



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DEL EXTRACTO FENÓLICO
DE LA SEMILLA DE SEIS VARIEDADES DE MANGO
(*Mangifera indica*) EN LA PREVENCIÓN DEL ESTRÉS
OXIDATIVO EN *Caenorhabditis elegans*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A:

p.Q.F.B. DIEGO IVÁN GUZMÁN VILLANUEVA

ASESOR:

D.C. JOSUÉ ALTAMIRANO HERNÁNDEZ

COASESOR:

D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ



MORELIA MICHOACÁN, OCTUBRE 2019

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.C Josué Altamirano Hernández.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y cumplir una de mis mayores metas en la vida.

Agradezco a mis padres por todo su apoyo incondicional que me han dado, por sus consejos, sus valores que me han permitido ser un hombre de bien. Gracias por todo su amor y su cariño.

A mis hermanos por todo su apoyo y quienes también han puesto su granito de arena para que hoy esto sea posible. A mi familia, abuelos, tíos, primos y demás, gracias por sus palabras de apoyo y su ayuda en momentos cuando los necesitaba.

A mi segunda madre Teresa y a sus hijos por todo su apoyo incondicional que me han dado, esas palabras de ánimo y esos buenos momentos que hemos pasado.

A mi novia Rocío por su apoyo, ayuda, consejos, paciencia y todo su cariño que me ha dado, te amo.

A mis sinodales, D.C Ulises Huerta, D.C Rafael Ortiz, D.C Rosa Elena Torres, M.S.P Rodrigo Díaz, y el Q.F.B Ricardo Vega, por su valioso tiempo y sus consejos para que este trabajo sea mejor.

Agradezco a mi asesor D.C Josué Altamirano, gracias doctor por todo el conocimiento y sabiduría que me ha brindado en esta importante etapa de mi vida, gracias por su paciencia, por sus buenos consejos y por creer en mi para la realización de este proyecto. Por todo su apoyo y toda su ayuda, es usted una gran persona y un gran amigo, como usted pocos.

A mi maestra, compañera y amiga la M.C Alejandra Yitzel Guzmán, gracias por todo tu tiempo, amistad, conocimiento, apoyo, los buenos consejos que me has dado, los momentos divertidos que vivimos juntos y por toda la paciencia que me has tenido. Gracias, sin tu ayuda este logro no hubiera sido posible.

A Joel por ser la persona más inteligente que conozco, pero por el bien de la humanidad mantiene su cerebro apagado, sigue así socio, en unos años te ganas un premio nobel.

A mis compañeros de casa Alda y Gaby, por todos los momentos divertidos que vivimos juntos, por su amistad y todas sus locuras.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada: Daniel, Liz, Israel, Pedro, Kevin, Gustavo, Jonathan, Aimé, Daniela, por todo su apoyo, sus enseñanzas, amistad y por esas platicas tan divertidas y sin sentido que siempre me hacían reír.

April mientras estuvimos juntos siempre cuidaste de mí y lo seguiste haciendo desde allá arriba como lo prometiste, yo también cumplí mi palabra y este logro también es para ti. Te quiero, cariño mío, siempre te voy a tener en mi corazón, gracias por cuidarme desde el cielo.

A. ÍNDICE GENERAL

A.	ÍNDICE GENERAL.....	5
B.	ÍNDICE DE TABLAS	7
C.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
D.	GLOSARIO	9
E.	RESUMEN.....	10
F.	ABSTRACT	11
1.	INTRODUCCIÓN	12
2.	ANTECEDENTES	13
2.1	Mango	13
2.2	Origen y distribución	14
2.3	Propiedades químicas del mango	15
2.4	Consumo del mango en México.....	17
2.5	Actividades terapéuticas del mango.....	17
2.6	Compuestos fenólicos y sus derivados	18
2.6.1	Compuestos fenólicos del mango	19
2.7	Estrés oxidativo y actividad antioxidante.....	20
2.8	Propiedades antioxidantes del mango	21
2.9	Determinación de la capacidad antioxidante.....	23
2.9.1	<i>Caenorhabditis elegans</i> para determinación antioxidante <i>in vivo</i>	23
3.	JUSTIFICACIÓN	24
4.	HIPOTÉISIS	25
5.	OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	26
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1	Material biológico	27
7.2	Extracción metanólica	27
7.3	Cuantificación de compuestos fenólicos	28
7.4	Pruebas antioxidantes.....	28
7.4.1	Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	28

7.4.2 Actividad antioxidante <i>in vivo</i> en <i>C. elegans</i>	29
7.4.3 Ensayos de protección frente al estrés oxidativo.....	29
7.5 Ensayos de toxicidad	30
8. RESULTADOS	31
8.1 Contenido de compuestos fenólicos	31
8.2 Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	32
8.3 Actividad antioxidante <i>in vivo</i>	33
8.3.1 Estrés oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂).....	35
8.3.2 Efecto tóxico de los extractos de seis variedades de mango en <i>Artemia salina</i>	42
9. DISCUSIÓN	43
10. CONCLUSIÓN	48
11. PERSPECTIVAS.....	49
12. BIBLIOGRAFÍA	50

B. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Mangifera</i>	13
Tabla 2. Contenido nutrimental del mango (por cada 100 g de pulpa)	16

C. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto del mango	14
Figura 2. Estructura de compuestos fenólicos encontrados en el mango	19
Figura 3. Variedades de mango	27
Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos en seis variedades de mango	31
Figura 5. Actividad antioxidante de la semilla de seis variedades de mango por la técnica de DPPH	32
Figura 6. Efecto del extracto de la semilla del mango Ataulfo sobre la supervivencia en <i>C. elegans</i>	33
Figura 7. Efecto del extracto de la semilla del mango Criollo y Kent sobre la supervivencia en <i>C. elegans</i>	34
Figura 8. Efecto del extracto de la semilla del mango Haden, Manila y Tommy sobre la supervivencia en <i>C. elegans</i>	34
Figura 9. Efecto del extracto de la semilla del mango Ataulfo en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	35
Figura 10. Efecto del extracto de la semilla del mango Tommy en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	36
Figura 11. Efecto del extracto de la semilla del mango Manila en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	36
Figura 12. Efecto del extracto de la semilla del mango Criollo en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	37
Figura 13. Efecto del extracto de la semilla del mango Kent en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	37
Figura 14. Efecto del extracto de la semilla del mango Haden en la supervivencia en <i>C. elegans</i> bajo el estrés oxidativo	38
Figura 15. Supervivencia de <i>C. elegans</i> tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 1 mM de H ₂ O ₂	39
Figura 16. Supervivencia de <i>C. elegans</i> tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 2.5 mM de H ₂ O ₂	40
Figura 17. Supervivencia de <i>C. elegans</i> tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 5 mM de H ₂ O ₂	41
Figura 18. Efecto tóxico del extracto de la semilla de seis variedades de mango. 42	

D. GLOSARIO

ABTS: 2, 2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

CL₅₀: Concentración Letal Media

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EAG: Equivalentes de ácido gálico

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power/Poder Antioxidante Reductor de Hierro

FCR: Ensayo de Folin-Ciocalteu

g: Gramos

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HCl: Ácido Clorhídrico

HT-29: Línea celular (células de cáncer de colon)

K562: Línea celular (células de cáncer de leucemia mielógena)

L: Litro

MDA-MB-231: Línea celular (células de cáncer de mama)

MCF-7: Línea celular (células de cáncer de mama)

mM: Milimolar

mg: Miligramo

mL: Mililitro

NCI-ADR/RES: Línea celular (células de cáncer de ovario)

NCI-H460: Línea celular (células de cáncer de pulmón)

nm: Nanómetro

OVCAR03: Línea celular (células de cáncer de ovario)

OH: Radical Hidroxilo

PC-3: Línea celular (células de cáncer de próstata)

TROLOX: Antioxidante sintético análogo de la vitamina C (6-hydroxy 2,5,7,8,tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

UACC-62: Línea celular (células de cáncer de melanoma)

WT: Wild Type/Cepa Silvestre

786-0: Línea celular (células de adenocarcinoma renal)

μ: Micro (1x10⁻⁶)

E. RESUMEN

El mango es el fruto del árbol *Mangifera indica*, es rico en calcio, magnesio, potasio, fósforo, vitamina A, vitamina C, fibras y antioxidantes, razón por la cual su mercado está creciendo continuamente. La semilla representa del 28 al 38% de su peso y es el mayor producto de desecho sin aparente valor nutrimental y económico, en la que diversos estudios han demostrado la presencia de un alto contenido de compuestos polifenólicos que le confieren un importante efecto antioxidante, pero carecen de estudios enfocados en la participación de estos compuestos como antioxidantes indirectos enfocados al tratamiento y prevención de enfermedades crónico degenerativas. En este estudio se realizó la extracción metanólica a partir de semillas de las variedades Ataulfo, Tommy, Criollo, Kent, Haden y Manila. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante *in vitro* se determinó mediante la técnica DPPH. Para las pruebas *in vivo*, se utilizó la cepa silvestre de *Caenorhabditis elegans* (N2) como modelo experimental, los cuales fueron sometidos a estrés oxidante mediante la adición de H₂O₂ en el medio. Los resultados mostraron que los extractos de las variedades Haden y Kent presentan una mayor protección ante el estrés oxidativo donde la letalidad de *C. elegans* se observó hasta las 6 horas de exposición con una concentración de H₂O₂ de 5 mM. Además, se analizó el efecto tóxico de los extractos en *Artemia salina*, donde el extracto de la variedad Tommy a una concentración 1 µg/mL muestra una letalidad a las 4 horas de exposición. El extracto metanólico de la semilla de *Mangifera indica* contiene altas cantidades de compuestos fenólicos. Sin embargo, no protegen del estrés oxidativo a *C. elegans* ya que probablemente se ven afectados por otras moléculas presentes en este.

F. ABSTRACT

The mango is the fruit of the *Mangifera indica* tree. It is rich in calcium, magnesium, potassium, phosphorus, vitamin A, vitamin C, fibers and antioxidants, for this reason, its market is growing continuously. The seed represents 28 to 38% of its weight and is the largest waste product without apparent nutritional and economic value. Several studies have shown the presence of a high content of polyphenolic compounds that give it an important antioxidant effect, but they lack of studies focused on the participation of these compounds as indirect antioxidants focused on the treatment and prevention of chronic degenerative diseases. In this study, the methanolic extraction from seeds of Ataulfo, Tommy, Criollo, Kent, Haden and Manila varieties was performed. The quantification of phenolic compounds was carried out by the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity *in vitro* was determined by the DPPH technique. For *in vivo* tests, the strain of *Caenorhabditis elegans* (N2) was used as experimental model, which were subjected to oxidative stress by the addition of H₂O₂ in the medium. The results showed that the extracts of Haden and Kent varieties present a greater protection against oxidant stress, where the lethality of *C. elegans* was observed until 6 hours of exposure, with a concentration of Hydrogen Peroxide of 5 mM. In addition, the toxic effect of the extracts in *Artemia salina* was analyzed, the extract of the Tommy variety at a concentration of 1 µg / mL shows a lethality at 4 hours of exposure. The methanolic extract of the *Mangifera indica* seed contains high amounts of phenolic compounds. However, they do not protect *C. elegans* from oxidative stress since they are probably affected by other molecules present in it.

Palabras clave: Nematodo, Peróxido, Radicales, Oxidación, Antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en los riesgos potenciales para la salud asociados con el consumo de antioxidantes, ha promovido el interés de muchos grupos de investigación por la búsqueda de compuestos antioxidantes de fuentes naturales (Seneviratne y Kotuwegedara, 2009). En este contexto, se han evaluado compuestos naturales con potencial antioxidante y antimicrobiano como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos y carotenos (Kaur y Kapoor, 2001). El mango (*Mangifera indica L.*) es una fruta tropical que destaca por su particular sabor y aroma, tiene amplia aceptación y una creciente demanda en los mercados internacionales. Las variedades comercializadas a nivel local carecen de estudios que impulsen la promoción de su consumo por el aporte nutricional y que permitan agregar valor a la cadena productiva (Sumaya-Martínez y col., 2012). Uno de los compuestos que pueden dar un valor adicional a este fruto son los antioxidantes naturales, los cuales están ampliamente distribuidos en los alimentos vegetales frescos y sus productos, entre ellos la vitamina E, vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos, específicamente flavonoides (Ercisli y col., 2008). Se han identificado compuestos con propiedades antioxidantes en los subproductos cáscaras y semillas del mango (Larrauri y col., 1996; Rincon y col., 2005; Soong y Barlow, 2004) y es considerable la cantidad que la industria procesadora de frutas genera al elaborar estos productos, lo cual representa un problema económico y ambiental (Soon g y Barlow, 2004). Por ello, es necesario plantear alternativas de uso de dichos subproductos (Cerezal y Duarte, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Mango

El mango es el fruto del árbol *Mangifera indica*, originario de la India, su taxonomía se indica en la tabla 1. Se trata comúnmente de un árbol frondoso de hasta 20 metros de altura, de copa redonda, hoja perenne, siempre verde y muy longevo. El fruto es una drupa que varía en forma, tamaño y color, dependiendo de la variedad.

Tabla 1. Taxonomía del género *Mangifera*.

Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Suborden	Anacardiineae
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Mangifera</i>
Especie	<i>indica</i>

Una de las variedades con mayor superficie cultivada es el mango de la variedad Tommy, fruto de excelente calidad, de color rojo predominante, de forma redonda y tamaño mediano (350 a 450 g); la pulpa es jugosa con poco contenido de fibra (figura 1). Actualmente se conocen más de 1000 diferentes variedades de mangos en todo el mundo y casi todas estas variedades de mango injerto se derivan de una variedad obtenida por evolución natural y adaptación climática a través del tiempo (SAGARPA, 2005). Las principales variedades cultivadas en México son Ataulfo,

Manila, Haden, Irwin, Kent, Keitt y Criollo; las tres primeras son las que se comercializan en el mercado internacional (CONASPROMANGO, 2012).



Figura 1. Fruto del mango (TopTropicals.com)

2.2 Origen y distribución

El origen del mango se sitúa en el noreste de Asia en la zona tropical. Este árbol es de clima tropical, habita en temperaturas cálidas y semicálidas. En México se tienen plantadas aproximadamente 181,000 hectáreas. Se producen mangos de diferentes cultivos los cuales son consumidos o demandados para diversos fines. La mayor parte de la superficie cultivada se ubica en los estados de Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Sinaloa y Chiapas, sin embargo, SAGARPA ha incluido muchos otros estados donde también se cultiva este fruto.

2.3 Propiedades químicas del mango

El mango es una fruta rica en calcio, magnesio, potasio, fósforo, vitamina A (IICA., 2007), vitamina C, fibras y antioxidantes, razón por la cual su mercado está creciendo continuamente. El ácido cítrico es el predominante, aunque también se encuentran el ácido málico, succínico, urónico, tartárico y oxálico en cantidades menores (Jagtiani y col., 1988) y su composición depende de la variedad, así como el estado de madurez que se tenga en el fruto (Stafford, 1983). El contenido de ácido ascórbico y la acidez total disminuyen durante el desarrollo del fruto, mientras que los carotenoides y azúcares totales aumentan (Laskshminarayana, 1973). En la tabla 2 se muestra el contenido de nutrientes del mango.

El mango, por su alto contenido de ácido ascórbico (vitamina C), resulta un fruto atractivo debido a que éste representa propiedades antioxidantes, por lo que puede ser un potente antioxidante de procedencia exógena para el ser humano.

Cabe mencionar que la composición química del fruto del mango es distinta desde la cáscara hasta la semilla. Por ejemplo, la semilla contiene los alcaloides de los isómeros *cis* y *trans* de zeatina ribósidos, la almendra de la semilla contiene los triterpenos alfa y beta-amirenona, alfa-amirina, citrostadienol, 24-metileno-cicloartenol, ciclobromol, ciclosadol, dammaradienol, friedelinol, germanicol, gramisterol, lofenol y obtusigenol; y los esteroides dehidro-avenasterol, campesterol, colesterol y beta-sitosterol (Torres y col., 2010; Guevara y col., 2004).

Tabla 2. Contenido nutrimental del mango (por cada 100 g de pulpa).

Composición química	Contenido
Agua	81.7%
Calorías	66 cal
Proteína	0.7g
Grasa	0.4g
Carbohidratos totales	16.8
Fibra	0.9g
Ceniza	0.4g
Calcio	10mg
Fósforo	13mg
Hierro	0.4mg
Sodio	7mg
Potasio	189mg
Vitamina A	4,800 UI
Tiamina	0.05 mg
Riboflavina	0.05mg
Niacina	1.1mg
Ácido ascórbico	35 mg

2.4 Consumo del mango en México

El consumo per cápita de mango en México en el año 2016 fue de 11.6 kilogramos, lo cual evidencia la aceptabilidad de consumo por la sociedad, así como la importancia de su producción para la economía nacional, principalmente en lo que se refiere a los cultivares Ataulfo, Haden, Kent, Tommy Atkins y Manila, entre otros. El mango se consume, principalmente, como fruto fresco, por su pulpa, aunque también se obtienen productos de valor agregado como mermeladas, jugos, rebanadas en almíbar, rodajas en enlatados y productos congelados y deshidratados. Además de la pulpa, el aceite de la semilla es utilizado en la industria cosmética (SAGARPA, 2017).

Sin embargo, en los últimos años se han generado líneas de investigación que favorecen la innovación y el desarrollo de tecnología para la obtención de productos de alto valor agregado del mango. Esto debido a la presencia de compuestos bioactivos en diferentes partes del cultivar, como la piel y la semilla del fruto, además de las hojas y la corteza de la planta (Bukasov, 2007).

2.5 Actividades terapéuticas del mango

Se ha evaluado el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de mango en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*; el extracto etanólico de la corteza de mango se considera de acción débil; pero el extracto acuoso, etanólico y metanólico de la semilla presenta una fuerte actividad contra bacterias Gram positivas en estudios *in vitro* y actividad antimicótica contra *Candida albicans* (Alonso, 2004; Duke y col., 2012; Sowmiya, 2009).

Por otra parte, se ha determinado la actividad inmunológica del extracto etanólico de la corteza del mango, este se administró a ratas y al finalizar el ensayo se produjo un aumento de anticuerpos tumorales, provocando un retraso en la hipersensibilidad al extracto (actividad inmunoestimulante) (Garrido y col., 2004; García, 2006). Esta actividad inmunológica del extracto se le atribuyó a los compuestos fenólicos presentes en este, demostrando tener una actividad antioxidante en los roedores.

2.6 Compuestos fenólicos y sus derivados

Los compuestos fenólicos, son un grupo de compuestos formados por la unión de un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilos (-OH). En las plantas son parte de los metabolitos secundarios, muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos. Algunos compuestos fenólicos son solubles en disolventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles. Con base en su esqueleto químico los compuestos fenólicos se clasifican en: fenoles simples como la vainillina y fenoles complejos como los flavonoides.

2.6.1 Compuestos fenólicos del mango

Un total de 12 flavonoides y xantonas han sido identificados en la piel y semillas de mango, considerándolos una fuente de antioxidantes bioactivos (Ribeiro y col., 2008); la piel de mango posee flavonoles, xantona-C-glicósido, galotaninos y derivados de benzofenona (Berardini y col., 2004).

En el mango además se puede encontrar: ácido gálico, ácido elágico (Berardini y col., 2004), taninos, cumarina, vainillina, ácido ferúlico, ácido cinámico (Ashoush y Gadallah, 2011; Martinez y col., 2000).

La mangiferina, xantona-C-glicósido, llama la atención por la gran variedad de propiedades farmacológicas, además de su capacidad antioxidante, antidiabética, antitumoral y antiviral (Guha y col., 1996).

En la figura 2 se muestran algunos compuestos fenólicos encontrados en el fruto del mango.

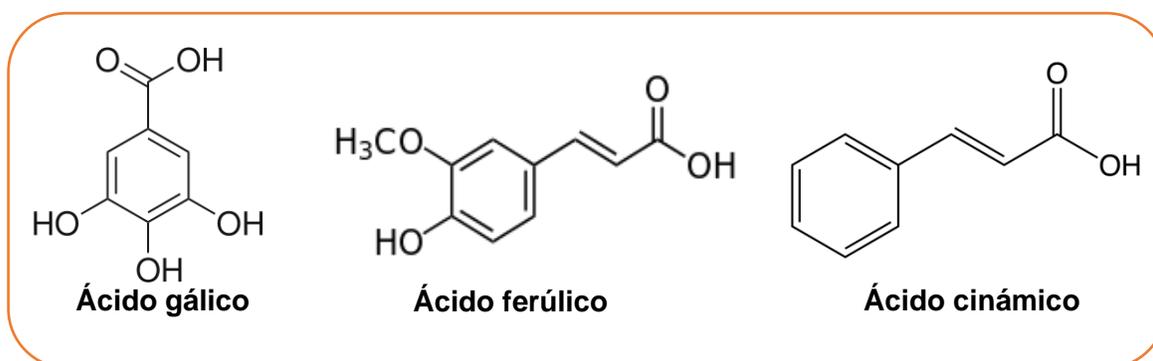


Figura 2. Estructura de compuestos fenólicos encontrados en el mango.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el mango contiene una gran cantidad de polifenoles. Estos son compuestos bioactivos ampliamente conocidos debido a sus propiedades antioxidantes, por lo tanto, tienen un papel muy importante para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer, alzheimer y parkinson.

2.7 Estrés oxidativo y actividad antioxidante

Gutteridge y Halliwell en 1990 definieron “antioxidante” como cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato. Para que un antioxidante tenga actividad debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino para la célula después de reaccionar con la especie reactiva.

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio en nuestras células debido a un aumento en los radicales libres y/o una disminución en los antioxidantes. Con el tiempo, este desajuste en el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes puede generar daños en la célula (COEC, 2012). El estrés oxidativo puede causarse por: disminución de antioxidantes debido a mutaciones o a toxinas que causan disminución de defensas o por el incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de oxígeno (García, 2006).

2.8 Propiedades antioxidantes del mango

Las variedades comercializadas a nivel local carecen de estudios que impulsen la promoción de su consumo por el aporte nutricional y que permitan agregar valor a la cadena productiva (Sumaya-Martínez y col., 2012). Uno de los compuestos que pueden dar un valor adicional a este fruto son los antioxidantes naturales, los cuales están ampliamente distribuidos en los alimentos vegetales frescos y sus productos, entre ellos la vitamina E, vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos, específicamente flavonoides (Ercisli y col., 2008).

Entre los principales factores que afectan la actividad antioxidante de los extractos, se encuentra: calidad de la planta, origen geográfico, condiciones climáticas, época de recolección y almacenamiento (Conde, 2009).

De acuerdo con estudios en algunos vegetales (Corrales-Bernal y col., 2014; Kuskoski y col., 2005), frutos como mango (*Mangifera indica L.*) y guayaba (*Psidium guajava L.*) poseen propiedades medicinales o nutraceuticas, las cuales son atribuidas principalmente al conjunto de compuestos fenólicos contenidos, carotenoides totales y a su capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante equivalente a vitamina C en la pulpa de mango var. Ataulfo determinada por el método de inhibición del radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue de 179 mg/100 g (Robles-Sánchez y col., 2009). Este valor también resultó superior a los reportados en la piña (41.1 mg/100 g), guayaba (100.7 mg/100 g), uva (105.9 mg/100 g) y fresa (132.8 mg/100 g) (Kuskoski y col., 2005).

Soong y Barlow en el 2004, evaluaron la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de las semillas de mango, aguacate y tamarindo, usando los métodos ABTS (ácido 2, 2'-azino-bis 3-etilbenzo-tiazolona-6-sulfónico), FRAP (ensayo del poder

antioxidante reductor del ion hierro) y FCR (ensayo de Folin-Ciocalteu). En dicho estudio se encontró que la semilla de mango presenta mayor capacidad antioxidante y contenido fenólico que la semilla de tamarindo y aguacate. Los valores para ABTS fueron de 762, 698 y 236.1 $\mu\text{mol/g}$ de equivalentes de ácido ascórbico para la semilla del mango, aguacate y tamarindo respectivamente. Los valores de FRAP para el mango, aguacate y tamarindo fueron de 2572, 2486 y 1484 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente.

En 2011 se realizó un estudio del efecto antitumoral de Vimang®, un fitomedicamento obtenido por una extracción acuosa de la corteza de *Mangifera indica* L. en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama en el cual el tratamiento con el extracto del mango disminuyó significativamente el porcentaje de inhibición celular en comparación con el control de DMSO, este efecto antitumoral se le atribuyó al ácido gálico y la xantana Mangifera, presentes en este extracto (García y col., 2001).

El estudio más reciente se realizó con el aceite de las hojas de *Mangifera indica* var. Coquino, se evaluó su efecto antiproliferativo y citotóxico en líneas celulares tumorales humanas de mama MCF-7, leucemia K562, ovario NCI-ADR/RES y OVCAR-3, pulmón NCI-H460, melanoma UACC-62, riñón 786-0, próstata PC-3 y colon HT-29. Obteniendo una fuerte actividad contra NCI-ADR/RES, OVCAR-3 (ovario), NCI-H460 (pulmón), 786-0 (riñón) y UACC-62 (melanoma) y una actividad moderada contra HT-29 (colon), PC-3(próstata) y MCF-7 (mama).

2.9 Determinación de la capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre *in vivo*. Las técnicas espectrofotométricas son muy utilizadas para determina la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, ocurriendo una pérdida de color proporcional con la concentración (Rojas y col., 2008) y las más utilizadas son DPPH, ABTS y FRAP.

2.9.1 *Caenorhabditis elegans* para determinación antioxidante *in vivo*

El nematodo *C. elegans* ha demostrado ser un potente organismo modelo en el estudio de varios procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, el envejecimiento y una serie de condiciones patológicas (Brenner, 1974; Kenyon y col., 1993; Rodríguez y col., 2013; Felix y Barkoulas, 2012; Antoshechkin y Sternberg, 2007). *C. elegans* ofrece varias ventajas experimentales incluyendo el bajo costo, el mantenimiento directo, la capacidad de escala y su transparencia, que permite la microscopía. Además, tienen un ciclo de vida corto (± 25 días a 20°C) que le proporciona una ventaja clave en los estudios de envejecimiento. Además, se pueden distinguir muchos tipos de células diferentes en *C. elegans*, incluyendo neuronas, células musculares, intestino y células excretoras (Antoshechkin y Sternberg, 2007) que han sido bien caracterizadas.

3. JUSTIFICACIÓN

El mango representa una industria de gran importancia y valor en México, siendo uno de los principales productores y exportadores a nivel mundial, donde la semilla representa del 28 al 38% del peso total del fruto. Diversos estudios sobre la composición de la semilla de mango han mostrado la presencia de múltiples compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y que esta se puede ver afectada dependiendo de las distintas variedades de mango. Debido a lo anterior, se plantea el uso de la semilla de *Mangifera indica* como una posible fuente de metabolitos con aplicación farmacéutica en la prevención de distintas enfermedades crónicas degenerativas asociadas con el estrés oxidativo, dándole utilidad y valor agregado por ser considerado un producto de desecho.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de la semilla de *Mangifera indica* previenen del estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo*.

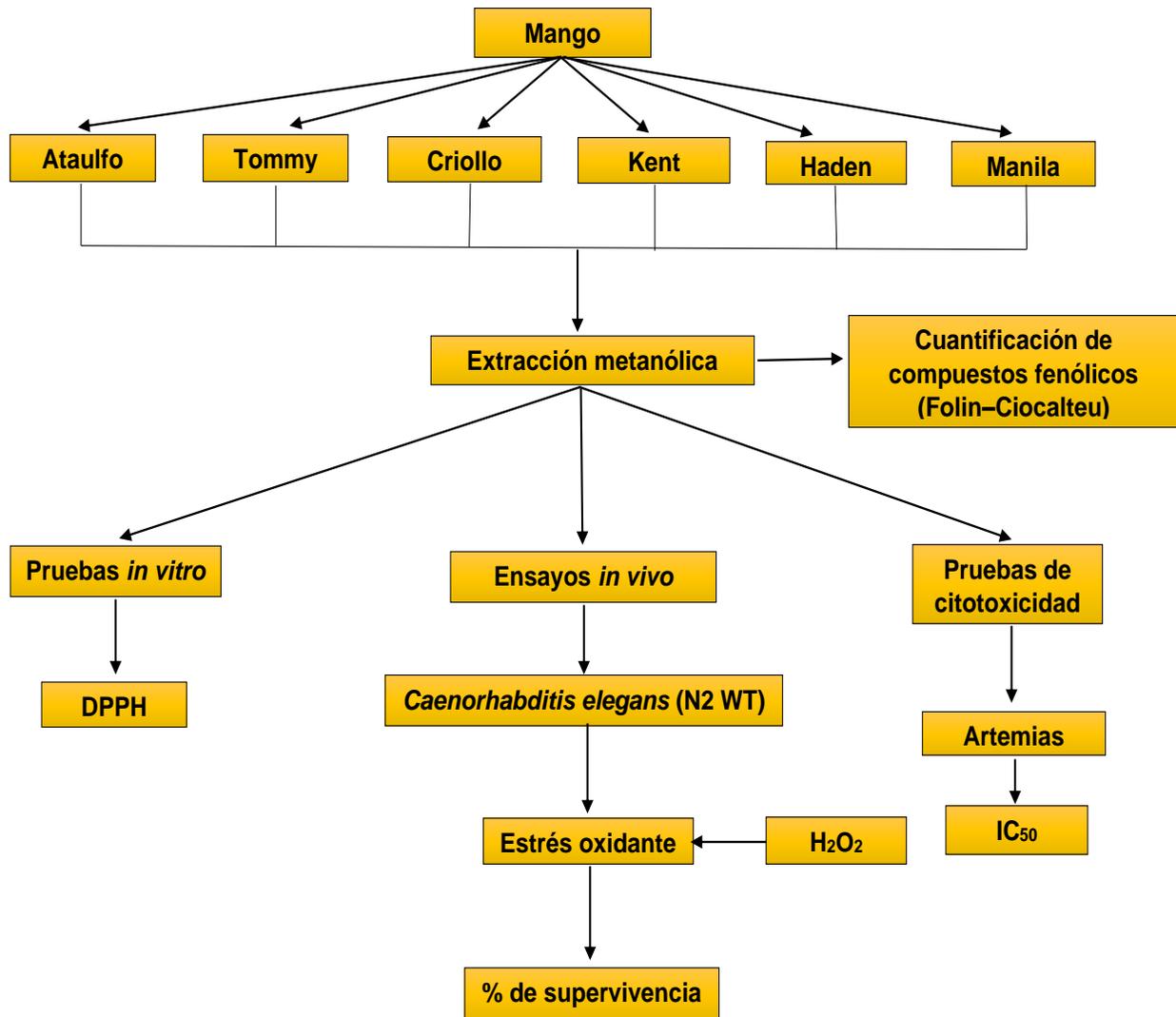
5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad antioxidante de los extractos fenólicos de la semilla de diferentes variedades de *Mangifera indica* *in vitro* e *in vivo*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar el contenido de fenoles totales de los extractos fenólicos de la semilla de seis variedades de *Mangifera indica*.
- Evaluar el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* de los extractos fenólicos de la semilla de *Mangifera indica*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizaron las semillas de las siguientes variedades de *Mangifera indica*: Tommy, Ataulfo, Manila, Haden, Kent y Criollo (figura 3). Las cuales fueron obtenidas de “El Capire de Lombardía”, municipio de Gabriel Zamora, Michoacán.

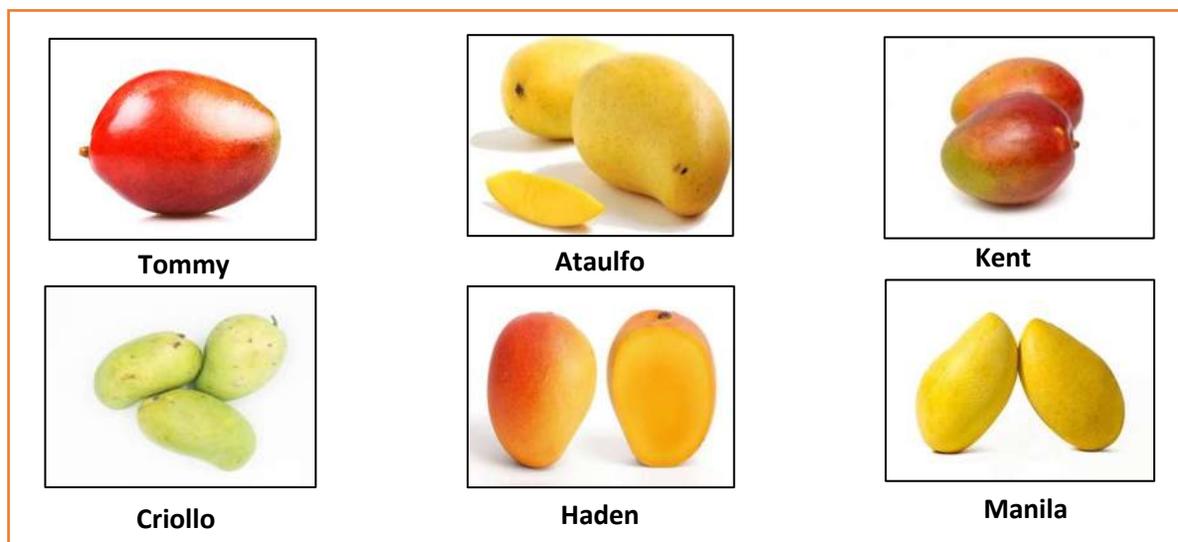


Figura 3. Variedades de mango.

7.2 Extracción metanólica

Inicialmente se separó el pericarpio, el mesocarpio, las fibras y la testa para quedarnos solo con la semilla, una vez obtenida la semilla de cada fruto de las seis variedades diferentes de *Mangifera indica*, se trituraron 15 g y se añadieron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se agregaron 50 mL de metanol:HCl (50:1 % v / v), posteriormente se dejó en agitación durante 30 minutos y después de una filtración con papel filtro Whatman™ No.1 se obtuvo un volumen final de 150 mL de cada muestra, se concentró el contenido en un rotavapor RV 10 digital (IKA®, Wilmington,

USA) a una temperatura de 70°C hasta obtener un volumen final de 1 a 5 mL (todo esto en oscuridad), se colocó en un vial color ámbar y se almacenó a 4°C.

7.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu reportado por Wan y col en 2011, con adecuaciones para placa de 96 pozos. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar al Ácido gálico (Sigma G7384) a las concentraciones de 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.3125 µg/mL, 0.15625 µg/mL, 0.078125 µg/mL, y se preparó una solución de Na₂CO₃ al 7.5% y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma F9252) al 1N. Posteriormente se añadieron 2 µL de la muestra o estándar, 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 40 µL de Na₂CO₃ y 158 µL de H₂O desionizada, posteriormente se incubó en oscuridad durante 2 h en una microplaca de 96 pozos y se leyeron las muestras a una absorbancia de 764 nm en un lector de microplacas UV-Vis (EPOCH, BioTek, EE.UU). Finalmente se analizaron los resultados.

7.4 Pruebas antioxidantes

7.4.1 Actividad antioxidante *in vitro*

El radical DPPH- (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) se preparó a partir de un stock (10 mM) diluyéndolo con metanol al 80% hasta una concentración final de 0.1 mM. Para la curva de calibración se utilizó el antioxidante sintético Trolox (Sigma 238813), análogo a la vitamina E, del cual se preparó una curva de calibración a las concentraciones que van desde 800 mM, 400 mM, 200 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM y 12.5 mM. En una microplaca de 96 pozos agregando 140 µL de DPPH a una concentración de 10 mM (Sigma 09132) y 10 µL de muestra., Se incubó durante 2

minutos en oscuridad y se le leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrómetro UV-Vis para microplacas (Epoch, BioTek, USA). Cada una de las muestras se hizo por triplicado.

7.4.2 Actividad antioxidante *in vivo* en *C. elegans*

Se utilizó como modelo biológico el nemátodo *Caenorhabditis elegans* N2 (WT), en los cuales se realizaron pruebas para determinar la concentración letal y su concentración óptima de fenoles totales de los extractos de *Mangifera indica* L. en el nematodo. Utilizamos una microplaca de 96 pozos para realizar este ensayo, agregando en cada pozo 145 μ L del medio M9, 5 μ L de nuestros extractos, 10 nematodos en el estadio adulto y se incubaron por 48 h en oscuridad a una temperatura de 18°C., Transcurrido este tiempo se determinó el porcentaje de supervivencia de la población de nemátodos, graficando los resultados de cada uno de los extractos. Cada una de las muestras se realizó por cuadruplicado a las concentraciones de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL y 12.5 μ g/mL.

7.4.3 Ensayos de protección frente al estrés oxidativo

Una vez obtenidas las concentraciones óptimas de los extractos se realizó el ensayo en una placa de 96 pozos., Se normalizó el extracto en el medio agregando en cada pozo 145 μ L de medio M9 y 5 μ L del extracto metanólico de *Mangifera indica* L., (Variedad Ataulfo 50 μ g/mL, Criollo, Kent 25 μ g/mL, Haden, manila y Tommy 12.5 μ g/mL), 10-15 nematodos por pozo y se incubaron por 48 h en oscuridad a una temperatura de 18°C., Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con medio M9 fresco para eliminar los residuos de los extractos, al finalizar los lavados se añadió el H₂O₂ para inducir un efecto de estrés oxidante a una concentración de 1

a 5 mM partiendo de un stock 80 mM de H₂O₂, y se incubaron durante 6 h a 18°C determinando la supervivencia cada hora durante este transcurso de incubación. Los resultados obtenidos se graficaron en el programa estadístico Prisma 7 utilizando las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier.

7.5 Ensayos de toxicidad

Para este ensayo se utilizó como modelo biológico a *Artemia salina*, una especie de crustáceo branquiópodo. Desde 1982 se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la citotoxicidad *in vivo* con la utilización de "camarones de mar" (*Artemia salina*); los cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje citotóxico *in vivo* de extractos. Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en solución de sal marina en presencia de luz artificial y a temperatura ambiente durante 48 h. Las pruebas se realizaron en una placa de 24 pozos, poniendo en cada uno de ellos 10 – 15 Artemias, 795 µL de agua (del estanque de cultivo de estas), 5 µL del extracto metanólico de *Mangifera indica* y se incubaron a temperatura ambiente por 6 horas determinando la supervivencia cada hora durante este transcurso de incubación. El cálculo de la concentración de extracto que provoca la muerte de 50 % de los organismos (CL₅₀) se graficó en el programa estadístico Prisma 7.

8. RESULTADOS

8.1 Contenido de compuestos fenólicos

Se sabe que los compuestos fenólicos ejercen actividades antioxidantes en el organismo y que su contenido varía de acuerdo a las distintas variedades en el mango. Se observó que las semillas del mango de la variedad Ataulfo posee mayor contenido de compuestos fenólicos totales en comparación con las semillas de las otras variedades, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$). El contenido de fenoles en la semilla varió desde 7.9 mg EAG / g para el mango Kent hasta 27.98 mg EAG / g para la semilla del mango Ataulfo (Figura 4).

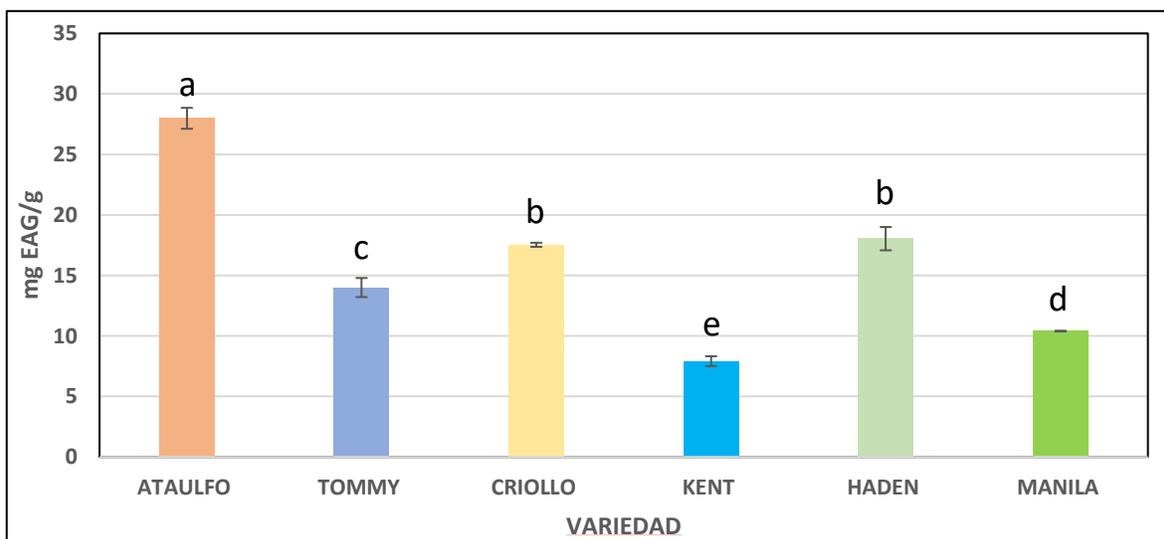


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos en seis variedades de mango. Las barras representan el error estándar (SE), ANOVA, Tukey, letras diferentes denotan diferencia significativa $p \leq 0.05$. N=3.

8.2 Actividad antioxidante *in vitro*

En la prueba con el radical DPPH- la cual consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg/L., Se observó una mejor actividad antioxidante en la semilla del mango de la variedad Tommy con una actividad antioxidante equivalente a 3.68 mM TROLOX, Kent con 3.47 mM TROLOX, Haden con 3.50 mM TROLOX, Manila con una actividad antioxidante de 3.68 mM TROLOX y Ataulfo 3.09 mM TROLOX (Figura 5), la semilla con menor actividad de eliminación de este radical fue el mango criollo con 2.79 mM TROLOX. Cabe mencionar que los extractos no fueron normalizados por lo que se añadieron 10 μ L de extracto crudo.

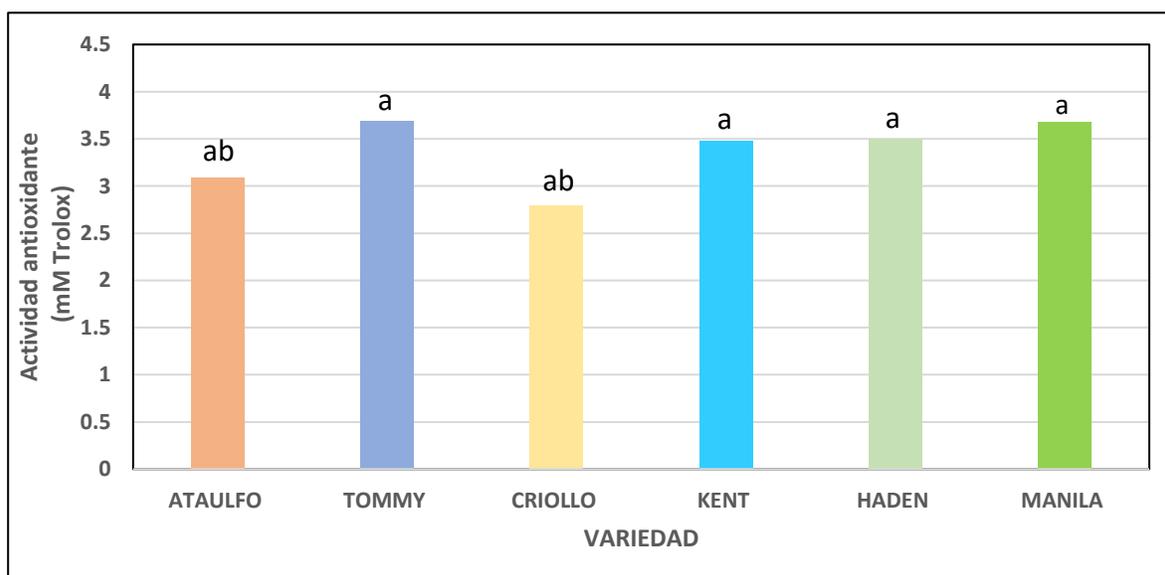


Figura 5. Actividad antioxidante de la semilla de seis variedades de mango por la técnica de DPPH. Las barras representan el error estándar (SE), ANOVA, Tukey; $p \leq 0.05$, letras diferentes denotan diferencia significativa. N=3.

8.3 Actividad antioxidante *in vivo*

Inicialmente se realizó una curva de concentración-respuesta a los extractos de las semillas de cada una de las variedades en estudio a concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de compuestos fenólicos en el medio. Se observó que para la semilla del mango Ataulfo el límite de tolerancia a compuestos fenólicos fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue letal para *Caenorhabditis elegans* (Figura 6).

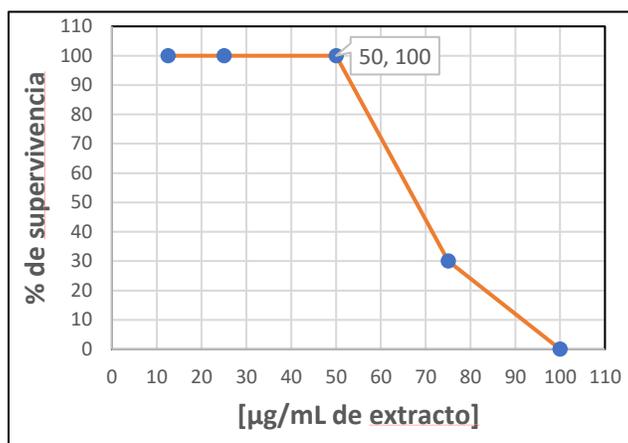


Figura 6. Efecto del extracto de la semilla del mango Ataulfo sobre la supervivencia en *C. elegans*. N=3.

Por otro lado, para las semillas de mango de la variedad Kent y Criollo el límite de tolerancia de estos compuestos fenólicos fue de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue la concentración letal para la población de nematodos (Figura 7).

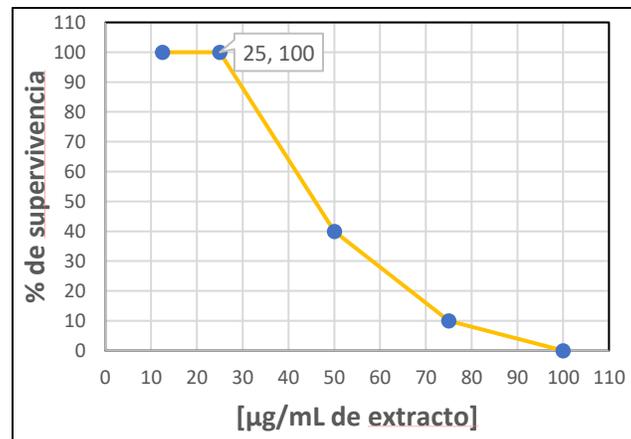


Figura 7. Efecto del extracto de la semilla del mango Criollo y Kent sobre la supervivencia en *C. elegans*. N=3.

Finalmente, las semillas del mango Haden, Manila y Tommy presentaron las mismas concentraciones límites de compuestos fenólicos en el medio siendo esta de 12.5 µg/mL y la concentración letal en *C. elegans* fue de tan solo 72 µg/mL (Figura 8), observando para estas variedades en particular una sensibilidad mayor con respecto a las variedades Kent, Criollo y Ataulfo.

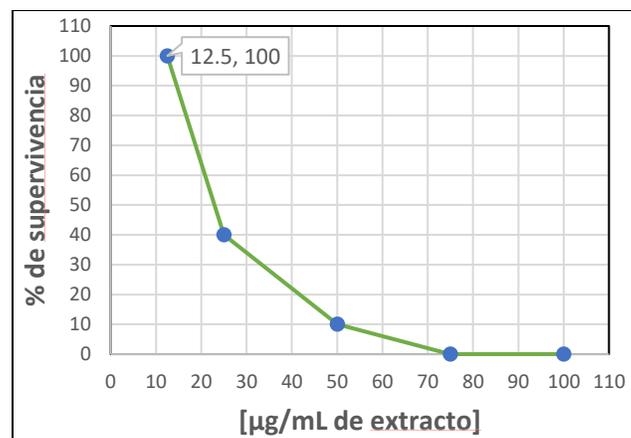


Figura 8. Efecto del extracto de la semilla del mango Haden, Manila y Tommy sobre la supervivencia en *C. elegans*. N=3.

8.3.1 Estrés oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Después de determinar la concentración máxima de tolerancia de los extractos en *C. elegans* se procedió a analizar la protección contra el estrés oxidativo, para lo cual se incubaron durante 48 h los nematodos con el extracto a las concentraciones óptimas obtenidas en las pruebas anteriores, donde se tiene un porcentaje de supervivencia del 100% para cada una de las semillas de las diferentes variedades de mango y se sometieron a estrés oxidativo con H₂O₂ a una concentración de 1 a 5 mM.

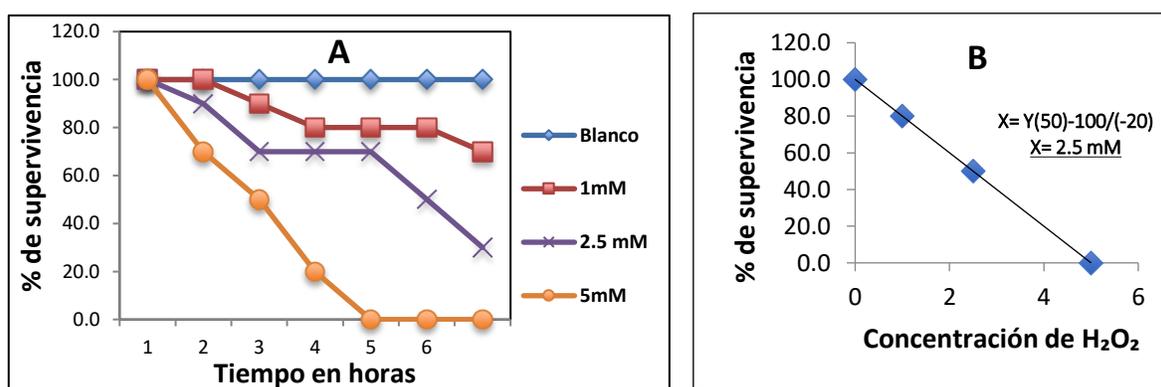


Figura 9. Efecto del extracto de la semilla del mango Ataulfo en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

Se observó que para la variedad Ataulfo, Tommy y Manila con la concentración de 5 mM de H₂O₂ el porcentaje de supervivencia disminuye gradualmente hasta las 5 horas de exposición en donde no se observa supervivencia de *C. elegans* (Figura 9), (Figura 10), (Figura 11).

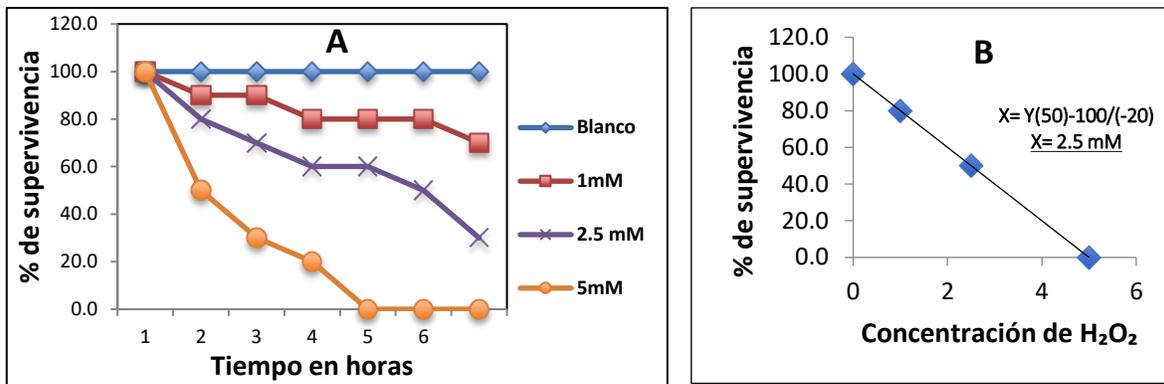


Figura 10. Efecto del extracto de la semilla del mango Tommy en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

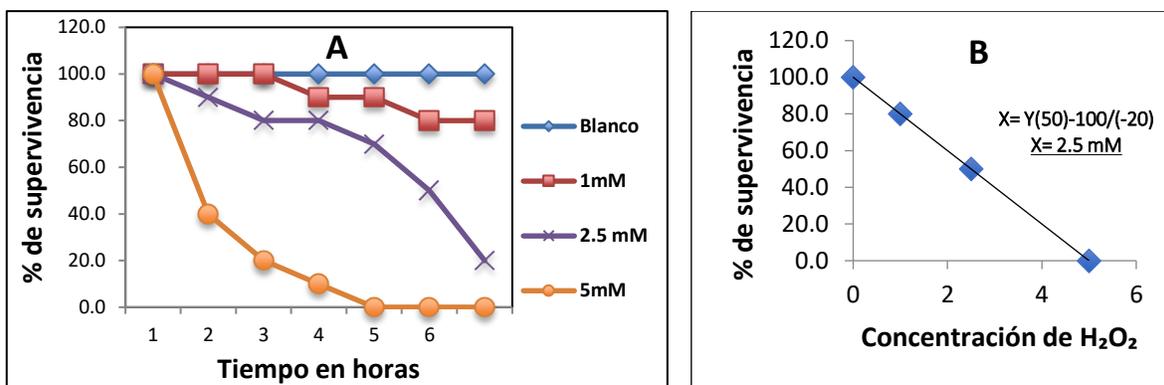


Figura 11. Efecto del extracto de la semilla del mango Manila en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

En el tratamiento con el extracto de la semilla del mango de la variedad Criollo, en la concentración más alta de H_2O_2 (5 mM) el porcentaje de supervivencia disminuyó en comparación con las variedades Tommy y Ataulfo, mostrando una letalidad de la población a las 4 h de exposición (Figura 12).

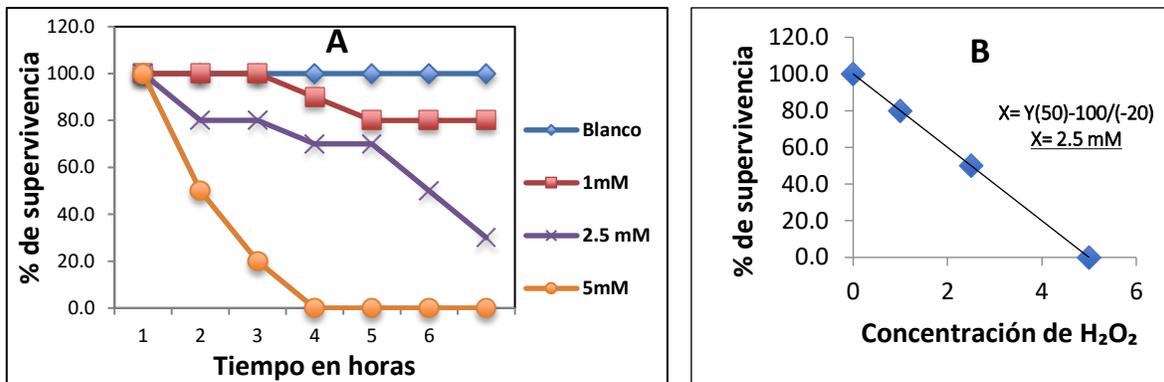


Figura 12. Efecto del extracto de la semilla del mango Criollo en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

Para la variedad Haden y Kent la letalidad de *C. elegans* se observó hasta las 6 h de exposición con una concentración de H_2O_2 de 5 mM. (Figura 13 y 14).

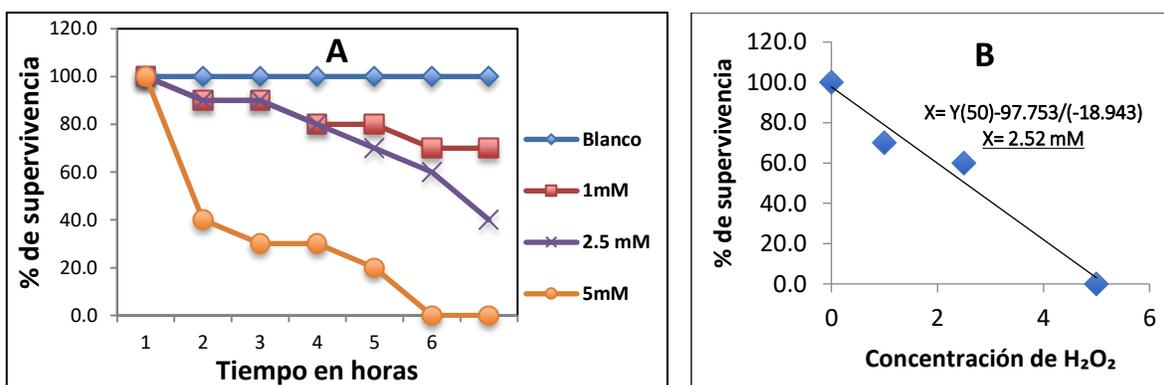


Figura 13. Efecto del extracto de la semilla del mango Kent en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

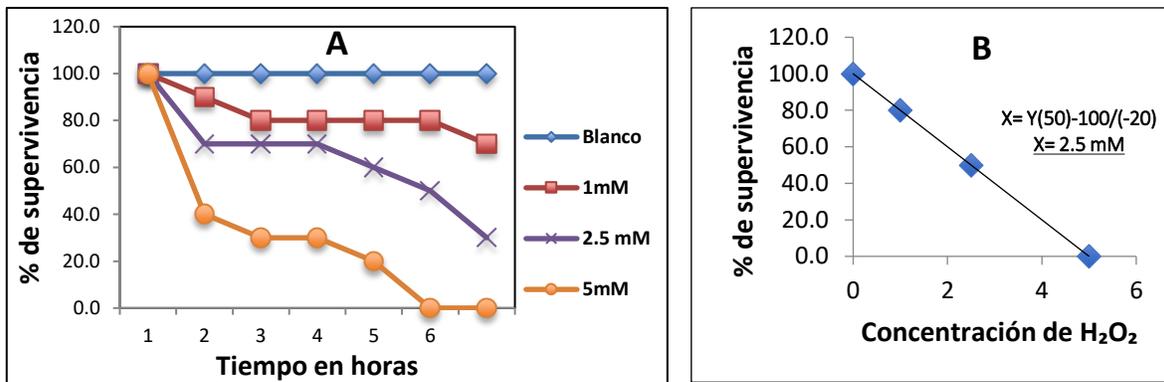


Figura 14. Efecto del extracto de la semilla del mango Haden en la supervivencia en *C. elegans* bajo el estrés oxidativo.

A) Gráfica de supervivencia.

B) Determinación de la concentración letal media.

Finalmente se observó que las variedades Ataulfo, Tommy, Haden, Criollo y Manila presentan una concentración letal media de 2.5 mM, mientras que para la variedad Kent la concentración letal media fue de 2.52 mM a la hora 6 del tratamiento.

Analizando el comportamiento de la supervivencia del nematodo a las tres y cuatro horas, que representan el tiempo medio del ensayo, se observó que en el tratamiento con H₂O₂ 1 mM (figura 15), a la hora 3 y 4, los nemátodos pretratados con el extracto de la semilla de la variedad Haden presentaron un 80% de supervivencia. Los nemátodos pretratados con los extractos de las variedades Ataulfo, Tommy y Kent, mostraron una supervivencia del 90 % a las tres horas, disminuyendo al 80 % a las cuatro horas. Los nemátodos pretratados con los extractos de las variedades Criollo y Manila mantuvieron una supervivencia del 100 % a las tres horas, disminuyendo al 90 % para la cuarta hora. Los nemátodos del tratamiento Control, que fueron pretratados con los extractos de las diferentes variedades de mango, pero que no se les adicionó H₂O₂, tuvieron una supervivencia del 100 % en las seis horas que duró el ensayo.

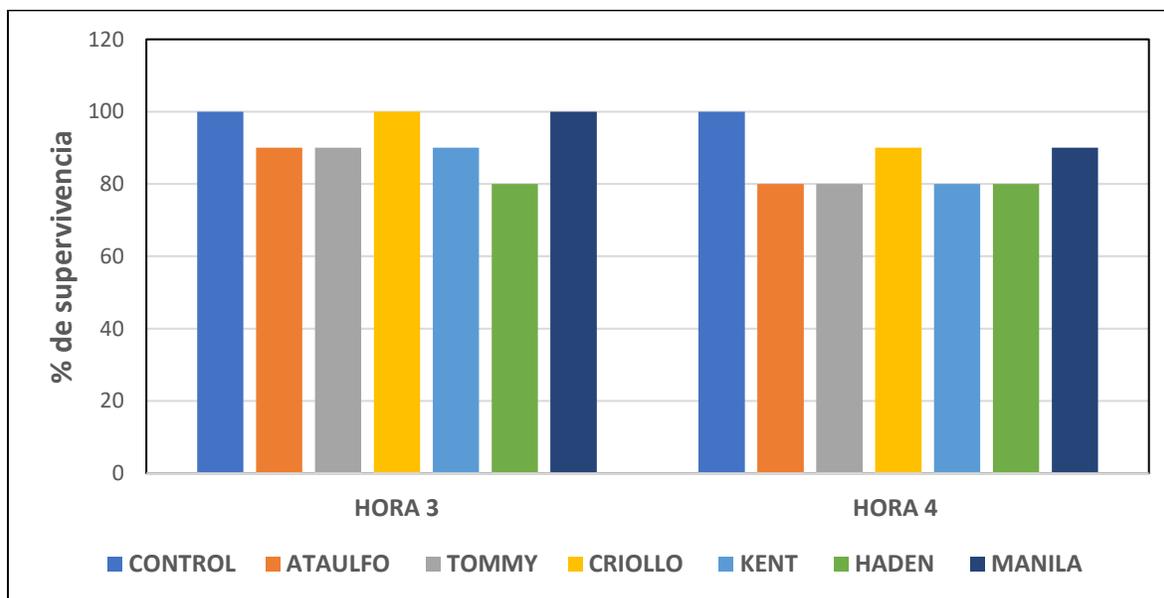


Figura 15. Supervivencia de *C. elegans* tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 1 mM de H₂O₂.

Para el tratamiento con H_2O_2 2.5 mM (figura 16), a la hora 3 y 4, se observó que los nematodos pretratados con los extractos de las semillas de las variedades Ataulfo, Tommy y Haden presentan un 70 % de supervivencia. Los nematodos pretratados con los extractos de las variedades Criollo y Manila, mostraron una supervivencia del 80 % a las 3 horas, manteniéndose constante a la hora 4 en la variedad Manila y disminuyendo la supervivencia en un 10 % en la variedad Criollo. Los nematodos pretratados con el extracto de la semilla de la variedad Kent, mostraron una supervivencia del 90 % en la hora 3, disminuyendo al 80 % para la cuarta hora con respecto al Control.

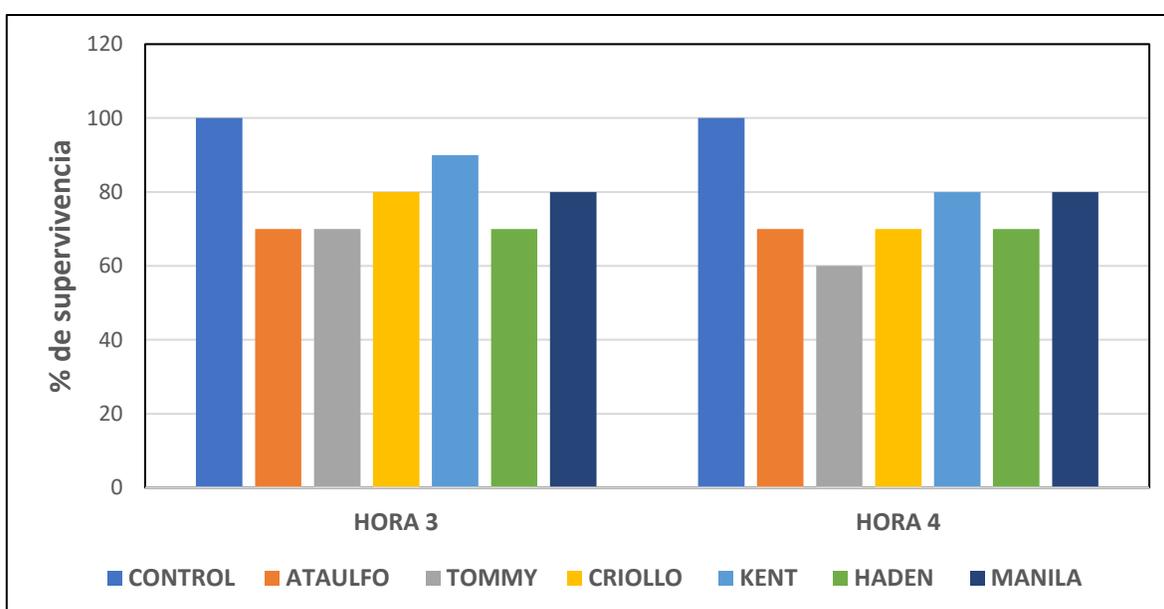


Figura 16. Supervivencia de *C. elegans* tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 2.5 mM de H_2O_2 .

Finalmente, para el tratamiento con H_2O_2 5 mM (figura 17), a la hora 3, se observó que los nematodos pretratados con los extractos de las semillas de las variedades Criollo y Kent presentan una supervivencia del 20 %, disminuyendo al 10 % en la variedad Manila a la cuarta hora y una supervivencia del 0 % en la variedad Criollo. Los nematodos pretratados con los extractos de las semillas de las variedades Tommy, Kent y Haden, mostraron un 30 % de supervivencia a la hora 3,

manteniendo una supervivencia del 30 % en las variedades Kent y Haden a la cuarta hora y disminuyendo en un 10 % para la variedad Tommy. Los nematodos pretratados con los extractos de la semilla de la variedad Ataulfo, mostraron un 50 % de supervivencia en la hora 3, disminuyendo a 20 % a la cuarta hora con respecto al tratamiento Control.

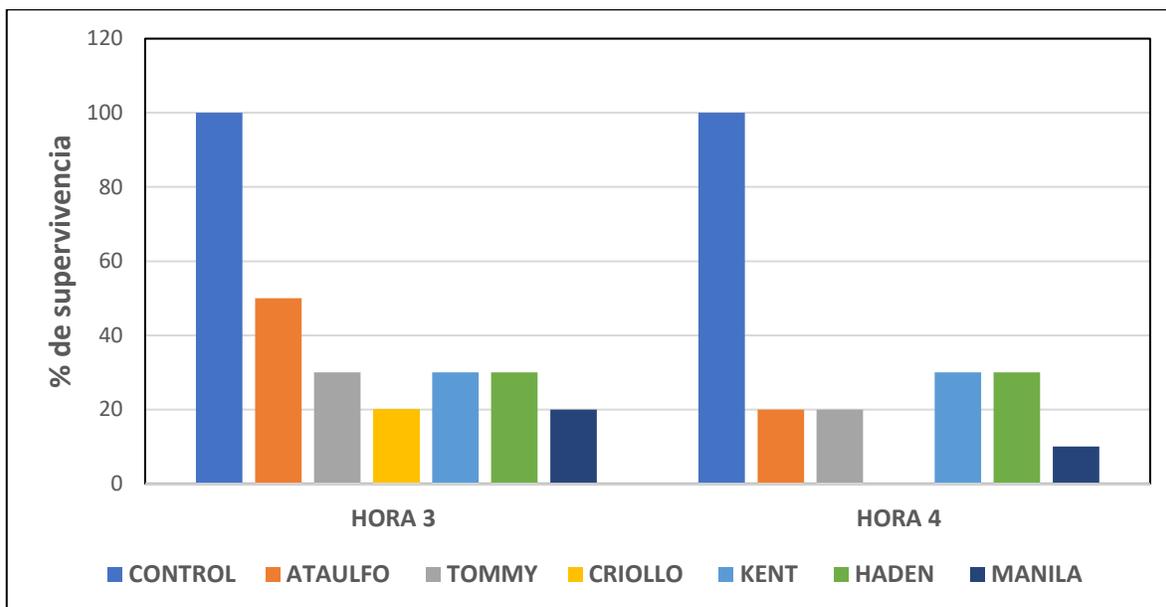


Figura 17. Supervivencia de *C. elegans* tratados con extractos fenólicos de mango ante el estrés oxidativo a 5 mM de H₂O₂.

Analizando en conjunto los resultados previos (figuras 9 a la figura 17), las principales diferencias observadas en los tratamientos se ven en el tiempo medio del ensayo que corresponde a las 3 horas, en los cuales destaca el comportamiento de la variedad Criollo que tiene la menor sobrevivencia y el comportamiento de las variedades Kent y Haden que tuvieron la máxima sobrevivencia. Si bien la concentración letal media del H₂O₂ fue similar en todos los tratamientos (2.5 mM), estos diferentes comportamientos en las curvas de supervivencia en tiempos medios (tres a cuatro horas) del ensayo, nos sugieren diferencias en el perfil de compuestos presentes en los extractos y por ende las variaciones observadas en las cinéticas de supervivencia.

8.3.2 Efecto tóxico de los extractos de seis variedades de mango en *Artemia salina*

Al ver el efecto tóxico de nuestros extractos de la semilla de *Mangifera indica* en *C. elegans* se quiso evaluar su toxicidad frente *Artemia salina* el cual se utiliza como indicador para determinar si un extracto tiene potencial efecto anticancerígeno. En la figura 18 se muestra el porcentaje de supervivencia de *Artemia salina* a diferentes concentraciones de compuestos fenólicos en el medio, desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad Kent, Haden, Manila, Criollo, Tommy y hasta 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad Ataulfo. Se observó que el extracto de la semilla de la variedad Tommy muestra una letalidad para *Artemia salina* a las 4 horas de exposición al extracto, seguido por la variedad Kent siendo las 5 horas de exposición la mortalidad de la población y posteriormente a la hora 6 se muestra la muerte de la población aquellos que estuvieron bajo tratamiento con el extracto de la semilla del mango de la variedad Manila, Criollo, Haden y Ataulfo.

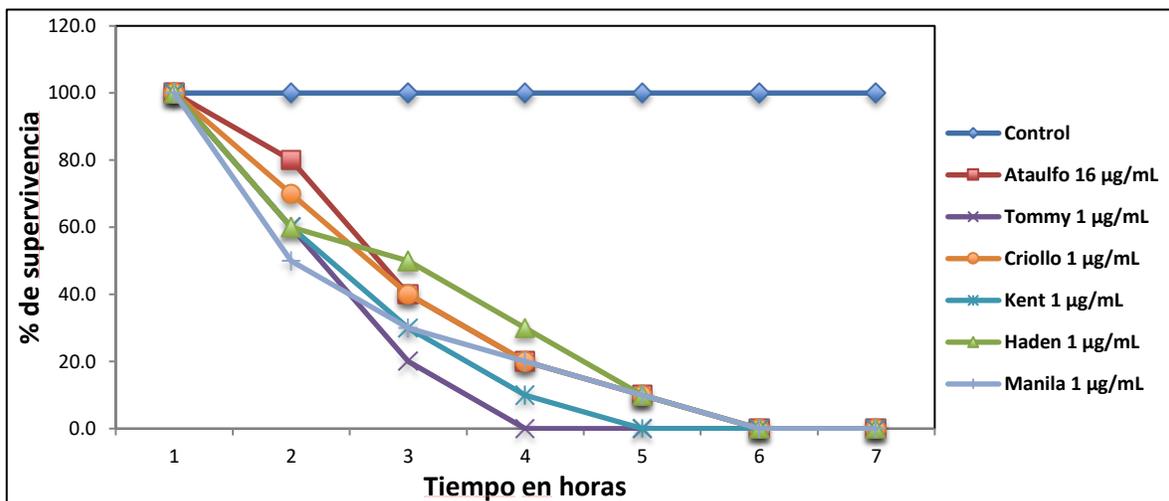


Figura 18. Efecto tóxico del extracto de la semilla de seis variedades de mango.

9. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como objetivo comparar entre diferentes variedades de mango el contenido de compuestos fenólicos, además de su actividad antioxidante con el nematodo *Caenorhabditis elegans* y su actividad tóxica en *Artemia salina*. En este contexto los antioxidantes naturales están ampliamente distribuidos en los alimentos vegetales frescos y sus productos, entre ellos la vitamina E, vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos, específicamente flavonoides (Ercisli y col., 2008), lo cual potenciaría su uso en enfermedades crónico-degenerativas, contrarrestando el estrés oxidante que viene de la mano con este tipo de enfermedades.

Por otro lado, si se utiliza el tejido entero del fruto podría traer beneficios económicos a los productores y reducir el impacto negativo al medio ambiente, dando lugar a mayor diversidad de productos destinados al uso humano (Cerezal y Duarte., 2005). Se ha descrito que cuando se corta en cubos el mango de la variedad Kent (*Mangifera indica*) hay residuos del 13.5% de semilla (Ayala- Zavala y col., 2010).

En lo referente a la cuantificación de compuestos fenólicos totales de semilla de mango, los resultados obtenidos muestran que hay un mayor contenido de estos compuestos en la semilla de la variedad Ataulfo y que la menor cantidad se encuentra en la semilla de la variedad Kent, casi 4 veces menos que el mango Ataulfo. Se ha reportado que en la pulpa del mango de la variedad Ataulfo el contenido de fenoles totales es de 160 mg/100g de muestra (Robles-Sánchez y col., 2009), sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en la semilla se encuentran 27 mg/g de muestra por lo que hay más contenido de compuestos

fenólicos en la semilla de esta variedad de Mango (Figura 4)., Estos resultados concuerdan con lo reportado por Larrauri y col., 1996 en donde se tiene un mayor contenido de fenoles totales en la semilla del mango, incluso comparándolo con otros frutos como la manzana, mandarina, papaya y piña. Así mismo Vega y col., 2011 determinaron para la variedad Haden un contenido de fenoles totales de un 116.13 mg EAG / g de semilla por lo que en nuestro estudio el contenido de fenoles totales para esta variedad es de 18 mg EAG / g, esto puede deberse a que existen varios factores que pueden afectar a la composición de compuestos fenólicos en el fruto como por ejemplo las condiciones de clima, calidad de la planta, origen geográfico, condiciones climáticas, época de recolección, almacenamiento así como la extracción de la muestra, (Conde, 2009). Se reportó que la variedad Haden se encontraron polifenoles como el ácido gálico, ácido cumárico, ácido caféico, magniferina, ácido ferúlico y ácido cinámico.

Estudios previos han demostrado que el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, es mayor en las cáscaras y semillas que en los tejidos comestibles. De acuerdo con la capacidad antioxidante, aplicando la técnica de inhibición del radical DPPH, se observó que las seis variedades contienen casi la misma concentración de ácidos fenólicos mostrando diferencias no muy significativas entre ellas, la mayor actividad antioxidante es evidente en la semilla del mango de las variedades Tommy, Kent, Haden y Manila. Curiosamente, para la variedad del mango Kent, aunque obtuvo la menor cantidad de fenoles totales, presenta una alta capacidad de eliminar este radical, esto podría deberse tanto al tipo de compuestos fenólicos presentes en el extracto como a la sinergia que puede

haber entre ellos para realizar dicha actividad y que las otras variedades no presenten. Esto concuerda con un estudio realizado por Vega en el 2011, en donde la semilla del mango de la variedad Kent tiene hasta un 90% de eliminación del radical DPPH, observando una menor actividad antioxidante en la pulpa del mango, por lo que se debe a un menor contenido de fenoles totales presentes en la pulpa.

Analizando los resultados obtenidos en la prueba de cuantificación de compuestos fenólicos totales, se observa que hay diferencias significativas en la concentración de estos compuestos entre las seis variedades, a diferencia de la prueba DPPH, donde se observó que el contenido de ácidos fenólicos es muy similar entre ellas. En general, en el mango la actividad antioxidante se le atribuye a su contenido de flavonoides (Ribeiro y col., 2008).

En el ser humano, el estrés oxidante que se genera debido a las especies reactivas del oxígeno como el H_2O_2 participa en enfermedades de gran importancia clínica como la aterosclerosis, parkinson, encefalopatías, alzheimer y es parte importante en el envejecimiento (Meyers y col., 1996). Para demostrar en *C. elegans* una capacidad antioxidante de los extractos de las seis variedades del mango, al realizar la prueba de tolerancia máxima a cada uno de estos extractos la semilla del mango de la variedad Ataulfo mostró la mayor concentración de tolerancia límite con respecto a las otras variedades (50 $\mu\text{g/mL}$), seguido de la variedad Kent y Criollo (25 $\mu\text{g/mL}$) y finalmente para Haden, Manila y Tommy fue de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, por lo que estas últimas variedades presentan mayor sensibilidad en *C. elegans*, lo cual puede ser causado por la sinergia de otros metabolitos encontrados en estas variedades,

ya que la diversidad de fitoquímicos es variable de acuerdo a la variedad. De acuerdo a esta concentración límite para cada variedad los ensayos con H₂O₂ mostraron que con una concentración de 5 mM de este agente oxidante y el tratamiento previo con los extractos de la semilla del mango no ejercen un efecto protector significativo en *C. elegans*, ya que la concentración letal media de H₂O₂ a la cual los extractos de la semilla del mango ejercen un efecto protector es de 2.5 mM, incluso se muestra una sensibilidad de los nematodos a los extractos de la semilla del mango al inducir estrés oxidativo.

El repetido hallazgo epidemiológico sobre el papel protector del consumo de frutas y verduras contra el cáncer, ha llevado a proponer la hipótesis de que los fitoquímicos presentes en estos alimentos pueden disminuir el riesgo de cáncer. Por otra parte, se ha propuesto que la acción sinérgica entre los diferentes componentes de un alimento de origen vegetal, potencia sus propiedades anticancerígenas, lo que puede explicar el efecto preventivo sugerido a partir de estudios epidemiológicos (Carrillo-Rivera y col., 2011; Gallegos, 2006; Globocan, 2008; Betancourt, 2001; Anaya y col., 2003). En este contexto, al determinar la capacidad tóxica en *Artemia salina* de cada uno de los extractos de la semilla del mango observamos que la variedad Tommy tiene un mayor efecto tóxico, ya que la concentración de extracto requerida fue de tan solo 1 mg/mL, sin embargo, aunque para el mango de la variedad Ataulfo se requieren 16 mg/mL para ejercer la misma acción, esta concentración sigue siendo considerablemente baja, se sabe que uno de los componentes del mango a los que se atribuyen propiedades anticancerígenas es la vitamina C o ácido ascórbico (Parrotta, 1993). Para

corroborar esta acción, de cada una de las variedades de mango se debe de seguir con ensayos líneas celulares de cáncer. El mango es una fuente importante de fitoquímicos a los cuales se les atribuyen propiedades preventivas contra el cáncer de colon por mecanismos antioxidantes, alteración del ciclo celular, antiproliferación celular y apoptosis, como se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*. Aunque el mango forma parte de la dieta humana y es consumido por gran parte de la población mundial; es importante promover y enfatizar el consumo y productos de estas frutas para la prevención del cáncer. Sin embargo, aún se requieren más y nuevas investigaciones de los extractos y productos del mango a nivel *in vitro*, *in vivo* y en seres humanos para justificar su inclusión en una estrategia de quimioprevención del cáncer, así como en individuos sanos.

10. CONCLUSIÓN

A pesar del alto contenido de compuestos antioxidantes en el extracto fenólico crudo de la semilla del mango, no se observó un efecto protector ante el estrés oxidante en *Caenorhabditis elegans*, ya que este se ve afectado por la toxicidad de otras moléculas presentes en él.

11. PERSPECTIVAS

- Entre las perspectivas futuras se recomienda llevar a cabo una cromatografía de líquidos para identificar la naturaleza de los componentes del extracto fenólico.
- Identificar los compuestos presentes en la semilla de mango que tuvo un mayor efecto citotóxico.
- Utilizar en condiciones que se asemejen a enfermedades crónico-degenerativas.
- Usar células derivadas de distintos tipos de cánceres para probar su efecto citotóxico.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Anaya Saavedra G, Ramírez Amador V, Irigoyen Camacho ME, Zimbrón Romero A, Zepeda Zepeda MA. Oral and pharyngeal cancer mortality rates in Mexico, 1979-2003. *J Oral Pathol Med* 37:11-7, 2008.
- Ayala-Zavala, J.F., Rosas-Dominguez, C., Vega-Vega, V., y González Aguilar, G.A (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *Journal of food Science*, 75, 175-181.
- Ashoush, I ; Gadallah, M. 2011. Utilization of mango peels and seed kernels powders as sources of phytochemicals in biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 6(1): 35-42
- Antolovich, M; Prenzler, PD; Patsalides, E; McDonald, S ; Robards, K. 2001. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst critical review*. 127(1): 183-198
- Ara A. 40 Plantas medicinales. 3ª ed. EDAF;2006: 22, 2332.
- Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Rosario: Corpus; 2004

- Antolovich, M; Prenzler, PD; Patsalides, E; Mcdonald, S ; Robards, K. 2001. Methods for testing antioxidant activity. The Analyst critical review. 127(1): 183-198
- Arnao, M; Cano, A ; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry. 73(1): 239-244
- Betancourt M. C.C.-RHM-01, Mortalidad y morbilidad. Compendio de Cáncer 2001. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaría de Salud.
- Biblioteca digital medicina tradicional mexicana[internet]. México :Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>.
- Berardini, N; Carle, R ; Schieber, A. 2004. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry. 18(19): 2208-2216
- Bukasov S. Las plantas cultivadas de México, Guatemala la y Colombia. Lima: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA;2007.

- Berardini, N; Carle, R ; Schieber, A. 2004. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 18(19): 2208-2216
- Benzie, IF ; Strain, JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power “: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(292): 70-76
- Carrillo Rivera J, Simón Naci E, Gil Romero MG, Rodríguez Flores MR. Cáncer oral en México. Re- visión bibliográfica y presentación de caso clínico. *AMCB* 7:104-108, 2011.
- Castañeda, C; Ramos, L ; Ibáñez, V. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*. 8(2008): 56-72
- Cerezal, P., y Duarte, G. (2005). Utilización de cáscaras en la elaboración de productos concentrados de tuna (*Opuntia ficus – indica* (L.) Miller *Journal of the Professional Association for Cactus Development* , 61 - 83.

- Corrales-Bernal A., M. E. Maldonado, L. A. Urango, M. C. Franco y B. A. Rojano (2014) Mango de azúcar (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales.
- Duke J, Bogenschutz M, Ducey P. *Handbook of medicinal herbs*. 2nd edn. California: CRC Press, Boca Raton; 2012.
- Ercisli S., M. Akbulut, M. Ozdemir, M. Sengul and E. Orhan (2008) Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyros kaki* L.) genotypes in Turkey. *International Food Sciences and Nutrition* 59:477-482
- Gallegos Hernández JF. El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Ciruj* 74:287-293, 2006.
- García D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Vanden W. Gallic acid, indirubin and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive antitumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA MB231 breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2011;305: 21–31.
- García, FJ. 2006. Elaboración in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral. Murcia. Universidad de Murcia. 1-202

- Garrido G, Delgado R, Lemus Y, García D, Beltran A, Rodriguez J, et al. Extracto natural de *Mangifera indica* (Vimang®): de la etnomedicina a la clínica. *Boletín latino y del Caribe de plant med y arom.* 2004; 3(6): 107-109.
- García D. Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica. [Tesis]. La Habana: Laboratorio de farmacología; 2006.
- Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, IARC, WHO, como: <http://glo-bocan.iarc.fr/>.
- Guevara M, González S, Álvarez A, Riaño A, Garrido G, Nuñez A. Uso etnomédico de la corteza de *Mangifera indica* L. en Cuba. *Rev. Cubana Plant Med.* 2004; 9 (1): 1-7.
- Kaur, C., y Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36 (7), 703 – 725
- Kuskoski E. M., A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho y R. Fett (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)* 25:726-732.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini- Filho, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25, 726-732. Soong, Y. Y., y Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88 (3), 411- 417.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Borroto, B., y Saura - Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 29 (8), 729 -733
- Lim, Y; Lim, T ; Tee, J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits : A comparative study. *Food Chemistry*. 103(2007): 1003-1008
- Mango[Internet]. México:Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Disponible en: <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutales/Mango>.
- Martinez, I; Periago, M ; Gaspar, R. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 50(2000): 5-18

- Maisuthisakul, P ; Gordon, M. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. Food Chemistry. 117(2009): 332-341
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal of Science and Technology. 26(2004): 211-219
- Nantitanon, W; Yotsawimonwat, S ; Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. Food Science and Technology. 43(2010): 1095-1103
- Parrotta JA. *Mangifera indica* L. Mango. SO-ITF- SM-63. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1993.
- Pérez-Jiménez, J ; Saura-Calixto, F. 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. Departamento de metabolismo y nutrición. Instituto del Frío. Madrid. 1150-1160

- Principales productores de mango[Internet]. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/opt/123/77/76.html>.
- Prior, R; Wu, X ; Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53(2005): 4290- 4302
- Pulido, R; Bravo, L ; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 48(2000): 3396-3402
- Resumen nacional de la producción agrícola [Internet]. México. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=26
- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M ; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(1999): 1231-1237

- Ribeiro, S; Barbosa, L; Queiroz, J; Knödler, M ; Schieber, A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*. 110(2008): 620-26
- Rincon, A. M., Vasquez, A., y Padilla, M. (2005). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 25, 305 – 310
- Robles-Sánchez, M., Islas-Osuna, M., Astiazarán-García, H., Vázquez Ortiz, F., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., y González-Aguilar, G. (2009). Quality index, consumer acceptability, bioactive compounds, and antioxidant activity of fresh -cut ataulfo mangoes (*Mangifera Indica* L.) as affected by low temperature storage. *Journal of Food Science*, 74(3), 126-134.
- Rojas, D; Narváez, C ; Restrepo, L. 2008. Evaluación del contenido de vitamina c , fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium Guajava* L.) de las variedades pera , regional roja y regional blanca. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogota. 49- 60
- Secretaría de Salud. Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades. Programa de acción específico salud bucal 2007-2012.

- Sumaya-Martínez M. T., L. M. Sánchez H., G. Torres G. y D. García P. (2012) Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 30:826-833
- Simionatto E, Peres M, Hess S, da Silva C, Chagas C, Poppi N, et al. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of Leaves Essential Oil from *Mangifera indica* var. coquinho (Anacardiaceae). *Jof Essential Oil Research*. 2013; 22 (6): 596-599.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology*. 8(2002): 121-137
- Sanchez-Moreno, C; Larrauri, JA ; Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Science of Food and Agriculture*. 76(1998): 270-276
- Saura-Calixto, F ; Goñi, I. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 94(2006): 442-447

- Swain, T ; Hillis, W. 1959. The Phenolic constituents of prunus domestica. Science of Food and Agriculture. 10(1959): 63-68
- Sowmiya S, Soundarapandian P, Rajan S. Bioactive studies of Mangifera Indica against bacteria isolated from urine samples. J.of BiologScien. 2009; 1(3): 139-143.24.
- Seneviratne, K. N., y Kotuwegedara, R. T. (2009). Antioxidant activities of the phenolic extracts of seed oils and seed hulls of five plant species. Food Science and Technology International, 15 (5), 419 – 425
- Soong, Y. Y., y Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Food Chemistry, 88 (3), 411 - 417.
- Saura-Calixto, F ; Goñi, I. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. Food Chemistry. 94(2006): 442-447

- Thaipong, K; Boonprakob, U; Crosby, K; Cisneros-zevallos, L ; Hawkins, D. 2006. Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. 19(2006): 669-675
- Torres J, Caballero B, Burgos J, Fernández J. Análisis del aprovechamiento de subproductos del mango (*Mangifera indica* L.) para la obtención de compuestos farmacológicos y nutricionales. Artículo técnico. 2010; 417: 95-98.
- Vega-Vega, V., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G. A., Vargas - Arispuro, I., y Ruiz-Cruz, S. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic compounds from fresh-cut mango byproducts extracts. *Food Research International*.
- Vega-Vega, V., Ayala- Zavala, J.F., González-Aguilar, G. A., Vargas-Arispuro, I., y Corrales-Maldonado, C. F. Antimicrobial protection and antioxidant enrichment of fresh-cut mango applying phenolic extract from their seeds byproducts.

