del disolvente. Más aún, la actividad proliferativa del extracto acuoso mostró un comportamiento dependiente de la dosis.

Por otro lado, los extractos acuosos y metanólico presentaron una modesta actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

Finalmente, a pesar de que el extracto etanólico mostró una mejor respuesta a TEAC, TPC y pruebas de TAC, éste indujo la actividad proliferativa en ambos tipos, en células humanas normales bronquiales epiteliales y células de adenocarcinoma de pulmón epiteliales. Por lo tanto, no hay una relación directa entre la respuesta mostrada en las pruebas químicas y la actividad proliferativa y antiproliferativa (Sun, 2002). 

Referencias

- Ayşe, K., Beraat, O. y Samim, S. (2009). "Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities". En *Food Anal. Methods*. 2, 41–60.
- Boyer, J. y Liu, R. (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits". En *Nutrition Journal*. 3:5. Recuperado el 13 de marzo de 2012 en <http://www.nutritionj.com/content/3/1/5>
- Castro-Garza, J., Barrios-García, H. B., Cruz-Vega, D., Said-Fernández, S., Carranza-Rosales, P. y Molina-Torres, C. (2007). "Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of Mycobacterium tuberculosis strains". En *Journal of Medical Microbiology*. 56, 733–737.
- He, X. y Liu, R. H. (2007). "Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity". En *J. Agric. Food Chem.* 55, 4366-4370.
- Kumar, S., Kumar, D. y Om, P. (2008). "Evaluation of Antioxidant Potential, Phenolic and flavonoid Contents of Hibiscus Tiliaceus Flowers". En *Electronic Journal of Environmental. Agricultural and Food Chemistry*. 7 (4), 2863-2871.
- Kunradi-Vieira, F., da Silva Campelo-Borges, G., Copetti, C. Valdemiro Gonzaga, L., da Costa Nunes, E. y Fett, R. (2009). "Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars". En *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59 (1), 101-106.
- Lee, J., Durst, R. y Wrolstad, R. (2005). "Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study". En *Journal of AOAC International*. 88 (5), 1269-1278.
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M. y Zhang, H. (2004). "Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay". En *J. Agric. Food Chem.* 19, 4668–4674.
- Okada, M. y Okada, Y. (2007). "Effects of Methanolic Extracts from Broad Beans on Cellular Growth and Antioxidant Enzyme Activity". En *Environmental Health and Preventive Medicine*. 12, 251-257.
- Spigno, G. y De Faveri, D. M. (2007). "Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts". En *Journal of Food Engineering*. 78, 793-801.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. (2009). "Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts". En *Molecules*. 14, 2167-2180.
- Sun, J., Chu, Y., Wu, X. y Liu, R.H. (2002). "Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits". En *J. Agric. Food Chem.* 50, 7449-7454.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S. y Sockovie, E. (2005). "Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?" En *J. Agric. Food Chem.* 53, 4989-4995.
- Wolfe, K. y Liu, R. (2003). "Apple Peels as a Value-Added Food Ingredient". En *J. Agric. Food Chem.* 51, 1676-1683.
- Wolfe, K., Wu, X. y Liu, R.H. (2003). "Antioxidant Activity of Apple Peels". En *J. Agric. Food Chem.* 51, 609-614.
- Ya-Qin, M., Xing-Qian, Y., Zhong-Xiang, F. y Dong-Hong, L. (2008). "Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marc.)Peels". En *J. Agric. Food Chem.* 56, 5682–5690.