

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE  
LA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE SUBPRODUCTOS DE AGUACATE (*Persea  
americana* Mill), SEMILLA Y EPICARPIO

JESSICA SARAY BASANTE VALENCIA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2016

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE  
LA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE SUBPRODUCTOS DE AGUACATE (*Persea  
americana* Mill), SEMILLA Y EPICARPIO

JESSICA SARAY BASANTE VALENCIA

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular del Departamento de Química  
como requisito parcial para optar al título de Químico

Director:  
NELSON HURTADO GUTIÉRREZ  
Ph. D. en Ciencias Químicas

Codirectora:  
CORALIA OSORIO ROA  
Ph. D. en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2016

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez  
Director

---

Juan José Lozada  
Jurado

---

Olga Lucia Benavides  
Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2016

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Rosa Alba y Javier, mis hermanos Samir y David por su apoyo y amor incondicional. En especial a mi madre, por mantenerse en pie, siendo mi fortaleza durante todo este tiempo a pesar de las adversidades. Y a mi abuelita Elvia por su cariño y confianza, que aunque ya no está conmigo, siempre espero lo mejor de mí.

A mi asesor, Dr. Nelson Hurtado; y co-asesora Dr. Coralia Osorio, por su dirección en la realización del presente trabajo de investigación.

A la Red para la Bioprospección de frutas Tropicales- RIFRUTBIO por su apoyo financiero para el desarrollo de la presente investigación.

A los profesores y laboratoristas del programa de Química de la Universidad de Nariño por sus enseñanzas durante mi formación profesional; en especial a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez por su colaboración y amistad brindada.

A mis amigos Ángela, Marcela, Natalia, Angélica, Johana, Darío, Nelson... por su amistad sincera y por los gratos momentos compartidos.

## RESUMEN

En el marco de la RED NACIONAL PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE FRUTAS TROPICALES-RIFRUTBIO, se estudió la composición y actividad antioxidante *in vitro* de la fracción polifenólica extraíble de la semilla y epicarpio de una variedad de aguacate cultivada en el municipio de Tumaco (Nariño). Inicialmente a partir de estas dos partes del fruto se obtuvieron los extractos crudos (ECs) por maceración química de las muestras en metanol-ácido acético (19:1). Con el fin de obtener los correspondientes extractos ricos en polifenoles (ERPs), los ECs se sometieron a retención selectiva mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria amberlita XAD-7. El mayor contenido de fenoles totales (CFT) de los ERPs con respecto a los ECs, permitió evidenciar la eficiencia del proceso de aislamiento de este tipo de compuestos.

Con el propósito de simplificar los extractos y hacer un seguimiento bioquímico de sus componentes antioxidantes, los ERPs aislados de la semilla y epicarpio de aguacate se fraccionaron posteriormente mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular (en sephadex LH-20). El análisis de las diferentes muestras por cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PAD) y a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS) permitió identificar parcialmente la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos, como: (-)-epicatequina y varios dímeros y trímeros de procianidina tipo B, tanto en la semilla como en el epicarpio; además de algunos isómeros del ácido cafeoilquínico, trímeros de procianidinas tipo A y (-)-catequin/epicatequin-galato, en la semilla; y otros como: cianidina 3-O-glucósido y varios glicósidos de quercetina (quercetina 3-O-rutinósido, quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina 3-O-arabinósido, quercetina-3-O-ramnósido entre otros), en el epicarpio del fruto. Adicionalmente, mediante el empleo de estándares se confirmó la presencia de flavonoides, como: (+)-catequina en la semilla y cianidina 3-O-rutinósido en el epicarpio de aguacate.

La evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de aguacate (ERPs y fracciones) frente a los radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> permitió establecer que existe una relación significativa entre estos ensayos y a su vez con el contenido fenólico total (CFT) determinado. Así mismo se evidenció una relación significativa entre la capacidad antioxidante de las muestras y su composición fenólica. En general, las fracciones enriquecidas en compuestos de mayor tamaño molecular; como: dímeros y trímeros de procianidinas tipo A (semilla) y B (semilla y epicarpio), y compuestos fenólicos de tipo polimérico, son más antioxidantes que las fracciones donde se identificó tentativamente compuestos de menor tamaño molecular, como: isómeros del ácido cafeoilquínico (semilla) y antocianinas derivadas de la cianidina (epicarpio). Se concluye así que los subproductos del aguacate (semilla y epicarpio) son una fuente potencial de compuestos bioactivos que podrían ser de importancia en las industrias alimentaria y farmacéutica.

## ABSTRACT

As part of the NATIONAL RED FOR BIOPROSPECTION OF TROPICAL FRUITS-RIFRUTBIO, the in vitro antioxidant composition and activity of the extractable polyphenolic fraction of the seed and epicarp of a variety of avocado cultivated in the municipality of Tumaco (Nariño) was studied. Initially from these two parts of the fruit the crude extracts (ECs) were obtained by chemical maceration of the samples in methanol-acetic acid (19: 1). In order to obtain the corresponding extracts rich in polyphenols (ERPs), the ECs were subjected to selective retention by column chromatography using as amberlite XAD-7 stationary phase. The higher total phenols content (CFT) of the ERPs with respect to the ECs, allowed to demonstrate the efficiency of the process of isolation of this type of compounds.

In order to simplify extracts and bioguided monitoring of their antioxidant components, ERPs isolated from avocado seed and epicarp were further fractionated by size exclusion chromatography (in Sephadex LH-20). The analysis of the different samples by liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC-PAD) and to mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) allowed to partially identify the presence of different types of phenolic compounds, such as: (-) -epicatechin and various procyanidin B-type dimers and trimers, both in the seed and in the epicarp; In addition to some caffeine-isoic acid isomers, trimer of procyanidins type A and (-) - catequin / epicatequin-gallate, in the seed; And others such as cyanidin 3-O-glucoside and various quercetin glycosides (quercetin 3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin 3-O-arabinoside, quercetin- O-rhamnoside among others), in the epicarp of the fruit. Additionally, the use of standards confirmed the presence of flavonoids, such as: (+) - catechin in seed and cyanidin 3-O-rutinoside in the avocado epicarp.

The evaluation of the antioxidant activity of avocado samples (ERPs and fractions) against free radicals  $ABTS^{•+}$  and  $DPPH^{\bullet}$  allowed to establish that there is a significant relationship between these tests and in turn with the total phenolic content (CFT) determined. Likewise, a significant relationship was found between the antioxidant capacity of the samples and their phenolic composition. In general, fractions enriched in compounds of larger molecular size; Such as dimers and trimers of procyanidins type A (seed) and B (seed and epicarp), and phenolic compounds of the polymer type, are more antioxidants than the fractions where compounds of smaller molecular size have been tentatively identified, such as: isomeros of caffeine-linoic acid Seed) and anthocyanins derived from cyanidin (epicarp). It concludes that avocado (seed and epicarp) by-products are a potential

source of bioactive compounds that could be of importance in the food and pharmaceutical industries.



## CONTENIDO

pág.

Introducción	24
1. Objetivos	25
1.1 Objetivo general	25
1.2 Objetivos específicos	25
2. Marco de referencia	26
2.1 Marco teórico	26
2.1.1 Aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill)	26
2.1.1.1 Descripción botánica	26
2.1.1.2 Subespecies del aguacate y principales características	27
2.1.1.3 Morfología del fruto	27
2.1.1.4 Composición química	28
2.1.1.5 Producción mundial y situación del cultivo en Colombia y Nariño	28
2.1.2 Compuestos polifenólicos	30
2.1.2.1 Flavonoides	30
2.1.2.2 Ácidos fenólicos	33
2.1.2.3 Taninos	35
2.1.3 Aislamiento y análisis de compuestos fenólicos de fuentes vegetales	37
2.1.3.1 Maceración química o extracción líquido-sólido	37
2.1.3.2 Purificación y fraccionamiento	37

2.1.3.3 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	38
2.1.3.4 Análisis por espectroscopia UV-Vis	39
2.1.3.5 Análisis por espectrometría de masas (MS)	40
2.1.4 Análisis del contenido fenólico por el método de Folin Ciocalteu	41
2.1.5 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y su determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis)	42
2.1.5.1 Método TEAC o de capacidad antioxidante equivalente a Trolox	42
2.1.5.2 Método DPPH o de actividad antioxidante frente al radical DPPH <sup>•</sup>	44
2.2 ANTECEDENTES	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1 MUESTREO, CARACTERIZACIÓN DE LOS FRUTOS Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.	50
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE AGUACATE	53
3.2.1 Maceración química de los tejidos vegetales	53
3.2.2 Retención selectiva de los compuestos polifenólicos sobre amberlita XAD-7	55
3.3 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE AGUACATE POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO MOLECULAR	55
3.4 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA, ESPECTROSCOPIA UV-Vis Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	56
3.4.1 Análisis HPLC-PAD	56
3.4.2 Análisis HPLC-ESI-MS	57
3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	57

3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	58
3.6.1 Ensayo de capacidad antioxidante equivalente a trolox (Ensayo TEAC)	58
3.6.2 Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH* (Ensayo DPPH)	59
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS FRUTOS	60
4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS	61
4.3 COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN POLIFENÓLICA EXTRAÍBLE DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE	64
4.3.1 Análisis de la fracción polifenólica aislada de la semilla de aguacate	64
4.3.2 Análisis de la fracción polifenólica aislada del epicarpio de aguacate	79
4.4 CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (CFT) DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE	95
4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE	101
4.5.1 Capacidad antioxidante equivalente a trolox o método TEAC	101
4.5.2 Capacidad antioxidante frente al radical DPPH*	107
CONCLUSIONES	117
PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN	119
BIBLIOGRAFÍA	120
ANEXOS	131

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Principales características de las subespecies del aguacate	27
Tabla 2. Principales proantocianidinas encontradas en los tejidos vegetales	36
Tabla 3: Gradiente solventes A y B en el análisis HPLC-PAD	57
Tabla 4: Peso promedio de los frutos y porcentajes de semilla y epicarpio en cada fruto (p/p).	61
Tabla 5: Cantidades de los extractos crudos (ECs) y extractos ricos en polifenoles (ERPs) de la semilla (expuesta al aire y no expuesta) y del epicarpio de aguacate	62
Tabla 6: Cantidades de las fracciones aisladas de los ERP de la semilla y epicarpio mediante cromatografía de exclusión por tamaño.	62
Tabla 7: Principales compuestos fenólicos detectados en el ERP de la semilla de aguacate y las fracciones aisladas mediante cromatografía de exclusión por tamaño.	75
Tabla 8: Parámetros espectroscópicos (UV-Vis) para cada una de las antocianinas aisladas	80
Tabla 9: Principales compuestos fenólicos detectados en el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas mediante cromatografía de exclusión por tamaño	94
Tabla 10. Datos del ensayo de Folin Ciocalteu con los patrones de ácido gálico para la construcción de la recta de calibrado	96
Tabla 11. Resultados de la prueba de residuos atípicos en Statgraphics	96
Tabla 12. Parámetros de la ecuación de la recta de calibrado del ensayo de Folin Ciocalteu	97
Tabla 13. Contenido fenólico total de los extractos y fracciones polifenólicas de la semilla y epicarpio de aguacate	98

Tabla 14.	Datos del ensayo TEAC con patrones de trolox para la construcción de la recta de calibrado	101
Tabla 15.	Parámetros de la ecuación de la recta de calibrado del ensayo TEAC	102
Tabla 16.	Valores TEAC para las muestras aisladas de la semilla y epicarpio y el patrón de ácido ascórbico.	103
Tabla 17.	Datos de absorbancia y concentración de DPPH empleados para la construcción de la recta de calibrado	107
Tabla 18.	Parámetros de la recta de calibrado para el ensayo DPPH	108
Tabla 19.	Parámetros de las ecuaciones de ajuste para las gráficas de % de DPPH remanente versus concentración de antioxidante de las muestras en estudio	111
Tabla 20.	Valores $EC_{50}$ para las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate y el patrón de ácido gálico	112
Tabla 21:	Valores $EC_{50}$ del ensayo DPPH de las muestras de aguacate y de otros frutos	116

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Árbol de aguacate	26
Figura 2. Partes del fruto de aguacate: semilla y pericarpio	28
Figura 3. Estadísticas de la producción departamental de aguacate en Colombia.	29
Figura 4: Estructuras químicas de las principales clases de flavonoides	31
Figura 5: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos	34
Figura 6. Estructura química del monómero flavan-3-ol	35
Figura 7: Estructura química de un dímero de procianidina tipo A y B	36
Figura 8. Estructuras químicas de las resinas amberlita XAD-7 (a) y sephadex LH-20 (b)	38
Figura 9. Perfil UV-Vis característico de un flavonol: kaempferol hexosido (a) y de una flavona: apigenina glucurónido (b)	40
Figura 10: Mecanismo de la ionización electrospray (ESI)	41
Figura 11: Mecanismo antioxidante fenólico, estabilización por resonancia	42
Figura 12: Reacción antioxidante del catión-radical ABTS <sup>•+</sup> en el ensayo TEAC	43
Figura 13: Reacción antioxidante en el ensayo DPPH	44
Figura 14. a) Municipio de Tumaco en el Dpto. de Nariño, b) lugar de muestreo en el municipio de Tumaco y c) árbol de aguacate (Tumaco)	50
Figura 15. a) Penetrómetro y lámina de corte y b) medida de la firmeza de la pulpa de aguacate	51

Figura 16.	a) Epicarpio, b) semilla con cubierta y c) semilla de aguacate sin cubierta	52
Figura 17.	Reacción general de la oxidación de sustratos fenólicos por acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO)	52
Figura 18:	a) Maceración química de la semilla y epicarpio de aguacate, b) concentración de los extractos por rotaevaporación c) pardeamiento de la semilla de aguacate expuesta al aire y luz por una hora	54
Figura 19:	a) Retención selectiva de los compuestos polifenólicos sobre amberlita XAD-7 y b) fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (sephadex LH-20)	56
Figura 20:	Frutos estudiados aspecto físico exterior (a) y aspecto físico interior (b)	61
Figura 21:	Aspecto físico de los ERPs de la semilla (expuesta y no expuesta al aire) y del epicarpio de aguacate	63
Figura 22.	Aspecto físico de las fracciones aisladas del ERP de la semilla (a) y del ERP del epicarpio de aguacate (b) (Fraccionamiento 2)	64
Figura 23.	Perfiles cromatográficos (HPLC-PAD) a una $\lambda$ de 280 nm para el ERP de la semilla de aguacate y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño	65
Figura 24.	Espectro UV-Vis del compuesto fenólico <b>1</b> (tr: 9,745 min)	66
Figura 25.	Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) para los compuestos fenólicos <b>1</b> (tr: 9,745 min) y <b>5</b> (tr: 13,176 min)	67
Figura 26.	Estructuras químicas de dos isómeros del ácido cafeoilquínico: ácido 3-O-cafeoilquínico y ácido 5-O-cafeoilquínico	67
Figura 27.	Espectro UV-Vis para el compuesto fenólico <b>8</b> (tr: 20,259 min)	68
Figura 28.	Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico <b>8</b> (tr: 20,259 min)	68
Figura 29.	Estructuras químicas propuestas para el compuesto fenólico <b>8</b>	69

(tr: 20,259 min)

Figura 30.	Espectro UV-Vis para el compuesto fenólico <b>4</b> (tr: 12,262 min.)	69
Figura 31.	Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) de los compuestos fenólicos <b>4</b> (tr: 12,262 min) y <b>a</b> (tr: 15,372 min)	70
Figura 32.	Estructuras químicas propuestas para los compuestos fenólicos <b>4</b> (tr: 12,262 min) y <b>a</b> (tr: 15,372 min)	70
Figura 33.	Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico <b>2</b> (tr: 10,915 min).	71
Figura 34.	Estructuras químicas posibles para el compuesto fenólico <b>2</b> (tr: 10,915 min)	72
Figura 35.	Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) de los compuestos fenólicos <b>3</b> (tr: 12,125 min), <b>b</b> (tr: 15,856 min) y <b>c</b> (tr: 16,152 min) aislados en la fracción <b>2b</b>	73
Figura 36.	Espectros de masas de los compuestos fenólicos (ESI-MS, modo negativo) <b>6</b> (tr: 13,729 min) y <b>7</b> (tr: 14,967 min) aislados en la fracción <b>3</b>	73
Figura 37.	Estructuras químicas posibles para los compuestos fenólicos aislados en las fracciones <b>2a</b> y <b>3</b>	74
Figura 38:	Perfil cromatográfico (HPLC-PAD) del extracto crudo de la semilla no expuesta (EC semilla) y expuesta al aire (EC Semilla EA) a una $\lambda$ de 280 nm (a) y 325 nm (b)	76
Figura 39:	Mecanismo de la reacción de oxidación de mediada por la acción catalítica de la enzima polifenol oxidasa (PPO)	78
Figura 40.	Perfiles cromatográficos registrados a 520 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño	79
Figura 41:	Espectros UV-Vis de las antocianinas <b>1</b> (tr: 13,473 min) y <b>2</b> (tr: 14,141 min)	80
Figura 42.	Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) de la antocianina	81



**2** (tr: 14,141 min)

Figura 43.	Estructura química de la antocianina <b>2</b> (Tr: 14,141 min)	81
Figura 44.	Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) de la antocianina <b>1</b> (tr: 13,473 min)	81
Figura 45.	Estructura química probable de la antocianina <b>1</b> (tr: 13,473 min)	82
Figura 46:	Perfiles cromatográficos registrados a 360 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño	82
Figura 47.	Espectros UV-Vis de los compuestos fenólicos <b>1</b> (tr: 18,280 min) y <b>3</b> (tr: 19,680 min)	83
Figura 48.	Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) correspondiente al compuesto fenólico <b>1</b> (tr: 18,280 min)	84
Figura 49.	Estructuras químicas posibles para el compuesto fenólico <b>1</b>	84
Figura 50.	Espectro de masas para el compuesto fenólico <b>3</b> (tr: 19,680 min)	85
Figura 51:	Estructura química probable para compuesto fenólico <b>3</b> (tr: 19,680 min)	85
Figura 52.	Espectro UV- Vis del compuesto fenólico <b>2</b> (Tr: 19,346 min)	86
Figura 53.	Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico <b>2</b> (tr: 19,346 min)	86
Figura 54.	Estructura química propuesta para el compuesto fenólico <b>2</b> (tr: 19,346 min)	86
Figura 55.	Espectro UV-Vis para el compuesto <b>a</b> (tr: 14,587 min)	87
Figura 56.	Estructura química general para una chalcona	87
Figura 57.	Espectro UV-Vis de los compuestos fenólicos <b>4</b> (tr: 21,510 min), <b>5</b> (tr: 22,067 min), <b>6</b> (tr: 24,299 min) y <b>7</b> (tr: 26,224 min)	88
Figura 58.	Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) para los	89

compuestos **4** (Tr: 21,510 min) y **5** (Tr: 22,067 min)

Figura 59.	Estructuras químicas propuestas para los compuestos <b>4</b> y <b>5</b>	89
Figura 60.	Espectros de masas de los compuestos <b>6</b> (tr: 24,299 min) y <b>7</b> (tr: 26,224 min)	90
Figura 61.	Estructuras químicas propuestas para los compuestos <b>6</b> (quercetina 3-O-pentosa) y <b>7</b> (quercetina 3-O-metil pentosa)	90
Figura 62:	Perfiles cromatográficos registrados a una $\lambda$ de 280 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño.	91
Figura 63.	Espectros de masas de los compuestos <b>1</b> (tr: 10,709 min), <b>2</b> (tr: 12,049 min), <b>3</b> (tr: 13,953 min) y <b>4</b> (tr: 15,001 min) aislados en la fracción <b>F2a</b> .	92
Figura 64.	Espectros de los compuestos <b>a</b> (tr: 12,149 min), <b>b</b> (tr: 13,404 min), <b>c</b> (tr: 13,912 min) y <b>5</b> (tr: 16,157 min) aislados en la fracción <b>F2b</b> .	93
Figura 65.	Recta de calibrado del ensayo de Folin Ciocalteu: Absorbancia Vs Concentración de Ácido gálico (ppm)	97
Figura 66.	Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para el CFT de las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate	99
Figura 67.	CFT de la semilla y epicarpio de aguacate del presente estudio frente al CFT de otros frutos	101
Figura 68.	Recta de calibrado del ensayo TEAC: Absorbancia Vs Concentración trolox	102
Figura 69.	Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para los valores TEAC de las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate	104
Figura 70.	Relación entre el contenido fenólico total y actividad antioxidante determinada mediante el ensayo TEAC	105
Figura 71.	Valores TEAC de la semilla y epicarpio de aguacate del	107

presente estudio frente a los valores TEAC de otros frutos

Figura 72.	Recta de calibrado del ensayo DPPH: Absorbancia Vs Concentración DPPH (mM)	108
Figura 73.	Gráficos de % de DPPH remanente Vs concentración de antioxidante para el patrón de ácido gálico y los ERP de la semilla y epicarpio de aguacate	109
Figura 74.	Gráficos de % de DPPH remanente Vs concentración de antioxidante para las diferentes fracciones de la semilla y epicarpio aisladas por cromatografía de exclusión molecular	110
Figura 75.	Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para los valores $EC_{50}$ de las muestras de la semilla y epicarpio de aguacate	113
Figura 76.	Relación entre el contenido fenólico total y actividad antioxidante (método DPPH)	114
Figura 77.	Relación entre los ensayos de actividad antioxidante DPPH y TEAC	115

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A: Certificado de clasificación taxonómica del Herbario de la Universidad Nacional y del Herbario de la Universidad de Nariño.	131
Anexo B. Perfiles cromatográficos del estándar de (+)-catequina y el ERP de la semilla de aguacate.	133
Anexo C. Perfiles cromatográficos del estándar de cianidina 3-O-rutinósido y el ERP de la semilla de aguacate.	133
Anexo D. Calculo de una concentración y su error aleatorio mediante métodos de calibración.	134
Anexo E. Composición fenólica de las fracciones de la semilla y epicarpio de aguacate aisladas en el segundo ensayo cromatográfico.	135
Anexo F. Datos para la construcción de las diferentes graficas de porcentaje de DPPH' remanente versus concentración de antioxidante (g de muestra / kg de DPPH).	138

## ABREVIATURAS

RIFRUTBIO	Red para la Bioprospección de Frutas Tropicales
ECs	Extractos crudos de la semilla y epicarpio de aguacate
ERPs	Extractos ricos en polifenoles de la semilla y epicarpio de aguacate
CFT	Contenido fenólico total
TEAC	Actividad antioxidante equivalente a trolox
ABTS	Ácido 2,2'-azino- bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
UV-Vis	Ultra violeta visible
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MS	Espectrometría de masas
PAD	Detector de arreglo de fotodiodos
ESI	Ionización electrospray
tr	Tiempo de retención
$\lambda$	Longitud de onda
EGA	Equivalentes de ácido gálico
PPO	Enzima polifenol oxidasa

## GLOSARIO

**AGLICONA:** es la parte no glucídica de un heterósido.

**ANTIOXIDANTE:** molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

**BIOACTIVO:** componente que tienen una actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en beneficios para la salud.

**NUTRACÉUTICO:** producto de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva o terapéutica.

**BIOPROSPECCIÓN:** proceso de búsqueda y evaluación que permite identificar, seleccionar y aislar componentes útiles de la biodiversidad.

**EPICARPIO:** Parte externa (piel, cáscara) de los frutos.

**MACERACIÓN QUÍMICA:** proceso de extracción sólido-líquido.

**RADICAL LIBRE:** especie química que tienen electrones desapareados en sus orbitales externos y que puede existir de forma independiente.

**SUBPRODUCTO:** Producto secundario que se deriva de la obtención del principal en un proceso industrial de elaboración, fabricación o extracción.

**POLIFENOLES:** sustancias químicas presentes en las plantas, caracterizados por la presencia de más de uno o más grupos fenólicos en su estructura.

**CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC):** técnica analítica que permite separar, aislar e identificar los analitos de una mezcla de compuestos químicos.

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS):** técnica analítica que permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura de diferentes moléculas

**IN VITRO:** que tiene lugar en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente fuera de un organismo vivo.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto tropical de creciente importancia comercial en Colombia. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2013 Colombia ocupó el tercer lugar como productor mundial de aguacate<sup>1</sup>. Este fruto es reconocido por sus propiedades nutricionales y sus agradables características sensoriales. En la literatura científica se ha publicado que la pulpa tiene un alto contenido en ácidos grasos insaturados, fibra, vitamina B y E, entre otros nutrientes<sup>2</sup>; sin embargo, pocas investigaciones se han enfocado en el estudio de su composición polifenólica y actividad antioxidante *in vitro*. Para las diferentes variedades de aguacate cultivadas en Colombia y en el departamento de Nariño no existen publicaciones acerca de este tipo de fitocomponentes y sus propiedades bioactivas.

La ingesta de compuestos fenólicos ubicuos en los alimentos de origen vegetal, se han asociado con varios beneficios para la salud derivados del consumo de altos niveles de frutas y verduras<sup>3</sup>. Se ha encontrado que estos compuestos exhiben actividades biológicas de gran interés investigativo, como: efectos anti-inflamatorios, anti-virales, anti-bacterianos, anti-trombogénicos, cardioprotectores y vasodilatadores<sup>4</sup>. De acuerdo a la literatura, los polifenoles del aguacate presentan no solo una importante actividad antioxidante, sino también se ha publicado que presentan un potencial efecto contra *H. pylori*<sup>5</sup>, una bacteria causante de una infección de alta prevalencia en el departamento de Nariño<sup>6</sup>, y que como reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS), está relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico<sup>7</sup>, lo que es de particular interés para esta investigación.

---

<sup>1</sup> FAOSTAT: Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations [en línea]. [citado en Enero 2016]. Disponible en: < <http://faostat3.fao.org/home/E>>.

<sup>2</sup> DONETTI M. Postharvest biochemical and physiological characterization of imported avocado fruit. Tesis doctoral en Ciencias de la Poscosecha. Reino unido: Universidad Cranfield, Laboratorio en Ciencias de las Plantas, 2011. p. 7-28.

<sup>3</sup> BALASUNDRAM N., *et al.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. En: Food Chemistry, 2006. vol. 99, p. 191–203.

<sup>4</sup> LI, An-Na *et al.* Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. En: Nutrients, 2014. vol. 6, p. 6020-6047.

<sup>5</sup> CHÁVEZ F. *et al.* Los polifenoles antioxidantes del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. En: Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas., 2011. vol. 10, p. 265-280.

<sup>6</sup> MENA J. y Yépez M. Actividad antibacteriana *In vitro* de extractos de plantas medicinales regionales promisorias sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. En: Revista centro de estudios en salud-Universidad de Nariño, 2007. vol. 1, p. 7-15.

<sup>7</sup> RAMÍREZ A. y Sánchez R. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. Artículo de revisión. En: Revista de Gastroenterología del Perú, 2008. vol. 28, p. 258-266.

El desarrollo del presente estudio permitió generar información fundamental acerca de la composición y actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en el epicarpio y semilla de una variedad de aguacate cultivada en el municipio de Tumaco (Dpto. de Nariño). Los resultados encontrados indicaron que estos tejidos vegetales, constituyen una fuente promisoría de compuestos fenólicos, con potenciales aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria como agentes fitoterapéuticos, nutracéuticos o ingredientes funcionales. El posible uso de estos subproductos derivados del consumo del aguacate, no solo es favorable económicamente, sino que además reduce el impacto ambiental que generan este tipo de residuos vegetales.

De esta manera, con el conocimiento derivado de esta investigación, se espera a largo plazo, promover o posibilitar el aprovechamiento de nuevos productos de bajo costo, que sirvan como alternativas a los compuestos químicos sintéticos empleados en la industria de alimentos y/o farmacéutica.



## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición y la capacidad antioxidante *in vitro* de la fracción polifenólica extraíble de la semilla y epicarpio de aguacate (*Persea americana* Mill) de una variedad cultivada en Colombia.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y fraccionar los componentes polifenólicos de la semilla y epicarpio de aguacate mediante técnicas analíticas como la extracción con solventes (maceración química), retención selectiva en fase sólida y cromatografía de exclusión por tamaño.
- Analizar la composición de los extractos de la semilla y epicarpio de aguacate y de cada una de las fracciones obtenidas por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) y a espectrometría de masas (HPLC-MS).
- Determinar el contenido polifenólico total en los extractos y fracciones aisladas mediante el método de Folin Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de las diferentes muestras en estudio mediante los métodos TEAC y DPPH.

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 MARCO TEÓRICO.

#### 2.1.1 Aguacate (*Persea americana* Mill)

##### 2.1.1.1 Descripción botánica

El aguacate se clasifica taxonómicamente en la familia de las Lauráceas y en el género *persea*, tomando la designación científica de *Persea americana* Mill; la cual viene también del nombre de Miller, un botánico escocés que en el siglo XVII publicó una descripción del género en su "Gardeners Dictionary"<sup>8</sup>.

La zona de origen del aguacate es Centroamérica; probablemente México, Guatemala y Honduras. En la actualidad se cultiva en otras partes de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Los cultivos de aguacate se encuentran desde el nivel del mar hasta aproximadamente 2.500 m de altura<sup>9</sup>. Dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales, el árbol de aguacate puede alcanzar de 10 a 30 m de altura; y su copa, los 25 m de diámetro (figura 1). Una característica de este árbol es el pequeño tamaño de su flor (5-8 mm), las cuales se agrupan en panículas que puede tener hasta 100 inflorescencias, de las que sólo el 1% llega a la etapa de fruta<sup>10</sup>.

Figura 1. Árbol de aguacate.



Fuente: Elaboración propia.

---

<sup>8</sup> DONETTI M., Op. Cit., p. 7-28.

<sup>9</sup> LIM T. *Persea americana*. En: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*, 2012. vol. 3, p. 78-97.

<sup>10</sup> DONETTI M., Op. Cit., p. 7-8.

### 2.1.1.2 Subespecies del aguacate y principales características

La especie *Persea americana* Mill ha dado origen a tres diferentes subespecies: Mexicana, Guatemalteca y Antillana, las cuales en el proceso evolutivo se desarrollaron bajo diferentes condiciones edafoclimáticas. Las subespecies Mexicana y Guatemalteca se caracterizan por tolerar temperaturas bajas y suelos muy bien drenados; mientras que la subespecie Antillana se adapta a climas cálidos y secos. De acuerdo a la literatura el tamaño de los frutos es una de las principales características que varían con la subespecie de los mismos. En la tabla 1 se resumen las características de adaptación climática y el rango de pesos característicos de cada una de las subespecies; además de algunas de las variedades más representativas<sup>11,12</sup>.

Tabla 1. Principales características de las subespecies del aguacate<sup>13</sup>.

<b>Característica</b>	<b>Subespecie botánica</b>		
	<b>Mexicana</b>	<b>Guatemalteca</b>	<b>Antillana</b>
<b>Adaptación climática</b>	Frio	Frio moderado	Cálido
<b>Altura (m.s.n.m)</b>	Menor a 1.000	Entre 1.000 y 2.000	Más de 1.700
<b>Peso del fruto (g)</b>	80-250	120-1500	250-2500
<b>Algunas variedades</b>	Puebla, Duke, Gottfried, Zutano, Bacon.	Hass, Reed, Linda, Nabal, Pinkerton.	Lorena, Peterson Simmonds, Trapp Pollock.

### 2.1.1.3 Morfología del fruto

El fruto del árbol de aguacate es una baya con una gran semilla localizada en la parte central del mesocarpio o pulpa del fruto. Como se muestra en la figura 2 el pericarpio del fruto está compuesto del epicarpio o cubierta externa, el mesocarpio o pulpa y el endocarpio, una capa delgada que cubre la semilla<sup>14</sup>. Como el tamaño de los frutos, otras características como su forma y coloración externa difieren también con la subespecie y variedad de los mismos. Entre las formas de los frutos más comunes se encuentran las piriformes, esféricas y ovoides. Por otro lado, las coloraciones típicas del epicarpio son verde, púrpura, morada y sus combinaciones<sup>15</sup>.

<sup>11</sup> BERNAL E., Díaz D. y Cipriano A. Generalidades del cultivo de aguacate. En: Tecnología para el cultivo del aguacate. Antioquia, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Centro de Investigación La Selva, Rionegro, 2008.

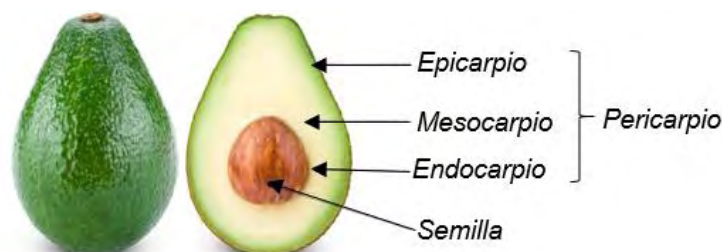
<sup>12</sup> ROBAYO A. Delgado W. y Cuca L. El aguacate, *Persea americana* MILL (Lauraceae): Origen, propiedades y estado actual en Colombia, 2016. En: Revista Quei. Química e Industria. vol. XXVIII, no. 1, p. 1-9.

<sup>13</sup> YABRUDY J. El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el caribe colombiano. Cartagena: Banco de la Republica. Centro de Estudios Económicos regionales, CEER, 2012.

<sup>14</sup> DONETTI M., Op. Cit., p. 14-15.

<sup>15</sup> BERNAL E., Op. Cit., p. 22.

Figura 2. Partes del fruto de aguacate: semilla y pericarpio.



Fuente: Adaptado de LEMBE S. y Samson Z., 2015.

#### 2.1.1.4 Composición química

Los principales componentes del fruto de aguacate son: agua (70-80%), grasas (15-18%), carbohidratos (4-5%), proteínas (1-2%), fibra (1%) y ceniza. Adicionalmente, para este fruto se ha reportado un alto valor nutritivo debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados y vitaminas C, B, y E; entre otros fitocomponentes con efectos biológicos positivos. En el mesocarpio (pulpa) del fruto por ejemplo, se ha reportado altas cantidades de los ácidos oleico, linoleico y ácidos alfa-linolénico que son valiosos constituyentes de la dieta humana<sup>16</sup>.

Por otro lado, en los diferentes tejidos vegetales del fruto, como la semilla, epicarpio y mesocarpio, investigaciones previas han reportado también la presencia de diferentes tipos de polifenoles de interés para el presente estudio; lo cual se describe más detalladamente en la sección de antecedentes.

#### 2.1.1.5 Producción mundial y situación del cultivo en Colombia y Nariño

Los mayores cultivos de aguacate en el mundo se encuentran en los países latinoamericanos, dentro de los que se destacan México como primer productor mundial, Chile, Brasil, Perú, Colombia y República Dominicana<sup>17</sup>. De acuerdo a las últimas estadísticas de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), para el año 2013, se tuvo una producción global de aguacate de 4.717.102 Toneladas Métricas (TM), de las cuales los cinco principales países productores fueron México como el primer productor con 1.467.837 TM (31,11%), seguido por República Dominicana con 387.546 TM (8,21%), Colombia con 303.340 TM (6,43%), Perú con 288.387 TM (6,11%) e Indonesia con 276.311 TM (5,85%)<sup>18</sup>.

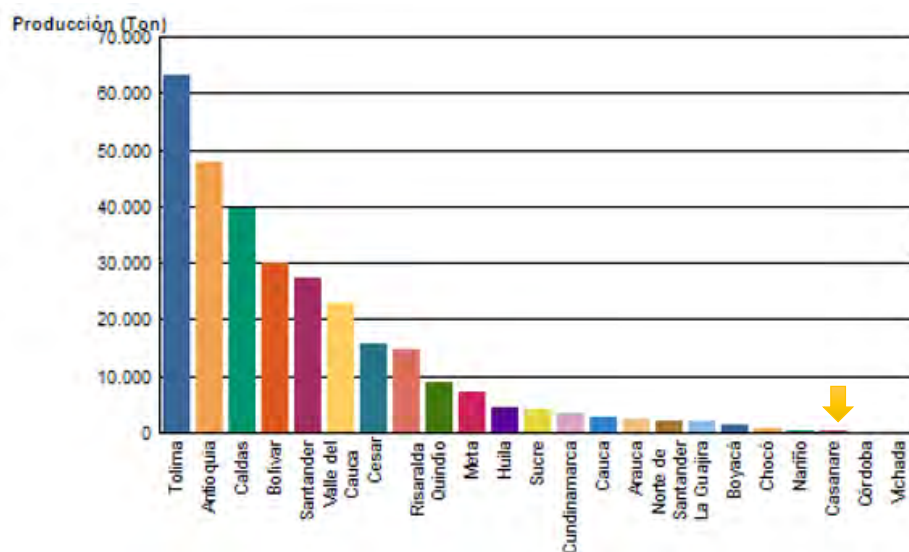
<sup>16</sup> DONETTI M., Op. Cit., p. 17-28.

<sup>17</sup> BERNAL E., Op. Cit., p. 22.

<sup>18</sup> FAOSTAT: Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations [en línea]. [citado en Enero 2016]. Disponible en: < <http://faostat3.fao.org/home/E>>.

Como se mencionó en las estadísticas, Colombia presenta una producción de aguacate importante a nivel mundial. Sin embargo, debido a la alta demanda interna y la falta de prácticas agrícolas adecuadas no se ha logrado posesionar como un exportador neto. Los departamentos del Eje Cafetero junto con Antioquia son los que han experimentado las mayores tasas de crecimiento anual promedio en la producción de aguacate (figura 3), que por sus condiciones de clima y altura han desarrollado principalmente el cultivo de la variedad Hass, siendo esta la de mayor potencial exportador.

Figura 3. Estadísticas de la producción departamental de aguacate en Colombia.



Fuente: AGRONET.

Por otra parte, el departamento de Nariño no ha tenido una participación importante en la producción de aguacate en el país, tal como lo demuestran las estadísticas del ministerio de Agricultura para el año 2014, donde aportó únicamente con el 0,16% de la producción nacional total (figura 3)<sup>19</sup>. Sin embargo, Nariño cuenta con una gran variedad de pisos térmicos y condiciones edafoclimáticas adecuadas para este cultivo. Investigaciones como la desarrollada por Rodríguez *et al.* por ejemplo, reportaron la presencia de diferentes variedades nativas de aguacate en el departamento, de las cuales el 68,8% correspondieron a la subespecie Antillana, y el porcentaje restante a la subespecie Mexicana<sup>20</sup>.

<sup>19</sup> AGRONET - Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano [En línea]. [Citado en Noviembre, 2016]. Disponible en: <<http://www.agronet.gov.co/Paginas/default.aspx>>.

<sup>20</sup> RODRÍGUEZ M. *et al.* Colecta de aguacate criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. Congreso latinoamericano del aguacate. (3: 12 de Noviembre de 2009, Medellín, Colombia). Consejo Nacional del Aguacate y la Corporación Antioqueña del Aguacate.

### 2.1.2 Compuestos polifenólicos

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas; los cuales se derivan de las vías pentosa fosfato, shiquimato y fenilpropanoide<sup>21</sup>. Estos compuestos son sin duda de gran importancia en la vida vegetal, pues actúan como fitoalexinas, antialimentadores, atrayentes para los polinizadores, antioxidantes y agentes protectores contra la luz UV, entre otros<sup>22</sup>. Además de contribuir a las características de color y sensoriales de las frutas y hortalizas.

Por otro lado, debido a su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal, los polifenoles constituyen una parte importante de la dieta humana, por lo que también han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional. Estos compuestos se han asociado con los beneficios para la salud derivados del consumo de altos niveles de frutas y verduras; los cuales frecuentemente se han atribuido a su reconocida actividad antioxidante. Adicionalmente, se ha encontrado que estos compuestos exhiben diferentes actividades biológicas de gran interés en el ámbito de la salud, tales como efectos anti-inflamatorios, anti-virales, anti-bacterianos, anti-trombogénicos, cardioprotectores y vasodilatadores<sup>23</sup>.

Estructuralmente, los compuestos fenólicos consisten en un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, pueden variar de una molécula fenólica sencilla a la de un complejo polímero de alta masa molecular; y a pesar de la diversidad estructural, estos compuestos son a menudo referidos como polifenoles. Los polifenoles pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos. Los principales subgrupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos<sup>24</sup>. A continuación, se describe los tres primeros subgrupos de interés en el presente estudio<sup>25</sup>.

#### 2.1.2.1 Flavonoides:

Representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 7.000 compuestos diferentes.

---

<sup>21</sup> BALASUNDRAM N. *et al.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *En: Food Chemistry*, 2006. vol. 99, p. 191–203.

<sup>22</sup> IGNAT I. *et al.* A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *En: Food Chemistry*, 2011. vol. 126, p. 1821–1835.

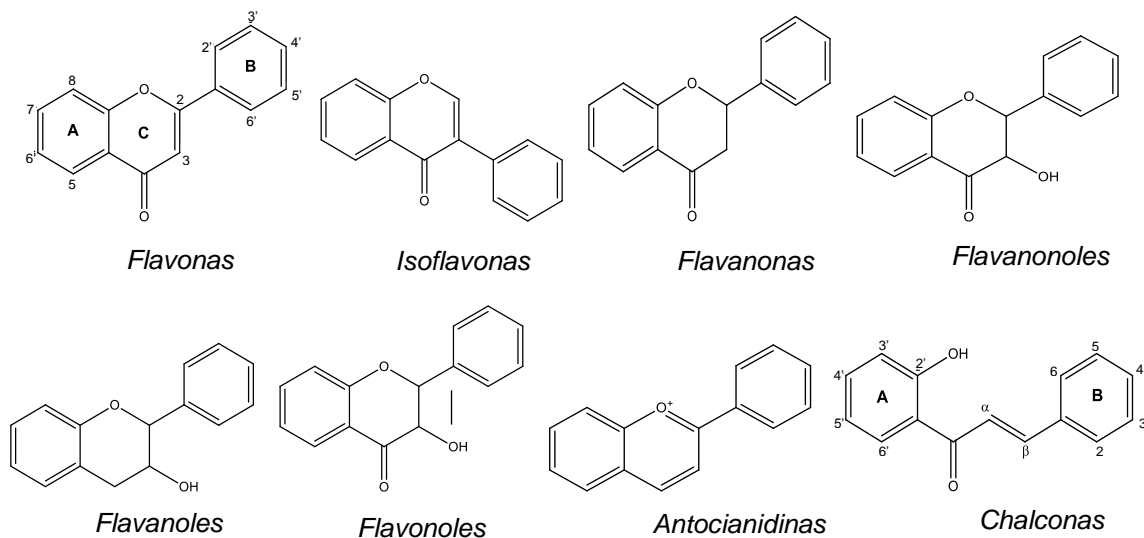
<sup>23</sup> BALASUNDRAM N. *et al.*, *Op. Cit.*, p. 191.

<sup>24</sup> IGNAT I. *et al.*, *Op. Cit.*, p. 1822.

<sup>25</sup> RODRÍGUEZ-CARPENA J. *et al.* Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. vol. 59, p. 5625–5635.

Esencialmente, consisten en dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un puente de 3 carbonos, usualmente en la forma de un anillo heterocíclico, C (figura 4). La clasificación de los flavonoides se basa en el estado de oxidación y el grado de insaturación del anillo central heterocíclico (o la falta de ella en el caso de chalconas). En la figura 4 se pueden distinguir las principales clases como: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanonoles, flavanoles, flavonoles, las antocianidinas y chalconas<sup>26</sup>.

Figura 4: Estructuras químicas de las principales clases de flavonoides.



Fuente: DE VILLIERS A. *et al.*, 2016.

Adicionalmente, las sustituciones en los anillos A y B dan lugar a diferentes compuestos dentro de cada subclase de flavonoides. Estas sustituciones pueden incluir hidroxilación, metoxilación, alquilación, glicosilación, acilación, y sulfonación<sup>27</sup>. Generalmente el anillo A presenta hidroxilos que se ubican principalmente en las posiciones 7 y 5. El anillo B presenta 1, 2, o 3 hidroxilos o metoxilos que se ubican generalmente de la siguiente manera: si hay un solo hidroxilo/metoxilo se ubica en la posición 4', si hay dos se ubican en las posiciones 3' y 4', y si hay tres se ubican en las posiciones 3', 4' y 5'.

De otro lado, la forma glicosídica es una característica general de los flavonoides, a excepción de los flavanoles cuyas formas glicosidadas son raras. Los flavonoides libres, es decir, los flavonoides sin azúcares enlazados, se llaman agliconas. Los flavonoides pueden estar en forma de O-glicósidos donde los azúcares se unen a los grupos hidroxilo (monoglicósidos generalmente en las

<sup>26</sup> DE VILLIERS A. *et al.* Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *En: Journal of Chromatography A*, 2016. vol. 1430, no 22. p.16–78.

<sup>27</sup> BALASUNDRAM N. *et al.*, *Op. Cit.*, p. 191.

posiciones 3, 7, 3' y 4' y diglicósidos en posiciones 3 y 5, 3 y 7' en 7 y 4') o C-glicósidos donde los azúcares se enlazan directamente a un átomo de carbono del esqueleto del flavonoide (en los carbonos 6 y 8). Los azúcares más comúnmente encontrados son mono-, di- y polisacáridos; predominantemente enlazados a los flavonoides por medio de un enlace  $\beta$ -glicosídico<sup>28</sup>.

A continuación se describe brevemente algunas de estas subclases:

*Los flavonoles y flavonas* son usualmente encontrados en las plantas como O-glicósidos. Las flavonas también pueden presentarse como C-glicósidos. Las agliconas de flavonoles y flavonas no están presentes en las plantas frescas, pero puede estar presente como productos de alimentos procesados. En los flavonoles el sitio de unión del azúcar más frecuente es la posición 3, seguido de la posición 7, y sólo en casos raros, las posiciones 4', 3' y 5 (figura 4). De otro lado, las flavonas se encuentran principalmente como 7-O-glicosidos. La glucosa es el azúcar más frecuente; otros residuos de azúcar encontrados son D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-apiosa, como también ácido D-glucurónico<sup>29</sup>.

Respecto a su distribución en las plantas, *los flavonoles* se encuentran abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, las pieles u hollejos de las frutas son particularmente ricas en estos compuestos. Los más conocidos son la quercetina, kaempherol y miricetina, y se presentan generalmente en forma de glicósidos<sup>30</sup>. Por su parte, las *flavonas* no se encuentran frecuentemente en frutas pero sí en cereales y muchas plantas herbáceas. El perejil y otras hierbas aromáticas, como el romero y el tomillo, contienen apigenina que junto a la luteolina, presente en cereales, son las flavonas más comunes. Los glicósidos de flavonas están presentes en verduras y hortalizas<sup>31</sup>.

De otro lado, los *flavonoles* pueden encontrarse en la naturaleza como monómeros (catequinas) o condensados entre sí, formando compuestos con diverso grado de polimerización conocidos como proantocianidinas (taninos condensados). Como se mencionó al contrario de lo que ocurre con otros flavonoides, las combinaciones con azúcares son poco habituales. Sin embargo, pueden poseer restos acilo, siendo el ácido gálico el sustituyente más frecuente. La falta de un doble enlace en las posiciones 2-3 del anillo heterocíclico C y la presencia de un grupo 3-OH da origen a dos centros de simetría (figura 4). Hasta

---

<sup>28</sup> MARCANO D. y Hosegawa M. Fitoquímica Orgánica. Citado por: Jiménez, Juan Pablo y Villarreal, Jhon. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Motilon (Hyenorima macrocarpa). Tesis de pregrado. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Química. 2008.

<sup>29</sup> HOLLMAN P. y Arts LI. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. vol. 80, p. 1081-1093.

<sup>30</sup> RIVAS J. y García A. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. En: Alimentación, Nutrición y Salud, 2002. vol. 9, no 2, p. 31-38.

<sup>31</sup> RIVAS J. y García A., Op. Cit., p. 32.



ahora, solo los que presentan una configuración 2R han sido encontrados en la naturaleza. Los flavanoles predominantes son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina; además de los siguientes ésteres de ácido gálico: (-)-epicatequin galato y (-)-epigalocatequin galato<sup>32</sup>. La catequina y epicatequina son los principales flavonoides en las frutas, mientras que galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina se encuentran en ciertas semillas de plantas leguminosas, en las uvas, y de manera importante en el té<sup>33</sup>.

Finalmente, entre las subclases de flavonoides más sobresalientes, están *las antocianinas*, que consisten en pigmentos vegetales hidrosolubles responsables del color azul, púrpura y rojo de muchas plantas y frutos. Estos compuestos son de gran interés investigativo, debido a su impacto en las características sensoriales de los productos alimenticios, y por sus propiedades relacionadas con la salud. En la naturaleza se encuentran principalmente como glicósidos o acilglicósidos. Sus agliconas se conocen como antocianidinas y rara vez se encuentran en materiales vegetales frescos. Existen alrededor de 17 antocianidinas; mientras que sólo 6 de estas, como la cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina, y malvidina, están distribuidas de forma ubicua. Entre los azúcares más frecuentes presentes en las antocianinas se encuentran: la glucosa, ramnosa, xilosa, galactosa, arabinosa y fructosa. Normalmente estos azúcares se encuentran unidos a la aglicona como monosacáridos, pero pueden estar en forma de di- o trisacáridos. Las posiciones más frecuentes de unión de los azúcares a la aglicona son: 3, 5, 7, 3', 4' y 5' (figura 4). Cuando el aglicona lleva un solo azúcar éste se suele encontrar en la posición 3. Los restos ácidos que más frecuentemente forman parte de las antocianinas son: cumárico, cafeico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, sinápico, malónico, acético, succínico, oxálico y málico. Estos ácidos se unen a la posición 6 de la molécula de azúcar<sup>34, 35</sup>.

### 2.1.2.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen alrededor de un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta, los cuales pueden estar presentes en las plantas en forma libre y vinculados a diversos componentes de la planta a través de enlaces tipo éster, éter, o acetal. Los derivados de los *ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos* son los ácidos fenólicos predominantes en las plantas. En

<sup>32</sup> HOLLMAN P. y Arts LI., Op Cit., p. 1081.

<sup>33</sup> MANACH C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. En: The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. vol. 79, p. 727–47.

<sup>34</sup> DE PASCUAL-Teresa S., Moreno D. y García-Viguera C. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. En: International Journal of Molecular Sciences, 2010. vol. 11, p. 1679-1703.

<sup>35</sup> VALLS J. *et al.* Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. En: Journal of Chromatography A, 2009. vol. 1216, p. 7143–7172.

contraste con otros compuestos fenólicos; estos compuestos presentan un carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula, el cual está unido directamente al anillo aromático en los *ácidos hidroxibenzoicos*, y mediante una cadena lateral de carbonos en los *ácidos hidroxicinámicos*, tal como se muestra en la figura 5<sup>36, 37</sup>.

Los *ácidos hidroxicinámicos* más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, que con frecuencia se producen en los alimentos como ésteres simples con ácido quínico o glucosa. Probablemente el ácido hidroxicinámico más conocido es el ácido clorogénico, que se combina a partir de ácidos cafeico y quínico<sup>38</sup>. Este se encuentra en muchos tipos de frutas y en altas concentraciones en el café: una sola taza puede contener 70-350 mg de ácido clorogénico. Las frutas con los contenidos más altos de este tipo de ácidos fenólicos son los arándanos, kiwis, ciruelas, cerezas, manzanas<sup>39</sup>.

A diferencia de hidroxicinamatos, el contenido de *ácidos hidroxibenzoicos* en las plantas comestibles es generalmente muy bajo, con la excepción de ciertas frutas rojas, rábano negro, y las cebollas, que puede tener concentraciones de varias decenas de miligramos por kilogramo de peso en fresco. Las variaciones en las estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos individuales se encuentran en las hidroxilaciones y metilaciones del anillo aromático. Los ácidos hidroxibenzoicos más comunes son el ácido *p*-hidroxibenzoico, vanílico y protocatéquico<sup>40</sup>. Estos pueden estar presentes en forma soluble o conjugados con azúcares o ácidos orgánicos, así como unidos a fracciones de la pared celular, por ejemplo, la lignina<sup>41</sup>. Además, los ácidos hidroxibenzoico son componentes de estructuras complejas como los taninos hidrolizables<sup>42</sup>.

---

<sup>36</sup> MATTILA P. y Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2007. vol. 20, p. 152–160.

<sup>37</sup> ROBBINS R. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. En: Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003. vol. 51, p. 2866-2887.

<sup>38</sup> MATTILA P. y Hellström J., Op. Cit., 152.

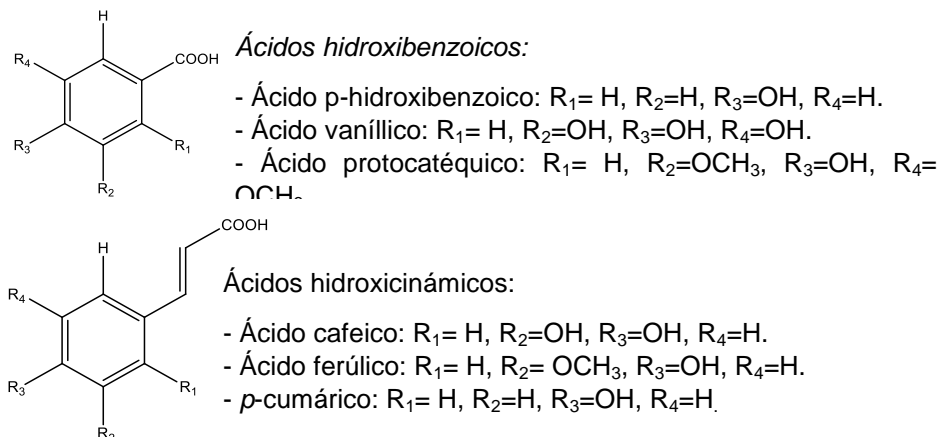
<sup>39</sup> MANACH C. *et al.*, Op. Cit., p. 728.

<sup>40</sup> *Ibid.*, p. 728.

<sup>41</sup> GOLENIOWSKI M. *et al.* Phenolic Acids. En: Natural Products, K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (eds.). Berlin. 2013. Capítulo 63. p. 1953-1972.

<sup>42</sup> MANACH C. *et al.* Op. Cit., p. 728.

Figura 5: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.



Fuente: GOLENIOWSKI M. *et al.*, 2013.

### 2.1.2.3 Taninos

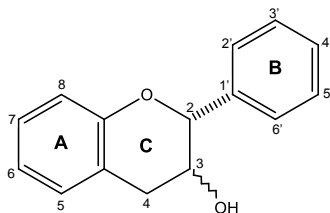
Los taninos son compuestos con pesos moleculares relativamente altos que oscilan entre los 500 y 20.000 Da, constituyen el tercer grupo de mayor importancia dentro de los compuestos fenólicos, se puede subdividir en *taninos hidrolizables* y *condensados*<sup>43</sup>. A continuación se describen más detalladamente los taninos condensados de interés para el presente estudio.

Los *taninos condensados* o *proantocianidinas* son oligómeros y polímeros de las unidades tipo flavan-3-ol. Los monómeros flavan-3-ol se encuentran diversamente sustituidos, en particular hidroxilados, en las 5 y 7 posiciones del anillo A, en la posición 3 del heterociclo y en las posiciones 3', 4' y/o 5' del anillo B (Figura 6). Las proantocianidinas pueden dividirse en varias clases basándose en el patrón de hidroxilación de sus unidades constituyentes, el tipo de enlaces entre estas y su grado de polimerización. Los patrones de hidroxilación permiten distinguir varias clases de proantocianidinas, como procianidinas, prodelfinidinas, propelargonidinas, profisetidinas y prorobinetinidinas (tabla 2); siendo las procianidinas y prodelfinidinas las más comúnmente encontradas en plantas. Como se observa en la tabla 2 las procianidinas se encuentran constituidas de unidades de catequina y epicatequina, mientras que prodelfinidina, de galocatequina epigalocatequina<sup>44</sup>.

<sup>43</sup> HUANG X., *et al.*, Molecular weight and protein binding affinity of Leucaena condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *En: Animal Feed Science and Technology*, 2010. vol. 159, no. 3–4, p. 81–87.

<sup>44</sup> SUN B. y Spranger M. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *En: Ciência e Técnica Vitivinícola*, 2005. vol. 20, no 2, p. 59-89.

Figura 6. Estructura química del monómero flavan-3-ol.



Fuente: SUN B. y Spranger M., 2005.

Tabla 2. Principales Proantocianidinas encontradas en los tejidos vegetales<sup>45</sup>.

Proantocianidina	Monómero	Patrón de sustitución					
		3	5	7	3'	4'	5'
<i>Procianidina</i>	Catequina, epicatequina	OH	OH	OH	OH	OH	H
<i>Prodelfinidina</i>	Galocatequina, epigalocatequina	OH	OH	OH	OH	OH	OH
<i>Propelargonidina</i>	Afzelequina	OH	OH	OH	H	OH	H
<i>Profisetidina</i>	Fisetinidol	OH	H	OH	OH	OH	H
<i>Prorobinetinidina</i>	Robinetinidol	OH	H	OH	OH	OH	OH

Por otro lado, de acuerdo al tipo enlaces entre los monómeros flavan-3-ol, las proantocianidinas se pueden dividir en dos clases: de tipo A y de tipo B. Las procianocinidinas de tipo B, los monómeros flavan-3-ol están unidos por enlaces tipo C-C, como: C4-C8 o C4-C6; mientras que en las proantocianidinas de tipo A presentan enlaces tipo éter adicionales, como: C2-O-C7 o C2-O-C5<sup>46</sup> (figura 7).

Los oligómeros de proantocianidinas corresponden a una de las clases de compuestos polifenólicos más abundantes en el reino vegetal. Las proantocianidinas son una parte integral de la dieta humana, se encuentra en altas concentraciones en las frutas como la manzana, pera, y uvas, y en el chocolate, el vino y el té<sup>47</sup>. Las proantocianidinas se encuentran principalmente en forma libre, aunque hay algunas excepciones bien conocidas como ésteres con ácido gálico presentes comúnmente en el té verde y las uvas<sup>48</sup>.

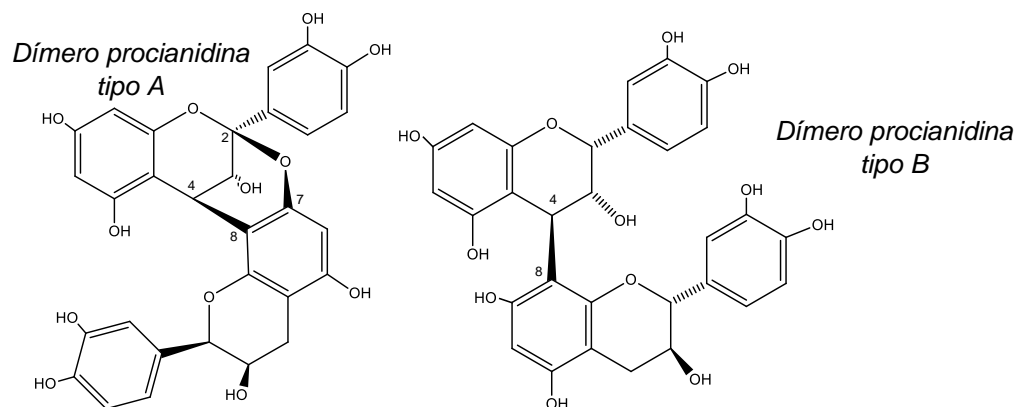
<sup>45</sup> SUN B. y Spranger M., Op. Cit., p. 61.

<sup>46</sup> HELLSTRÖM J. *et al.* Proanthocyanidins in Common Food Products of Plant Origin. *En: Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2009. vol. 57, p. 7899–7906.

<sup>47</sup> Oligomeric Proanthocyanidins. *En: Alternative Medicine Review*, 2003. vol. 8, no 4, p. 422-450.

<sup>48</sup> HELLSTRÖM J. y Mattila P. HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. *En: Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2008. vol. 56, p. 7617–7624.

Figura 7: Estructura química de un dímero de procianidina tipo A y B.



Fuente: SUN B. y Spranger M., Op. Cit., p. 62.

### 2.1.3 Aislamiento y análisis de compuestos fenólicos de fuentes vegetales

#### 2.1.3.1 Maceración química o extracción líquido sólido

La Maceración química (o extracción sólido líquido) es una de las técnicas más comúnmente usadas en la obtención de compuestos fenólicos de fuentes vegetales<sup>49</sup>. Esta se puede definir como un fenómeno de transporte de materia en el que los sólidos contenidos en una matriz sólida migran hacia un disolvente puesto en contacto con la matriz. La eficiencia de la extracción es función de las condiciones del proceso; factores como la temperatura, la razón líquido-sólido, el tamaño de partícula y el tiempo de contacto afectan la concentración de los componentes deseados en el extracto<sup>50</sup>. La polaridad del disolvente de extracción juega también un papel importante en el proceso. Su escogencia dependerá principalmente de los fines analíticos de la investigación, ya que son en sí, la estructura química y la polaridad de los compuestos fenólicos los factores que determinan su extractabilidad y por lo tanto la eficiencia de los solventes de extracción<sup>51</sup>. Sin embargo, independientemente del tipo de disolventes que se utilicen, está siempre será incompleta y cierta cantidad de los analitos puede quedarse en los residuos vegetales. De esta manera, los compuestos fenólicos se pueden dividir también en *extraíbles*, como son aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos y, *no extraíbles*, los que quedan retenidos en los residuos resultante tras la extracción o que pueden quedar atrapados en la matriz vegetal inaccesibles a los disolventes<sup>52</sup>.

<sup>49</sup> IGNAT I. *et al.*, Op. Cit., p. 1826.

<sup>50</sup> IGNAT I. *et al.*, Op. Cit., p. 1827.

<sup>51</sup> RODRÍGUEZ-CARPENA J., *et al.*, Op. Cit., p. 5629.

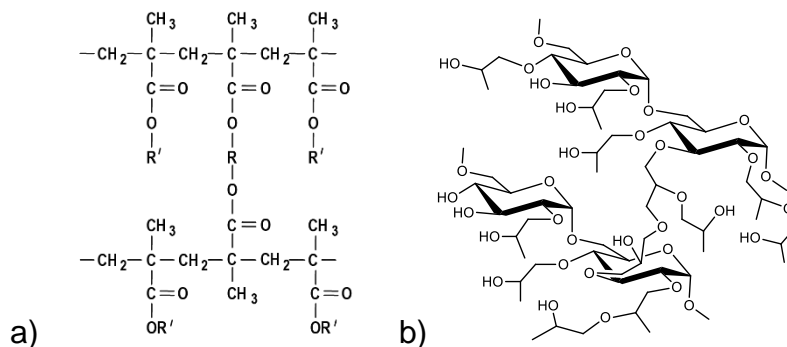
<sup>52</sup> ARRANZ S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis de doctorado. Universidad

### 2.1.3.2 Purificación y fraccionamiento

Los procesos de extracción implican la co-extracción de sustancias no fenólicas, como azúcares, sales, ácidos orgánicos, proteínas, grasas y clorofilas, que pueden interferir con los análisis posteriores y por lo tanto es necesario eliminarlos<sup>53</sup>. En el presente estudio la eliminación de interferentes presentes en los extractos vegetales se realizó por retención selectiva de los compuestos fenólicos sobre amberlita XAD-7, que como se muestra en la figura 6 presenta una estructura polimérica de éster acrílico de polaridad moderada<sup>54</sup>.

Adicionalmente, puesto que los extractos vegetales presentan una mezcla compleja de diferentes clases de compuestos fenólicos, para simplificar su composición, generalmente se realiza su fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular. En el presente estudio el fraccionamiento de los compuestos fenólicos se realizó empleando como fase estacionaria sephadex LH-20, la cual permite realizar su separación de acuerdo a su tamaño molecular y polaridad. Su estructura polimérica consiste en dextrano entrecruzado e hidroxipilado se muestra en la figura 8<sup>55</sup>.

Figura 8. Estructuras químicas de las resinas amberlita XAD-7 (a) y sephadex LH-20 (b).



Fuente: Adaptado de a) KUNIN R., 1991 y b) GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Dpto. Nutrición Y Bromatología. Madrid-España. 2010. p. 7.

<sup>53</sup> IGNAT I. *et al.* Analytical Methods of Phenolic Compounds. En: Natural Products. J.M. Mérillon (Eds.). 2013.

<sup>54</sup> KUNIN R. Polymeric Adsorbents. En: Ion Exchangers. New York. Konrad D. (Ed.) 1991. p. 661-677.

<sup>55</sup> SANTACRUZ L. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de maestría. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Química. 2011. p. 21.

### 2.1.3.3 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia de fase inversa (RP-HPLC) es el principal método utilizado para la separación de compuestos fenólicos de fuentes vegetales. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La fase estacionaria suele componerse de cadenas alquílicas hidrófobas, como C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub>, de las cuales la C<sub>18</sub> es ampliamente usada. Debido a su complejidad química y similitud, los polifenoles de las plantas, son generalmente identificados y cuantificados utilizando un gradiente de elución en lugar del modo isocrático, donde la fase móvil es generalmente un sistema binario de solventes. Por lo general, el gradiente de elución se lleva a cabo con agua acidificada (ácidos fosfórico, acético y fórmico) como el disolvente polar, y acetonitrilo y metanol como disolventes menos polares. Una pequeña cantidad de ácido se añade al sistema para suprimir la ionización de los polifenoles y grupos carboxílicos, lo que mejora ciertos parámetros tales como el tiempo de retención y resolución<sup>56</sup>.

El sistema de HPLC puede estar equipado con una amplia gama de detectores como de índice de refracción (FID), fluorescencia (FLD), arreglo de fotodiodos, UV-Vis (PAD) y espectrometría de masas (MS), los cuales se utilizan para el estudio cualitativo y cuantitativo de los compuestos fenólicos. La identificación de estos compuestos frecuentemente se realiza por comparación de tiempos de retención mediante el uso de patrones apropiados; o también por espectroscopia UV-Vis y espectrometría de masas, como en el presente estudio<sup>57, 58</sup>.

### 2.1.3.4 Análisis por espectroscopia UV-Vis

Todos los compuestos fenólicos presentan en sus estructuras sistemas aromáticos conjugados que absorben en las regiones ultravioleta y/o visible del espectro electromagnético. El detector de arreglo de fotodiodos (PAD) mide simultáneamente una amplia gama de longitudes de onda (por ejemplo, 200 a 500 nm), lo que permite obtener los espectros UV-Vis de compuestos fenólicos. Las diferentes subclases de compuestos fenólicos muestran los espectros UV-Vis característicos que se pueden utilizar para su clasificación inicial.

Los espectros UV-Vis de los flavonoides por ejemplo, se componen de absorciones que surgen de los anillos aromáticos A y B y sus posibles conjugaciones con al anillo C. Todos los flavonoides tienen un máximo de

---

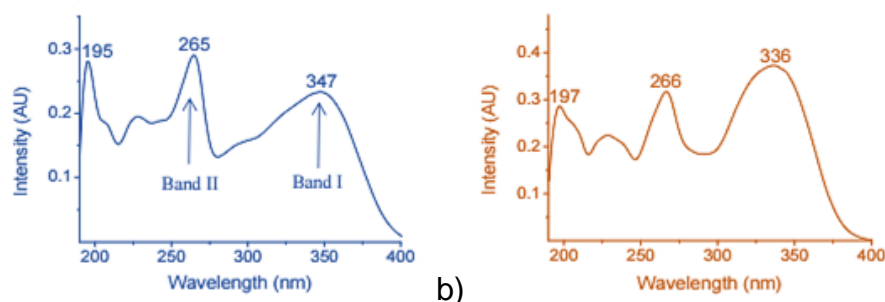
<sup>56</sup> HAMINIUK C., *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. En: International Journal of Food Science and Technology, 2012. vol. 47, p. 2023–2044.

<sup>57</sup> HAMINIUK C., *et al.*, Op. Cit., p. 2032.

<sup>58</sup> STEFOVA M., Stafilov T. y Kulevanova S. HPLC Analysis of Flavonoids. En: Encyclopedia of Chromatography. Skopje, Republic of Macedonia. Sts. Cyril and Methodius University. 2003.

absorción a alrededor de 240 a 290 nm (Banda II), el cual se ve afectado principalmente por la conjugación del anillo A y su patrón de sustitución; adicionalmente, algunos flavonoides presentan otra absorbancia máxima a alrededor de 300 a 550 nm (banda I), que es detectada en flavonoides donde los anillos B y C están conjugados. Este máximo de absorción está en torno a 460 a 560 nm para las antocianinas y entre 310 y 370 nm para flavonas y flavonoles, presentándose generalmente, a una longitud de onda más larga en flavonoles que en flavonas, lo cual puede ayudar a diferenciar entre estos dos tipos de flavonoides (figura 9). De manera general, las ubicaciones de las bandas de absorción I y II se ven afectadas por el número de grupos hidroxilo en los anillos A y B, así como por la glicosidación de los flavonoides. Adicionalmente, los grupos sustituyentes acilo en glicósidos pueden originar un máximo adicional en el espectro de UV-Vis. Por ejemplo, un sustituyente coumaroil produce un máximo de absorción adicional alrededor de 310 a 320 nm en el espectro UV-Vis de los glucósidos kaempferol y quercetina (figura 9)<sup>59</sup>.

Figura 9. Perfil UV-Vis característico de un flavonol: kaempferol hexosido (a) y de una flavona: apigenina glucurónido (b).



Fuente: Adaptado de VIHAKAS M., 2014.

### 2.1.3.5 Análisis por espectrometría de masas (MS)

De manera similar a los detectores de arreglo de fotodiodos (PAD), los espectrómetros de masas tienen un papel crucial en la detección y el análisis de los flavonoides y otros compuestos fenólicos. Si bien, los detectores PAD sólo detectan compuestos que presentan absorción en el rango UV-Vis, los espectrómetros de masas pueden detectar prácticamente todos los tipos de compuestos químicos que se ionizan en las condiciones de análisis utilizadas. Esta técnica analítica tiene un papel muy importante en los estudios estructurales de los compuestos polifenólicos. El principio consiste en la ionización química de compuestos para generar moléculas cargadas o fragmentos moleculares, que posteriormente se analizan en función de sus relaciones masa-carga ( $m/z$ ). Los espectrómetros de masas se dividen en diferentes grupos de acuerdo con sus

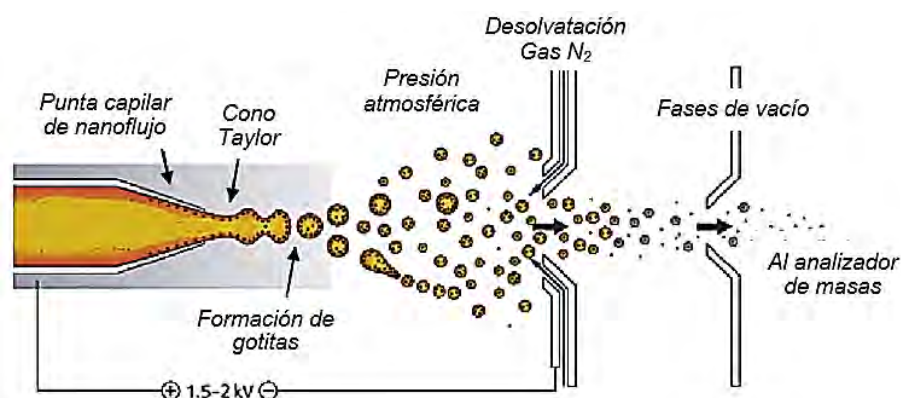
<sup>59</sup> VIHAKAS M. Flavonoids and other Phenolic Compounds: Characterization and Interactions with Lepidopteran and Sawfly Larvae. Tesis doctoral. Laboratorio de Química Orgánica y Química Biológica. 2014. Universidad de Turku. Finlandia. p. 14.



técnicas de ionización y analizadores de masas. Las principales fuentes de iones utilizadas para el análisis de polifenoles son: bombardeo con átomos rápidos (FAB), ionización por electrospray (ESI) y desorción-ionización laser asistida por matriz (MALDI). De otro lado, existen también varios analizadores de masas, tal como, trampa de iones (IT), triple cuadrupolo (TQ) y analizadores de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)<sup>60</sup>.

En el presente estudio la fuente de iones empleada fue la ionización electrospray (ESI), la cual funciona como una interface entre el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas. El mecanismo de esta técnica de ionización se esquematiza en la figura 10:

Figura 10: Mecanismo de la ionización electrospray (ESI).



Fuente: Adaptado de Santacruz L., 2011.

Como se observa en la figura 7, en ESI las moléculas del solvente y el analito se rocían a través de una aguja que se mantiene a un alto potencial, lo cual provoca la formación de gotitas cargadas que se mueven hacia la entrada del espectrómetro de masas. A continuación, estas gotitas se reducen por el flujo de gas de secado que evapora el disolvente; y finalmente, la repulsión de cargas positivas o negativas las rompe hasta que los iones se forman a partir de las moléculas de analito (figura 10). Esta es una técnica de ionización suave, útil para un amplio rango de moléculas; sin embargo su aplicación más importante radica en el análisis de compuestos de alto peso molecular, termolábiles y de alta polaridad<sup>61</sup>.

#### 2.1.4 Análisis del contenido fenólico por el método de Folin Ciocalteu

Uno de los métodos usado comúnmente para cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales es el de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la

<sup>60</sup> PRASAIN J. *et al.* Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. En: Free Radical Biology & Medicine, 2004. vol. 37, no 9, p. 1324–1350.

<sup>61</sup> VIHAKAS M., Op. Cit., p. 17.

capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. A continuación, a un pH básico se da la transferencia electrónica que reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), cuantificables espectrofotométricamente a una longitud de onda de aproximadamente 765 nm<sup>62</sup>.

### 2.1.5 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y su determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los antioxidantes son moléculas capaces de inactivar los radicales libres y su acción, de tal manera que inhiben la oxidación de otras moléculas. Uno de los grupos más conocidos de compuestos antioxidantes en la literatura científica son los compuestos fenólicos<sup>63</sup>. En general, el potencial antioxidante de los polifenoles depende de algunos factores como: el potencial quelante de metales que está fuertemente relacionado con el arreglo de los grupos hidroxilo y carbonilo alrededor de la molécula, la presencia sustituyentes donantes de átomos de hidrógeno o electrones capaces de reducir radicales libres y su habilidad para deslocalizar el electrón desapareado mediante la formación de un radical fenoxilo estable como se muestra en la figura 11<sup>64</sup>.

Para estimar el poder antioxidante de los diferentes polifenoles aislados de diversas fuentes naturales, se han desarrollado diferentes métodos experimentales (*In vitro*). Todos estos basados principalmente en la generación de un radical libre el cual es sometido a la acción del antioxidante. La muestra añadida inhibe la generación de estos radicales, que usualmente presentan absorbancias significativas en la región visible del espectro lo que permite estimar la disminución en su concentración por métodos espectroscópicos<sup>65</sup>. Actualmente existen varios métodos de este tipo; sin embargo, a continuación se describe los ensayos a empleados en el presente estudio:

Figura 11: Mecanismo antioxidante fenólico, estabilización por resonancia.

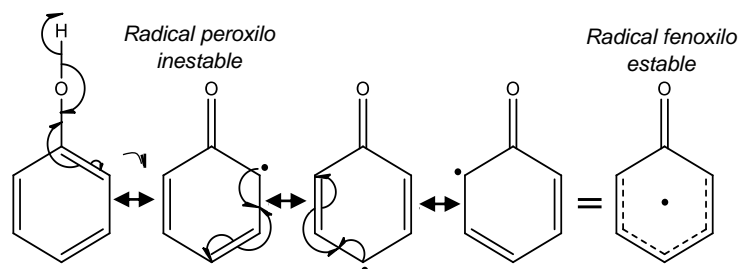
---

<sup>62</sup> MORILLAS-Ruiz J. y Delgado-Alarcon J. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. En: Nutrición clínica y dietética hospitalaria, 2012. vol. 32, p. 8-20.

<sup>63</sup> CRAFT B. *et al.* Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. En: Food Science and Food Safety, 2012. vol. 11, p. 148-173.

<sup>64</sup> RICE-EVANS C. *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds. En: Trends in plants science, 1997. vol. 2, no. 4, p. 152-159.

<sup>65</sup> GÜLÇİN I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. En: Archives of Toxicology, 2012. vol. 86, p. 345–391.

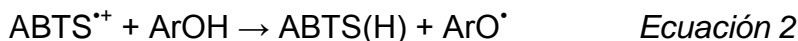
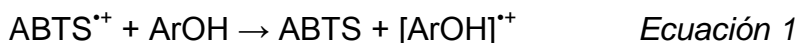


Fuente: Adaptado de CRAFT B. *et al.*, 2012.

### 2.1.5.1 Método TEAC o de capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Este método se basa en la formación del catión radical libre  $ABTS^{*+}$  y su reducción por la acción del extracto antioxidante a analizar (figura 12). En el presente estudio este radical se generó a partir del cromóforo ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) mediante reacción química con persulfato de potasio; sin embargo esta reacción también puede ser de tipo enzimático o electroquímico. Una vez generado el radical  $ABTS^{*+}$ , este pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a diferentes longitudes de onda, entre las cuales la de 734 nm es empleada para su detección. El uso de este radical permite determinar el potencial antioxidante de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos; además, al presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja, reduce posibles interferencias de compuestos coloreados, como las antocianinas, que absorben en la región del visible<sup>66</sup>.

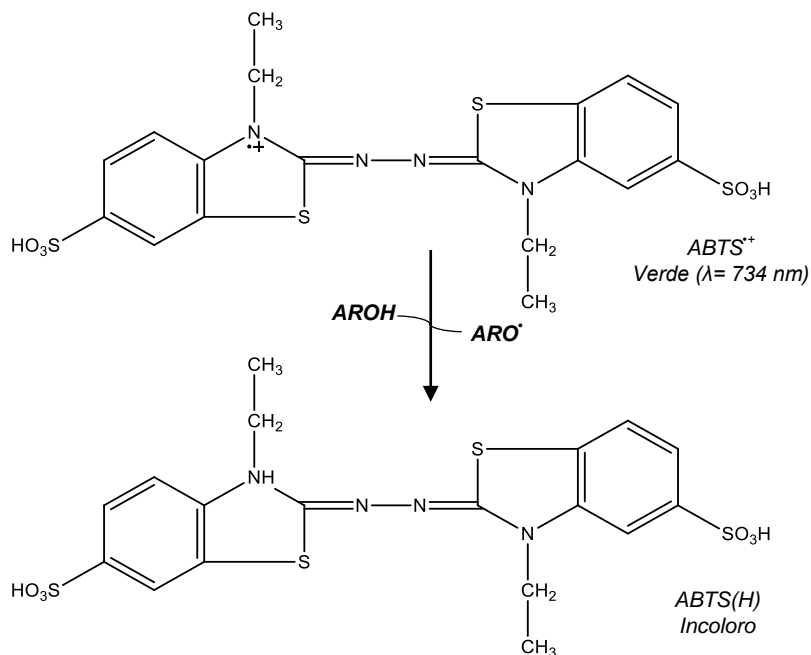
El mecanismo antioxidante generalmente aceptado, entre el catión-radical  $ABTS^{*+}$  y los compuestos fenólicos antioxidantes (ArOH), es a través de una transferencia electrónica (Ecuación 1); sin embargo, el catión radical  $ABTS^{*+}$  podría también ser neutralizado por transferencia de un átomo de hidrógeno (Ecuación 2), como se representa en las siguientes ecuaciones químicas respectivamente<sup>67</sup>:



<sup>66</sup> KUSKOSKI M. Asuero A., Troncoso A., Mancini-filho J. y Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *En: Ciencia e Tecnología de Alimentos*, 2005. vol. 25, no 4, p. 726-732.

<sup>67</sup> CRAFT B. *et al.*, Op. Cit., p. 166.

Figura 12: Reacción antioxidante del radical catión ABTS ensayo TEAC<sup>68</sup>.



Fuente: Adaptado de CRAFT B. *et al.*, 2012.

### 2.1.5.2 Método DPPH o de actividad anti-radical contra DPPH<sup>•</sup>

Este método se basa en la reducción del radical DPPH<sup>•</sup> (1,1'-difeníl-1-picrilhidrazilo) por los antioxidantes de la muestra (figura 13). El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se somete al efecto de sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a una  $\lambda$  de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH<sup>69</sup>.

<sup>68</sup> Ibid., p. 167-168.

<sup>69</sup> SANTACRUZ L. Op. Cit., p. 32.

Al contrario que para el ensayo TEAC, para el ensayo DPPH el mecanismo antioxidante generalmente aceptado es a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Ecuación 3); sin embargo, también se considera que sea posible a través de una transferencia electrónica (Ecuación 4), como se representa en las siguientes ecuaciones químicas<sup>70</sup>:

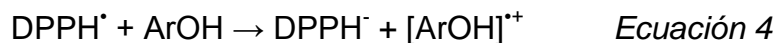
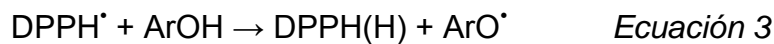
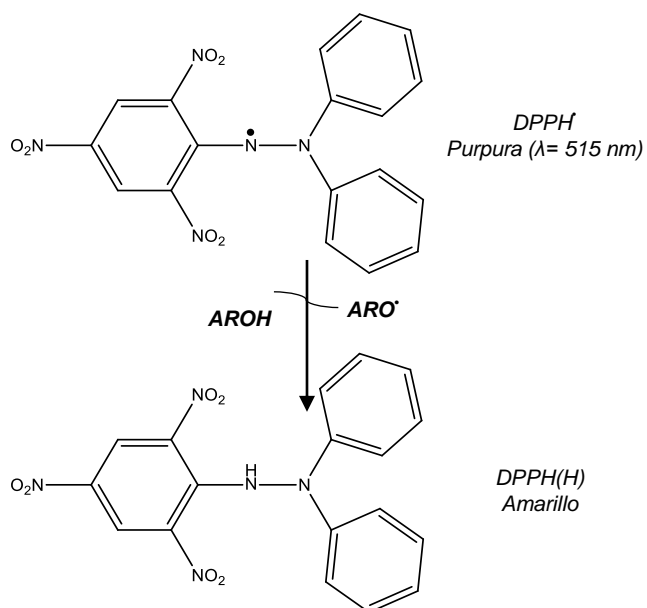


Figura 13: Reacción antioxidante ensayo DPPH.



Fuente: Adaptado de CRAFT B. *et al.*, 2012.

<sup>70</sup> CRAFT B. *et al.*, Op. Cit., p. 166-167.

## 2.2 ANTECEDENTES.

Gran parte de las investigaciones relacionadas con la composición polifenólica del aguacate se han realizado principalmente con el fin de estudiar la reacción de pardeamiento enzimático que ocurre en la pulpa, la cual es de gran relevancia comercial y económica en la industria de este fruto. Los estudios realizados en relación a la composición y actividad antioxidante *in vitro* de la fracción polifenólica de la semilla y epicarpio del aguacate son relativamente bajos, limitándose a un número reducido de variedades del fruto. Entre las variedades de aguacate cultivadas en Colombia, los estudios de este tipo reportados en la literatura científica, son prácticamente nulos.

A continuación, se describe los estudios más sobresalientes en relación a los compuestos fenólicos y actividad antioxidante del aguacate.

Entre las primeras investigaciones realizadas en aguacate, se encuentran las desarrolladas por Ramírez- Martínez y Luh en 1973<sup>71</sup>, y por otro lado por Golan, Kahn y Sadovski en 1977<sup>72</sup>, donde mediante cromatografía de papel y cromatografía en capa fina (TLC) estudiaron los compuestos fenólicos presentes en el mesocarpio (pulpa) de aguacate (variedad Lerman, y variedades Lerman y Fuerte respectivamente); y basándose en los respectivos valores de R<sub>f</sub>, espectros de absorción, reacciones de color y comportamiento fluorescente característicos, identificaron diferentes compuestos fenólicos, como: isómeros de ácido clorogénico y ácido *p*-cumarilquinico, catequinas, leucoantocianidinas, isoflavona y ácidos cafeico y *p*-cumárico. Adicionalmente, estos últimos autores encontraron que el desarrollo de la reacción de pardeamiento en la pulpa de aguacate, se encuentra directamente relacionado con el contenido fenólico total y con la actividad de la enzima polifenol oxidasa.

---

<sup>71</sup> RAMÍREZ-MARTÍNEZ J. R. y Luh B. S. Phenolic compounds in frozen avocados. Citado en: Golan A., Kahn V. y Sadovski A. Y. Relationship between Polyphenols and Browning in Avocado Mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman Cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. vol. 25, no. 6, p. 1253-1259.

<sup>72</sup> GOLAN A., Kahn V. y Sadovski A. Y. Relationship between Polyphenols and Browning in Avocado Mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman Cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. vol. 25, no. 6, p. 1253-1259.

Posteriormente, con el objetivo similar de estudiar los compuestos fenólicos y su oxidación endógena, en 1980, Prabha y Patwardhan<sup>73</sup> incluyeron en su investigación otros tejidos vegetales como la semilla, la cubierta seminal y el epicarpio del fruto; y mediante cromatografía de papel identificaron compuestos como los mencionados previamente, encontrando que la (+)-catequina y (-)-picatequina eran los principales sustratos implicados en las reacciones de pardeamiento enzimático en todos los tejidos de aguacate.

En investigaciones posteriores (1987), Torres A. M., Mau-Lastovicka T. y Rezaaiyan R.<sup>74</sup> estudiaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) los ácidos fenólicos presentes en las hojas, mesocarpio y semilla de aguacate de diferentes variedades (Hass, Duke, Fuerte y Gwen), logrando identificar 16 ácidos diferentes, como los ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico, y siríngico, derivados del ácido benzoico; y los ácidos ferúlico, sinápico, cafeico y *p*-cumárico, derivados del ácido cinámico. Adicionalmente, estudiaron el contenido fenólico total, encontrando concentraciones más altas en la semilla y concentraciones más bajas en el mesocarpio de los frutos.

Más adelante, en relación a los cambios ocurridos durante la maduración de los frutos, en 1992, Cuttig *et al.*<sup>75</sup> encontraron que el contenido fenólico total en el mesocarpio de aguacate (variedad Fuerte) aumenta con el incremento de la madurez del fruto. Por otra parte, en 2004, Cox *et al.*<sup>76</sup> estudiaron la coloración del epicarpio y los cambios en la pigmentación durante la maduración del aguacate variedad Hass, encontrando que durante este proceso existe una disminución inicial en el contenido de clorofila, seguida de un aumento en la concentración de antocianinas totales, en particular de la cianidina 3-O-glucósido, lo que resulta en el color morado oscuro del fruto.

En relación al estudio de la actividad antioxidante del aguacate, en 2006, Terasawa N., Sakakibara M. y Murata M.<sup>77</sup> encontraron que la actividad captadora

---

<sup>73</sup> PRABHA, T. N. y Patwardhan, M. V. Polyphenols of avocado (*Persea americana*) and their endogenous oxidation. Citado en: Donetti, M., Postharvest biochemical and physiological characterization of imported avocado fruit. Tesis de grado (Doctor Ciencias de la Poscosecha). Reino Unido. Universidad Cranfield, Laboratorio en ciencias de las plantas. 2011. p. 7-28.

<sup>74</sup> TORRES A. M., Mau-Lastovicka T. y Rezaaiyan R. Total Phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of Phenolic Acids of Avocado. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987. vol. 35, no. 6, p. 921-925.

<sup>75</sup> CUTTING J. G. M., Wolstenholme B. N. y Hardy J. Increasing relative maturity alters the base mineral composition and phenolic concentration in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. En: South African Avocado Growers' Association Yearbook, 1992. vol. 15, p. 64-67.

<sup>76</sup> COX K. A. *et al.* Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. En: Postharvest Biology and Technology, 2004. vol. 31, p. 287-294.

<sup>77</sup> TERASAWA N., Sakakibara M. y Murata M. Antioxidative Activity of Avocado Epicarp Hot Water Extract. En: Food Science and Technology Research, 2006. vol. 12, no. 1, p. 55-58.

de radicales libres (DPPH') del extracto del epicarpio de aguacate es aproximadamente dos veces superior que las del  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico. Además, encontraron que esta se mantuvo sustancialmente después de un tratamiento térmico a 180°C durante 60 minutos. Finalmente, mediante cromatografía líquida (HPLC) identificaron flavonoides como (+)-catequina y (-)-epicatequina, de los cuales se encontró que esta última contribuyó en un porcentaje importante en la actividad antioxidante total determinada.

En investigaciones más recientes (2010), Wang W., Bostic T. y Gu L.<sup>78</sup> estudiaron mediante los ensayos ORAC y DPPH, la capacidad antioxidante *in vitro*, y mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-ESI--MS<sup>n</sup>) y detector de fluorescencia (FLD), el contenido de procianidinas de la pulpa, semilla y epicarpio de aguacate de siete diferentes variedades (Slimcado, Booth 7, Booth 8, Choquette, Loretta, Simmonds y Tonnage), encontrando que la semilla presentó la mayor capacidad antioxidante, contenido fenólico total y de procianidinas. Estos investigadores sugirieron además, que las procianidinas son los principales compuestos fenólicos que contribuyen a la capacidad antioxidante del fruto. Más adelante (2011), en relación a este tipo de polifenoles, autores como Chávez *et al.*<sup>79</sup> encontraron que el extracto del epicarpio de aguacate (Variedad Hass) rico en procianidinas, derivadas de la (-)-epicatequina, mostró una actividad inhibitoria contra la ureasa de *H. pylori*, una bacteria relacionada con el desarrollo de afecciones gástricas severas, como úlceras pépticas y adenocarcinoma gástrico.

En investigaciones sucesivas (2011), Rodríguez-Carpena *et al.*<sup>80</sup> estudiaron mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) con detectores de arreglo de fotodiodos (PAD), de fluorescencia (FLD) y espectrometría de masas (MS), la composición polifenólica de diferentes extractos de la semilla, pulpa y epicarpio de aguacate (variedades Hass y Fuerte) obtenidos con tres solventes diferentes como: acetato de etilo, acetona 70% y metanol 70%; encontrando que el epicarpio y semilla de aguacate eran ricos en catequinas, procianidinas y ácidos hidroxicinámicos; mientras que la pulpa fue particularmente rica en ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y procianidinas. Adicionalmente, mediante los ensayos CUPRAC, DPPH y ABTS determinaron la capacidad antioxidante *in vitro* de dichos extractos, encontrando que los extractos obtenidos de la semilla y epicarpio presentaron los valores más altos.

---

<sup>78</sup> WANG W., Bostic T. y Gu L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *En*: Food Chemistry. Marzo, 2010. vol. 122, p. 1193–1198.

<sup>79</sup> CHÁVEZ F. *et al.* Los polifenoles antioxidantes del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *En*: Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2011. vol. 10, p. 265-280.

<sup>80</sup> RODRÍGUEZ-CARPENA J.-G., *et al.* Op. Cit., p. 5625–5635.



En este mismo año, Hurtado *et al.*<sup>81</sup> desarrollaron un potente método para la determinación de metabolitos fenólicos de aguacate. Los autores estudiaron la pulpa de tres variedades de aguacate (Hass, Lamb-Hass y Rugoro); y mediante cromatografía líquida (HPLC) con detectores UV-Vis y espectrometría de masas (ESI-MS), además del uso de diferentes estándares lograron identificar inequívocamente 17 compuestos; y alrededor de 25 analitos fueron identificados tentativamente a partir de la información isotópica.

Posteriormente, en 2012, en investigaciones similares, Kosińska *et al.*<sup>82</sup> estudiaron mediante cromatografía líquida (HPLC-PAD) y espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS) los perfiles fenólicos de los extractos metanólicos de la semilla y epicarpio de aguacate (variedades Hass y Shepard); evaluando además su contenido fenólico total y actividad antioxidante *in vitro* por los ensayos ABTS, DPPH, ORAC y FRAP. En concordancia con investigaciones previas, encontraron que los extractos estudiados contenían cuatro clases de polifenoles, como son: monómeros flavanol, proantocianidinas, ácidos hidroxicinámicos y glicósidos flavanol. Adicionalmente, encontraron que los extractos de la semilla presentaron los valores más altos tanto en contenido fenólico como actividad antioxidante *in vitro*.

Más adelante, en este mismo año, en relación al estudio de las propiedades antioxidantes de los extractos de aguacate, autores como Rodríguez-Carpena *et al.*<sup>83</sup> investigaron la inhibición de la formación de productos de oxidación del colesterol (COPs) en productos cárnicos derivados de carne de cerdo, mediante la adición de extractos ricos en polifenoles del epicarpio de aguacate (variedad Hass). Estos autores encontraron una reducción significativa en la formación de 7-ceto-colesteroles y una inhibición total en la formación de epoxi-colesteroles nocivos durante la cocción de dichos productos cárnicos.

En el año 2013, Contreras-Gutiérrez *et al.*<sup>84</sup> mediante electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-ESI-MS) determinaron los cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil metabólico de aguacate (variedad Reed) durante el proceso de maduración del fruto. Estos autores cuantificaron 10

---

<sup>81</sup> HURTADO-FERNÁNDEZ E. *et al.* Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS Method for the Determination of Phenolic Metabolites from Avocado (*Persea americana*). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 59, p. 2255–2267.

<sup>82</sup> KOSIŃSKA A. *et al.* Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60. p. 4613–4619.

<sup>83</sup> RODRÍGUEZ-CARPENA J.-G. *et al.* Inhibition of Cholesterol Oxidation Products (COPs) Formation in Emulsified Porcine Patties by Phenolic-Rich Avocado (*Persea americana* Mill.) Extracts. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60, p. 2224–2230.

<sup>84</sup> CONTRERAS-GUTIÉRREZ P. *et al.* Determination of changes in the metabolic profile of avocado fruits (*Persea americana*) by two CE-MS approaches (targeted and non-targeted). En: Electrophoresis, 2013. vol. 34, p. 2928–2942.

metabolitos, como ácidos fenólicos, flavonoides, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas y fitohormonas; en muestras de aguacate (mesocarpio) en diferentes estados de maduración; los resultados obtenidos indicaron que compuestos como perseitol, los ácidos quínico, clorogénico, trans-cinámico, pantoténico y abscísico, así como (-)-epicatequina y (+)-catequina disminuyeron su concentración durante el proceso de maduración; mientras que los ácidos ferúlico y *p*-cumárico incrementaron. En una investigación posterior, estos mismos autores desarrollaron un método de electroforesis capilar con detección UV (CE-UV), mediante el cual detectaron y cuantificaron los ácidos fenólicos presentes en 13 variedades de aguacate, en dos estados de madurez (madurez de cosecha y de consumo). El estudio realizado indicó que los ácidos trans-cinámico, *p*-cumárico y protocatéquico estuvieron presentes todas las muestras, en los dos estados de maduración; y otros compuestos, como los ácidos benzoico y ferúlico, se observaron en al menos uno de los estados de madurez; por ejemplo, el ácido ferúlico estuvo presente en el estado de madurez de consumo de todas las variedades<sup>85</sup>.

Posteriormente, en el año 2015 Chai *et al.*<sup>86</sup> estudiaron las proantocianidinas de la pulpa de aguacate (variedad Hass) mediante las técnicas como espectrometría de masas con ionización MALDI y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y analizador QTRAP (HPLC-ESI-QTRAP MS). Estos autores encontraron que dichas proantocianidinas consistían en homo- y heteropolímeros de procianidinas, prodelphinidinas, propelargonidinas y galato de procianidina. Adicionalmente, encontraron que estas proantocianidinas extraídas de aguacate resultaron ser un potente agente anti-tirosinasa (o anti-polifenol oxidasa), la cual es una enzima que juega un papel crítico en las reacciones de pardeamiento de los alimentos.

En este mismo año, Calderón-Oliver *et al.*<sup>87</sup> estudiaron la optimización de la mezcla de aditivos naturales, como los extractos polifenólicos de la semilla y epicarpio de aguacate (Variedad Hass) y nisina (un péptido antimicrobiano), con el fin de maximizar la actividad antioxidante y el efecto antimicrobiano contra bacterias transmitidas por los alimentos, tales como la listeria. Durante la optimización, encontraron que la mayor contribución en la respuesta antioxidante se debía al extracto del epicarpio de aguacate; y respecto a la respuesta

---

<sup>85</sup> HURTADO-FERNÁNDEZ E. *et al.* Merging a sensitive capillary electrophoresis–ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. *En*: Food Chemistry, 2013. vol. 141, p. 3492–3503.

<sup>86</sup> CHAI W.-M. *et al.* Avocado Proanthocyanidins as a Source of Tyrosinase Inhibitors: Structure Characterization, Inhibitory Activity, and Mechanism. *En*: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. vol. 63., p. 7381–7387.

<sup>87</sup> CALDERÓN-OLIVER M. *et al.* Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *En*: Food Science and Technology, 2015. vol 65, p. 46-52.

antimicrobiana, observaron un efecto sinérgico en las mezclas de los extractos de la semilla y epicarpio de aguacate con nisina.

Finalmente, en el año en curso (2016), López-Cobo *et al.* mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF- MS estudiaron las diferencias entre los perfiles polifenólicos de la pulpa, semilla y epicarpio de aguacate, en dos estados de madurez: muy maduro y óptimo para consumo. Estos autores encontraron que los compuestos fenólicos identificados en la semilla y la pulpa del fruto presentaron una concentración más alta en el estado de madurez mayor. Además, mediante HPLC-FLD-MS estudiaron de manera específica los flavan-3-oles presentes en el fruto. De esta manera, se cuantificó por primera vez procianidinas con un grado de polimerización de 13; y se encontró que la concentración de este tipo de compuestos aumenta con la madurez del fruto, probablemente debido a la liberación de taninos vinculados a las estructuras de pared celular<sup>88</sup>.

---

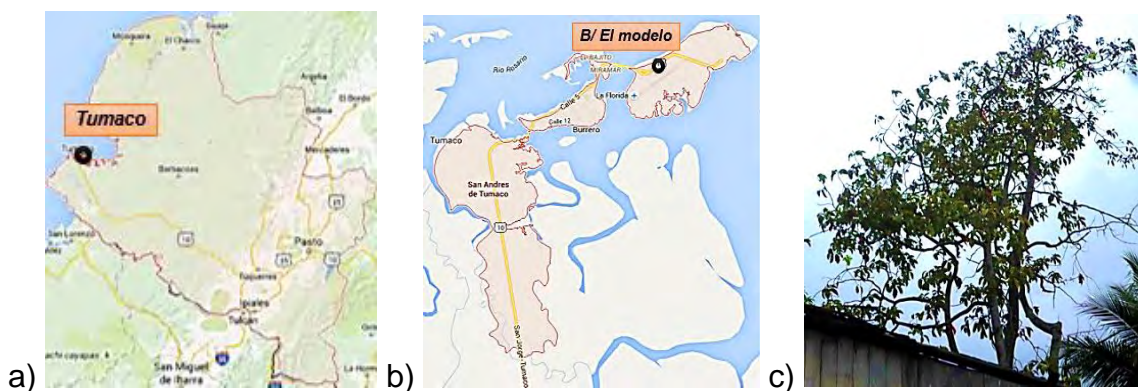
<sup>88</sup> LÓPEZ-COBO A. *et al.* HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. En: Food Science and Technology, 2016. vol. 73., p. 505-513.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MUESTREO, CARACTERIZACIÓN DE LOS FRUTOS Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal objeto de este estudio fue obtenido en el municipio de Tumaco. Los frutos se seleccionaron de manera aleatoria de la producción total de un árbol de aguacate ubicado en el barrio El modelo (con las siguientes coordenadas geográficas: 1.818284,-78.749113). La selección del punto de muestreo se debió a la difícil consecución de un cultivo de aguacate de la variedad de interés investigativo (figura 14). Una muestra del material vegetal reposa en el Herbario de la Universidad de Nariño y en el Herbario de la Universidad Nacional (sede Bogotá), lugar donde se realizó su clasificación taxonómica.

Figura 14. a) Municipio de Tumaco en el Dpto. de Nariño, b) lugar de muestreo en el municipio de Tumaco y c) árbol de aguacate (Tumaco).



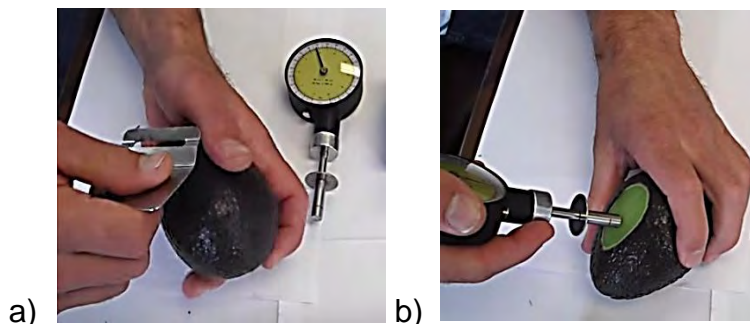
Fuente: Esta investigación.

Los frutos se recolectaron en su estado de madurez fisiológica; es decir, con un desarrollo adecuado para su cosecha<sup>89</sup>. Posteriormente, se dejó que alcanzaran el estado de madurez de consumo en un lugar seco, protegidos de la luz y a temperatura ambiente; por un periodo de una semana aproximadamente. Finalmente, se lavaron, secaron y pesaron.

<sup>89</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana 5209: Frutas frescas. Aguacate y variedades mejoradas, especificaciones. Bogotá D.C., 2003, p. 8.

Con el fin de determinar el estado de madurez de los frutos, se utilizó como parámetro la pérdida de la firmeza de la pulpa, que de acuerdo a la literatura, es uno de los principales indicadores del proceso de maduración del aguacate<sup>90,91</sup>. Adicionalmente, para una estimación más objetiva, al finalizar el proceso de maduración se determinó la firmeza de la pulpa de cada uno de los frutos objeto de estudio, para lo cual se empleó un penetrómetro manual equipado con un puntal de 5 mm de diámetro. Se realizaron tres mediciones, en tres puntos diferentes sobre la parte ecuatorial de cada fruto, retirando el epicarpio en la zona de medida como se muestra en la figura 15<sup>92,93</sup>. El valor de firmeza promedio estimado se expresó en Newtons (N), para el cálculo se empleó la siguiente relación matemática<sup>94</sup>:  $Fuerza (N) = fuerza (Kg-f) \times 9,807$ .

Figura 15. a) Penetrómetro y lámina de corte y b) medida de la firmeza de la pulpa de aguacate.



Fuente: Avocado penetrometer, [video online] [Citado el 8 de Julio de 2015] Disponible en: <[https://www.youtube.com/watch?v=Tab86M\\_flYw](https://www.youtube.com/watch?v=Tab86M_flYw)>.

Posteriormente para iniciar el proceso de extracción se separó manualmente la semilla y epicarpio de la pulpa del fruto (figura 16); luego, justo antes de iniciar este proceso se retiró la cubierta de la semilla o endocarpio. Esto último con el fin de minimizar su exposición al aire y la luz. Finalmente se pesaron independientemente las dos fracciones (cáscara y semilla).

<sup>90</sup> MÁRQUEZ C. et al. Cambios físico-químicos del aguacate (*Persea americana* Mill. cv. "Hass") en poscosecha para dos municipios de Antioquia. En: Temas Agrarios, 2014. vol. 19, no 1, p. 32-47.

<sup>91</sup> BOWER J. P. y Cutting J. G. Avocado fruit development and ripening physiology. En: Horticultural Reviews, 1988. vol. 10, p. 229-271.

<sup>92</sup> MITCHAM B. et al. Methods for Determining Quality of Fresh Commodities. En: Perishables Handling Newsletter, 1996. vol. 85., p. 2-4.

<sup>93</sup> FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Measurement of fruit firmness using a penetrometer. En: Horticultural Chain Management For Eastern and Southern Africa. A practical Manual [Libro Online]. Londres, Jane Lanigan, 2008. p. 18.

<sup>94</sup> MITCHAM B., Op. cit., p. 3.

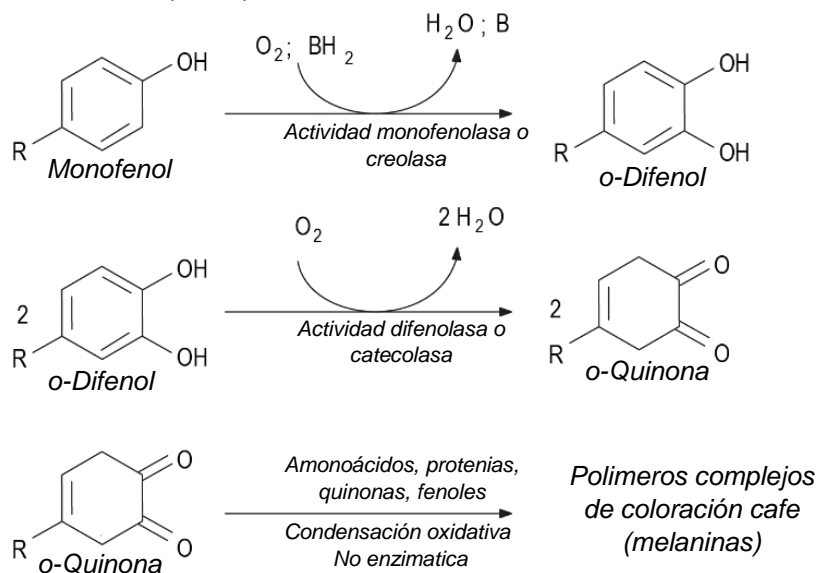
Figura 16. a) Epicarpio, b) semilla con cubierta y c) semilla de aguacate sin cubierta.



Fuente: Esta investigación.

Debido a que los compuestos fenólicos pueden sufrir transformaciones de tipo oxidativo, durante todos los procesos analíticos descritos a continuación se minimizó la influencia del aire y la luz<sup>95</sup>. En los tejidos vegetales las reacciones degradativas pueden ser catalizadas por enzimas como la polifenol oxidasa (PPO), generando una coloración marrón en la superficie de los mismos. Esto debido a la acción de la enzima PPO que cataliza la oxidación de mono-fenoles y *orto*-difenoles a benzoquinonas que posteriormente se polimerizan (en reacciones no catalizadas enzimáticamente) a complejos de color marrón denominados melaninas<sup>96</sup>, como se muestra en la figura 17.

Figura 17. Reacción general de la oxidación de sustratos fenólicos por acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO).



<sup>95</sup> MOURI C., Mozaffarian V., Zhang X. y Laursen R. Characterization of flavonols in plants used for textile dyeing and the significance of flavonol conjugates. En: Dyes and Pigments, 2014. vol. 100, p. 135-141.

<sup>96</sup> YORUK R. y Marshall M. physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. En: Journal of Food Biochemistry, 2003. vol. 27, p. 361-422.

Fuente: YORUK R.y Marshall M., 2003.

Adicionalmente, en los diferentes procesos analíticos realizados se tuvieron en cuenta factores como el pH y la temperatura, que también pueden influir en la estabilidad química de los polifenoles estudiados. Durante el proceso de extracción por ejemplo, únicamente se emplearon condiciones de pH ácido (3-4) y temperaturas relativamente bajas (15-45 °C), en las cuales este tipo de compuestos presentan una mayor estabilidad<sup>97</sup>.

## 3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE AGUACATE

La obtención de los extractos ricos en polifenoles (ERP) de la semilla y epicarpio de aguacate se realizó en dos etapas; inicialmente la maceración química de los tejidos vegetales de interés y posteriormente la retención selectiva de los compuestos polifenólicos sobre amberlita XAD-7. A continuación, se describe cada una de estas etapas:

### 3.2.1 Maceración química de los tejidos vegetales.

Mediante maceración química de la semilla y epicarpio de aguacate se obtuvieron dos extractos crudos: EC-Semilla y EC-Epicarpio. Este proceso consistió en dejar el material vegetal en contacto con el solvente de extracción (metanol-ácido acético,19:1) por un periodo de 20 horas a temperatura ambiente (~18 °C) la proporción material vegetal / solvente fue de 0,5 g / mL. Adicionalmente, con el fin de incrementar el área de contacto entre el material vegetal y el solvente de extracción, tanto la semilla como el epicarpio de los frutos se dividieron manualmente en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>. Como se mencionó anteriormente, para reducir al mínimo el tiempo de exposición directa del material vegetal al aire y la luz, su división se realizó sobre el solvente de extracción. Esto principalmente en el caso de la semilla, donde se observó que durante su división pueden desarrollarse rápidamente reacciones de tipo oxidativo, evidenciadas por la aparición progresiva de una coloración marrón sobre su superficie (pardeamiento). Una vez el material vegetal estuvo en contacto con el solvente de extracción, se observó que el pardeamiento de la semilla disminuyó significativamente (Figura 18, a), probablemente debido a que la enzima polifenol oxidasa (PPO) que cataliza este tipo de reacciones, disminuyó su actividad al encontrarse en un pH muy ácido (<3), como se ha publicado en algunos estudios<sup>98,99</sup>.

---

<sup>97</sup> FRIEDMAN M.y Jürgens H. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. En: Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000. vol. 48, no. 6, p. 2101–2110.

<sup>98</sup> DOS SANTOS T. *et. al.* Experimental and Modelling Study of Enzymatic Oxidation of 5-o-Caffeoylquinic Acid by Polyphenol Oxidases. En: Food Technol. Biotechnol, 2010. vol. 48, no. 4, p. 548–553.

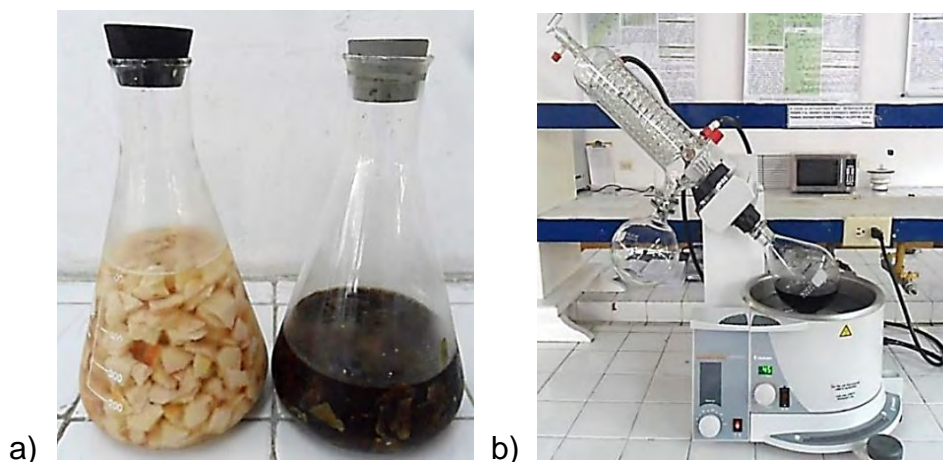
<sup>99</sup> GÓMEZ V. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. En: Food Chemistry, 2002. vol. 77, p. 163–169.

Sin embargo, dada la relevancia de las transformaciones de tipo oxidativo en el estudio de los compuestos fenólicos de interés, se evaluó de forma preliminar el efecto que tienen las reacciones que conducen al pardeamiento de la semilla en los extractos, sobre el perfil polifenólico, contenido fenólico total y actividad antioxidante *in vitro*. Así, bajo las mismas condiciones de extracción, se obtuvo el extracto fenólico crudo de cierta cantidad semilla (EC-Semilla EA) dividida y expuesta directamente al aire y luz por una hora (figura 18, c).

Todos los extractos crudos (EC) obtenidos previamente, se sometieron a los diferentes procesos analíticos descritos a continuación, exceptuando el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular para el EC de semilla expuesta al aire.

Una vez transcurrido el tiempo de maceración química (20 horas), se retiró el material vegetal mediante filtración por gravedad (empleando papel filtro cuantitativo). Los extractos metanólicos crudos se concentraron en un rotavapor a 45 °C (figura 18, b) y luego, se llevaron a sequedad en plancha de calentamiento a una temperatura de 45 °C. Finalmente, se pesó cada extracto sólido obtenido y se almacenaron adecuadamente en refrigeración, a una temperatura aproximada de 4 a 5 °C.

Figura 18: a) Maceración química de la semilla y epicarpio de aguacate, b) concentración de los extractos por rotaevaporación c) pardeamiento de la semilla de aguacate expuesta al aire y luz por una hora.







c)

Fuente: Esta investigación.

### 3.2.2 Retención selectiva de los compuestos polifenólicos sobre amberlita XAD-7.

Los diferentes extractos crudos de la semilla (EC-Semilla y EC-Semilla EA) y epicarpio (EC-Epicarpio) se sometieron a retención selectiva sobre amberlita XAD-7. En este proceso los compuestos polifenólicos de interés se retienen en la resina y se eliminan otros fitocomponentes co-extraídos durante la maceración química; tales como azúcares, aminoácidos, proteínas entre otros. Inicialmente, se disolvió una cantidad determinada de cada extracto crudo en un volumen mínimo de agua destilada y esta solución se cargó sobre la columna XAD-7 (de dimensiones: 28,0 cm x 1,7 cm) (ver figura 19, a). Luego, se realizaron lavados con abundante agua destilada, en cada lavado se determinó los grados Brix con el fin de verificar la eliminación de azúcares. Finalmente, se realizó la elución de los extractos enriquecidos en polifenoles empleando como solvente metanol-ácido acético (19:1, v/v). Estos extractos metanólicos se concentraron nuevamente en un rotavapor a una temperatura de 45 °C, se llevaron a sequedad en plancha de calentamiento a una temperatura de 45 °C y se almacenaron adecuadamente en refrigeración, a una temperatura aproximada de 4 a 5 °C.

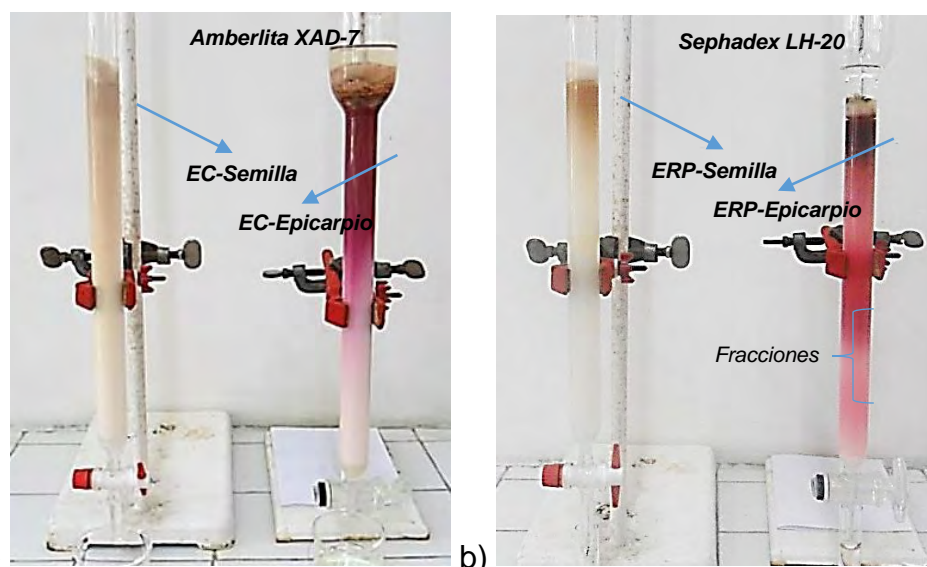
### 3.3 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE AGUACATE POR CROMATOLOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Con el fin de simplificar la composición los extractos ricos en polifenoles de la semilla (ERP-Semilla) y epicarpio (ERP-Epicarpio) de aguacate éstos se fraccionaron por cromatografía en columna de exclusión molecular. Las condiciones del fraccionamiento cromatográfico (definidas en estudios preliminares), se describen a continuación: como fase estacionaria se empleó sephadex LH-20 y como fase móvil solventes de diferente polaridad, como: metanol 30%, metanol 60% y acetona 60% (Acidificados con ácido fórmico 0,01%, v/v). En el proceso se empleó una columna de dimensiones: 26,0 cm x 1,7 cm, una vez acondicionada con metanol al 30% se cargó el respectivo extracto en proporción de 1 g de extracto / 100 g de resina (figura 19, b). En el proceso se recolectaron fracciones cada 10 mL que luego se mezclaron convenientemente teniendo en cuenta su perfil UV-Vis (200-700 nm). Las diferentes fracciones se concentraron en un rotavapor a 45 °C, se llevaron a sequedad en plancha de

calentamiento a una temperatura de 45 °C y se pesaron. Finalmente, se almacenaron adecuadamente en refrigeración a una temperatura aproximada de 4 a 5 °C para posteriores análisis HPLC-PAD y HPLC-MS.

Para los análisis de contenido fenólico total y actividad antioxidante *in vitro* de los extractos polifenólicos se realizó un segundo fraccionamiento empleando la metodología antes descrita (Fraccionamiento 2), con la mezcla de algunas de las fracciones. Para cada una de estas fracciones se confirmó nuevamente el perfil polifenólico mediante análisis por HPLC-PAD.

Figura 19: a) Retención selectiva de los compuestos polifenólicos sobre amberlita XAD-7 y b) fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular (sephadex LH-20).



Fuente: Esta investigación.

### 3.4 ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA, ESPECTROSCOPIA UV-Vis Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos de la semilla (ERP-Semilla y ERP-Semilla EA) y epicarpio de aguacate (ERP-Epicarpio) y en las fracciones aisladas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PAD) y a espectrometría de masas con interface electrospray (HPLC-ESI-MS). Los análisis se desarrollaron bajo las siguientes condiciones:

### 3.4.1 Análisis HPLC-PAD.

Los diferentes análisis HPLC-PAD se realizaron en la universidad de Nariño en un equipo Waters 1525 equipado con bomba binaria de solventes, detector de arreglo de fotodiodos Waters 2998 (PAD) y una columna cromatográfica C<sub>18</sub> (100mm x 4,6mm, 3µm). Las condiciones cromatográficas se establecieron a partir de las publicadas por Kosinska *et al.*<sup>100</sup> realizando algunas modificaciones (gradiente de elución, flujo y tiempo de análisis). La fase móvil empleada consistió en un sistema binario de solventes, compuesto por: solvente A: agua-ácido acético (98:2, v/v) y solvente B: agua-acetonitrilo-ácido acético (78:20:2, v/v/v); empleando un gradiente lineal de 0-100% de B (tabla 3), un flujo de 0,8 mL/min y un tiempo de análisis de 40 minutos.

Tabla 3: Gradiente solventes A y B en el análisis HPLC-PAD.

Tiempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0	100	0
15	20	80
30	0	100
40	100	0

### 3.4.2 Análisis HPLC-ESI-MS.

Los análisis HPLC-ESI-MS se realizaron en la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá) en un equipo Shimadzu LCMS-2010. Se usó una columna Shimadzu Premier C18 (150mm x 4,6mm, 3µ) y, como se empleó un sistema binario de solventes compuesto por: solvente A: Agua: Ácido acético (99:1, v/v) y solvente B: Acetonitrilo: Agua: Ácido acético (78:21:1, v/v/v). Las condiciones de análisis en espectrometría de masas (MS) fueron: ionización por Electro spray (ESI) en modo positivo y negativo, temperatura del CDL: 250 °C, temperatura del Heat Block: 250 °C, voltaje del detector: 1,50 KV, rango: 50-1000 m/z y flujo N<sub>2</sub>: 1,0 L/min.

Las longitudes de onda (λ) de análisis en HPLC-PAD y HPLC-ESI-MS fueron 280 nm, 360 nm y 520 nm.

---

<sup>100</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4615.

### 3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL

La determinación del contenido fenólico total de los extractos polifenólicos (EC y ERP) de la semilla y epicarpio de aguacate y de las diferentes fracciones aisladas se realizó mediante el ensayo de Folin Ciocalteu<sup>101</sup>.

Inicialmente, se construyó una curva de calibrado (Absorbancia Vs Concentración, ppm) empleando ácido gálico como patrón en soluciones de diferentes concentraciones: 50, 100, 150, 200 y 250 ppm. El procedimiento fue el siguiente: A 100 µL de la solución a analizar, se adicionaron 500 µL del reactivo de Folin Ciocalteu y 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20% (p/v). Luego, se aforo a 10 mL con agua (tipo I) y transcurridas dos horas se midió la absorbancia de las diferentes soluciones a una longitud de onda de 765 nm.

A continuación, se analizó el contenido fenólico de los diferentes extractos (EC y ERP) y fracciones, preparando soluciones de 1,0 mg/mL de los extractos y 0,5 mg/mL de las fracciones, como solvente se empleó una mezcla metanol-agua (1:1). Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto o fracción polifenólica y, además en mg de EAG por 100 g de material vegetal para el caso de los extractos polifenólicos crudos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos (ERP) y de las diferentes fracciones polifenólicas aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate se implementaron los ensayos de capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) y de actividad antioxidante frente al radical DPPH<sup>•</sup>.

#### 3.6.1 Ensayo de capacidad antioxidante equivalente a trolox (Ensayo TEAC)

Este análisis se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Re *et al.*<sup>102</sup> realizando algunas modificaciones. Inicialmente, se generó el catión-radical ABTS<sup>•+</sup> por la reacción entre ABTS y persulfato de potasio, en concentraciones finales de 7 mM y 2,45 mM respectivamente y usando agua (tipo I) como disolvente. La solución madre de ABTS<sup>•+</sup> obtenida se almacena durante un periodo

---

<sup>101</sup> SINGLETON V., Orthofer R. y Lamuela-Ravent R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. En: American Journal of Enology and Viticulture, 1974. vol. 25, p. 119.

<sup>102</sup> RE R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannalaa A., Yanga M. y Rice-Evansa C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. 1999. En: Free Radical Biology and Medicine. vol. 26, p. 1231-1237.

de 16 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. A partir de la solución madre se preparó una solución de trabajo mediante su dilución en metanol (HPLC) con una absorbancia de aproximadamente 0,900 uA.

A continuación, se construyó una recta de calibrado (Absorbancia Vs Concentración, mM) empleando trolox como patrón en concentraciones de: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mM. Para los ensayos antioxidantes se tomaron 2 mL de la solución de trabajo de ABTS\*\* y se adicionaron 20 µL de la solución a analizar, se agitó por un minuto y la mezcla se dejó en reposo por seis minutos, luego se midió su absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Las diferentes muestras en estudio (ERP y fracciones) fueron analizadas a una concentración de 0,3 mg/mL empleando metanol (HPLC) como disolvente. Los resultados se expresaron como mmol de trolox / g de extracto o fracción polifenólica.

La funcionalidad y exactitud de la metodología desarrollada, se determinó de manera experimental el valor TEAC del ácido ascórbico y se comparó con el valor publicado en la literatura científica para este antioxidante ( $1,05 \pm 0,02$  mM trolox/mM ácido ascórbico<sup>103</sup>). De igual manera que en los ensayos anteriores todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.6.2 Ensayo de la actividad antioxidante frente al radical DPPH\*.

Para estimar el efecto inhibitorio de las muestras (ERP y fracciones) contra el radical DPPH\* se determinó el parámetro EC<sub>50</sub>. Este parámetro mide la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial del radical DPPH\* a un 50%. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Sánchez *et al.*<sup>104</sup> con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

Inicialmente se construyó una recta de calibrado (Absorbancia Vs Concentración, mM), a partir de diferentes soluciones metanólicas del radical DPPH: 0,0025, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,05 mM. Las mediciones de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 515 nm.

A continuación, para determinar la actividad antioxidante de las muestras, se midió la absorbancia de la solución madre del radical DPPH\* (0,025 g/L) ( $\lambda = 515$  nm); luego, a 1.950 µL de esta solución se adicionaron 50 µL de la solución a analizar, se agito suavemente y se realizó un seguimiento de la absorbancia de la mezcla de reacción a intervalos de tiempo de 10 minutos hasta su estabilización. Este procedimiento se realizó para cinco concentraciones diferentes por cada muestra de antioxidante, en el rango de 60-170 g/kg DPPH para algunas muestras y de 120-500 g/kg DPPH para otras. Finalmente, con ayuda de la ecuación de calibrado se determinó la concentración del radical DPPH\* remanente para cada una de las

---

<sup>103</sup> Ibid., p. 1235.

<sup>104</sup> SÁNCHEZ-MORENO J. y Fulgencio S. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *En: Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998. vol. 76, p. 270-276.

concentración de antioxidante empleada, y se construyó una gráfica de porcentaje de DPPH<sup>\*</sup> remanente Vs concentración de antioxidante (expresada como g antioxidante / kg de DPPH<sup>\*</sup>) y a partir de esta se determinó por interpolación el parámetro EC<sub>50</sub>.

Con el fin de evaluar la funcionalidad y exactitud de la metodología desarrollada, se determinó experimentalmente el valor EC<sub>50</sub> para el ácido gálico y se comparó con el valor publicado en la literatura científica para este antioxidante (26 ± 1)<sup>105</sup>. Las soluciones de ácido gálico se prepararon en el rango de concentraciones de: 10-100 g/kg DPPH, empleando metanol (HPLC) como solvente. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.6.3 Correlación entre los ensayos de contenido fenólico total y de actividad antioxidante in vitro

La correlación entre los ensayos de contenido fenólico total y de actividad antioxidante in vitro (TEAC y DPPH) se estudió aplicando una regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados y análisis de varianza ANOVA para evaluar su significancia estadística.

Las diferentes gráficas, los cálculos de regresión por mínimos cuadrados y las pruebas estadísticas se realizaron en Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.11.

---

<sup>105</sup> Ibid., p. 173.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS FRUTOS

De acuerdo a la literatura científica la composición polifenólica y actividad antioxidante del aguacate dependen de variables como su variedad taxonómica y estado de madurez<sup>106,107</sup>. De esta manera, con respecto a la clasificación taxonómica de los frutos estudiados, con la colaboración del Herbario de la Universidad de Nariño y del Herbario de la Universidad Nacional se logró verificar que corresponden a la especie *Persea americana* Mill (anexo A). Adicionalmente, teniendo en cuenta las condiciones geográficas y climáticas del lugar de muestreo, con una altura entre los 0 m.s.n.m. hasta los 400 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 26,2 °C se sugiere que los frutos pueden corresponder a la subespecie *Antillana*<sup>108,109,110</sup>.

Por otra parte, los frutos se analizaron en el estado de madurez de consumo; el cual se evidencio con la pérdida de la firmeza de la pulpa, siendo este uno de los principales indicativos en el aguacate<sup>111,112</sup>. Al finalizar dicho proceso se encontró que el valor medio de la firmeza de la pulpa de los frutos correspondió a 6,86 ± 1,30 N. En la literatura científica no se encuentran valores de firmeza característicos para aguacates de la región de muestreo, sin embargo, al respecto, investigaciones como la de Gamble J. *et al.*<sup>113</sup> reportan que para aguacates variedad *Hass*, la madurez preferida por los consumidores se caracteriza por una firmeza de 6,5 N, un valor cercano al encontrado en la presente investigación.

Entre las características físicas más relevantes de los frutos se destaca que presentan una forma ovoide y epicarpio de coloración oscura y textura lisa, como se puede observar en la figura 20.

---

<sup>106</sup> KOSIŃSKA A. *et al.*, Op. Cit., p. 4616-4617.

<sup>107</sup> DAVENPORT J. Y Ellis S. Chemical changes during growth and storage of the avocado. División de alimentos, preservación y transporte, 1959. p. 445-454.

<sup>108</sup> ALCALDÍA MUNICIPAL DE TUMACO. Plan de ordenamiento territorial, 2008-2009.

<sup>109</sup> RODRÍGUEZ M., Jaramillo J. y Orozco J. Colecta de aguacates criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. III congreso Latinoamericano del Aguacate.

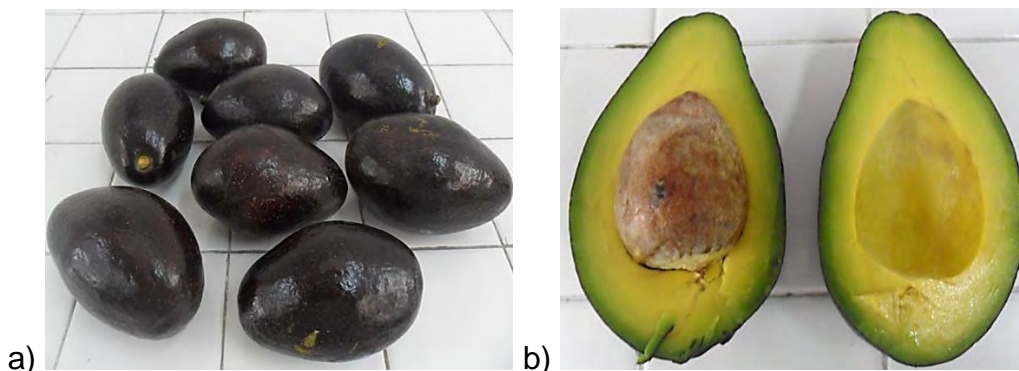
<sup>110</sup> BERNAL E. Op. Cit., p. 23.

<sup>111</sup> MÁRQUEZ C. *et al.*, Op. Cit., p. 38.

<sup>112</sup> FLITSANOW U. *et al.* Measurement of avocado softening at various temperatures using ultrasound. *En*: Postharvest Biology and Technology, 2000. vol. 20, p. 279-286.

<sup>113</sup> GAMBLE J. *et al.* The impact of dry matter, ripeness and internal defects on consumer perceptions of avocado quality and intentions to purchase. *En*: Postharvest Biology and Technology, 2010. vol. 57, p. 35-43.

Figura 20: a) Frutos estudiados aspecto físico exterior y b) aspecto físico interior.



Fuente: Esta investigación.

Adicionalmente, en la tabla 4 se muestra el peso promedio de los frutos y los porcentajes de semilla y epicarpio (g/ 100 g fruto). Estos valores junto con las características físicas mencionadas son específicos para cada variedad de aguacate por lo que permiten distinguirlos de otras<sup>114</sup>.

Tabla 4: Peso promedio de los frutos y porcentajes de semilla y epicarpio en cada fruto (p/p).

Peso frutos (g)	% Semilla	% Epicarpio
403,56 ± 29,86 <sup>1</sup>	16,80 ± 2,49	7,26 ± 0,78

<sup>1</sup>Valores expresados como:  $\bar{X} \pm S$ ,  $\bar{X}$ : Valor medio,  $S$ : Desviación estándar.

Como se observa en la tabla 3, la semilla y epicarpio representan un porcentaje significativo del fruto (24,06%), lo cual es de relevancia considerando que dichos tejidos vegetales son productos de desecho habituales que pueden ser una potencial fuente de compuestos bioactivos, como los polifenoles.

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS

La selección de la semilla y epicarpio de aguacate como tejidos vegetales de interés investigativo se realizó teniendo en cuenta que de acuerdo a la literatura científica son los que presentan un mayor contenido fenólico y actividad antioxidante *in vitro* en el fruto<sup>115</sup>. Adicionalmente, al ser subproductos de su consumo, constituyen una materia prima favorable desde el punto de vista económico y ambiental, lo cual es de relevancia para eventuales aplicaciones.

<sup>114</sup> BERNAL E., Díaz D. y Cipriano A., Op. Cit., p. 24-43.

<sup>115</sup> WANG W. *et al.*, Op. Cit., p. 1195.



En la tabla 5 se muestran las cantidades de los extractos crudos (ECs) y extractos ricos en polifenoles (ERPs) aislados de la semilla (expuesta y no expuesta al aire) y epicarpio de aguacate, expresados en g de extracto /100 g de cada tejido vegetal (TV).

Tabla 5: Cantidades de los extractos crudos (ECs) y extractos ricos en polifenoles (ERPs) de la semilla (expuesta al aire y no expuesta) y del epicarpio de aguacate.

<i>Tejido vegetal (TV)</i>	<i>g EC<sup>1</sup> / 100 g TV</i>	<i>g ERP<sup>2</sup> / 100 g TV</i>
<b>Semilla</b>	3,478	0,752
<b>Semilla EA<sup>3</sup></b>	2,781	0,554
<b>Epicarpio</b>	2,754	0,936

<sup>1</sup>EC: extracto crudo, <sup>2</sup>ERP: Extracto rico en polifenoles, <sup>3</sup> Semilla EA: Semilla expuesta al aire.

Como se observa en la tabla 5, se obtuvieron cantidades mucho mayores de los extractos crudos (ECs) con respecto a los extractos ricos en polifenoles (ERPs), debido a que durante el proceso de extracción por maceración química no solo los compuestos polifenólicos de interés migraron de la matriz vegetal al solvente, sino también otros fitocomponentes (azúcares, proteínas y aminoácidos) afines a la polaridad del solvente. Sin embargo, durante el proceso de retención selectiva de los polifenoles sobre amberlita XAD-7, se eliminaron gran parte de estos componentes y se obtuvieron extractos de menor masa, pero con una composición menos compleja y de mayor concentración en los compuestos de interés. Este proceso de aislamiento fue relevante puesto que permitió eliminar posibles interferentes de los extractos iniciales, facilitando la identificación y una determinación más precisa de las propiedades antioxidantes de los analitos.

Por otra parte, con respecto al fraccionamiento de los ERPs de la semilla y epicarpio de aguacate mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular, en la tabla 6 se presenta las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones en el primer y segundo ensayo cromatográfico, expresadas en mg fracción/ 100 mg ERP. Cabe destacar que el fraccionamiento del ERP de la semilla EA no se realizó puesto que su obtención fue eventual y éstos resultados no son objeto del presente estudio.

Tabla 6: Cantidades de las fracciones aisladas de los ERP de la semilla y epicarpio mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Solvente de elución	Fraccionamiento 1			Fraccionamiento 2		
	No. Frac.	mg fracción 100 mg ERP		No. Frac.	mg fracción 100 mg ERP	
		Semilla	Epicarpio		Semilla	Epicarpio
Metanol 30%	1a	15,7 <sup>1</sup>	8,8	1	17,5	18,7
	1b		9,9			
Metanol 60%	2a	12,8	21,7	2	17,2	28,9
	2b	6,5	8,4			
Acetona 60%	3	65,0	55,8	3	65,2	52,4

<sup>1</sup>Se obtuvo una sola fracción.

Los dos ensayos de fraccionamiento presentados en la tabla 6 se desarrollaron bajo las mismas condiciones analíticas; sin embargo, como se observa, el número de fracciones aisladas en cada caso es diferente. En el segundo ensayo (fraccionamiento 2), por cada solvente de elución se obtuvo una fracción; mientras que en el primer ensayo (fraccionamiento 1), en algunos casos, basándose en el seguimiento por espectroscopia UV-Vis realizado, se obtuvieron dos fracciones. Esto último con el fin de simplificar en mayor medida su composición. Por lo tanto, las fracciones aisladas en el primer ensayo cromatográfico, se emplearon para el análisis por de la composición fenólica (HPLC-PAD y HPLC-ESI-MS); mientras que las fracciones del segundo ensayo, se emplearon principalmente para el análisis de la actividad antioxidante *in vitro*. No obstante, su composición también se confirmó mediante HPLC-PAD.

Por otra parte, en la tabla 6 se observa que tanto en el caso de a semilla como del epicarpio, en los dos ensayos cromatográficos realizados, las primeras fracciones eluidas con metanol al 30% y 60% se obtuvieron en una menor proporción; mientras que las últimas fracciones eluidas con acetona 60% se obtuvieron en una mayor cantidad. De acuerdo a la literatura, en este ensayo cromatográfico, los solventes metanólicos permiten aislar los componentes fenólicos de tipo no polimérico; mientras que la acetona (60%) permite obtener los componentes fenólicos de tipo polimérico, que son fuertemente retenidos en el gel<sup>116</sup>. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los componentes fenólicos de tipo polimérico representan un mayor porcentaje (p/p) en los extractos iniciales de la semilla y epicarpio.

En la figura 21 se puede observar el aspecto físico de los ERPs de la semilla (expuesta y no expuesta al aire) y epicarpio de aguacate, y en la figura 22 el aspecto físico de las fracciones polifenólicas aisladas (fraccionamiento 2).

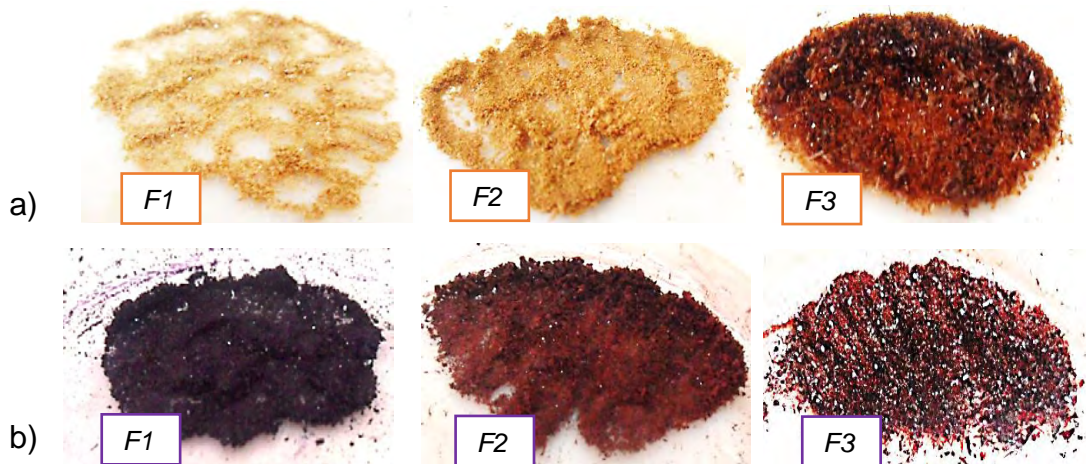
<sup>116</sup> KANTZ K. y Singleton V. Isolation and Determination of Polymeric Polyphenols Using Sephadex LH-20 and Analysis of Grape Tissue Extracts. *En: American Journal of Enology and Viticulture*, 1990. vol. 41, no. 3, p. 223-228.

Figura 21: Aspecto físico de los ERPs de la semilla (expuesta y no expuesta al aire) y del epicarpio de aguacate.



Fuente: Esta investigación.

Figura 22. Aspecto físico de las fracciones aisladas del ERP de la semilla (a) y del ERP del epicarpio de aguacate (b) (Fraccionamiento 2).



Fuente: Esta investigación.

Como se observa en las figura 21 y 22, el ERP y las fracciones polifenólicas obtenidas de la semilla de aguacate presentaron coloraciones amarillentas claras y oscuras; mientras que el ERP y las fracciones polifenólicas del epicarpio presentaron coloraciones rojizas oscuras, a excepción de la fracción F1 que presentó una coloración morada oscura. Estas coloraciones se deben principalmente a la presencia de compuestos con un alto grado de conjugación, como los compuestos fenólicos de interés para este estudio. En la figura 21, se observa que el ERP de la semilla expuesta al aire presentó una coloración amarillenta más oscura con respecto al obtenido de la semilla no expuesta al aire, como se mencionó previamente la diferencia de coloración podría deberse a la presencia de complejos tipo melanina (de color café) formados a partir de la oxidación enzimática de los polifenoles de interés.

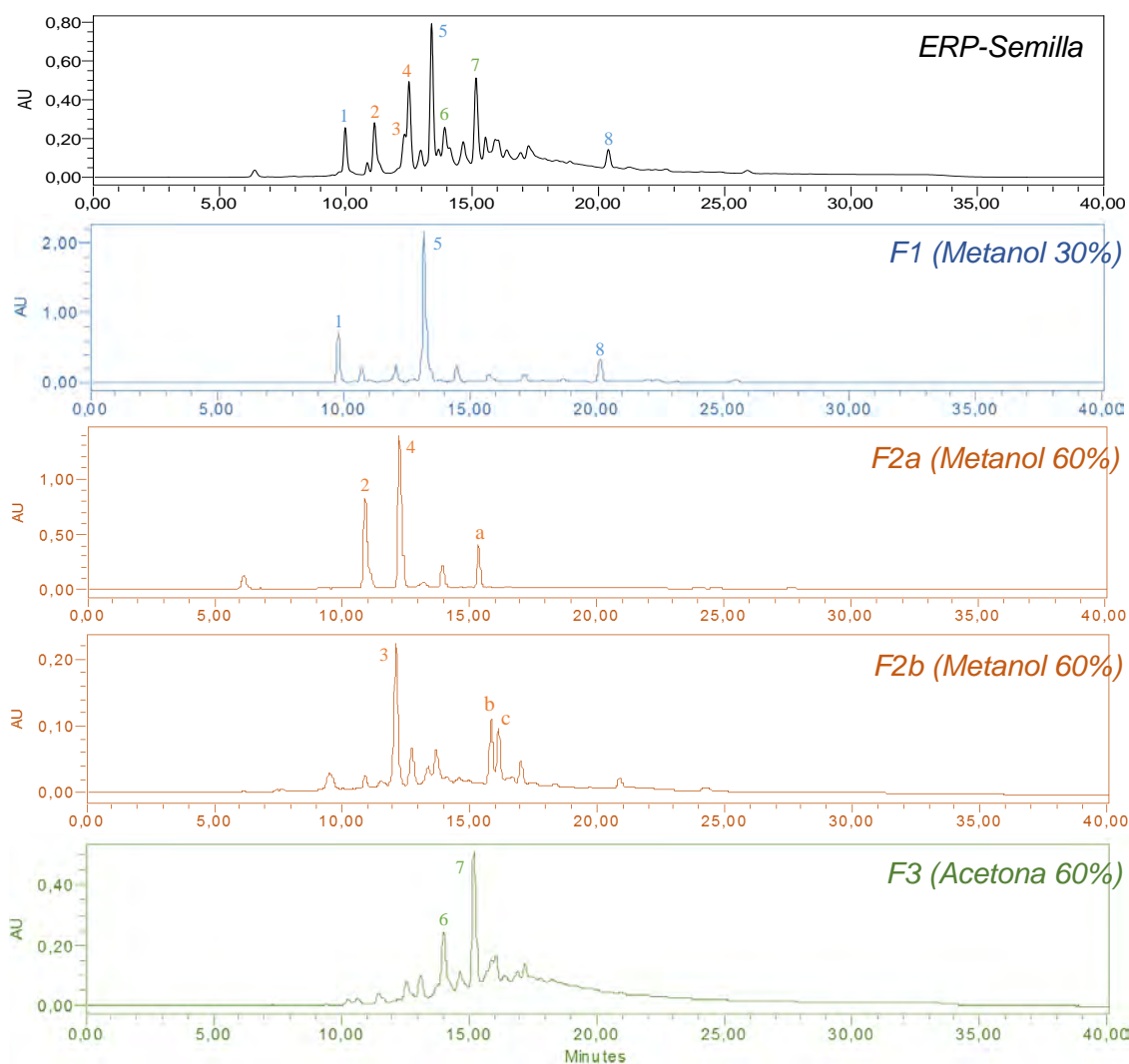
### 4.3 COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN POLIFENÓLICA EXTRAÍBLE DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE.

La identificación parcial de los principales polifenoles extraídos de la semilla y epicarpio de aguacate se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PAD) y a espectrometría de masas (HPLC-MS), como se describe a continuación:

#### 4.3.1 Análisis de la fracción polifenólica aislada de la semilla de aguacate:

Los perfiles cromatográficos (HPLC-PAD) del ERP de la semilla de aguacate y de las fracciones aisladas mediante cromatografía de exclusión por tamaño se registraron a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm, en la que diferentes tipos de polifenoles presentan un máximo de absorción. En la figura 23 se presentan los diferentes perfiles cromatográficos obtenidos para las muestras aisladas de la semilla de aguacate.

Figura 23. Perfiles cromatográficos (HPLC-PAD) a una  $\lambda$  de 280 nm para el ERP de la semilla de aguacate y las diferentes fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño.

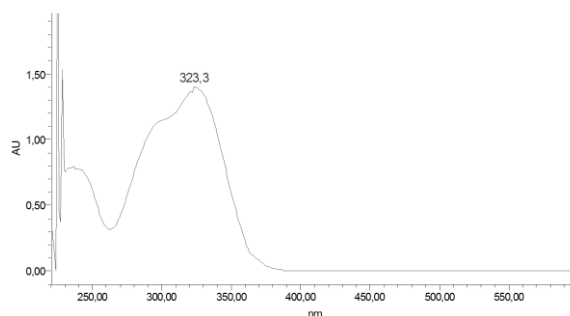


Fuente: Esta investigación.

Como se observa en la figura 23 los principales polifenoles detectados en el ERP de la semilla fueron separados en diferentes fracciones mediante cromatografía de exclusión por tamaño, lo cual se realizó con el fin de facilitar su identificación y realizar un estudio más preciso de sus propiedades antioxidantes.

Inicialmente, entre los compuestos fenólicos aislados en la fracción 1 (**F1**), eluida con metanol 30%) se detectaron dos compuestos fenólicos mayoritarios diferenciados principalmente por su tiempo de retención (tr) y porcentaje de área relativo (%Ar) (pico **1** con tr: de 9,745 min y %Ar: 20,6 y pico **5** con tr: 13,176 min y %Ar: 67,0). Estos compuestos muestran espectros UV-Vis muy similares entre sí, con un máximo de absorción en  $\cong 323$  nm y un hombro alrededor de 300 nm (figura 24), que son característicos de ácidos fenólicos tipo hidroxicinámico, derivados de ácido cafeico o ferúlico<sup>117</sup>.

Figura 24. Espectro UV-Vis del compuesto fenólico **1** (tr: 9,745 min).



Fuente: Esta investigación.

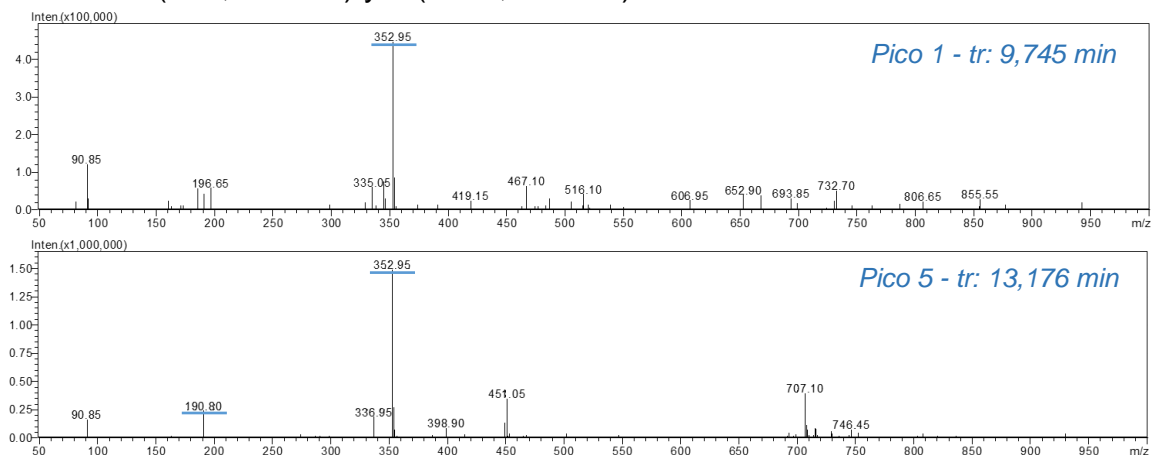
En la figura 25 se muestran los espectros de masas de los compuestos 1 y 5, donde se observa una señal en común en  $m/z$  353u correspondiente al ión pseudomolecular  $[M- H]^-$ . De acuerdo a publicaciones científicas, esta masa corresponde a isómeros de ácido cafeoilquínico<sup>118</sup>; los cuales consisten en ésteres del ácido cafeico con ácido quínico, y varían estructuralmente dependiendo de la posición del grupo cafeoil en el residuo de ácido quínico<sup>119</sup>.

<sup>117</sup> VASCO C. Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits. Tesis Doctoral. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Uppsala, 2009. p. 40.

<sup>118</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>119</sup> BASTOS C. y Alves R. Métodos para el análisis de ácido clorogénico. En: Química Nova, 2004. vol. 27, no 4, p. 586-592.

Figura 25. Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) para los compuestos fenólicos **1** (tr: 9,745 min) y **5** (tr: 13,176 min).



Fuente: Esta investigación.

De acuerdo a lo publicado en la literatura, en la semilla y epicarpio de aguacate se han identificado los cuatro isómeros posibles del ácido cafeoilquínico: ácido 1-*O*-cafeoilquínico, ácido 3-*O*-cafeoilquínico, 4-*O*-cafeoilquínico y ácido 5-*O*-cafeoilquínico<sup>120,121</sup>, los cuales podrían diferenciarse por espectrometría de masas en modo tándem (MS<sup>n</sup>)<sup>122</sup>. Sin embargo, mediante la técnica de análisis (ESI-MS) empleada en el presente estudio no fue posible identificar completamente cada isómero. Como se observa en la figura 25, únicamente en el espectro de masas correspondiente al pico **5** (tr: 13,176 min) se observa con claridad una señal en m/z 191u, que es característica de todos los isómeros y corresponde al ión fragmento de ácido quínico generado tras la pérdida del grupo cafeoil ([M-H-162]<sup>-</sup>)<sup>123</sup>. En la figura 26 se muestra las estructuras químicas de dos de estos isómeros.

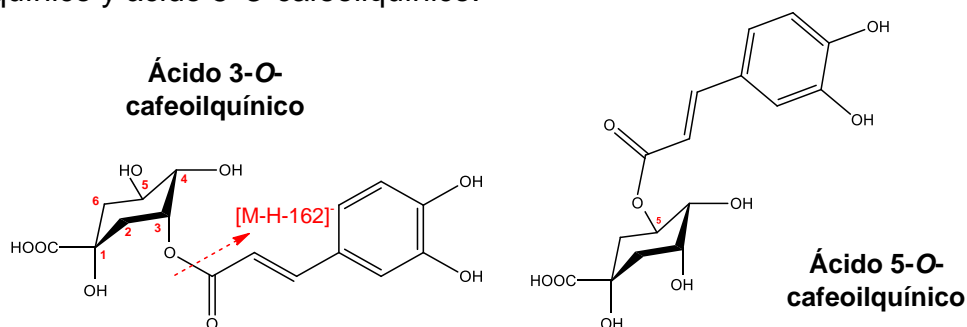
<sup>120</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>121</sup> LÓPEZ-COBO A. *et al.*, Op. Cit., p. 508.

<sup>122</sup> CLIFFORD M. *et al.* Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> Identification of Chlorogenic Acids. *En: Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2003. vol. 51, p. 2900-2911.

<sup>123</sup> CLIFFORD M., Op. Cit., p. 2902.

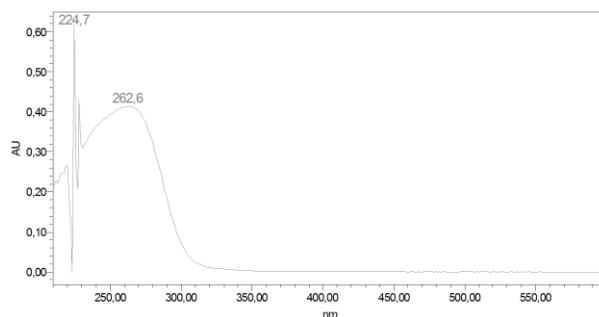
Figura 26. Estructuras químicas de dos isómeros del ácido cafeoilquínico: ácido 3-O-cafeoilquínico y ácido 5-O-cafeoilquínico.



Fuente: Dawidowicz A. y Typek R., 2014.

En la fracción 1 (**F1**) se observa además, el pico **8** con un mayor tiempo de retención (tr: 20,259 min) y con menor porcentaje de área relativa (% Ar: 12,4) que los compuestos antes descritos. El pico 8 tiene un máximo de absorción en 263 nm y una relación m/z 441,15u correspondiente al ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  (figura 27 y 28). Esta relación m/z es característica de un éster del ácido gálico con catequina, que ha sido identificado en estudios previos en la semilla de aguacate<sup>124</sup>. Teniendo en cuenta que en los galatos de catequina el grupo acilo galoil se encuentra en el carbono 3 del anillo heterocíclico de la catequina<sup>125</sup>, y que los estereoisómeros comúnmente presentes en las plantas son la (+)-Catequina y la (-)-Epicatequina<sup>126</sup>, se plantea que el compuesto detectado puede corresponder a (+)-Catequin 3-O-galato o (-)-Epicatequin 3-O-galato, que como se muestra en la figura 29 varían estructuralmente dependiendo de la orientación espacial del grupo galoil.

Figura 27. Espectro UV-Vis para el compuesto fenólico **8** (tr: 20,259 min).



Fuente: Esta investigación.

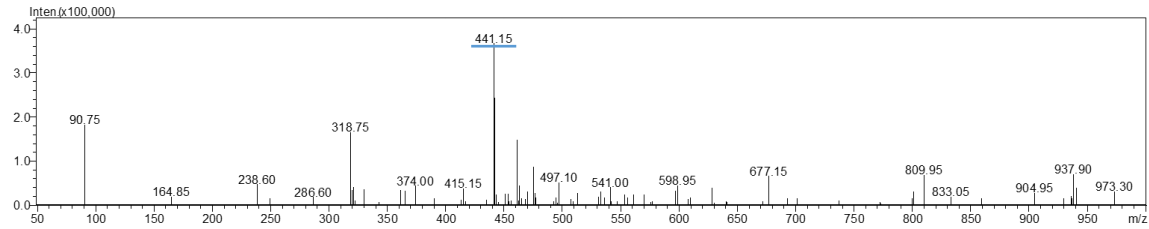
<sup>124</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>125</sup> PELILLO M. et al. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. En: Food Chemistry, 2002. vol. 78, p. 369–374.

<sup>126</sup> ARTS I., Van de Putte B. y Hollman P. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. En: Journal of Agricultural Food Chemistry, 2000. vol. 48, p. 1746-1751.

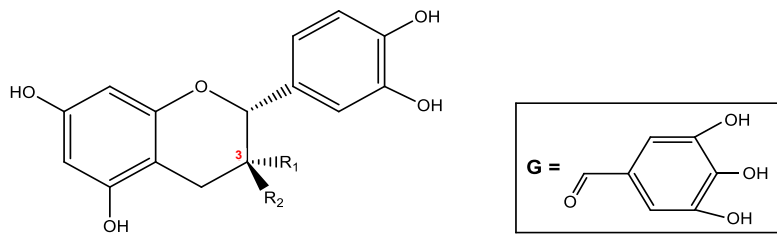


Figura 28. Espectro de masas (ESI-MS modo negativo) para el compuesto fenólico **8** (tr: 20,259 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 29. Estructuras químicas propuestas para el compuesto fenólico **8** (tr: 20,259 min).



**(+)-Catequin 3-O-galato:**  $R_1=H$ ,  $R_2=OG$

**(-)-Epicatequin 3-O-galato:**  $R_1=OG$ ,  $R_2=H$

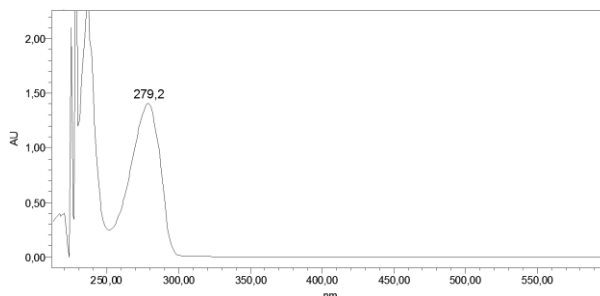
Fuente: Ikeda I. *et al.*, 2004.

Como se observa el espectro de masas (figura 28) del flavanol detectado presenta otras señales de intensidad considerable, como la señal en  $m/z$  319u, para esta señal no se encontró un patrón de fragmentación característico a partir del ión molecular. Por lo tanto se sugiere que puede corresponder a otro compuesto coeluido en el análisis cromatográfico.

En el cromatograma registrado para la fracción **2a** (eluida con metanol 60%) se observan tres picos mayoritarios (**2**, **4** y **a**) con perfiles UV-Vis muy similares entre sí, con un solo máximo de absorbancia en 279 nm (figura 30), que es característico de monómeros flavan-3-ol y procianidinas<sup>127</sup>.

Figura 30. Espectro UV-Vis para el compuesto fenólico **4** (tr: 12,262 min.)

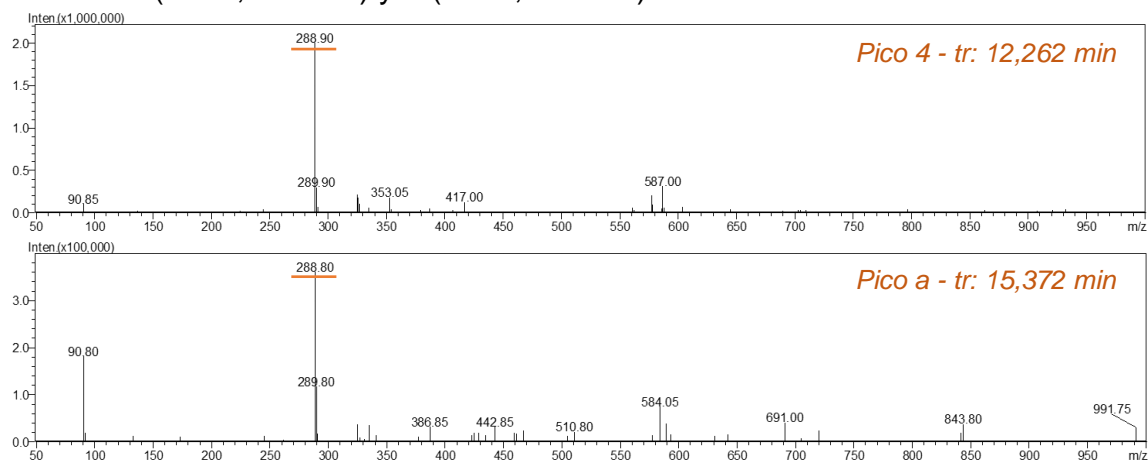
<sup>127</sup> VASCO C., Op. Cit., p. 44.



Fuente: Esta investigación.

Del análisis de los espectros de masas se encontró que los picos cromatográficos **4** (tr: 12,262 min y % Ar: 53,6) y **a** (tr: 15,372 min y %Ar: 12,3) muestran en común una relación m/z 289 correspondiente al ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  (figura 31), que de acuerdo con la literatura pertenece a estereoisómeros de catequina<sup>128</sup>, como la (+)-catequina y (-)-epicatequina, comúnmente encontradas en las plantas. El posterior análisis cromatográfico de un patrón de (+)-Catequina bajo las mismas condiciones de las muestras indicó, por comparación de tiempos de retención ( $\Delta t = 0,110$ , anexo B), que el pico cromatográfico **4** corresponde a este flavanol. En este sentido, el pico **a** puede corresponder a la (-)-Epicatequina. Este orden de elución se encuentra en concordancia con el reportado en análisis cromatográficos similares (columna cromatográfica, fases móviles y gradiente)<sup>129,130</sup>. En la figura 31 y 32 se presentan los espectros de masas (ESI- MS, modo negativo) y las estructuras químicas para los estereoisómeros de catequina aislados.

Figura 31. Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) de los compuestos fenólicos **4** (tr: 12,262 min) y **a** (tr: 15,372 min).



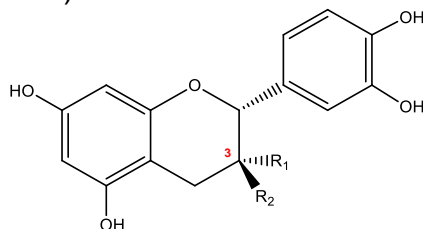
Fuente: Esta investigación.

<sup>128</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>129</sup> CHANG C. y Wu R. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC-MS. *En: Food Chemistry*, 2011. vol. 126, p. 710–717.

<sup>130</sup> ZHANG Q. *et al.* Simultaneous determination of catechin, epicatechin and epicatechin gallate in rat plasma by LC-ESI-MS/MS for pharmacokinetic studies after oral administration of Cynomorium songaricum extract. *En: Journal of Chromatography B*, 2012. vol. 880, p. 168– 171.

Figura 32. Estructuras químicas propuestas para los compuestos fenólicos **4** (tr: 12,262 min) y **a** (tr: 15,372 min).



**(+)-Catequin:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH

**(-)-Epicatequin:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H

Fuente: Ikeda I. *et al.*, 2004.

El compuesto fenólico **2** (tr: 10,915 min y %Ar: 34,1) detectado también en esta fracción (**F2a**) (con un máximo de absorción en 279 nm), muestra un espectro de masas con una señal en m/z 577 correspondiente al ion molecular [M-H]<sup>-</sup> y un ión fragmento en m/z 425 (figura 33). De acuerdo a la literatura estas señales son características de dímeros de procianidina tipo B, que se encuentran formados por unidades tipo catequina<sup>131,132</sup>. El ión fragmento en m/z 425 se genera por la escisión tipo retro Diels-Alder (RDA) de un anillo heterocíclico de catequina, [M-H-152]<sup>-</sup> (figura 34, b)<sup>133</sup>. Como se observa en la figura 34 este tipo de compuestos presentan una gran variación estructural debido no solo a los estereoisómeros de catequina constituyentes, sino también a los tipos de enlaces que los unen, las cuales pueden presentarse entre los carbonos C4-C8 o C4-C6<sup>134</sup>. Sin embargo mediante la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS) desarrollada no es posible identificarlos completamente, siendo necesarias técnicas analíticas adicionales como la espectrometría de masas en modo tándem (MS<sup>n</sup>) y resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C).

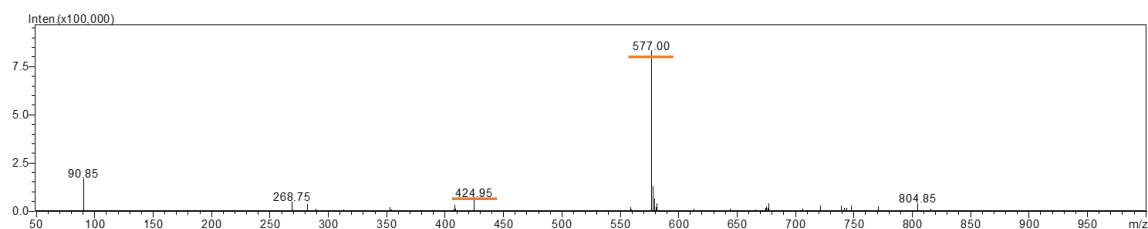
Figura 33. Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico **2** (tr: 10,915 min).

<sup>131</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>132</sup> SUN B. y Spranger M. Review: Quantitative Extraction and Analysis of Grape and Wine Proanthocyanidins and Stilbenes. En: Ciencia e Tecnica Vitivinicola, 2005. vol. 20, no 2, p. 59-89.

<sup>133</sup> TEIXEIRA N., Azevedo J., Mateus N. y de Freitas V. Proanthocyanidin screening by LC-ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. En: Food Chemistry, 2016. vol. 190, p. 300-307.

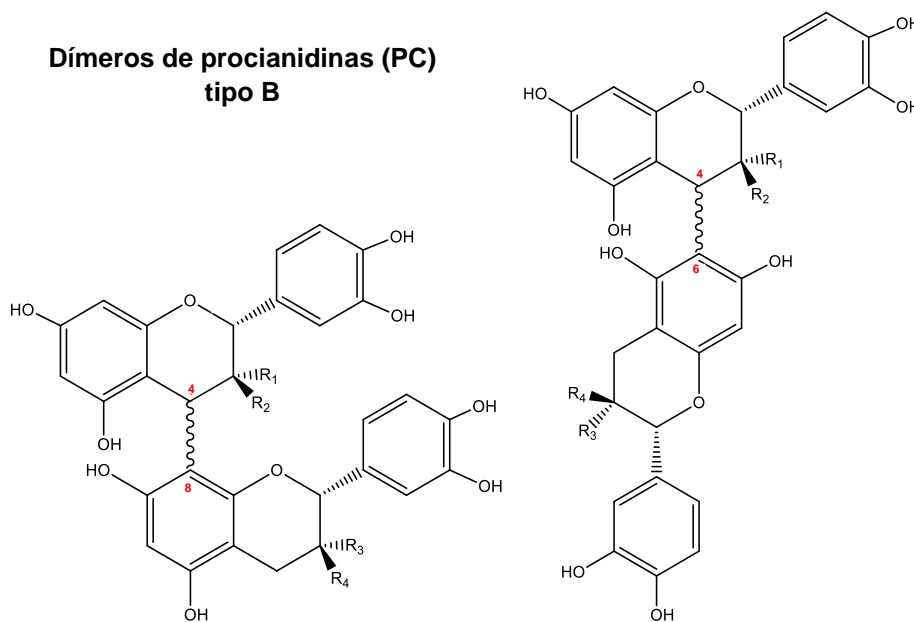
<sup>134</sup> SUN B., Op. Cit., p. 62.



Fuente: Esta investigación.

Figura 34. a) Estructuras químicas posibles para el compuesto fenólico **2** (tr: 10,915 min) y b) esquema de fragmentación para un dímero de procianidina tipo B.

**Dímeros de procianidinas (PC)  
tipo B**



**PC B1:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=OH

**PC B2:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=H

**PC B3:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=OH

**PC B4:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=H

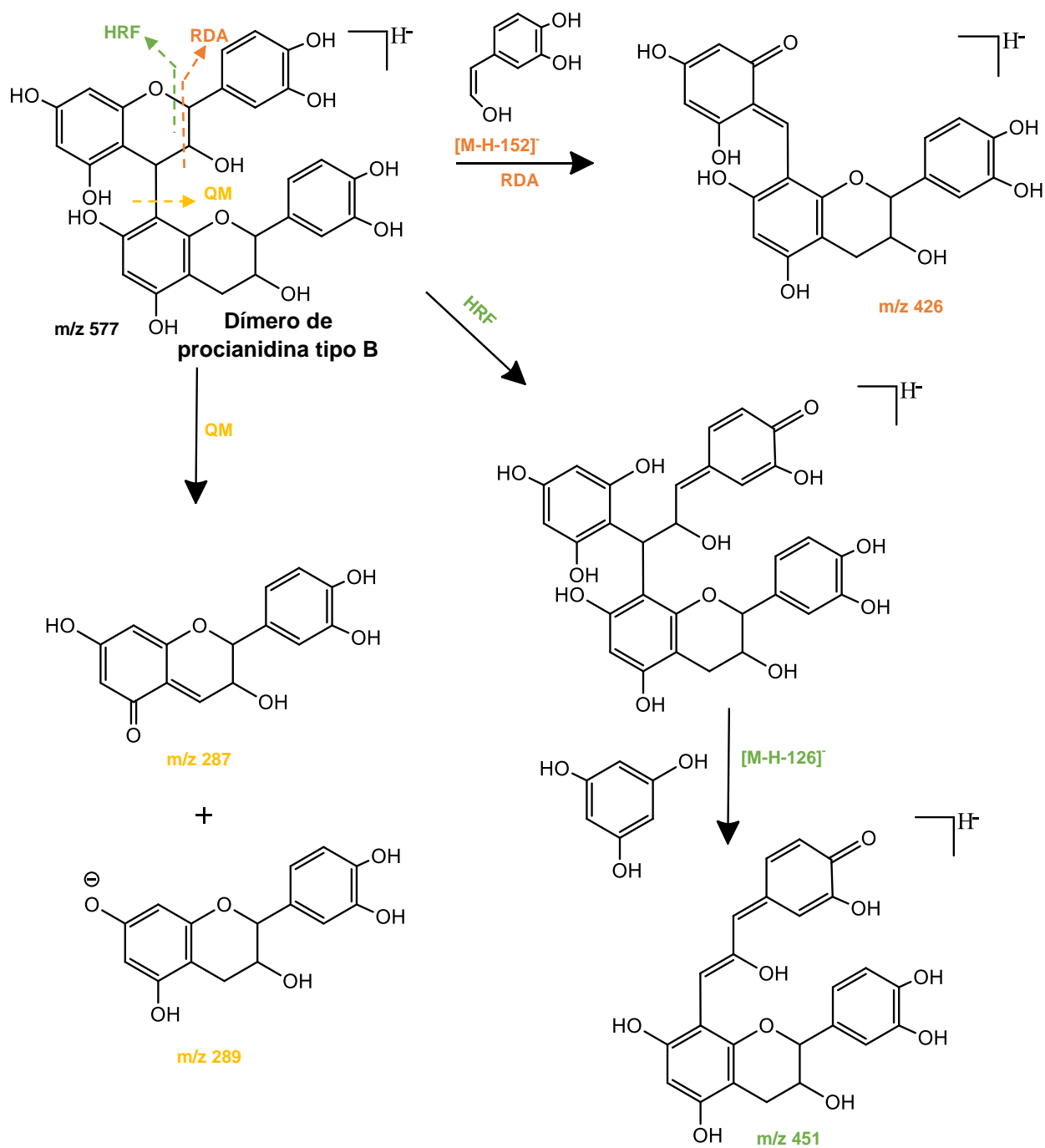
**PC B5:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=H

**PC B6:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=OH

**PC B7:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=OH

**PC B8:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=H

a)

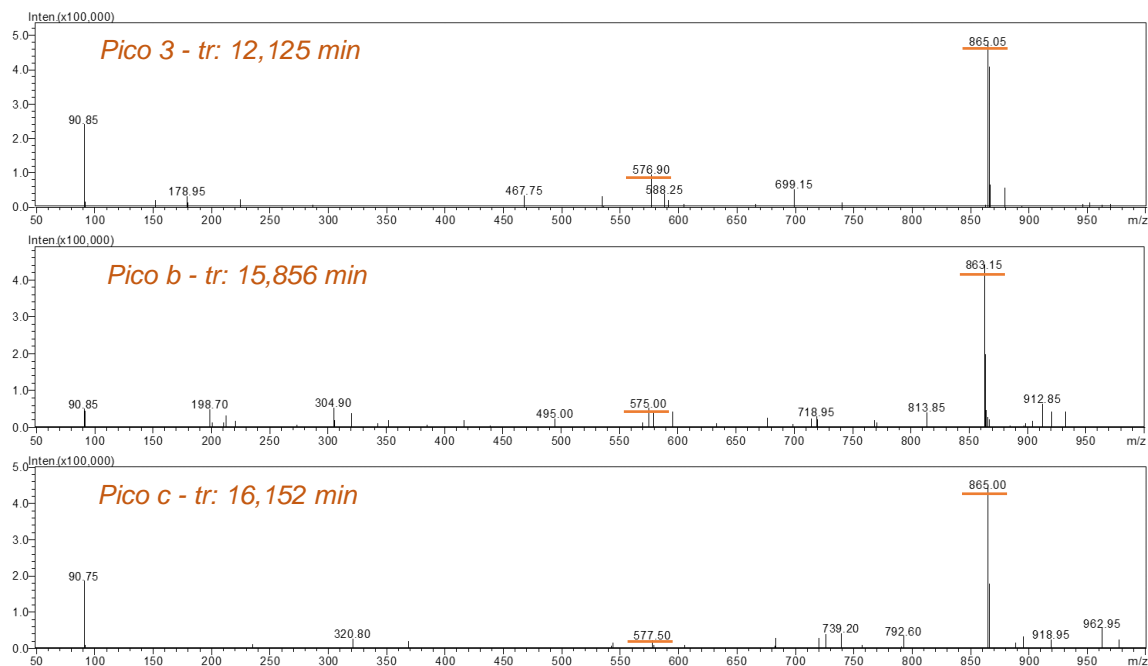


b)

Fuente: a) BITTNER K. *et al.*, 2013 y b) YANG T. *et al.*, 2014.

Finalmente, el análisis por espectrometría de masas de las fracciones: **F2b** (eluida con metanol al 60%) y **F3** (eluida con acetona al 60%) muestra que están enriquecidas en trímeros de procianidina tipo A y B. De forma similar que para los dímeros de procianidina identificados en la fracción analizada anteriormente, las procianidinas detectadas mostraron un espectro UV-Vis característico con un máximo de absorbancia en 279 nm. Como se muestra en la figura 35 y 36 los espectros de masas correspondientes a compuesto **3** (tr: 12,125 min y %Ar: 56,8), **6** (tr: 13,729 min y %Ar: 37,7) y **c** (tr: 16,152 min y %Ar: 20,1) muestran un ión pseudomolecular común en m/z 865 [M-H]<sup>-</sup> que corresponde a procianidinas tipo B (figura 37)<sup>135</sup>; mientras que los compuestos **7** (tr: 14,967 min y %Ar: 62,3) y **b** (tr: 15,856 min y %Ar: 23,0) muestran un ión pseudomolecular en m/z 863 [M-H]<sup>-</sup> que identifica a las procianidinas tipo A (figura 37)<sup>136</sup>.

Figura 35. Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) de los compuestos fenólicos **3** (tr: 12,125 min), **b** (tr: 15,856 min) y **c** (tr: 16,152 min) aislados en la fracción **2b**.

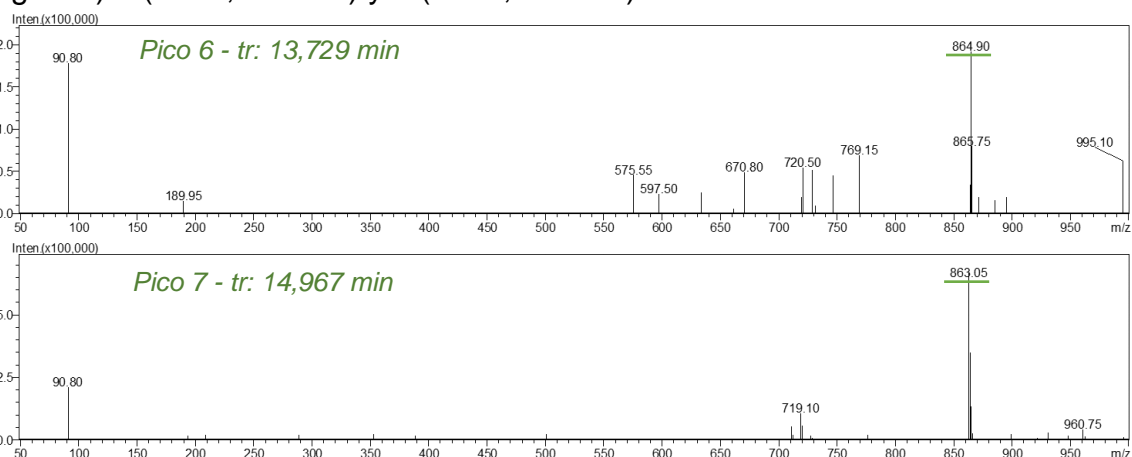


Fuente: Esta investigación.

<sup>135</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

<sup>136</sup> Ibid., p. 4617.

Figura 36. Espectros de masas de los compuestos fenólicos (ESI-MS, modo negativo) **6** (tr: 13,729 min) y **7** (tr: 14,967 min) aislados en la fracción **3**.



Fuente: Esta investigación.

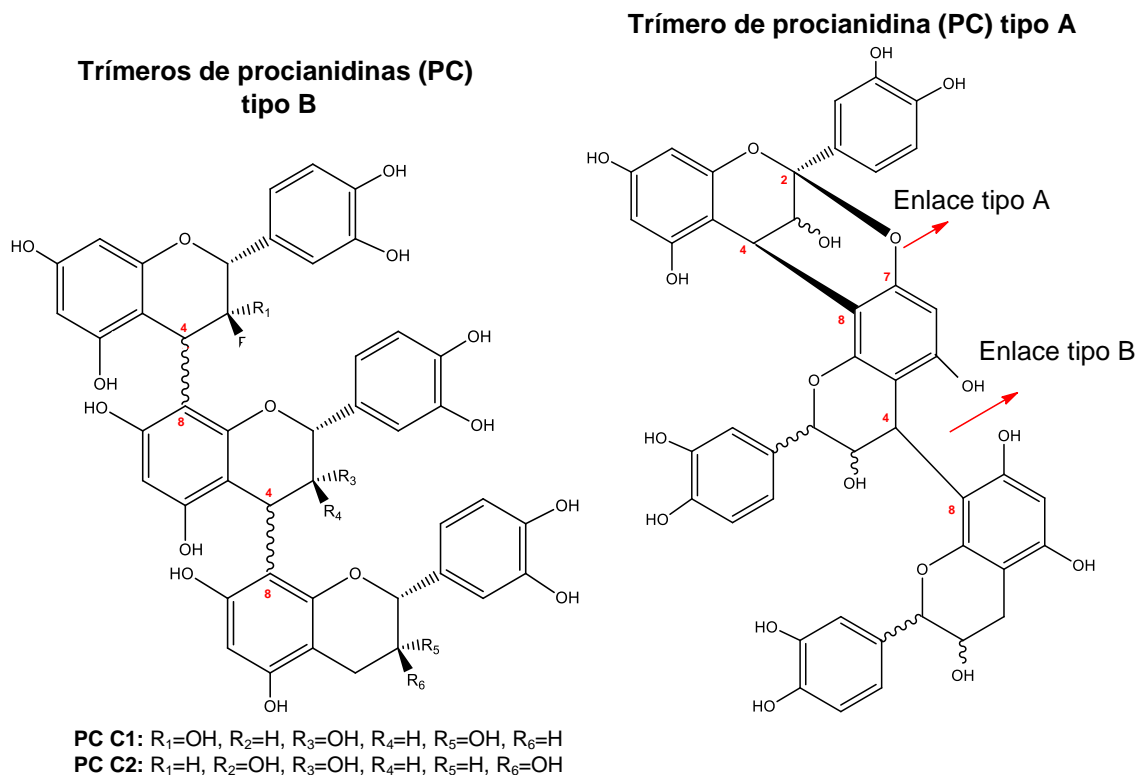
En la figura 35 se observa que los espectros de masas de las procianidinas **3** y **c** muestran iones fragmento en  $m/z$  575 (procianidina tipo A) y 577 (procianidinas tipo B) característicos de la pérdida de una unidad monomérica de catequina [M-H-287], mediante una escisión tipo metenil quinona (QM) de los enlaces interflavano del correspondiente trímero de procianidina<sup>137</sup>. En la figura 37, b se muestra un esquema de este tipo de fragmentaciones y otras como tipo retro Diels Alder (RDA) y de fisión del anillo heterocíclico (HRF) que son características de este tipo de compuestos.

De forma similar que los dímeros de procianidina antes descritos, las estructuras químicas de los trímeros varían ampliamente debido a la estereoisomería de sus unidades monoméricas (catequina) y al tipo de enlaces que las unen. Como se muestra en la figura 37 los trímeros de procianidina tipo A y B se diferencian estructuralmente en el tipo de enlaces existentes entre sus monómeros; las procianidinas tipo B presentan enlaces entre los carbonos C(4)-C(8) o C(4)-C(6), mientras que las procianidinas tipo A presentan un enlace tipo éter adicional C(2)-O(7)-C(6 u 8)<sup>138</sup>.

<sup>137</sup> TEIXEIRA N., Op. Cit., p. 305.

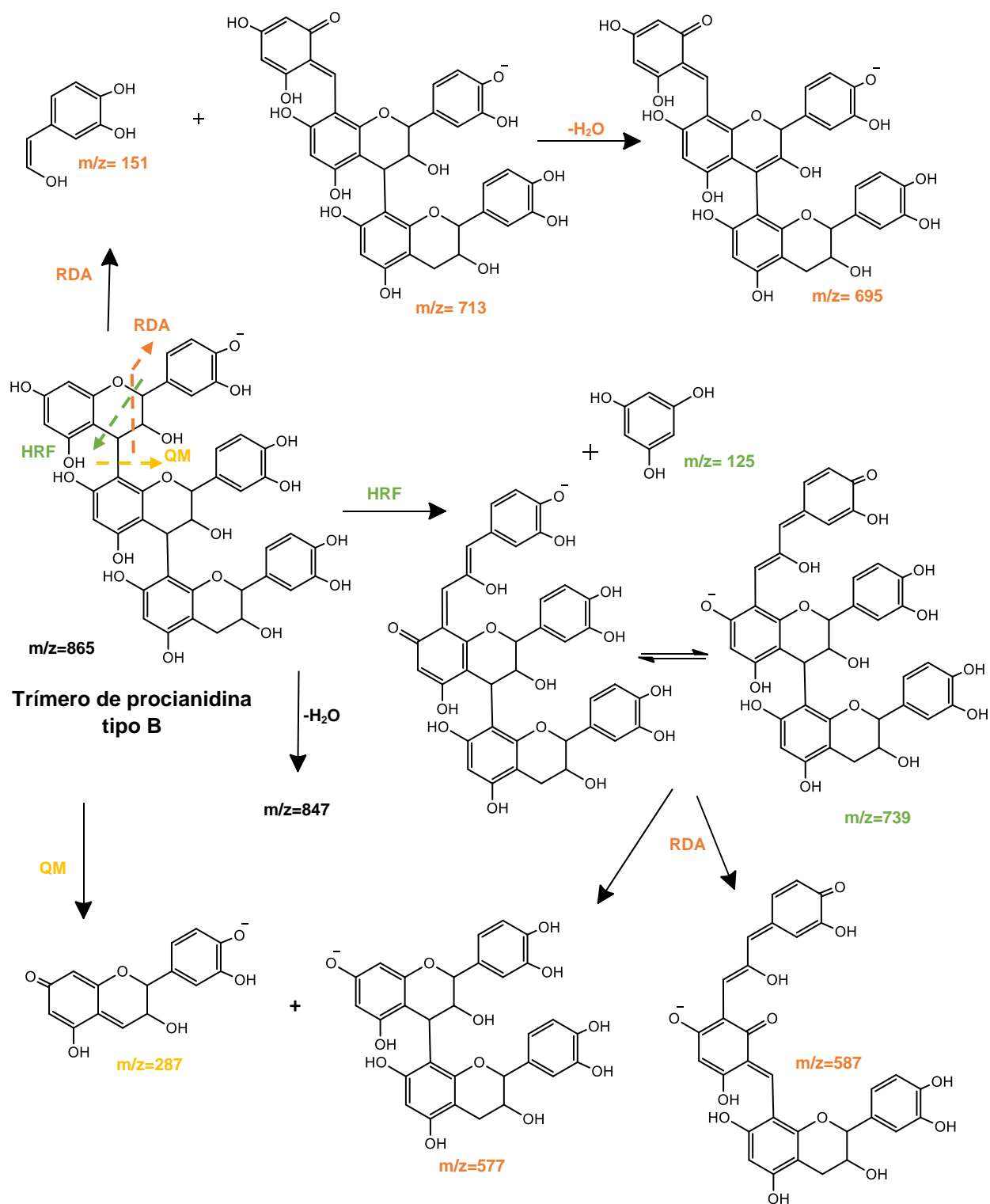
<sup>138</sup> SUN B., Op. Cit., p. 62.

Figura 37. a) Estructuras químicas posibles para los compuestos fenólicos aislados en las fracciones **2b** y **3** y b) esquema de fragmentación de un trímero de procianidina tipo B.



a)





b)

Fuente: a) BITTNER K. *et al.*, 2013 y b) TEIXEIRA N. *et al.*, 2016.

En la tabla 7 se resume la información analítica e identificación parcial de los principales compuestos polifenólicos aislados de la semilla de aguacate.

Tabla 7: Principales compuestos fenólicos detectados en el ERP de la semilla de aguacate y las fracciones aisladas mediante cromatografía de exclusión molecular.

Fracción	No pico	tr (min)	% Área rel. <sup>1</sup>	$\lambda_{m\acute{a}x.}$ (nm)	m/z [M-H] <sup>+</sup> (f) <sup>2</sup>	Identificación parcial
<b>F1-Met30<sup>3</sup></b>	1	9,745	20,6	323 (300h)	353	Isómero de ácido cafeoilquínico (I)
	5	13,176	<b>67,0</b>	323 (300h)	353 (191)	Isómero de ácido cafeoilquínico (II)
	8	20,259	12,4	263	441	(+)-Catequin/(-)-Epicatequin 3-O-galato
<b>F2a-Met60<sup>3</sup></b>	2	10,915	34,1	279	577 (425)	Dímero procianidina tipo B (I)
	4	12,262	<b>53,6</b>	279	289	(+)-Catequina
	a	15,372	12,3	279	289	Estereoisómero de catequina ((-)-Epicatequina)
<b>F2b-Met60<sup>3</sup></b>	3	12,125	<b>56,8</b>	279	865 (577)	Trímero procianidina tipo B (I)
	b	15,856	23,0	279	863	Trímero procianidina tipo A (I)
	c	16,152	20,1	279	865 (577)	Trímero procianidina tipo B (II)
<b>F3-Acet60<sup>4</sup></b>	6	13,729	37,7	279	865	Trímero procianidina tipo B (III)
	7	14,967	<b>62,3</b>	279	863	Trímero procianidina tipo A (II)

<sup>1</sup> Área rel.: área relativa, <sup>2</sup>f: ión fragmento, <sup>3</sup>Met30, Met60: metanol al 30% y 60% y <sup>4</sup>Acet60: Acetona al 60%.

Como se observa en la tabla 7 los diferentes tipos de polifenoles aislados de la semilla de aguacate: ácidos fenólicos, flavanoles y procianidinas tipo A y B, se lograron separar mediante cromatografía de exclusión por tamaño en diferentes fracciones de composición más simple. En consistencia con la literatura, se encontró que las primeras fracciones en eluir **F1** y **F2a** (con metanol 30% y 60% respectivamente) contienen compuestos fenólicos de menor tamaño molecular, como ácidos hidroxicinámicos, monómeros tipo catequina y un dímero de procianidina; mientras que las fracciones más retenidas **F2b** y **F3** (con metanol 60% y acetona 60% respectivamente) son ricas en polifenoles de mayor tamaño molecular, como trímeros de procianidina tipo A y B.

Por otra parte, con respecto al potencial bioactivo de los compuestos fenólicos aislados de la semilla de aguacate, destacan los isómeros de ácido clorogénico y las procianidinas, que de acuerdo a la literatura científica presentan numerosas propiedades como antivirales, antibacterianos, antimicótico, antioxidante; además

efectos antiinflamatorios, antitumorales, antidiabéticos y anticancerígenos<sup>139,140</sup>. Adicionalmente, los flavonoides tipo catequina también destacan por presentar un alto potencial antioxidante, además de ayudar en el tratamiento de problemas circulatorios, arteriosclerosis, trombosis arteriales y enfermedades crónicas como el cáncer<sup>141</sup>. De manera particular, se ha publicado sobre el potencial de la (+)-catequina y (-)-epicatequina en ejercer propiedades neuroprotectoras y prevenir la muerte de las células neuronales<sup>142,143</sup>.

Finalmente, como se mencionó anteriormente con el fin estudiar el efecto del pardeamiento de la semilla debido a su exposición directa al aire y la luz, sobre el perfil polifenólico del extracto crudo aislado, en la figura 38 se presentan los perfiles cromatográficos (registrados a  $\lambda$  de 280 nm y 325 nm) de los extractos crudos de la semilla expuesta directamente al aire por una hora (EC-Semilla EA) y de la semilla protegida de la luz y aire (EC-Semilla).

---

<sup>139</sup> CHEN L. *et al.* Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: Evidence for quinone methide mechanism. En: Food Chemistry, 2014. vol. 154, p. 315–322.

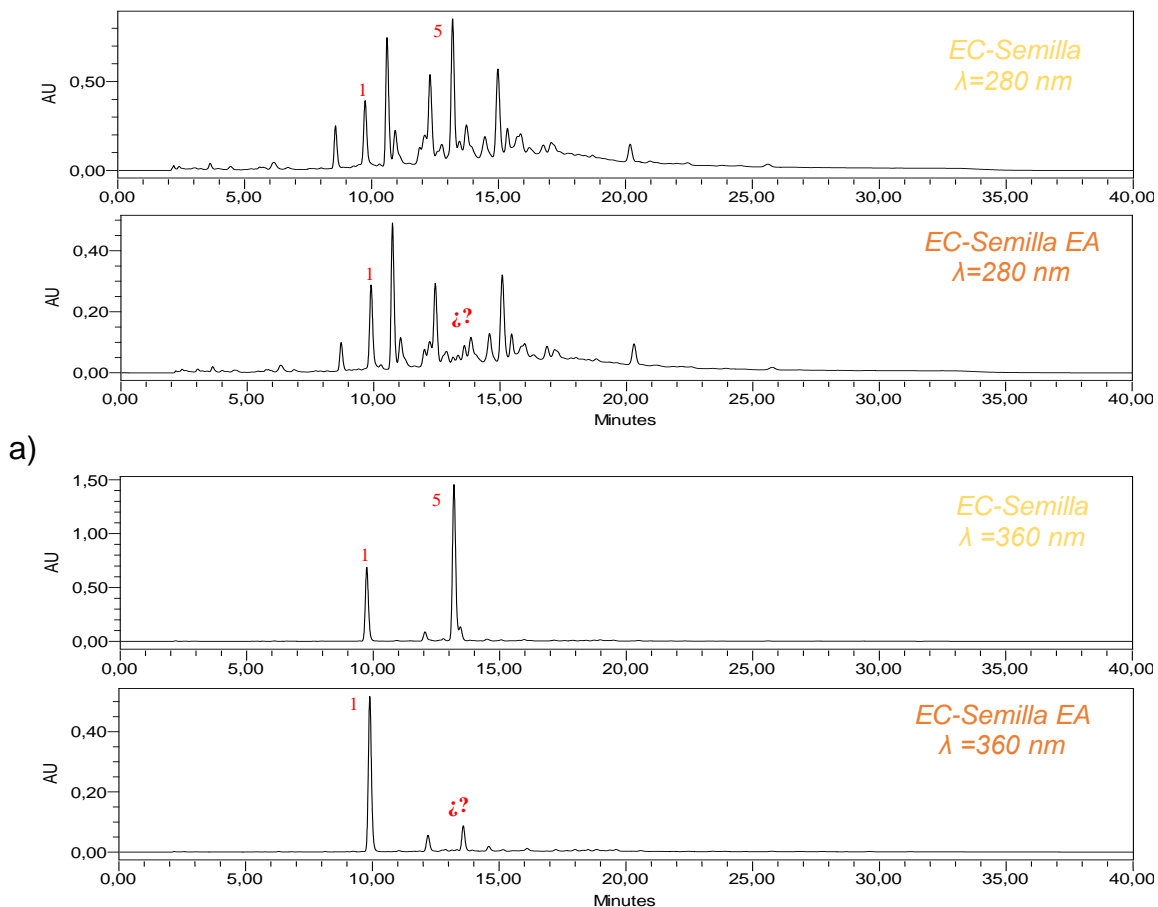
<sup>140</sup> DAWIDOWICZ A. y Typek R. Transformation of 5-O-Caffeoylquinic Acid in Blueberries during High-Temperature Processing. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. vol. 62, p. 10889–10895.

<sup>141</sup> CALA M. y VÁSQUEZ A. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia *labiaceae*, y determinación de su actividad antioxidante. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad De Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga. 2008.

<sup>142</sup> KÜRBITZ C., Heise D. Redmer T., Goumas F., Arlt A., Lemke J., Rimbach G., Kalthoff H. y Trauzold A. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. En: Cancer Science, 2011. vol. 102, no. 4, p. 728–734.

<sup>143</sup> CHANG C. y Wu R. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC–MS. En: Food Chemistry, 2011. vol. 126, p. 710–717.

Figura 38: Perfil cromatográfico (HPLC-PAD) del extracto crudo de la semilla no expuesta (EC semilla) y expuesta al aire (EC Semilla EA) a una  $\lambda$  de 280 nm (a) y 360 nm (b).



b)

Fuente: Esta investigación.

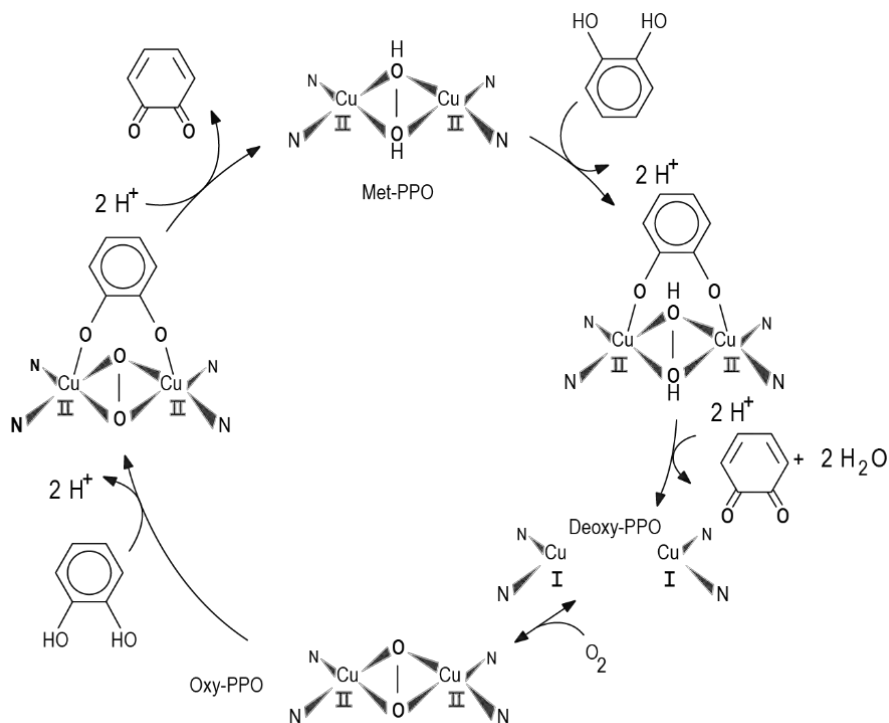
Como se observa en la figura 38, en el cromatogramas obtenido para el EC de la semilla expuesta al aire (EC semilla EA) es evidente la ausencia del pico cromatográfico **5**, que de acuerdo al análisis previo se identificó como uno de los isómeros del ácido cafeoilquínico; lo cual posiblemente se debe a que en presencia de oxígeno molecular, la enzima polifenol oxidasa (PPO) cataliza selectivamente su oxidación<sup>144,145</sup>. Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos se oxidan a la correspondiente quinona la que participa en reacciones de polimerización (no catalizadas enzimáticamente) formando compuestos de mayor tamaño molecular como las melaninas, que pueden ser los

<sup>144</sup> DOS SANTOS B. *et al.*, Op. Cit., p. 548–553.

<sup>145</sup> PIERPOINT W. The Enzymic Oxidation of Chlorogenic Acid and some Reactions of the Quinone Produced. *En: Biochemical Journal*, 1968. vol. 98, p. 567.

responsables de la coloración marrón observada en la superficie de la semilla<sup>146</sup>. El mecanismo de reacción para estas transformaciones oxidativas por la acción catalítica de la enzima PPO se esquematiza en la siguiente figura:

Figura 39: Mecanismo de la reacción de oxidación mediada por la acción catalítica de la enzima polifenol oxidasa (PPO).



Fuente: YORUK R. y Marshall M., 2003.

De acuerdo a la literatura la enzima polifenol oxidasa actúa sobre dos tipos de sustratos, como monohidroxifenoles que mediante su actividad monofenolasa o creolasa son convertidos a *o*-dihidroxifenoles; y sobre estos últimos, que mediante su actividad difenolasa o catecolasa oxida a las correspondientes benzoquinonas. De especial interés para el presente estudio es la actividad difenolasa o catecolasa, mediante la cual se desarrolló la transformación de uno de los isómeros de ácido cafeoilquínico (un *o*-dihidroxifenol) a la correspondiente benzoquinona. Como se observa en la figura, en la actividad catecolasa de la enzima, el *o*-dihidroxifenol se puede unir al sitio activo de la enzima, caracterizado por la presencia de dos átomos de cobre, en su forma de reposo met-PPO(Cu<sup>+2</sup>) o en su forma oxy-PPO(Cu<sup>+1</sup>). Inicialmente, forma Met-PPO se reduce a su forma desoxy-PPO con la oxidación de una molécula de *o*-difenol (por remoción de los H de los grupos -OH), y luego se combina con oxígeno para convertirse a su forma oxi-PPO, que a su vez forma el complejo *o*-difenol-PPO que también conduce a la

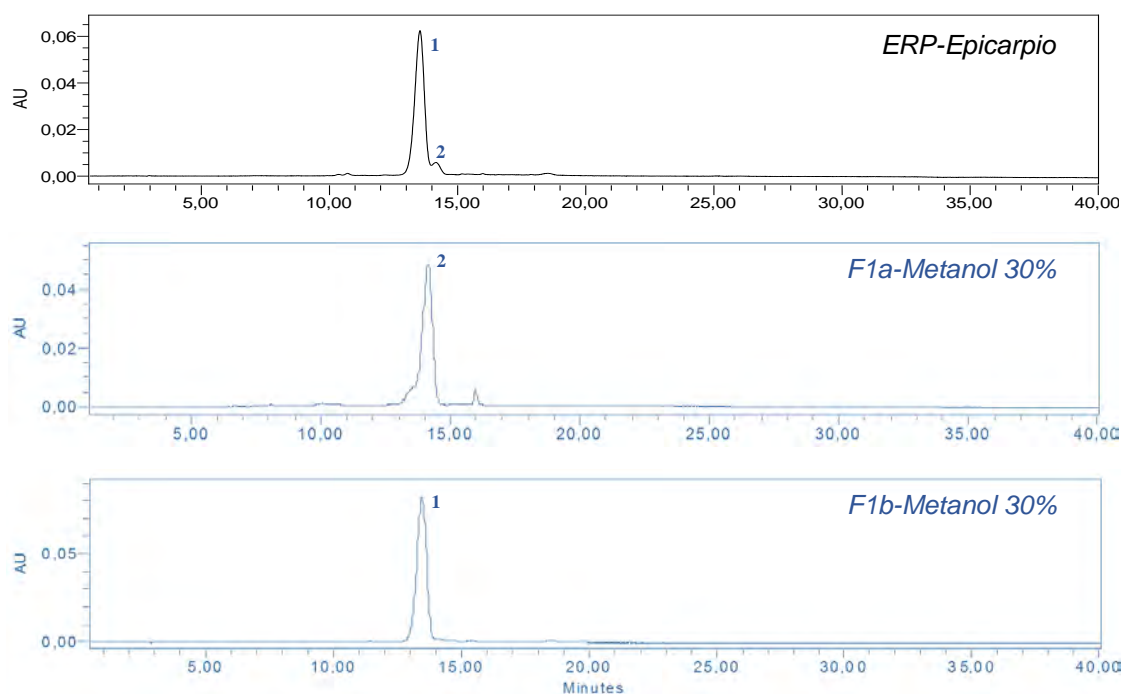
<sup>146</sup> YORUK R. y Marshall M., Op. Cit., p. 363-364.

formación de la correspondiente quinona; finalmente después de la oxidación la enzima se reduce hasta su forma de reposo inicial (Met-PPO)<sup>147,148</sup>.

#### 4.3.2 Análisis de la fracción polifenólica aislada del epicarpio de aguacate:

El seguimiento cromatográfico de los polifenoles aislados del epicarpio de aguacate se realizó a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ): 280 nm, 360 nm y 520 nm, que son características de diferentes tipos de compuestos fenólicos. Inicialmente, con el fin de estudiar la presencia de antocianinas en el ERP y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión molecular se registró los cromatogramas a una  $\lambda$  de 520 nm, presentados en la figura 40:

Figura 40. Perfiles cromatográficos registrados a 520 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño.



Fuente: Esta investigación.

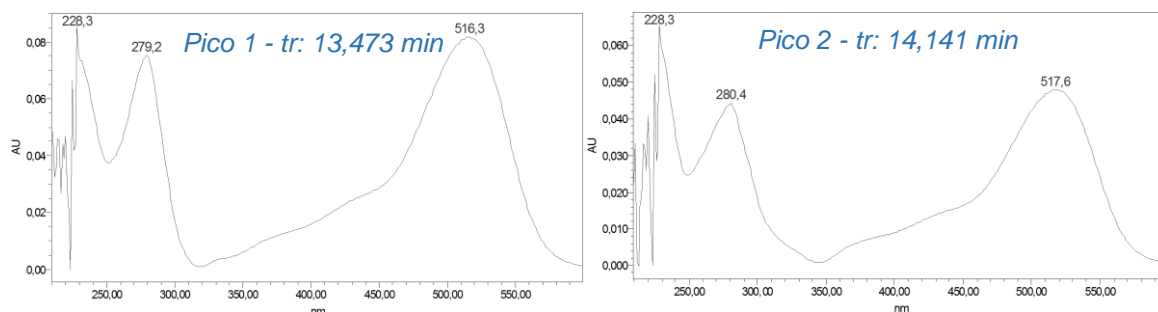
En el cromatograma del ERP del epicarpio registrado a una  $\lambda$  de 520 nm (figura 40) se observan dos compuestos fenólicos. Mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular fue posible separar los compuestos **1** y **2**. Estos compuestos muestran espectros UV-Vis similares entre sí con máximos de

<sup>147</sup> GUERRERO C. Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (*cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 2009.

<sup>148</sup> Ibid., p. 373-374.

absorción en 280 nm y 520 nm que son característicos de flavonoides tipo antocianina (figura 41).

Figura 41: Espectros UV-Vis de las antocianinas **1** (tr: 13,473 min) y **2** (tr: 14,141 min)



Fuente: Esta investigación.

Un estudio más detallado de los perfiles UV-Vis permitió determinar ciertas características estructurales de importancia para cada compuesto fenólico. En la tabla 8 se presentan algunos parámetros espectroscópicos de importancia para los compuestos **1** y **2**. De acuerdo a la literatura las relaciones de absorbancia  $Abs.\lambda_{440}/ Abs.\lambda_{m\acute{a}x(vis)}$  mayores a 0,3 sugieren que las dos antocianinas son monoglucósidos sustituidos en la posición 3; y además, la ausencia de un máximo de absorbancia en la región entre 300 y 360 nm indica que no existen grupos acilo en las estructuras<sup>149</sup>.

Tabla 8: Parámetros espectroscópicos (UV-Vis) para cada una de las antocianinas aisladas.

No	$T_R$ (min)	$\frac{Abs.\lambda_{440}}{Abs.\lambda_{m\acute{a}x(vis)}}$	$Abs.\lambda_{m\acute{a}x(300-360)}$
<b>1</b>	13,473	0,3264	-
<b>2</b>	14,141	0,3189	-

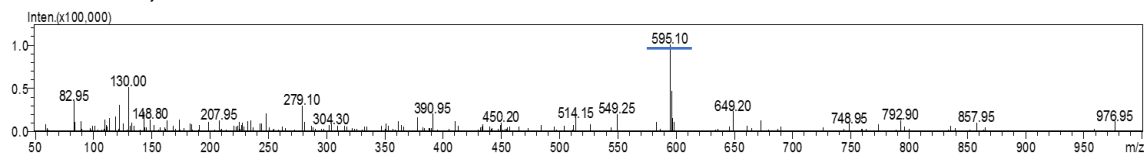
El análisis del espectro de masas de la antocianina aislada en la fracción **1a** (pico **2**, tr: 14,141 min) muestra una señal m/z 595u correspondiente al ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  (figura 42), que corresponde a la cianidina enlazada a un biósido hexosa- metil pentosa o una hexosa acilada con un grupo cumarilo<sup>150</sup>. Sin embargo, como se mencionó anteriormente el perfil UV-Vis no muestra la presencia de grupos acilo, por lo tanto la estructura más probable para este compuesto es la cianidina 3-O-rutinósido comúnmente encontrada en las plantas

<sup>149</sup> FRANCIS F. Analysis of Anthocyanins. En: Anthocyanins as Food Colors, 1982. Pericles Markakis. New York. Capítulo 7. p. 182-207.

<sup>150</sup> SUN-WATERHOUSE D., Zhou J. y Wadhwa S. Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. En: Food Control, 2013. vol. 32, p. 450-460.

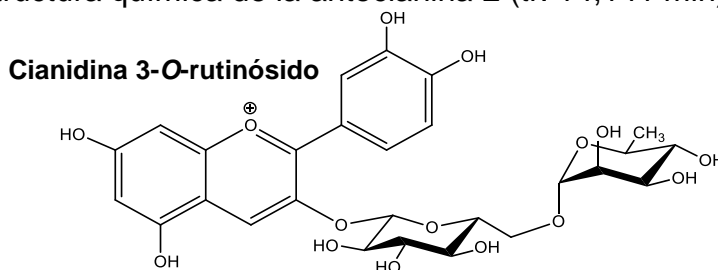
(figura 43)<sup>151</sup>. El análisis cromatográfico de un patrón de esta antocianina, bajo las mismas condiciones de las muestras, permitió confirmar por comparación de los tiempos de retención su identidad ( $\Delta tr$ : 0,005) (anexo C).

Figura 42. Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) de la antocianina **2** (tr: 14,141 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 43. Estructura química de la antocianina **2** (tr: 14,141 min).



Fuente: Sun-Waterhouse D., Zhou J. y Wadhwa S., 2013.

Por otra parte, el espectro de masas de la antocianina aislada en la fracción **1b** (Pico **1**, tr: 13,473 min) muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  449 y un ión fragmento en  $m/z$  287 correspondiente a la aglicona cianidina (figura 44). El ión  $[M+H-162]^+$  sugiere que la aglicona se encuentra enlazada a una hexosa (glucosa ó galactosa). La identificación exacta del azúcar y de su posición en la molécula no es posible con la información analítica disponible en el presente estudio, para lo cual es necesario el uso de técnicas adicionales como la resonancia magnética nuclear (RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ ). Sin embargo, se plantea que esta puede corresponder a la glucosa mayoritariamente encontrada en las antocianinas. De esta manera, y basándose en los datos espectroscópicos previos, se plantea que la estructura más probable es la cianidina 3-O-glucósido (figura 45), identificada en otros estudios en el epicarpio de aguacate<sup>152</sup>. De acuerdo a lo anterior, se sugiere que las dos antocianinas aisladas son las responsables de la coloración morada oscura del epicarpio del fruto<sup>153</sup>.

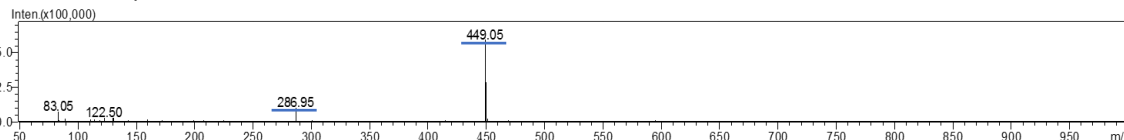
<sup>151</sup> ABAD-GARCÍA B. *et al.* A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *En: Journal of Chromatography A*, 2009. vol. 1216, p. 5398–5415.

<sup>152</sup> KOSIŃSKA A., *Op. Cit.*, p. 4617.

<sup>153</sup> COX K., *et al.* Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *En: Postharvest Biology and Technology*, 2004. vol. 31, p. 287–294.

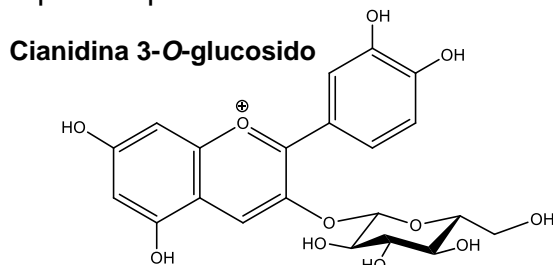


Figura 44. Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) de la antocianina **1** (tr: 13,473 min).



Fuente: Esta investigación.

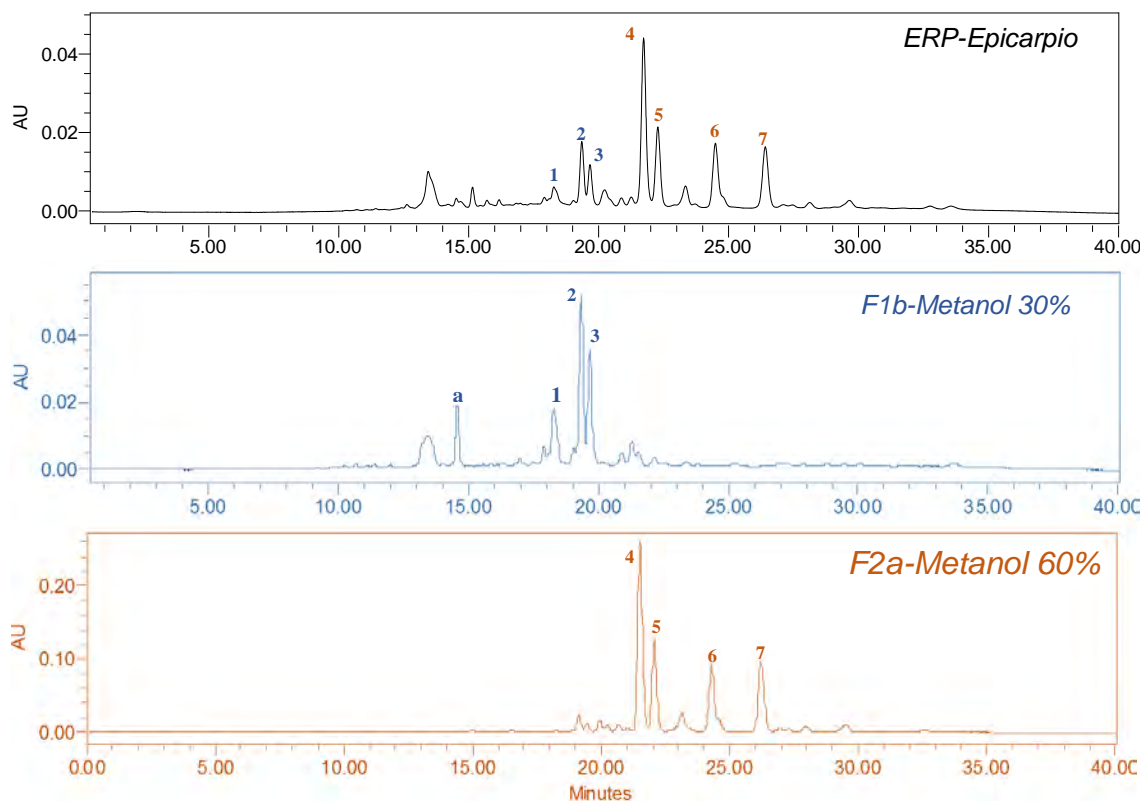
Figura 45. Estructura química probable de la antocianina **1** (tr: 13,473 min).



Fuente: Sun-Waterhouse D., Zhou J. y Wadhwa S., 2013.

Continuando con el estudio de los diferentes tipos de polifenoles aislados del epicarpio de aguacate se registraron los perfiles cromatográficos a una  $\lambda$  de 360 nm para los extractos y fracciones polifenólicas del epicarpio de aguacate (figura 46).

Figura 46: Perfiles cromatográficos registrados a 360 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño.



Fuente: Esta investigación.

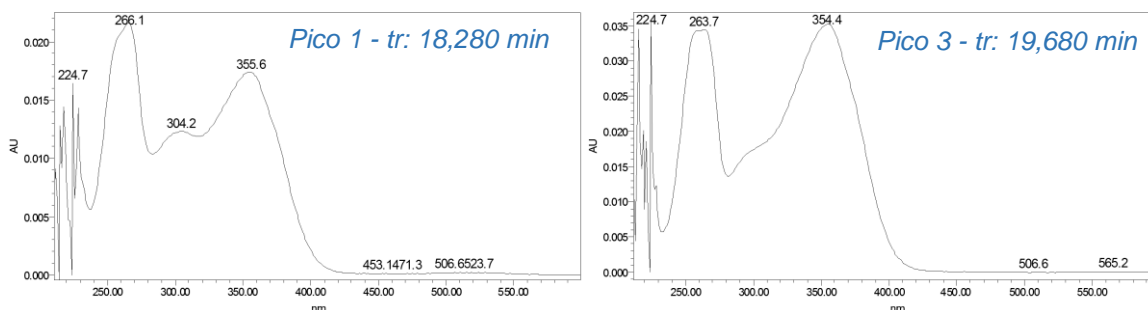
Como se observa en la figura 43 los compuestos mayoritarios detectados a  $\lambda$  360 nm en el ERP, se lograron aislar en la fracción **2a** (eluida con metanol al 60%); mientras que los compuestos minoritarios fueron eluidos en la fracción **1b** (eluida con metanol al 60%). Los compuestos **1** y **3** (fracción **1b**) muestran espectros UV-Vis similares entre sí con máximos de absorción alrededor de 255 nm (banda II) y de 355 nm (banda I) que son característicos de glicósidos de flavonol (figura 47)<sup>154</sup>. Adicionalmente, ciertas características espectroscópicas como  $\lambda_{\text{máx}}$  en el rango de 347-370 nm para la banda I y de 250–267 nm para la banda II, con una mayor absorbancia en esta última (para el compuesto **1**), sugieren que el enlace aglicona-azúcar se encuentra en el carbono 3 del anillo heterocíclico<sup>155,156</sup>, como

<sup>154</sup> ISWALDI I., Gómez-Caravaca A., Lozano-Sánchez J., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. y Fernández-Gutiérrez A. Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *En: Food Research International*, 2013. vol. 50., p. 77–84.

<sup>155</sup> ABAD-GARCÍA B., Op. Cit. p. 5403.

en los 3-O-glicósidos de quercetina identificados en anteriores estudios en el epicarpio de aguacate, que presentan perfiles UV-Vis muy similares a los encontrados en este estudio<sup>157</sup>.

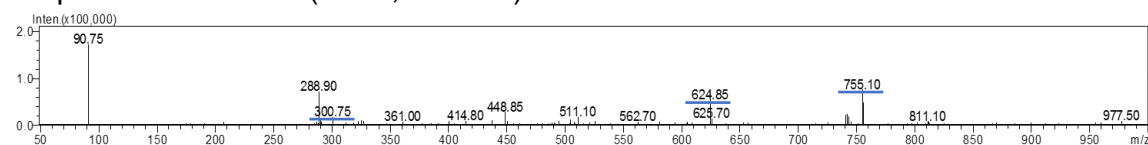
Figura 47. Espectros UV-Vis de los compuestos fenólicos **1** (tr: 18,280 min) y **3** (tr: 19,680 min).



Fuente: Esta investigación.

El espectro de masas del flavonol **1** (tr: 18,280 min y %A: 19,6) muestra una relación m/z de 755u correspondiente al ión pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> y un ión fragmento en m/z 301 (Figura 48). De acuerdo a lo publicado en la literatura, estas señales son características de un glicósido de quercetina enlazada a dos metil pentosas y una hexosa. El ion fragmento m/z 301 se debe a la pérdida de los azúcares [M-H-146-146-162]<sup>158</sup>. Los azúcares presentes en la estructura no pueden ser identificados mediante las técnicas analíticas desarrolladas; sin embargo podrían corresponder a la ramnosa y glucosa, que son mayoritariamente encontrados en las plantas<sup>159</sup>. De esta manera, y de acuerdo a los datos espectroscópicos previos, la estructura tentativa del flavonol detectado podría corresponder a la quercetina 3-O-ramnosil-ramnosil-glucosido (figura 49).

Figura 48. Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) correspondiente al compuesto fenólico **1** (tr: 18,280 min).



Fuente: Esta investigación.

Adicionalmente, como se observa en la figura 48 en este mismo espectro de masas se observa otras señales, de intensidad considerable que no son

<sup>156</sup> TIBERTI L., *et al.* Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *En: Journal of Chromatography B*, 2007. vol. 846, p. 378–384.

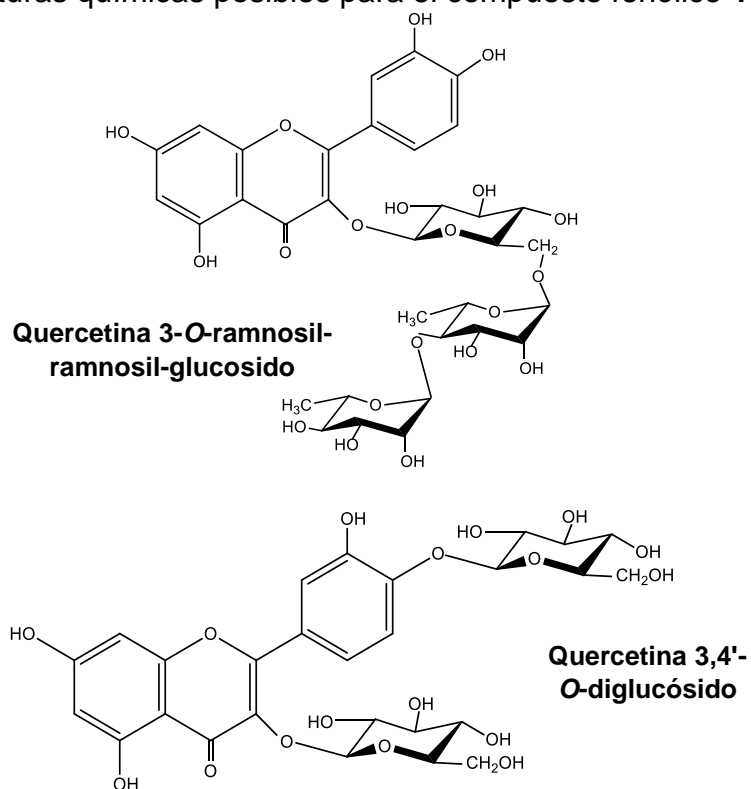
<sup>157</sup> KOSIŃSKA A., *Op. Cit.*, p. 4617.

<sup>158</sup> *Ibid.*, p. 4617.

<sup>159</sup> ABAD-GARCÍA B., *Op. Cit.* p. 5398.

consistentes con algún ión fragmento del glicósido de quercetina antes descrito. De esta manera, se plantea que la señal en  $m/z$  625 podría corresponder a un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  de quercetina enlazada a dos hexosas, como la quercetina 3-*O*-diglucósido o la quercetina 3,4'-*O*-diglucósido, de las cuales esta última ha sido identificada previamente en el epicarpio de aguacate (figura 48)<sup>160</sup>. De otro lado, la señal en  $m/z$  288,90 podría corresponder al ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  o ión fragmento de uno de los estereoisómeros de catequina, que como se describe más adelante se detectaron también en esta fracción (a una  $\lambda$  de 280 nm).

Figura 49. Estructuras químicas posibles para el compuesto fenólico 1.



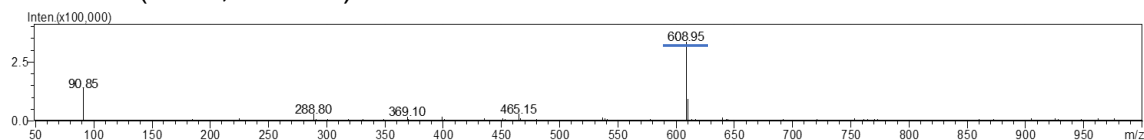
Fuente: PhytoChemical Interactions Data Base (PCIDB).

Por otra parte, el compuesto fenólico **3** (tr: 19,680 min y %Ar: 27,8) mostró un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  en  $m/z$  609u que corresponde a quercetina enlazado a una hexosa y una metil-pentosa (figura 50), como la quercetina 3-*O*-rutinosido, reportada previamente en el epicarpio de aguacate (figura 51)<sup>161</sup>. Por otra parte la señal de baja intensidad en  $m/z$  465 no se encontró consistente con la pérdida de alguno de los azúcares de la estructura propuesta, por lo que podría corresponder a otro compuesto coeluido en el análisis cromatográfico.

<sup>160</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

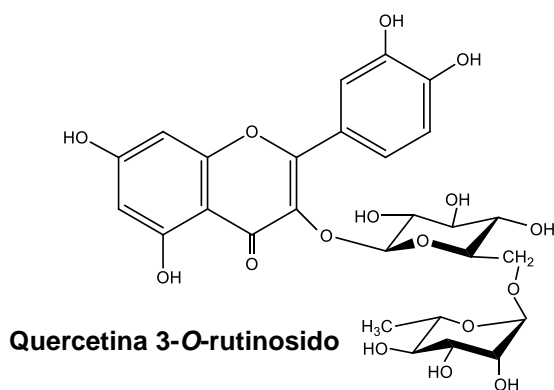
<sup>161</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

Figura 50. Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico **3** (tr: 19,680 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 51: Estructura química probable para compuesto fenólico **3** (tr: 19,680 min).



Fuente: NGUYEN T. *et al.*, 2013.

De manera similar que el glicósido de quercetina **3** previamente descrito (quercetina 3-O-rutinosido), el compuesto **2** (tr: 19,346 min y %Ar: 41,2) detectado también en esta misma fracción (**F1b**), muestra un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  en  $m/z$  609u, lo que sugiere que podría corresponder a un isómero de este último. Sin embargo, el correspondiente espectro UV-Vis mostró algunas diferencias importantes, como una menor  $\lambda_{m\acute{a}x}$  para la banda I (ubicada entre 339–350 nm), y una mayor intensidad de absorción en esta banda con respecto a la banda II (figura 52), que son características de otro tipo de flavonoides, como los glicósidos de flavonas<sup>162,163,164</sup>. Como se observa en la figura 53, en el espectro de masas de este compuesto no se encontró la señal característica del ión fragmento de la aglicona respectiva, que permitiera diferenciar entre un posible isómero posicional de este glicósido de quercetina (aglicona con  $m/z$  en 301) o un glicósido de

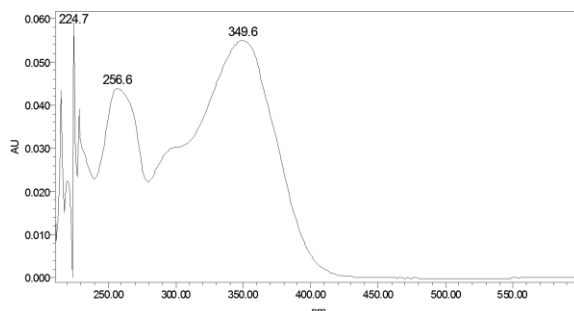
<sup>162</sup> CRISTEA D., Bateau I. y Vilarem G. Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.). *En: Dyes and Pigments*, 2003. vol. 57, p. 267–272.

<sup>163</sup> HUNG-JU C., Baskaran S. y Bing-Huei C. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *En: International Journal of Molecular Sciences*, 2012. vol. 13, p. 260-285.

<sup>164</sup> ABAD-GARCÍA B. *et al.*, *Op. Cit.*, p. 5403.

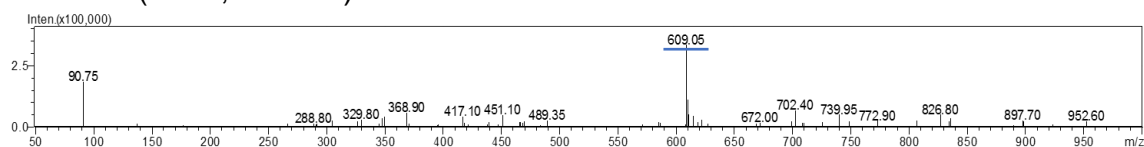
flavona, como la luteolina-hexosa-hexosa, que también presenta una masa molecular consistente con el ión pseudomolecular en  $m/z$  609 (aglicona con  $m/z$  en 285)<sup>165</sup>. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de análisis adicionales ( $MS^n$  y RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ ) para determinar con mayor exactitud la identidad del compuesto fenólico detectado. No obstante, se sugiere una probable estructura para la flavona detectada, como la luteolina 3',7-diglucósido que presenta un perfil UV-Vis muy similar al compuesto detectado (figura 54)<sup>166</sup>.

Figura 52. Espectro UV- Vis del compuesto fenólico **2** (Tr: 19,346 min).



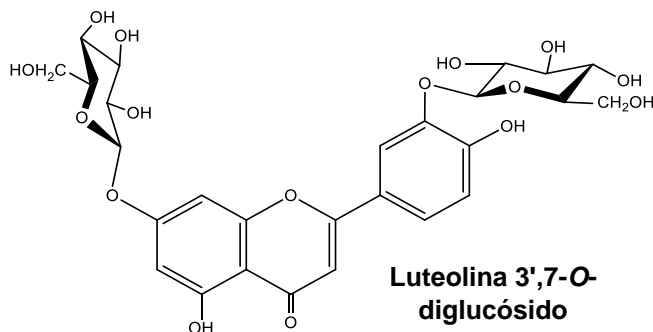
Fuente: Esta investigación.

Figura 53. Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto fenólico **2** (tr: 19,346 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 54. Estructura química propuesta para el compuesto fenólico **2** (tr: 19,346 min).



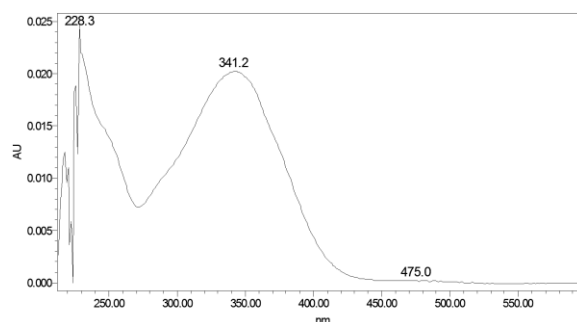
Fuente: CRISTEA D., Bateau I. y Vilarem G., 2003.

<sup>165</sup> HUNG-JU C., Baskaran S. y Bing-Huei C., Op. Cit. 272.

<sup>166</sup> CRISTEA D., Bateau I. y Vilarem G., Op. Cit., p. 269.

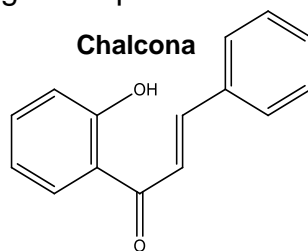
Finalmente, entre los compuestos fenólicos aislados en la fracción **1b**, el compuesto **a** (tr: 14,587 min y %Ar: 11,4) no mostró un espectro de masas claro. Sin embargo, presentó un espectro UV-Vis con un máximo de absorción alrededor de 341, característico de chalconas, por lo que se sugiere podría corresponder a este tipo de flavonoides, que presentan perfiles UV-Vis con máximos de absorción entre 340-390nm<sup>167</sup>. De acuerdo a la literatura este tipo de compuestos fenólicos pueden encontrarse de forma natural o como producto de degradación de flavonoides como las antocianinas, debido a la influencia de diferentes factores en su estabilidad química; como la temperatura, pH o exposición a la luz<sup>168</sup>. En la figura 56 se presenta la estructura química general para una chalcona. Como es evidente, es necesario obtener información analítica (MS, RMN) adicional que permita confirmar el supuesto realizado.

Figura 55. Espectro UV-Vis para el compuesto **a** (Tr: 14,587 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 56. Estructura química general para una chalcona<sup>169</sup>.



Fuente: Ramírez M. *et al.*, 2012.

De manera similar a los glicósidos de quercetina detectados en la fracción **1b**, los compuestos aislados en la fracción **2a** (picos **4**, **5**, **6** y **7**) presentaron espectros

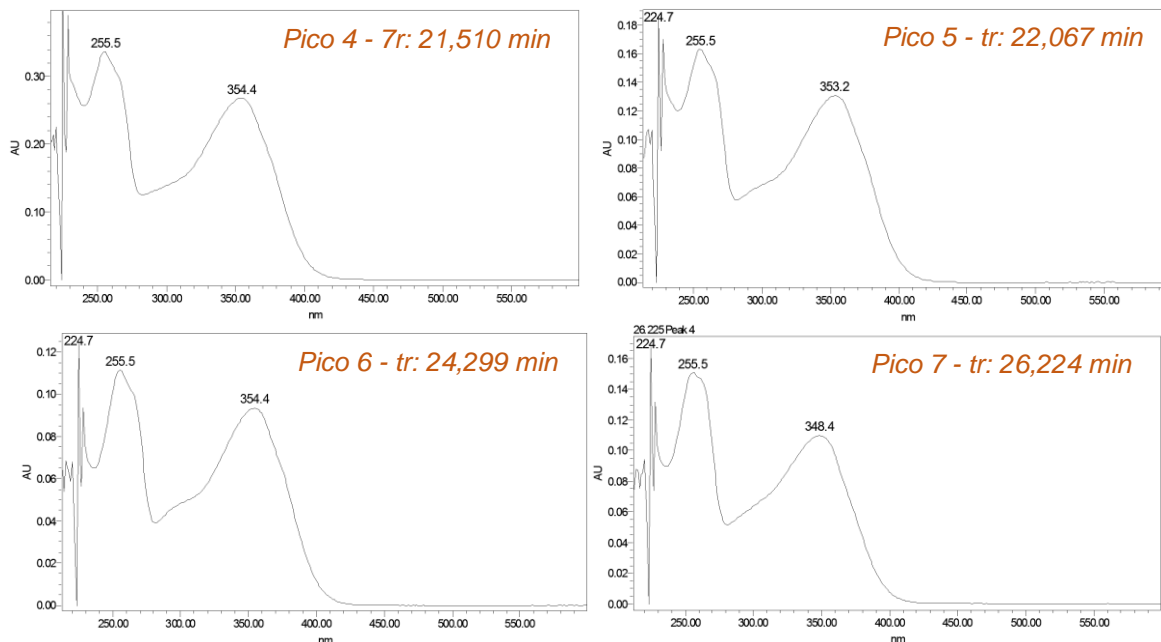
<sup>167</sup> DEY P. y Harborne. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1. Plant Phenolics. Capítulo 7. Chalcones and aurones. Academic press. London, 1989. p. 243.

<sup>168</sup> HERAZO I. Obtención y estabilización de antocianinas de berenjena (*Solanum Melongena* L.) mediante microencapsulación y su evaluación como compuesto funcional en la industria alimentaria. Tesis de maestría en Ciencia Agroalimentaria con énfasis en Ciencias de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Berástegui, Córdoba, 2013.

<sup>169</sup> RAMÍREZ M., Barajas L., Pérez C., Sáenz A. y Silva S. Síntesis y actividad biológica de chalconas. *En: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2012. vol. 43, no. 4.

UV-Vis característicos de estos flavonoides, con una banda de absorción de mayor intensidad alrededor de 256 nm y otra de menor intensidad alrededor de 355 nm (figura 57). Como se describe a continuación, el análisis de los correspondientes espectros de masas permitió identificar parcialmente cada uno de los glucósidos de quercetina detectados.

Figura 57. Espectro UV-Vis de los compuestos fenólicos **4** (tr: 21,510 min), **5** (tr: 22,067 min), **6** (tr: 24,299 min) y **7** (tr: 26,224 min).



Fuente: Esta investigación.

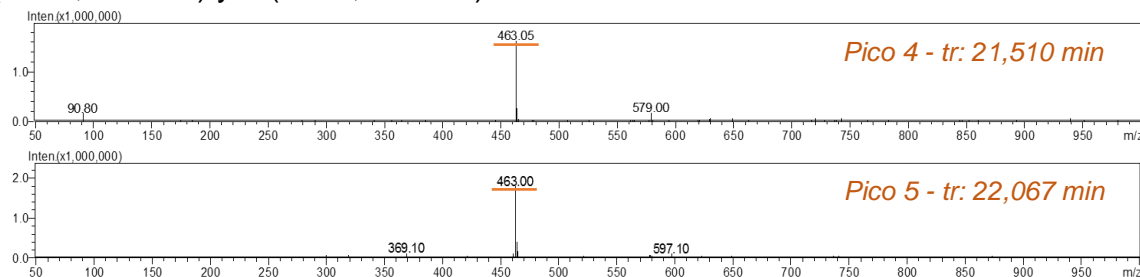
Inicialmente, se encontró que los picos cromatográficos **4** (tr: 21,510 min y %Ar: 40,9) y **5** (tr: 22,067 min y %Ar: 20,5) presentaron un mismo ión pseudomolecular en  $m/z$  463u que corresponde a quercetina enlazada a una hexosa (figura 58); como la glucosa y la galactosa, que ha sido reportadas en estudios previos en el epicarpio de aguacate<sup>170,171</sup>. De esta manera, y teniendo en cuenta los datos espectroscópicos previos, se sugiere que los compuestos detectados corresponden a la quercetina 3-O-glucósido y quercetina 3-O-galactósido (Figura 59). Sin embargo, como se mencionó con la información analítica disponible no es posible discriminar entre estas estructuras isoméricas.

<sup>170</sup> ABAD-GARCÍA B., Op. Cit. p. 5398.

<sup>171</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

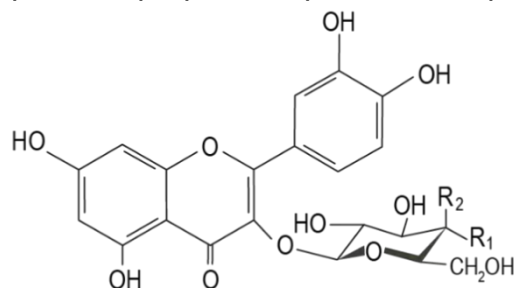


Figura 58. Espectros de masas (ESI-MS, modo negativo) para los compuestos **4** (tr: 21,510 min) y **5** (tr: 22,067 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 59. Estructuras químicas propuestas para los compuestos **4** y **5**.



**Quercetina 3-O-glucósido:**  $R_1=OH$  y  $R_2=H$

**Quercetina 3-O-galactósido:**  $R_1=H$  y  $R_2=OH$

Fuente: KHALLOUKI F. *et al.*, 2015 y CASTILLO-MUÑOZ N. *et al.*, 2010.

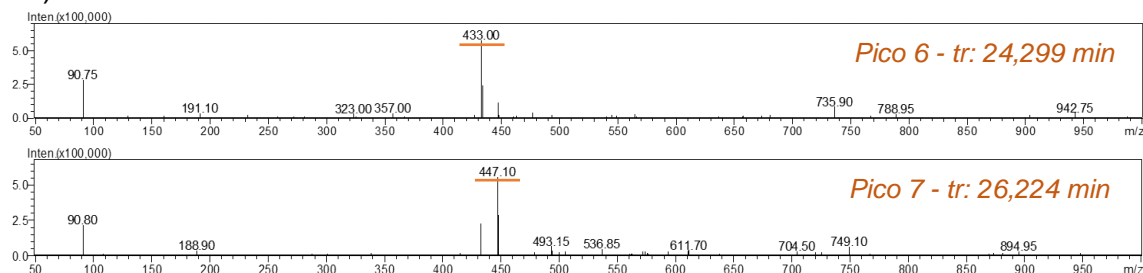
Por otra parte, en la figura 57 se muestran los espectros de masas de los picos cromatográficos **6** (tr: 24,299 min y %Ar: 19,1) y **7** (tr: 26,224 min y %Ar: 19,5), donde se observan señales para los iones pseudomoleculares en  $m/z$  433 y 447 respectivamente. De acuerdo a la literatura estas señales corresponden a quercetina enlazada a una pentosa en el caso del pico **6**<sup>172</sup>, y a una metil-pentosa en el caso del pico **7**<sup>173</sup>. De manera similar que para los glicósidos de quercetina descritos previamente, para estos compuestos no se observó la señal en  $m/z$  301 correspondiente al ión fragmento de quercetina. Sin embargo, teniendo en cuenta lo publicado en la literatura junto con las características de los perfiles UV-Vis de los compuestos fenólicos detectados (figura 57), se sugiere estos compuestos podrían corresponder a quercetina 3-O-arabinósido y quercetina 3-O-ramnósido

<sup>172</sup> KHALLOUKI F. *et al.* Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits. *En:* Food Chemistry, 2015. vol. 179, p. 191–198.

<sup>173</sup> CASTILLO-MUÑOZ N. *et al.* Flavonol profiles of Vitis vinifera white grape cultivars. *En:* Journal of Food Composition and Analysis, 2010. vol. 23, p. 699–705

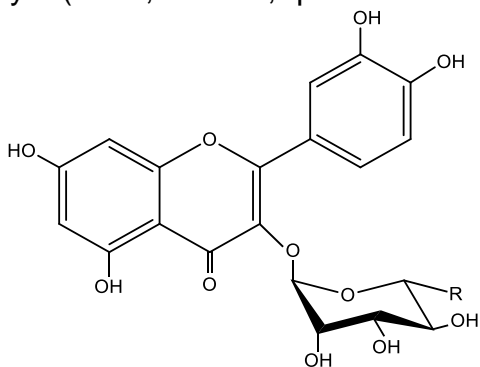
respectivamente (figura 61). El primero de estos flavonoles ya se ha reportado en aguacate<sup>174</sup>.

Figura 60. Espectros de masas de los compuestos **6** (tr: 24,299 min) y **7** (tr: 26,224 min).



Fuente: Esta investigación.

Figura 61. Estructuras químicas propuestas para los compuestos **6** (tr: 24,299 min, quercetina 3-O-pentosa) y **7** (tr: 26,224 min, quercetina 3-O-metil pentosa).



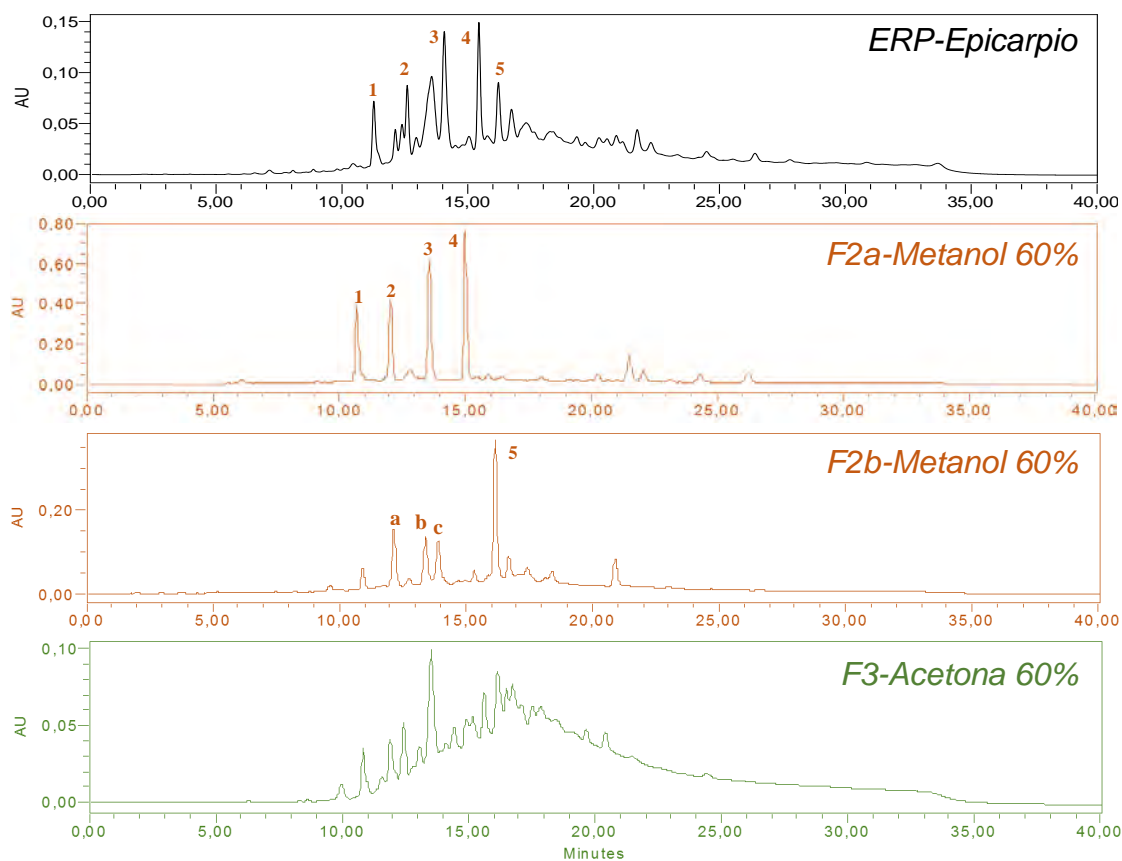
**Quercetina 3-O-arabinosido:** R=H  
**Quercetina 3-O-ramnosido:** R=CH<sub>3</sub>

Fuente: KHALLOUKI F. *et al.*, 2015 y DOS SANTOS A. *et al.*, 2014.

Finalmente, para el ERP y fracciones polifenólicas aisladas del epicarpio de aguacate se registró los perfiles cromatográficos a una longitud de onda de 280 nm, éstos se presentan en la figura 62.

<sup>174</sup> KOSIŃSKA A., Op. Cit., p. 4617.

Figura 62: Perfiles cromatográficos registrados a una  $\lambda$  de 280 nm para el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño.



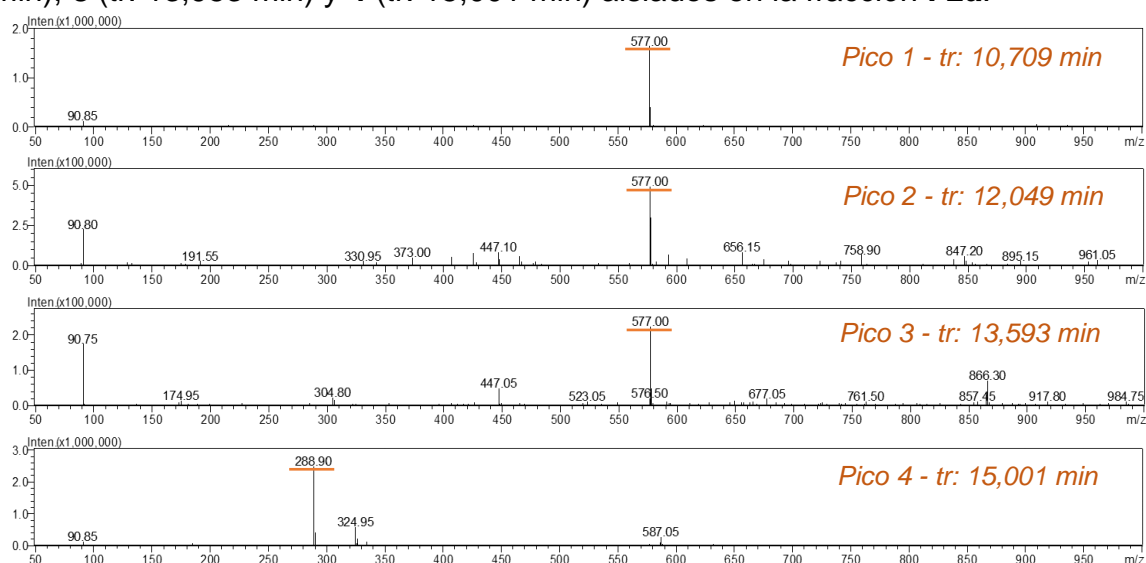
Fuente: Esta investigación.

Como se observa en la figura 62, la mayoría de los compuestos fenólicos detectados en el ERP del epicarpio a una  $\lambda$  de 280 nm se lograron aislar en la fracción **2a** (eluida con metanol al 60%). De otro lado, se observa que la última fracción (F3) (eluida con acetona al 60%) presenta un perfil cromatográfico característico de compuestos fenólicos de tipo polimérico con picos no resueltos, debido posiblemente a su alto grado de polimerización.

De manera similar que en las muestras de la semilla de aguacate, en el ERP y en algunas de las fracciones aisladas del epicarpio de aguacate se identificaron parcialmente dímeros y trímeros de procianidina, que como se mencionó previamente muestran un espectro UV-Vis característico con un máximo de absorción en 279 nm. El análisis de los espectros de masas de los polifenoles

detectados indicó que la fracción **2a** se encuentra enriquecida principalmente en dímeros de procianidina; mientras que la fracción **2b**, se encuentra enriquecida en trímeros de procianidina. Como se observa en la figura 63, en la fracción **2a**, los compuestos fenólicos **1** (tr: 10,709 min y %Ar: 18,9), **2** (tr: 12,049 min y %Ar: 19,1) y **3** (tr: 13,953 min y %Ar: 29,9) muestran un ión pseudomolecular en comuna a una  $m/z$  577u, que como se describió previamente, corresponde a dímeros de procianidina tipo B. Además, el compuesto **4** (tr: 15,001 min y %Ar: 32,1) aislado también en esta fracción, muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  289u que corresponde a uno de los estereoisómeros de catequina, que por comparación de los tiempos de retención con los estereoisómeros detectados en las muestras de la semilla de aguacate ( $\Delta t$ : 0,371 min), se sugiere es (-)-epicatequina.

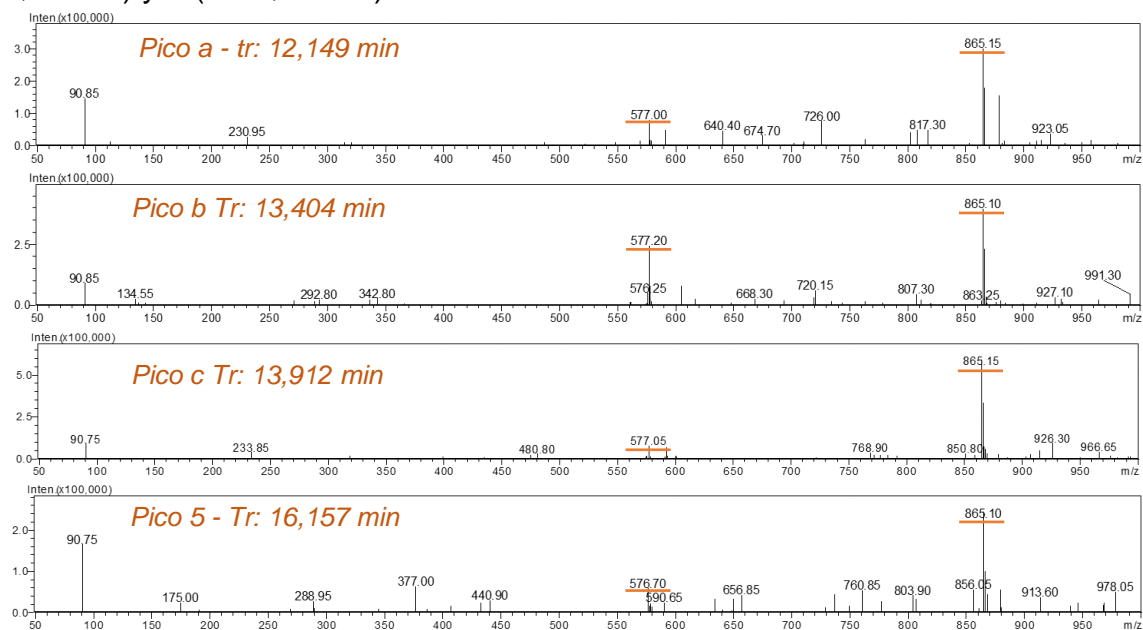
Figura 63. Espectros de masas de los compuestos **1** (tr: 10,709 min), **2** (tr: 12,049 min), **3** (tr: 13,953 min) y **4** (tr: 15,001 min) aislados en la fracción **F2a**.



Fuente: Esta investigación.

Por otra parte, como se observa en la figura 64, en la fracción **2b**, el compuesto mayoritario **5** (tr: 16,157 min y %Ar: 42,5), y los compuestos **a** (tr: 12,149 min y %Ar: 19,2), **b** (tr: 13,404 min y %Ar: 19,4) y **c** (tr: 13,912 min y %Ar: 18,9) presentes en una menor proporción, muestran un ión pseudomolecular en común a una  $m/z$  865u correspondiente a trímeros de procianidinas tipo B. Adicionalmente, en todo los espectros de masas se observa una señal correspondiente a un ión fragmento en  $m/z$  577u, que como se mencionó previamente en el caso de la semilla, se origina por la pérdida de una unidad de tipo catequina mediante una escisión tipo metenil quinona (figura 37, b).

Figura 64. Espectros de los compuestos **a** (tr: 12,149 min), **b** (tr: 13,404 min), **c** (tr: 13,912 min) y **5** (tr: 16,157 min) aislados en la fracción **F2b**.



Fuente: Esta investigación.

En la tabla 9 se resume la información analítica e identificación parcial de los compuestos fenólicos aislados del epicarpio de aguacate.

Tabla 9: Principales compuestos fenólicos detectados en el ERP del epicarpio de aguacate y las fracciones aisladas mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

$\lambda$	Frac.	No pico	Tr (min)	% Área Rel.	$\lambda_{m\acute{a}x.1}$ (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x.2}$ (nm)	[M-H] o [M+H] <sup>+</sup> / (frag.)	Identificación parcial	
520 nm	F1a	2	14,141	100,0	280	518	595 (+)	Cianidina 3-O-rutinósido	
	F1b	1	13,473	100,0	279	516	449 (+) (287)	Cianidina 3-O-hexosa (Cianidina 3-O-glucósido)	
360 nm	F1b	a	14,587	11,4	341	-	-	-	
		1	18,280	19,6	257	354	625 (301)	Quercetina hexosa hexosa (Quercetina 3,4'-O- diglucósido)	
		2	19,346	41,2	256	348	609	Luteolina hexosa hexosa o Quercetina hexosa-metil pentosa	
		3	19,680	27,8	257	354	609	Quercetina 3-O-hexosa- metil pentosa (Quercetina 3-O-rutinósido)	
	F2a	4	21,510	40,9	256	354	463	Quercetina 3-O-hexosa (Quercetina-3-O- galactósido y	
		5	22,067	20,5	256	353	463	Quercetina-3-O-glucósido)	
		6	24,299	19,1	256	354	433	Quercetina 3-O-pentosa (Quercetina 3-O- arabinósido)	
		7	26,224	19,5	256	348	447	Quercetina 3-O-metil pentosa (Quercetina-3-O- ramnósido)	
	280 nm	F2a	1	10,709	18,9	279	-	577	Dímero procianidina tipo B (I)
			2	12,049	19,1	279	-	577	Dímero procianidina tipo B (II)
3			13,593	29,9	279	-	577	Dímero procianidina tipo B (III)	
4			15,001	32,1	278	-	289	Estereoisómero de catequina ((-)-Epicatequina)	
F2b		a	12,149	19,2	279	-	865 (577)	Trímero de procianidina tipo B (I)	
		b	13,404	19,4	279	-	865 (577)	Trímero de procianidina tipo B (II)	
		c	13,912	18,9	279	-	865 (577)	Trímero de procianidina tipo B (III)	

		5	16,157	42,5	279	-	865 (577)	Trímero de procianidina tipo B (IV)
--	--	---	--------	------	-----	---	--------------	--

Como se observa en la tabla 9, los diferentes tipos de compuestos fenólicos aislados del epicarpio de aguacate como: antocianinas, glicósidos de quercetina y procianidinas, se lograron separar (semipurificar) en diferentes fracciones mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular. De esta forma, en las primeras fracciones en eluir, **1a** y **1b** se aislaron flavonoides de menor tamaño molecular, como antocianinas derivadas de la cianidina y algunos glicósidos de quercetina; en la fracción intermedia **2a** se obtuvieron la mayoría de glicósidos de quercetina y algunos dímeros de procianidina tipo B; y finalmente en las fracciones más retenidas **2b** y **3** se obtuvieron compuestos de mayor tamaño molecular como trímeros de procianidina tipo B y otros compuestos con un alto grado de polimerización, que no se identificaron mediante los análisis desarrollados.

En relación a los glicósidos de quercetina identificados del epicarpio de aguacate, se ha publicado que la quercetina presenta efectos antivirales, antibacteriales y antiinflamatorios<sup>175</sup>; además de manera importante se ha encontrado que ejerce efectos antiproliferativos en varios tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, estudios a nivel *in vitro* han demostraron sus efectos antiproliferativos en la leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario y cáncer de hígado<sup>176</sup>. De manera similar, se ha publicado un efecto anticancerígeno para las antocianinas identificadas en este estudio, encontrando una relación dosis-dependiente en la inhibición del crecimiento celular contra el cáncer de mama, de colon, estómago, pulmonar y de células tumorales del sistema nervioso central<sup>177</sup>.

#### 4.4 CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (CFT) DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE.

Para determinar el contenido fenólico total (CFT) de los extractos (ECs y ERPs) de la semilla y epicarpio de aguacate y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño (fraccionamiento 2), se construyó la recta de calibrado graficando absorbancia versus concentración de ácido gálico (ppm) y mediante el método de regresión por mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación del modelo lineal. En la tabla 10 se presentan los datos de concentración de ácido gálico y absorbancia empleados.

<sup>175</sup> MATERSKA M. Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity – A Review. *En: Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 2008. vol. 58, no. 4, p. 407-413

<sup>176</sup> NAM J., *et al.* Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. *En: Molecules*, 2016. vol. 21, no. 108, p. 1-23.

<sup>177</sup> GALVANO F. *et al.* Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *En: Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 2007. vol. 43, no. 4, p. 382-393.

Tabla 10. Datos del ensayo de Folin Ciocalteu con los patrones de ácido gálico para la construcción de la recta de calibrado.

<i>Acido gálico (ppm)</i>	<i>Absorbancias-réplicas de reacción</i>			<i>Abs. media</i>	<i>S<sup>1</sup></i>	<i>CV<sup>2</sup></i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>50</b>	0,089	0,081	0,089	0,086	0,005	5,350
<b>151</b>	0,258	0,240	0,242	0,247	0,010	4,000
<b>251</b>	0,369	0,373	0,371	0,371	0,002	0,539
<b>351</b>	0,518	0,511	0,521	0,517	0,005	0,993
<b>552</b>	0,804	0,809	0,804	0,806	0,003	0,358

<sup>1</sup>S: Desviación estándar, <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variación.

Como se observa en la tabla 10 los valores de desviación estándar y coeficientes de variación son relativamente bajos indicando una buena precisión en los datos. Por otra parte, en la tabla 11 se presentan los resultados de la prueba de residuos realizada en Statgraphics, la cual indicó la presencia de un valor atípico en el conjunto de datos, con un residuo estudentizado mayor a 3 que es inusual para una distribución normal<sup>178</sup>, y por lo tanto fue retirado de la curva de calibrado.

Tabla 11. Resultados de la prueba de residuos atípicos en Statgraphics.

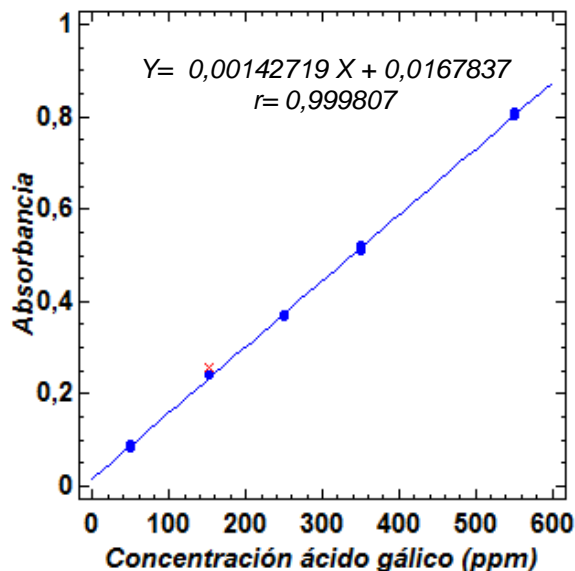
<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y predicho</i>	<i>Residuo</i>	<i>Residuo estudentizado</i>
151,0	0,258	0,234832	0,0231681	4,59

En la figura 65 se presenta la recta de calibrado y en la tabla 12 se presenta los parámetros de la ecuación del modelo lineal ajustado junto con su respectiva desviación estándar como una medida del error asociado a su estimación. Estos últimos valores se emplearon para estimar el error aleatorio global en los resultados finales (anexo D).

<sup>178</sup> STATGRAPHICS CENTURION XVI, versión 16.1.11. Modelos de Calibración.



Figura 65. Curva de calibrado del ensayo de Folin Ciocalteu: Absorbancia Vs Concentración de Ácido gálico (ppm).



Fuente: Esta investigación.

Tabla 12. Parámetros de la ecuación de la recta de calibrado del ensayo de Folin Ciocalteu.

Parámetro	Estimado de MC <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	Coef. de Correlación (r)
<b>Intercepto</b>	0,0167837	0,0026694	0,999807
<b>Pendiente</b>	0,0014272	0,0000081	

<sup>1</sup>MC: Mínimos cuadrados y <sup>2</sup>S: Desviación estándar.

Como se observa en la tabla 12, el coeficiente de correlación (r) presenta un valor cercano a 1 que indica una relación lineal fuerte entre las variables. Esta correlación se confirmó mediante el análisis de varianza (ANOVA), encontrando que las variables están relacionadas significativamente (valor-P < 0,05) con un nivel de confianza del 95,0%.

El contenido fenólico total (CFT) de los extractos y fracciones de la semilla y epicarpio de aguacate se determinó por interpolación de los datos de absorbancia en la ecuación de la recta de calibrado y la posterior conversión de unidades. En la tabla 13 se presentan los resultados encontrados.

Tabla 13. Contenido fenólico total de los extractos y fracciones polifenólicas de la semilla y epicarpio de aguacate.

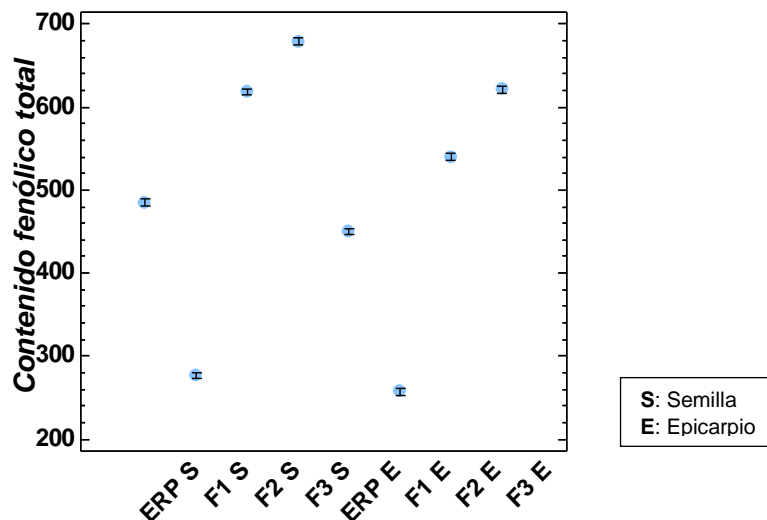
<b>Contenido fenólico total (CFT) extractos</b>						
<b>TV</b>	<b>mg EAG<sup>1</sup>/g EC<sup>2</sup></b>		<b>mg EAG/g ERP<sup>3</sup></b>		<b>mg EAG/100 g TV<sup>4</sup></b>	
<b>Semilla</b>	105 ± 2		485 ± 3		387 ± 9 <sup>7</sup>	
	CV	1,9	CV	0,6	CV	2,3
<b>Semilla EA<sup>5</sup></b>	101 ± 2		425 ± 2		-	
	CV	2,0	CV	0,5		
<b>Epicarpio</b>	167 ± 2		450 ± 3		483 ± 7	
	CV	1,2	CV	0,67	CV	1,4
<b>Contenido fenólico total (CFT) fracciones (mg EAG/ g fracción)</b>						
<b>ERP</b>	<b>F1<sup>6</sup></b>		<b>F2</b>		<b>F3</b>	
<b>Semilla</b>	276 ± 5		618 ± 5		697 ± 5	
	CV	1,8	CV	0,8	CV	0,7
<b>Epicarpio</b>	257 ± 5		540 ± 4		621 ± 4	
	CV	1,9	CV	0,7	CV	0,6

<sup>1</sup>EAG: mg equivalentes de ácido gálico, <sup>2</sup>EC: Extracto crudo, <sup>3</sup>ERP: Extracto rico en polifenoles, <sup>4</sup>TV: Tejido vegetal, <sup>5</sup>Semilla EA: Semilla expuesta al aire, <sup>6</sup>F: fracción, <sup>7</sup> Determinados a partir del CFT de los respectivos EC.

Al comparar el CFT de las diferentes muestras, se observa que todos los ERPs presentan un CFT significativamente mayor que los correspondientes ECs (valor-P < 0,05, nivel de confianza del 95%) lo que evidencia la eficiencia del proceso de aislamiento de los compuestos fenólicos de interés empleando amberlita XAD-7. Se observa además que entre los ECs, el EC del epicarpio presenta un CFT significativamente mayor; mientras que entre los ERPs, el ERP de la semilla es el que presenta un CFT mayor. La variación en la tendencia del CFT de los extractos posiblemente se debe a su composición fenólica en particular, que en el caso de la semilla derivó en un proceso más eficiente, con un incremento en aproximadamente 4,6 veces el CFT del EC inicial; frente al caso del epicarpio con un incremento aproximado de solo 2,7. Adicionalmente, al comparar el CFT de los extractos de la semilla EA (expuesta al aire) con los extractos obtenidos de la semilla no EA, se encontró que entre el CFT de los ECs no existen diferencias estadísticamente significativas; mientras que entre el CFT de los ERPs que sí (valor-P > 0,05, nivel de confianza del 95%), siendo el ERP de la semilla EA quien presentó un valor menor. Estos resultados podrían deberse a las transformaciones de tipo oxidativo desarrolladas en la semilla cuando se expuso al aire.

Por otra parte, con el fin de comparar los valores de CFT de los ERPs y sus fracciones correspondientes en la figura 66 se presenta el gráfico de medias de la prueba de múltiples rangos (basado en el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fisher), en el cual cuando no existen diferencias significativas entre los datos, los intervalos asociados a cada uno se traslapan.

Figura 66. Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para el CFT de las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate.



Fuente: Esta investigación.

En la figura 66 se observa que al comparar los valores de CFT de las muestras aisladas de un mismo tejido vegetal (semilla o epicarpio) los intervalos asociados a los datos no se traslapan, es decir que existen diferencias significativas entre sí (valor-P < 0,05, nivel de confianza 95%). Se observa claramente que el CFT de las primeras fracciones en eluir de la columna, tanto en el caso de semilla (F1S) como en el del epicarpio (F1E), tienen los valores más bajos; mientras que las fracciones más retenidas (F2S, F2E, F3S y F3E) presentaron un CFT más alto; siendo mucho mayor en las últimas fracciones en eluir (F3S y F3E).

Adicionalmente, al relacionar estos resultados con la composición fenólica de cada una de las fracciones (Anexo E), se evidencia que los compuestos mayoritarios identificados tentativamente en las primeras fracciones, como isómeros del ácido cafeoilquínico (semilla) y antocianinas derivadas de la cianidina (epicarpio), no aportan significativamente al contenido fenólico total; mientras que si lo hacen los compuestos identificados en las fracciones más retenidas (intermedias y últimas en eluir), como: glicósidos de flavonol (epicarpio), monómeros tipo catequina (semilla y epicarpio), dímeros y trímeros de procianidinas (semilla y epicarpio). Así mismo teniendo en cuenta que fracciones las últimas fracciones en eluir (F3S y F3E) son las que se obtuvieron en una mayor proporción (Tabla 5, sección 4,2), se

sugiere que los compuestos fenólicos de mayor tamaño molecular aislados en estas, como trímeros de procianidina en la fracción F3S y polifenoles de tipo polimérico en la fracción F3E, se encuentran en una mayor proporción en los extractos polifenólicos correspondientes, ERP semilla y ERP epicarpio.

Finalmente, en la gráfica se observa también que las fracciones aisladas de la semilla presentan un CFT significativamente mayor que las respectivas fracciones aisladas del ERP del epicarpio (valor-P < 0,05, nivel de confianza 95%).

Por otra parte, con el propósito de facilitar la comparación de los resultados de esta investigación con datos publicados en la literatura, en la tabla 13 se observa el CFT de los extractos expresado en mg EAG/100 g del material vegetal de partida (MV). De esta manera, se observa que el epicarpio del fruto presenta un CFT más alto que el de la semilla ( $483 \pm 7$  mg EAG/100 g epicarpio frente a  $387 \pm 9$  EAG/100 g semilla). A diferencia de estos resultados, Wang *et al.* encontraron en ocho variedades de aguacate (Hass, Slimcado, Booth 7, Booth 8, Choquette, Loretta, Simmonds y Tonnage), que la semilla presentó un mayor CFT que el epicarpio de los frutos; con valores en un rango de  $1.920 \pm 330$  mg EAG/ 100 g a  $5.160 \pm 160$  mg EAG/ 100 g (peso fresco)<sup>179</sup>, que como se observa superan en gran medida a los hallados en esta investigación. Estas diferencias podrían atribuirse no solo a composición fenólica en particular de cada variedad de aguacate, sino también a las variaciones en el proceso de extracción. Por otra parte, en consistencia con los resultados del presente estudio, Rodríguez *et al.* encontraron que en las variedades de aguacate Fuerte y Hass, el epicarpio presentó un mayor CFT que la semilla, siendo el epicarpio de la variedad fuerte el cual presentó el valor más alto de  $13.770 \pm 2557$  mg EAG/ 100 g<sup>180</sup>. Sin embargo, se debe destacar que en esta investigación no solo existen diferencias en el proceso de extracción, sino que además los resultados se expresaron en base a peso seco del material vegetal, por lo que no es posible comparar de forma absoluta los valores del CFT. En este sentido, en la figura 67 se comparan los resultados de esta investigación con los encontrados para otros frutos en condiciones de extracción similares (solvente de extracción, tiempo de extracción y relación material vegetal solvente). Todos estos estudios desarrollados en el grupo de investigación en productos de importancia biológica de la Universidad de Nariño (GIPIB)<sup>181,182,183,184,185</sup>.

---

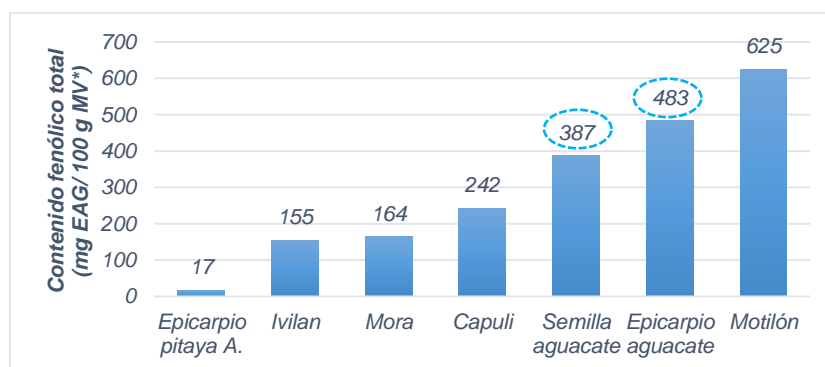
<sup>179</sup> WANG W. *et al.*, Op. Cit., p. 1195.

<sup>180</sup> RODRÍGUEZ-Carpena J. G. *et al.*, Op . Cit., p. 5629.

<sup>181</sup> DELGADO A. Betalaínas del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*): identificación, estabilidad y actividad antioxidante *in vitro*. Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2015.

<sup>182</sup> CHARFUELAN C. Estudio químico de la fracción de polifenoles tipo antocianinas aisladas del fruto de ivilan (*Monima obtusifolia*), estabilidad y capacidad antioxidante *in vitro*. Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2012.

Figura 67. CFT de la semilla y epicarpio de aguacate del presente estudio frente al CFT de otros frutos.



Fuente: Esta investigación

Como se observa en la figura 67 el CFT del epicarpio y semilla de aguacate es superior a la mayoría de los frutos comparados (pitaya, ivilan, mora y capuli), siendo superado únicamente por el motilón; lo que sugiere que estos subproductos son una potencial fuente de compuestos fenólicos.

#### 4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES POLIFENÓLICAS DE LA SEMILLA Y EPICARPIO DE AGUACATE

##### 4.5.1 Capacidad antioxidante equivalente a trolox o método TEAC

Para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los ERP y de las diferentes fracciones de la semilla y epicarpio de aguacate mediante el método TEAC, se construyó una recta de calibrado graficando absorbancia versus concentración de trolox (mM). En la tabla 14 se presentan los datos de concentración y absorbancia.

<sup>183</sup> ENRÍQUEZ S. Extracción, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto de la mora (*Rubus urticaefolius* *poir* R.). Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2013.

<sup>184</sup> PÉREZ M. Análisis químico, estabilidad y actividad biológica *in vitro* de la fracción de polifenoles del fruto de capulí (*Prunus serótina* Ehrh. Var. *Capulí*). Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2013.

<sup>185</sup> JIMÉNEZ, J.P. y Villarreal, J., op. Cit, p. 63-64.

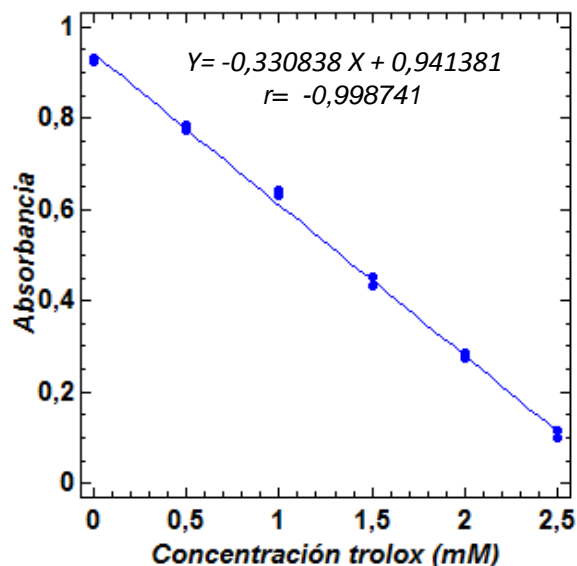
Tabla 14. Datos del ensayo TEAC con patrones de trolox para la construcción de la recta de calibrado

<i>Trolox (mM)</i>	<i>Absorbancias réplicas de reacción</i>			<i>Abs. media</i>	<i>S<sup>1</sup></i>	<i>CV<sup>2</sup></i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
0,00	0,923	0,926	0,931	0,927	0,004	0,436
0,50	0,774	0,773	0,787	0,778	0,008	1,004
1,00	0,633	0,641	0,631	0,635	0,005	0,833
1,50	0,432	0,434	0,454	0,440	0,012	2,765
2,00	0,273	0,287	0,286	0,286	0,008	2,770
2,50	0,099	0,100	0,117	0,105	0,010	9,604

<sup>1</sup>S: Desviación estándar y <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variación.

Como se muestra en la tabla 14 los valores de desviación estándar y los coeficientes de variación son relativamente bajos, lo que muestra una buena precisión en los resultados. De acuerdo al análisis de residuos realizado en Statgraphics no se encontraron valores atípicos en el conjunto de datos y por lo tanto, todos se emplearon para la construcción de la curva de calibrado. En la figura 68 se presenta la curva de calibrado y en la tabla 14 se presentan los parámetros de la ecuación lineal.

Figura 68. Curva de calibrado del ensayo TEAC: Absorbancia Vs Concentración trolox.



Fuente: Esta investigación.

Tabla 15. Parámetros de la ecuación de la recta de calibrado del ensayo TEAC.

Parámetro	Estimado de MC <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	Coef. de correlación (r)
<b>Intercepto</b>	0,941381	0,006289	-0,998741
<b>Pendiente</b>	-0,330838	0,004155	

<sup>1</sup>MC: Mínimos cuadrados y <sup>2</sup>S: Desviación estándar.

Como se observa en la figura 68 y tabla 15, la pendiente negativa del modelo lineal ajustado indica la decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup> por la acción antioxidante del trolox. Por otra parte, el coeficiente de correlación cercano a -1 indica que existe una buena relación lineal entre las variables absorbancia y concentración de trolox. Esta relación se confirmó también mediante un análisis de varianza (ANOVA).

En la tabla 16 se presentan los valores TEAC determinados por interpolación y posterior conversión de unidades para las muestras en estudio. Con el fin de evaluar la funcionalidad y exactitud de la metodología de análisis se determinó la actividad antioxidante *in vitro* para un estándar conocido (ácido ascórbico) y se comparó con el valor publicado en la literatura científica.

Tabla 16. Valores TEAC para las muestras aisladas de la semilla y epicarpio y el patrón de ácido ascórbico.

<b>Valores TEAC extractos y patrón (mmol trolox/ g extracto)</b>									
<b>ERP<sup>1</sup> Semilla</b>		<b>ERP Semilla EA<sup>2</sup></b>		<b>ERP Epicarpio</b>		<b>Ácido Ascórbico</b>			
						<b>V. Exp.<sup>3</sup></b>		<b>V. Teórico</b>	
5,41 ± 0,10		3,90 ± 0,09		5,10 ± 0,10		0,97 ± 0,02		1,05 ± 0,02 <sup>186</sup>	
CV	1,85	CV	2,31	CV	2,06	CV	2,06	CV	1,90
<b>Valores TEAC fracciones (mmol trolox/ g fracción)</b>									
<b>ERP</b>		<b>F1</b>		<b>F2</b>		<b>F3</b>			
<b>Semilla</b>		2,98 ± 0,10		6,10 ± 0,10		5,81 ± 0,10			
		CV	3,36	CV	1,64	CV	1,72	CV	1,72
<b>Epicarpio</b>		3,75 ± 0,09		5,32 ± 0,10		5,05 ± 0,10			
		CV	2,40	CV	1,88	CV	1,98	CV	1,98

<sup>1</sup>ERP: Extracto rico en polifenoles, <sup>2</sup>Semilla EA: Semilla expuesta al aire y <sup>3</sup>V. exp.: Valor experimental.

Como se observa en la tabla 16 al comparar el valor de actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) del patrón (ácido ascórbico) con el reportado en la literatura, se observa que son similares indicando que existe una buena exactitud con la metodología de análisis desarrollada. Por otra parte, en el análisis de los valores TEAC de las muestras, se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los tres extractos polifenólicos (ERP semilla, ERP semilla EA y ERP epicarpio) (valor-P < 0,05, nivel de confianza 95%), observándose la siguiente tendencia en los resultados: ERP semilla > ERP epicarpio > ERP semilla EA (expuesta al aire), que es la misma que la encontrada en el CFT determinado para los extractos, lo que indica la relación directa entre estas dos variables (actividad antioxidante en el ensayo TEAC y contenido fenólico). Se debe destacar que la menor actividad antioxidante del ERP de la semilla EA (expuesta al aire) puede deberse a las transformaciones oxidativas desarrolladas durante el pardeamiento enzimático de este tejido vegetal, que se evidenciaron con la desaparición de uno de los isómeros del ácido cafeoilquínico, provocando posiblemente una menor actividad antioxidante *in vitro* del extracto.

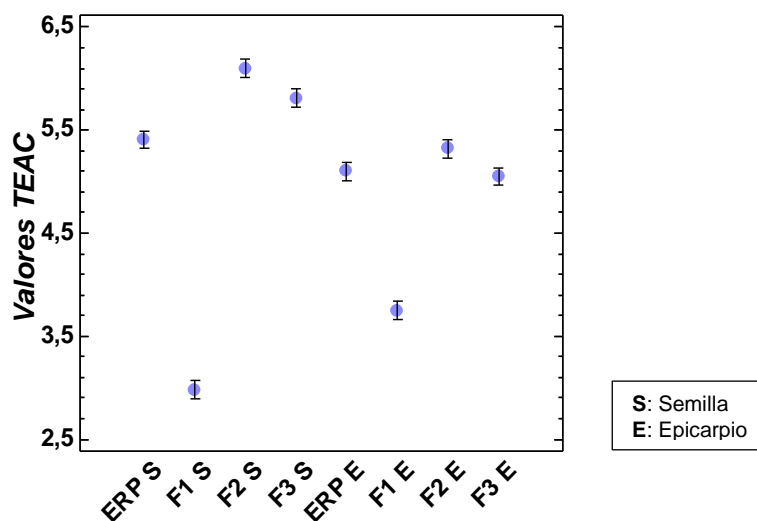
Con el fin de comparar los valores TEAC de los ERP y las diferentes fracciones en la figura 69 se presenta el gráfico de medias de la prueba de múltiples; como se mencionó previamente los intervalos asociados a los diferentes valores, se traslapan en el caso de que estos sean iguales<sup>187</sup>.

<sup>186</sup> RE R., Op. Cit., p. 1235.

<sup>187</sup> STATGRAPHICS CENTURION XVI, versión 16.1.11. Comparación de varias muestras.



Figura 69. Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para los valores TEAC de las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate.



Fuente: Esta investigación.

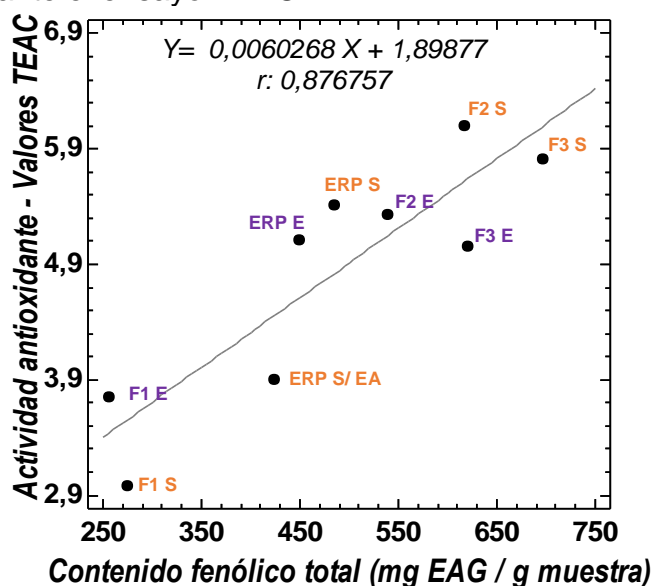
Como se observa en la figura 69 entre los valores TEAC de las muestras de un mismo tejido vegetal (semilla o epicarpio) existen diferencias estadísticamente significativas (valor-P < 0,05, confianza del 95%), a excepción del ERP del epicarpio y la fracción F2E correspondiente. Como en los valores de CFT determinados, tanto en el caso de la semilla como del epicarpio, las primeras fracciones en eluir: F1S y F1E son las que presentan los valores TEAC más bajos. Sin embargo, en este caso se observa que las fracciones intermedias (F2S, F2E) y no las últimas fracciones en eluir (F3S y F3E), son las que presentan los valores más altos. Se observa también que al igual que en los resultados de CFT encontrados, la mayoría de fracciones aisladas de la semilla presentan los valores TEAC significativamente más altos. En la figura 67 se puede observar con mayor claridad la relación entre el CFT y la actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup> de las muestras en estudio.

Por otra parte, con relación a la composición de las fracciones, se observa que de manera general, las fracciones primeras en eluir (F1S y F1E), donde se identificó tentativamente compuestos fenólicos como isómeros del ácido cafeoilquínico (semilla) y antocianinas derivadas de la cianidina (epicarpio), no contribuyen significativamente a la actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup>; mientras que si lo hacen los compuestos fenólicos como: glicósidos de flavonol (epicarpio), monómeros tipo catequina (semilla y epicarpio), dímeros y trímeros de procianidinas (semilla y epicarpio) identificados tentativamente en las fracciones intermedias y últimas en eluir de la columna (F2S, F2E, F3S y F3E). Estos resultados pueden atribuirse a la presencia de un mayor número de compuestos fenólicos en estas últimas fracciones, como también a la presencia procianidinas y polifenoles de tipo polimérico, que se destacan por su elevada actividad

antioxidante<sup>188</sup>. Al respecto autores como Wang *et al.* reportan que las procianidinas son las responsables de la elevada actividad antioxidante del aguacate<sup>189</sup>, con una clara relación entre su contenido y la capacidad antioxidante de las muestras.

En la figura 70 se puede observar con mayor claridad la relación entre el CFT y la actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup> de las muestras en estudio.

Figura 70. Relación entre el contenido fenólico total y actividad antioxidante determinada mediante el ensayo TEAC.



Fuente: Esta investigación.

Como se observa en la figura 70, es evidente que existe una correlación entre el CFT y la capacidad de captura del radical sintético ABTS<sup>•+</sup> ( $r=0,876757$ , valor- $P < 0,05$ ) de las muestras. Sin embargo, se observan algunas desviaciones particulares en la tendencia, como por ejemplo, las fracciones intermedias de la semilla y epicarpio (F2S y F2E) que sin presentar el CFT más alto exhiben la mayor capacidad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup> entre las muestras. De manera similar, se observa que aunque, entre las primeras fracciones en eluir, la fracción del epicarpio presenta el CFT más bajo, es también la que presenta la mayor actividad antioxidante. De acuerdo a la literatura estos resultados posiblemente se deben a la influencia de otra variable de importancia en la actividad antioxidante de las muestras, como su composición fenólica. De esta manera, se observa que los compuestos fenólicos identificados tentativamente en fracciones de mayor actividad antioxidante (como dímeros y trímeros de procianidinas, glicósidos de quercetina y flavanoles tipo catequina en las

<sup>188</sup> CRAFT B. *et al.*, Op. Cit., p. 160.

<sup>189</sup> WANG W. *et al.*, Op. Cit., p. 1195.

fracciones intermedias de la semilla y epicarpio; y principalmente antocianinas derivadas de la cianidina en la fracción 1FE del epicarpio), aún en una proporción más baja (CFT menor), actuaron de manera más eficiente frente al catión radical ABTS<sup>•+</sup>. De acuerdo a la literatura científica factores como la facilidad de donar átomos de hidrógeno y capacidad de deslocalizar y estabilizar electrones desapareados determinan el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos<sup>190</sup>. En concordancia con los resultados encontrados en este estudio, se ha encontrado que de manera general ciertas características estructurales como la presencia de un mayor número anillos fenólicos y grupos hidroxilo libres en las estructuras (como sucede en los compuestos fenólicos de mayor tamaño molecular y las antocianinas), favorecen sus propiedades antioxidantes<sup>191</sup>.

Finalmente, con el fin de comparar los resultados del ensayo TEAC obtenidos en el presente estudio con los publicados en la literatura, los valores TEAC de los ERPs también se expresaron en mmol trolox/ 100 g del material vegetal de partida. De esta manera, para el epicarpio de aguacate se encontró un valor de  $4,78 \pm 0,09$  mmol trolox/ 100 g, mientras que para la semilla se encontró un valor de  $4,07 \pm 0,08$  mmol trolox/ 100 g, como es evidente el epicarpio presenta no solo un mayor CFT sino también un potencial actividad antioxidante mayor que la semilla de aguacate. En contraste con otros estudios realizados en aguacate, se encuentra que estos resultados son inferiores a los publicados por Rodriguez *et al.* quienes encontraron en el epicarpio de la variedad Fuerte un valor de  $18.587 \pm 2.691$  mmol trolox / 100 g epicarpio y en la semilla un valor de  $12.161 \pm 3.187$  mmol trolox / 100 g semilla (peso fresco)<sup>192</sup>. Como se mencionó previamente las variaciones en el proceso de extracción como también en la composición fenólica de cada variedad de aguacate estudiada son las responsables de estas diferencias en los resultados.

De otro lado, en la figura 71 se compara los valores TEAC de la semilla y epicarpio de aguacate encontrados en la presente investigación con los hallados para otros frutos, en similares condiciones de extracción<sup>193,194,195,196,197</sup>.

---

<sup>190</sup> RICE E. C., Miller N. y Paganga G. Antioxidants properties of phenolics compounds. En: Trends in plant science. Reviews, 1997. vol. 2. no. 4.

<sup>191</sup> CRAFT B. *et al.*, Op. Cit., p. 160.

<sup>192</sup> RODRÍGUEZ-Carpena J. G. *et al.*, Op. Cit., p. 5630.

<sup>193</sup> DELGADO A., Op. Cit., p. 93-96.

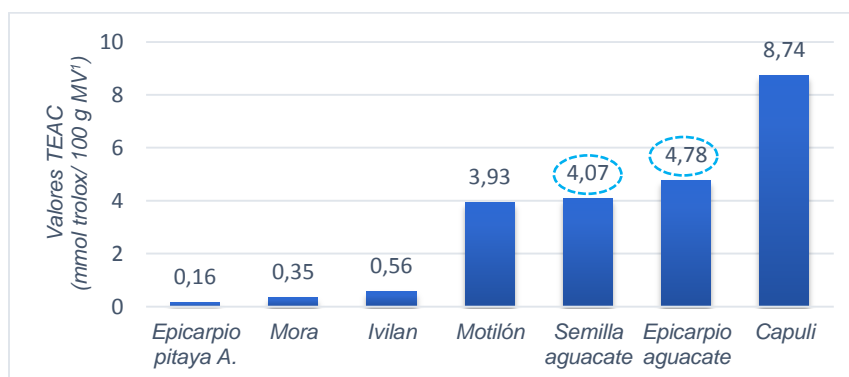
<sup>194</sup> ENRÍQUEZ S., Op. Cit., p. 59-61.

<sup>195</sup> CHARFUELAN C., Op. Cit., p. 92-94.

<sup>196</sup> JIMÉNEZ, J.P. y Villarreal, J., Op. Cit., p. 73-75.

<sup>197</sup> PÉREZ M., Op. Cit., p. 98-100.

Figura 71. Valores TEAC de la semilla y epicarpio de aguacate del presente estudio frente a los valores TEAC de otros frutos.



<sup>1</sup>MV: Material Vegetal.

Fuente: Esta investigación.

Como se observa en la figura 71, a diferencia de la tendencia encontrada al comparar los resultados de CFT de los frutos, se observa que el motilón presenta un valor TEAC muy similar a los encontrados para la semilla y epicarpio de aguacate en la presente investigación, siendo en este caso el capulí el que supera estos valores. Y de manera similar a las comparaciones previas, los valores TEAC encontrados en este estudio superan a los determinados para frutos como: el epicarpio de la pitaya amarilla, la mora y el ivilan.

#### 4.5.2 Actividad antioxidante frente al radical DPPH<sup>\*</sup>

Para el desarrollo de este ensayo antioxidante, inicialmente se construyó una recta de calibrado de absorbancia versus concentración de DPPH<sup>\*</sup> (mM). En la tabla 17 se presentan los datos de concentración y absorbancia empleados.

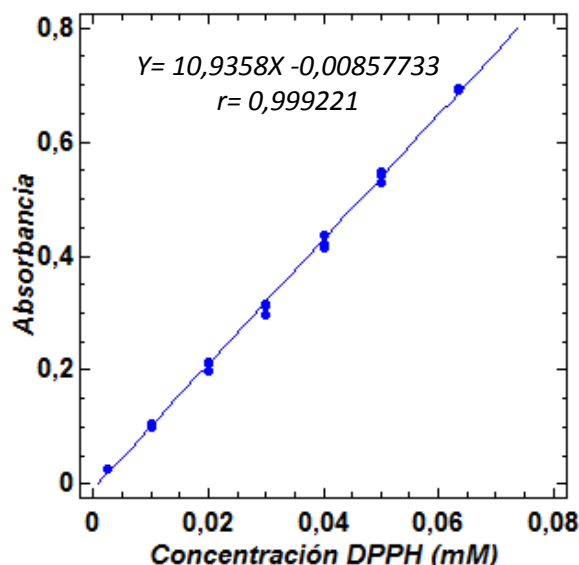
Tabla 17. Datos de absorbancia y concentración de DPPH empleados para la construcción de la recta de calibrado.

DPPH (mM)	Absorbancias-réplicas soluciones			Abs. media	S <sup>1</sup>	CV <sup>2</sup>
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
0,0025	0,025	0,025	0,026	0,025	0,001	2,279
0,0100	0,106	0,106	0,101	0,104	0,003	2,767
0,0200	0,197	0,215	0,211	0,208	0,009	4,551
0,0300	0,315	0,298	0,312	0,308	0,009	2,943
0,0400	0,420	0,435	0,415	0,423	0,010	2,459
0,0500	0,529	0,549	0,548	0,542	0,011	2,079
0,0634	0,693	0,694	0,690	0,692	0,002	0,301

<sup>1</sup>S: Desviación estándar y <sup>2</sup>CV: Coeficiente de variación.

Los datos estadísticos muestran que existe una buena precisión en los resultados. Como en el caso del ensayo TEAC, no se detectaron valores atípicos en las mediciones (análisis de residuos) y por lo tanto todos los datos se emplearon en la construcción de la curva de calibrado. En la figura 72 se presenta la curva de calibrado y en la tabla 18 se presentan los parámetros característicos de la ecuación lineal.

Figura 72. Curva de calibrado del ensayo DPPH: Absorbancia Vs Concentración DPPH (mM).



Fuente: Esta investigación.

Tabla 18. Parámetros de la recta de calibrado para el ensayo DPPH.

Parámetro	Estimado de MC <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	Coef. de correlación (r)
<b>Intercepto</b>	-0,00857733	0,00365535	0,999221
<b>Pendiente</b>	10,9358	0,0991	

<sup>1</sup>MC: Mínimos cuadrados y <sup>2</sup>S: Desviación estándar.

Como se observa en la tabla 18, la recta de calibrado presenta un coeficiente de correlación lineal cercano a 1 ( $r=0,999221$ ) que demuestra una buena correlación entre las variables en estudio, la cual se confirmó mediante el análisis de varianza (ANOVA) (valor-P < 0,05, nivel de confianza 95%).

Una vez establecida la ecuación de calibrado, se determinaron para las muestras de interés (a diferentes concentraciones) los porcentajes de DPPH<sup>\*</sup> remanente. Estos valores se emplearon para la construcción de las diferentes gráficas de porcentaje de DPPH<sup>\*</sup> remanente versus concentración de antioxidante (expresada como g de muestra / kg de DPPH) (anexo F). Finalmente, a partir de estas gráficas se determinaron las ecuaciones de los modelos ajustados que permitieron el

cálculo de los valores  $EC_{50}$  para todas las muestras, y el patrón de referencia (ácido gálico) con el fin de evaluar la funcionalidad y exactitud de la metodología.

En las figuras 73 y 74 se presentan las gráficas construidas para los ERP y las fracciones aisladas. En la tabla 18 se resumen los parámetros de las diferentes ecuaciones de correlación y sus valores de desviación estándar, que de manera similar a los ensayos anteriores, se emplearon para estimar el error aleatorio global de los resultados finales.

Figura 73. Gráficos de % de DPPH remanente Vs concentración de antioxidante para el patrón de ácido gálico y los ERP de la semilla y epicarpio de aguacate.

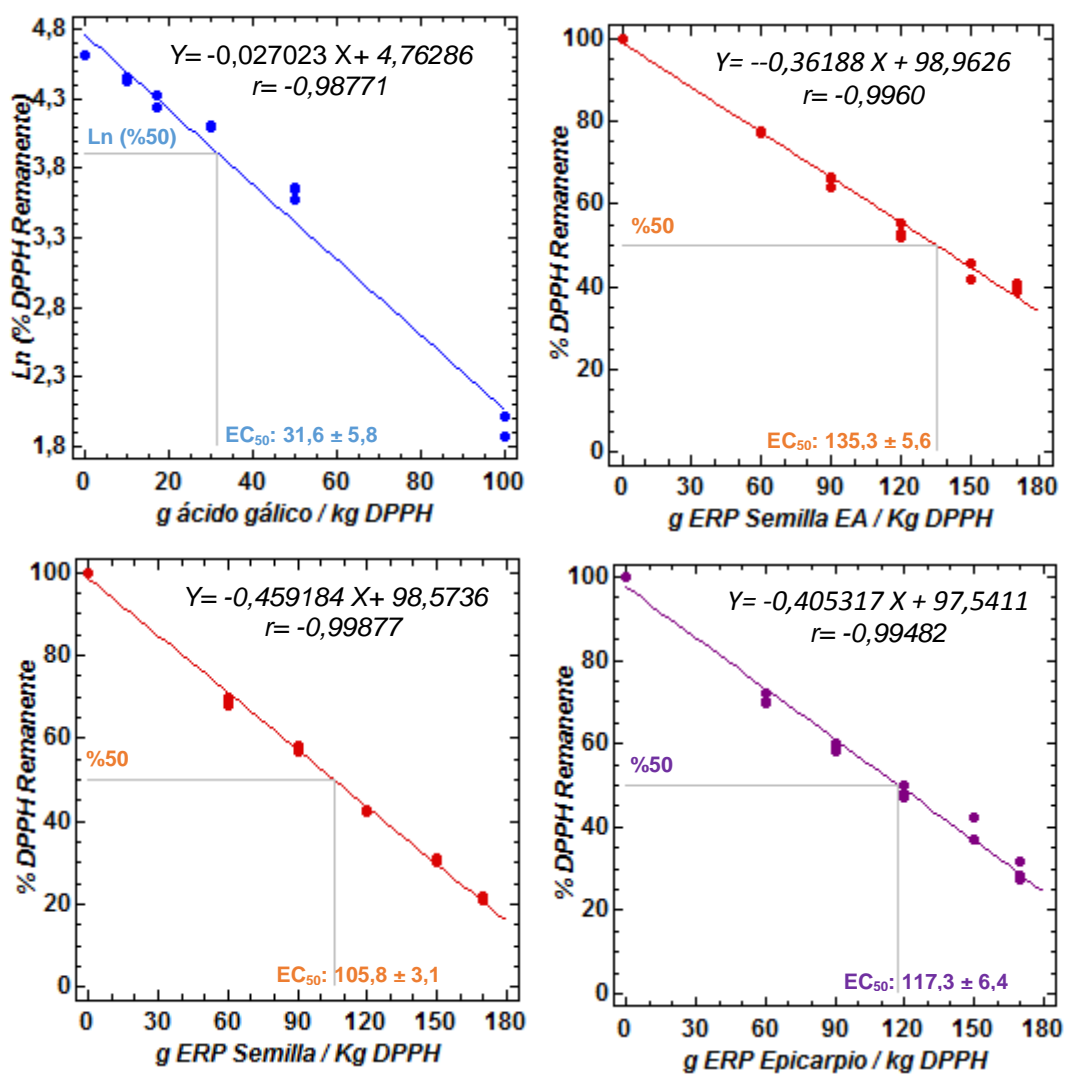
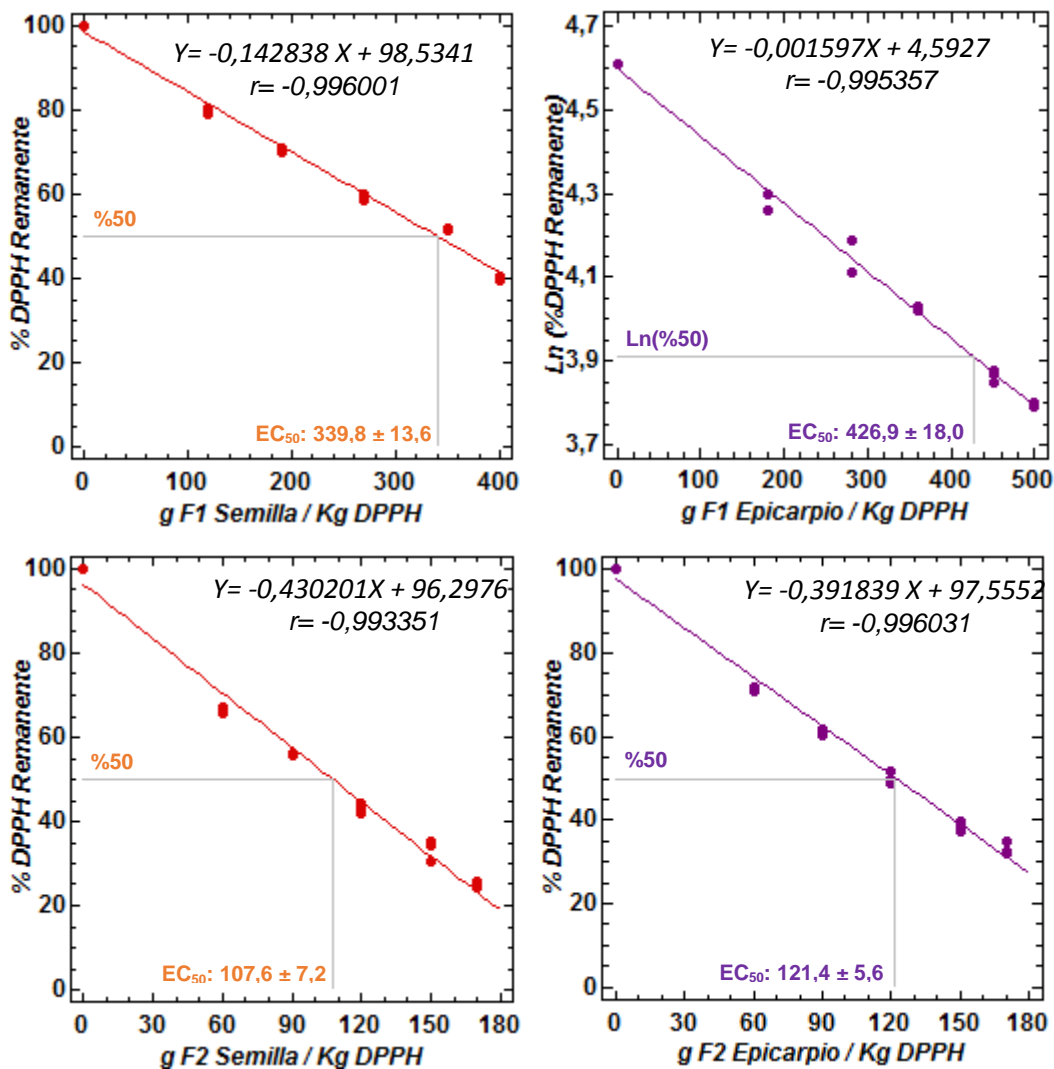
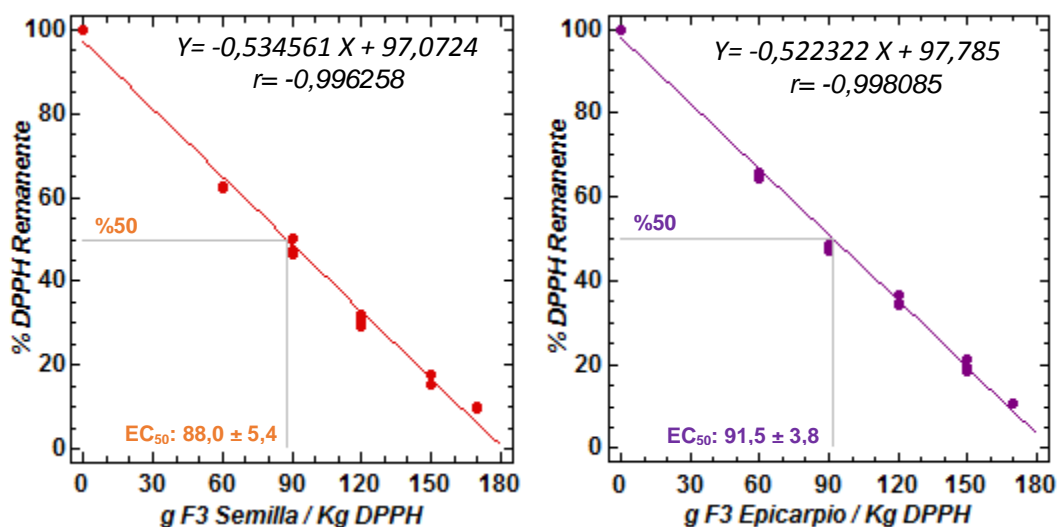


Figura 74. Gráficos de % de DPPH remanente Vs concentración de antioxidante para las diferentes fracciones de la semilla y epicarpio aisladas por cromatografía de exclusión molecular.





Fuente: Esta investigación.

Tabla 19. Parámetros de las ecuaciones de ajuste para las gráficas de % de DPPH remanente Vs concentración de antioxidante de las muestras en estudio.

<b>Parámetros ecuación del modelo ajustado</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Estimado de MC</b>	<b>S</b>	<b>Coef. de correlación (r)</b>	
<b>Ác. gálico</b>	<i>Intercepto</i>	4,76286	0,05126	-0,98771	
	<i>Pendiente</i>	-0,027023	0,001069		
<b>ERP semilla</b>	<i>Intercepto</i>	98,5736	0,6468	-0,99877	
	<i>Pendiente</i>	-0,459184	0,005691		
<b>ERP Semilla EA</b>	<i>Intercepto</i>	98,9626	0,9201	-0,9960	
	<i>Pendiente</i>	-0,36188	0,00810		
<b>ERP epicarpio</b>	<i>Intercepto</i>	97,5411	1,1764	-0,99482	
	<i>Pendiente</i>	-0,405317	0,010351		
<b>Frac. Semilla</b>	<b>F1</b>	<i>Intercepto</i>	98,5341	0,8331	-0,996001
		<i>Pendiente</i>	-0,142838	0,003203	
	<b>F2</b>	<i>Intercepto</i>	96,2976	1,4166	-0,993351
		<i>Pendiente</i>	-0,430201	0,012464	
	<b>F3</b>	<i>Intercepto</i>	97,0724	1,3176	-0,996258
		<i>Pendiente</i>	-0,534561	0,011594	
<b>Frac. Epicarpio</b>	<b>F1</b>	<i>Intercepto</i>	4,5927	0,0131	-0,995357
		<i>Pendiente</i>	-0,001597	0,000039	
	<b>F2</b>	<i>Intercepto</i>	97,5552	0,9949	-0,996031
		<i>Pendiente</i>	-0,391839	0,008754	
	<b>F3</b>	<i>Intercepto</i>	97,785	0,920	-0,998085
		<i>Pendiente</i>	-0,522322	0,008092	



Las figuras 73 y 74 muestran que los modelos de ajuste fueron en su mayoría lineales; excepto para los casos del ácido gálico y de la fracción 1 del epicarpio (F1E), para los cuales se encontró una correlación exponencial, por lo que fue necesario linealizar los modelos, así los valores de % de DPPH remanente se graficaron como su logaritmo natural. Para los diferentes modelos se encontraron coeficientes de correlación cercanos a 1 (tabla 18) que demuestran una buena relación lineal entre las variables. En concordancia con lo anterior, los respectivos análisis de varianza aplicados a los modelos ajustados indicaron en todos los casos una relación estadísticamente significativa entre las variables mencionadas con un nivel de confianza del 95,0% (valor-P < 0,05).

En la tabla 20 se resumen los valores EC<sub>50</sub> determinados a partir de las gráficas presentadas en las figuras 70 y 71 para cada una de las muestras en estudio.

Tabla 20. Valores EC<sub>50</sub> para las muestras aisladas de la semilla y epicarpio de aguacate y el patrón de ácido gálico.

<b>Valores EC<sub>50</sub> Extractos (g Extracto/ kg DPPH)</b>							
<b>ERP<sup>1</sup> Semilla</b>	<b>ERP Semilla EA<sup>2</sup></b>		<b>ERP Epicarpio</b>		<b>Ácido Gálico</b>		
					<b>V. Exp.<sup>3</sup></b>	<b>V. Teórico<sup>198</sup></b>	
105,8 ± 3,1	135,3 ± 5,6		117,3 ± 6,4		31,6 ± 5,8	26,0 ± 1,0	
CV 2,9	CV	4,1	CV	5,4	CV 18,4	CV	3,8
<b>Valores EC<sub>50</sub> fracciones (g Fracción/ kg DPPH)</b>							
<b>ERP</b>	<b>F1</b>		<b>F2</b>		<b>F3</b>		
<b>Semilla</b>	339,8 ± 13,6		107,6 ± 7,2		88,0 ± 5,4		
	CV	4,0	CV	6,7	CV	6,1	
<b>Epicarpio</b>	426,9 ± 18,0		121,4 ± 5,6		91,5 ± 3,8		
	CV	4,2	CV	4,6	CV	4,2	

<sup>1</sup>ERP: Extracto rico en polifenoles, <sup>2</sup>Semilla EA: Semilla expuesta al aire y <sup>3</sup>V. exp.: Valor experimental.

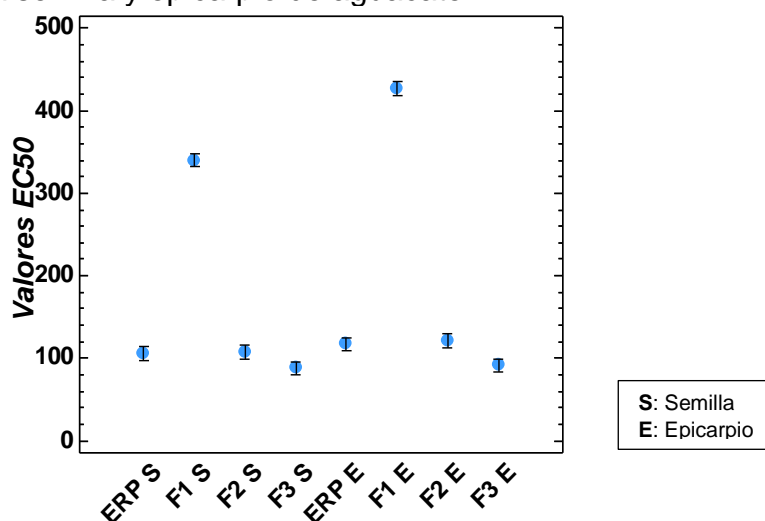
Como se observa en la tabla 20 al comparar el valor EC<sub>50</sub> del patrón (ácido gálico) determinado experimentalmente con el publicado en la literatura se encuentra que son similares. Por otra parte, se observa que de manera general, en términos de actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH', las muestras presentaron una tendencia similar a la encontrada en los ensayos TEAC y de CFT. Al comparar estos valores EC<sub>50</sub> de los extractos (ERP de semilla y epicarpio y ERP de semilla EA) se encuentra que difieren significativamente unos de otros (valor-P < 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%), siendo igualmente el ERP de la semilla el que presenta la mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH' (menor valor EC<sub>50</sub>), y el ERP de la semilla EA el que presenta la menor (mayor valor EC<sub>50</sub>). Como ya se mencionó anteriormente la menor actividad del extracto de semilla

<sup>198</sup> SÁNCHEZ-MORENO J. y Fulgencio S., Op. Cit., p. 273.

expuesta al aire (EA) puede deberse a las transformaciones oxidativas desarrolladas durante la exposición de la semilla al aire.

De manera similar a lo expuesto en los ensayos anteriores, en la figura 75 se presenta el gráfico de medias de la prueba de múltiples rangos, que permite determinar las diferencias significativas entre los valores  $EC_{50}$  obtenidos para los ERPs y las diferentes fracciones.

Figura 75. Gráfico de medias (prueba de múltiples rangos) para los valores  $EC_{50}$  de las muestras de la semilla y epicarpio de aguacate.



Fuente: Esta investigación.

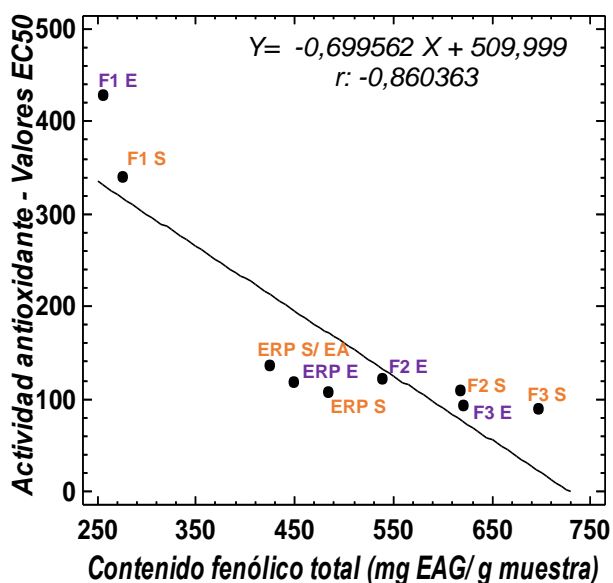
En consistencia con los ensayos de CFT y TEAC, se observa que los valores  $EC_{50}$  determinados para las primeras fracciones de la semilla y epicarpio (F1S y F1E) indican una actividad antioxidante significativamente menor que todas las demás muestras (valor-P < 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%). Igualmente se puede concluir que las fracciones más retenidas (F2S, F2E, F3S y F3E) son las que presentan mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH<sup>•</sup>, siendo en este caso las últimas fracciones en eluir (F3S y F3E) las que presentan una actividad antioxidante significativamente más alta (valor-P < 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%). Sin embargo en este caso, se observa que las fracciones intermedias tienen valores estadísticamente similares a los respectivos ERPs (valor-P > 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%). Así mismo, al comparar los valores  $EC_{50}$  de las fracciones de la semilla con los respectivos valores de las fracciones del epicarpio, se encuentra que en su mayoría no presentan diferencias significativas (valor-P > 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%).

Como se mencionó en el ensayo TEAC, los resultados encontrados en el ensayo DPPH también fueron consistentes con lo publicado en la literatura, puesto las fracciones más retenidas en la columna ricas en oligómeros de procianidinas y

compuestos fenólicos de tipo polimérico, son las que presentan una mayor capacidad antioxidante del radical DPPH<sup>\*</sup>.

En la figura 76 se muestra la correlación entre los resultados del ensayo TEAC y del ensayo de CFT.

Figura 76. Relación entre el contenido fenólico total y actividad antioxidante (método DPPH).

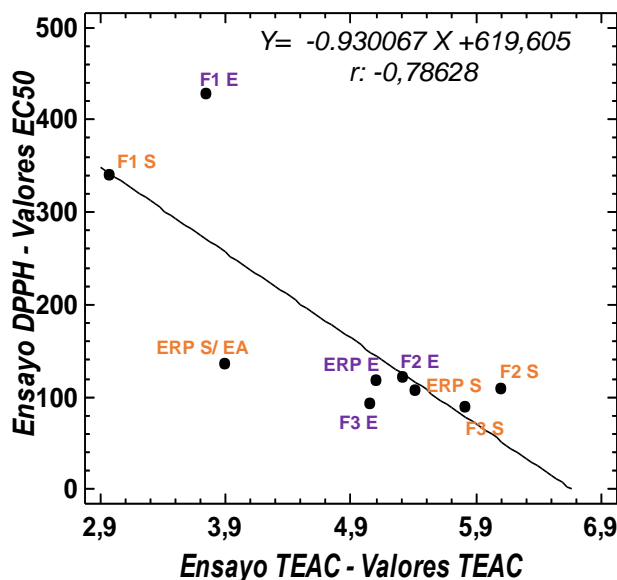


Fuente: Esta investigación.

En la figura 76 se observa una buena correlación significativa entre los valores de CFT y los valores EC<sub>50</sub> ( $r=-0,860363$ , valor- $P < 0,05$ ). Sin embargo, como se observa en la gráfica (figura 73) en este caso también se presentan desviaciones en la tendencia, así las fracciones intermedias (F2S y F2E) que presentan un CFT mayor que los respectivos ERPs correspondientes, no presentan diferencias significativas (valor- $P < 0,05$ ) entre sus respectivos valores EC<sub>50</sub>. Como se mencionó anteriormente estos resultados pueden estar relacionados con la composición fenólica particular de las muestras y la eficiencia de reacción de los compuestos fenólicos presentes con el radical DPPH<sup>\*</sup>.

Por otra parte, en la siguiente grafica se relaciona los resultados del ensayo TEAC con los encontrados en el ensayo DPPH.

Figura 77. Relación entre los ensayos de actividad antioxidante DPPH y TEAC.



Fuente: Esta investigación.

Como se observa en la figura 77 entre los valores  $EC_{50}$  y los valores TEAC de las muestras existe una correlación significativa ( $r = -0.78628$ , valor-P < 0,05). De manera general, las muestras que presentaron valores TEAC altos presentaron valores  $EC_{50}$  bajos, y viceversa; esto demuestra que en general existe una relación directa entre las dos metodologías seleccionadas para determinar la actividad antioxidante. Sin embargo, existen algunos casos en particular que es necesario destacar; así entre las primeras fracciones por ejemplo (F1S y F1E), se encuentra que si bien, frente al radical  $ABTS^{+}$  la fracción del epicarpio (F1E) presenta una mayor actividad antioxidante, frente al radical  $DPPH^{\cdot}$  esta fracción presenta una menor capacidad antioxidante; lo que sugiere que no siempre los compuestos fenólicos presentan el mismo comportamiento antioxidante en los ensayos en estudio, posiblemente debido a los diferentes mecanismos de reacción de los compuestos fenólicos presentes en la muestra con cada uno de los radicales,  $ABTS^{+}$  y  $DPPH^{\cdot}$ .

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos en el ensayo DPPH con lo publicado en la literatura para el fruto en estudio, se encontró el estudio realizado por Wang *et al.* donde, para siete de ocho variedades de aguacate estudiadas (Slimcado, Booth 7, Booth 8, Choquette, Loretta, Simmonds y Tonnage) se encontró que la semilla es la que presenta la mayor actividad antioxidante frente al radical  $DPPH^{\cdot}$ , con valores entre  $0,1283 \pm 0,0174 \mu\text{mol trolox/g}$  y  $0,2402 \pm 0,0366 \mu\text{mol trolox/g}$  (peso fresco)<sup>199</sup>; sin embargo como se observa estos resultados no se pueden comparar de forma directa con los encontrados en este trabajo puesto que se expresaron en unidades diferentes (en referencia al antioxidante trolox). No

<sup>199</sup> WANG W. *et al.*, Op. Cit., p. 1195.

obstante, en la en la tabla 21 se presentan los valores  $EC_{50}$  publicados para otros frutos en las mismas unidades de trabajo del presente estudio, que además se desarrollaron en condiciones similares de extracción<sup>200,201,202</sup>.

Tabla 21: Valores  $EC_{50}$  del ensayo DPPH de las muestras de aguacate y de otros frutos.

<i>Material vegetal</i>	<i>Valor <math>EC_{50}</math> (g extracto/ kg DPPH)</i>
Motilón	36,2
Semilla de aguacate	<b>105,8 ± 3,1</b>
Epicarpio de aguacate	<b>117,3 ± 6,4</b>
Mora	2.800
Ulloco	18.710

Como se observa en la tabla, en comparación a otros frutos, los tejidos de aguacate estudiados presentan una actividad antioxidante frente al radical DPPH<sup>\*</sup> mucho mayor (mora y ulloco), siendo superado únicamente por el motilón, que como se mencionó previamente presentó también un CFT mayor. Se concluye así que los residuos del aguacate (semilla y epicarpio) son una fuente potencial de compuestos bioactivos, de importantes propiedades antioxidantes y de uso potencial en las industrias alimentaria y farmacéutica.

<sup>200</sup> JIMÉNEZ, J.P. y Villarreal, J., Op. Cit., p. 73-75.

<sup>201</sup> ENRÍQUEZ S., Op. Cit., p. 59-61.

<sup>202</sup> MOSQUERA N., Op. Cit., p. 123-128.

## CONCLUSIONES

- Se lograron obtener fracciones más simples de polifenoles de la semilla y epicarpio del aguacate (*Persea americana* Mill) mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas, esto facilitó no solo la identificación de los compuestos mayoritarios sino también el estudio bioguiado de sus componentes.
- Las técnicas HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS permitieron la identificación parcial de los compuestos polifenólicos mayoritarios; en la semilla se identificaron 11 compuestos fenólicos y en el epicarpio 17. Los principales compuestos fueron: (-)-epicatequina y varios dímeros y trímeros de procianidina tipo B, tanto en la semilla como en el epicarpio; además de algunos isómeros del ácido cafeoilquínico, trímeros de procianidinas tipo A y (-)-catequin/epicatequin-galato, en la semilla; y otros como: cianidina 3-O-glucósido y varios glicósidos de quercetina (quercetina 3-O-rutinósido, quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina 3-O-arabinósido, quercetina-3-O-ramnósido entre otros), en el epicarpio del fruto. Adicionalmente, mediante el empleo de estándares se confirmó la presencia de flavonoides, como (+)-catequina en la semilla y cianidina 3-O-rutinósido en el epicarpio de aguacate.
- La coloración morada del epicarpio del aguacate de la variedad estudiada puede deberse a las antocianinas: cianidina 3-O-rutinósido y a la cianidina 3-O-glucósido identificadas en este tejido vegetal.
- La evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de aguacate (ERPs y fracciones) frente a los radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> permitió establecer que existe una relación significativa entre estos ensayos y a su vez con el contenido fenólico total (CFT) determinado para las muestras.
- Se pudo establecer que las fracciones más retenidas en la columna (sephadex LH-20), enriquecidas en compuestos fenólicos de mayor peso molecular, como dímeros y trímeros de procianidinas (semilla y epicarpio) y compuestos fenólicos de tipo polimérico (F2S, F2E, F3S y F3E), son más antioxidantes frente a los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> que las primeras fracciones en eluir (F1S y F1E), donde se identificaron tentativamente compuestos fenólicos de menor peso molecular, como isómeros del ácido cafeoilquínico (semilla) y antocianinas derivadas de la cianidina (epicarpio).
- De la comparación de la actividad antioxidante y contenido fenólico total de las muestras de aguacate con otras fuentes naturales de polifenoles (principalmente frutas), se ha podido establecer que los residuos de

aguacate estudiados son una potencial fuente de compuestos bioactivos que podrían ser importantes en la industria alimentaria y farmacéutica; que al ser subproductos derivados del consumo de aguacate, son una materia prima favorable desde el punto de vista económico y ambiental.

- La RED RIFRUTBIO dará continuidad a este trabajo de investigación evaluando el potencial efecto de las fracciones más antioxidantes (F2S, F2E, F3S y F3E) contra la bacteria *H. pylori* asociada con el desarrollo de cáncer gástrico de alta prevalencia en nuestra región.
- Del estudio preliminar de las transformaciones de tipo oxidativo desarrolladas durante la exposición de la semilla al aire, se sugiere que pueden afectar la composición fenólica de los extractos, provocando una disminución significativa de su actividad antioxidante *in vitro* (frente a los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>), lo cual evidencia la necesidad de evitar su desarrollo.

## PRODUCTOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

### PONENCIAS ORALES

-XV CONGRESO LATINOAMERICANO DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES Y VII CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFÍA, realizado desde el 29 de Septiembre al 3 de Octubre de 2014, Hotel Caribe, Cartagena - Colombia.

➤ Ponencia:

Extracción, identificación y cuantificación de polifenoles en subproductos de semilla y epicarpio aguacate (*Persea americana* Mill).

-V CONGRESO IBEROAMERICANO DE PRODUCTOS NATURALES, realizado desde el 25 al 29 de abril de 2016, Hotel Tequendama, Bogotá – Colombia.

➤ Ponencia:

Estudio de la composición y actividad antioxidante *In vitro* de la fracción polifenólica extraíble de subproductos de aguacate (*Persea americana* Mill), Semilla y epicarpio.

### OTRAS ACTIVIDADES INVESTIGATIVAS

Planteamiento y desarrollo del proyecto de investigación titulado: OBTENCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE AGUACATE, POTENCIALES INHIBIDORES DEL CÁNCER GÁSTRICO. En el grupo de Investigación de Productos de Importancia Biología (GIPIB), en el marco del programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de la Gobernación de Nariño, 2015.

➤ Ponencia tipo póster

Obtención, fraccionamiento y determinación de la composición de extractos polifenólicos de aguacate (*Persea americana* Mill).



## BIBLIOGRAFÍA

ABAD-GARCÍA B., Berrueta La., Garamón-Lobato S., Gallo B. y Vicente F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. En: Journal of Chromatography A, 2009. vol. 1216, p. 5398–5415.

AGRONET - Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano [En línea]. [Citado en Noviembre, 2016]. Disponible en: <<http://www.agronet.gov.co/Paginas/default.aspx>>.

ALCALDÍA MUNICIPAL DE TUMACO. Plan de ordenamiento territorial, 2008-2009.

AN-NA L., Sha L., Yu-Jie Z., Xiang-Rong X., Yu-Ming C. y Hua-Bin L. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. En: Nutrients, 2014. vol. 6, p. 6020-6047.

ARRANZ S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Dpto. Nutrición Y Bromatología. Madrid-España. 2010. p. 7.

ARTS I., Van de Putte B. y Hollman P. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. En: Journal of Agricultural Food Chemistry, 2000. vol. 48, p. 1746-1751.

BALASUNDRAM N., *et al.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. En: Food Chemistry, 2006. vol. 99, p. 191–203.

BASTOS C. y Alves R. Métodos para el análisis de ácido clorogénico. En: Química Nova, 2004. vol. 27, no 4, p. 586-592.

BERNAL E., Díaz D. y Cipriano A. Generalidades del cultivo de aguacate. En: Tecnología para el cultivo del aguacate. Antioquia, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Centro de Investigación La Selva, Rionegro, 2008.

BOWER J. P. y Cutting J. G. Avocado fruit development and ripening physiology. En: Horticultural Reviews, 1988. vol. 10, p. 229-271.

BUENO T., Mitchell D., Krieger N., Rotuno V. y Zanoelo E. Experimental and Modelling Study of Enzymatic Oxidation of 5-o-Caffeoylquinic Acid by Polyphenol Oxidases. En: Food Technol. Biotechnol, 2010. vol. 48, no. 4, p. 548–553.

CALA M. y Vásquez A. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia *labiaceae*, y determinación de su actividad antioxidante. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad De Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga. 2008.

CALDERÓN-OLIVER M., Escalona-Buendía H., Medina-Campos O., Pedraza-Chaverri J., Pedroza-Islas R. y Ponce-Alquicira E. Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. En: Food Science and Technology, 2015. vol 65, p. 46-52.

CASTILLO-MUÑOZ N., Gómez-Alonso S., García-Romero E. y Hermosín-Gutiérrez I.. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2010. vol. 23, p. 699–705.

CHAI W., Wei MK., Wang R., Deng RG., Zou ZR. y Peng YY. Avocado Proanthocyanidins as a Source of Tyrosinase Inhibitors: Structure Characterization, Inhibitory Activity, and Mechanism. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. vol. 63., p. 7381–7387.

CHANG C. y Wu R. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC–MS. En: Food Chemistry, 2011. vol. 126, p. 710–717.

CHARFUELAN C. Estudio químico de la fracción de polifenoles tipo antocianinas aisladas del fruto de ivilan (*Monima obtusifolia*), estabilidad y capacidad antioxidante *in vitro*. Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2012.

CHÁVEZ F., Aranda M., García A. y Pastene E. Los polifenoles antioxidantes del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. En: Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2011. vol. 10, p. 265-280.

CHEN L., Yuan P., Chen K., Jia Q. Li Y. Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: Evidence for quinone methide mechanism. En: Food Chemistry, 2014. vol. 154, p. 315–322.

CLIFFORD M., Johnston K., Knight S. y Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. En: Journal of Agricultural Food Chemistry, 2003. vol. 51, p. 2900-2911.

CONTRERAS-GUTIÉRREZ P., Hurtado-Fernández E., Gómez-Romero M., Ignacio-Hormaza J., Carrasco-Pancorbo A. Y Fernández-Gutiérrez A. Determination of changes in the metabolic profile of avocado fruits (*Persea americana*) by two CE-MS approaches (targeted and non-targeted). En: Electrophoresis, 2013. vol. 34, p. 2928–2942.

COX K., McGhie T., White A. y Woolf A. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. En: Postharvest Biology and Technology, 2004. vol. 31, p. 287–294.

CRAFT B., Kerrihard A., Amarowicz R. y Pegg R. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. En: Food Science and Food Safety, 2012. vol. 11, p. 148-173.

CRISTEA D., Bareau I. y Vilarem G. Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.). En: Dyes and Pigments, 2003. vol. 57, p. 267–272.

CUTTING J. G. M., Wolstenholme B. N. y Hardy J. Increasing relative maturity alters the base mineral composition and phenolic concentration in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. En: South African Avocado Growers' Association Yearbook, 1992. vol. 15, p. 64-67.

DAVENPORT J. Y Ellis S. Chemical changes during growth and storage of the avocado. División de alimentos, preservación y transporte, 1959. p. 445-454.

DAWIDOWICZ A. y Typek R. Transformation of 5-O-Caffeoylquinic Acid in Blueberries during High-Temperature Processing. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. vol. 62, p. 10889–10895.

DE PASCUAL-Teresa S., Moreno D. y García-Viguera C. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. En: International Journal of Molecular Sciences, 2010. vol. 11, p. 1679-1703.

DE VILLIERS A., Venter P. y Pasch H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. En: Journal of Chromatography A, 2016. vol. 1430, no 22. p.16–78.

DELGADO A. Betaláinas del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*): identificación, estabilidad y actividad antioxidante in vitro. Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2015.

DEY P. y Harborne. Methods in plant biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics. Capítulo 7. Chalcones and aurones. Academic press. London, 1989. p. 243.

DONETTI M. Postharvest biochemical and physiological characterization of imported avocado fruit. Tesis doctoral en Ciencias de la Poscosecha. Reino unido: Universidad Cranfield, Laboratorio en Ciencias de las Plantas. 2011. p. 7-28.

ENRÍQUEZ S. Extracción, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto de la mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*). Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2013.

FAOSTAT: Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations [en línea]. [citado en Enero 2016]. Disponible en: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>.

FLITSANOV U., Mizrach A., Liberzon A. Akerman M. Y Zauberman G. Measurement of avocado softening at various temperatures using ultrasound. En: Postharvest Biology and Technology, 2000. vol. 20, p. 279-286.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Measurement of fruit firmness using a penetrometer. En: Horticultural Chain Management For Eastern and Southern Africa. A practical Manual [Libro Online]. Londres, Jane Lanigan, 2008. p. 18.

FRANCIS F. Analysis of Anthocyanins. En: Anthocyanins as Food Colors, 1982. Pericles Markakis. New York. Capítulo 7. p. 182-207.

FRIEDMAN M. y Jürgens H. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. En: Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000. vol. 48, no. 6, p. 2101–2110.

GALVANO F., La Fauci L., Vitaglione P., Fogliano V., Vanella L. y Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. En: Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 2007. vol. 43, no. 4, p. 382-393.

GAMBLE J., Harker F., Jaeger S., White A., Bava C., Beresford M., Stubbings B., Wohlers M., Hofman P., Marques R. Y Woolf A. The impact of dry matter, ripeness and internal defects on consumer perceptions of avocado quality and intentions to purchase. En: Postharvest Biology and Technology, 2010. vol. 57, p. 35–43.  
GE Healthcare. Shephadex LH-20, Gel filtration. Data File 18-1107-22 AB.

GOLAN A., Kahn V. y Sadovski A. Y. Relationship between Polyphenols and Browning in Avocado Mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman Cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. vol. 25, no. 6, p. 1253-1259.

GÓMEZ V. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. En: Food Chemistry, 2002. vol. 77, p. 163–169.

GUERRERO C. Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (*cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 2009.

GÜLÇİN I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. En: Archives of Toxicology, 2012. vol. 86, p. 345–391.

HAMINIUK C., Maciel G., Plata-Oviedo M. Y Peralta R. Phenolic compounds in fruits – an overview. En: International Journal of Food Science and Technology, 2012. vol. 47, p. 2023–2044.

HELLSTRÖM J., Törrönen A. Y Mattila P. Proanthocyanidins in Common Food Products of Plant Origin. En: Journal Agricultural and Food Chemistry, 2009. vol. 57, p. 7899–7906.

HELLSTRÖM J. y Mattila P. HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. En: Journal Agricultural and Food Chemistry, 2008. vol. 56, p. 7617–7624.

HERAZO I. Obtención y estabilización de antocianinas de berenjena (*Solanun Melongena L.*) mediante microencapsulación y su evaluación como compuesto funcional en la industria alimentaria. Tesis de maestría en Ciencia Agroalimentaria con énfasis en Ciencias de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Berástegui, Córdoba, 2013.

HOLLMAN P. y Arts LI. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. vol. 80, p. 1081-1093.

HUANG X., Liang J., Tan H., Yahya R., Khamseekhiew B. y Ho Y. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. En: Animal Feed Science and Technology, 2010. vol. 159, no. 3–4, p. 81–87.

HUNG-JU C., Baskaran S. y Bing-Huei C. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. En: International Journal of Molecular Sciences, 2012. vol. 13, p. 260-285.

HURTADO-FERNÁNDEZ E., Contreras-Gutiérrez P., Cuadros-Rodríguez L., Carrasco-Pancorbo A. y Fernández-Gutiérrez A. Merging a sensitive capillary

electrophoresis–ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. En: Food Chemistry, 2013. vol. 141, p. 3492–3503.

HURTADO-FERNÁNDEZ E. Carrasco-Pancorbo A. y Fernández-Guitierrez A. Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS Method for the Determination of Phenolic Metabolites from Avocado (*Persea americana*). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 59, p. 2255–2267.

IGNAT I., Volf I. Y Popa V. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. En: Food Chemistry, 2011. vol. 126, p. 1821–1835.

IGNAT I., Volf I. Y Popa V. Analytical Methods of Phenolic Compounds. En: Natural Products. J.M. Mérillon (Eds.). 2013.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana 5209: Frutas frescas. Aguacate y variedades mejoradas, especificaciones. Bogotá D.C., 2003, p. 8.

ISWALDI I., Gómez-Caravaca A., Lozano-Sánchez J., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. y Fernández-Gutiérrez A. Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. En: Food Research International, 2013. vol. 50., p. 77–84.

JIMÉNEZ, J.P. y Villarreal, J. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Motilon (*Hyenorima macrocarpa*). Tesis de pregrado en Química. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Química. 2008. Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2013.

KANTZ K. y Singleton V. Isolation and Determination of Polymeric Polyphenols Using Sephadex LH-20 and Analysis of Grape Tissue Extracts. En: American Journal of Enology and Viticulture, 1990. vol. 41, no. 3.

KHALLOUKI F., Haubner R., Ricarte I., Erben G., Klika K., Ulrich CM. Y Owen RW. Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits. En: Food Chemistry, 2015. vol. 179, p. 191–198.

KOSIŃSKA A., Karamać M., Estrella I., Hernández T., Bartolomé B y Dykes GA. Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60. p. 4613–4619.

KUNIN R. Polymeric Adsorbents. En: Ion Exchangers. New York. Konrad D. (Ed.) 1991. p. 661-677.

KÜRBITZ C., Heise D. Redmer T., Goumas F., Arlt A., Lemke J., Rimbach G., Kalthoff H. y Trauzold A. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. En: Cancer Science, 2011. vol. 102, no. 4, p. 728–734.

KUSKOSKI M. Asuero A., Troncoso A., Mancini-filho J. y Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005. vol. 25, no 4, p. 726-732.

LEMBE S. y Samson Z. A Review of Destructive and Non-destructive Methods for Determining Avocado Fruit Maturity. En: Food Bioprocess Technol. 2015. Vol. 8. p. 1995–2011.

LIM T. *Persea americana*. En: Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, 2012. vol. 3, p. 78-97.

LÓPEZ-COBO A., Gómez-Caravaca A., Pasini F., Fiorenza M., Segura-Carreter A. y Fernández-Gutiérrez A. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. En: Food Science and Technology, 2016. vol. 73., p. 505-513.

MANACH C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. Y Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. En: The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. vol. 79, p. 727–47.

MÁRQUEZ C., Yepes D., Sanchez L. Y Osorio J. Cambios físico-químicos del aguacate (*Persea americana* Mill. cv. “Hass”) en poscosecha para dos municipios de Antioquia. En: Temas Agrarios, 2014. vol. 19, no 1, p. 32-47.

MATERSKA M. Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity – A Review. En: Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences, 2008. vol. 58, no. 4, p. 407-413.

MATTILA P. y Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2007. vol. 20, p. 152–160.

MENA J. y Yépez M. Actividad antibacteriana *In vitro* de extractos de plantas medicinales regionales promisorias sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. En: Revista centro de estudios en salud-Universidad de Nariño, 2007. vol. 1, p. 7-15.

MITCHAM B., Cantwell M. y Kader A. Methods for Determining Quality of Fresh Commodities. En: Perishables Handling Newsletter, 1996. vol. 85., p. 2-4.

MORILLAS-Ruiz J. y Delgado-Alarcon J. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. En: Nutrición clínica y dietética hospitalaria, 2012. vol. 32, p. 8-20.

MOSQUERA N. Contenido de betalainas y actividad antioxidante in vitro del ulluco (*Ullucus tuberosus*). Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2015.

MOURI C., Mozaffarian V., Zhang X. y Laursen R. Characterization of flavonols in plants used for textile dyeing and the significance of flavonol conjugates. En: *Dyes and Pigments*, 2014. vol. 100. p. 135-141.

NAM J., Ranjan S., Nguyen L., Chakraborty C., Sharma G. y Lee S. Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. En: *Molecules*, 2016. vol. 21, no. 108, p. 1-23.

PIERPOINT W. The Enzymic Oxidation of Chlorogenic Acid and some Reactions of the Quinone Produced. *Biochemical Journal*, 1968. vol. 98, p. 567.

PELILLO M., Biguzzi B., Bendini A., Gallina T., Vanzini M. Lercker G. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. En: *Food Chemistry*, 2002. vol. 78, p. 369–374.

PÉREZ M. Análisis químico, estabilidad y actividad biológica *in vitro* de la fracción de polifenoles del fruto de capulí (*Prunus serótina Ehrh. Var. Capulí*). Tesis de pregrado en Química. Colombia-San Juan de Pasto. Universidad de Nariño, 2013.

PRASAIN J., Wang C. Y Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. En: *Free Radical Biology & Medicine*, 2004. vol. 37, no 9, p. 1324–1350.

PRABHA, T. N. y Patwardhan, M. V. Polyphenols of avocado (*Persea americana*) and their endogenous oxidation. Citado en: Donetti, M., Postharvest biochemical and physiological characterization of imported avocado fruit. Tesis de grado (Doctor Ciencias de la Poscosecha). Reino unido. Universidad Cranfield, Laboratorio en ciencias de las plantas. 2011. p. 7-28.

RAMÍREZ A y Sánchez R. Helicobacter Pylori y Cáncer Gástrico. Artículo de revisión. En: *Revista de Gastroenterología del Perú*, 2008. vol. 28, p. 258-266.

RAMÍREZ M., Barajas L., Pérez C., Sáenz A. y Silva S. Síntesis y actividad biológica de chalconas. En: *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2012. vol. 43, no. 4.



RAMÍREZ-MARTÍNEZ J. R. y Luh B. S. Phenolic compounds in frozen avocados. Citado en: Golan A., Kahn V. y Sadovski A. Y. Relationship between Polyphenols and Browning in Avocado Mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman Cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. vol. 25, no. 6, p. 1253-1259.

RE R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannalaa A., Yanga M. y Rice-Evansa C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. 1999. En: Free Radical Biology and Medicine. vol. 26, p. 1231-1237.

RICE E. C., Miller N. y Paganga G. Antioxidants properties of phenolics compounds. En: Trends in plant science. Reviews, 1997. vol. 2. no. 4.

RODRÍGUEZ-CARPENA J., Morcuende D., Andrade Mj. Kylli P. Y Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 59, p. 5625–5635.

RODRÍGUEZ M, *et al.* Colecta de aguacate criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. Congreso latinoamericano del aguacate. (3: 12 de Noviembre de 2009, Medellín, Colombia). Consejo Nacional del Aguacate y la Corporación Antioqueña del Aguacate.

RODRÍGUEZ M., Jaramillo J. y Orozco J. Colecta de aguacates criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. III congreso Latinoamericano del Aguacate.

RICE-EVANS C., Miller N. Y Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. En: Tends in plants science, 1997. vol. 2, no. 4, p. 152-159.

RIVAS J. y García A. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. En: Alimentación, Nutrición y Salud, 2002. vol. 9, no 2, p. 31-38.

ROBAYO A. Delgado W. y Cuca L. El aguacate, *Persea americana* MILL (Lauraceae): Origen, propiedades y estado actual en Colombia, 2016. En: Revista Quei. Química e Industria. vol. XXVIII, no. 1, p. 1-9.

ROBBINS R. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. En: Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003. vol. 51, p. 2866-2887.

RODRÍGUEZ-CARPENA J.-G., Morcuende D., Petró MJ. Y Estévez M. Inhibition of Cholesterol Oxidation Products (COPs) Formation in Emulsified Porcine Patties

by Phenolic-Rich Avocado (*Persea americana* Mill.) Extracts. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60, p. 2224–2230.

SÁNCHEZ-MORENO J. y Fulgencio S. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. vol. 76, p. 270-276.

SANTACRUZ L. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de maestría. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Química. 2011. p. 21.

SINGLETON V., Orthofer R. y Lamuela-Ravent R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, 1974. En: American Journal of Enology and Viticulture. vol. 25, p. 119.

SUN B. y Spranger M. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. En: Ciência e Técnica Vitivinícola, 2005. vol. 20, no 2, p. 59-89.

SUN-WATERHOUSE D., Zhou J. y Wadhwa S. Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. En: Food Control, 2013. vol. 32, p. 450-460.

STATGRAPHICS. Modelos de Calibración. Rev. 9/14/2006.

STEFOVA M., Stafilov T. y Kulevanova S. HPLC Analysis of Flavonoids. En: Encyclopedia of Chromatography. Skopje, Republic of Macedonia. Sts. Cyril and Methodius University. 2003.

TEIXEIRA N., Azevedo J., Mateus N. y de Freitas V. Proanthocyanidin screening by LC–ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. En: Food Chemistry, 2016. vol. 190, p. 300–307.

TERASAWA N., Sakakibara M. y Murata M. Antioxidative Activity of Avocado Epicarp Hot Water Extract. En: Food Science and Technology Research, 2006. vol. 12, no. 1, p. 55-58.

TIBERTI L., Yariwake J., Ndjoko k. y Hostettmann K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. En: Journal of Chromatography B, 2007. vol. 846, p. 378–384.

TORRES A. M., Mau-Lastovicka T. y Rezaaiyan R. Total Phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of Phenolic Acids of Avocado. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987. vol. 35, no. 6, p. 921-925.

VALLS J., Millána S., Martí P., Borràs E., Arola LI. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. En: Journal of Chromatography A, 2009. vol. 1216, p. 7143–7172.

VASCO C. Phenolic compounds in ecuadorian fruits. Tesis Doctoral. Universidad Sueca De Ciencias Agrícolas. UPPSALA, 2009. p. 40.

VIHAKAS M. Flavonoids and other Phenolic Compounds: Characterization and Interactions with Lepidopteran and Sawfly Larvae. Tesis doctoral. Laboratorio de Química Orgánica y Química Biológica. 2014. Universidad de Turku. Finlandia. p. 14.

WANG W., Bostic T. y Gu L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. En: Food Chemistry. 2010. vol. 122, p. 1193–1198.

YABRUDY J. El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el caribe colombiano. Cartagena: Banco de la Republica. Centro de Estudios Económicos regionales, CEER, 2012.

YAN T., Hu G., Wang A., Hong Y. y Jia J. Characterisation of proanthocyanidins from Schisandra chinensis seed coats by UPLC-QTOF/MS. En: Natural Product Research. 2014. vol. 28, No. 21, p. 1834–1842.

YORUK R. y Marshall M. physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. En: Journal of Food Biochemistry, 2003. vol. 27, p. 361-422.

ZHANG Q., Wang W., Li J., Chang Y., Wang Y., Zhang J., Zhang B. y Gao X. Simultaneous determination of catechin, epicatechin and epicatechin gallate in rat plasma by LC–ESI-MS/MS for pharmacokinetic studies after oral administration of Cynomorium songaricum extract. Journal of Chromatography B, 2012. vol. 880, p. 168– 171.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 268  
Bogotá D.C., 20 de agosto de 2014

Señores  
Universidad Nacional de Colombia  
Departamento de Química  
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica muestras**

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

ANEXOS

Anexo A:  
Certificado  
o de  
clasificación  
taxonómica  
del  
Herbario  
de la  
Universidad  
Nacional y  
del  
Herbario  
de la  
Universidad  
de  
Nariño.

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Persea americana</i> Mill.	LAURACEAE	576779	Jessica Basante & Jerry Centeno	1	J. L. Fernández/2014
<i>Persea americana</i> Mill.	LAURACEAE	576780	Jessica Basante & Jerry Centeno	2	J. L. Fernández/2014

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA  
Administrador General  
Herbario Nacional Colombiano -COL  
E-mail: herbacol\_fcboq@unal.edu.co

Copia Archivo COL  
Héctor Fiala

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,  
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222  
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538  
Correo electrónico: herbacol\_fcboq@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América



San Juan de Pasto, 11 de marzo de 2014.

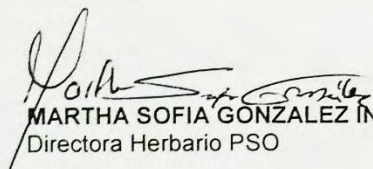
### CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

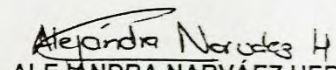
Por medio del presente, el HERBARIO PSO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO, certifica que la planta conocida con el nombre común de AGUACATE (cultivada en el municipio de Tumaco), pertenece a la especie vegetal, *Persea americana* Mill. La cual se encuentra registrada en nuestros catálogos de la siguiente manera:

Número de Inclusión: 10035.  
Colector: López Jurado, G & Riascos, J.  
Fecha de recolección: 22 de Octubre de 1980.

Este certificado se expide a solicitud de la estudiante: JESSICA SARAY BASANTE VALENCIA, inscrita en el Programa de Química, como soporte de identificación taxonómica, para el trabajo de grado denominado "ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE SUBPRODUCTOS DE AGUACATE, SEMILLA Y EPICARPIO".

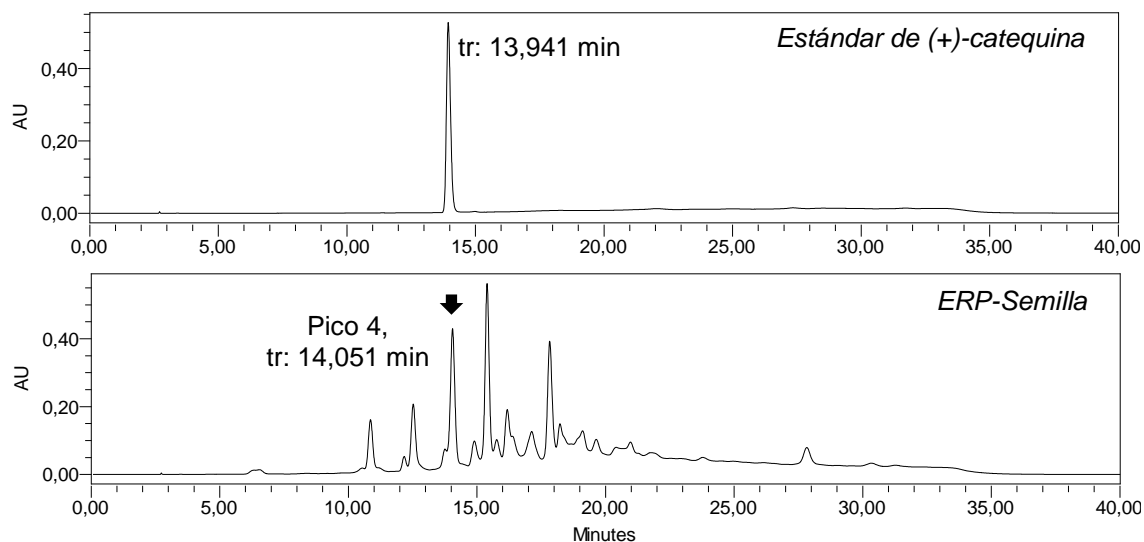
Atentamente,

  
MARTHA SOFIA GÓNZALEZ INSUASTI  
Directora Herbario PSO

  
ALEJANDRA NARVÁEZ HERRERA  
Técnico Herbario PSO.

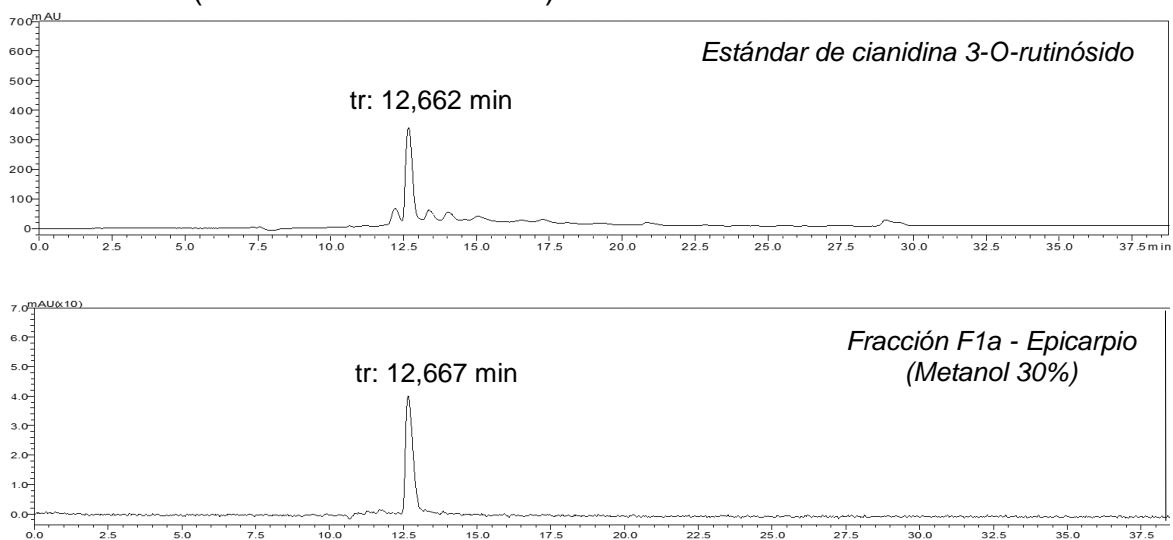
Anexo B. Perfiles cromatográficos del estándar de (+)-catequina y el ERP de la semilla de aguacate.

Figura 1. Perfiles cromatográficos del estándar de (+)-catequina y el ERP de la semilla de aguacate registrados a una  $\lambda$  de 280 nm.



Anexo C. Perfiles cromatográficos del estándar de cianidina 3-O-rutinósido y el ERP de la semilla de aguacate.

Figura 2. Perfiles cromatográficos del estándar de cianidina 3-O-rutinósido y la fracción **F1a** (eluida con metanol 30%) a una  $\lambda$  520 nm.



Anexo D. Cálculo de concentración y su error aleatorio mediante métodos de calibración.

Una vez determinada la ecuación de una recta de regresión (calibrado), es fácil calcular la concentración (valor de x) correspondiente a cualquier señal medida en el instrumento (valor de y). Sin embargo, también es necesario estimar el error asociado a la concentración calculada. Puesto que el cálculo de una concentración desconocida implica el uso de la pendiente e intercepto de la ecuación de calibrado, que están sujetas a error, el error global a calcular debe estimar también su magnitud. Además, de considerar los errores aleatorios a los cuales está sujeta la señal del instrumento. Para este fin, se ha planteado el uso de la siguiente fórmula aproximada para la estimación del error global<sup>203</sup>.

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

$S_{x_0}$ : Desviación estándar estimada de  $x_0$

$y_0$ : Valor experimental de y, a partir se determina el valor de la concentración  $x_0$

$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$ , estadístico que determina los errores en la dirección de y

$\hat{y}_i = a + bx$ ; donde  $\hat{y}_i$ : valor ajustado de y

$y_i - \hat{y}_i$ : residuos de y

---

<sup>203</sup> Miller N. J. y Miller M. C. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid-España: Pearson Educación, S.A, 2002. p. 135.

Anexo E. Composición fenólica de las fracciones de la semilla y epicarpio de aguacate aisladas en el segundo ensayo cromatográfico.

-Composición de las fracciones de aisladas de la semilla.

Figura 3. Perfil cromatográfico del ERP de la semilla y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño (fraccionamiento 2).

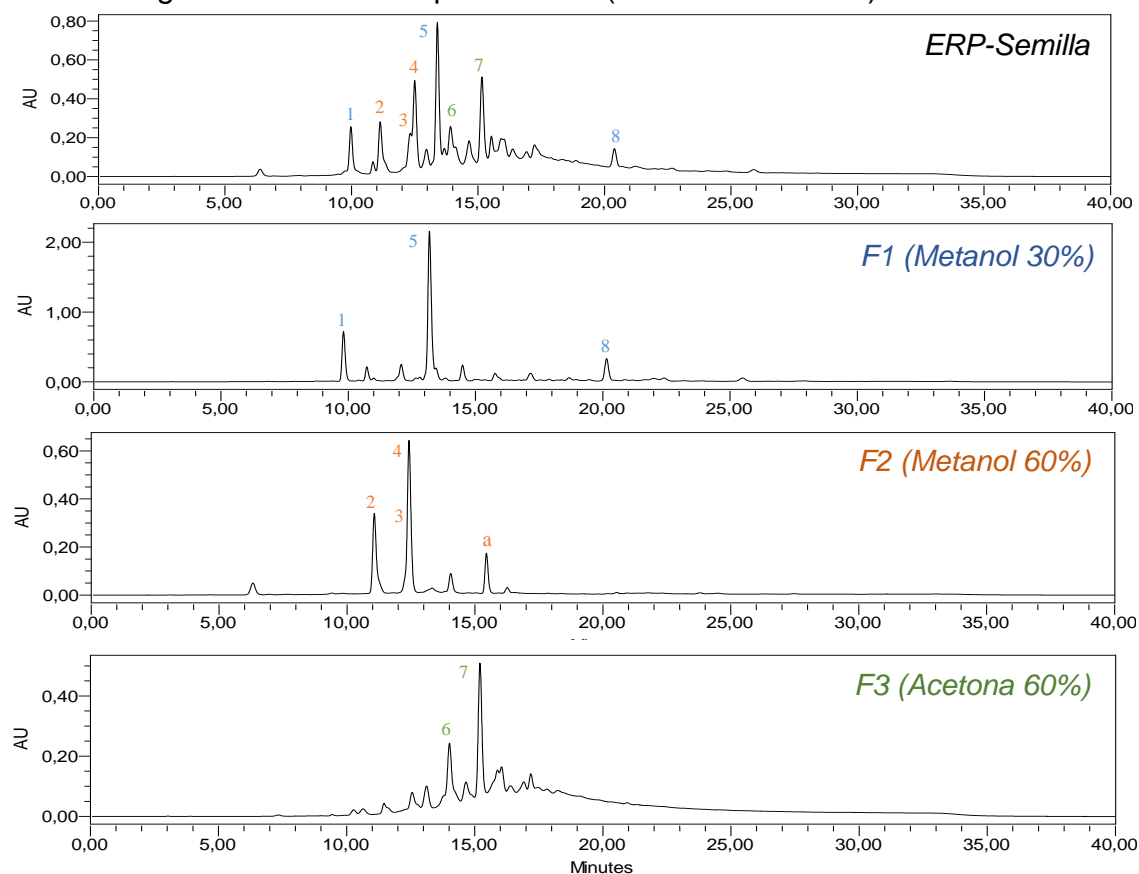


Tabla 1. Composición de las fracciones aisladas de la semilla de aguacate mediante cromatografía de exclusión por tamaño (segundo fraccionamiento).

<b>Fracción</b>	<b>No pico</b>	<b>tr (min)</b>	<b>Identificación parcial</b>
<b>F1-Met30</b>	1	9,814	Isómero ácido cafeoilquínico (I)
	5	13,189	Isómero ácido cafeoilquínico (II)
	8	20,150	(+)-Catequin/(-)-Epicatequin 3-O-galato
<b>F2-Met60</b>	2	11,065	Dímero procianidina tipo B (I)
	3	12,422	Trímero procianidina tipo B (I)
	4		(+)-Catequina
	a	15,449	Estereoisómero de catequina ((-)-Epicatequina*)
<b>F3-Acet60</b>	6	14,014	Trímero procianidina tipo B (III)
	7	15,206	Trímero procianidina tipo A (II)



-Composición de las fracciones aisladas del epicarpio.

Figura 4. Perfil cromatográfico del ERP del epicarpio y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño a una  $\lambda$  de 520 nm (fraccionamiento 2).

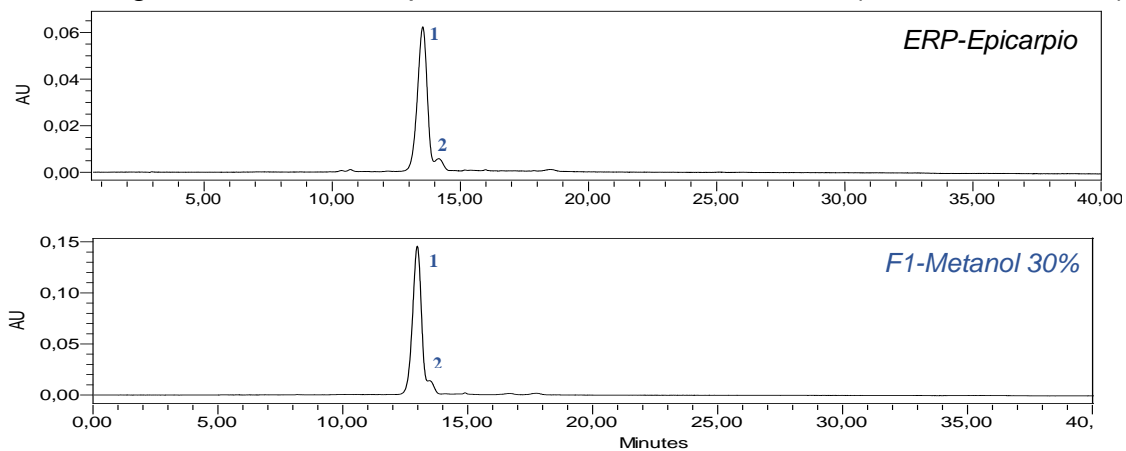


Figura 5. Perfil cromatográfico del ERP del epicarpio y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño a una  $\lambda$  de 360 nm (fraccionamiento 2).

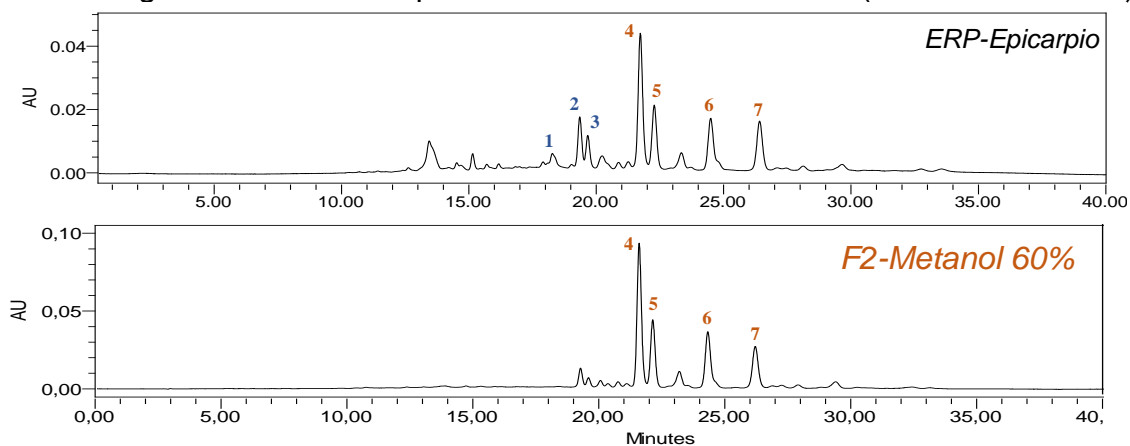


Figura 6. Perfil cromatográfico del ERP del epicarpio y de las fracciones aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño a una  $\lambda$  de 280 nm (fraccionamiento 2).

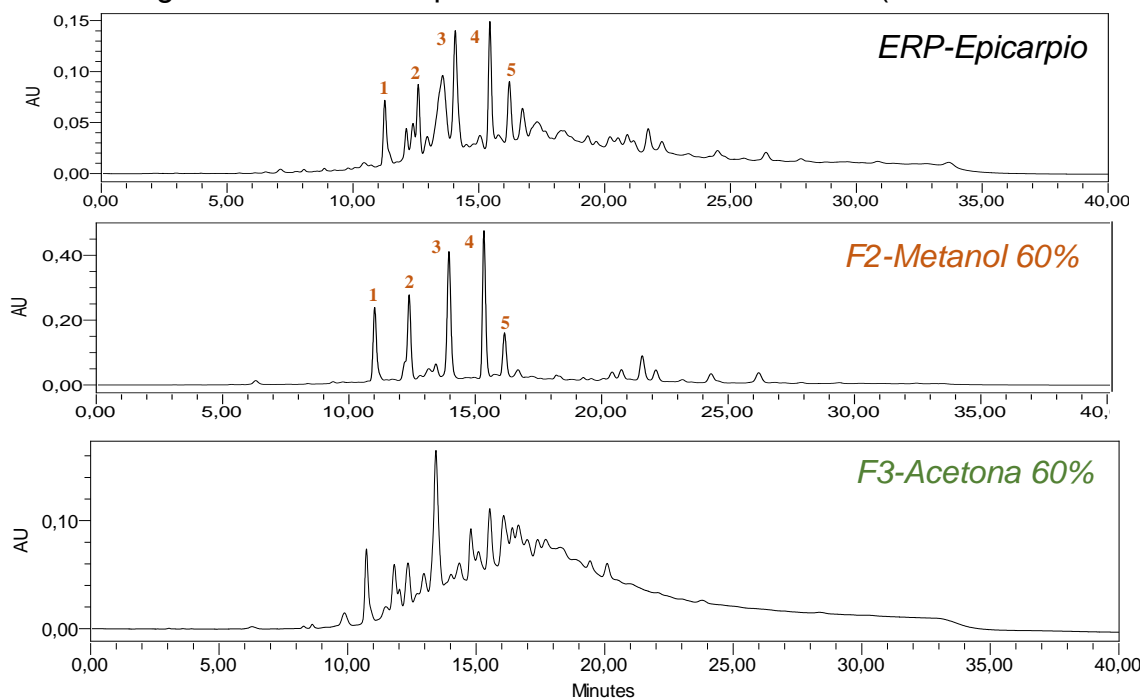


Tabla 1. Composición de las fracciones aisladas del epicarpio de aguacate mediante cromatografía de exclusión por tamaño (fraccionamiento 2).

$\lambda$	Frac.	No pico	tr (min)	Identificación parcial
320 nm	F1	1	12,991	Cianidina 3-O-hexosa (Cianidina 3-O-glucósido)
		2	13,475	Cianidina 3-O-rutinósido
360 nm	F2	4	21,602	Quercetina 3-O-hexosa (Quercetina-3-O-galactósido y Quercetina-3-O-glucósido)
		5	22,142	Quercetina 3-O-pentosa (Quercetina 3-O-arabinósido)
		6	24,329	Quercetina 3-O-pentosa (Quercetina 3-O-arabinósido)
		7	26,210	Quercetina 3-O-metil pentosa (Quercetina-3-O-ramnósido)
280 nm	F2	1	11,019	Dímero procianidina tipo B (I)
		2	12,382	Dímero procianidina tipo B (II)
		3	13,956	Dímero procianidina tipo B (III)
		4	15,340	Estereoisomero de catequina ((-)-Epicatequina)
		5	16,156	Trímero de procianidina tipo B (IV)

Anexo F. Datos para la construcción de las diferentes gráficas de porcentaje de DPPH remanente versus concentración de antioxidante (g de muestra / kg de DPPH).

Tabla 3. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de ácido gálico.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,00</b>	4,61	4,61	4,61	4,61	0,00	0,00
<b>10,0</b>	4,43	4,45	4,44	4,44	0,01	0,22
<b>17,0</b>	4,24	4,32	4,32	4,29	0,05	1,07
<b>30,0</b>	4,09	4,11	4,09	4,10	0,01	0,28
<b>50,0</b>	3,66	3,57	3,65	3,63	0,05	1,35
<b>100,0</b>	1,87	1,87	2,01	1,92	0,08	4,02

Tabla 4. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de ERP-Semilla.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	68,0	69,8	69,4	69,0	0,9	1,3
<b>90,0</b>	58,4	57,2	56,7	57,5	0,9	1,6
<b>120,0</b>	42,8	42,0	42,2	42,4	0,4	1,0
<b>150,0</b>	31,1	30,2	29,9	30,4	0,6	2,1
<b>170,0</b>	22,1	21,0	20,7	21,3	0,7	3,4

Tabla 5. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de ERP-Semilla EA.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	77,6	77,3	77,6	77,5	0,2	0,2
<b>90,0</b>	63,8	66,0	66,3	65,4	1,3	2,0
<b>120,0</b>	53,0	55,1	51,7	53,3	1,7	3,3
<b>150,0</b>	45,5	45,8	41,7	44,3	2,3	5,5
<b>170,0</b>	38,7	40,7	40,1	39,8	1,0	2,6

Tabla 6. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de ERP-Epicarpio.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100	100	100	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	72,15	70,29	69,76	70,7	1,3	1,8
<b>90,0</b>	59,9	58,17	59,1	59,1	0,9	1,5
<b>120,0</b>	49,91	48,17	47,24	48,4	1,4	2,9
<b>150,0</b>	36,98	42,18	36,98	38,7	3,0	8,1
<b>170,0</b>	31,92	27,26	28,32	29,2	2,4	8,6

Tabla 7. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de Fracción 1-Semilla.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>120,0</b>	79,4	80,4	79,0	79,6	0,7	0,9
<b>190,0</b>	71,0	70,0	71,0	70,6	0,5	0,8
<b>270,0</b>	59,9	58,4	59,8	59,4	0,8	1,4
<b>350,0</b>	51,3	51,3	51,6	51,4	0,2	0,3
<b>400,0</b>	40,3	39,5	40,4	40,1	0,5	1,3

Tabla 8. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de Fracción 2-Semilla.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	65,8	67,1	65,7	66,2	0,8	1,2
<b>90,0</b>	55,8	56,3	56,3	56,1	0,3	0,5
<b>120,0</b>	44,4	43,3	42,1	43,3	1,2	2,7
<b>150,0</b>	35,4	30,6	34,2	33,4	2,5	7,4
<b>170,0</b>	25,2	25,7	24,3	25,0	0,7	3,0

Tabla 9. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de Fracción 3-Semilla.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0</b>	100	100	100	100,0	0,0	0,0
<b>60</b>	62,11	62,52	62,25	62,3	0,2	0,3
<b>90</b>	50,41	47,45	46,42	48,1	2,1	4,5
<b>120</b>	31,91	30,73	29,1	30,6	1,4	4,8
<b>150</b>	18	15,48	15,18	16,2	1,5	10,2
<b>170</b>	10,3	9,56	9,71	9,9	0,4	4,0

Tabla 10. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de Fracción 1-Epicarpio.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	4,61	4,61	4,61	4,61	0,00	0,00
<b>180,0</b>	4,26	4,30	4,26	4,27	0,02	0,54
<b>280,0</b>	4,19	4,11	4,19	4,16	0,05	1,10
<b>360,0</b>	4,02	4,03	4,02	4,02	0,01	0,14
<b>450,0</b>	3,88	3,85	3,87	3,87	0,02	0,39
<b>500,0</b>	3,80	3,80	3,79	3,80	0,01	0,15

Tabla 11. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de F2-Epicarpio.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	72,0	71,1	71,3	71,4	0,5	0,6
<b>90,0</b>	60,8	60,5	61,8	61,0	0,7	1,1
<b>120,0</b>	48,7	51,6	49,7	50,0	1,5	3,0
<b>150,0</b>	39,8	38,8	37,2	38,6	1,3	3,5
<b>170,0</b>	32,4	34,9	31,8	33,0	1,7	5,2

Tabla 12. Resultados del ensayo DPPH, % DPPH remanente en función de la concentración de F3-Epicarpio.

<i>Antioxidante (g/kgDPPH)</i>	<i>% DPPH Remanente réplicas reacción</i>			<i>%DPPH Rem. medio</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep. 3</i>			
<b>0,0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
<b>60,0</b>	64,8	65,7	64,5	65,0	0,6	1,0
<b>90,0</b>	48,8	47,3	47,9	48,0	0,7	1,6
<b>120,0</b>	36,5	34,4	34,6	35,2	1,2	3,3
<b>150,0</b>	21,1	19,5	18,6	19,7	1,3	6,8
<b>170,0</b>	10,7	10,7	10,6	10,7	0,1	0,8