

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS FENÓLICOS  
CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE RESIDUOS DE AGUACATE:  
EPICARPIO Y SEMILLA (*Persea americana*)**

**JOHANNA CATALINA ROSERO ROSERO**

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

**2017**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS FENÓLICOS  
CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE RESIDUOS DE AGUACATE:  
EPICARPIO Y SEMILLA (*Persea americana*)**

**JOHANNA CATALINA ROSERO ROSERO**

**Trabajo de grado para optar al título de Químico**

**Director:**

**NELSON H. HURTADO G.**

**Ph.D. en Ciencias Químicas**

**CODIRECTORA:**

**SILVIA CRUZ SÁNCHEZ.**

**Ph.D. en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**SAN JUAN DE PASTO**

**2017**

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

Artículo 1ro del Acuerdo N°. 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 Camilo Vargas Gallego  
Jurado

---

José Hipólito Isaza  
Jurado

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser el pilar de mi vida, ser la luz de mis días.

A mi madre por ser mi mayor ejemplo de amor incondicional, esfuerzo, sacrificio y fortaleza.

Al docente Nelson Hurtado y coasesora Silvia Cruz por su orientación y colaboración durante el desarrollo del proyecto

A la Red para la Bioprospección De Frutas Tropicales – RIFRUTBIO por la financiación de este trabajo.

A los jurados evaluadores Juan Camilo Vargas Gallego y José Hipólito Isaza por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, su valiosa colaboración y por los conocimientos entregados.

A los profesores y laboratoristas del programa de Química por toda su ayuda y atención prestada en especial a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez encargados del laboratorio de Cromatografía.

A mi familia por su cariño y apoyo incondicional y por enseñarme en cada momento a ser una persona de bien, con principios y valores.

A mis amigos por llenar de mil sonrisas cálidas mis días, por brindarme su cariño sincero e inextinguible al paso del tiempo. Mil gracias por encontrar siempre en ustedes un apoyo en los momentos de dificultad y felicidad. Los quiero.

## RESUMEN

En Colombia se produce una amplia gama de frutas tropicales, de las cuales existen muy pocos estudios químicos. La investigación en el campo de los compuestos fenólicos de origen natural provenientes de frutas, permite establecer el potencial de ellas como alimento con propiedades biofuncionales y el desarrollo de productos con valor agregado que puedan ser usados como aditivos en la industria farmacéutica y de alimentos. En el marco de la RED NACIONAL PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE FRUTAS TROPICALES-RIFRUTBIO, se realizó el análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos presentes en sub-productos (semilla y epicarpio) del fruto de aguacate (*Persea Americana* Mill). Inicialmente mediante un diseño experimental se evaluaron dos disolventes de extracción (acetona/agua 70:30 y metanol/agua 80:20 v/v), el diseño tuvo en cuenta la parte del fruto y el tipo de disolvente y como factor de respuesta se tomó la actividad antioxidante (TEAC) y el contenido fenólico total (CFT). El análisis de varianza ANOVA permitió establecer que los disolventes empleados no influyen significativamente ( $p < 0,05$ , nivel de confianza 95%) sobre los valores CFT y TEAC.

Se obtuvieron extractos enriquecidos en compuestos fenólicos por adsorción selectiva sobre Amberlita XAD-7 a partir de los extractos obtenidos con acetona. Posteriormente los extractos enriquecidos se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CET) utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20. En total se obtuvieron para la semilla y epicarpio los siguientes extractos: extracto crudo de semilla (ECS) y epicarpio (ECE), extracto purificado de semilla (EPS) y epicarpio (EPE) y las fracciones separadas por (CET) para la semilla (F1S, F2S, F3S) y epicarpio (F1E, F2E, F3E). En todos los extractos se cuantificó el contenido fenólico total (CFT), el contenido de flavonoides totales (FT) y la actividad antioxidante mediante los métodos TEAC y DPPH. Los extractos enriquecidos en compuestos fenólicos y sus fracciones se analizaron por cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en modo tándem con interfase electro spray (LC/MS-ESI). Estos análisis junto con el análisis de patrones permitieron elucidar la estructura de la mayoría de los compuestos.

Los análisis realizados en la semilla y el epicarpio del aguacate, confirmaron la presencia en la semilla de diferentes ácidos fenólicos (protocatéquico, quínico, cafeico, cafeoilquínico, p-cumárico, cumaroilquínico, ferúlico, sinápico, y cítrico), un aldehído (vainillina) y diversos compuestos fenólicos (catequina, epicatequina, rutina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina, apigenina, kaempferol, phloridzina, procianidinas diméricas tipo B1 y B2 y procianidinas triméricas tipo A y B. En el epicarpio se identificaron glicósidos de flavonoides como quercetina-3-O-glucósido, rutina, quercetina-3-O-arabinosido, quercetina-3-O-ramnosido entre otros y procianidinas diméricas y triméricas tipo A y B.

En las fracciones más pesadas (F3S y F3E) se identificaron principalmente procianidinas diméricas y triméricas.

Posteriormente se evaluó el contenido fenólico total (CFT), el contenido de flavonoides totales (FT) y la actividad antioxidante de los extractos frente a los radicales libres ABTS y DPPH mediante espectroscopía UV-Vis. El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y la prueba de múltiples rangos permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ , nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT, FT y TEAC de todas las muestras (extractos purificados y fracciones). Los extractos crudos de semilla y epicarpio (ECS y ECE) mostraron valores relativamente bajos en el CFT y TEAC con respecto a los extractos purificados (EPS y EPE), se encontró que estos valores son mayores para EPE y EPS. El mayor CFT, FT y TEAC lo presentaron las fracciones con peso molecular intermedio de la semilla y epicarpio (F2E y F2S) y las más pesadas (F3E y F3S), siendo las fracciones F2E y F2S quienes presentan los mayores valores. Comparando los valores TEAC de los extractos purificados y sus fracciones (semilla y epicarpio) con el CFT, se observó una relación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre estas características, para la semilla se encontró un  $r = 0,96945$  y para el epicarpio un  $r = 0,984621$ . El comportamiento de los extractos para el caso de la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH fue diferente, no se evidenció una clara correlación entre los valores DPPH y CFT, sin embargo las fracciones más pesadas (F3S y F3E) fueron las más antioxidantes (menor  $FRS_{50}$ ).

Con estos resultados se comprobó que los subproductos de la fruta estudiada son una fuente promisoría de compuestos bioactivos que podrían ser de importancia en la industria alimentaria y farmacéutica, siendo más interesantes las fracciones de mayor peso molecular aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño. La RED RIFRUTBIO continuará con las investigaciones en este campo, para las fracciones más activas (F2S, F2E, F3S y F3E) se evaluará el potencial efecto sobre la bacteria *Helicobacter pylori* asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, una enfermedad con alta ocurrencia en el Departamento de Nariño.

## ABSTRACT

Colombia produces a wide range of tropical fruits, of which there are very few chemical studies. Research in the field of naturally occurring phenolic compounds from fruits allows them to establish their potential as food with biofunctional properties and the development of value added products that can be used as additives in the pharmaceutical and food industry. The qualitative analysis of the phenolic compounds present in sub-products (seed and epicarp) of the avocado fruit (*Persea Americana* Mill) was carried out in the framework of the NATIONAL NETWORK FOR THE BIOPROSPECTION OF TROPICAL FRUITS-RIFRUTBIO. Initially, two extraction solvents (70% acetone and 80% methanol) were evaluated using the experimental design. The design took into account the fruit and solvent type and the antioxidant activity (TEAC) were used as the response factor and the total phenolic content (CFT). Analysis of variance ANOVA allowed to establish that the solvents used did not significantly influence ( $p < 0.05$ , 95% confidence level) on the CFT and TEAC values.

Extracts enriched in phenolic compounds were obtained by selective absorption on Amberlite XAD-7 of the methanolic extract from the by-products of the fruit. Subsequently the enriched extracts were fractionated by size exclusion chromatography (CET) using as Sephadex LH-20 stationary phase. Finally, the following extracts were obtained for the seed and epicarp: crude seed extract (ECS) and epicarp (ECE), purified crude extract enriched in seed phenolic compounds (EPS) and epicarp (EPE) and fractions separated by (CET) for the seed (F1S, F2S, F3S) and epicarp (F1E, F2E, F3E). In all extracts total phenolic content (CFT) and antioxidant activity were quantified using the TEAC and DPPH methods. The extracts enriched in phenolic compounds and their fractions were analyzed by liquid chromatography coupled to a diode array detector (LC-DAD) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in Tandem mode with electrospray interface (LC / MS-ESI). These analyzes, along with the analysis of patterns, allowed to elucidate the structure of most of the compounds.

The analysis of avocado seed and epicarp confirmed the presence of different phenolic acids (protocatechic, quinic, caffeic, caffeine, p-coumaric, cumaroilquinic, ferulic, synapic and citric) in the seed, an aldehyde (vanillin) and various phenolic compounds (catechin, epicatechin, rutin, quercetin-3-O-glucoside, quercetin, apigenin, kaempferol, phloridzine, dimeric procyanidins B1 and B2 and trimeric procyanidins type A and B. In the epicarp flavonoid glycosides such as quercetin -3-O-glucoside, rutin, quercetin-3-O-arabinoside, quercetin-3-O-rhamnoside among others, and dimeric and trimeric procyanidin of type A and B. In the heavier fractions (F3S and F3E) were identified mainly dimeric and trimeric procyanidins.

The total phenolic content (CFT), total flavonoid content (FT) and antioxidant activity of ABTS and DPPH free radicals by UV-Vis spectroscopy were evaluated. Data analysis using Fisher's least significant difference (LSD) and multiple-rank test allowed the establishment of statistically significant differences ( $p < 0.05$ , 95% confidence level) when comparing CFT, FT And TEAC of all samples (purified extracts and fractions). Crude seed and epicarp extracts (ECS and ECE) showed relatively low values in CFT and TEAC with respect to purified extracts (EPS and EPE), it was found that these values are higher for EPE and EPS. The highest CFT, FT and TEAC fractions were presented with the intermediate molecular weight fractions of the seed and epicarp (F2E and F2S) and the heavier fractions (F3E and F3S), with the F2E and F2S fractions having the highest values. Comparing the TEAC values of the purified extracts and their fractions (seed and epicarp) with the CFT, a statistically significant ( $p < 0.05$ ) relationship was observed between these characteristics, for the seed an  $r = 0.96945$  was found and for the epicarp  $r = 0.984621$ . The behavior of the extracts for the case of the antioxidant activity evaluated by the DPPH method was different, there was no clear correlation between the DPPH and CFT values, however the heavier fractions (F3S and F3E) were the most antioxidant  $FRS_{50}$ .

With these results, it was verified that the byproducts of the fruit studied are a promising source of bioactive compounds that could be of importance in the food and pharmaceutical industry, with higher molecular weight fractions being isolated by size exclusion chromatography. The network RIFRUTBIO will continue with research in this field. For the most active fractions (F2S, F2E, F3S and F3E) the potential effect on *H. pylori* bacterium associated with the development of gastric cancer, a disease with a high occurrence in Nariño department.

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
INTRODUCCIÓN	23
1. OBJETIVOS	24
1.1 OBJETIVO GENERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2. MARCO REFERENCIAL	25
2.1 ANTECEDENTES	25
2.2 MARCO CONTEXTUAL	30
2.2.1 AGUACATE ( <i>Persea Americana</i> Mill): Origen, botánica, morfología y estructura	30
2.2.2 Aguacate en Colombia.	31
2.2.3 Aguacate: composición química	32
2.3 MARCO TEÓRICO	32
2.3.1 Compuestos fenólicos y su presencia en frutos y alimentos	32
2.3.2 Clasificación de compuestos fenólicos	32
2.3.3 Métodos de extracción, separación y purificación de compuestos fenólicos.	38
2.3.3.1 Separación y purificación.	39
2.3.4 Métodos de caracterización de compuestos fenólicos.	40
2.3.5 Cuantificación del contenido de fenoles totales.	41
2.3.6 Cuantificación del contenido de flavonoides totales	41
2.3.7 Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos.	42
2.3.7.1 Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante in-vitro.	43
2.3.7.1.1 Método ABTS	43
2.3.7.1.2 Método DPPH	45
2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 RECOLECCIÓN, CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO.	47
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.	47
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.	48

3.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (CFT), ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC).	49
3.4.1	Determinación del contenido de fenoles totales	49
3.4.2	Método ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)): TEAC	49
3.5	PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	50
3.5.1	Fraccionamiento de los extractos purificados	50
3.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH	53
3.7	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.	53
3.8	ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC –ANALÍTICA Y HPLC-MS	54
3.8.1	Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-MS	54
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1	CLASIFICACIÓN DEL FRUTO.	55
4.2	AISLAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (TEAC) Y EL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)	55
4.2.1	Determinación de la actividad antioxidante	55
4.2.2	Determinación del contenido fenólico total (CFT)	57
4.3	Estudio de la variación de la actividad antioxidante bajo las diferentes condiciones experimentales.	58
4.3.1	Estudio de la variación del contenido fenólico total (CFT) bajo las diferentes condiciones experimentales.	60

4.4	PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS (ECE Y ECS).	61
4.5	CONTENIDO FENÓLICO TOTAL DE FRACCIONES Y EXTRACTOS PURIFICADOS	62
4.6	ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TEAC DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS.	66
4.7	Actividad antioxidante (Método DPPH)	69
4.8	FLAVONOIDES TOTALES (FT)	73
4.9	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC-ESI-MS EN SEMILLA Y EPICARPIO	75
4.9.1	Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS en semilla	75
4.9.1.1	Identificación de los compuestos fenólicos en F1S	81
4.9.1.2	Identificación de los compuestos fenólicos en F2S	89
4.9.1.3	Identificación de los compuestos fenólicos en F3S	95
4.9.2	ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EPICARPIO	101
4.9.2.1	Identificación de los compuestos fenólicos en F1E	105
4.9.2.2	Identificación de los compuestos fenólicos en F2E.	111
4.9.2.3	Identificación de los compuestos fenólicos en F3E	1222
	CONCLUSIONES	1255
	RECOMENDACIONES	127
	PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN	128
	BIBLIOGRAFIA	1299
	ANEXOS.	141

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Metabolitos secundarios fenólicos encontrados en extractos metanólicos obtenidos de tres diferentes variedades de aguacate.	27
Tabla 2. Estructuras de principales flavonoides presentes en alimentos.	36
Tabla 3. Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación de la actividad antioxidante (TEAC).	56
Tabla 4. Contenido de fenoles totales (CFT) y capacidad antioxidante (TEAC) en extractos crudos de semilla y epicarpio (Persea americana).	57
Tabla 5. Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación del CFT.	57
Tabla 6. Análisis de Varianza para valores TEAC.	58
Tabla 7. Medias por Mínimos Cuadrados para TEAC con intervalos de confianza del 95,0%	59
Tabla 8. Discriminación entre medias mediante LSD	59
Tabla 9. Pruebas de Múltiple Rangos para los valores TEAC en cada condición.	59
Tabla 10. Análisis de varianza para actividad antioxidante-Suma de cuadrados tipo III.	60
Tabla 11. Prueba de Múltiples Rangos para concentración de fenoles totales por condición.	61
Tabla 12. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, TEAC y DPPH para extractos de semilla, epicarpio y sus fracciones aisladas de aguacate (Persea americana).	62
Tabla 13. Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de CFT.	63
Tabla 14. Pruebas de múltiples rangos para los valores CFT por Fracciones y extractos purificados.	63
Tabla 15. Comparación del contenido de fenoles totales semilla y epicarpio Persea americana con el de diferentes cultivos.	64

Tabla 16.	Comparación del contenido de fenoles totales para semilla y epicarpio Persea americana con el de variedades Hass y Fuerte.	65
Tabla 17.	Discriminación entre medias mediante LSD para los valores TEAC.	66
Tabla 18.	Análisis de varianza de valores TEAC y CFT en fracciones y extractos purificados de semilla y epicarpio de aguacate.	67
Tabla 19.	Correlaciones para las diferentes características medidas en extractos de semilla y epicarpio.	68
Tabla 20.	Comparación de la actividad antioxidante (TEAC) en semilla y epicarpio de aguacate con las variedades Hass y Shepard.	68
Tabla 21.	Actividad antioxidante (TEAC) en semilla y epicarpio aguacate variedades Hass y Fuerte.	69
Tabla 22.	Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de FRS50.	73
Tabla 23.	Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de FT.	74
Tabla 24.	Compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS en EPS y las fracciones F1S, F2S y F3S.	78
Tabla 25.	Compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS en EPE y las fracciones aisladas F1E, F2E y F3E.	104

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Estructura para los compuestos resveratrol (estilbeno) y secoisolariciresinol (lignano).	33
Figura 2. Estructura representativa para los ácidos fenólicos.	34
Figura 3. Estructura de benzo- $\gamma$ -pirona	35
Figura 4. Estructura básica de los flavonoides	35
Figura 5. Estructura representativa para una proantociandina con enlaces tipo A y tipo B.	38
Figura 6. Reacción de quelación del ión $Al^{3+}$ con flavonoides.	42
Figura 7. Estructura del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante.	44
Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.	45
Figura 9. Árbol de aguacate y muestras recolectadas.	47
Figura 10. Proceso para la obtención de los extractos crudos de semilla y epicarpio.	48
Figura 11. Purificación de extractos crudos de semilla y epicarpio de aguacate sobre columna con Amberlita XAD-7.	50
Figura 12. Fraccionamiento extracto purificado de semilla.	51
Figura 13. Fraccionamiento extracto purificado de epicarpio.	52
Figura 14. Fracciones de semilla y epicarpio de aguacate obtenidas a partir del fraccionamiento mediante la resina de Sephadex LH-20.	52
Figura 15. Recta de calibrado para determinar la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC).	56
Figura 16. Recta de calibrado para determinar el CFT.	58
Figura 17. Correlación entre TEAC y CFT para la semilla.	67
Figura 18. Curva de calibración para determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.	70

Figura 19.	Comportamiento del radical DPPH frente a diferentes concentraciones de ácido gálico.	70
Figura 20.	Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de ácido gálico.	71
Figura 21.	Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto purificado de semilla (EPS).	72
Figura 22.	Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto purificado de epicarpio.	72
Figura 23.	Curva de calibración para determinación del contenido de flavonoides totales	74
Figura 24.	Cromatograma (HPLC-ESI-MS) del extracto purificado de semilla (EPS) y fracciones F1S, F2S y F3S aisladas de semilla.	76
Figura 25.	Algunas estructuras químicas identificadas en la semilla.	80
Figura 26.	Espectros UV-Vis a 280 nm de los compuestos 20 y 7.	82
Figura 27.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 20 y 7.	82
Figura 28.	Espectro MS/MS del compuesto 20.	83
Figura 29.	Estructuras químicas de los compuestos 7 y 20.	83
Figura 30.	Espectro UV-Vis de los compuestos 21 y 22.	84
Figura 31.	Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 21 y 22.	84
Figura 32.	Espectro MS/MS del compuesto 22.	85
Figura 33.	Estructuras químicas de los compuestos 21 y 22.	85
Figura 34.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 23	86
Figura 35.	Espectro MS/MS para el compuesto 23.	86
Figura 36.	Estructura química del compuesto 23.	87
Figura 37.	Espectro UV-Vis del compuesto 25	87
Figura 38.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 25.	88
Figura 39.	Espectro MS/MS para el compuesto 25.	88
Figura 40.	Estructura química del compuesto 25	88
Figura 41.	Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 3 y 5.	90
Figura 42.	Espectro MS/MS para los compuestos 3 y 5.	90

Figura 43.	a. Estructura química para procianidinas diméricas tipo B y b. Posible mecanismo para la reacción tipo retro Diels-Alder	91
Figura 44.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS para los compuestos 4 y 8.	93
Figura 45.	Estructura química de los compuestos 4 y 8.	94
Figura 46.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 17.	95
Figura 47.	Estructura química del compuesto 16.	95
Figura 48.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 29.	96
Figura 49.	Estructura para procianidina dimérica tipo A.	96
Figura 50.	Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 3, 5 y 34	97
Figura 51.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 32.	99
Figura 52.	Estructura para procianidinas triméricas (PC) tipo B (a) y procianidinas triméricas (PC) tipo A(b)	100
Figura 53.	Espectro MS/MS del compuesto 33.	101
Figura 54.	Cromatograma (HPLC-ESI-MS) del extracto purificado de epicarpio (EPE) y fracciones F1E, F2E y F3E.	102
Figura 55.	Espectros de masas HPLCS-ESI-MS del compuesto 22.	106
Figura 56.	Espectro UV-Vis del compuesto 25.	107
Figura 57.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 25.	107
Figura 58.	Espectro UV-Vis del compuesto 28 medida a 280nm.	108
Figura 59.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 28.	109
Figura 60.	Estructura química del compuesto 28.	109
Figura 61.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 31 y 32.	110
Figura 62.	Estructura química general para los compuestos 31 y 32.	110
Figura 63.	Espectros MS/ MS para los picos 4 y 7.	111
Figura 64.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 33.	112
Figura 65.	Espectro MS/MS para el compuesto 33.	113
Figura 66.	Estructura química del compuesto 33.	113
Figura 67.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 34.	114
Figura 68.	Espectro MS/MS para el compuesto 34.	114
Figura 69.	Estructura química del compuesto 34.	115
Figura 70.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS para el compuesto 16.	116

Figura 71.	Espectro MS/MS para el compuesto 16.	116
Figura 72.	Estructura química del compuesto 16.	117
Figura 73.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 35	117
Figura 74.	Estructura química del compuesto 35.	118
Figura 75.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 17.	1199
Figura 76.	Espectro MS/MS para el compuesto 17	119
Figura 77.	Estructura química del compuesto 17.	120
Figura 78.	Espectro de masas HPLC-ESI-MS para el compuesto 36.	121
Figura 79.	Espectro MS/MS para el compuesto 36.	121
Figura 80.	Estructura química del compuesto 36.	122
Figura 81.	Espectros MS-MS de los compuestos 4 y 7.	122
Figura 82.	Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 38 y 40.	123

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Datos para la construcción de curvas de calibración.	141
Anexo B. Prueba de múltiples rangos para las metodologías TEAC, DPPH y FT.	142
Anexo C. Gráficas de comparación de medias de extractos purificados y fracciones de epicarpio y semilla obtenidos en las metodologías de CFT, TEAC, DPPH y FT.	144
Anexo D. Análisis de varianza y gráficas de correlaciones	145
Anexo E. Concentraciones y % DPPH remanente para extractos purificados y fracciones de semilla y epicarpio.	149
Anexo F. Gráficas para calcular $FRS_{50}$ para ácido gálico extractos purificados de semilla y epicarpio de aguacate y sus respectivas fracciones.	150
Anexo G. Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 4 y 7 presentes en F2E.	152
Anexo H. Espectro de masas HPLC-ESI-MS para los compuestos 5 y 9 presentes en F2E.	152
Anexo I. Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 4 y 7 presentes en F3E.	153

## ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
CET	Cromatografía de exclusión por tamaño
CFT	Contenido fenólico total
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECS	Extracto crudo de semilla
ECE	Extracto crudo de epicarpio
FRS <sub>50</sub>	Concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH en un 50%
EAG	Equivalente de ácido gálico
EPE	Extracto purificado de epicarpio
EPS	Extracto purificado de semilla
ESI	Ionización electrospray
FT	Contenido de flavonoides totales
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HPLC- MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas modo tandém
PAD	Detector de arreglo de fotodiodos
RIFRUTBIO	Red para la Bioprospección de Frutas Tropicales
TEAC	Actividad antioxidante equivalente al trolox
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UV-Vis	Ultravioleta visible
λ <sub>máx</sub>	Longitud de onda de máxima absorción

## GLOSARIO

**AGLÍCONA:** compuesto orgánico combinado con la porción azúcar de un glucósido y que se obtiene por hidrólisis.

**ANTIOXIDANTE:** moléculas presentes de forma natural en muchos alimentos que tienen la función de captar radicales libres responsables, entre otras cosas, del envejecimiento de las células.

**BIOACTIVO:** sustancias que tienen un efecto en el tejido vivo o causa una reacción en él.

**BIOPROSPECCIÓN:** búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos, que forman parte de la biodiversidad.

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC):** técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica.

**DISEÑO EXPERIMENTAL:** técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental, en el cual se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés.

**EPICARPIO:** capa externa de las tres que forman el pericarpio de los frutos formando la

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS TÁNDEM :** técnica de espectrometría de masas que utiliza dos (MS/MS) o más analizadores de masas.

**FACTOR:** variable independiente dentro de un diseño experimental.

**FITOQUÍMICOS:** componentes químicos naturales, biológicamente activos, que se encuentran en los alimentos.

**IN VITRO:** proceso que se realiza fuera del organismo.

**MACERACIÓN QUÍMICA:** proceso en el que se mantiene en contacto una muestra vegetal con un disolvente determinado por un periodo de tiempo prolongado.

**RADICAL LIBRE:** átomo o molécula que contiene al menos un electrón no apareado y existente por un breve periodo de tiempo antes de reaccionar para producir un molécula estable.

**SUBPRODUCTO:** en cualquier proceso industrial, producto que se obtiene además del principal.

**POLIFENOLES:** Compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000 Da, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas.

**VARIABLES RESPUESTA:** característica del producto cuyo valor interesa mejorar mediante el diseño de experimentos.

## INTRODUCCIÓN

La identificación de compuestos fenólicos en una amplia variedad de frutas y vegetales va más allá del interés por sus propiedades organolépticas como el color (antocianinas), astringencia (taninos), amargura (flavanoles) sino por su alto valor nutricional relacionado directamente con la disminución del riesgo de sufrir enfermedades de tipo crónico como cáncer, deformaciones teratogénicas, trombosis, úlceras, alergias, inflamaciones e incluso actividad anti-microbiana<sup>1</sup>. Una de las principales funciones que cumple esta familia de compuestos es la de proteger células de procesos degenerativos debido a la presencia de radicales libres mediante mecanismos antioxidantes. También actúan como quelantes de cationes divalentes y como moduladores o inhibidores de la actividad de enzimas como las topoisomerasas, protein-quinasas y ciclooxigenasa. Estas características han permitido que la industria se enfoque en el desarrollo de productos con alto contenido fenólico útiles en la industria de cosméticos, medicamentos, suplementos nutricionales y alimentos funcionales. Esto sumado al especial interés en disminuir la cantidad de antioxidantes artificiales cuyo uso es altamente restringido<sup>2</sup>.

Dentro de los vegetales superiores, las frutas y hortalizas constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos. Como fruto de interés se encuentra el aguacate (*Persea americana*) cuyo árbol es nativo de países como Colombia, México y Venezuela y cuyo consumo ha incrementado debido a que cada vez es más valorado por los consumidores, no solo por su singular sabor y textura<sup>3</sup> sino también por sus beneficios para la salud<sup>4,5</sup>.

La separación, aislamiento y caracterización de compuestos fenólicos en alimentos específicamente en residuos de aguacate amplia no solo la posibilidad de incrementar el número de fitoquímicos que puedan mejorar la calidad de vida de las personas, sino también la alternativa de aprovechar subproductos de desecho (epicarpio y semilla) a nivel industrial<sup>6</sup> y de esta manera conseguir un aprovechamiento integral de esta fruta.

---

<sup>1</sup> RICE-EVANS, Katherine ; MILLER, Nicholas y PAGANDA, George. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. En: Free Radical Biology & Medicine, 1996. vol. 20, no. 7, p. 933-956

<sup>2</sup> Ibid., p. 933-956

<sup>3</sup> GIFFONI, J., *et al.* Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea Americana* (avocado) seed extracts. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009. vol. 42, no.2 ,p.110 .113.

<sup>4</sup> HAIMING, Ding, *et al.* Chemopreventive characteristics of avocado fruit. En: Seminars in Cancer Biology, 2007. vol. 17, no.5, p.386–94.

<sup>5</sup> GIFFONI, *et al.* Op. Cit., p. 110.

<sup>6</sup> BETANCUR-ANCONA, David, *et al.* Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. En: Food and Bioproducts Processing, 2016. vol. 100. p.457-463.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos extraíbles presentes en epicarpio y semilla de aguacate de la especie *Persea Americana* originaria del municipio de Sandoná.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar dos métodos de extracción con disolventes (metanol 80% y acetona 70%) y valorar en cada uno de ellos su actividad antioxidante a nivel *in-vitro* por medio de los métodos ABTS Y DPPH.
- Cuantificar el contenido fenólico total y flavonoides totales en los extractos de aguacate.
- Purificar mediante extracción en fase sólida y caracterizar químicamente de forma preliminar los componentes fenólicos mayoritarios mediante técnicas cromatográficas (cromatografía en columna, retención selectiva por resina, exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta eficiencia) y espectrometría de masas.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 ANTECEDENTES

A continuación se darán a conocer los principales trabajos con referencia a la extracción y la caracterización de compuestos fenólicos en semilla y epicarpio de aguacate.

En 2010 Gorinstein *et al*<sup>7</sup> hicieron un estudio comparativo de las propiedades nutricionales y bioactivas de frutos exóticos minoritariamente estudiados como durian, mango y aguacate. Para el proceso de extracción evaluaron tres disolventes puros: metanol, acetona y hexano. Los resultados mostraron que en el extracto de aguacate obtenido a partir de metanol se encuentra el mayor contenido fenólico total (5,04±0,03 mg EAG/ g peso seco). En el extracto de aguacate en acetona encontraron el mayor contenido de flavonoles (12,715± mg catequina equivalente/ g peso seco) y el mayor contenido de taninos (8,32±0,41 mg catequina equivalente/ g peso seco). Con respecto a la actividad antioxidante equivalente a TROLOX el extracto de aguacate obtenido utilizando como solvente agua mostró el mejor resultado (15,74±0,6µM Trolox/g peso seco), seguido del extracto obtenido en metanol (13,83±0,7 µM Trolox/g peso seco), posteriormente el obtenido con acetona (11,31±0,5 µM Trolox/g peso seco) y finalmente el extracto con hexano (0,8 ±0,04 µM Trolox/g peso seco). Los resultados analizados con el método DPPH mostraron una tendencia similar en donde el extracto acuoso presentó la mayor actividad antioxidante (6,19± 0,3 µM Trolox/g peso seco) seguido del extracto metanólico(10± 0,3 µM Trolox/g peso seco).

Liwey Gu *et al*<sup>8</sup> en el año 2011 determinaron la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de ocho variedades de aguacate: Slimcado, Simmonds, Loretta, Choquette, Booth 7, Booth 8, Tonagge y Hass. Durante la investigación, cuantificaron los principales compuestos fitoquímicos antioxidantes presentes en semilla, pulpa y epicarpio de cada variedad. Para el proceso de extracción emplearon una mezcla de acetona/agua/ácido acético en proporciones 70:29.7:0.3, v/v/v.

Además, evaluaron el contenido fenólico aplicando el método de Folin-Ciocalteu. En las semillas de las diferentes variedades de aguacate obtuvieron contenidos fenólicos en un rango entre 19,22± 3,3 y 51,6± 1,6 mg EAG /g peso fresco y para el epicarpio valores entre 4,6±0,3 y 12,6±0,3 mg EAG /g peso fresco. En este mismo trabajo los autores evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH, los valores encontrados para la semilla estuvieron entre 128,3±17,4 y 240,2±36,6 µmol TEAC/g peso fresco y para el epicarpio entre 38,0±2,3 y 189,8±10,8 µmol TEAC/g peso fresco.

---

<sup>7</sup> GORINSTEIN, Shela,*et al*.Comparative characterisation of durian, mango and avocado. En: International Journal of Food Science and Technology, 2010. vol. 45,no.5, p.921 -929.

<sup>8</sup> GU, Liweij; BOSTIC, Terrell y WANG, Wei. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 122,no.4,p.1193-1198.

En general para todas las semillas de las diferentes variedades encontraron un mayor contenido fenólico y actividad antioxidante que en los extractos aislados del epicarpio. Los autores concluyen que la variedad Hass es la que tiene el mayor contenido fenólico (51,6±1,6 mg EAG /g peso fresco) y la mayor actividad antioxidante (189,8 µmol TEAC ±10,8 g peso fresco). Finalmente cuantificaron e identificaron las procianidinas empleando la técnica HPLC-MS. Para la separación utilizaron dos fases móviles A y B consistentes en: A: cloruro de metileno/metanol/ ácido acético/ agua (82:14:2:2, v/v/v/v) y B: metanol/ácido acético/agua (96:2:2 v/v/v). Las procianidinas identificadas en semilla y epicarpio, empleando HPLC-ESI-MS en fase normal fueron: catequina, epicatequina, dímeros tipo A y tipo B, trímeros tipo A y tipo B, tetrámeros pentámeros y hexámeros.

En el año 2011 Estéves *et al*<sup>9</sup> llevaron a cabo un proceso de extracción de compuestos fenólicos presentes en semilla, pulpa y epicarpio de las variedades de aguacate Hass y Fuerte procedentes de Madrid, España. Para el proceso de extracción emplearon tres disolventes: acetato de etilo, acetona/agua (70:30, v/v) y metanol/agua (80:20, v/v). Posteriormente cuantificaron el contenido de fenoles totales (CFT) usando el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu, para lo cual emplearon una curva estándar de ácido gálico y expresaron los resultados como mg EAG /100g muestra seca. El contenido fenólico más alto se obtuvo al emplear acetona como disolvente, seguido de metanol y finalmente acetato de etilo. El CFT del epicarpio para la variedad Fuerte (17218±1446 mg EAG/ 100g de muestra seca) fue mayor en comparación con el de la variedad Hass (8997±3103 mg EAG/ 100g de muestra seca). Por su parte en la semilla de la variedad Fuerte encontraron un mayor CFT (6912±1699 mg EAG/ 100g de muestra seca) que en la variedad Hass (6082±863).

En la segunda etapa de la investigación, los autores realizaron una medición de la actividad antioxidante por medio de dos metodologías: utilizando el radical ABTS y el radical DPPH. En ambos procesos se expresaron los resultados como TEAC en mmol equivalente de Trolox por g de muestra fresca. Los resultados mostraron que la mayor actividad antioxidante se obtiene empleando acetona como disolvente de extracción, seguido de metanol y finalmente acetato de etilo. La actividad antioxidante para el epicarpio de la variedad Fuerte por el método TEAC (242,26±28,31 mmol Trolox/ g muestra fresca) y DPPH (199,61±33,15 mmol Trolox/ g muestra fresca) arrojó mayores valores en comparación con la variedad Hass (103,75±44,49 y 88,94±48,22 mmol Trolox/ g muestra fresca respectivamente). Por su parte en la semilla encontraron la misma tendencia, la variedad Fuerte presenta los mayores valores de actividad antioxidante, por el método ABTS (194,80±44,69 mmol Trolox/ g muestra fresca) y DPPH (167,50±42,08 mmol Trolox/ g muestra fresca) en comparación con los obtenidos para la variedad Hass (158,29±26,27 y 130,26±36,80 respectivamente).

Finalmente identificaron los compuestos fenólicos presentes en semilla y epicarpio de ambas variedades por medio de un análisis por cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC). Para ello realizaron la separación de los compuestos en modo gradiente empleando las fases móviles A (agua /0,5 % en ácido fórmico) y B (acetónitrilo

---

<sup>9</sup> ESTÉVES, Mario, *et al.* Avocado (*Persea americana* Mill) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation. *En*: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 59, no. 10, p. 5625, 5635.

/0,5% en ácido fórmico). Los resultados mostraron la presencia de compuestos fenólicos como catequina, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y procianidinas. Dentro de los compuestos más abundantes en el epicarpio de ambas variedades se encuentra la epicatequina (~98%), mientras que la proporción entre epicatequina y catequina fue incluso el 50% aproximadamente en la semilla. Cabe resaltar que el epicarpio de la variedad Fuerte tuvo las mayores cantidades de procianidinas, catequinas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles. Las semillas de la variedad Hass presentaron cantidades significativamente altas de catequinas, procianidinas y ácidos hidroxicinámicos comparadas con los resultados encontrados para el epicarpio.

Carrasco-Pancorbo *et al*<sup>10</sup> en el año 2011 establecieron un método empleando HPLC-DAD-ESI-TOF para la identificación de los constituyentes químicos en extractos metanólicos de tres variedades de aguacate (*Persea americana*): Hass, Lamb-Hass y Rugoro. Para el proceso de extracción utilizaron metanol, etanol, acetona y acetato de etilo puro. Encontraron que, al emplear metanol como solvente se obtiene un perfil cromatográfico con mayor número de señales y en mayor concentración.

Posteriormente, los autores optimizaron las condiciones de separación y detección usando una mezcla estándar de 39 compuestos entre ácidos fenólicos y diferentes categorías de flavonoides que podrían estar potencialmente presentes en los extractos metanólicos. Para este propósito emplearon una columna cromatográfica C<sub>18</sub> (4.6X450mm, tamaño de partícula de 1,8µm). El gradiente de elución que utilizaron fue agua, ácido acético (0.5%) y acetonitrilo como fase móvil y una velocidad de elución de 1.6mL/min. En la tabla 1 se muestran los compuestos fenólicos encontrados en los extractos procedentes de las tres variedades de aguacate.

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios fenólicos encontrados en extractos metanólicos obtenidos de tres diferentes variedades de aguacate.

Compuesto	Formula	m/z experimental	m/z teórica	Tiempo de retención (min)	Variedad de aguacate		
					Rugoro	Lamb-Hass	Hass
Ácido protocatecuico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0196	153,0193	5,3			
Ácido gentísico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0201	153,0193	6,4	X	X	X
Ácido 4-hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137,0242	137,0244	6,9	X	X	-
Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0879	353,0878	7,5	X	-	-
Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0701	289,0718	7,7	X	-	-
Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179,0353	179,0350	8,3	X	X	X
Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0718	289,0718	9,3	X	X	-
Vanilina	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151,0396	151,0401	9,9	X	X	X
Ácido p-cumarico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,0400	163,0401	10,3	X	-	-
Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0494	193,0506	11,4	X	X	X
Ácido sinapínico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223,0616	223,0612	11,6	X	X	X
Ácido benzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	121,0295	121,0295	12,5	X	X	X

<sup>10</sup> CARRASCO-PANCORBO, Alegría; HURTADO-FERNÁNDEZ, Elena y FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto. 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, no. 6, p 2255–2267.

Ácido trans-cinámico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	147,0454	147,0452	16,8	-	-	X
Laricitrina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	331,0452	331,0459	17,1	X	-	-
Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271,0618	271,0612	18,7	X	-	-
Crisin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	253,0493	253,0506	24,3	X	-	-
Kaempferide	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	299,0543	299,0561	25,3	X	-	-

X: indica la presencia de los compuestos en las muestras de aguacate.

Fuente: Adaptado de CARRASCO-PANCORBO, *et al.* (2011).

En otro trabajo realizado por Kosińska *et al*<sup>11</sup>, se determinó la capacidad antioxidante en semilla y epicarpio de aguacate de la especie *Persea americana* Mill variedades Hass y Shepard. Para la extracción de los compuestos fenólicos emplearon metanol al 80% en un baño termostático a 60 °C por 15 minutos.

Luego evaluaron el contenido de fenoles totales en el epicarpio de ambas variedades empleando para ello el método de Folin-Ciocalteu. Los valores se expresaron como mg catequina equivalente/g peso seco. En general para el epicarpio de los frutos obtuvieron mayores contenidos fenólicos que para las semillas. El contenido fenólico total del epicarpio variedad Hass (25,32±0,242 mg CE/ g peso seco) mostró un mayor valor que la variedad Shepard (15,61±0,241 mg CE/ g peso seco). Por su parte para la semilla variedad Shepard (13,04±0,211 mg CE/ g peso seco) obtuvieron un mayor contenido fenólico que para la variedad Hass (9,51±0,161 mg CE/ g peso seco).

Para calcular la capacidad antioxidante de los extractos emplearon el método TEAC. Los resultados se expresaron como mmol Trolox equivalente/ g peso seco. Los extractos de epicarpio mostraron un mayor poder reductor del catión-radical ABTS que los extractos de semilla. Con respecto a las variedades, los autores concluyen que el extracto de epicarpio en la variedad Hass tiene una mayor actividad antioxidante TEAC (0,161±0,0024 mmol Trolox equivalente/ g peso seco) que la variedad Shepard (0,112±0,0034 mmol Trolox equivalente/ g peso seco). Publican también que no existen diferencias significativas entre los valores TEAC en las semillas de ambas variedades: 0,094±0,0007 mmol Trolox equivalente/ g peso seco variedad Hass y 0,091±0,0047 mmol Trolox equivalente/ g peso seco variedad Shepard. Los extractos metanólicos de epicarpio en la variedad Hass mostraron una mayor actividad antioxidante en comparación con los otros extractos analizados.

Los autores también evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH expresando los resultados como valores de FRS<sub>50</sub> (mg de peso seco). El epicarpio variedad Hass (0,358 mg peso seco) mostró la actividad antioxidante más alta seguido del epicarpio variedad Shepard (0,112 mg peso seco), semilla variedad Hass (0,091 mg peso seco) y semilla variedad Shepard (0,094 mg peso seco). Finalmente los extractos obtenidos fueron analizados por la técnica HPLC-PAD logrando identificar cuatro clases de compuestos fenólicos: monómeros de flavanoles, proantocianidinas, ácidos hidroxicinámicos y glicósidos de flavonoles. En las semilla de ambas especies se identificó al ácido 3-O-cafeoilquinico, el ácido 3-O-*p*-coumaroilquinico y procianidinas triméricas tipo A. Se encontraron diferencias en la composición del epicarpio de ambas

<sup>11</sup> KOSIŃSKA, Agnieszka, *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, no.18, p.4615-4616.

variedades. En la variedad Hass se encontraron procianidinas diméricas y (+)-catequina, sin embargo estos compuestos no se encontraron en la variedad Shepard. Finalmente se identificaron el ácido 5-O-cafeoilquinico y derivados de quercetina en ambas variedades.

Ana López Cobo *et al*<sup>12</sup> en el año 2016 llevaron a cabo una extracción sólido-líquido de los compuestos presentes en semilla, pulpa y epicarpio de aguacate empleando para ello una mezcla de metanol/agua (80:20, v/v). Realizaron la determinación de los compuestos fenólicos polares por medio de la técnica HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. De igual forma aplicaron la técnica HPLC-FLD-MS para determinar flavan-3-oles en las muestras. Los autores lograron identificar siete compuestos en la semilla y once en el epicarpio. Dentro del epicarpio mencionan compuestos como perseitol, ácido quínico, penstemide, ácido clorogénico, derivados de la quercetina como quercetina diclucósido y derivados del ácido cafeico como el ácido clorogénico. Para la semilla encontraron derivados de alcoholes fenólicos como el hidroxitirosol 1-glucósido, derivados de ácido hidroxicinámicos como el ácido 3-O-p-coumaroilquinico e isómeros del ácido cafeoilquinico.

Con respecto al uso que podrían tener estos extractos se encontró un estudio publicado por Estéves *et al*<sup>13</sup> en 2012 quienes evaluaron el efecto de la adición de compuestos fenólicos aislados a partir de epicarpio de aguacate (*Persea americana*) sobre procesos de oxidación en frituras de porcino. Los extractos ricos en compuestos fenólicos se obtuvieron a partir de una extracción sólido-líquido empleando como disolvente acetona: agua 70:30 (v/v). La caracterización del extracto de epicarpio indicó un alto contenido de fenoles ( $6082 \pm 863$  mg EAG/100 g materia seca). Los mayores constituyentes fenólicos encontrados fueron catequina ( $237.8 \pm 4.2$  mg/100 g materia seca), ácidos hidroxicinámicos ( $282.7 \pm 6.9$  mg/100 g materia seca,) flavonoles( $2.5 \pm 0.7$  mg/100 g materia seca), y procianidinas ( $4592.0 \pm 129.4$  mg/100 g materia seca ). La actividad antioxidante del extracto medida por el método DPPH mostró un valor de  $130.26 \pm 36.80$  mmol Trolox/g materia fresca.

El resultado final, indicó que los subproductos del aguacate utilizados lograron inhibir algunos cambios químicos inducidos por proteínas oxidantes. Se resalta que la eficiencia de estos procesos depende de varios factores como la proteína objetivo y las rutas de oxidación para que se pueda destacar la especificidad de las acciones antioxidantes de los procesos bioquímicos en aguacate. Finalmente, la investigación sugiere que los extractos obtenidos pueden ser recomendados como agentes aditivos sobre productos cárnicos que pueden prevenir procesos de tipo oxidativo mejorando el valor nutricional de estos productos cárnicos.

---

<sup>12</sup> GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, *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.

<sup>13</sup> ESTÉVES, Mario, *et al*. Formation of Lysine-Derived Oxidation Products and Loss of Tryptophan during Processing of Porcine Patties with Added Avocado Byproducts. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60, no.15,p.3917-3926.

Finalmente en el año 2011 Chávez *et al*<sup>14</sup> obtuvieron extractos fenólicos a partir del epicarpio del fruto de *Persea americana* (palto) empleando agua como disolvente, el contenido fenólico total fue 77,13±2 mg EAG / g muestra. Al probar la actividad inhibitoria del extracto sobre la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*, se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 1.02 µg EAG/mL comprobando la eficiencia sobre la inhibición de la ureasa, la que constituye uno de los factores más importantes en el proceso de colonización de la bacteria *Helicobacter pylori*.

## 2.2 MARCO CONTEXTUAL

### 2.2.1 AGUACATE (*Persea Americana* Mill): Origen, botánica, morfología y estructura

En el libro de Yahia<sup>15</sup> se reporta que por medio de datos arqueológicos se logró determinar que el centro del origen de esta fruta es la parte central de México, pasando por Guatemala hasta el Centro de América. El aguacate está botánicamente clasificado en tres razas (Antillana, Mexicana y Guatemalteca) que poseen diferencias debido a la madurez del fruto y su contenido de aceite. Los frutos de la raza Antillana tienen larga variabilidad de forma y bajo contenido de aceite. La raza Mexicana corresponde a frutos semitropicales, pequeños, alargados, de piel delgada y alto contenido de aceite. Los frutos subtropicales de la raza Guatemalteca en su mayoría son redondos, con espesor de piel y contenido intermedio de aceite<sup>16</sup>.

El aguacate es una planta dicotiledónea que pertenece al orden Ranales, familia Laurácea y género *Persea*. Este último está conformado por 150 especies distribuidas, en las regiones tropicales y subtropicales. Los árboles que pertenecen a este género se caracterizan por tener hojas coriáceas y aromáticas; inflorescencias axilares o subterminales, dispuestas en panículas corimbosas o racimosas; flores pediceladas o sésiles, hermafroditas, con ovario globoso y sub-globoso, estilo delgado, estigma triangular peldado; frutos en bayas globosas o elípticas<sup>17</sup>. Entre las especies se encuentra la *Persea americana* clasificada por Miller, la cual desarrolló varias subespecies por su aislamiento geográfico, que originó diferentes tipos botánicos<sup>18</sup>.

En general esta especie se caracteriza por ser perenne, muy vigorosa, de crecimiento erecto y cuyos árboles en ambientes nativos puede alcanzar hasta los 30 m de altura<sup>19</sup>.

---

<sup>14</sup> CHÁVEZ, Felipe, *et al*. Los polifenoles antioxidantes extraídos 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, no.3, p. 265 - 280.

<sup>15</sup> YAHIA, E. M. y WOOLF, A. B. Avocado (*Persea American* Mill.). En: YAHIA. Elhadi (Ed.). Postharvest biology technology of tropical and subtropical fruits: Açai to Citrus. No. 207. Cambridge: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, 2011. p.125-185.

<sup>16</sup> *Ibid.*, p.127

<sup>17</sup> BERNAL ESTRADA, Jorge, *et al*. Manual técnico, actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas en el cultivo de aguacate. 2 ed. Medellín: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), 2014. p.1-410

<sup>18</sup> YAHIA y WOOLF. *Op. cit.*, p.126.

<sup>19</sup> RESTREPO, Juan, *et al*. Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C.: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2012. p.1-75

La fruta muestra gran variabilidad en tamaño, forma y peso, dependiendo de la variedad, las condiciones climáticas y las prácticas de agricultura seguidas durante su crecimiento. La forma de la fruta puede variar de esférica, a ovalada e incluso en forma de pera. El peso puede estar en rangos de 70 a 190 g<sup>20</sup>. A continuación se indican los datos de la clasificación taxonómica del fruto<sup>21</sup>.

Reino: Vegetal  
Orden: Ranales  
División: Espermatofita  
Subdivisión: Angiosperma  
Clase: Dicotiledoneas  
Subclase: Dyalipetalae  
Familia: Laurácea  
Género: *Persea*

### 2.2.2 Aguacate en Colombia.

El cultivo de aguacate está presente en Colombia desde la época precolombina. Se sabe que las primeras siembras de este cultivo se realizaron en los Montes de María<sup>22</sup>. La producción de aguacate se lleva a cabo desde el nivel del mar hasta los 2200 msnm. Cabe resaltar que la gran variedad de aguacates existentes se debe a las condiciones agroclimáticas ideales de las regiones productoras<sup>23</sup>.

Entre los principales productores de aguacate se encuentran los departamentos de Tolima, Bolívar, Antioquia y Santander<sup>24</sup>. En Colombia se pueden encontrar cultivos de las tres razas de aguacate: mexicana, guatemalteca y antillana, siendo ésta última la raza más adaptada a las condiciones climáticas del país. Dentro de las variedades pertenecientes a la raza Antillana se encuentra el aguacate común criollo, uno de los más conocidos y consumidos en Colombia<sup>25</sup>. Los frutos se caracterizan por tener cuellos largos, epicarpio liso y bajo contenido de aceite<sup>26</sup>.

---

<sup>20</sup> DE ARRIOLA, María del Carmen; MENCHÚ, Juan Francisco y ROLZ, Carlos. The Avocado. En: INGLET, George y CHARALAMBOUS, George (Eds.). Tropical Foods: Chemistry and Nutrition. New York: Academic Press, Inc., 1979. p. 609-624.

<sup>21</sup> BERNAL ESTRADA, *et al.* Op. cit., p. 17.

<sup>22</sup> YABRUDY, Javier. El aguacate en Colombia: Estudio del caso de los Montes de María, en el Caribe Colombiano. En: YABRUDY, Javier (Ed.). Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER). No.171. Cartagena: Editorial Banco de la República, 2012, p. 1-45

<sup>23</sup> RÍOS-CASTAÑO, D. Y TAFFUR-REYES, R. Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia. En: Actas V Congreso Mundial del Aguacate, 2003. vol.2, p.143-147.

<sup>24</sup> YABRUDY. Op cit., p.9.

<sup>25</sup> BERNAL ESTRADA, *et al.* Op cit., p.59-64.

<sup>26</sup> AMÓRTEGUI, Ignacio; CAPERA, Edgar y GODOY, José. El cultivo del aguacate: módulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. Ibagué: Corporación para la Promoción del Desarrollo Rural y Agroindustrial del Tolima (PROHACIENDO). MADR-PRONATTA, 2001. p.1-49

### 2.2.3 Aguacate: composición química

El consumo de aguacate está aumentando debido a los numerosos beneficios que posee para la salud, características relacionadas directamente con su composición. Esta fruta es considerada una importante fuente de energía, principalmente por sus altas cantidades de lípidos; específicamente, el aguacate es rico en grasas monoinsaturadas, como el ácido oleico. También contiene hidratos de carbono C7 como la D-manoheptulosa<sup>27</sup>; proteínas; fibra dietética; vitaminas E, C, B2, B5 y B6; potasio; magnesio y fósforo. Por otra parte, tiene una considerable cantidad de pigmentos como carotenoides ( $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, isoluteína, zeaxantina, etc), las clorofilas (clorofilas a y b); antocianinas (cianidina 3-O-glucósido); esteroides ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol); y compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides)<sup>28</sup>.

## 2.3 MARCO TEÓRICO

### 2.3.1 Compuestos fenólicos y su presencia en frutos y alimentos

Los compuestos fenólicos son antioxidantes que abundan en nuestras dietas. Proviene exclusivamente de los alimentos de origen vegetal<sup>29</sup>. Estos metabolitos secundarios de las plantas son determinantes en la calidad sensorial y nutricional de una gran variedad de frutas y hortalizas<sup>30</sup> sin contar con su importancia morfológica y fisiológica en la constitución de las mismas<sup>31</sup>. Estos compuestos están constituidos por un amplio número de estructuras heterogéneas formando desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados<sup>32</sup>.

### 2.3.2 Clasificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos comprenden miles de moléculas que han sido clasificados dentro de diferentes grupos basados en el número de anillos fenólicos que ellos contienen

---

<sup>27</sup> COWAN, A.K y WOLSTENHOLME, B.N. Avocado. En: SMITHERS, Geoffrey (Ed.). Reference module in food science: Encyclopedia of food and health. Oxford: Elsevier, 2016.

<sup>28</sup> CARRASCO-PANCORBO, Alegría, *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: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, no. 4. vol. 141, p.3492–3503.

<sup>29</sup> FÉSTY, D. Antioxidantes: Guía práctica: ¿Qué son? ¿Qué funciones realizan? ¿Qué beneficios aportan? . Barcelona: Ediciones Robinbook, 2003. p.257.

<sup>30</sup> TOMÁS-BARBERÁN, F.A.;FERRERES, F. y GIL, M. I., Antioxidant phenolic metabolites from fruits and vegetables and changes during postharvest storage and processing. En: RAHMAN, Attaur (Ed.).Studies in Natural products Chemistry: Bioactive natural products (Parte D).Amsterdam: Elsevier, 2000.p. 739-735

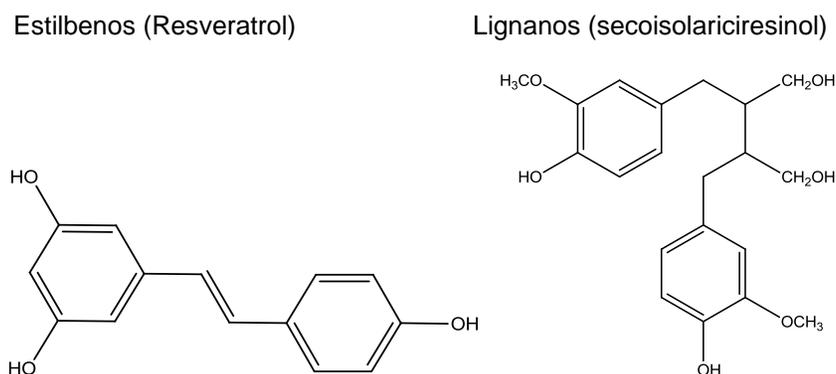
<sup>31</sup> IGNAT, Ioana ; VOLF, Irina y POPA, Valentin. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. En: Food Chemistry, 2011.vol.126,no.4, p. 1821–1835.

<sup>32</sup> REIS GIADA, Maria de Lourdes. Food Phenolic Compounds:Main Classes,Sources and Their Antioxidant Power. En: MORALES-GONZALES, Jose A. (Ed.). Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A role for Antioxidants. p. 87-112.

y cómo esos anillos están enlazados<sup>33</sup>. Hacen parte de esta clasificación los fenoles simples (estilbenos, lignanos, ácidos fenólicos y flavonoides<sup>34</sup>) y los polifenoles también conocidos como taninos.

Los estilbenos son compuestos fenólicos que poseen dos anillos bencénicos unidos por un puente de etano o eteno. Están distribuidos altamente en las plantas superiores actuando como fitoalexinas y reguladores del crecimiento; Los lignanos son dímeros de fenilpropano que se ciclan en diferentes caminos. Se caracterizan por hacer parte de los fitoestrógenos los cuales actúan como factores protectores de los sistemas inmune y cardiovascular<sup>35</sup>. En la figura 1 se muestra la estructura química para los compuestos resveratrol y secoisolariciresinol clasificados como estilbeno y lignano respectivamente.

**Figura 1.** Estructura para los compuestos resveratrol (estilbeno) y secoisolariciresinol (lignano).



Fuente: Adaptado de HURST R. y HURST S. (2013)

Por su parte los ácidos fenólicos están presentes en las plantas como derivados sustituidos del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico, siendo estos últimos los más comunes<sup>36</sup>. Los ácidos hidroxibenzoicos poseen una estructura general C6-C1 y los ácidos hidroxicinámicos se caracterizan por tener como estructura base el ácido trans-3-fenil-propenoico<sup>37</sup>. El ácido cafeico es uno de los más comunes ácidos hidroxicinámicos al cual se le atribuyen procesos de bloqueo selectivo durante la biosíntesis de leucotrienos,

<sup>33</sup> IGNAT, VOLF y POPA. Op. cit., p.1822.

<sup>34</sup> D' ARCHIVIO, Massimo, *et al.* Polyphenols, dietary, sources and bioavailability. En: Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 2007. vol. 43, no. 4, p.348 –361.

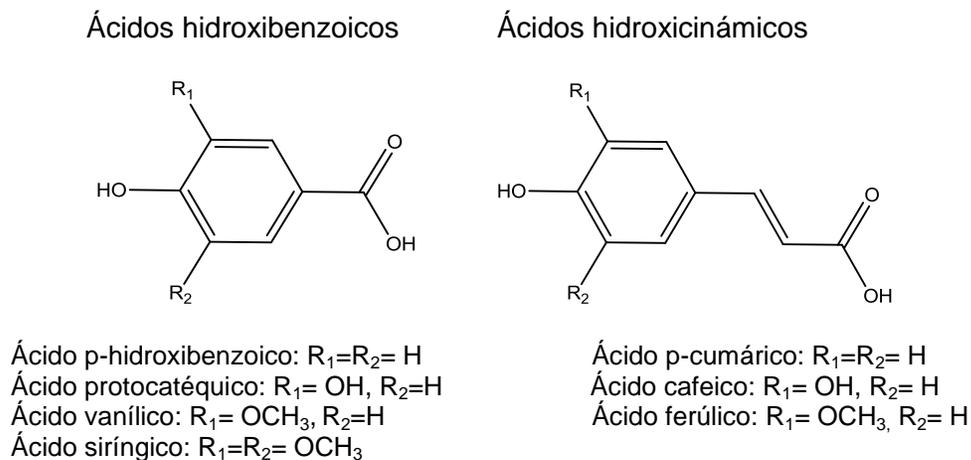
<sup>35</sup> BLASA, Manuela, *et al.* Fruit and vegetable antioxidants in health. En: WATSON, Ronald y PREEDY, Victor (Eds.). Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables. San Diego, CA: Academic Press Inc., 2010.p. 37-58.

<sup>36</sup> SHAHIDI, Fereidoon y AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. En: Journal of functional foods, 2015.vol.18,p. 820–897.

<sup>37</sup> PIETTA, Piergiorgio; MINOGGIO, Markus y BRAMATI,Lorenzo. Plant polyphenols:structure, occurrence and bioactivity. En: RAHMAN, Atta-ur (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry. Oxford: Elseiver Inc., 2003. p. 257-312.

compuestos asociados a daños en procesos de inmunorregulación<sup>38</sup>. En la figura 2 se muestra la estructura básica para esta clase de compuestos fenólicos.

**Figura 2.** Estructura representativa para los ácidos fenólicos.



Fuente: Adaptado de HURST R. y HURST S. (2013)

Sin embargo cuando se discute sobre compuestos fenólicos en plantas, los flavonoides son el grupo predominante debido a que su cantidad corresponde a las dos terceras partes de la dieta en compuestos fenólicos<sup>39</sup>.

Actualmente se han encontrado más de 8.000 compuestos fenólicos de los cuales se incluyen por lo menos más de 4.000 flavonoides, y el número sigue creciendo<sup>40</sup>. Los flavonoides son los principales responsables de las virtudes antioxidantes de las frutas y verduras<sup>41</sup>. El término flavonoide es un nombre colectivo para los pigmentos de las plantas, en su mayoría derivados de la benzo- $\gamma$ -pirona, el cual es sinónimo de cromona (figura 3)<sup>42</sup>.

<sup>38</sup> KOSHIHARA, Yasuko., *et al.* Cafeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. En: *Biochimica Biophysica Acta*, 1984. vol. 792, no.1, p. 92-97.

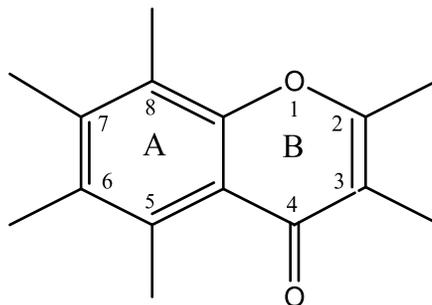
<sup>39</sup> ROBBINS, Rebecca. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003.vol.51,no.10, p. 2866–2887.

<sup>40</sup> HARBORNE, Jeffrey ; BAXTER, Herbert y MOSS, Gerard. *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants.* London: Taylor & Francis Ltd., 1999. p 1-985

<sup>41</sup> IGNAT, VOLF y POPA. *Op.cit.*, p. 1821

<sup>42</sup> HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. En: *Pharmacology & Therapeutics*, 2002.vol.96, no. 2-3, p. 67– 202. ,

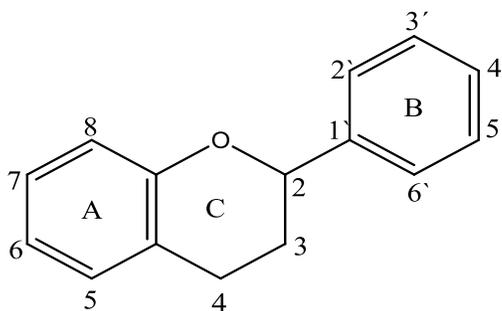
**Figura 3.** Estructura de benzo- $\gamma$ -pirona



Fuente: HAVSTEEN (2002)

Los flavonoides se caracterizan por la presencia de un esqueleto difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ). En la figura 4<sup>43</sup> se indica la estructura básica y el sistema de numeración de flavonoides. La estructura de este tipo de compuestos origina dependiendo del grado de ciclización, el grado de insaturación y oxidación en el anillo C<sup>44</sup>. La tabla 2<sup>45</sup> muestra las familias más importantes de flavonoides en alimentos, clasificados por su estructura.

**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides



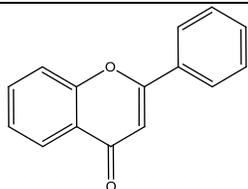
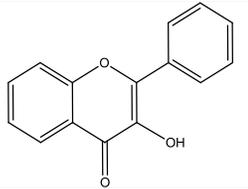
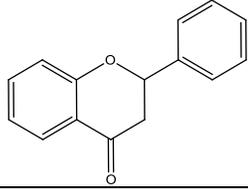
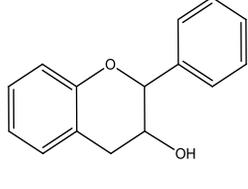
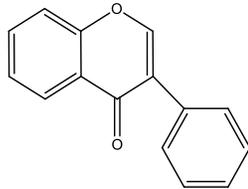
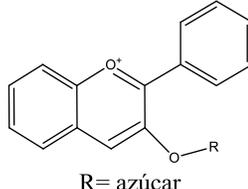
Fuente: VALLS, *et al.* (2009)

<sup>43</sup> VALLS, Josep, *et al.* Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *En: Journal of Chromatography A*, 2009. vol.1216, no.43, p.7143–7172.

<sup>44</sup> CUYCKENS, Filip y CLAEYS, Magda. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *En: Journal of Mass Spectrometry*, 2004.vol.39, no.1, p. 1-15.

<sup>45</sup> *Ibid.*,p. 7145.

**Tabla 2.** Estructuras de principales flavonoides presentes en alimentos.

Clase	Estructura	Ejemplos	Existencia en alimentos
Flavonas		Apigegina Luteolina	Apio Vino blanco
Flavonoles		Quercetina Miricetina Kaempferol Rutina	Cebolla Cerezas Manzanas
Flavanona		Naringenina Hesperidina Eriodictiol	Jugo de naranja y limón
Flavanoles, Proantocianidinas y Taninos		Catequina Epicatequina Epigallocatequina B1, Procianidina C1	Cocoa y chocolate, vino, te, manzanas.
Isoflavonoides		Genisteina Daidzein Glycitein	Legumbres: soya
Antocianinas		Malvidin, Cianidin Malvidin-3-glucosido	Bayas (uvas, arandos, cerezas)

Fuente: Adaptado de VALLS, *et al.* (2009)

Cabe mencionar que en la naturaleza, la mayoría de flavonoides se encuentran como glicósidos. Estos pueden formarse por la sustitución de varios tipos de azúcares a través de los grupos hidroxilo del esqueleto flavonoide en el caso de los O-glicósidos o enlazarse directamente a átomos de carbono del anillo A formando los C-glicósidos<sup>46</sup>. La glucosa es el azúcar más común en este tipo de compuestos no así la galactosa, la ramnosa, la

<sup>46</sup> STOBIECKI, Maciej. Review: Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *En: Phytochemistry*, 2000. vol. 54, no. 3, p.237-256.

xilosa y la arabinosa<sup>47</sup>. En general el efecto de la glicosilación les permite a los flavonoides ser menos reactivos e incrementar su solubilidad en agua y de esta manera ser almacenados en las vacuolas de las células<sup>48</sup>. Las tres clases de flavonoides que han atraído más atención en el área de los alimentos nutraceuticos y funcionales son la antocianinas, los flavonoides y los isoflavonoides<sup>49</sup>.

Finalmente se tiene a los compuestos polifenólicos o taninos los cuales se presentan en la naturaleza en forma hidrolizable y condensada. Estos se caracterizan por ser solubles en agua; tener masas moleculares entre 500<sup>50</sup> y 3000-5000<sup>51</sup> Da; poseer 12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa; y tener características de astringencia debido a la complejación intermolecular<sup>52</sup>.

El ácido gálico y el ácido elágico constituyen las unidades básicas de los taninos hidrolizables esterificados a un núcleo en la molécula, comúnmente glucosa o monómeros de flavanol como catequina. Por su parte los taninos condensados, (llamados proantocianidinas), son los principales polímeros de flavonoides, los cuales se componen de moléculas de catequina enlazadas formando dímeros, oligómeros y polímeros<sup>53</sup> que están unidos por enlaces C4 y C8 (o C6)<sup>54</sup>.

Existe una clasificación adicional la cual indica el tipo de enlace interflavano (figura 5). Entre estas moléculas se encuentran las proantocianidinas tipo B en donde las unidades monoméricas se enlazan por el C4 en la unidad superior y las posiciones C6 o C8 por la unidad inferior. Las proantocianidinas tipo A por su parte contienen un enlace éter adicional entre la posición C2 en la unidad superior y el grupo hidroxilo de las posiciones C7 o C5 de la unidad inferior<sup>55</sup>. Son potentes antioxidantes, aunque son escasamente absorbidos por el intestino y son considerados factores anti-nutricionales debido a su capacidad de precipitar proteínas e inhibir enzimas digestivas<sup>56</sup>.

---

<sup>47</sup> CUYCKENS y CLAEYS. Op. Cit., p. 3.

<sup>48</sup> CUYCKENS, Filip y CLAEY Magda. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. En: Journal of Mass Spectrometry, 2005.vol. 40, no. 3, p. 364–372.

<sup>49</sup> Ibid.,p. 7145.

<sup>50</sup> HASLAM, E. Practical Polyphenols: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. 1998, Cambridge: Cambridge University Press, .

<sup>51</sup> YOSHIDA, T.; ITO, H., e ISAZA MARTÍNEZ, J.H..Pentameric ellagitannin oligomers in *melastomataceous* plants--chemotaxonomic significance.En:Phytochemistry,2005.vol. 66, no. 17, p.1972-1983.

<sup>52</sup> ISAZA MARTÍNEZ, J.H. Taninos o polifenoles vegetales. En: *Scientia Et Technica*,2007.vol.13, no.33,.p. 13-18.

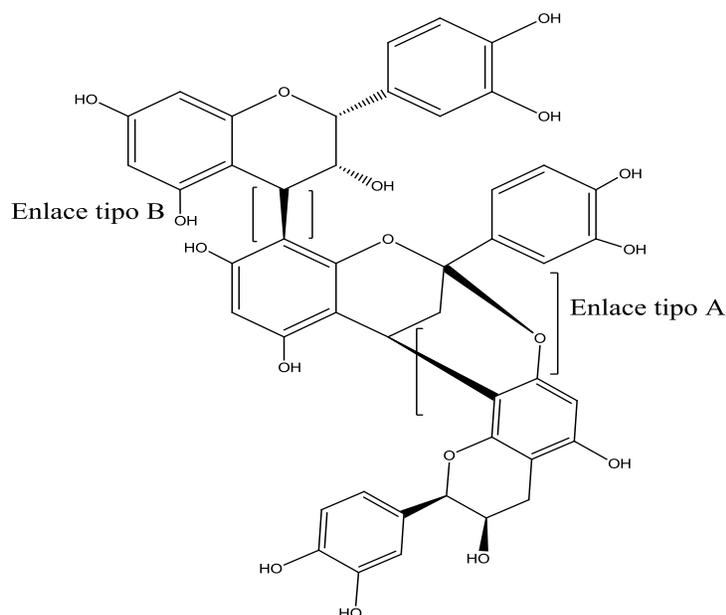
<sup>53</sup> HURST, Roger y HURST, Suzanne. Fruits and vegetables as functional foods for exercise and Inflammation. En: Ronald Ross Watson y PREEDY,Victor (Eds.). Bioactive foods and chronic disease states: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Oxford: Elsevier Inc., 2013.p. 319-336.

<sup>54</sup> LUCCI, Paolo; SAURINA, Javier y NUÑEZ, Oscar. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. En: Trends in Analytical Chemistry, 2017. vol.88.p.1-24.

<sup>55</sup> Ibid., p.4.

<sup>56</sup> BLASA, *et al.* Op. cit.,p.43.

**Figura 5.** Estructura representativa para una proantociandina con enlaces tipo A y tipo B.



Fuente: NAVARRO, *et al.* (2014)

### 2.3.3 Métodos de extracción, separación y purificación de compuestos fenólicos.

La extracción de los compuestos fenólicos está influenciada por varios parámetros entre los cuales se encuentran el tamaño de partícula del fruto y los solventes empleados para llevar a cabo el proceso de extracción. Para el tamaño de partícula se debe tener en cuenta que al emplear partículas finas, se incrementa el área superficial de la muestra promoviendo una ruptura de la pared celular de la planta y mejora el proceso de extracción<sup>57</sup>.

La elección del disolvente más apropiado dependerá de su selectividad, miscibilidad, densidad, recuperación, precio, presión de vapor, viscosidad y estabilidad química y térmica<sup>58</sup>. Solventes como metanol, etanol, acetona, propanol, acetato de etilo y dimetilformamida han sido usados comúnmente a diferentes concentraciones para la extracción de compuestos fenólicos en productos frescos. Usualmente, los solventes menos polares son considerados los más adecuados para la extracción de fenoles lipofílicos<sup>59</sup>.

Una vez determinadas estas condiciones se procede a someter la muestra a un proceso de extracción sólido-líquido (SLE), en la cual a partir de un proceso de transferencia de

<sup>57</sup> KIM, Dae-Ok. y LEE, Chang Yee. Extraction and isolation of polyphenolics. En: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2002. NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 1:11:11.2

<sup>58</sup> HAMINIUK, Charles, *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. En: International Journal of Food Science and Technology, 2012. vol. 47, no. 10, p.1-22.

<sup>59</sup> ESTÉVES, *et al.* Op.Cit., p. 5625-5635

masa de los compuestos solubles de la matriz de la planta hacia el disolvente, se logran recuperar los compuestos fenólicos de los tejidos de las frutas hasta llegar a un estado de equilibrio<sup>60</sup>. El proceso puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o en frío para evitar la degradación de los pigmentos. Una desventaja de esta técnica es que la co-extracción de sustancias como proteínas, azúcares y ácidos orgánicos<sup>61</sup> puede interferir en la cuantificación de compuestos fenólicos especialmente en el método de Folin-Ciocalteu.

### 2.3.3.1 Separación y purificación.

La cromatografía de capa delgada (CCD) puede indicar la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en la muestra y las cantidades de flavonoides individuales presentes en un extracto purificado por cromatografía en columna. Las técnicas cromatográficas modernas como HPLC permiten identificar una amplia gama de flavonoides por medio de los tiempos retención después de obtener los extractos purificados.

Entre los diferentes métodos disponibles para la separación, caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos, la técnica HPLC ha dominado en los últimos veinte años<sup>62</sup>. La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa constituye una de las principales técnicas para la separación de compuestos fenólicos presentes en plantas y alimentos. La separación se efectúa debido a la relativa no polaridad de los compuestos, en donde la interacción hidrofóbica entre las regiones superficiales no polares de los analitos y la superficie no polar de los ligandos en la fase estacionaria permite los mecanismos de retención y posterior separación<sup>63</sup>. La fase estacionaria posee una polaridad menor que la de la fase móvil y se caracteriza por estar hecha de compuestos hidrofóbicos como C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub><sup>64</sup>. Generalmente se emplean dos fases móviles durante la separación las cuales suelen estar constituidas por un solvente acuoso acidificado y un solvente orgánico. La acidificación de una de las fases móviles se realiza con el fin de evitar la ionización de los grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos mejorando así la resolución y la reproducibilidad de los picos característicos. Con respecto a los solventes orgánicos más utilizados son metanol y acetonitrilo. Este último provee una mejor resolución de los picos sumado a que emplea un menor tiempo de análisis, aunque su mayor toxicidad hace que el metanol sea escogido la mayoría de las veces<sup>65</sup>.

La separación de los compuestos puede llevarse a cabo en modo isocrático o en modo gradiente dependiendo del número y tipo de analitos sumado a la naturaleza de la matriz. Cuando se emplea cromatografía líquida en fase reversa, generalmente los compuestos

---

<sup>60</sup> CORRALES, M. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *En: Journal of Food Engineering*, 2009.vol.90,no.4,p.415–421.

<sup>61</sup> IGNAT, VOLF y POPA. *Op. cit.*, p.1826

<sup>62</sup> KONTOGIANNI, G.Vassiliki. Novel Techniques Towards the Identification of Different Classes of Polyphenols (Capítulo 8). *En: WATSON, Ronald(Ed.).Polyphenols in plants: Isolation purification and extract preparation*. San Diego CA: Academic Press Inc., 2014.p.159-185

<sup>63</sup> BOYSEN, Reinhard y HEARN, Milton. High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. *En: LIU, Hung-wen y MANDER, Lew (Eds.). Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Oxford: Elsevier Inc., 2010. 5-45.

<sup>64</sup> GUZZETA, A. Reverse Phase HPLC Basics for LC/MS. [En línea]. [Citado el 15 de agosto de 2016]. Disponible en: < <http://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm> >.

<sup>65</sup> KONTOGIANNI . *Op. cit.*, p.164.

polares eluyen primero, seguido de los flavonoides diglicósidos, posteriormente los monoglicósidos y las agliconas<sup>66</sup>.

Finalmente hay que hacer referencia en el diseño de múltiples detectores acoplados a los equipos de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación y detección de compuestos fenólicos ejemplo de ellos son: detectores de índice de refracción, fluorescencia, electroquímico, dispersión de luz, espectrometría de masas y UV/Vis<sup>67</sup>. Entre ellos el detector UV/Vis con detector de arreglo de fotodiodos (PAD) es uno de los más extensamente utilizados para la elucidación de compuestos fenólicos en materiales basados en plantas, analizando un número específico de longitudes de onda<sup>68</sup>. Esto se debe a la existencia de enlaces dobles conjugados en los compuestos fenólicos lo cual les permite absorber luz ultravioleta o ultravioleta-visible<sup>69</sup>.

### 2.3.4 Métodos de caracterización de compuestos fenólicos.

Los colores característicos emitidos por los flavonoides permiten su caracterización por medio de espectroscopía UV-Vis. Perfiles a 240 y 280 nm han sido ampliamente utilizados para determinar diferentes familias de compuestos fenólicos:  $\lambda=280$  nm es particularmente útil para la determinación de ácidos fenólicos;  $\lambda=320$  nm (aproximadamente) es una longitud de onda adecuada cuando no se han determinado las diferentes subclases de flavonoides y se recomienda trabajar con 440 y 520 nm (aproximadamente) cuando se desea determinar antocianinas<sup>70</sup>.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es un método eficiente para detectar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en plantas y fluidos biológicos<sup>71</sup>. Está técnica permite generar moléculas cargadas y fragmentos de moléculas por medio de altas energías de ionización y medir de esta forma las relaciones masa-carga de estas especies<sup>72</sup>. La detección de los compuestos fenólicos se lleva a cabo en modo ión negativo y modo ión positivo<sup>73</sup>.

---

<sup>66</sup> KONTOGIANNI . Op. cit p.164.

<sup>67</sup> THOMPSON, Richard. y LOBRUTTO, Rosario. Role of HPLC in process development. En: KAZAKEVICH, Yuri y LOBRUTTO, Rosario. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.p. 641–677.

<sup>68</sup> HAMINIUK, *et al.* Op. cit., p.10 .

<sup>69</sup> STALIKAS, Constantine. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods (Capítulo 5). En: UPPU, R.M, *et al* (Eds.). Free Radicals and Antioxidant Protocols. Serie: Methods in Molecular Biology. San Diego CA: Editorial Humana Press, 2010. p. 65–90.

<sup>70</sup> CARRASCO-PANCORBO, HURTADO-FERNÁNDEZ, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Op.Cit., p. 2225-2257

<sup>71</sup> LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa María, *et al.* Improved characterization of polyphenols using liquid chromatography (Capítulo 14). En: WATSON, Ronald (Ed.). Polyphenols in plants. Oxford: Elsevier Inc.,2014. p. 261-292.

<sup>72</sup> MARCANO, D.; HASEGAWA M. Fitoquímica orgánica, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.2 ed. Venezuela: Editorial Torino, Venezuela, 2002. p.594

<sup>73</sup> LAMUELA-RAVENTÓS, *et al.* Op. cit., p.272.

### 2.3.5 Cuantificación del contenido de fenoles totales.

Aunque la naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu aún no se conoce, se sabe que contiene complejos de ácido fosfomolibdico / fosfotúngstico. Este ensayo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino por parte de los compuestos fenólicos produciendo la reducción de especies de molibdeno, formando complejos azules que pueden ser detectados espectrofotométricamente a 750-765nm. Los complejos azules son independientes de la estructura de los compuestos fenólicos, lo que evita la posibilidad de coordinación con complejos formados entre el metal y estos compuestos. El átomo de molibdeno dentro del complejo es generalmente aceptado como el sitio de reducción donde los iones de  $\text{Mo}^{+6}$  son reducidos a  $\text{Mo}^{+5}$  por aceptación de electrones donados por los antioxidantes fenólicos<sup>74</sup>. El ácido gálico se utiliza como patrón de referencia y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100g de fruta<sup>75</sup>.

### 2.3.6 Cuantificación del contenido de flavonoides totales.

La medida del contenido de flavonoides totales ha sido discutida por muchos autores (Dai *et al.*, 1995<sup>76</sup>; Moreno *et al.*, 2000<sup>77</sup>; Sakanaka *et al.*, 2005<sup>78</sup>). Este método consiste en formar un complejo de aluminio-flavonoide en presencia de medio básico que presenta una coloración rosa salmón que absorbe a 490 nm (Figura 6). La reacción se lleva a cabo en presencia de nitrito de sodio, el cual genera inicialmente una reacción de oxidación de los grupos hidroxilo en C2' y C3' en el anillo B del compuesto flavonoides. Posteriormente en presencia del cloruro de aluminio se da una reacción de nitrosilación en C5' (anillo B). En esta etapa el aluminio forma un complejo de coordinación con el grupo carbonilo en C2' y un enlace con C3' formando un compuesto coloreado amarillo. Finalmente la adición de hidróxido de sodio permite que el oxígeno del grupo nitrosilo en C5' se reduzca formando el complejo coloreado de color rosa-salmón<sup>79</sup>. Cabe resaltar la capacidad que posee el cloruro de aluminio para formar complejos con grupos o-hidroxilo y con grupos hidroxil-cetona vecinos para formar complejos lábiles ante la presencia del ácido de tal modo que este desaparece con el agregado de HCl, no así en el segundo caso en el que

---

<sup>74</sup> SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. En: Journal of functional foods, 2015. vol.18, p.757-781

<sup>75</sup> KRISHNAIAH, Duduku.; ROSALAM, Sarbatly y RAJESH, Nithyanandam. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. En: Food Bioproducts Processing, 2011. vol. 89, no. 3, p. 217-233.

<sup>76</sup> DAI, G.H., *et al.* Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). En: European Journal of Plant Pathology, 1995. vol.101, no.5, p. 541-547.

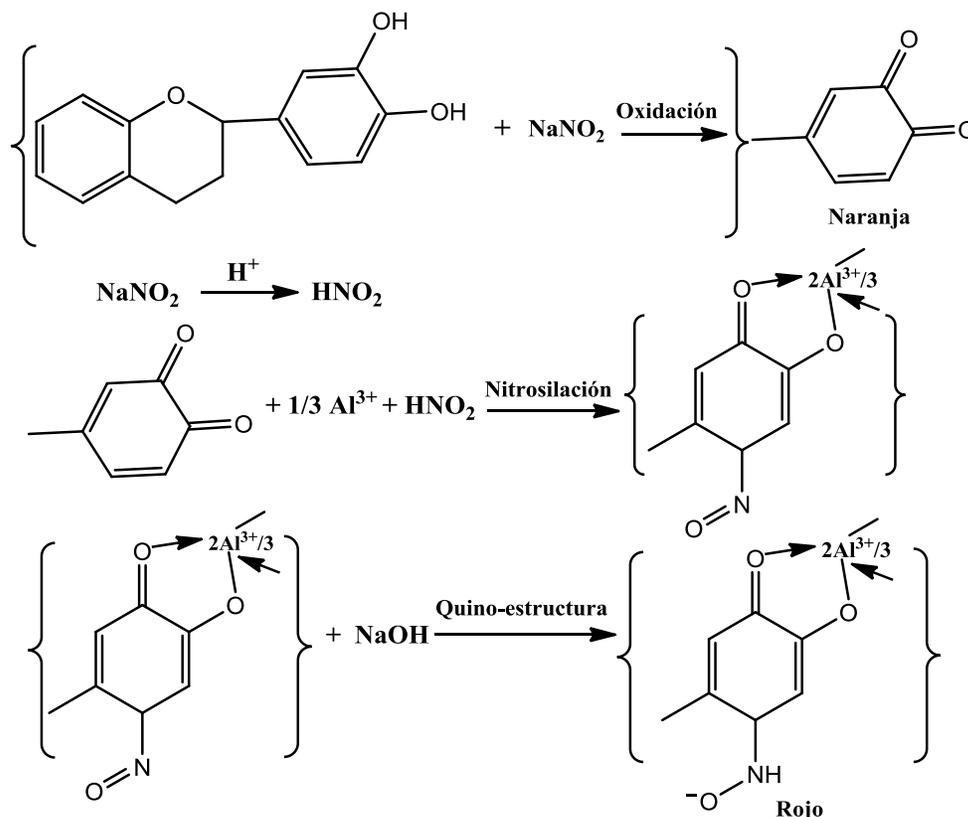
<sup>77</sup> NIEVA MORENO, María, *et al.* Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. En: Journal of Ethnopharmacology, 2000. vol. 71.no.1-2,p. 109-114.

<sup>78</sup> SAKANAKA, Senji; TACHIBANA, Yumi y OKADA, Yuki. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). En: Food Chemistry, 2005. vol. 89, no. 4, p. 569-575.

<sup>79</sup> ZHU, Hongbin, *et al.* Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. En: Food Analytical Methods, 2010. vol.3, p. 90-97

el complejo es estable<sup>80</sup>. El contenido de flavonoides totales se expresa como mg de catequina por cada g de muestra<sup>81</sup>.

**Figura 6.** Reacción de quelación del ión  $Al^{3+}$  con flavonoides.



Fuente: Adaptado de ZHU, *et al.* (2010)

### 2.3.7 Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos.

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células del cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante que puede ser brindada por moléculas endógenas u exógenas (compuestos fenólicos, vitamina E, vitamina C, carotenoides) capaces de neutralizar la acción oxidante de estas especies<sup>82</sup>.

Los compuestos fenólicos presentes en una gran variedad de verduras y frutas pueden actuar como antioxidantes de varias formas especialmente por medio de la captura de

<sup>80</sup> LOCK, O. Colorantes Naturales.1 ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1997. p.279

<sup>81</sup> PEÑARRIETA, J. M., *et al.* Total antioxidant activity in Andean food species from Bolivia. En: Revista Boliviana de Química, 2005. vol. 22, no.1,p.89-93.

<sup>82</sup> AVELLO, M. y SUWALSKY, M. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. En : Revista Atenea- Universidad de Concepción, 2006.vol.494, p.161-172.

radicales libres y la donación de átomos de hidrógeno. Los compuestos fenólicos son efectivos antioxidantes en una amplia gama de sistemas de oxidación química siendo capaces de capturar radicales alquil, peroxil, superóxido, radicales hidroxil, óxidos nítricos y peroxinitratos en medios acuosos u orgánicos. Estas características se deben a la presencia de grupos hidroxilo y la habilidad que posee un anillo aromático para soportar en su estructura electrones libres por deslocalización de ellos en el sistema de electrones  $\pi$ <sup>83</sup>.

Cabe resaltar que una sustancia fenólica puede ser considerada como antioxidante si posee la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación mediada por radicales estando en una concentración menor que la del sustrato a oxidar. Además se debe tener en cuenta que los radicales formados después de la captura deben tener una estabilidad considerable<sup>84</sup>.

### 2.3.7.1 Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante *in-vitro*.

Existen tres mecanismos por los cuales los compuestos antioxidantes pueden detener la acción de un radical: transferencia de átomos de hidrógeno, transferencia de electrones y una combinación de ambos<sup>85</sup>. Se han desarrollado una gran variedad de métodos para la medición de la actividad antioxidante a nivel *in-vitro* como los métodos TEAC Y DPPH los cuales combinan los dos mecanismos de acción frente a radicales libres. En cada método las condiciones de operación como pH, solubilidad, solventes y medida de la longitud de onda varían produciendo resultados diferentes<sup>86</sup>. Aunque estos métodos no pueden reproducir mecanismos antioxidante *in-vivo*, son útiles para clasificar la actividad antioxidante de sustancias y alimentos que las contienen<sup>87</sup>.

#### 2.3.7.1.1 Método ABTS.

El método ABTS mide la capacidad que poseen los antioxidantes para capturar al catión radical estable ABTS<sup>•+</sup> (2,2 -azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), un cromóforo azul-verdoso que posee máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm y disminuye en su intensidad debido a la presencia de antioxidantes<sup>88</sup>. Hay que aclarar que se ha preferido la

---

<sup>83</sup> ROBBINS. Op. cit.,p. 2867.

<sup>84</sup> KAPOOR, Harish y KAUR, Charanjit. Review Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. En: International Journal of Food Science and Technology,2001.vol.36,no. 7,p.703-725.

<sup>85</sup> RASCO, Bárbara, *et al.* Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. En: Food Chemistry, 2011.vol.129, no.2,p. 637-644

<sup>86</sup> KAPOOR y KAUR. Op. cit.,p.716

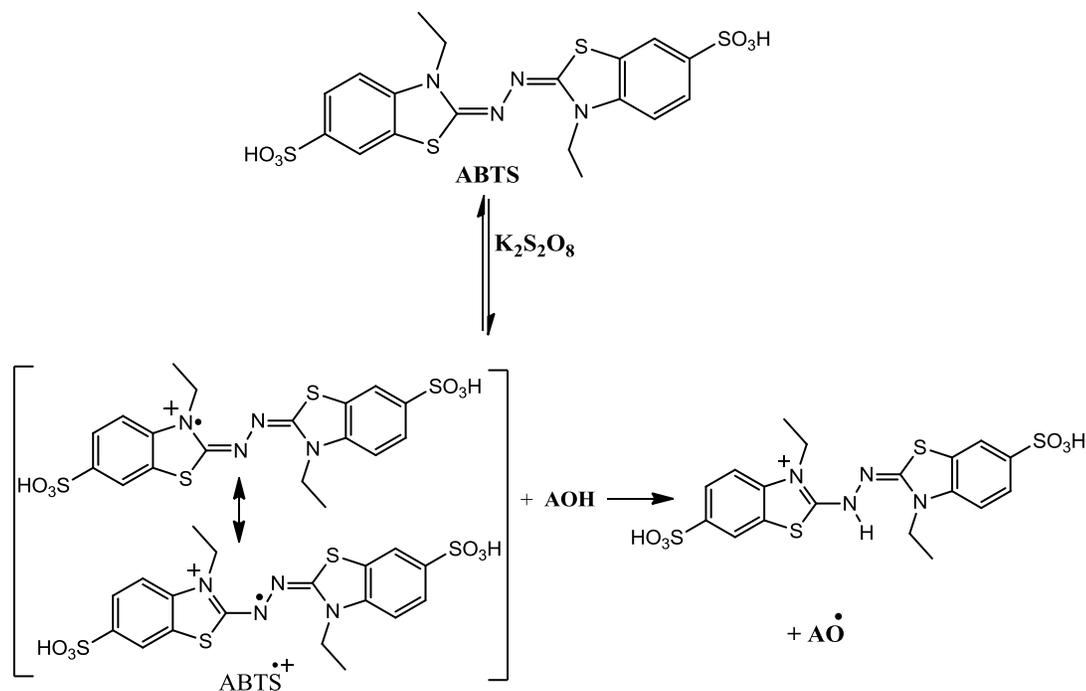
<sup>87</sup> GARCÍA PARRILLA, M.C., *et al.* Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. En: Talanta, 2007.vol.71,no.1,p.230-235.

<sup>88</sup> SEGUNDO, Marcela, *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. En: Analytica Chimica Acta, 2008. vol. 63, p.1-19.

determinación a 734nm debido a que la interferencia de otros componentes absorbentes y de turbidez de la muestra en esta longitud se reduce al mínimo<sup>89</sup>.

El catión radical ABTS puede ser generado de diferentes maneras, por ejemplo por medio de una reacción química usando dióxido de manganeso o persulfato de potasio, por reacciones enzimáticas usando metmioglobina, peroxidasa o por alguna reacción electroquímica (Figura 7). Se ha adoptado un tiempo de reacción que va desde 1 a 30 minutos. La concentración restante de ABTS<sup>•+</sup> se mide después de un tiempo de reacción fijo y los resultados se expresan como equivalentes de Trolox por gramo de extracto (TEAC / g)<sup>90</sup>. Una de las ventajas de este método es que puede ser evaluada en un amplio rango de pH lo que implica un mayor análisis del efecto del pH sobre mecanismos antioxidantes. Finalmente la solubilidad del radical ABTS<sup>•+</sup> en agua y disolventes orgánicos permite la determinación de la capacidad antioxidante tanto en muestras hidrofílicas como lipofílicas<sup>91</sup>.

**Figura 7.** Estructura del catión radical ABTS<sup>•+</sup> antes y después de la reacción con el antioxidante.



Fuente: Image bank Quim. Nova.

<sup>89</sup> ARNAO, Marino. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *En: Trends in Food Science and Technology*, 2011. vol.11, p. 419-421

<sup>90</sup> ESTÉVES, *et al.* Op. cit., p. 5627

<sup>91</sup> SEGUNDO, *et al.* Op. Cit., p.14



La actividad biológica de los fenilpropanoides y su papel como agentes antimicrobianos son bien reconocidos, además de sus propiedades como agentes antialérgicos y antiinflamatorios a través la inhibición de la lipoxigenasa<sup>94</sup> y su acción como antimutagénico<sup>95</sup>.

Se ha demostrado que la quercetina es mediadora en la disminución de la línea celular p53 asociada con un tipo de cáncer de mama<sup>96</sup> y otros estudios indican que la actividad inhibidora del crecimiento inducido por este mismo compuesto en los ovarios puede estar mediada por la modulación de la transformación del factor de crecimiento Y<sup>97</sup>.

Además de la actividad antirradicalaria de los compuestos fenólicos, cabe mencionar su actuación como: modulador de la actividad de una amplia gama de enzimas y receptores celulares<sup>98</sup>; actividad anticarcinogénica; actividad anti-arteriosclerótica; actividad anti-inflamatoria; inhibición de la liberación de histamina y actividad espasmolítica; actividad hepatoprotectora; actividad antiviral, antimicrobiana y actividad estrogénica<sup>99,100,101,102,103</sup>.

---

<sup>94</sup> SUD'INA, G. F. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. En: Federation of European Biochemical Societies, 1993. vol.329, no.1-2, p.21-24.

<sup>95</sup> NAMIKI, Mitsuo. Antioxidants/antimutagens in food. En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1990.vol.29, no.4, p.273-300.

<sup>96</sup> AVILA, M. A., *et al.* Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. En: Journal of Cancer Research, 1994. vol. 54, no.9, p.2424- 2428.

<sup>97</sup> MANCUSO, S., *et al.* Quercetin enhances transforming growth factor beta I secretion by human ovarian cancer cells. En: International Journal of Cancer, 1994.vol.57,no.2,p.211-215.

<sup>98</sup> MIDDLETON, E. Jr.; KANDASWAMI, C. y THEOHARIDES, T.C.The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. En: Pharmacological Reviews, 2000.vol 52, no.4,p. 673-751.

<sup>99</sup> PIETTA, MINOGGIO y BRAMATI. Op. cit., p. 293

<sup>100</sup> DAI,Q., *et al.* Fruit and vegetable juices and Alzheimer 's disease: The Kame Project. En: The American Journal of Medicine,2006. vol.119,no.9,p.751 .759.

<sup>101</sup> DE PASCUAL-TERESA, S. y SANCHEZ-BALLESTA,M.T. Anthocyanins:From plant to health.A review. En: Phytochemistry, 2008. vol. 7,p. 281 .299.

<sup>102</sup> PAN, M.H.; LAI, C.S. y HO,C.T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids.En: Food and Function, 2010.vol.1,p.15-31.

<sup>103</sup> SCALBERT, A., *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases.En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. vol.45,no.4,p.287 –306.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 RECOLECCIÓN, CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO.

Los frutos de aguacate se recolectaron en el municipio de Sandoná localizado a 48 km de la ciudad de San Juan de Pasto, el municipio se encuentra a 1848 msnm y posee una temperatura promedio de 19,8 °C<sup>104</sup>. La recolección de los frutos se realizó mediante un muestreo aleatorio simple, en total se recolectaron catorce frutos (figura 9), los que se caracterizaron por tener un tamaño uniforme, una coloración verde brillante y un estado óptimo para consumo. La clasificación taxonómica del fruto se llevó a cabo en el herbario de la Universidad de Nariño y la Universidad Nacional.

**Figura 9.** Árbol de aguacate y muestras recolectadas.



Fuente: Esta investigación.

#### 3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.

Inicialmente los frutos se lavaron con agua desionizada para eliminar las impurezas. Se pesó cada fruto y posteriormente se separó manualmente el epicarpio y la semilla de cada aguacate. En total se procesaron 600 g de epicarpio y 600 g de semilla.

Independientemente se procesaron 50g de epicarpio y semilla. Las muestras se colocaron en un erlenmeyer de 500 mL. Se adicionó la cantidad de metanol/agua (80:20, v/v)<sup>105</sup> suficiente para cubrir toda la superficie del material vegetal, se selló cada recipiente con papel celofán y se sometió a un proceso de maceración química durante 24 horas<sup>106</sup>.

<sup>104</sup> ALCALDÍA DE SANDONÁ- NARIÑO [en línea]. [citado el 28 de septiembre del 2016]. Disponible en: <[http://www.sandona-narino.gov.co/informacion\\_general.shtml](http://www.sandona-narino.gov.co/informacion_general.shtml)>

<sup>105</sup> KOSINSKA, *et al.* Op.cit., p. 4614.

<sup>106</sup> SHAHIDI, Fereidoon y NACZK, Marian. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, vol. 41,no.5, p.1523–1542

El extracto crudo (EC) de las dos partes del fruto se filtró empleando papel filtro Whatman N°.1, luego se rotaevaporó el solvente empleando un rotaevaporador Heidolph a 40 °C y finalmente se secó cada extracto sobre una plancha de calentamiento a una temperatura de 45° C. El mismo proceso se evaluó empleando acetona/agua (70:30, v/v)<sup>107</sup>. El proceso de extracción utilizando los dos tipos de solventes se realizó por triplicado (Figura 10), obteniendo finalmente el extracto crudo de semilla (ECS) y el extracto crudo de epicarpio (ECE).

**Figura 10.** Proceso para la obtención de los extractos crudos de semilla y epicarpio.



Separación manual de epicarpio y semilla



Maceración

Filtración

Rotaevaporación

Secado



EC Epicarpio

EC Semilla

Fuente: Esta investigación.

### 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Con el fin de encontrar el mejor solvente de extracción de los compuestos fenólicos, se realizó un diseño bifactorial, cada factor con dos niveles así:

1. Parte del fruto: epicarpio y semilla
2. Disolvente de extracción : metanol 80% y acetona 70%

<sup>107</sup> ESTÉVES, *et al.* Op. cit., p.5626.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statgraphics Centurion 16.1.15. Se realizaron tres réplicas por cada experimento utilizando como variable respuesta la actividad antioxidante equivalente a TROLOX (TEAC).

### **3.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT), ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC).**

#### **3.4.1 Determinación del contenido de fenoles totales**

Se mezclaron 200 µL de los extractos obtenidos con 200 µL del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, seis minutos después se adicionan 2000 µL de carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% (p/v)<sup>108</sup>. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se midió la absorbancia a 765nm usando un espectrofotómetro Pharo UV-Vis (Merck). El contenido fenólico se calculó a partir de una curva estándar preparando soluciones de 10, 30, 60, 100, 150 y 180 ppm de ácido gálico y expresando los resultados como mg de ácido gálico por g de extracto seco.

#### **3.4.2 Método ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)): TEAC**

Para medir la actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) se preparó una solución trabajo que contenía ABTS en concentración 7 mmol y persulfato de potasio 2,45 mmol. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente en un cuarto oscuro durante 15 horas. Luego la solución trabajo de ABTS se diluyó en metanol para obtener una absorbancia medida a 734 nm de 0,9±0,04.

Posteriormente una alícuota de 20 µL de cada extracto diluido se adicionó a 2000 µL de solución del radical ABTS y se agitó durante un minuto. Se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad por seis minutos y luego se midió la absorbancia a 734 nm. La actividad antioxidante de las muestras se calculó por interpolación a partir de una curva estándar construida a partir de soluciones de 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 mM de TROLOX. Los valores TEAC se expresaron en mmol TROLOX / g de extracto seco<sup>109</sup>.

---

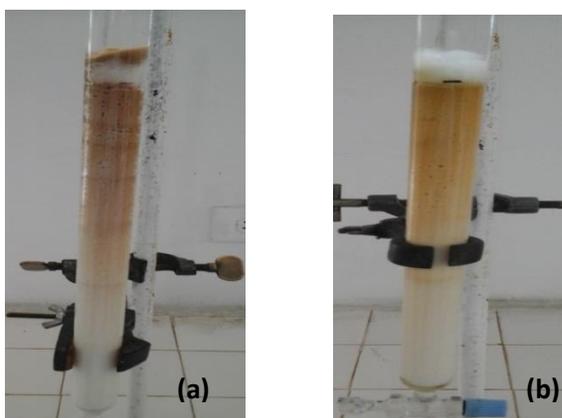
<sup>108</sup> CHUN, OCK, *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2011.vol.24,no. 7,p.1043-1045

<sup>109</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4614.

### 3.5 PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los extractos crudos de semilla y epicarpio de aguacate con mayor actividad antioxidante se purificaron utilizando una resina polimérica (Amberlita XAD-7) empacada en una columna cromatográfica de dimensiones: largo 23,5 cm y diámetro interno 2 cm (Figura 11). Este proceso se realizó con el fin de eliminar compuestos co-extraídos durante la maceración como azúcares, aminoácidos, proteínas entre otros. Como paso preliminar fue necesario activar la resina con 300 mL de H<sub>2</sub>O: HCl (0,01%). Posteriormente se cargaron independientemente 2,056 g de ECS y ECE realizando lavados con agua tipo II hasta completar un volumen de 500 mL. Finalmente se eluyeron los compuestos fenólicos retenidos con una mezcla de metanol/ácido acético (19:1, v/v).

**Figura 11.** Purificación de extractos crudos de semilla y epicarpio de aguacate sobre columna con Amberlita XAD-7.



(a) Semilla

(b) Epicarpio

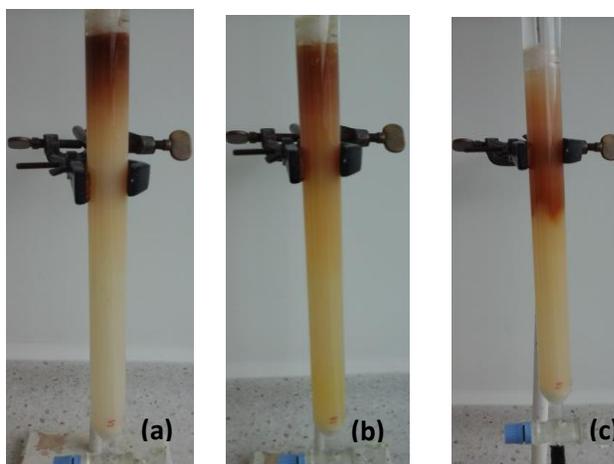
Fuente: Esta investigación.

#### 3.5.1 Fraccionamiento de los extractos purificados.

El proceso de separación de los compuestos fenólicos se realizó sobre una resina de Sephadex LH-20, la cual fue activada inicialmente con 500 mL de H<sub>2</sub>O:HCl (0,01%) y acondicionada con 1 L de agua tipo II. Una vez activada la resina, se disolvieron independientemente 0,25 g de los extractos EPS y EPE en la mínima cantidad de la fase móvil inicial y se cargaron en las columnas de dimensiones: largo 26 cm y diámetro interno 2 cm.

Para la elución de los compuestos fenólicos se empleó la metodología propuesta por Yang *et al*<sup>110</sup> y modificada por Basante<sup>111</sup> empleando tres fases móviles diferentes: los compuestos fenólicos de bajo peso molecular eluyeron con 400 mL de metanol/agua (30:70, v/v), en este proceso se recolectaron un total de 32 fracciones (de 10 mL cada una) obteniendo las fracciones F1S (Fracción 1 para la semilla) y F1E (Fracción 1 del epicarpio). Los compuestos fenólicos de tamaño molecular intermedio eluyeron con 450 mL de metanol/agua (60:40, v/v), recolectando para el caso del EPS la fracción F2S (Fracción 2 de la semilla) y para el EPE la fracción F2E (Fracción 2 del epicarpio). Finalmente los compuestos poliméricos (de mayor peso molecular) eluyeron con 250 mL de acetona/agua (60:40, v/v) obteniendo las fracciones F3S (Fracción 3 de la semilla) y F3E (Fracción 3 del epicarpio). Se realizó un seguimiento por espectroscopía UV-Vis a cada una de las fracciones obtenidas con el fin de determinar la forma de elución de los compuestos fenólicos y de esta forma iniciar el cambio de fase móvil. En las figuras 12 y 13 se puede observar el proceso de fraccionamiento de los extractos purificados de semilla y epicarpio respectivamente.

**Figura 12.** Fraccionamiento extracto purificado de semilla.



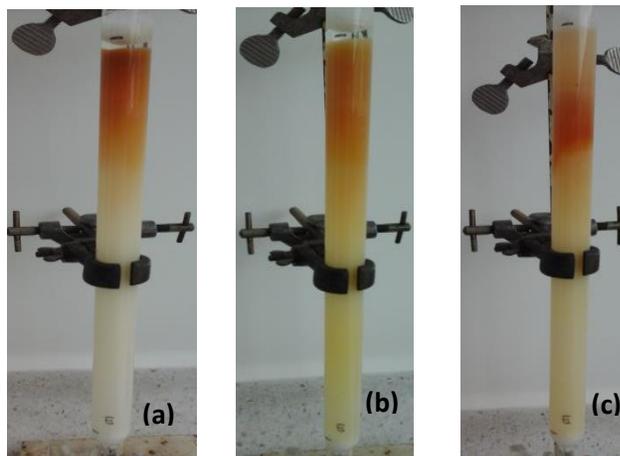
**a.** Fracción 1(F1S) **b.** Fracción 2(F2S) **c.** Fracción 3 (F3S)

Fuente: Esta investigación.

<sup>110</sup> YANG, Baoru, *et al.* Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012.vol. 60,no.35,p. 8672-8683.

<sup>111</sup> BASANTE, Jessica. Estudio de la composición y actividad antioxidante *In Vitro* de la fracción polifenólica de subproductos de aguacate (*Persea americana* Mill), semilla y epicarpio. San Juan de Pasto, 2016, 141p. Trabajo de grado (Químico).Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.Departamento de Química.

**Figura 13.** Fraccionamiento extracto purificado de epicarpio.

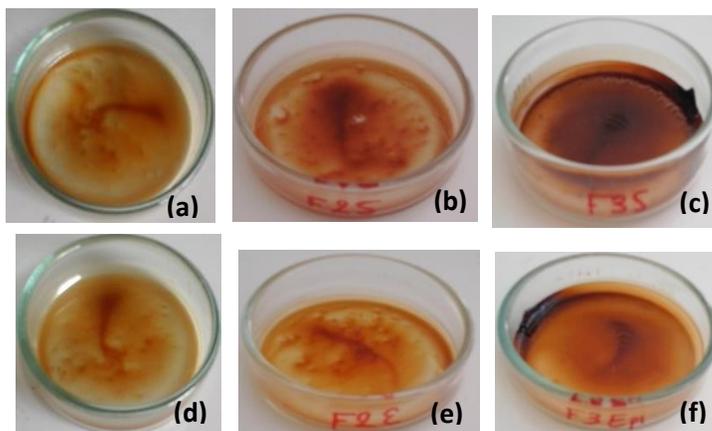


**a.** Fracción 1(F1E) **b.** Fracción 2(F2E) **c.** Fracción 3 (F3E)

Fuente: Esta investigación.

Finalmente para cada fracción se rotaevaporó el disolvente y se llevó a sequedad a una temperatura de 45°C obteniéndose en total 6 fracciones (figura 14).

**Figura 14.** Fracciones de semilla y epicarpio de aguacate obtenidas a partir del fraccionamiento mediante la resina de Sephadex LH-20.



Fracciones obtenidas durante el fraccionamiento: (a) F1S (b) F2S (c) F3S  
(d) F1E (e) F2E (f) F3E.

Fuente: Esta investigación.

Una vez obtenidas las fracciones, mediante la metodología descrita anteriormente sección 4.5.1) se determinó el CFT y la TEAC de las diferentes muestras.

### 3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH se preparó una solución trabajo de DPPH con una concentración de 0,063 mM, a partir de ésta se prepararon soluciones de concentración 0,0025, 0,005, 0,0075, 0, 01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,05 mM de DPPH, con estos datos se construyó una curva de calibración Absorbancia (515 nm) Vs concentración de DPPH. Para la evaluación de la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos se midieron 1950 µL de solución de DPPH 0,063 mM y posteriormente se registró el valor de la absorbancia a 515 nm, luego se adicionaron 50 µL de cada uno de los extractos a analizar en un rango de concentración de 70–200 g/L de antioxidante y finalmente se leyó la absorbancia a los 60 minutos de reacción. Posteriormente se graficó el % de DPPH remanente en cada muestra y la concentración de antioxidante empleada. Mediante interpolación de los datos obtenidos para cada extracto de semilla y epicarpio en la curva de calibración anteriormente descrita, se calculó el parámetro FRS<sub>50</sub>, valor que mide la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración del radical DPPH. Los datos se expresaron como g de antioxidante por cada kg de DPPH. Bajo la misma metodología se verificó la funcionalidad del método empleando ácido gálico como patrón de referencia<sup>112</sup>.

### 3.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.

Para el análisis de flavonoides totales se utilizó la metodología publicada por Peñarrieta *et al*<sup>113</sup>. Se mezclaron 200 µL de los extractos diluidos con 800 µL de agua ultrapura y posteriormente se adicionaron 60 µL de una solución de NaNO<sub>2</sub> 5% y se agitó. Después de 5 min, se adicionaron 60 µL de una solución de AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O al 20% seguido de 400 µL de NaOH 1 M. Transcurridos 5 minutos se midió la absorbancia a 415 nm usando un espectrofotómetro. El contenido de flavonoides totales se calculó mediante interpolación a partir de una curva estándar de catequina construida con soluciones de concentración 10, 30, 60, 100, 150 y 200 ppm. Los resultados se expresaron como mg de catequina /g de extracto seco<sup>114</sup>.

---

<sup>112</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,no.2, p. 270-276.

<sup>113</sup> PEÑARRIETA, *et al*. Op. Cit., p.91

<sup>114</sup> ORTIZ-MORENO, Alicia . Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *En: Food Research International*, 2011,vol.44,no.7,p. 2160–2168

### 3.8 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC –ANALÍTICA Y HPLC-MS

Los extractos purificados y fracciones de semilla y epicarpio fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia en modo analítico HPLC con detector de arreglo de fotodiodos. El equipo HPLC utilizado para los análisis fue un Waters 1525 consistente de una bomba HPLC binaria y un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2998. Se empleó una columna analítica C<sub>18</sub> de dimensiones 150mm x 4,6mm x 3 µm.

La separación se llevó a cabo de acuerdo al sistema empleado por Kosińska *et al*<sup>115</sup> utilizando como fases móviles para la elución las siguientes: Fase A: agua/ácido acético (98:2, v/v) y fase B: agua/acetonitrilo/ácido acético (78:10:2, v/v). Las muestras se disolvieron en 1mL de fase móvil B y posteriormente se filtraron en un papel con diámetro de poro de 0,45µm. El análisis se llevó a cabo en modo gradiente como se muestra a continuación: 0-15min 100% A; 15-20 min 20%A; 20-30min 0%A, 30 min 100%A. La velocidad de flujo fue de 1 µL/min y el volumen inyectado fue de 20 mL.

#### 3.8.1 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-MS

El análisis por espectrometría de masas se realizó en un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-orbitrap QExactive con fuente HESI en modo negativo. El cromatógrafo estaba equipado con una columna Xbridge BEH C<sub>18</sub> (100 mm x 2.1 mm, 2.5 µm). Para el análisis: la fase móvil A consistió de H<sub>2</sub>O al 0,1% en ácido trifluoroacético y la fase móvil B fue metanol al 0,1% en ácido trifluoroacético.

El análisis se llevó a cabo en modo gradiente como se muestra a continuación: 5% B (1 min), 100% B (2 min), 5%B (3 min), 5-100% B (10 min). La velocidad de flujo fue de 0,5 mL /min. La temperatura de la columna fue de 40 °C.

---

<sup>115</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4615.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CLASIFICACIÓN DEL FRUTO.

A partir de una revisión de las características morfológicas de la muestra y una comparación con los ejemplares presentes en el Herbario de Investigaciones- Herbario PSO- y el Herbario de la Universidad Nacional , el ejemplar recolectado en el municipio de Sandoná fue clasificado taxonómicamente como especie *Persea americana* Mill, perteneciente a la familia Lauraceae, con número de Voucher 576780. En la muestra recolectada se determinó que en la fruta el % de semilla es de aproximadamente el 15,5% y el % de epicarpio es del 9,3%.

### 4.2 AISLAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (TEAC) Y EL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)

Los porcentajes de extracción del proceso de maceración con metanol 80% (extractos crudos) fueron de 1,08% para el epicarpio (ECE) y de 4,57% para la semilla (ECS). Los extractos aislados con acetona (70%) fueron superiores a los encontrados con metanol, 3,28% para el epicarpio y de 5,53% para la semilla.

Una vez obtenidos los extractos ECE y ECS usando los dos tipos de solventes (metanol y acetona) y con el propósito de valorar la eficiencia de extracción tomando como factor de respuesta la actividad antioxidante (TEAC) se procedió a determinar esta propiedad en los diferentes extractos. Para los extractos igualmente se determinó el contenido fenólico total (CFT).

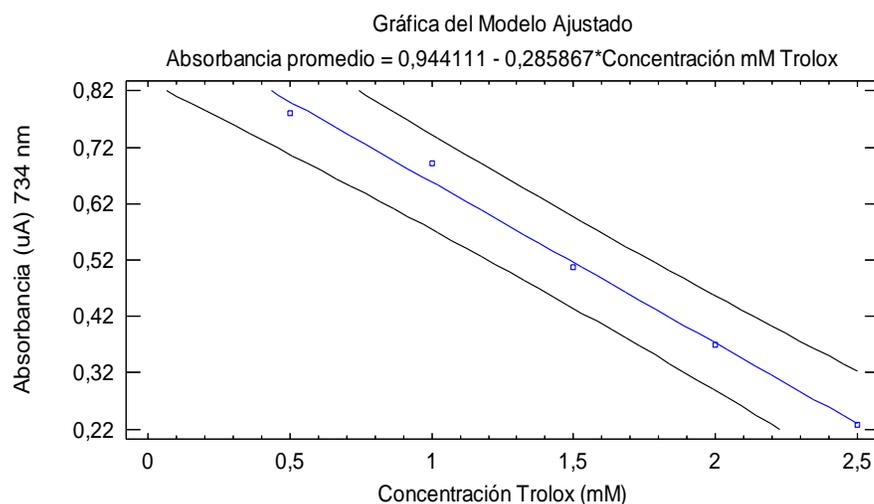
#### 4.2.1 Determinación de la actividad antioxidante.

Para medir la actividad antioxidante mediante el método TEAC de las diferentes muestras se construyó una recta de calibrado empleando Trolox como patrón de referencia. En la tabla 3 se registran estos resultados. La ecuación de regresión hallada mediante el método de los mínimos cuadrados fue  $A = 0,9441111 - 0,285867 * [C]$  ( $r=0,99608$ ), donde A es la absorbancia medida a 734 nm y C es la concentración del trolox en mmol /L. Todos los análisis se realizaron por triplicado, la representación gráfica de la recta se muestra en la figura 15.

**Tabla 3.** Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación de la actividad antioxidante (TEAC).

Concentración de trolox (mM)	Absorbancia $\pm$ desviación estándar
0,5	0,781 $\pm$ 0,006
1	0,692 $\pm$ 0,018
1,5	0,507 $\pm$ 0,037
2	0,370 $\pm$ 0,019
2,5	0,227 $\pm$ 0,017

**Figura 15.** Recta de calibrado para determinar la capacidad antioxidante equivalente al trolox(TEAC).



Fuente: Esta investigación

La funcionalidad del método se comprobó determinando el valor TEAC de un estándar conocido (ácido ascórbico). Para el patrón se encontró un valor de 0,945 mmol Trolox/mmol de compuesto que está en concordancia con el publicado en la literatura científica, Re y colaboradores<sup>116</sup> reportan un valor TEAC para este antioxidante de 1,05 mmol Trolox/mmol de compuesto. En la tabla 4 se presentan los valores TEAC (promedio de tres réplicas) para ECE y ECS aislados utilizando los dos tipos de solventes.

<sup>116</sup> RE, R, *et al.* Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *En: Free Radical Biology and Medicine*, 1999. vol. 26, no.9. p. 1231-1237.

**Tabla 4.** Contenido de fenoles totales (CFT) y capacidad antioxidante (TEAC) en extractos crudos de semilla y epicarpio (*Persea americana*).

<i>Muestra</i>	<i>CFT<sup>a</sup> mg EAG/g extracto crudo</i>	<i>TEAC<sup>a</sup> mmol trolox / g extracto Crudo</i>
ECE-metanol	495 ±42	5,4± 1,5
ECE-acetona	528±42	5,8 ± 1,5
ECS–metanol	205± 45	2,6± 1,8
ECS–acetona	329 ± 44	3,2 ± 1,7

<sup>a</sup> Media calculada a partir de tres experimentos

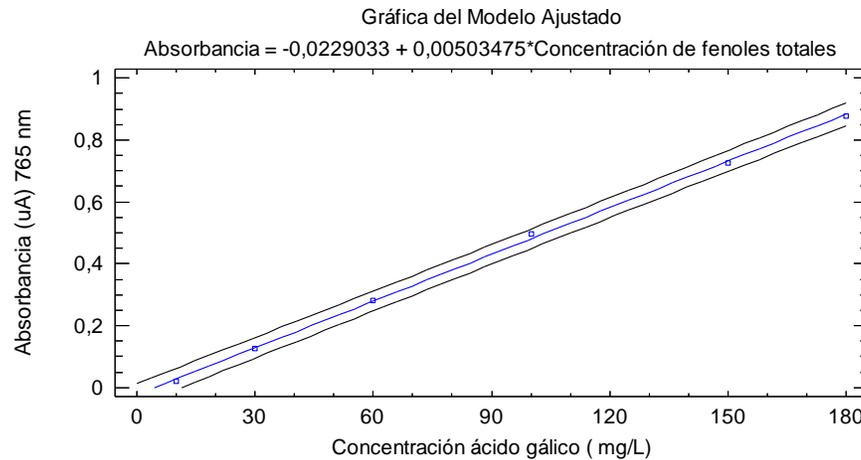
#### 4.2.2 Determinación del contenido fenólico total (CFT).

Para cuantificar los fenoles extraídos con cada tipo de solvente se implementó el método de Folin-Ciocalteu que utiliza como patrón de referencia el ácido gálico. En la tabla 5 se presentan los datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado. Mediante el método de los mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de correlación:  $A = -0,022933 + 0,00543445 * [C]$  ( $r=0,999614$ ), donde A es la absorbancia medida a 765 nm y C la concentración de ácido gálico en mg /L. Todos los análisis se realizaron por triplicado, la representación gráfica de la recta de calibrado se muestra en la figura 16.

**Tabla 5.** Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación del CFT.

<i>Concentración de ácido gálico (mg/L)</i>	<i>Absorbancia ± desviación estándar</i>
10	0,019±0,003
30	0,127±0,003
60	0,283±0,005
100	0,498±0,003
150	0,725±0,011
180	0,879±0,005

**Figura 16.** Recta de calibrado para determinar el CFT.



Fuente: Esta investigación

En la tabla 4 se presentan el CFT (promedio de tres réplicas) para ECE y ECS aislados utilizando los dos tipos de solventes.

#### 4.3 Estudio de la variación de la actividad antioxidante bajo las diferentes condiciones experimentales.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) que descompone la variabilidad de los valores TEAC bajo las diferentes condiciones experimentales (parte del fruto y tipo de solvente). La tabla 6 muestra que el valor  $p < 0.05$  para las condiciones parte del fruto y solvente evidencia un efecto estadísticamente significativo de éstos sobre los valores TEAC obtenidos.

**Tabla 6.** Análisis de Varianza para valores TEAC.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CONDICIÓN	21,2302	3	7,07674	27,13	0,0003
RESIDUOS	1,82624	7	0,260892		
TOTAL (CORREGIDO)	23,0565	10			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En la tabla 7 se muestra la media de los valores TEAC para cada condición y los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad debida a las réplicas. Las condiciones acetona-epicarpio y acetona-semilla obtuvieron los valores medios más altos de actividad antioxidante TEAC. Las dos columnas de la derecha muestran los intervalos de confianza al 95% para cada una de las medidas.

**Tabla 7.** Medias por Mínimos Cuadrados para TEAC con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	11	4,18979			
CONDICION					
Acetona – Epicarpio	3	5,71138	0,294897	5,01406	6,40871
Acetona – Semilla	3	3,12161	0,294897	2,42429	3,81893
Metanol – Epicarpio	2	5,38364	0,361173	4,5296	6,23768
Metanol – Semilla	3	2,54253	0,294897	1,8452	3,23985

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se aplicó un procedimiento de comparación múltiple. En la tabla 8 se identifican dos grupos homogéneos que muestran la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antioxidante TEAC de los compuestos fenólicos aislados de la semilla utilizando los dos tipos de solventes (acetona y metanol). Este mismo comportamiento se presenta para el caso de los extractos aislados del epicarpio. El método que se empleó para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

**Tabla 8.** Discriminación entre medias mediante LSD.

<i>CONDICION</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Metanol : Semilla	3	2,54253	0,294897	X
Acetona : Semilla	3	3,12161	0,294897	X
Metanol : Epicarpio	2	5,38364	0,361173	X
Acetona : Epicarpio	3	5,71138	0,294897	X

Además, mediante la prueba de múltiples rangos, que aplica un procedimiento de comparación para mostrar las diferencias estimadas entre cada par de medias, se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% cuando se comparan los valores TEAC de los extractos de semilla y epicarpio (ECS y ECE). En la tabla 9 se puede observar que independientemente del solvente existen diferencias en los valores TEAC para cualquier combinación epicarpio-semilla.

**Tabla 9.** Pruebas de Múltiple Rangos para los valores TEAC en cada condición.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Acetona : epicarpio - Acetona : semilla	*	2,58978	0,986161
Acetona : epicarpio - Metanol : epicarpio		0,327744	1,10256
Acetona : epicarpio - Metanol : semilla	*	3,16886	0,986161
Acetona : semilla - Metanol : epicarpio	*	-2,26203	1,10256
Acetona : semilla - Metanol : semilla		0,579081	0,986161
Metanol : epicarpio - Metanol : semilla	*	2,84111	1,10256

\* indica una diferencia significativa.

En la tabla 10 se muestra el análisis de varianza para cada condición establecida de manera individual. Se obtuvo que la parte del fruto es el factor principal que influye sobre la variable respuesta mencionada, al registrar un valor  $p < 0,05$ . Teniendo en cuenta que los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores, el resultado muestra que el factor parte del fruto tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad antioxidante con un 95,0% de confianza. La suma de cuadrados tipo III determina la contribución de cada factor eliminando los efectos de los demás factores.

**Tabla 10.** Análisis de varianza para actividad antioxidante-Suma de cuadrados tipo III.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Parte del fruto	19,6631	1	19,6631	75,37	<b>0,0001</b>
B:Solvente	0,54822	1	0,54822	2,10	0,1904
INTERACCIONES					
AB	0,0421136	1	0,0421136	0,16	0,6998
RESIDUOS	1,82624	7	0,260892		
TOTAL (CORREGIDO)	23,0565	10			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### 4.3.1 Estudio de la variación del contenido fenólico total (CFT) bajo las diferentes condiciones experimentales.

Siguiendo el mismo procedimiento mostrado anteriormente, el análisis de varianza (ANOVA) para el contenido fenólico total en las diferentes condiciones experimentales mostró un comportamiento similar, es decir, existe un efecto estadísticamente significativo de los factores sobre los valores del CFT. En la tabla 11 se muestra para este caso solo la prueba de múltiples rangos, se puede establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT de los extractos de semilla y epicarpio (ECS y ECE). Se puede observar que independientemente del solvente existen diferencias en los valores del CFT para la mayoría de combinaciones epicarpio-semilla, sin embargo en este caso, cuando se usa metanol como solvente del epicarpio y acetona como solvente de la semilla (Metanol:epicarpio - Acetona:semilla) no se observan diferencias significativas, esto probablemente se debe a que el reactivo Folin-Ciocalteu no posee una selectividad específica para compuestos fenólicos, reacciona también con sustancias que puedan ser fácilmente oxidadas por los aniones de tungsteno-heteropolifosfomolibdato (coloración amarilla) que adquieren una coloración azul después de la reducción<sup>117</sup>.

<sup>117</sup> WU, Li-chen, *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *En:* Food Chemistry, 2006. vol. 95,no.2, p. 319–327

**Tabla 11.** Prueba de Múltiples Rangos para concentración de fenoles totales por condición.

<i>Condición</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Acetona Epicarpio- Metanol Epicarpio		108,211	178,06
Epicarpio-acetona - Semilla-acetona	*	274,683	159,262
Epicarpio-acetona - Semilla-metanol	*	398,71	159,262
Epicarpio-metanol - Semilla-acetona		166,472	178,06
Epicarpio-metanol - Semilla-metanol	*	290,499	178,06
Semilla-acetona - Semilla-metanol		124,027	159,262

\* indica una diferencia significativa.

Estos resultados permiten establecer que el tipo de solvente (acetona ó metanol) no influye significativamente en la cantidad de fenoles (CFT) extraídos de la semilla y epicarpio del fruto de aguacate, ni en la capacidad antioxidante TEAC de los extractos aislados con estos dos solventes, además, el extracto crudo aislado del epicarpio (ECE) tiene mayor contenido fenólico y actividad antioxidante (TEAC) que el extracto crudo de la semilla (ECS).

#### **4.4 PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS (ECE Y ECS).**

Luego del proceso de maceración con acetona los ECE y ECS se purificaron mediante retención selectiva de los compuestos fenólicos sobre Amberlita XAD-7, en este proceso se aislaron 1,049 g de extracto purificado de la semilla (EPS) y 1,3094 g de extracto purificado del epicarpio (EPE) que corresponden al 52,45% y 65,47% respectivamente. Estos resultados están en concordancia con lo discutido anteriormente, es decir, el extracto purificado de epicarpio contiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Posteriormente los EPS y EPE se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria. A continuación se indica el número de fracciones recolectadas y su respectivo porcentaje de recuperación durante el proceso. Para el epicarpio se recolectaron tres fracciones nombradas como F1E (6,36%), F2E (21,46%) F3E (62,8%). En la semilla se aislaron F1S (12%), F2S (19,88%) y F3S (62,68%). Los altos porcentajes de recuperación de F3E y F3S (fracciones más pesadas) muestran que este tipo de compuestos son los que están en mayor proporción.

En el siguiente apartado se indica los resultados obtenidos para las metodologías CFT, TEAC, DPPH y FT desarrolladas en las diferentes muestras de semilla y epicarpio, los datos se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, TEAC y DPPH para extractos de semilla, epicarpio y sus fracciones aisladas de aguacate (*Persea americana*).

<i>Muestra Semilla</i>	<i>CFT (mg EAG/g extracto seco)</i>	<i>TEAC (mmol Trolox / g extracto seco)</i>	<i>EC<sub>50</sub> g antioxidante/ kg DPPH</i>	<i>FT (mg catequina / g extracto seco)</i>
ECS	329±43	3,2 ±1,7		
EPS	1303±128	18±6,4	90±45	595±114
F1S	588±136	7,6±7,5	191±91	190±124
F2S	957±131	13±6,9	104±49	530±114
F3S	752±133	12 ±7,1	86±62	529±114
<i>Muestra Epicarpio</i>	<i>CFT (mg EAG/g extracto seco)</i>	<i>TEAC (mmol Trolox / g extracto seco)</i>	<i>EC<sub>50</sub> g antioxidante/ kg DPPH</i>	<i>FT (mg catequina / g extracto seco)</i>
ECE	528±42	5,7 ± 1,5		
EPE	1058±130	12± 6,9	83±42	670±114
F1E	364±139	4,8± 7,8	374±155	150±127
F2E	1051±130	14 ± 6,8	85±29	712± 115
F3E	964±131	12± 6,9	80±63	561± 114

#### 4.5 CONTENIDO FENÓLICO TOTAL DE FRACCIONES Y EXTRACTOS PURIFICADOS.

Los extractos crudos de semilla y epicarpio (ECS y ECE) muestran valores relativamente bajos en el CFT con respecto a los extractos purificados (EPS y EPE), lo que evidencia una buena eficiencia del proceso de purificación, incrementando aproximadamente cuatro veces la concentración de los fenoles en el EPS (1303 mg EAG /g extracto) y dos veces en el EPE (1058,036 mg EAG /g extracto). La tabla 12 resume los resultados obtenidos para el contenido fenólico (CFT) de los extractos crudos, purificados y las fracciones aisladas de semilla y epicarpio de aguacate.

El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher muestra que para la mayoría de las muestras el CFT es estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). La única pareja de datos en el que el CFT no es estadísticamente diferente es para la fracción dos del epicarpio (F2E) y el extracto purificado del epicarpio (EPE) (Tabla 13). Estos resultados se evidencian en la gráfica de medias para los valores de CFT obtenidos en las diferentes muestras (Ver Anexo C). La interpolación de cada una de las medias con sus respectivos intervalos de incertidumbre indica que no existen diferencias significativas entre las medias correspondientes.

**Tabla 13.** Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de CFT.

<i>Fracciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
F1E	3	366,267	20,4438	X
F1S	3	510,049	20,4438	X
F3S	3	674,938	20,4438	X
F2S	3	881,16	20,4438	X
F3E	3	970,267	20,4438	X
F2E	3	1058,27	20,4438	X
EPE	3	1065,38	20,4438	X
EPS	3	1229,6	20,4438	X

En la Tabla 14 se muestra la prueba de múltiples rangos en donde se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT de todas las muestras (extractos purificados y fracciones). Se puede observar que existen diferencias en los valores del CFT para la mayoría de parejas de muestras. El mayor CFT lo presentaron las fracciones intermedias de la semilla y epicarpio (F2E y F2S) y las fracciones más pesadas (F3E y F3S) aisladas de la semilla y epicarpio (Tabla 14).

**Tabla 14.** Pruebas de múltiples rangos para los valores CFT por Fracciones y extractos purificados.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
EPE – EPS	*	-164,227	61,2907
EPE - F1E	*	699,111	61,2907
EPE - F1S	*	555,329	61,2907
EPE - F2E		7,11111	61,2907
EPE - F2S	*	184,218	61,2907
EPE - F3E	*	95,1111	61,2907
EPE - F3S	*	390,44	61,2907
EPS - F1E	*	863,338	61,2907
EPS - F1S	*	719,556	61,2907
EPS - F2E	*	171,338	61,2907
EPS - F2S	*	348,444	61,2907
EPS - F3E	*	259,338	61,2907
EPS - F3S	*	554,667	61,2907
F1E - F1S	*	-143,782	61,2907
F1E - F2E	*	-692,0	61,2907
F1E - F2S	*	-514,893	61,2907
F1E - F3E	*	-604,0	61,2907
F1E - F3S	*	-308,671	61,2907
F1S - F2E	*	-548,218	61,2907
F1S - F2S	*	-371,111	61,2907

F1S - F3E	*	-460,218	61,2907
F1S - F3S	*	-164,889	61,2907
F2E - F2S	*	177,107	61,2907
F2E - F3E	*	88,0	61,2907
F2E - F3S	*	383,329	61,2907
F2S - F3E	*	-89,1067	61,2907
F2S - F3S	*	206,222	61,2907
F3E - F3S	*	295,329	61,2907

\* indica una diferencia significativa.

A continuación se presenta una comparación del contenido fenólico total (CFT) de los extractos ECS y ECE con datos publicados en la literatura científica para otras variedades de aguacate. Los datos se expresaron en mg EAG / g de material vegetal (MV). En la tabla 15 se observa que el CFT no superó al de ninguna de las semillas de las ocho variedades estudiadas por GU *et al*<sup>118</sup>. Sin embargo, al analizar el CFT para el epicarpio se observa que este superó al de las mismas ocho variedades (Slimcado, Simmonds, Loretta, Choquette, Booth 7, Booth 8, Tonnage y Hass). El proceso para la obtención de los extractos que se referencian se menciona en la sección 2.4.

**Tabla 15.** Comparación del contenido de fenoles totales semilla y epicarpio *Persea americana* con el de diferentes cultivos.

Muestras	Cultivos	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g material vegetal )
ECS	<i>Persea americana Mill</i>	18,2±2,4*
ECE	<i>Persea americana Mill</i>	17,3±1,4*
Semilla	Slimcado	19,2±3,3
	Simmonds	40,2±1,9
	Loretta	31,5±2,2
	Choquette	33,4±1,5
	Booth 7	33,4±5,0
	Booth 8	35,7±0,8
	Tonnage	33,1±0,9
	Hass	51,6±1,6
Epicarpio	Slimcado	4,6±0,3
	Simmonds	7,4±0,2
	Loretta	7,6±0,8
	Choquette	13,9±1,1
	Booth 7	13,2±0,2
	Booth 8	8,1±0,6
	Tonnage	4,3±0,1
	Hass	12,6±0,3

\* CFT (mg EAG/g material vegetal)

Fuente: Adaptado de GU, BOSTIC y WANG (2010).

<sup>118</sup> GU, BOSTIC y WANG. Op. cit., p. 195-196

De otro lado, comparando el contenido fenólico publicado por Estéves *et al*<sup>119</sup> para las variedades Hass y Fuerte de la especie *Persea americana* con el obtenido en este estudio para los extractos crudos de semilla y picarpio (tabla 16), se observa que el contenido fenólico total de ECS y ECE en mg EAG /100g muestra fresca están muy por debajo del obtenido en las variedades Hass y Fuerte al utilizar acetona al 70% como disolvente de extracción con excepción del extracto de semilla obtenida con acetato de etilo en el cual en extracto ECS superó el valor respectivo del contenido fenólico total.

**Tabla 16.** Comparación del contenido de fenoles totales para semilla y epicarpio *Persea americana* con el de variedades Hass y Fuerte.

	Disolvente para la extracción	mg EAG /100g muestra fresca		
		<i>Persea americana</i> Mill	Hass	Fuerte
ECS	Acetona 70%	1820*±241		
ECE	Acetona 70%	1732*±138		
Epicarpio	Acetato de etilo		3293±925	4054±1008
	Acetona (70%)		8997±3103	17218±1446
	Metanol (70%)		7841±2447	13770±2557
Semilla	Acetato de etilo		1699±408	2029±715
	Acetona (70%)		6082±863	6912±1699
	Metanol (70%)		3511±988	4164±1048

\* CFT mg ácido gálico/100g material vegetal.

Fuente: Adaptado de ESTÉVES, *et al.* (2011)

También se comparó el contenido fenólico total de los extractos crudos aislados de semilla y epicarpio con el reportado en la literatura para otros frutos encontrándose que el contenido fenólico de los extractos ECS y ECE de *Persea americana* supera el de frutos como el banano<sup>120</sup> (1010±198 mg EAG/100 g peso fresco), la mora<sup>121</sup> (851±4,8 mg EAG/100 g peso fresco), la fresa<sup>122</sup> (622 ± 16 mg EAG/100 g peso fresco) y la guava<sup>123</sup> (462± 128 mg EAG/100 g peso fresco) en cuyos casos la extracción se llevó a cabo empleando una mezcla de metanol/agua (50:50, v/v) y posteriormente acetona/agua (70:30, v/v). Al comparar el contenido fenólico con el epicarpio del fruto Fig<sup>124</sup>(*Ficus carica* L.) (463 mg EAG / 100g de peso fresco) y la del capulí<sup>125</sup> (1494±385 mg EAG / 100g de peso fresco), se observa que el epicarpio del aguacate en estudio mostró un mayor valor en el contenido fenólico. Finalmente al comparar el contenido fenólico total tanto del

<sup>119</sup> ESTÉVES, *et al.* Op.Cit., p.5629.

<sup>120</sup> VASCO, Catalina; RUALES, Jenny y KAMAL-ELDIN, Afaf. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *En: Food Chemistry*, 2008. vol. 111,no.4,p. 816–823.

<sup>121</sup> RIOS DE SOUZA, Vanessa, *et al.* Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *En: Food Chemistry*, 2014. vol.156, p.362–368

<sup>122</sup> *Ibid.*, p. 366.

<sup>123</sup> VASCO, RUALES y KAMAL-ELDIN. Op. cit., p. 820.

<sup>124</sup> ZOHAR, Kerem, *et al.* Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.). *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2006.vol.54,no.20,p.7717-7723

<sup>125</sup> VASCO, RUALES y KAMAL-ELDIN. Op. cit., p.820

epicarpio como de la semilla con el encontrado para una variedad específica de frambuesa<sup>126</sup> (348 mg EAG/100 g de peso fresco) se concluye que los valores no superan al de *Persea americana* en estudio.

Cabe resaltar que en los resultados anteriormente citados para frutos diferentes al aguacate se utilizó la totalidad del fruto mientras que en el presente estudio se empleó una parte específica del aguacate lo que hace más significativo el resultado al tratarse de un sub-producto.

#### 4.6 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TEAC DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS.

En la tabla 12 se presentan los valores TEAC para los diferentes extractos y fracciones. Los resultados muestran una mayor actividad antioxidante en ECE que en ECS. Estadísticamente se comprobó que los valores TEAC de los extractos purificados son mayores que los extractos crudos, esto evidencia la eficiencia del proceso de purificación mencionado anteriormente. En la semilla el valor TEAC del EPS se incrementó aproximadamente cinco veces con respecto al ECS y dos veces para el caso del epicarpio, siendo el EPS el que tiene, en comparación con EPE, la mayor actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de las fracciones muestra diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (Tabla 17). Igual que para el caso del CFT, las fracciones intermedias de epicarpio y semilla F2E, F2S, F3S, F3E son las que presentan la mayor actividad antioxidante, siendo las fracciones F2E y F2S las que presentan los mayores valores. Las diferencias estadísticas obtenidas entre las diferentes parejas de muestras se pueden verificar por medio de la prueba de múltiples rangos (Anexo B) y la gráfica de comparación de medias (Anexo C). La mayor actividad antioxidante (TEAC) de los extractos EPS Y F2E está relacionada con el mayor CFT de estos extractos, compuestos con reconocida actividad antioxidante<sup>127</sup>. La capacidad de estos compuestos de donar hidrógeno les permite reducir con mayor facilidad este tipo de radicales sintéticos.

**Tabla 17.** Discriminación entre medias mediante LSD para los valores TEAC.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
F1E	3	4,75613	X
F1S	3	7,56208	X
F3E	3	11,9304	X
F3S	3	12,0159	X
EPE	3	12,0858	X

<sup>126</sup> ÇEKİÇ, Çetin y ÖZGEN, Mustafa . Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). En: Journal of Food Composition and Analysis, 2010. vol. 23, no.6, p.540–544

<sup>127</sup> CAI, Y.; SUN, M. y CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol. 51, no 8, p. 2288-2294.

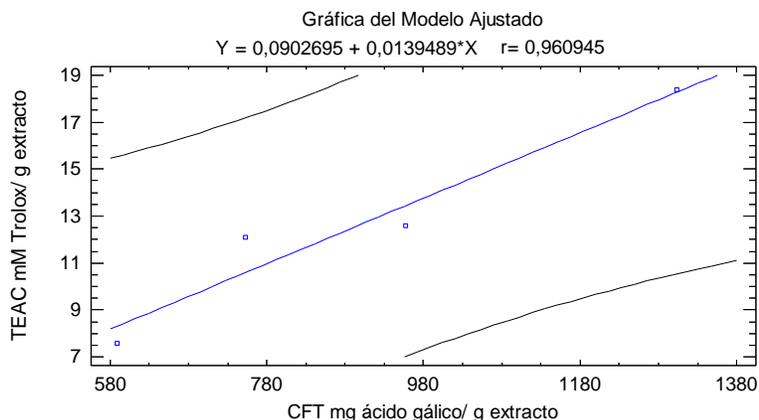
F2S	3	12,5677	XX
F2E	3	13,7103	X
EPS	3	18,3662	X

Comparando los valores TEAC de los extractos purificados y las fracciones de la semilla con el CFT se observa una relación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre estas características y las muestras de semilla y epicarpio (para la semilla  $r = 0,96945$  y para el epicarpio  $r = 0,984621$ ). En la figura 17 y tabla 18 se presentan las correlaciones para el caso de la semilla.

**Tabla 18.** Análisis de varianza de valores TEAC y CFT en fracciones y extractos purificados de semilla y epicarpio de aguacate.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	55,3722	1	55,3722	31,24	0,0305
Residuo	3,54483	2	1,77242		
Total (Corr.)	58,917	3			

**Figura 17.** Correlación entre TEAC y CFT para la semilla.



Fuente: Está investigación.

De igual forma el análisis de los valores TEAC y DPPH evidenció para el caso del epicarpio ( $r = -0,99$ ) igualmente correlaciones entre estas características (Anexo D), sin embargo para las muestras de la semilla no se obtuvo la correlación esperada.

Finalmente al comparar las variables FT y TEAC para el caso del epicarpio se observa una relación estadísticamente significativa entre estas características ( $p < 0.05$ , nivel de confianza al 95%). El coeficiente de correlación obtenido (cercano a uno) indica una relación fuerte entre las variables de estudio. En la semilla no se presentó tal correlación. En la tabla 19 se muestran las correlaciones realizadas para las diferentes metodologías empleadas.

**Tabla 19.** Correlaciones para las diferentes características medidas en extractos de semilla y epicarpio.

Correlación	Muestra	Coefficiente de correlación (r)
CFT/TEAC	Semilla	0,96945
	Epicarpio	0,984621
CFT/FT	Semilla	----
	Epicarpio	0,990898
CFT/DPPH	Semilla	-0,65
	Epicarpio	-0,99
TEAC/ DPPH	Semilla	----
	Epicarpio	-0,976988
FT/TEAC	Semilla	----
	Epicarpio	0,987465
FT/DPPH	Semilla	-0,981704
	Epicarpio	-0,965498

Al analizar la tendencia de la actividad antioxidante TEAC de los extractos crudos de semilla y epicarpio con el reportado por Kosinska *et al*<sup>128</sup> en las variedades Hass y Shepard (tabla 20), se observa que la actividad antioxidante de los extractos de semilla y epicarpio en estudio superan al obtenido en la semilla ( $0,094 \pm 0,0047$  mmolTrolox/g peso seco) y el epicarpio ( $0,161 \pm 0,0024$  mmolTrolox/g peso seco) para la variedad Hass y para el epicarpio ( $0,112 \pm 0,0034$  mmolTrolox/g peso seco) y semilla ( $0,112 \pm 0,0034$  mmolTrolox/g peso seco) de la variedad Shepard.

**Tabla 20.** Comparación de la actividad antioxidante (TEAC) en semilla y epicarpio de aguacate con las variedades Hass y Shepard.

	Variedad	TEAC(mmol Trolox/g peso seco)
ECS	<i>Persea americana</i> Mill	$0,177^* \pm 0,095$
ECE	<i>Persea americana</i> Mill	$0,187^* \pm 0,050$
Epicarpio	Hass	$0,161 \pm 0,0024$
Epicarpio	Shepard	$0,112 \pm 0,0034$
Semilla	Hass	$0,094 \pm 0,0007$
Semilla	Shepard	$0,091 \pm 0,0047$

\* mmol Trolox/ g material vegetal en base húmeda

Fuente: Adaptado de KOSIŃSKA, *et al.* (2012).

Sin embargo, al comparar los resultados de actividad antioxidante TEAC de los extractos ECS y ECE con los obtenidos por Estévez *et al*<sup>129</sup> (tabla 21), se observa que la actividad antioxidante equivalente a TROLOX de las variedades Hass y Fuerte empleando los tres disolventes de extracción supera al obtenido en los extractos de estudio.

<sup>128</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p.4615

<sup>129</sup> ESTÉVES, *et al.* Op.cit., p. 5630

**Tabla 21.** Actividad antioxidante (TEAC) en semilla y epicarpio aguacate variedades Hass y Fuerte.

		TEAC(mmol Trolox/g muestra fresca)	
		Hass	Fuerte
Epicarpio	Acetato de etilo	16,12±6,98	34,82±12,61
	Acetona	103,75±44,49	242,26±28,31
	Metanol	74,06±23,17	185,87±26,91
Semilla	Acetato de etilo	21,57±7,51	38,15±12,78
	Acetona	158,29±26,27	194,80±44,69
	Metanol	78,93±26,73	121,61±31,87

Fuente: Adaptado de ESTEVÉZ, *et al.* (2011)

Para finalizar se evaluó la actividad antioxidante TEAC obtenida con el de otros frutos encontrados en la literatura. Los resultados obtenidos indican que la actividad antioxidante de los extractos de semilla (176,55 µmol Trolox/ g material vegetal) y epicarpio (186,8 µmol Trolox/ g material vegetal) superan el de frutos como la granada<sup>130</sup> (40,61 ± 0,11 µmol Trolox/ g fruto fresco), frambuesas<sup>131</sup>(21,5 µmol Trolox/g peso fresco) y moras<sup>132</sup> variedad Jumbo (146,89±4,59 µmol Trolox/g peso fresco).

Algunas verduras como el repollo rojo (2,53±0,49 mmol Trolox Equivalente/ 100 g peso fresco) y la zanahoria morada (3,83±0,07 mmol Trolox equivalente/ 100 g peso fresco) mostraron actividades antioxidantes menores<sup>133</sup> que las de los extractos de semilla (117,7 mmol Trolox/ 100 g material vegetal) y epicarpio (186,8 mmol Trolox/ 100 g material vegetal) de *Persea americana* en estudio.

#### 4.7 Actividad antioxidante (Método DPPH)

Igualmente esta característica se evaluó mediante el método DPPH. Para ello se procedió a construir una curva de calibración que relacionara concentración de DPPH Vs Absorbancia. Los datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración se muestran en el anexo A. La ecuación de correlación encontrada fue  $y = 12,2848 - 0,00162375x$  ( $r = 0,998525$ ) donde  $y$  es la absorbancia medida a 515 nm y  $x$  es la concentración de DPPH en mmol /L. La representación gráfica de la curva de calibrado se muestra en la figura 18.

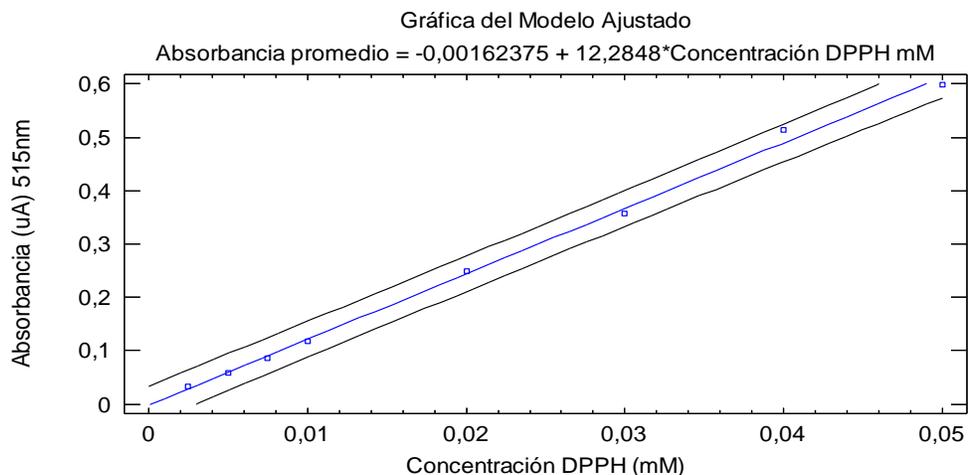
<sup>130</sup> HUA-BIN, LiA, *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *En* : Food Chemistry, 2011. vol. 129, no.2,p.345 –350

<sup>131</sup> ÇEKIÇ y ÖZGEN. Op. cit., p. 542

<sup>132</sup> SARIBURUN, Esra, *et al.* Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *En* :Journal of Food Science, 2010. vol. 75, no.4, p. 328-335

<sup>133</sup> KUCHARSKA , Alicja, *et al.* Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *En*: Journal of Functional Foods, 2016, vol. 21,p. 33–146

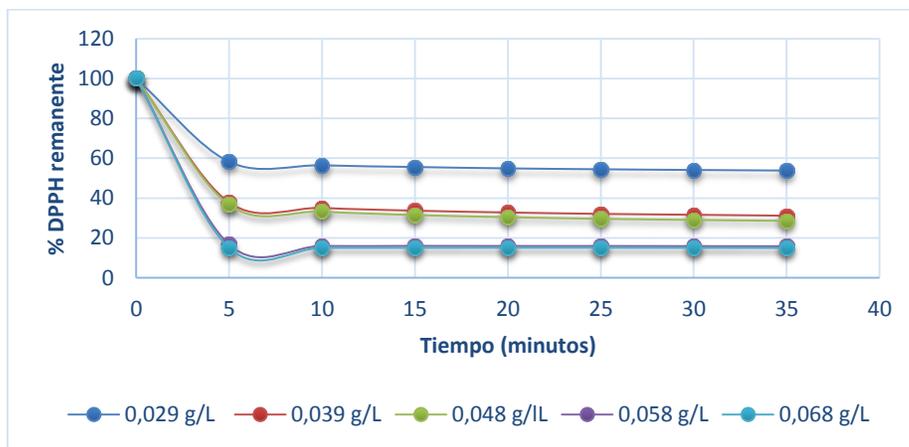
**Figura 18.** Curva de calibración para determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.



Fuente: Esta investigación.

Inicialmente se estudió el método con un patrón de ácido gálico, antioxidante catalogado con una eficiencia anti-radical intermedia<sup>134</sup>. En el anexo A se indica las concentraciones utilizadas de ácido gálico para la construcción de la recta de calibrado y el respectivo % de DPPH remanente.

**Figura 19.** Comportamiento del radical DPPH frente a diferentes concentraciones de ácido gálico.



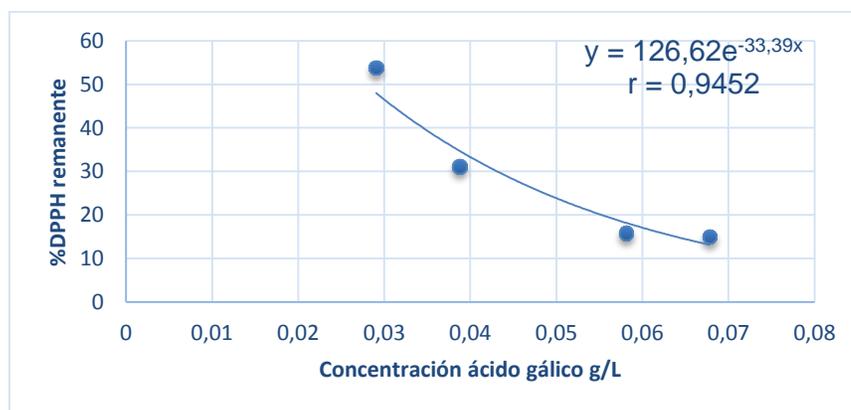
Fuente: Esta investigación.

En la figura 19 se observa que al incrementar la concentración de antioxidante, el % de DPPH remanente en la solución disminuye y posteriormente se estabiliza al completar un tiempo de reacción de 35 minutos. A partir de estos resultados se graficó el % de DPPH

<sup>134</sup> SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI y SAURA-CALIXTO. Op. cit., p.270-276.

remanente Vs la concentración de antioxidante utilizado. Con el propósito de evaluar el  $FRS_{50}$ , parámetro que indica la concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración del radical DPPH hasta en un 50%. Este parámetro se expresa en g de antioxidante / kg de DPPH.

**Figura 20.** Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de ácido gálico.



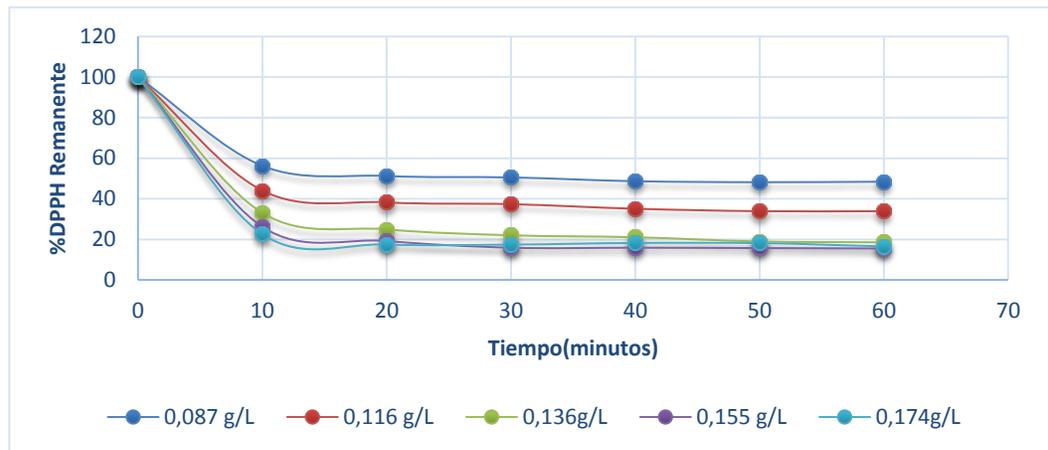
Fuente: Esta investigación.

A partir de la ecuación obtenida de la regresión exponencial (figura 20) se obtuvo un valor de  $FRS_{50}$  igual a 0,031 g ácido gálico/ kg de DPPH. Al comparar este resultado con el reportado por Sánchez-Moreno *et al*<sup>135</sup> (0,026 g antioxidante/ g DPPH) se observa una similitud entre los datos.

Teniendo como base estos resultados se procedió a medir la actividad antioxidante de los extractos purificados EPS, EPE y fracciones F1S, F1E, F2S, F2E, F3S y F3E de semilla y epicarpio de aguacate (Anexo E). En las figuras 21 y 22 se indica el comportamiento de los extractos EPS y EPE frente al radical DPPH. Se observa que el % de DPPH remanente tanto en EPS como en EPE se estabilizó en un tiempo de 60 minutos. De igual forma cabe resaltar que a medida que se incrementó la concentración de antioxidante el % de DPPH remanente disminuyó y se requirió una menor cantidad de tiempo para obtener el  $FRS_{50}$ .

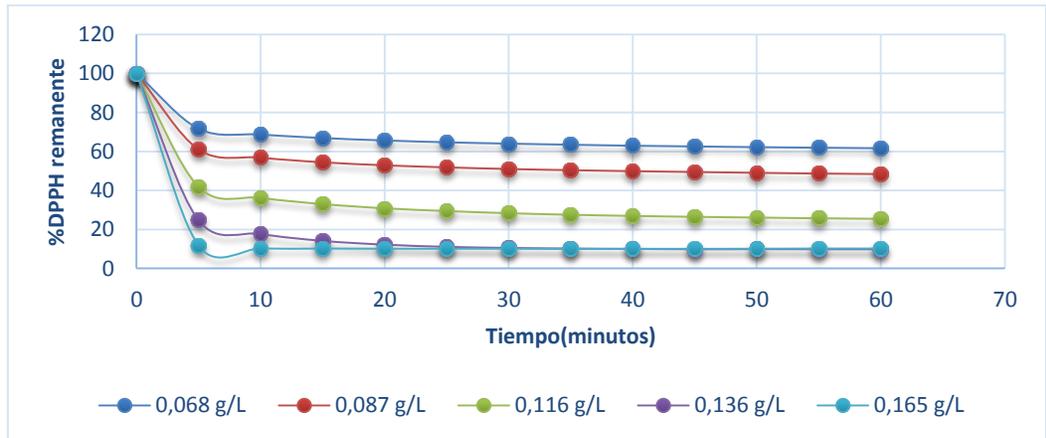
<sup>135</sup> SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI y SAURA-CALIXTO. Op. cit., p.270-276.

**Figura 21.** Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto purificado de semilla (EPS).



Fuente: Esta investigación.

**Figura 22.** Comportamiento del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto purificado de epicarpio.



Fuente: Esta investigación.

A partir de las gráficas del %DPPH remanente Vs concentración de antioxidante se calculó los valores de  $FRS_{50}$  para los extractos purificados y fracciones tanto de semilla como de epicarpio (Anexo F). Los valores de  $FRS_{50}$  registrados en la tabla 12 indican que para las fracciones F3S Y F3E se obtuvieron los menores valores de  $FRS_{50}$  (86,25 kg antioxidante/ kg DPPH y 79,73 kg antioxidante/ kg DPPH) respectivamente.

Estos resultados indican que estas muestras requirieron una menor cantidad de antioxidante para reducir hasta el 50% la concentración inicial de DPPH. Se destaca que

las muestras con mayor  $FRS_{50}$  fueron las fracciones F1S y F1E, esto indica que son las muestras con menor capacidad antioxidante DPPH, lo que está en concordancia con lo encontrado por el método TEAC. En general no se encontró diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza del 95%) en la mayor parte de las muestras excepto para la fracción F1E (Tabla 22). Estos resultados se evidencian en la prueba de múltiples rangos (Anexo B) y la gráfica de comparación de medias (Anexo C).

**Tabla 22.** Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de  $FRS_{50}$ .

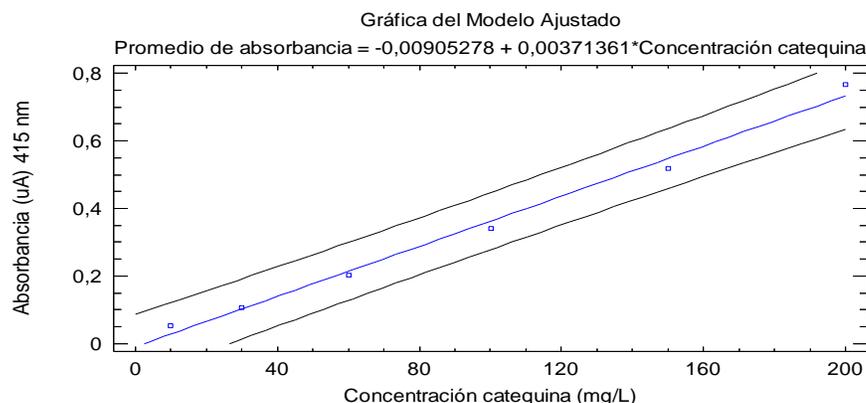
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
F3E	3	79,7328	X
EPE	3	82,5355	X
F2E	3	84,6592	X
F3S	3	86,2467	X
EPS	3	90,0667	X
F2S	3	104,251	X
F1S	3	191,018	X
F1E	3	373,474	X

Al comparar los valores de DPPH con CFT se obtuvo un coeficientes de correlación cercano a 1 para el epicarpio, en la semilla no se encontró esta tendencia (Tabla 20). Sin embargo, la comparación con los valores de FT dieron coeficientes de correlación cercanos a 1, lo cual indica una relación estadística fuerte entre las variables mencionadas ( $p < 0,05$ , nivel de confianza del 95%). Estos resultados muestran que a medida que incrementa el CFT y la cantidad de FT se obtienen valores de  $FRS_{50}$  menores (muestras que poseen mayor actividad antioxidante).

#### **4.8 FLAVONOIDES TOTALES (FT)**

En el anexo A se registran los datos para la construcción de la curva de calibración necesaria para determinar el contenido de flavonoides totales, se empleó catequina como patrón de referencia. En el proceso se encontró la correlación  $y = -0,00905278 + 0,00371361 X$  ( $r = 0,995738$ ) donde  $y$  es la absorbancia medida a 415 nm y  $X$  es la concentración de trolox en mmol /L (figura 23).

**Figura 23.** Curva de calibración para determinación del contenido de flavonoides totales



Fuente: Esta investigación

Al evaluar el contenido de flavonoides totales en los extractos crudos y fracciones de semilla y epicarpio (Tabla 12), se observa que en la semilla el EPS presenta el mayor contenido de flavonoides totales ( $595 \pm 114$  mg catequina / g extracto) y en epicarpio la fracción F2E es quien tiene el mayor contenido ( $712 \pm 115$  mg catequina / g extracto). En general se observa diferencias estadísticas en la mayoría de muestras exceptuando F3S, F3E y F2S (Tabla 23). Las diferencias estadísticas entre los pares de muestras se indican en la tabla de múltiples rangos (Anexo B) y la gráfica de comparación de medias (Anexo C).

**Tabla 23.** Discriminación entre medias mediante LSD para los valores de FT.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F1E	3	150,135	X
F1S	3	190,676	X
F3S	3	531,216	X
F2S	3	531,667	X
F3E	3	563,198	X
EPS	3	596,982	X
EPE	3	672,207	X
F2E	3	714,55	X

Estos resultados están en concordancia con lo analizado anteriormente para CFT y actividad antioxidante para la semilla, es decir se observa que EPS tiene los mayores valores de contenido fenólico y actividad antioxidante. Sin embargo al hacer el mismo análisis para el epicarpio, la fracción F2E aunque no tiene el mayor contenido fenólico total, mostró los mayores valores tanto para actividad antioxidante como para el contenido de flavonoides totales. A partir de esta observación se puede inferir en una primera instancia que compuestos fenólicos específicos de tipo flavonoide presentes en la fracción F2E de epicarpio son los responsables del alto valor de actividad antioxidante obtenido aunque el contenido fenólico haya sido bajo en comparación con el de EPE. Hay que tener en cuenta que la prueba de flavonoides totales es específica para compuestos que

poseen grupo o-hidroxilo, de manera que si en el extracto purificado están presentes flavonoides que no cumplan con este requisito no se tendrá en cuenta para la medición final de tal propiedad. Cabe resaltar que el extracto EPE contiene compuestos fenólicos de bajo peso molecular (fracción I) los cuales no aportan en gran medida con la actividad antioxidante y como resultado se obtiene un valor TEAC menor en comparación con el de F2E. Reportes en la literatura<sup>136</sup> indican que la presencia simultánea de algunos compuestos fenólicos puede generar una actividad antioxidante menor de la esperada, como el observado entre el ácido elágico y la catequina. Este hecho se origina debido a la posible existencia de hidrógenos donadores entre los grupos carbonilos del ácido elágico y los grupos o-dihidroxi de la catequina.

Al comparar los valores de FT y TEAC en epicarpio (Tabla 20) se evidenció una relación estadísticamente significativa entre estas pruebas ( $p < 0,05$ , nivel de confianza del 95%) aunque en la semilla no se haya obtenido. El coeficiente de correlación para el modelo ajustado indica una relación moderadamente fuerte entre las variables de estudio. Este resultado indica que a medida que incrementa el contenido de flavonoides totales en las muestras, la actividad antioxidante TEAC incrementa. De manera similar al comparar los valores de FT con CFT se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a uno para el epicarpio. Esta tendencia no se evidenció en la semilla.

#### **4.9 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC-ESI-MS EN SEMILLA Y EPICARPIO**

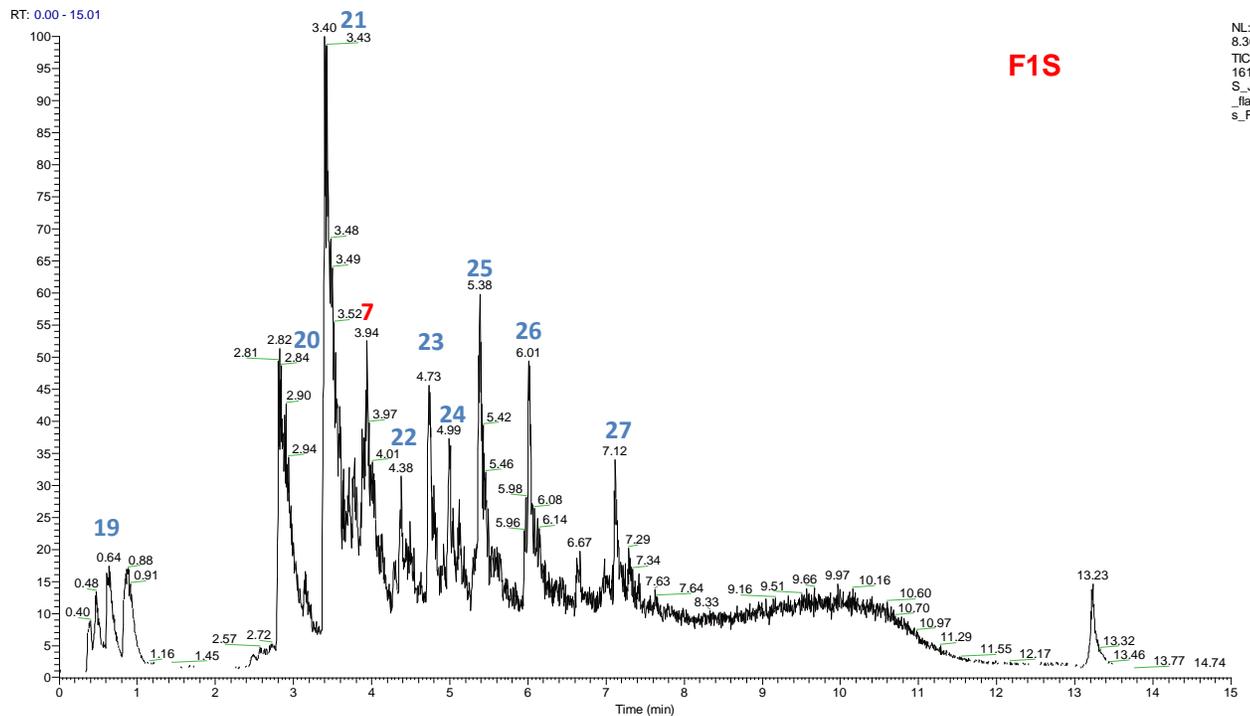
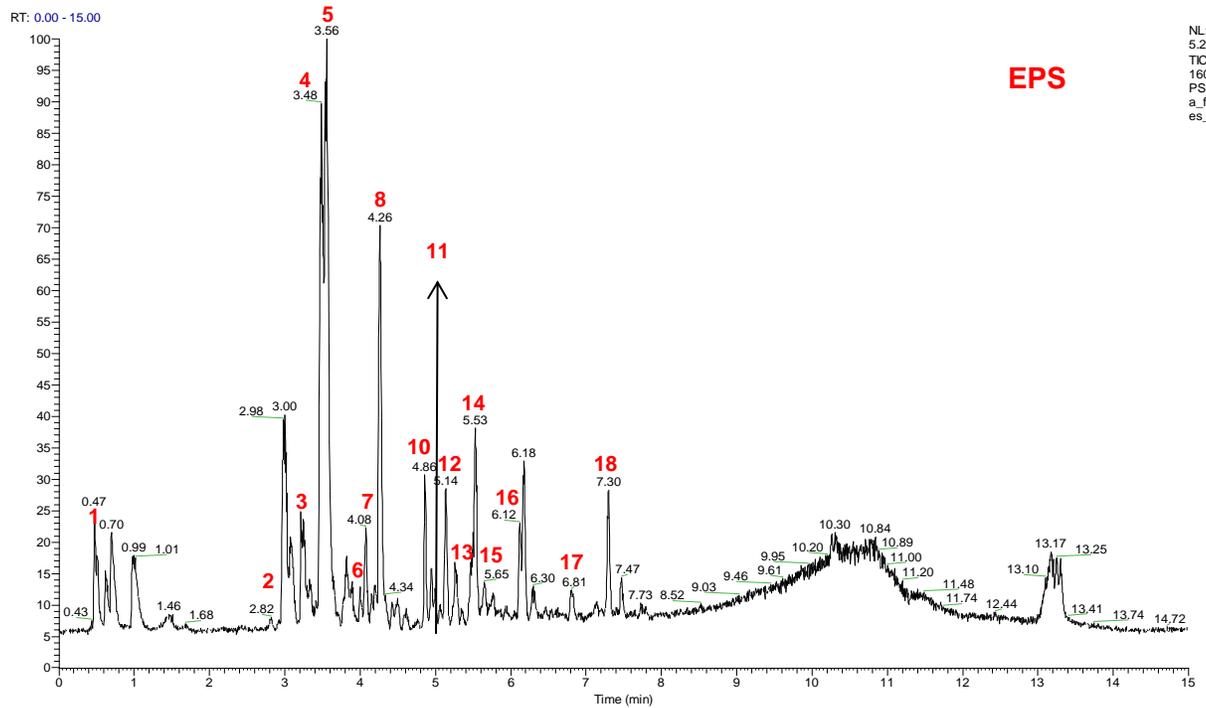
##### **4.9.1 Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS en semilla.**

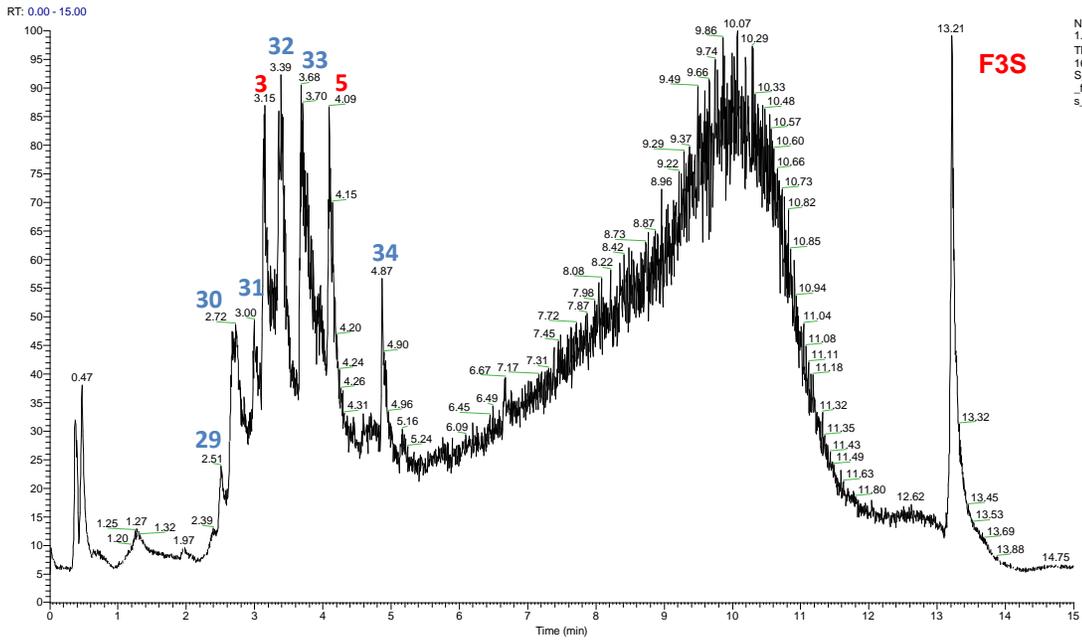
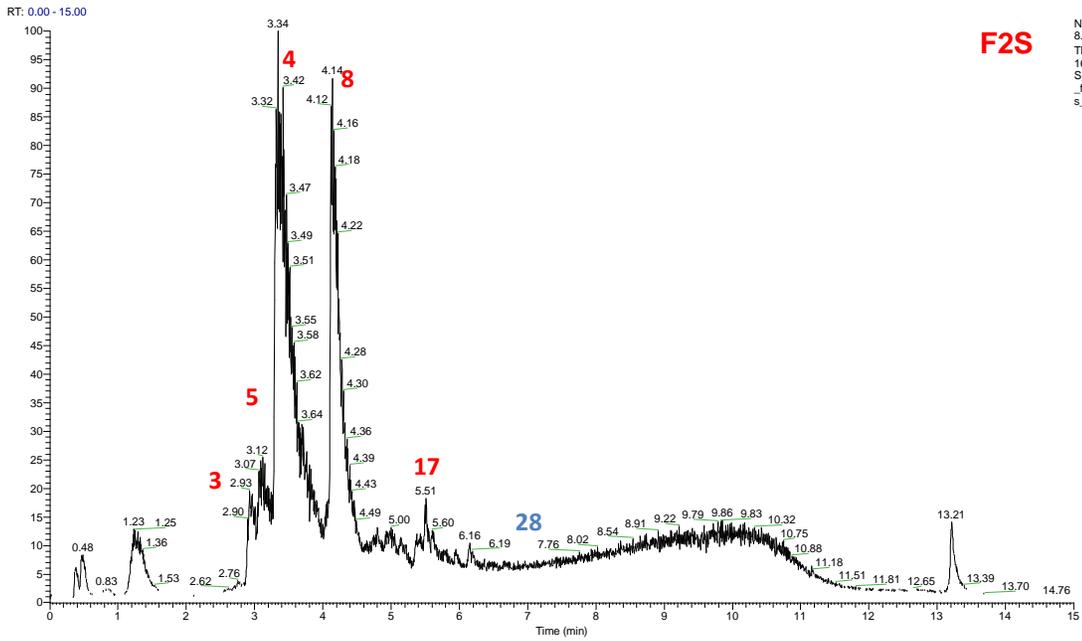
El análisis de los compuestos fenólicos se realizó por HPLC-ESI-MS en modo negativo. Mediante el uso de una mezcla de estándares de compuestos fenólicos fue posible identificar algunos compuestos del extracto purificado de semilla (EPS) y sus fracciones F1S, F2S y F3S. Cabe resaltar que la mínima diferencia de los valores  $m/z$  obtenidos para los estándares y los compuestos fenólicos identificados permitió corroborar la presencia de estos en los diferentes extractos y fracciones. En la figura 24 se presenta el cromatograma del EPS y en la tabla 24 se registran las masas y los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los diferentes compuestos.

---

<sup>136</sup> MEYER, Anne; HEINONEN, Marinay FRANKEL, Edwin. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. En: Food Chemistry, 1998.vol. 61, no.1-2,p. 71-75.

**Figura 24.** Cromatograma (HPLC-ESI-MS) del extracto purificado de semilla (EPS) y fracciones F1S, F2S y F3S aisladas de semilla.





Fuente: Esta investigación.

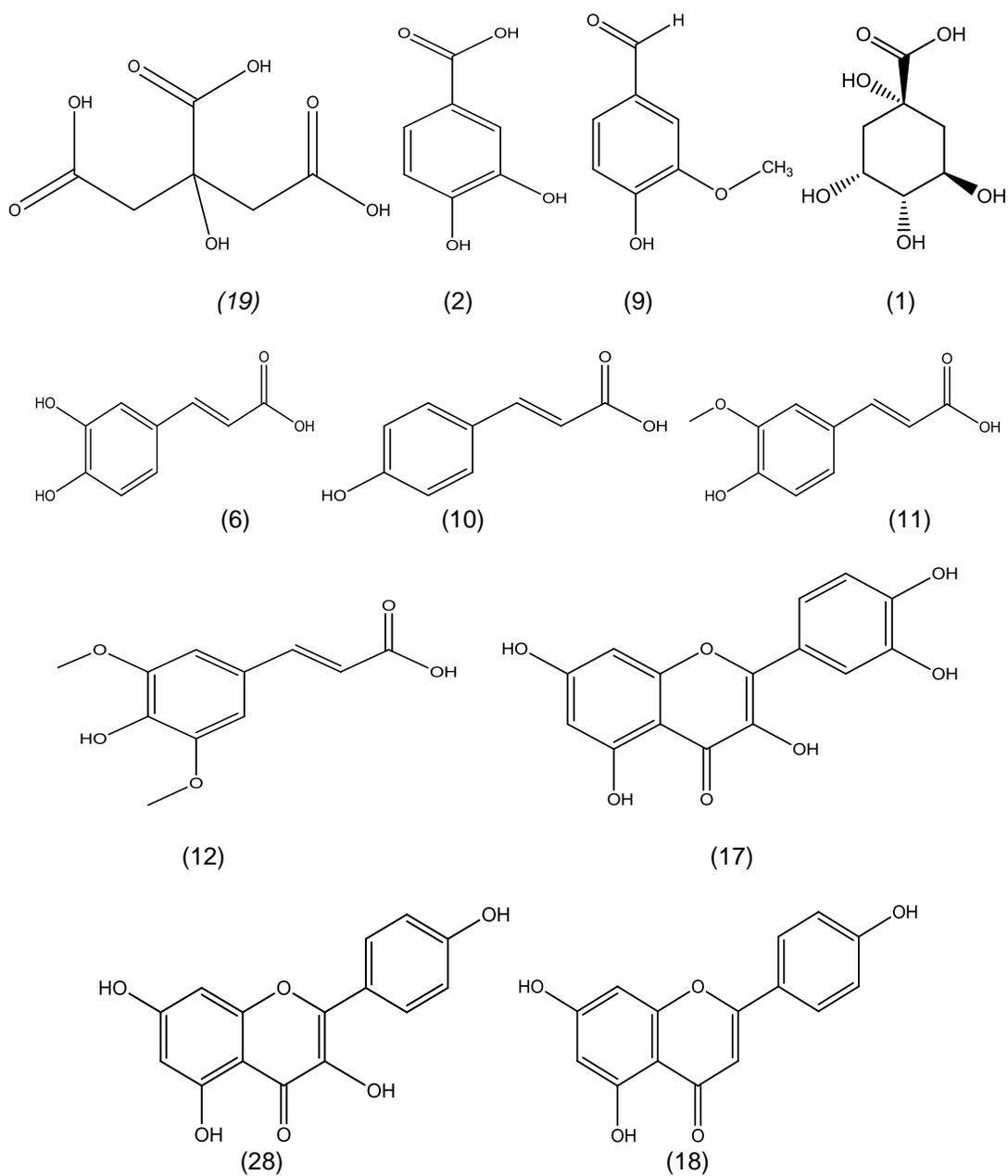
**Tabla 24.** Compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS en EPS y las fracciones F1S, F2S y F3S.

N° pico	Compuesto	t <sub>R</sub>	λ <sub>máx</sub>	Fórmula molecular	m/z medido
<b>EPS</b>					
1	Ácido quínico	0,51	—	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	191,0561
2	Ácido protocatéquico	2,15	—	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0194
3	Procianidina dimérica tipo B1	3,22	—	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,1348
4	Catequina	3,48	—	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0717
5	Procianidina dimérica tipo B2	3,82	—	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,1351
6	Ácido cafeico	3,96	—	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179,0349
7	Ácido clorogénico (Ácido 5-O-cafeoilquínico)	4,00	—	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0878
8	Epicatequina	4,26	—	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0718
9	Vainillina	4,27	—	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151,0396
10	Ácido p-cumárico	4,74	—	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,0402
11	Ácido ferulico1 mayor	5,07	—	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0506
12	Ácido sinápico	5,15	—	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223,0611
13	Ácido ferulico2 minor	5,43	—	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0506
14	Rutina	5,55	—	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,146
15	Quercetina-3-O-Glucósido	5,59	—	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,0886
16	Phloridzin	5,95	—	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,1296
17	Quercetina	6,60	—	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,0354
18	Apigenina	7,25	—	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269,0456
<b>F1S</b>					
19	Ácido cítrico	0,67	—	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191,01984
20	Ácido 3-O-cafeoilquínico	2,85	322,1	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,08795
7	Ácido 5-O-cafeoilquínico	3,94	324,5	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,08781
21	Ácido 3-O-p-coumaroilquínico	3,43	311,3	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	337,09289

22	Ácido 4-O- p-coumaroilquínico	4,36	311,3	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	337,09289
23	Penstemide	4,73	–	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	443,15591
24	No identificado	4,99	–	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	415,16116
25	Ácido (1`S, 6`R) -8`-hidroxiabscisico- β-D-glucosido.	5,38	263,5	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	441,17662
26	No identificado	6,01	–	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	427,16104
27	No identificado	7,12	–	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>12</sub>	493,22934
<b>F2S</b>					
3	Procianidina dimérica tipo B1	2,95	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13515
5	Procianidina dimérica tipo B2	3,12	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13515
4	Catequina	3,39	–	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07184
8	Epicatequina	4,16	–	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07187
16	Phloridzin	5,51	–	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,1296
28	Kaempferol	7,1	–	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,04031
<b>F3S</b>					
29	Procianidina dimérica tipo A	2,51	–	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	575,11993
30	No identificado	2,72	–	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	576,12750
31	Procianidina trimérica tipo B	3,0	–	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	865,19958
3	Procianidina dimérica tipo B1	3,15	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13544
32	Procianidina trimérica tipo B	3,39	–	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	865,20020
33	Procianidina trimérica tipo A	3,71	–	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	863,18439
5	Procianidina dimérica tipo B2	4,10	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13531
34	Procianidina dimérica tipo B	4,88	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13568

En la figura 25 se muestran algunas de las estructuras de los compuestos identificados.

**Figura 25.** Algunas estructuras químicas identificadas en la semilla.



Fuente: Adaptado de Haminiuk, *et al.* (2012)

#### 4.9.1.1 Identificación de los compuestos fenólicos en F1S

La mayoría de los compuestos fenólicos en F1S coinciden con los identificados en el extracto purificado de la semilla (EPS), sin embargo en F1S no se identificó phloridzin, apigenina y rutina. Un compuesto adicional identificado en F1S fue ácido cítrico. En la figura 24 se muestra el cromatograma de la fracción F1S en modo negativo.

Mediante el análisis de los patrones de fragmentación del espectro de masas se caracterizaron parcialmente diferentes compuestos fenólicos de la semilla de aguacate. En la semilla se identificaron dos isómeros del ácido cafeoil-quínico ( $C_{16}H_{18}O_9$ ) (pico 20), éste mostró un  $t_R$  de 2,85 min,  $\lambda_{m\acute{a}x}$  324,5 nm absorción característica del ácido clorogénico<sup>137</sup> (Figura 26), un ión pseudomolecular en  $m/z$  353u  $[M-H]^-$  y un ión fragmento en  $m/z$  191u  $[M-H-162]^-$  debido al ácido quínico<sup>138</sup>. La identificación de este compuesto también se confirmó por comparación con una mezcla comercial de estándares.

Los espectros de masas de los picos 20 y 7 (Figura 27) tienen en común el pico base en  $m/z$  191 característico de la unión en 3-OH ó 5-OH<sup>139</sup>. Para el espectro del pico 20 (Figura 28) se observa un fragmento en  $m/z$  179 [ácido cafeico-H]<sup>-</sup> que es más significativo para compuestos 3-OH<sup>140</sup>, también se observa un fragmento en  $m/z$  135  $[M-H-CO_2]^-$  debido a la descarboxilación del ácido cafeico<sup>141</sup>, la cual es típica para ácidos hidroxicinámicos<sup>142</sup>, así este compuesto se identificó como 3-O-cafeoilquínico. El pico 7 con  $t_R$  3,94 min y  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de 322,1nm (Figura 26) fue identificado mediante el uso de estándares como 5-O-cafeoilquínico sumado a que el patrón de fragmentación del 4-cafeoilquínico muestra un pico base MS/MS a  $m/z$  173<sup>143</sup>. Estos derivados clorogénicos ya han sido identificados en epicarpio (variedad Hass y Shepard)<sup>144</sup> y pulpa de aguacate (*Persea americana* variedad Rugoro<sup>145</sup>), en la figura 29 se presentan las estructuras de los compuestos identificados.

---

<sup>137</sup> KOLNIAK-OSTEK, Joanna y OSZMIANŃSKI, Jaa. Characterization of phenolic compounds in different anatomical pear (*Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS). En: International Journal of Mass Spectrometry, 2015. vol.392, p.154 –163

<sup>138</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p.4617.

<sup>139</sup> SU, Dan, *et al.* Comparative pharmacokinetics and tissue distribution study of mono-, and di-caffeoylquinic acids isomers of *Ainsliaea fragrans* Champ by a fast UHPLC- MS/MS method. En: Fitoterapia, 2014. vol. 99, no, p. 139-152.

<sup>140</sup> GOUVEIA, Sandra y CASTILHO, Paula. Validation of a HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia. En: Food Research International, 2012. vol.45, no.1, p.362-368.

<sup>141</sup> PAPETTI, *et al.* Op. Cit., p. 1065

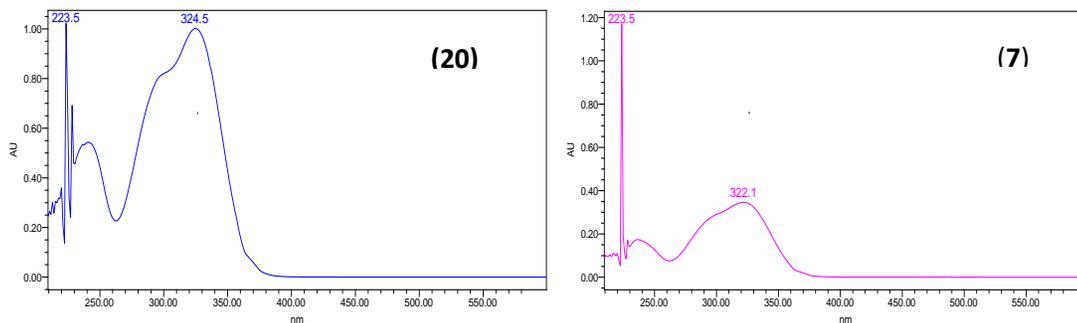
<sup>142</sup> MARTÍNEZ-LAS, Ruth, *et al.* Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). En: Journal of Functional Foods, 2016. vol. 23, p. 370–377

<sup>143</sup> CLIFFORD, MICHAEL N. *et al.* Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> Identification of Chlorogenic Acids. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol.51, p.2900-2911

<sup>144</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p.508

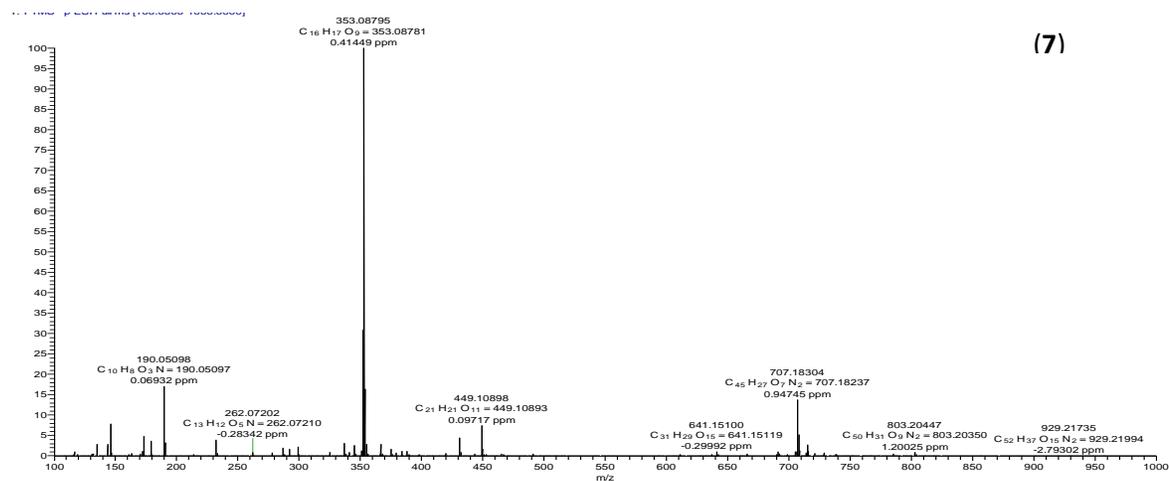
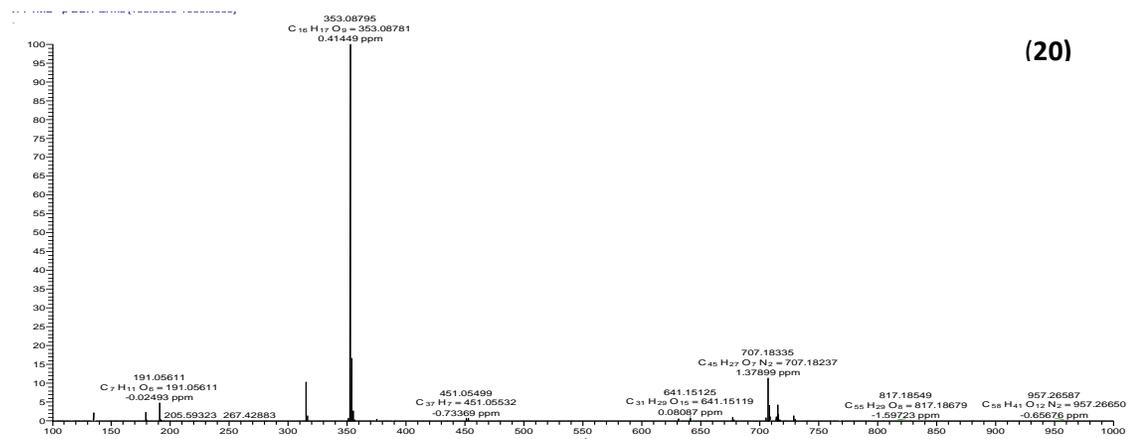
<sup>145</sup> CARRASCO-PANCORBO, HURTADO-FERNÁNDEZ y FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Op. cit., p.2264.

**Figura 26.** Espectros UV-Vis a 280 nm de los compuestos 20 y 7.



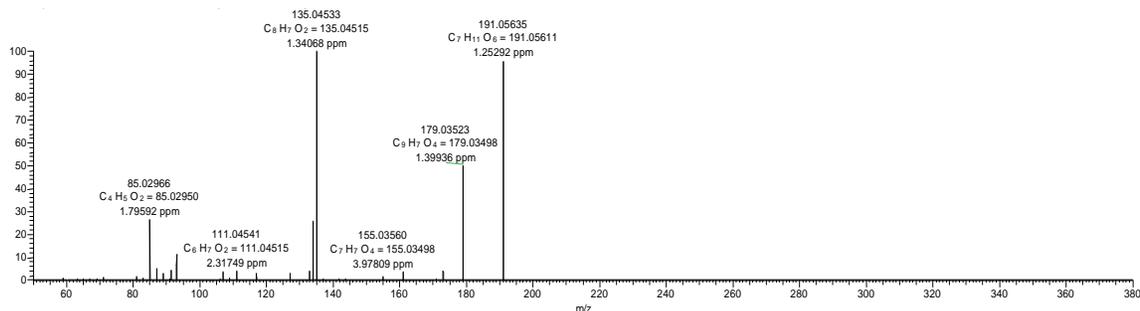
Fuente: Esta investigación.

**Figura 27.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 20 y 7.



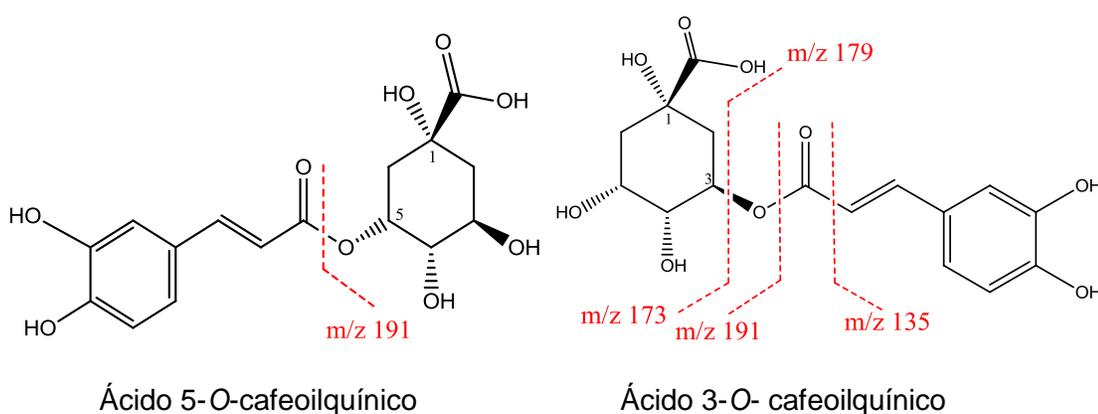
Fuente: Está investigación.

**Figura 28.** Espectro MS/MS del compuesto 20.



Fuente: Está investigación.

**Figura 29.** Estructuras químicas de los compuestos 7 y 20.



Fuente: SASSAKI, *et al.* (2011)

Los picos **21** y **22** con tiempos de retención 3,43 y 4,36 min respectivamente se identificaron como ácido 3-O-*p*-cumaroilquínico<sup>146</sup> y 4-O-*p*-cumaroilquínico, el espectro de masas de ambos compuestos muestran un ión pseudomolecular en  $m/z$  337 [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>). Para **21** se encontró una  $\lambda_{\text{máx}}$  311,3 nm (Figura 30) y un ión fragmento en  $m/z$  163 [ácido cumárico-H]<sup>-</sup><sup>147</sup> (Figura 31). En el pico **22** se observó una  $\lambda_{\text{máx}}$  311,3nm (Figura 30), sin embargo la discriminación entre los dos isómeros se basó en el patrón de fragmentación de **22**, el espectro MS/MS muestra un ión fragmento [ácido quínico-H-H<sub>2</sub>O] en  $m/z$  173 (Figura 32) que es característico del ácido 4-O-*p*-coumaroilquínico<sup>148</sup>. Las estructuras de los compuestos **21** y **22** se muestran en la figura 33. El isómero **21** ya ha

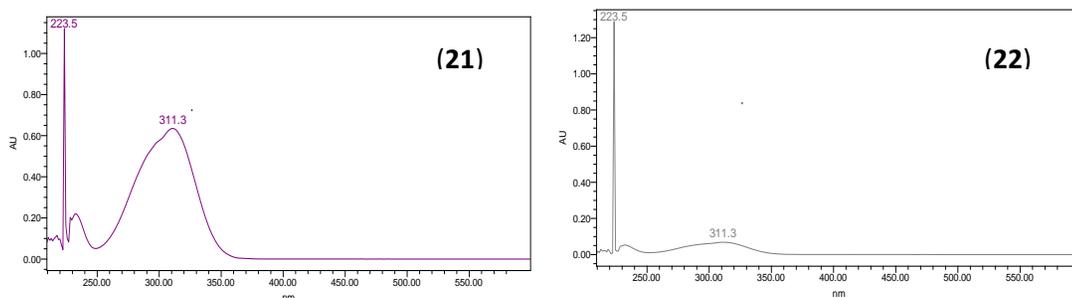
<sup>146</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p. 508

<sup>147</sup> QIAO, Yan-jiang, *et al.* A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in Flos Lonicerae Japonicae. *En: Talanta*, 2016, vol. 147, p.16-27.

<sup>148</sup> *Ibid.*, p. 24.

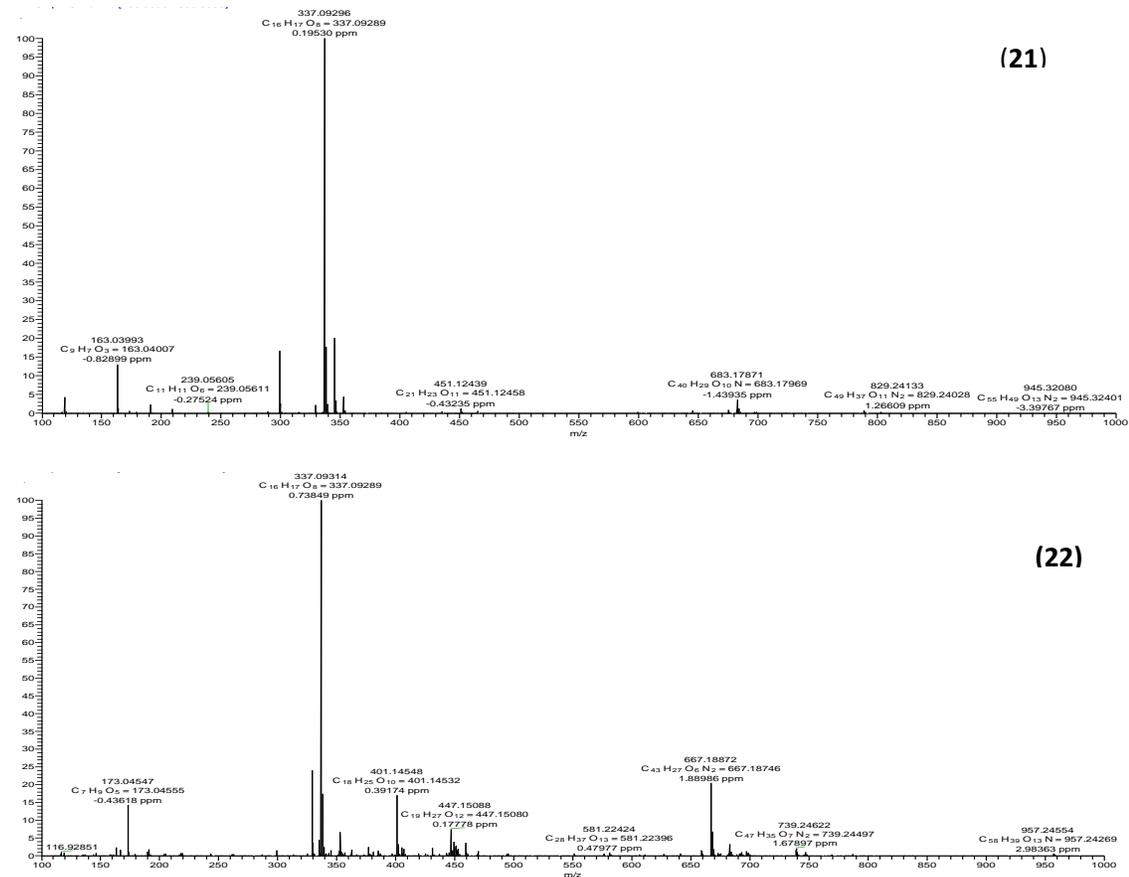
sido identificado en semilla de aguacate *Persea americana* Mill<sup>149</sup> variedades Hass y Shepad<sup>150</sup>.

**Figura 30.** Espectro UV-Vis de los compuestos 21 y 22.



Fuente: Está investigación.

**Figura 31.** Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 21 y 22.

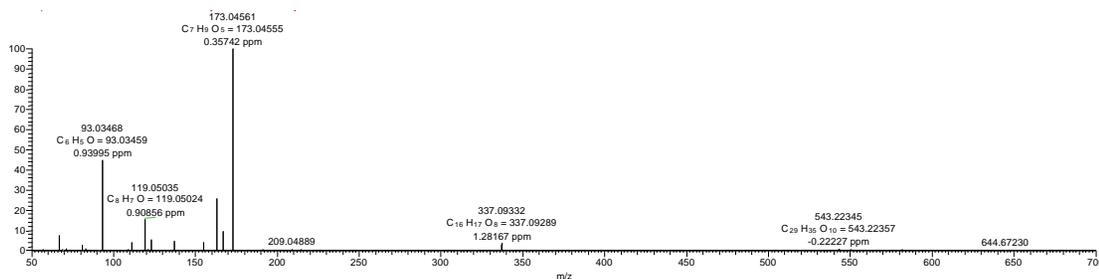


Fuente: Está investigación.

<sup>149</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op. cit., p. 508.

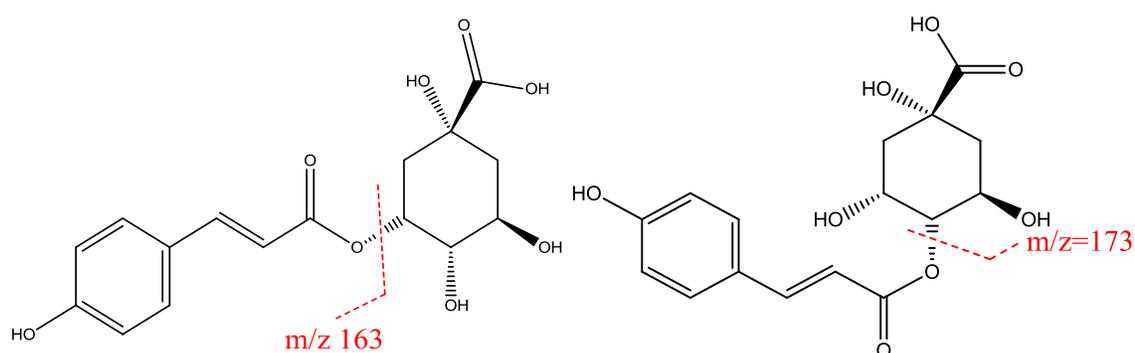
<sup>150</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4617.

Figura 32. Espectro MS/MS del compuesto 22.



Fuente: Está investigación

Figura 33. Estructuras químicas de los compuestos 21 y 22.



Ácido 3-O-p-coumaroilquínico

Ácido 4-O-p-coumaroilquínico

Fuente: SASSAKI, *et al.* (2011)

En la semilla también se identificó penstemide (pico **23**) en un tiempo de retención de 4,73 min. Este compuesto mostró un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  en  $m/z$  443u (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>) (Figura 34.). Cabe resaltar que la estructura propuesta para penstemide se basa en la reportada por varios autores<sup>151,152,153</sup>. En el espectro MS/MS (Figura 35) se observa los fragmentos en  $m/z$  101 y 113 característicos para este compuesto<sup>154,155,156</sup>. Penstemide ha sido identificado previamente en pulpa y epicarpio de aguacate *Persea americana* Mill<sup>157</sup>.

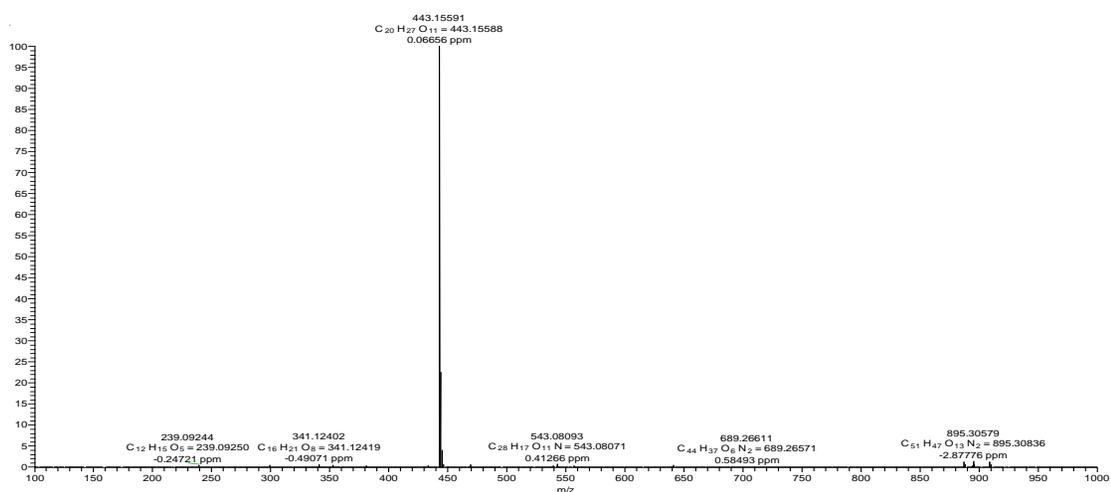
<sup>151</sup>BAZYLAK, Grzegorz, ROSIAK, Andrzej y SHI, Cheng-Yang. Systematic analysis of glucoiridoids from *Penstemon serrulatus* Menz. by high-performance liquid chromatography with pre-column solid-phase extraction. *En: Journal of Chromatography A*, 1996. vol.725, p. 177-187.

<sup>152</sup> ISOE, Sachihiko. Progress in the Synthesis of Iridoids and Related Natural Products. *En: RAHMAN Atta-ur (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry*. Oxford: Elseiver Inc.,1995.p. 289-320

<sup>153</sup> SUN, Yong, et al. Rapid characterization of chemical constituents in Radix Tetrastigma, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant/antiproliferative activities. *En: Journal of Functional Foods*, 2015.vol. 18, p. 300-318

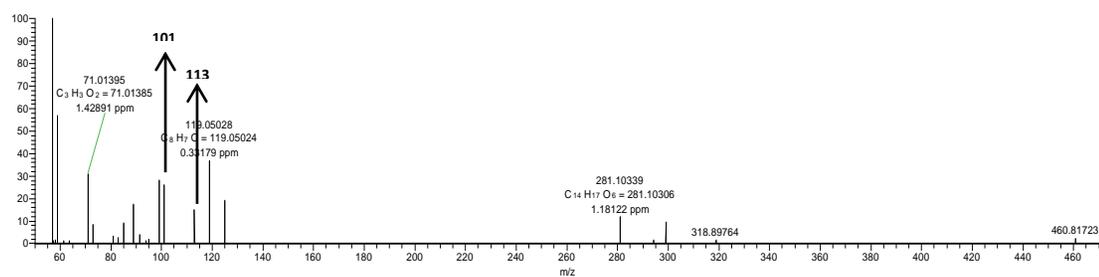
<sup>154</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p.508

**Figura 34.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 23



Fuente: Esta investigación.

**Figura 35.** Espectro MS/MS para el compuesto 23.



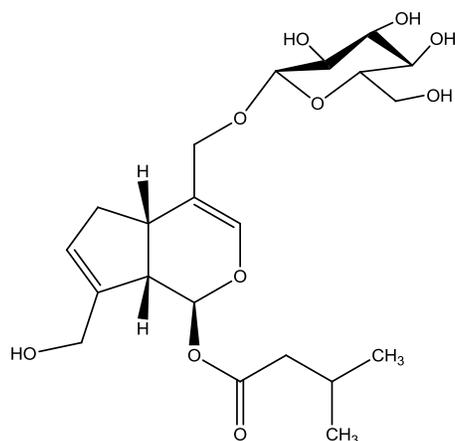
Fuente: Esta investigación.

<sup>155</sup> RODRIGUEZ-PEREZ,C.,*et al.* A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *En: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2013.vol. 77,no ,p.167 .174.

<sup>156</sup> DOMINGUEZ, Mariana,*et al.* Cespedes, Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. *En: Pharmaceutycal Biology*, 2011.vol.49,no.2, p.118-124.

<sup>157</sup> GÓMEZ-CARAVACA , *et al.* Op cit., p.508

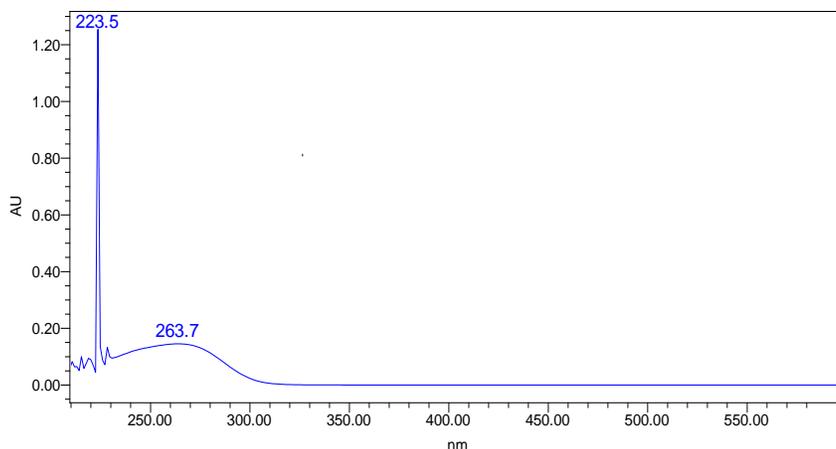
**Figura 36.** Estructura química del compuesto 23.



Fuente: BAZYLAK, ROSIAK y SHI. (1996)

El pico **25** con tr de 5,38 min se identificó parcialmente como el ácido (1`S, 6`R) -8`-hidroxiabscisico- β-D- glucósido por presentar un ión pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  441u y  $\lambda_{m\acute{a}x}$  263 nm (Figura 37), con fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub> (Figura 40). La estructura propuesta para este compuesto se basa en lo reportado por la literatura<sup>158,159</sup>. En el espectro de masas (Figura 39) se observa un fragmento en  $m/z$  330 [M-H]<sup>-</sup> reportado para este compuesto e identificado previamente en semilla de aguacate *Persea americana* Mill<sup>160</sup>.

**Figura 37.** Espectro UV-Vis del compuesto 25



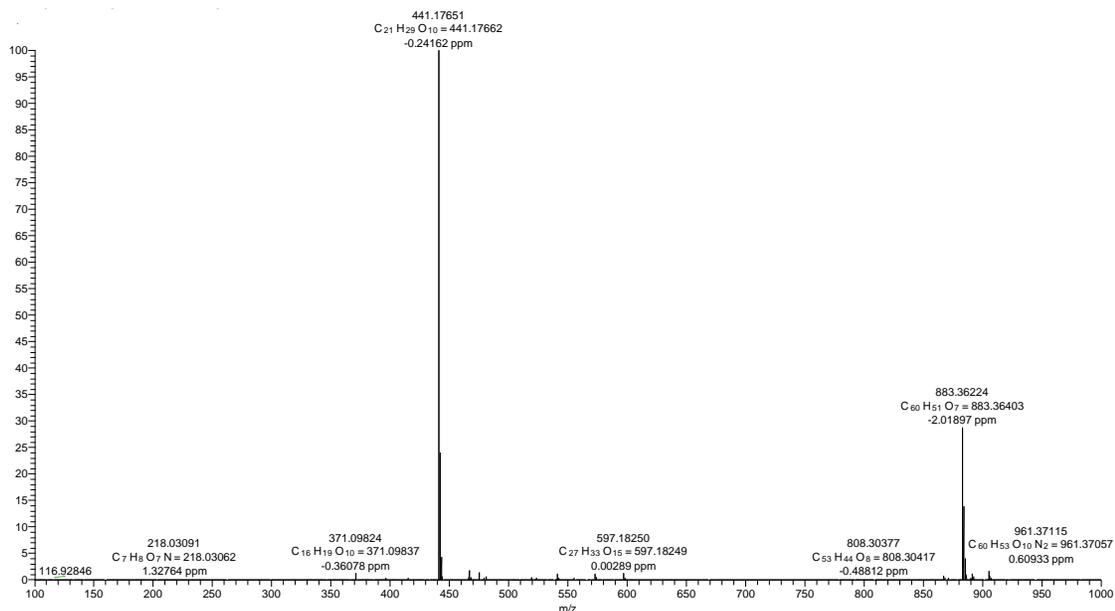
Fuente: Esta investigación.

<sup>158</sup> TODOROKI, Yasushi; HIRAI, Nobuhiro y OHIGASHI, Hajime. Synthesis, biological activity and metabolism of (S)-(+)-3'-Fluoroabscisic acid. *En: Tetrahedron*, 1995. vol.51, no. 51, p. 6911-6926.

<sup>159</sup> PIOTROWSKA, Alicja y BAJGUZ, Andrzej. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *En: Phytochemistry*, 2011. vol.72, p. 2097–2112.

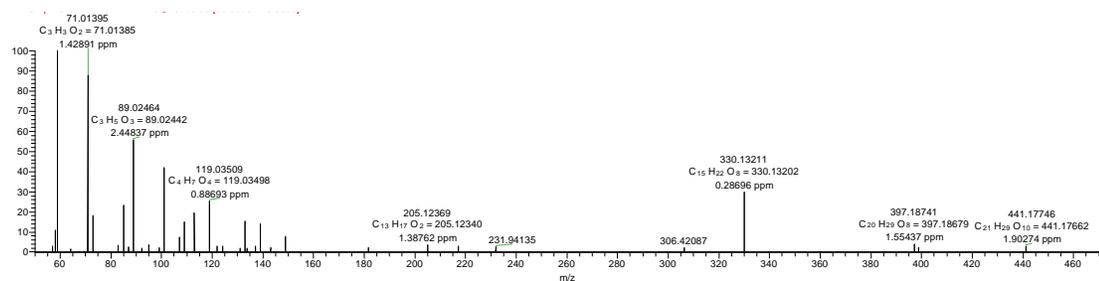
<sup>160</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op. Cit., p. 508.

**Figura 38.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 25.



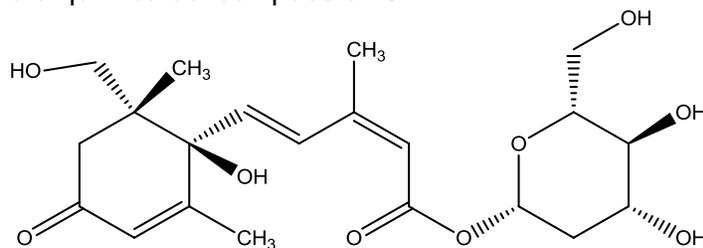
Fuente: Esta investigación.

**Figura 39.** Espectro MS/MS para el compuesto 25.



Fuente: Esta investigación.

**Figura 40.** Estructura química del compuesto 25



Fuente: SUN, *et al.* (2016)

#### 4.9.1.2 Identificación de los compuestos fenólicos en F2S

Mediante la utilización de una mezcla de estándares, en esta fracción igualmente se identificaron la mayoría de los componentes ya mencionados para el extracto EPS, exceptuando ácido sinápico y apigenina (Tabla 24). Un componente adicional identificado en esta fracción fue kaempferol. En la figura 24 se muestra el cromatograma de la fracción F2S en modo negativo.

Los compuestos detectados e identificados (3,5,4,8,16) por HPLC-ESI-MS se muestran en la tabla 24. La identidad de los picos 3 y 5 (prociandinas diméricas) con tiempos de retención de 2,95 y 3,12 min con iones pseudomoleculares a  $m/z$  577u [M-H]<sup>-</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub> (Figura 41) se confirmó mediante el uso de estándares y la presencia de los fragmentos característicos a  $m/z$  407, 289 y 245u (Figura 42). El fragmento  $m/z$  407 es el producto de un fraccionamiento tipo retro- Diels Alder (RDA) en el anillo C de la unidad superior, con la pérdida consecutiva de una molécula de agua<sup>161</sup>. El ión en  $m/z$  289 (epicatequina<sup>162</sup>) se puede atribuir a una escisión de la metil-quinona (MQ) en el enlace interflavano<sup>163</sup> con posterior pérdida de CO<sub>2</sub><sup>164</sup> que generan el fragmento en  $m/z$  245. Este análisis permite identificar a estos compuestos como prociandinas diméricas tipo B1 (pico 3) y B2 (pico 5) (Figura 43).

Este tipo de compuestos ya ha sido identificado en epicarpio de aguacate *Persea americana* variedad Hass<sup>165</sup>. Adicionalmente, las prociandinas (dímeros y oligómeros) también se han encontrado en semilla y/o epicarpio de aguacate de la variedad Hass, Fuerte, Slimcado, Simmonds, Loretta, Choquette, Booth 7, Booth 8, Tonnage<sup>166,167,168</sup>.

---

<sup>161</sup> GANGOPADHYAY, Nirupama, *et al.* Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. *En: Food Chemistry*, 2016. vol. 210, p.212–220.

<sup>162</sup> KOLNIAK-OSTEKY y OSZMIAŃSKI. *Op. cit.*, p.159

<sup>163</sup> *Ibid.*, p.162

<sup>164</sup> VERARDO, V., *et al.* Development of a CE-ESI-microTOF-MS method for a rapid identification of phenolic compounds in buckwheat. *En: Electrophoresis*, 2011. vol. 32, no.6-7, p. 669-673.

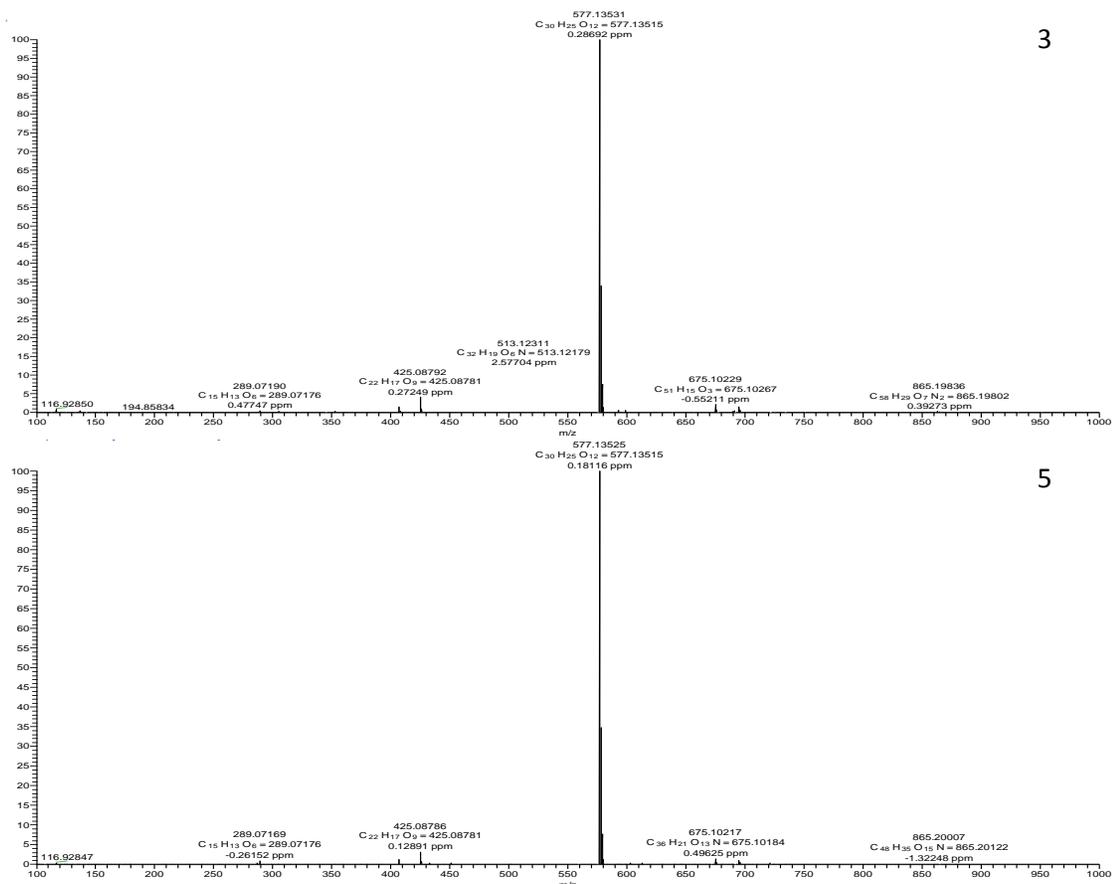
<sup>165</sup> KOSIŃSKA, *et al.* *Op. cit.*, p. 4617-4617 .

<sup>166</sup> ESTÉVES, *et al.* *Op. Cit.*, p. 5628-5630

<sup>167</sup> GÓMEZ-CARAVACA , *et al.* *Op cit.*, p. 510-511

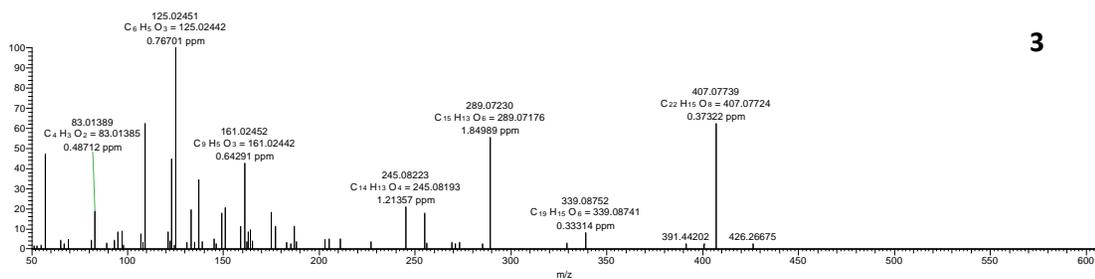
<sup>168</sup> GU, BOSTIC y WANG. *Op. Cit.*, p.1195

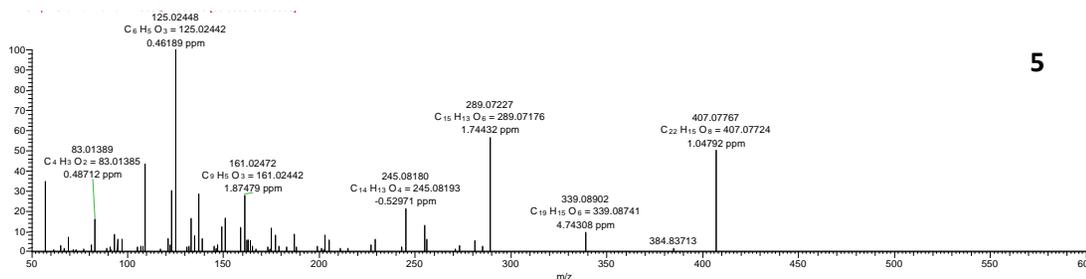
**Figura 41.** Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 3 y 5.



Fuente: Está investigación.

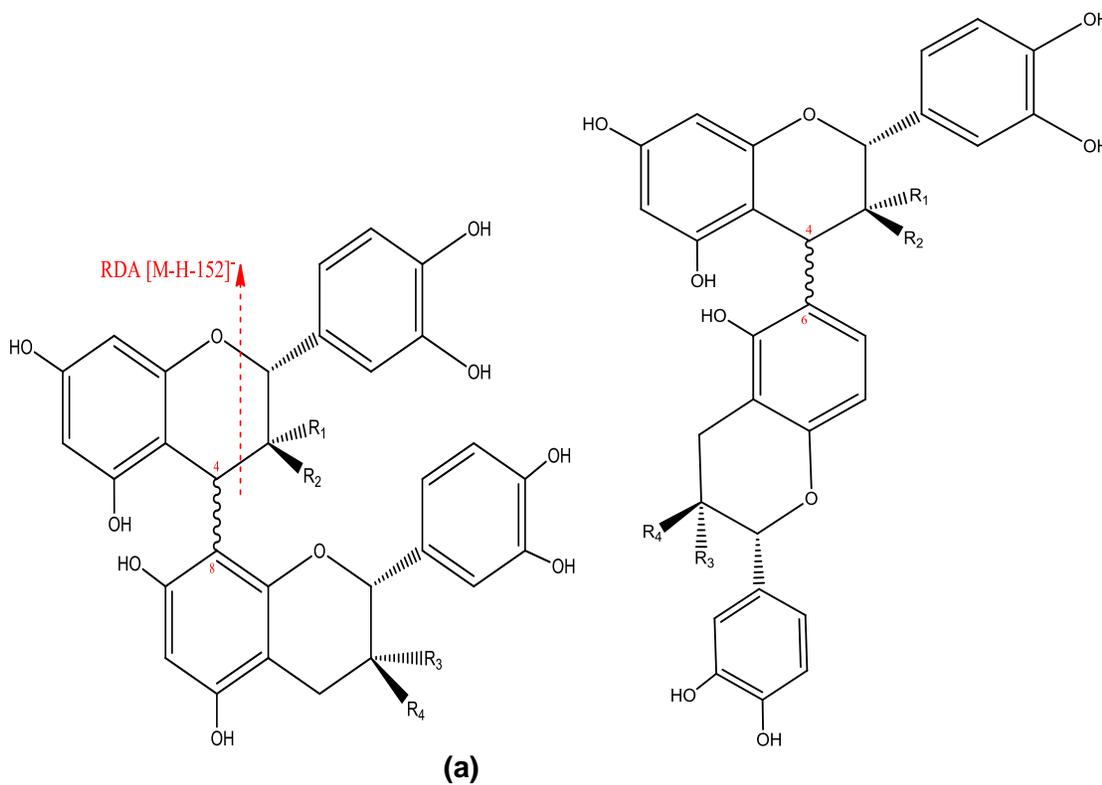
**Figura 42.** Espectro MS/MS para los compuestos 3 y 5.





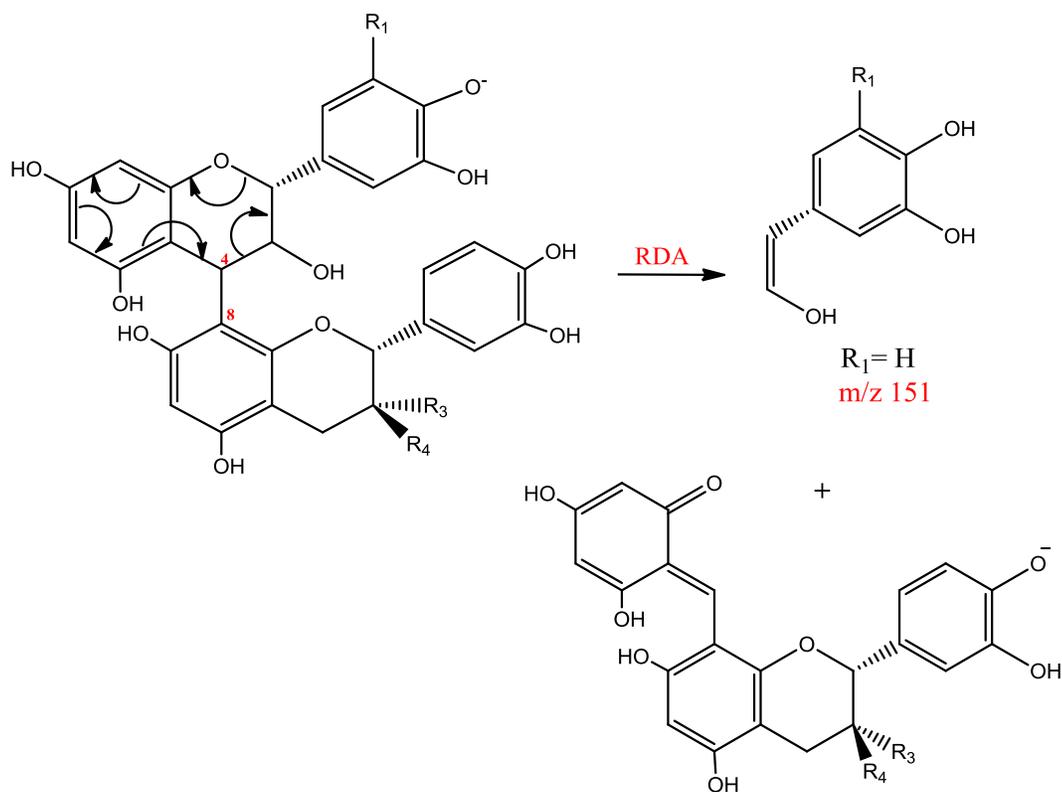
Fuente: Está investigación.

**Figura 43. a.** Estructura química para procianidinas diméricas tipo B y **b.** Posible mecanismo para la reacción tipo retro Diels-Alder



**PC B1:** R1=OH, R2=H, R3=H, R4=OH  
**PC B2:** R1=OH, R2=H, R3=OH, R4=H  
**PC B3:** R1=H, R2=OH, R3=H, R4=OH  
**PC B4:** R1=H, R2=OH, R3=OH, R4=H

**PC B5:** R1=OH, R2=H, R3=OH, R4=H  
**PC B6:** R1=H, R2=OH, R3=H, R4=OH  
**PC B7:** R1=OH, R2=H, R3=H, R4=OH  
**PC B8:** R1=H, R2=OH, R3=OH, R4=H



Fuente: DE FREITAS, *et al.* (1998)

Los picos **4 y 8** con tiempos de retención 3,39 y 4,16 min respectivamente se identificaron como catequina y epicatequina por el ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  289,  $C_{15}H_{14}O_6$  (figura 44). Esto se confirmó mediante el uso de estándares. El ión fragmento  $m/z$  245  $[M-H-44]^-$  en ambos espectros indica una descarboxilación de la molécula<sup>169</sup>. La presencia de este fragmento característico<sup>170</sup> debido a la ruptura del enlace interflavano ya ha sido publicada para esta molécula<sup>171</sup>. Estos isómeros ya se han encontrado en pulpa de aguacate *Persea americana* Mill de las variedades Hass<sup>172</sup>, Lamb Hass y Rugoro<sup>173</sup>. La estructura química de los compuestos 4 y 8 se muestran en la figura 45.

<sup>169</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p. 510

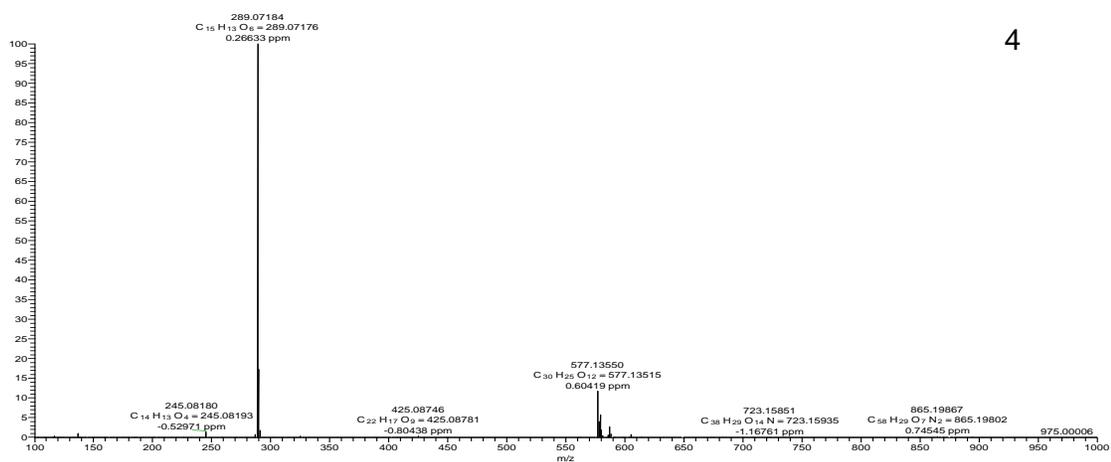
<sup>170</sup> SANDHU, AK y GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As determined by HPLC-DAD-ESI-MS(n). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010.vol.58.no.8,p.4681-4692 .

<sup>171</sup> CALLEMIEN, D. y COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. En: Journal of the American Society of Brewing Chemists,2008. vol. 66, p.109–115.

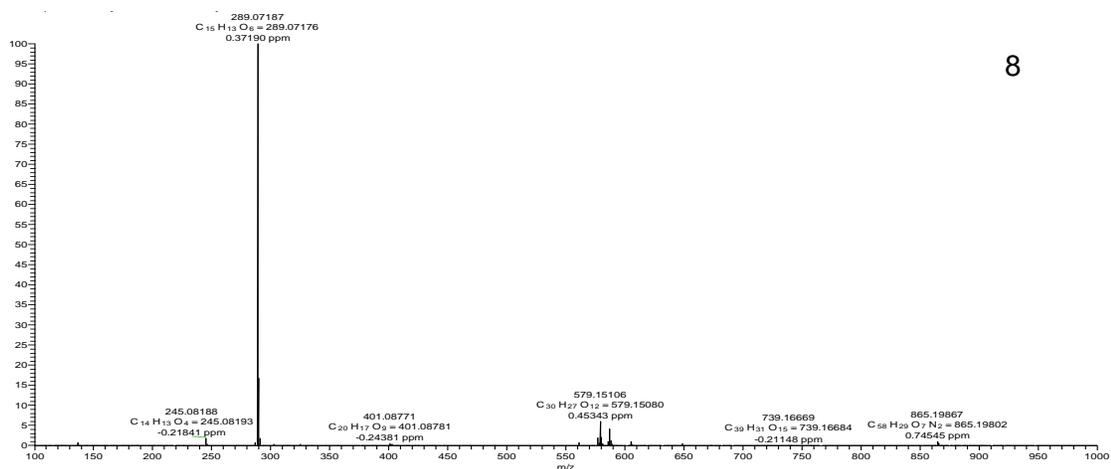
<sup>172</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit.,p.4616.

<sup>173</sup> CARRASCO-PANCORBO, HURTADO-FERNÁNDEZ y FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, *et al.* Op. cit., p.2263.

Figura 44. Espectro de masas HPLC-ESI-MS para los compuestos 4 y 8.



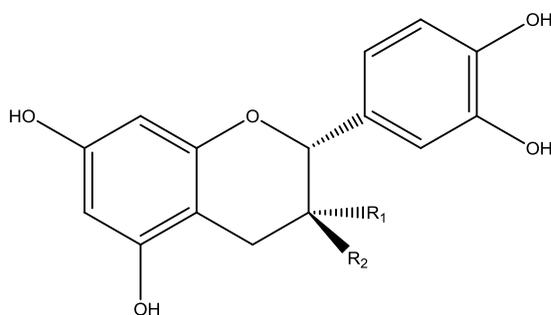
4



8

Fuente: Está investigación.

**Figura 45.** Estructura química de los compuestos 4 y 8.



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

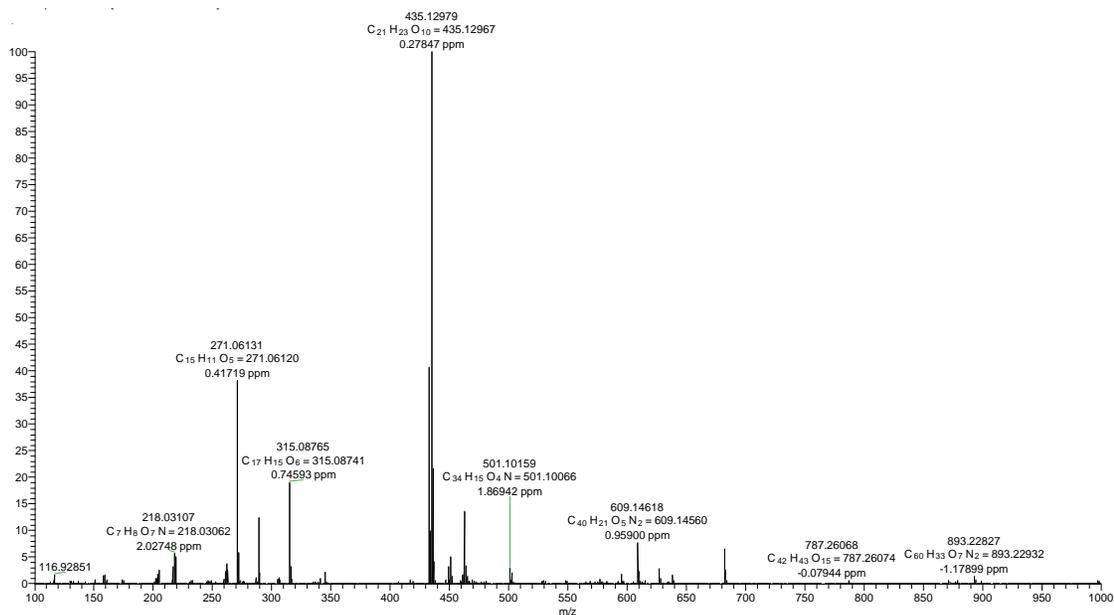
Fuente: HAMINIUK, *et al.* (2012)

Mediante el uso de estándares se identificó el pico 16 con tiempo de retención 5,51 min como phloridzina al mostrar el ión pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> con *m/z* 435 (Figura 46) y con fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>. La estructura propuesta se basa en lo reportado por la literatura<sup>174,175</sup>. Este compuesto no se ha reportado en investigaciones recientes sobre compuestos fenólicos en sub-productos de aguacate.

<sup>174</sup> GOSCH, Christian *et al.* Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.) En: Plant Science, 2009.vol.176, p. 223–231.

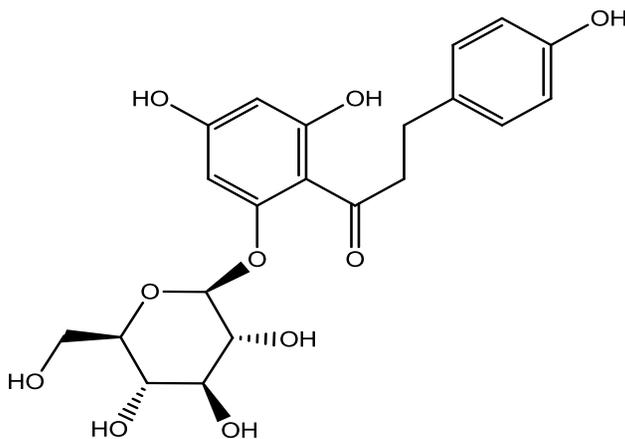
<sup>175</sup> LE GUERNEVE', Christine, *et al.* New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. En: Tetrahedron Letters, 2004.vol.45,p.6673–6677.

**Figura 46.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 17.



Fuente: Está investigación.

**Figura 47.** Estructura química del compuesto 16.



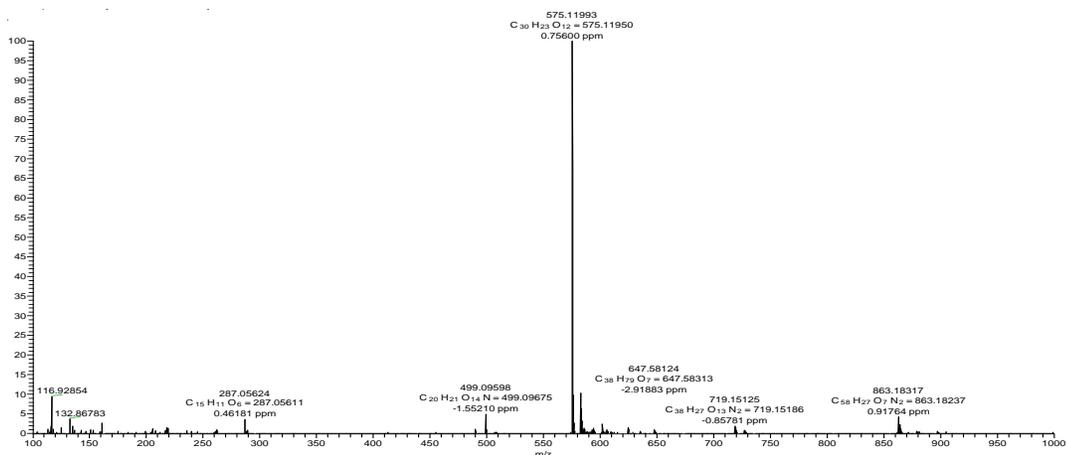
Fuente: GOSCH, HALBWIRTH y STICH (2010)

#### 4.9.1.3 Identificación de los compuestos fenólicos en F3S.

De igual forma utilizando estándares se identificaron en la fracción tres aislada de la semilla (F3S), compuestos presentes en el extracto purificado de la semilla (EPS) (tabla 24). Sin embargo en esta fracción no fue posible identificar compuestos como: ácido ferúlico I, ácido ferúlico II, ácido sinápico, apigenina y phloridzina. En la figura 24 se muestra el cromatograma HPLC-ESI-MS de la fracción F3S en modo negativo.

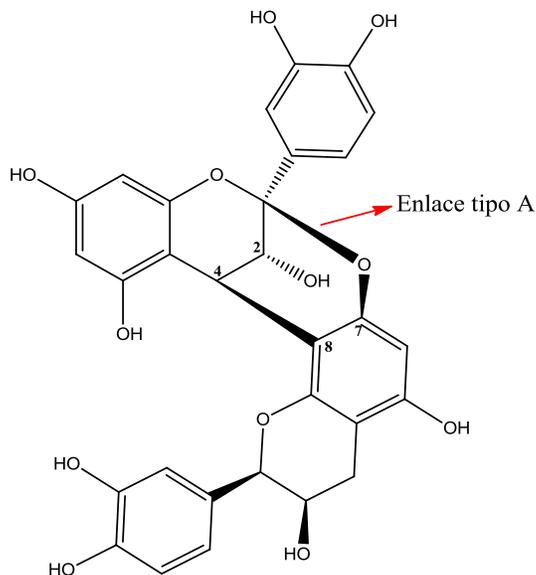
Mediante el estudio de los fragmentos se identificaron parcialmente los compuestos 28-34. El pico **29** ( $t_r=2,51$  min) presentó un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  575  $C_{30}H_{24}O_{12}$  (Figura 48), que corresponde a una procianidina dimérica tipo A<sup>176</sup>(Figura 49). Este compuesto se ha encontrado en epicarpio de aguacate variedad Hass<sup>177</sup> y también en semilla y epicarpio de aguacate *Persea americana* Mill<sup>178</sup>.

**Figura 48.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 29.



Fuente: Está investigación.

**Figura 49.** Estructura para procianidina dimérica tipo A.



<sup>176</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4615.

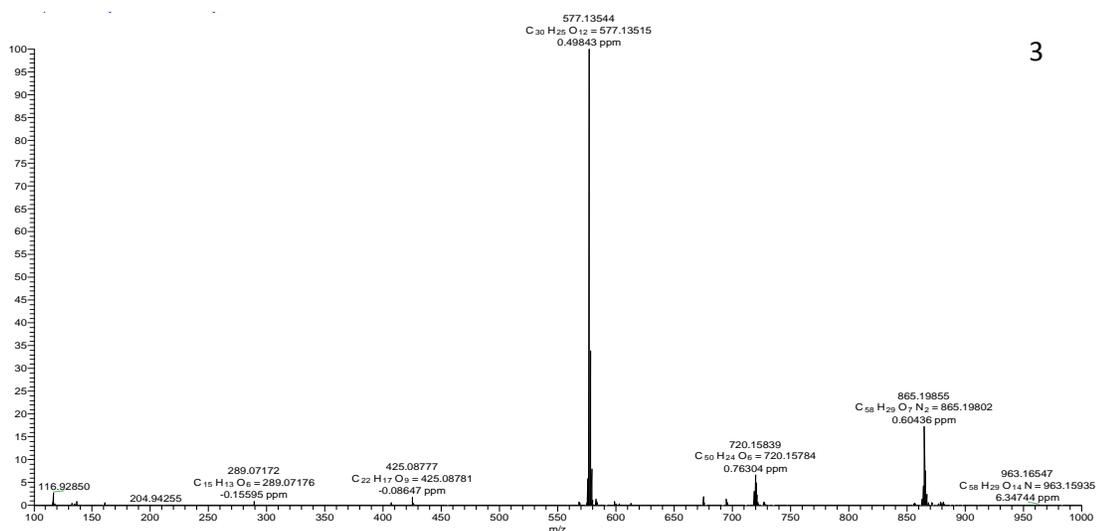
<sup>177</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4616.

<sup>178</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p.511.

Fuente: SUN y SPRANGER (2005)

Los picos **3**, **5** y **34** con tiempos de retención 3,15, 4,10 y 4,88 muestran un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  577,  $C_{30}H_{26}O_{12}$ . Estos compuestos se identificaron como procianidinas diméricas tipo B descritas previamente en F2S. Mediante el uso de estándares los picos 3 y 5 se identificaron como procianidinas diméricas tipo B1 y B2 respectivamente. En el espectro de masas de compuestos 3, 5 y 34 (Figura 50), se observa un ión fragmento  $[M-H-152]^-$  con  $m/z$  425 que se forma por la fisión retro Diels-Alder (RDA) de los anillos heterocíclicos en procianidinas dimericas<sup>179</sup>. Nuevamente se observa un ión fragmento  $[M-H-288]^-$  con  $m/z$  289 el cual se origina a partir de una escisión del enlace interflavano<sup>180</sup> con pérdida de una molécula de epicatequina<sup>181</sup>. Cabe resaltar que las procianidinas diméricas tipo B se caracterizan por presentar enlaces C4-C8 o C4-C6<sup>182</sup>, mientras que las procianidinas diméricas tipo A presentan enlaces tipo éter adicionales C2-O-C7 o C2-O-C5<sup>183</sup> (Figura 52). Esto genera que las procianidinas diméricas tipo A tengan un menor número de átomos de hidrógeno en su estructura en comparación con las procianidinas diméricas tipo B.

**Figura 50.** Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 3, 5 y 34



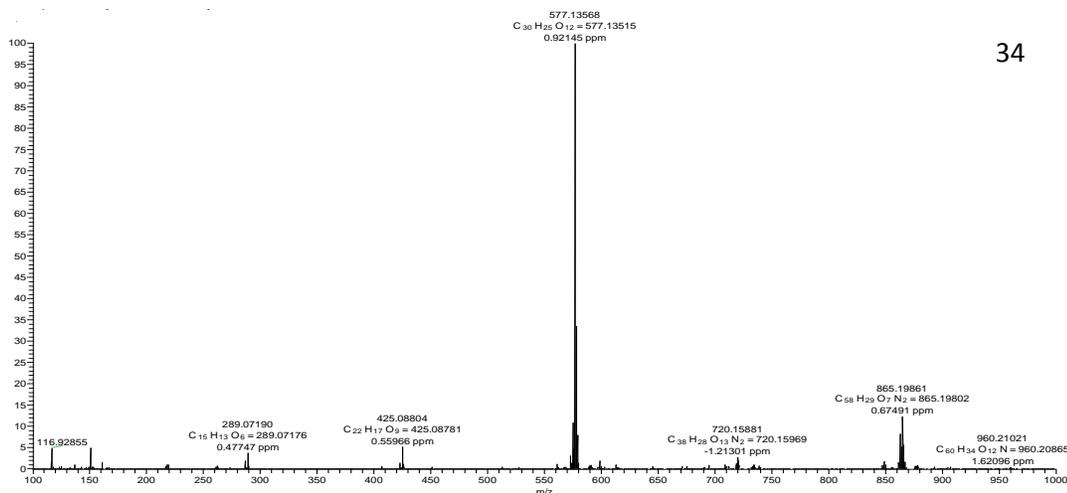
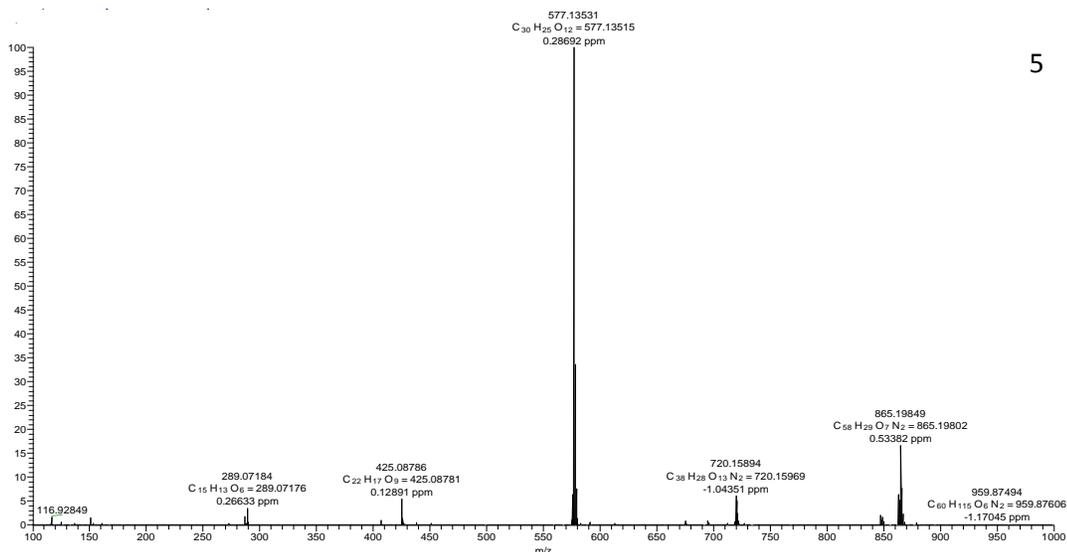
<sup>179</sup> FERNÁNDEZ DE SIMÓN, Brigida, *et al.* Phenolic Compounds in Cherry (*Prunus avium*) Heartwood with a View to Their Use in Cooperage. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. vol. 58,no.8,p. 4907–4914.

<sup>180</sup> *Ibid.*, p. 4911.

<sup>181</sup> GU, Liwei y SANDHU, Amandeep. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MS. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010.vol. 58,no.8, p. 4681–4692.

<sup>182</sup> SUN, B. y SPRANGER, M. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *En: Ciencia e Técnica Vitivinícola*, 2005. vol.20, no.2, p. 59,89.

<sup>183</sup> HELLSTRÖM, J y MATILLA, P. HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. vol.56, no.17, p. 7617-7624.

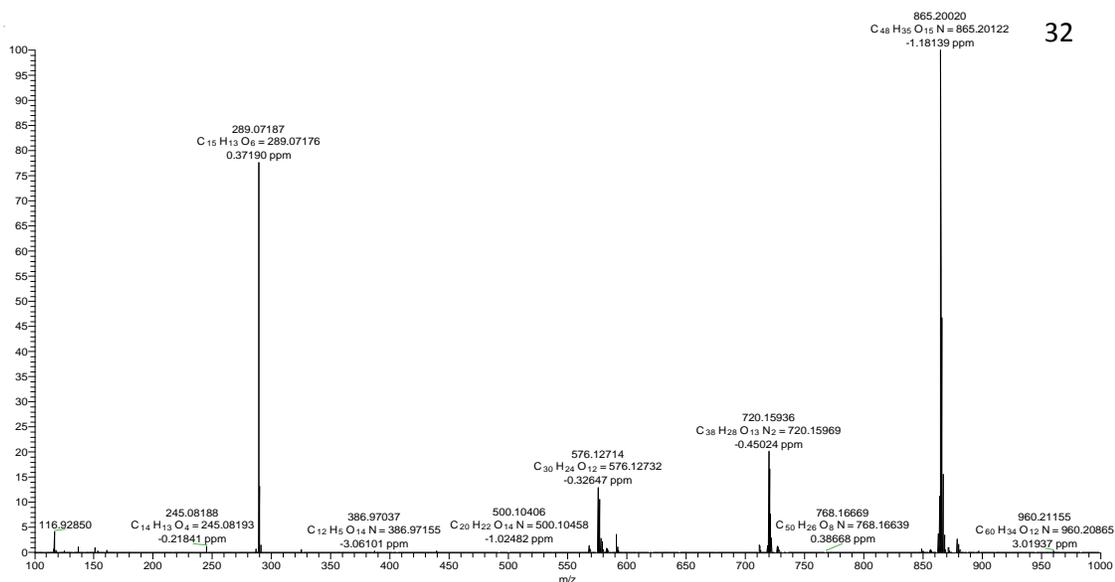


Fuente: Esta investigación.

El pico **32** con tiempo de retención 3,39, min muestra un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  865 (Figura 51) que está de acuerdo con la fórmula molecular  $C_{45}H_{38}O_{18}$ . Basados en publicaciones científicas se identificó este compuesto como procianidina trimérica tipo B. Estructuralmente se puede observar que los enlaces tipos éter adicionales presentes en las procianidinas triméricas tipo A resultan en una disminución del número de átomos de hidrógeno en la estructura en comparación con las procianidinas triméricas tipo B (Figura 52). En el espectro de masas se observa un ión fragmento de  $m/z$  289 correspondiente a

monómeros de catequina<sup>184</sup>. Investigaciones previas indican la presencia de este tipo de compuestos en semilla y epicarpio de ocho variedades de aguacate<sup>185</sup>.

**Figura 51.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 32.

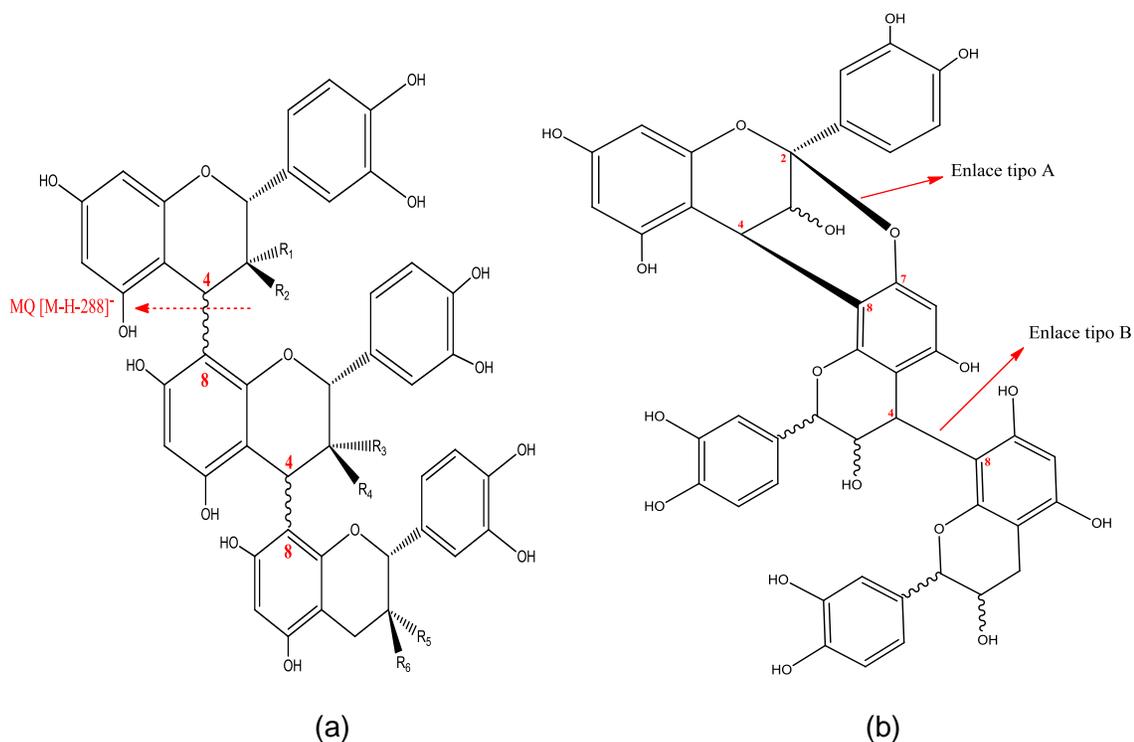


Fuente: Está investigación.

<sup>184</sup> KOLNIAK-OSTEK, Joanna; OSZMIAŃSKI, Jan y BIERNAT, Agata. The Content of Phenolic Compounds in Leaf Tissues of *Aesculus glabra* and *Aesculus parviflora* Walt. *En*: *Molecules*, 2015. vol. 20, no. 2, p. 2176-2189.

<sup>185</sup> GU, BOSTIC y WANG. Op. Cit., p. 1196-1197

**Figura 52.** Estructura para procianidinas triméricas (PC) tipo B (a) y procianidinas triméricas (PC) tipo A(b)



**PC C1:**  $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=H, R_5=OH, R_6=H$   
**PC C2:**  $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=H, R_5=OH, R_6=H$   
 Fuente: SANTOS-BUELGA, KOLODZIEJ y TREUTTER (1995)

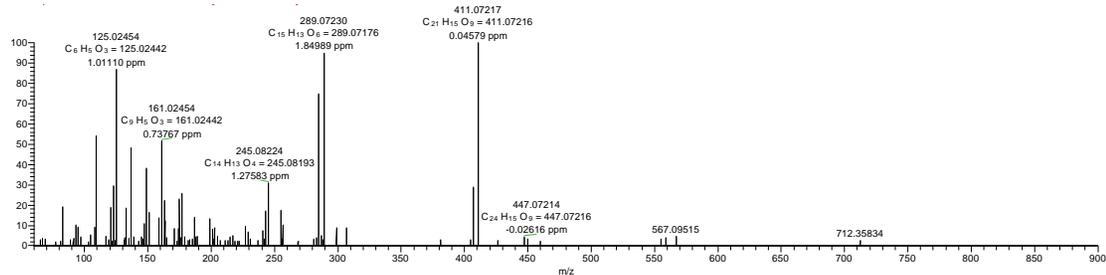
El pico **33** ( $t_r=3,71$  min) presentó un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  863. Este compuesto se identificó como procianidina trimérica tipo A<sup>186</sup>. El espectro de masas MS/MS de este compuesto (Figura 53) indica la presencia de iones fragmento con  $m/z$  289,  $m/z$  245 descritos previamente para los compuestos tipo procianidinas identificadas en F2S. La estructura se representa en la figura 57 b. Se ha reportado la identificación de procianidinas triméricas tipo A en semilla y epicarpio de ocho variedades de aguacate *Persea americana*<sup>187</sup>. Estudios indican que la presencia de este tipo de compuestos previene la aparición de infecciones en el tracto urinario<sup>188</sup>.

<sup>186</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit.,p. 4617.

<sup>187</sup> GU, BOSTIC y WANG. Op. Cit.,p. 1195-1196.

<sup>188</sup> HOWELL, A.B., *et al.* A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. En: Phytochemistry,2005. vol. 66, no.18,p.2281 .2291.

**Figura 53.** Espectro MS/MS del compuesto 33.

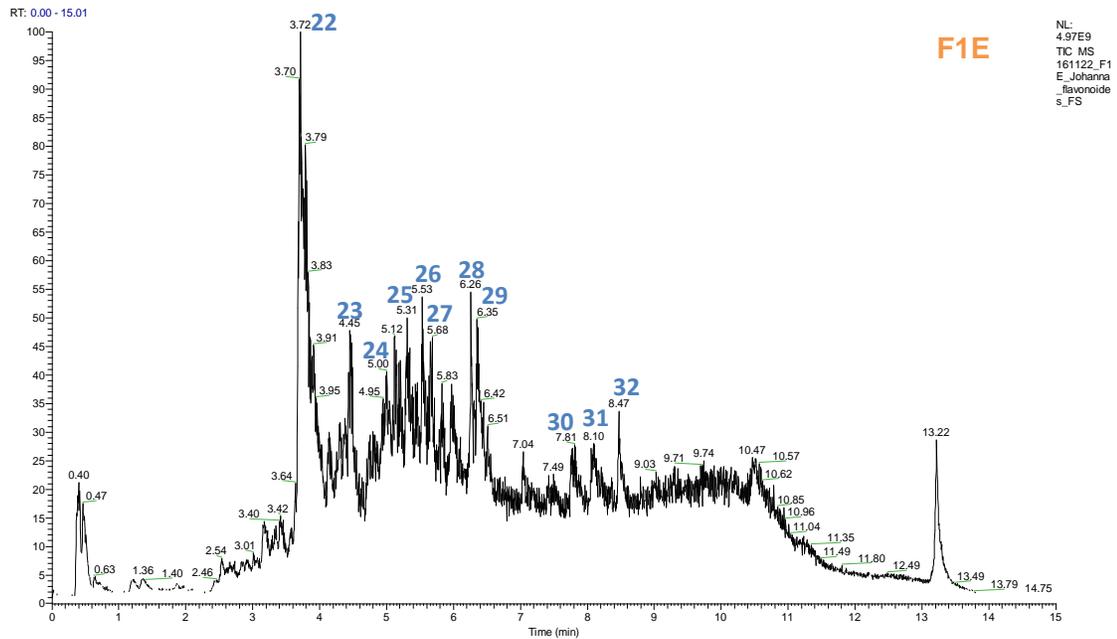
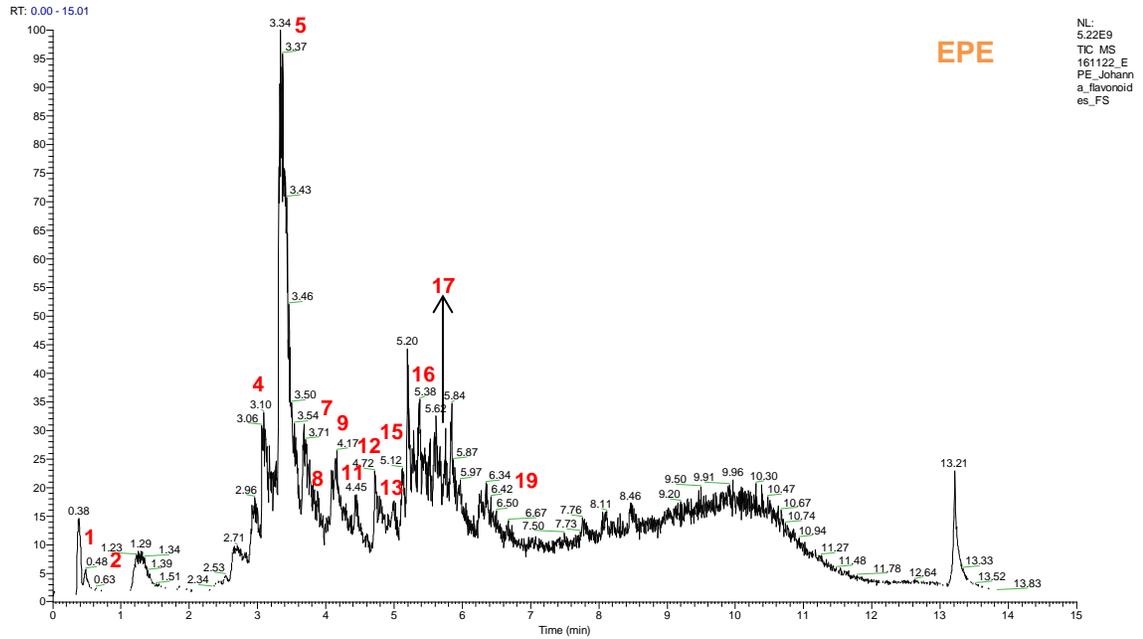


Fuente: Está investigación.

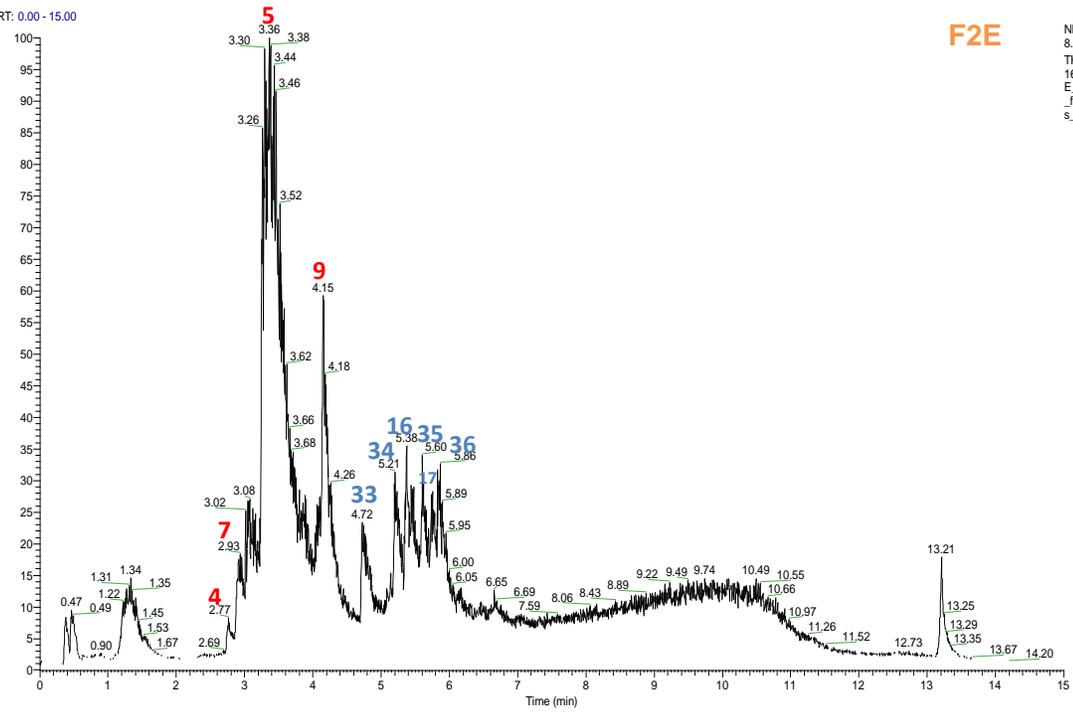
#### 4.9.2 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EPICARPIO.

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó por HPLC-ESI-MS en modo negativo. Mediante el uso de una mezcla de estándares de compuestos fenólicos fue posible identificar algunos compuestos del extracto purificado de epicarpio (EPE) y sus fracciones F1E, F2E y F3E. La mínima diferencia de los valores  $m/z$  obtenidos para los estándares y los compuestos fenólicos identificados permitió corroborar la presencia de estos en los diferentes extractos y fracciones. En la figura 54 se presenta el cromatograma del EPE y en la tabla 25 se registran las masas y los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los diferentes compuestos.

**Figura 54.** Cromatograma (HPLC-ESI-MS) del extracto purificado de epicarpio (EPE) y fracciones F1E, F2E y F3E.



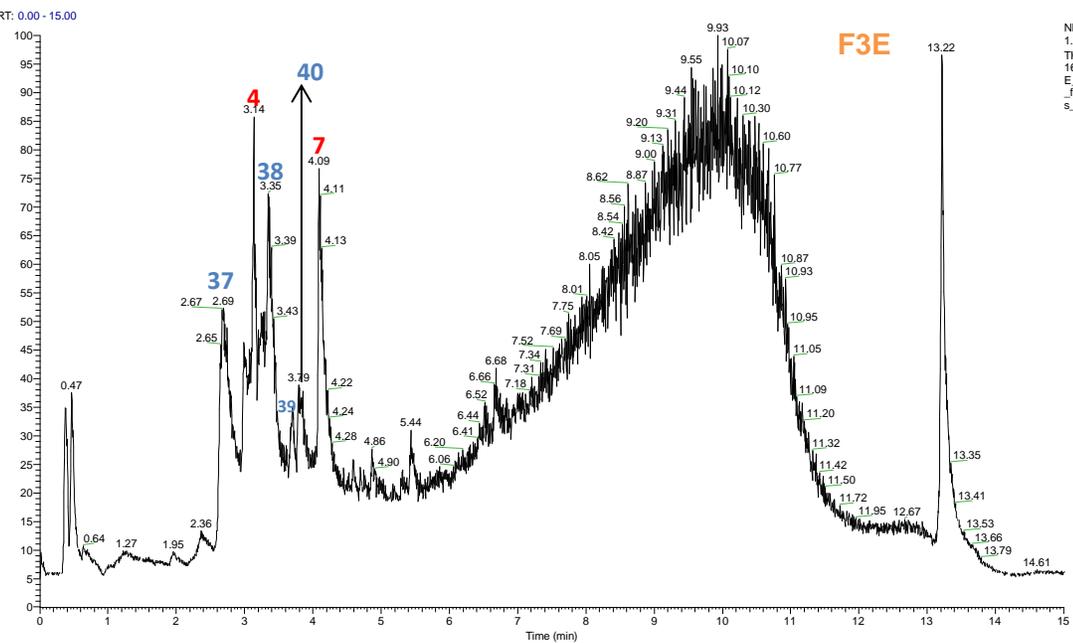
RT: 0.00 - 15.00



F2E

NL:  
8.12E9  
TIC MS  
161122\_F2  
E\_Johanna  
\_flavonoide  
s\_FS

RT: 0.00 - 15.00



F3E

NL:  
1.23E9  
TIC MS  
161122\_F3  
E\_Johanna  
\_flavonoide  
s\_FS

Fuente: Está investigación.

**Tabla 25.** Compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS en EPE y las fracciones aisladas F1E, F2E y F3E.

Nº pico	Compuesto	t <sub>R</sub>	λ <sub>máx</sub>	Fórmula	m/z medido
<b>EPE</b>					
1	Ácido quínico	0,48	—	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	191,05624
2	Ácido cítrico	0,66	—	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191,0199
3	Ácido protocatéquico	1,94	—	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,01938
4	Procianidina dimérica tipo B1	3,11	—	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13525
5	Catequina	3,36	—	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0719
6	Ácido clorogénico(ácido 5-O-cafeoilquínico)	3,68	—	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,08795
7	Procianidina dimérica tipo B2	3,72	—	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13562
8	Ácido cafeico	3,82	—	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179,035
9	Epicatequina	4,16	—	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07199
10	Ácido siringico	4,18	—	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197,0455
11	Vainillina	4,42	—	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151,04005
12	Acido p-cumárico	4,6	—	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,04018
13	Ácido ferulico1 mayor	4,94	—	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0506
14	Ácido sinápico	5,01	—	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223,06128
15	Ácido ferulico2 minor	5,13	—	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,05061
16	Quercetina-3-O-Glucósido	5,37	—	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,08862
17	Rutina	5,77	—	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,14685
18	Phloridzina	5,79	—	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,12967
19	Quercetina	6,44	—	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,03568
20	Kaempferol	7,03	—	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,04071
21	Apigenina	7,09	—	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269,04578
<b>F1E</b>					
22	Aducto dímero ácido cafeoilquínico	3,73	—	—————	707,18378
23	No identificado	4,45	—	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	431,19232
24	No identificado	5,0	—	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>14</sub>	585,21954
25	Ácido (1`S, 6`R) -8` - hidroxiaabscisico- β-D- glucósido	5,31	273	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	441,12271
26	No identificado	5,54	—	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	509,22412
27	No identificado	5,66	—	—————	439,10703
28	Cafeoil-O- hexósido	6,26	325	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	341,13950

29	No identificado	6,37	–	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	263,12894
30	No identificado	7,77	–	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	327,21796
31	Ácido vanílico hexósido I	8,12	–	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	329,23355
32	Ácido vanílico hexósido II	8,48	–	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	329,23361
<b>F2E</b>					
4	Procianidina dimérica tipo B1	2,77	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13550
7	Procianidina dimérica tipo B2	2,94	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13538
5	Catequina	3,36	–	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07190
9	Epicatequina	4,16	–	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07196
33	Diglicósido de quercetina	4,74	–	C <sub>27</sub> O <sub>17</sub> H <sub>30</sub>	625,14148
34	Quercetina 3-O- arabinosil-glicósido	5,21	–		595,13080
16	Quercetina 3 –O- glucosido	5,38	–	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,08856
35	Quercetina 3-O-arabinosido	5,62	–	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	433,07770
17	Quercetina 3-O- rutinosido(Rutina)	5,75	–	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,14642
36	Quercetina 3-O-ramnosido	5,85	–	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447,09341
<b>F3E</b>					
37	No identificado	2,69	–	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	576,12762
4	Procianidina dimérica tipo B1	3,14	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13538
38	Procianidina trimérica tipo B	3,35	–	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	865,20032
39	No identificado	3,69	–	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	576,12769
40	Procianidina trimérica tipo B	3,83	–	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	865,20026
7	Procianidina dimérica tipo B2	4,09	–	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577,13544

#### 4.9.2.1 Identificación de los compuestos fenólicos en F1E.

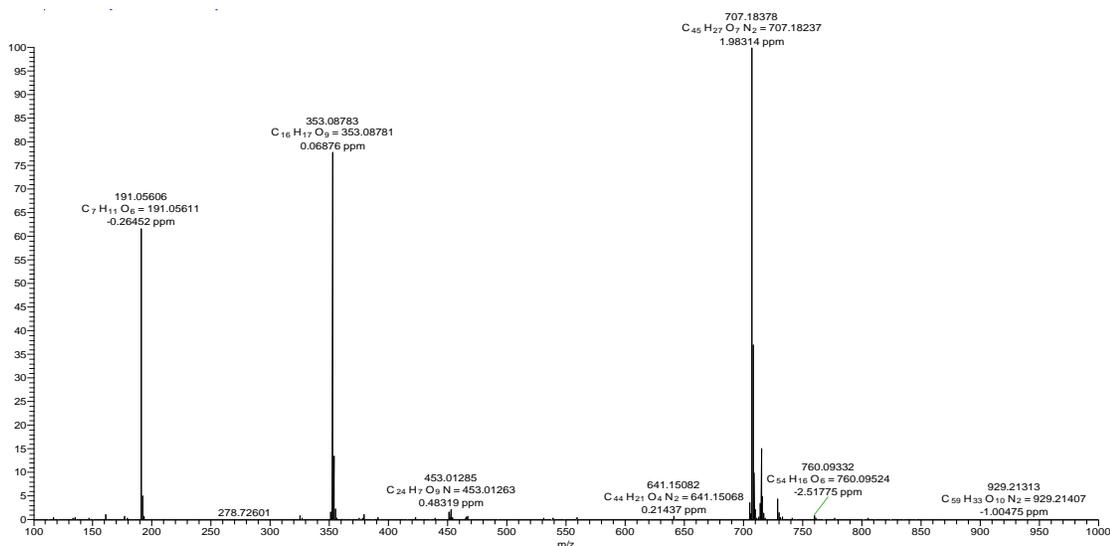
La mayoría de los compuestos fenólicos en F1E coinciden con los identificados en el extracto purificado del epicarpio (EPE), sin embargo en F1E no se identificó apigenina, kaempferol, procianidina B2 y quercetina. En la figura 54 se muestra el cromatograma de la fracción F1E en modo negativo.

Mediante el análisis de los patrones de fragmentación del espectro de masas, se caracterizaron parcialmente diferentes compuestos fenólicos del epicarpio de aguacate. El pico **22** con  $t_r=3,73$  min muestra un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  707. Este compuesto se identificó como un aducto dimerico del ácido cafeoilquinico<sup>189,190</sup> el cual se

<sup>189</sup> BRAVO, Laura; GOYA, Luis y LECUMBERRI, Elena. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St.Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. En: Food Research International, 2007. vol. 40, no.3, p. 393–405.

origina por la condensación de dos unidades del ácido clorogénico. Este proceso ha sido descrito por Clifford *et al*<sup>191</sup> solo para ácido cafeico en extractos de mate. En el espectro de masas de este compuesto (Figura 55) se observan los iones fragmento con  $m/z$  353 y 191 correspondientes al ácido clorogénico y el ácido quínico respectivamente.

**Figura 55.** Espectros de masas HPLCS-ESI-MS del compuesto 22.



Fuente: Esta investigación.

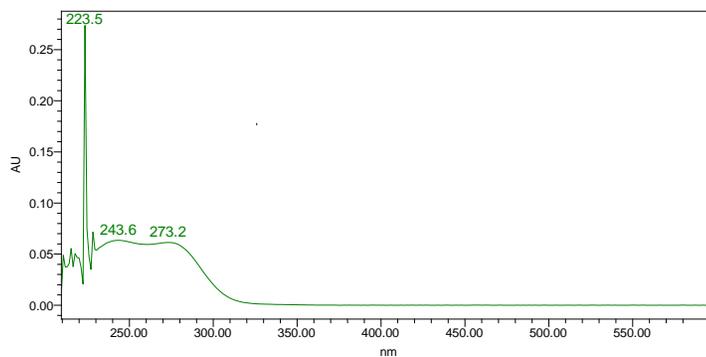
El pico **25** con tr de 5,31min se identificó como el ácido (1`S, 6`R) -8`- hidroxiaabscisico-  $\beta$ -D- glucosido por presentar un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  441u y  $\lambda_{m\acute{a}x}$  273nm<sup>192</sup>(Figura 56), con fórmula molecular  $C_{21}H_{30}O_{10}$  (Figura 57). Este compuesto fue identificado previamente en la fracción F1S. La impureza del pico cromatográfico genera diferentes señales en el espectro de masas del compuesto (Figura 57) y su espectro UV-vis.

<sup>190</sup> CHUL, Sung , *et al.* Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb. using liquid chromatography- tandem mass spectrometry: Contribution to the overall antioxidant activity. En: Food Chemistry, 2012. vol. 134, no. , p. 572 .577

<sup>191</sup> THABTI, Inés *et al.* Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian Morus species by HPLC-DAD and HPLC-MS. En: Journal of Functional Foods, 2012.vol 4,no.1, p. 367- 374.

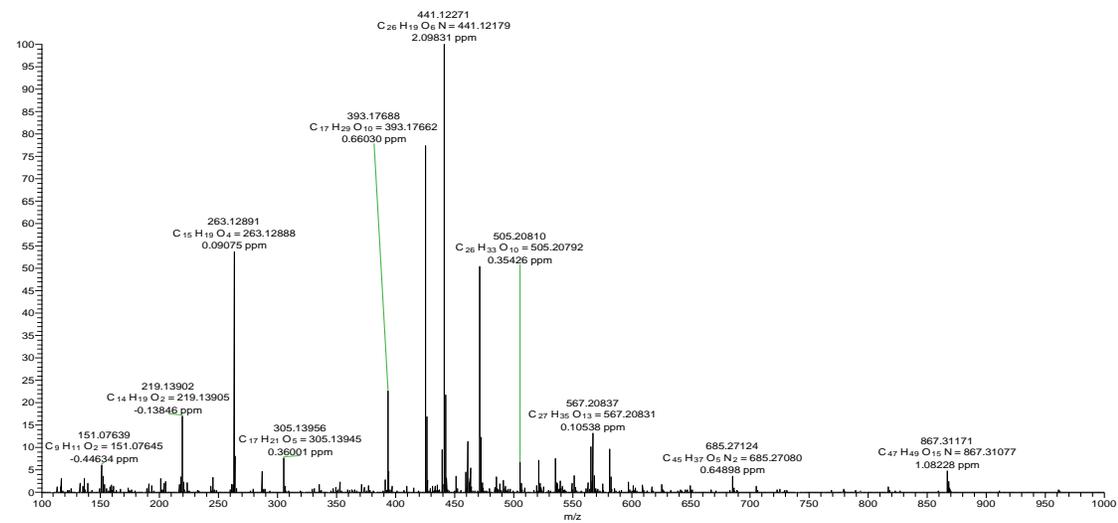
<sup>192</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op. Cit., p. 508.

**Figura 56.** Espectro UV-Vis del compuesto 25.



Fuente: Esta investigación.

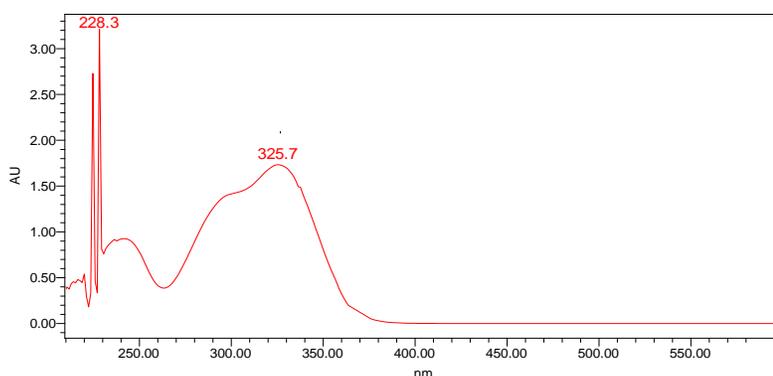
**Figura 57.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 25.



Fuente: Esta investigación.

El pico **28** mostró un  $t_R$  de 6,26min,  $\lambda_{m\acute{a}x}$  en 325 nm (Figura 58) y un ión pseudomolecular en  $m/z$  341  $[M-H]^-$ ,  $C_{20}H_{22}O_5$  (Figura 59). A partir de estas señales se identificó parcialmente este compuesto como el ácido hidroxicinámico cafeoil-O-hexósido<sup>193,194,195,196,197</sup>. La estructura del compuesto 28 se muestra en la figura 60.

**Figura 58.** Espectro UV-Vis del compuesto 28 medida a 280nm.



Fuente: Está investigación.

<sup>193</sup> MENA, Pedro, *et al.* (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Mmostróorus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach. En: Food Chemistry, 2016.vol. 212, p. 250-255.

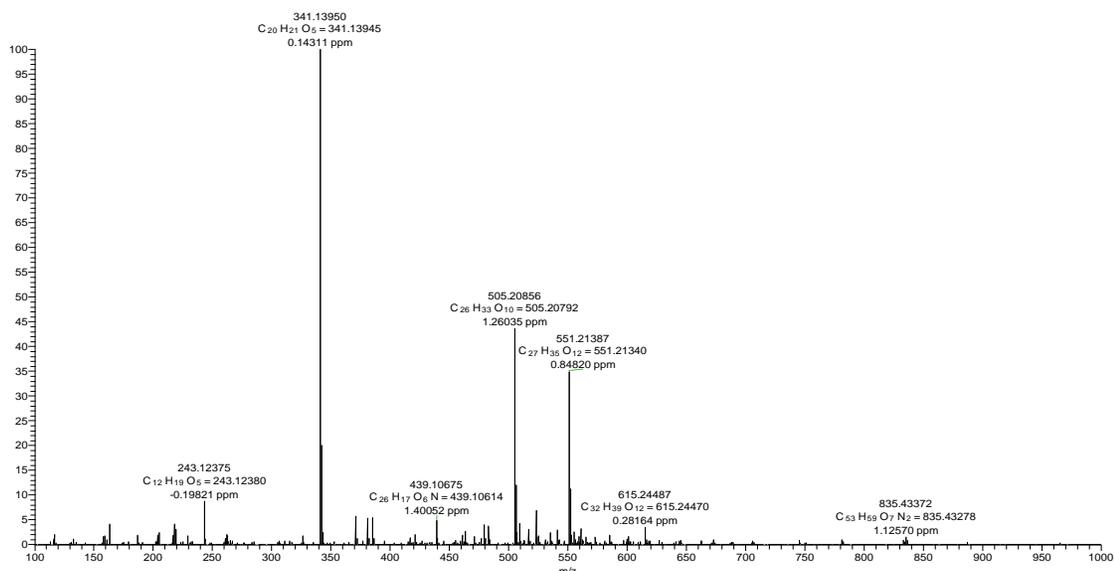
<sup>194</sup> SEGURA-CARRETERO, Antonio, *et al.* Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). En: Food Research International, 2013. vol. 51,no.1,p.354- 362.

<sup>195</sup> SASSAKI, Guilherme, *et al.*UPLC-PDA –MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions,treatments and ageing. En: Food Chemistry, 2011. vol. 129,no.4,p. 1453 –1461.

<sup>196</sup> CHUL SHIN, Sung, *et al.* Op.Cit., p. 572-577

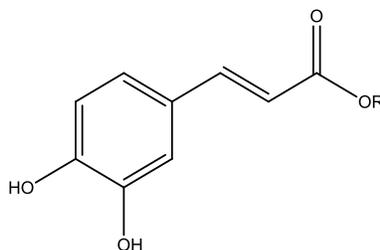
<sup>197</sup> LAMUELA-RAVENTOS, Rosa, *et al.* A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC .ESI-LTQ-Orbitrap-MS). En: Food Chemistry, 2015. vol.169, p.336 –343.

**Figura 59.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 28.



Fuente: Está investigación.

**Figura 60.** Estructura química del compuesto 28.



R= hexósido

Fuente: CHUL, *et al.* (2012)

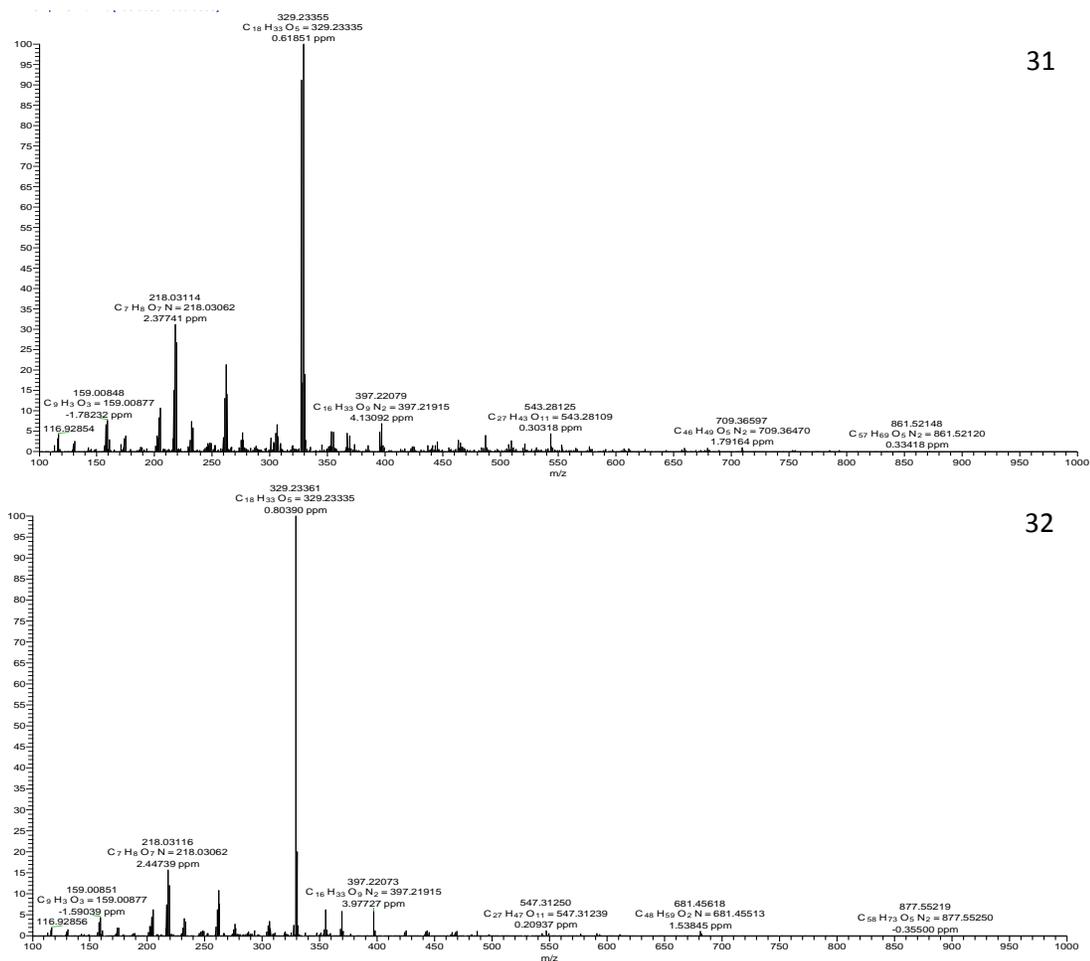
Los picos **31** y **32** con tiempos de retención 8,12 y 8,48min respectivamente se identificaron como isómeros del ácido vanílico-hexósido<sup>198,199</sup>. El espectro de masas de ambos compuestos muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  329  $[M-H]^-$ , C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (Figura 61). La estructura general de los compuestos 31 y 32 se muestran en la figura 62 los cuales poseen diferencias estructurales debido a la posición del grupo metoxilo, el cual puede estar en posición *meta* o *para*. Este compuesto se ha identificado previamente en semilla de aguacate *Persea americana* Mill<sup>200</sup>.

<sup>198</sup> SEGURA-CARRETERO, *et al.*, Op. cit., p.357

<sup>199</sup> SEGURA-CARRETERO, Antonio, *et al.* Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *En*: Food Research International, 2015. vol.78, p.246- 257.

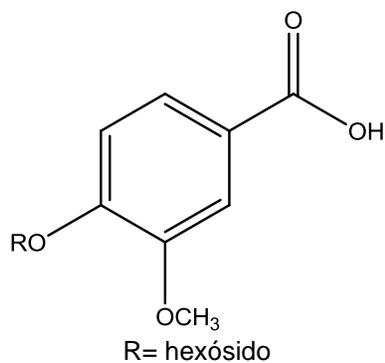
<sup>200</sup> GÓMEZ CARAVACA, *et al.* Op. cit., p. 508.

**Figura 61.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 31 y 32.



Fuente: Está investigación.

**Figura 62.** Estructura química general para los compuestos 31 y 32.



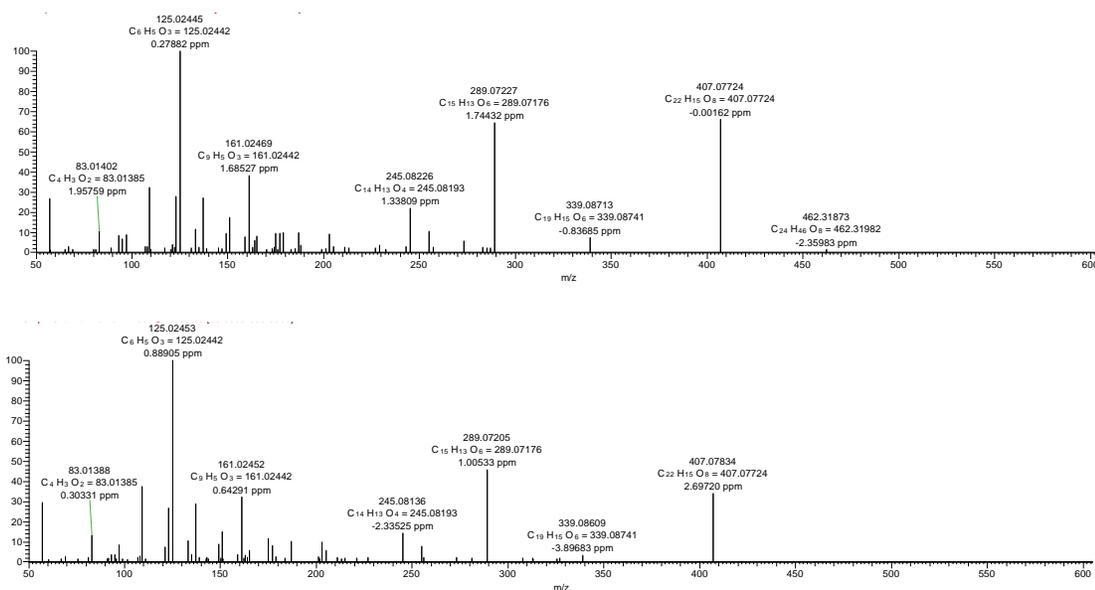
Fuente: Está investigación.

#### 4.9.2.2 Identificación de los compuestos fenólicos en F2E.

Mediante la utilización de una mezcla de estándares, en esta fracción igualmente se identificaron la mayoría de los componentes ya mencionados para el extracto EPE, exceptuando ácido sinápico, el ácido siríngico y la vainillina (Tabla 25). En la figura 54 se muestra el cromatograma de la fracción F2E en modo negativo.

Los compuestos detectados e identificados (4, 7, 5, 9, 33, 34,16,35,17 y 36) por HPLC-ESI-MS se muestran en la tabla 25. Mediante el uso de estándares los picos 4 y 7 con tiempos de retención 2,77 y 2,94 min con iones pseudomoleculares a  $m/z$  577  $[M-H]^-$ ,  $C_{30}H_{26}O_{12}$  (Anexo G) se identificaron como procianidinas diméricas tipo B1 (Pico 4) y tipo B2 (Pico 7). Los espectros MS/MS se muestran en la figura 63.

**Figura 63.** Espectros MS/ MS para los picos 4 y 7.



Fuente: Esta investigación.

De igual forma mediante el uso de estándares se identificaron los picos 5 y 9 con tiempos de retención 3,36 y 4,16 min respectivamente como catequina (Pico 5) y epicatequina (Pico 9) al mostrar el ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  289,  $C_{15}H_{13}O_6$ . El espectro de masas para los pico 5 y 9 se muestra en el anexo H.

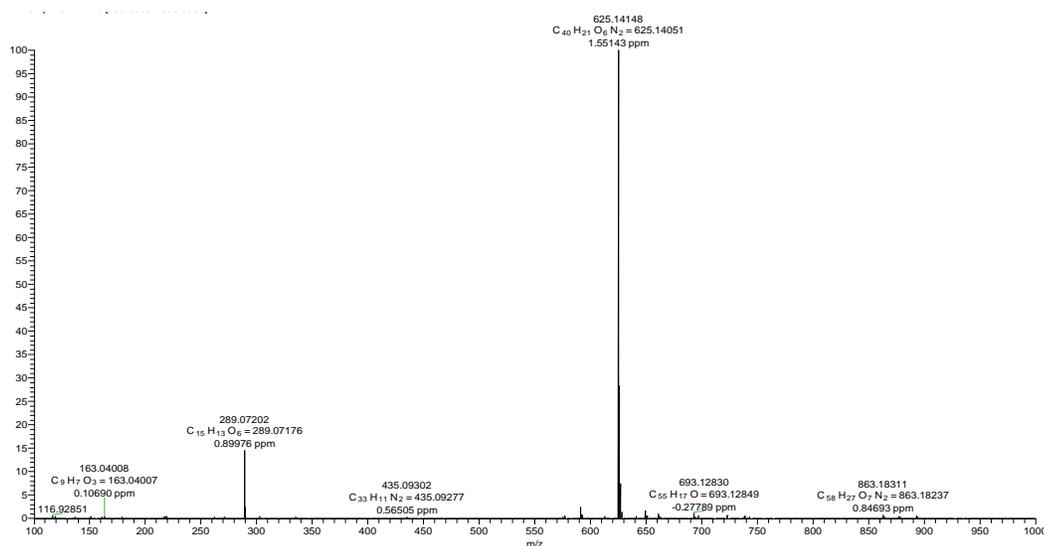
Los espectros de masas MS/MS de los picos 33, 34,16,35,17 y 36 tienen en común un ión fragmento en  $m/z$  300 con una abundancia relativa más alta que el ión fragmento en  $m/z$  301 (correspondiente a la molécula de quercetina) característico de compuestos glicosidados en la posición 3- $O^{201}$ . El análisis de las rutas de fragmentación de estos

<sup>201</sup> VAN CAMP, John, *et al.* Ultra(high)-pressure liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste. *En: Journal of Chromatography A*, 2014. vol. 1323, p. 39 – 48.

compuestos inicia con la escisión de los enlaces glicosídicos y la eliminación de las moléculas de azúcares presentes<sup>202</sup>.

El pico **33** con tiempo de retención 4,74 min muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  625 [M-H]<sup>-</sup>, C<sub>27</sub>O<sub>17</sub>H<sub>30</sub> (Figura 64). En el espectro MS/MS se observa un fragmento en  $m/z$  301 [M-H-324]<sup>-</sup> debido a la pérdida de dos unidades de glucosa. El fragmento en  $m/z$  271 [M-H-324-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (fragmento neutro formaldehído), se forma por pérdida de un grupo carbonilo en el carbono de la posición 3<sup>203</sup> (Figura 65). Teniendo en cuenta que los compuestos tipos flavonoide se caracterizan por la pérdida de moléculas neutras pequeñas como CO, CO<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sup>204</sup> se puede inferir que el fragmento en  $m/z$  243 [M-H-324-CH<sub>2</sub>O-CO]<sup>-</sup> se genera por la pérdida de una molécula neutra de CO y el fragmento en  $m/z$  199 [M-H-324-CH<sub>2</sub>O-CO-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> se genera por la pérdida de una molécula de CO<sub>2</sub>. Finalmente el ión fragmento [M-H-324-193]<sup>-</sup> a  $m/z$  107 se origina por la pérdida del anillo B<sup>205</sup>. Así este compuesto se identificó parcialmente como diglucósido de quercetina<sup>206</sup> (Figura 65). Kosinska *et al*<sup>207</sup>, reportan la presencia de la quercetina 3,4'-diglucosido en epicarpio de aguacate variedad Hass con lo que se podría inferir que las glucosas están en posiciones 3 y 4' del anillo C y B respectivamente.

**Figura 64.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 33.



<sup>202</sup> STOBIECKI, Maciej. Op.Cit.,p.237-256.

<sup>203</sup> YE, Min; YAN, Yuning y GUO,D.A.. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *En: Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2005. vol. 19,no. 11, p.1469–1484.

<sup>204</sup> CUYCKENS y CLAEYS. Op. Cit.,p. 6

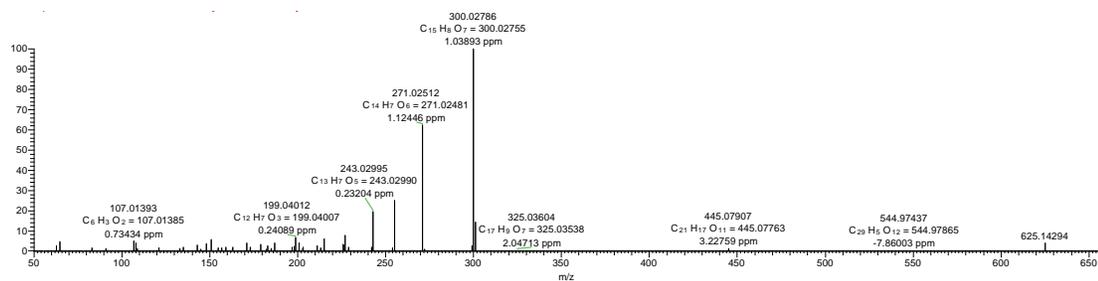
<sup>205</sup> LIANG, Xin-miao , *et al.* Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry.*En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. vol. 46,no.3, p. 418–430.

<sup>206</sup> GÓMEZ-CARAVACA , *et al.* Op cit., p.508.

<sup>207</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4617.

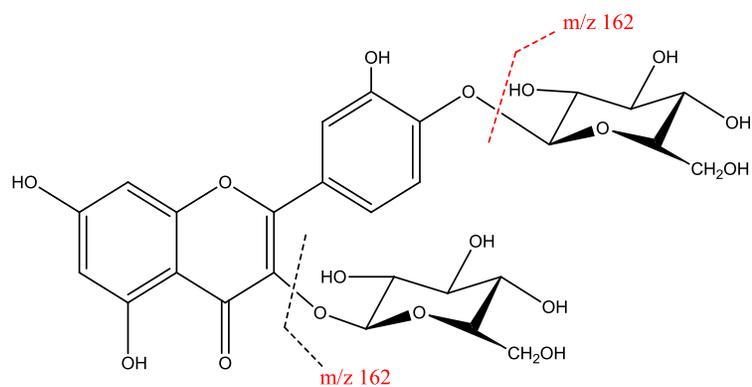
Fuente: Esta investigación.

**Figura 65.** Espectro MS/MS para el compuesto 33.



Fuente: Esta investigación.

**Figura 66.** Estructura química del compuesto 33.

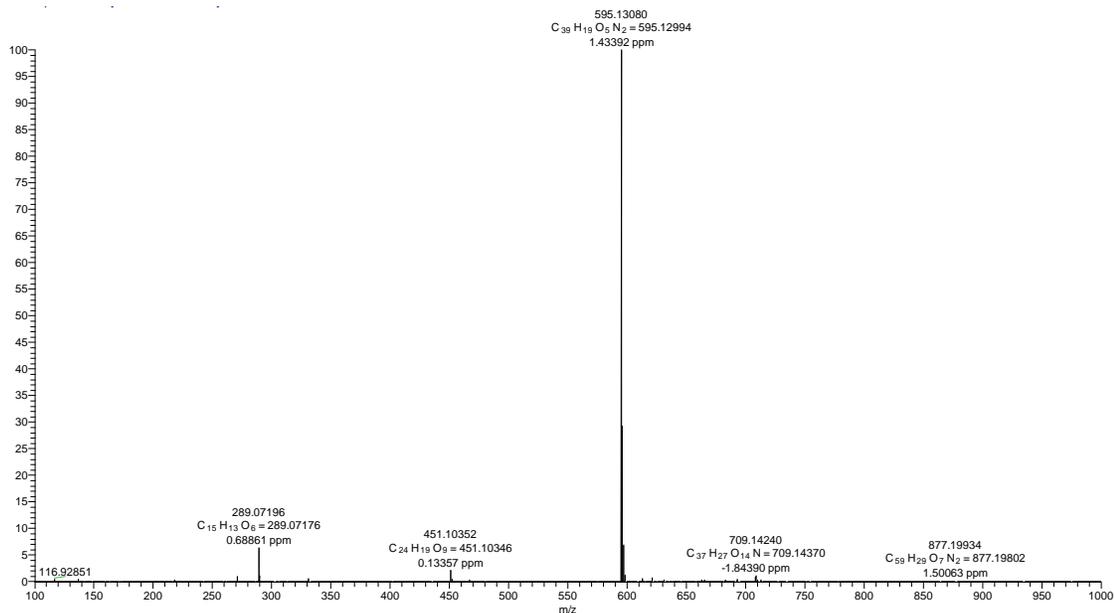


Fuente: PhytoChemical Interactions Data Base (PCIDB)

El pico **34** con tr 5,21 min se identificó parcialmente como quercetina-3-O-arabinosilglucósido<sup>208</sup>. El espectro de masas muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  595  $[M-H]^-$  (Figura 67).

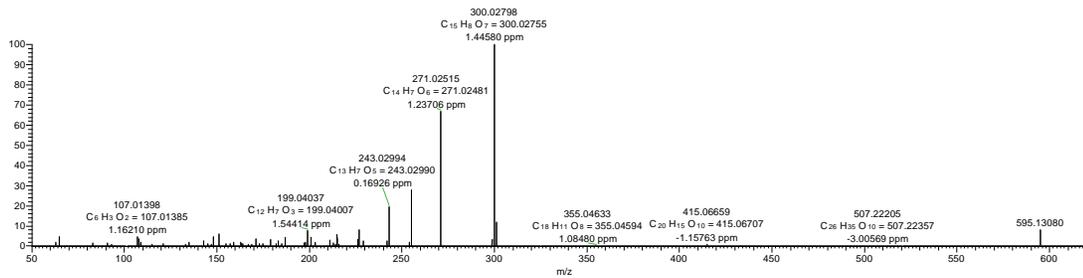
<sup>208</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op. cit., p. 4617

**Figura 67.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 34.



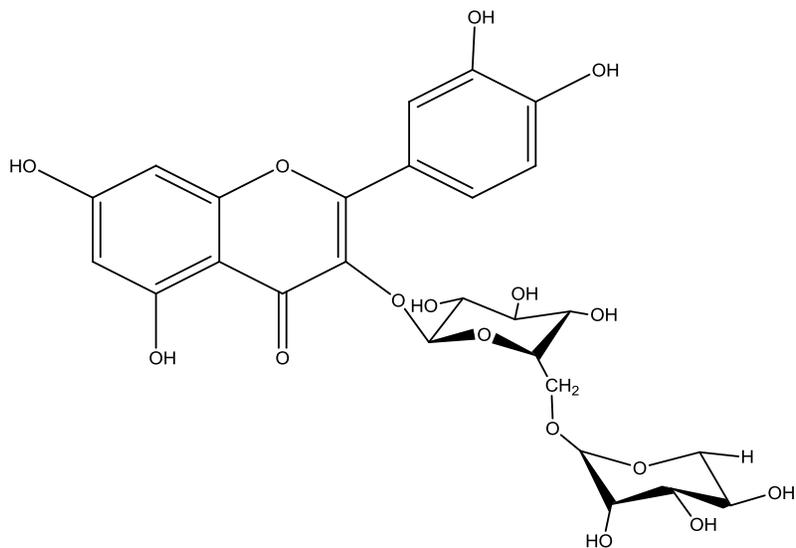
Fuente: Esta investigación.

**Figura 68.** Espectro MS/MS para el compuesto 34.



Fuente: Esta investigación.

**Figura 69.** Estructura química del compuesto 34.



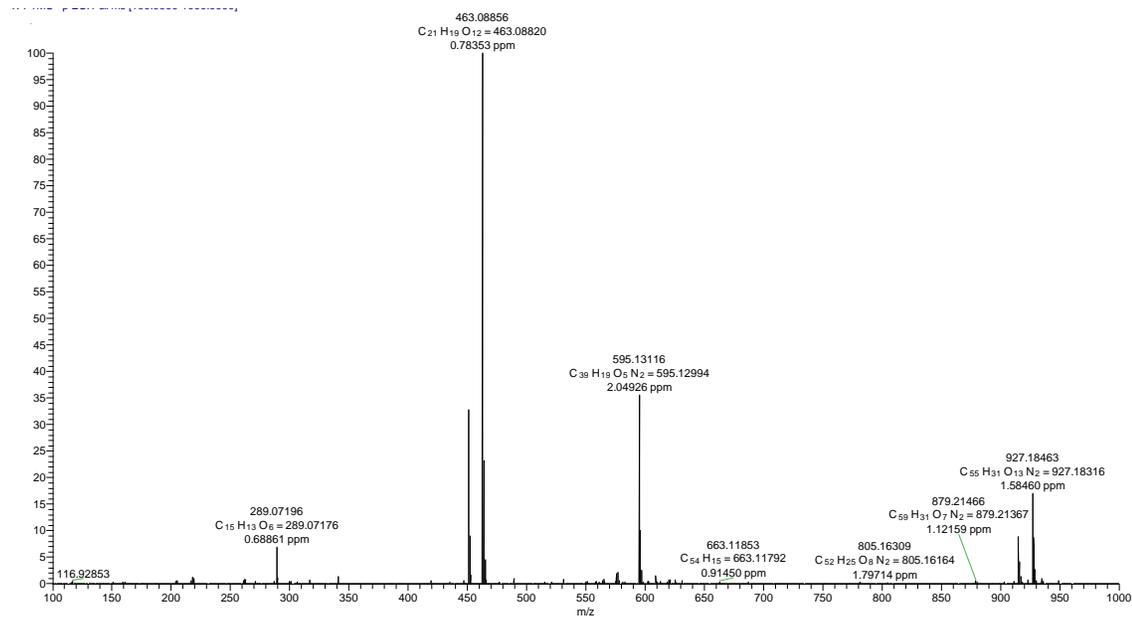
Fuente: Esta investigación.

Mediante el uso de estándares el pico **16** con tiempo de retención 5,38 min se identificó como quecetina 3-O-glucósido por el ión pseudomolecular en  $m/z$  463  $[M-H]^-$   $C_{21}H_{20}O_{12}$  (Figura 70), señal correspondiente a una molécula de quecetina enlazada a un hexosa. Este glicósido de flavonol muestra el ión fragmento en  $m/z$  301  $[M-H-162]^-$  (Figura 71), la cual indica una pérdida neutra de una unidad de hexosa que puede ser glucosa o galactosa, generando al final la respectiva aglicona del flavonol<sup>209</sup> (quecetina). La estructura del compuesto 16 se muestra en la figura 72.

---

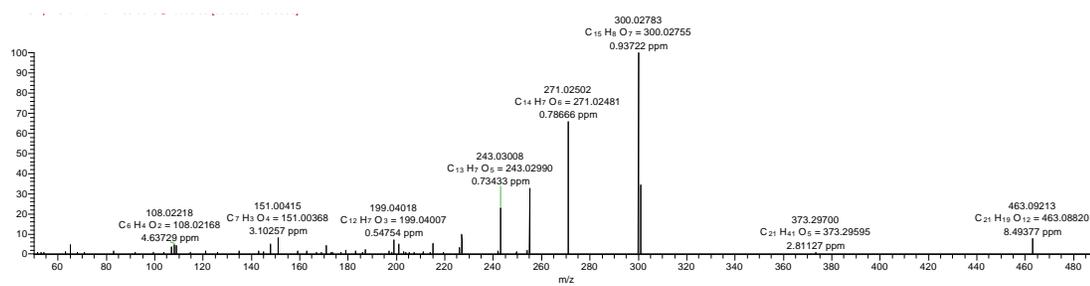
<sup>209</sup> JERZ, Gerold; GUTZEIT, Derek y WINTERHALTER, Peter. Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. En: Journal of Chromatography A, 2007. vol. 1172, no.1, p.40–46.

**Figura 70.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS para el compuesto 16.



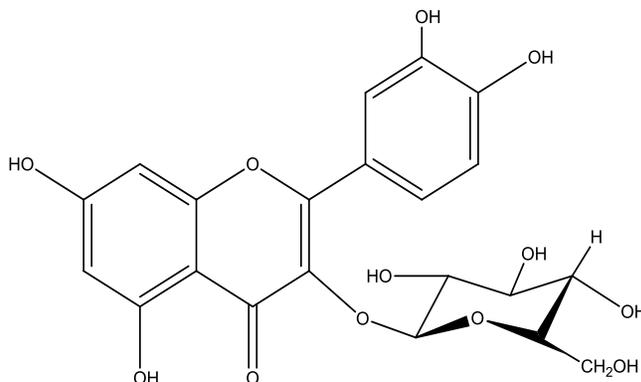
Fuente: Esta investigación.

**Figura 71.** Espectro MS/MS para el compuesto 16.



Fuente: Esta investigación.

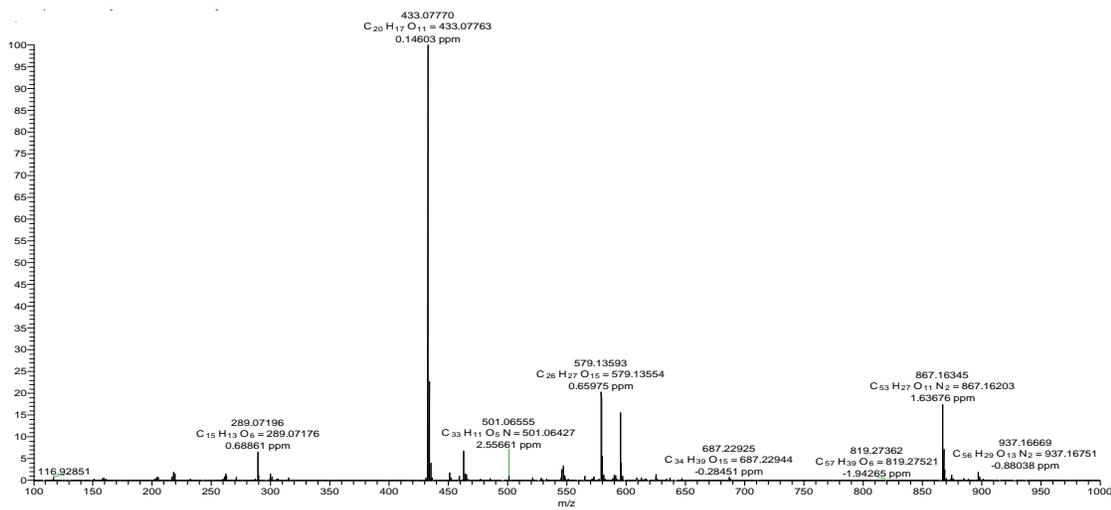
**Figura 72.** Estructura química del compuesto 16.



Fuente: CHEN, SONG y LI (2007)

El pico **35** con tiempo de retención 5,62 min se identificó como quercetina-3-O-arabinosido, el espectro de masas muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  433  $[M-H]^-$ ,  $C_{20}H_{18}O_{11}$  (Figura 73), que según reportes en la literatura corresponde a una molécula de quercetina enlazada a una pentosa<sup>210,211</sup>. Dentro de los estudios previos en sub productos de aguacate se ha reportado la presencia de este compuesto en epicarpio de aguacate *Persea americana* en las variedad Shepard<sup>212</sup>.

**Figura 73.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 35



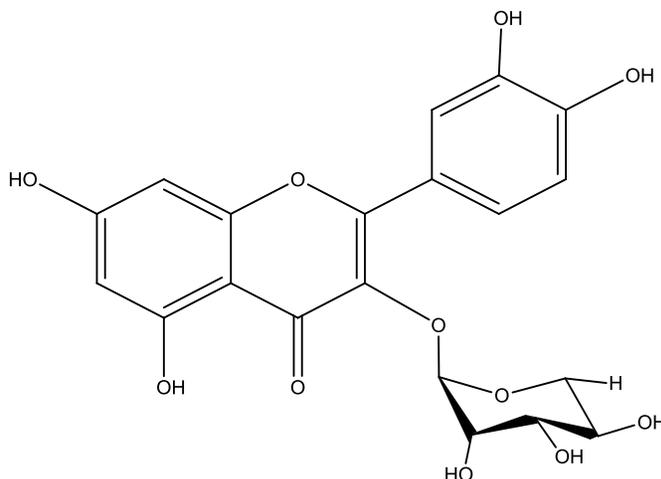
Fuente: Esta investigación.

<sup>210</sup> SASSAKI, *et al.* Op. cit., p.1458.

<sup>211</sup> HOFMANN, Tamas; NEBEHAJ, Esztella y ALBERT, Levente. Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry. *En: Industrial Crops and Products*, 2016. vol. 87, p.340 –349

<sup>212</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op.cit.,p.4617.

**Figura 74.** Estructura química del compuesto 35.



Fuente: Adaptado de CUYCKENS, *et al.* (2005)

Mediante el uso de estándares el pico **17** con tiempo de retención 5,75 min se identificó como un derivado de quercetina conocido como quercetin-3-O-rutinosido (rutina)<sup>213</sup> por el ión pseudomolecular en  $m/z$  609  $[M-H]^-$ ,  $C_{27}H_{30}O_{16}$  (Figura 75). La presencia del fragmento en  $m/z$  300 y 301  $[M-H-146-162]^-$  (Figura 76) indica la pérdida de los dos azúcares ramnosa y glucosa respectivamente<sup>214</sup> y la existencia de un enlace interglucosídico entre los carbonos C1-C6 de los dos monosacáridos<sup>215</sup>, que para este caso corresponde a una pentosa y una hexosa. Este compuesto ha sido identificado previamente en epicarpio de aguacate *Persea americana* Mill<sup>216</sup>.

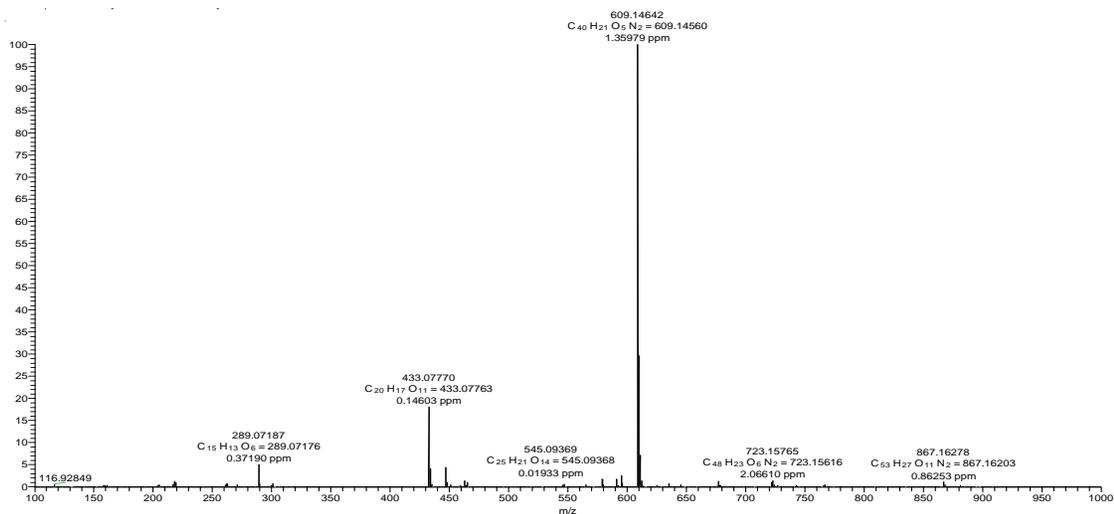
<sup>213</sup> KOSIŃSKA, *et al.* Op.cit.,p.4617.

<sup>214</sup> VAN CAMP, *et al.* Op.Cit., p.42.

<sup>215</sup> LI, Shao-Hua, *et al.* Analysis of flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves using high performance liquid chromatography/photodiode array detector tandem electrospray ionization mass spectrometry and an extraction method optimized by orthogonal design. *En: Journal of Chromatography A*, 2012. vol. 1227, p.145 – 153.

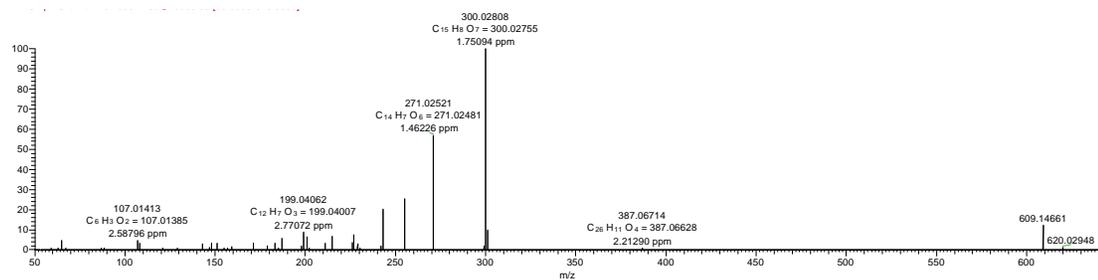
<sup>216</sup> GÓMEZ-CARAVACA, *et al.* Op cit., p.508.

**Figura 75.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS del compuesto 17.



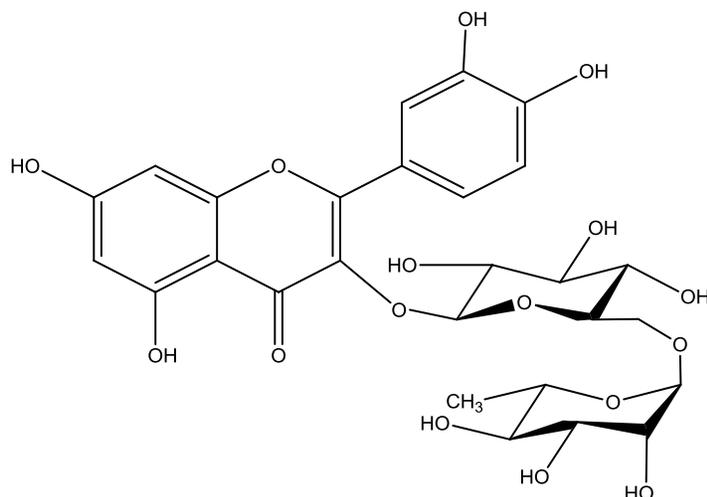
Fuente: Esta investigación.

**Figura 76.** Espectro MS/MS para el compuesto 17



Fuente: Esta investigación.

**Figura 77.** Estructura química del compuesto 17.



Fuente: CHEN, SONG y LI (2007)

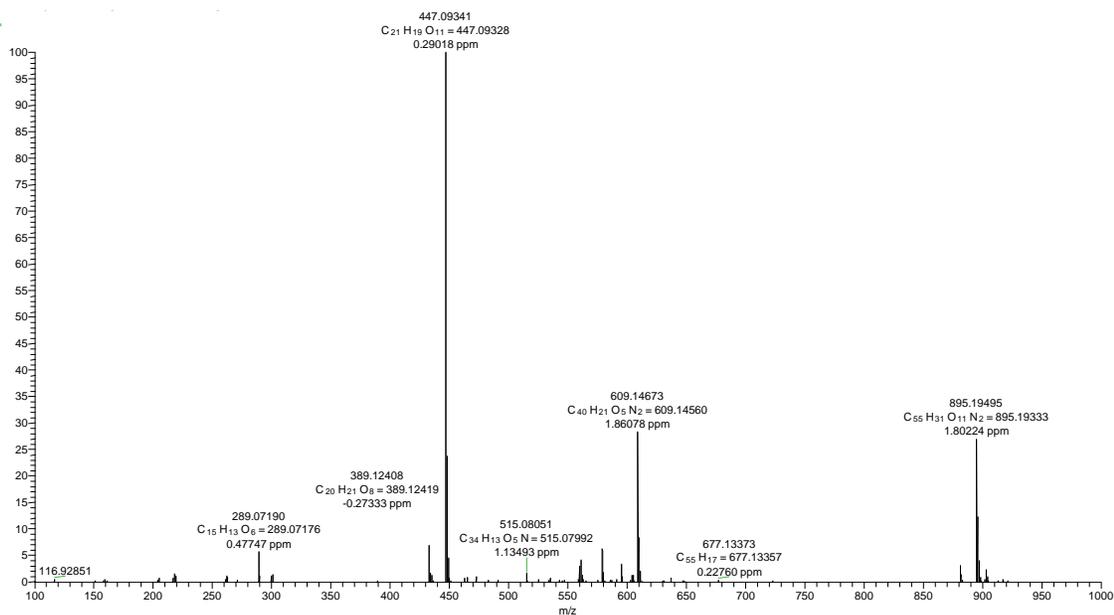
El pico **36** con tiempo de retención 5,85 min muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  447  $[M-H]^-$ ,  $C_{21}H_{20}O_{11}$  (Figura 78). En el espectro MS/MS (Figura 79) del compuesto se muestran diferentes iones fragmento a  $m/z$  300, 271, 255 y 151 los cuales han sido reportados previamente para el compuesto quercetina-3-O-ramnosido<sup>217</sup>. En el espectro de masas el fragmento en  $m/z$  301  $[M-H-146]^-$  corresponde a la pérdida de una unidad de ramnosa. El fragmento  $[M-H-146-H_2O-CO]^-$  a  $m/z$  255 se genera por la pérdida sucesiva de una molécula de  $H_2O$  y una molécula de  $CO$ <sup>218</sup>. Finalmente se observa un fragmento  $[M-H-147-H_2O-2CO]^-$  con  $m/z$  227 la cual se genera por la pérdida consecutiva de una molécula de agua y dos moléculas de  $CO$ <sup>219</sup>. La estructura del compuesto 36 se muestra en la figura 80.

<sup>217</sup> HOFMANN, NEBEHAJ, ALBERT. Op. Cit., p.345.

<sup>218</sup> MARCH, Raymond E., *et al.* A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *En: International Journal of Mass Spectrometry*, 2006. vol. 248, no.1-2 p. 61–85.

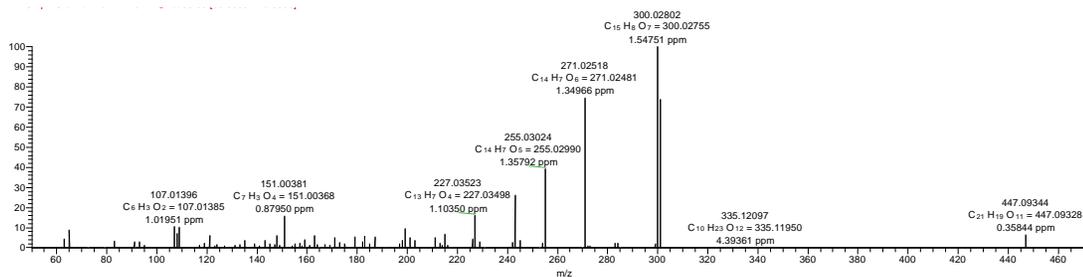
<sup>219</sup> CUYCKENS y CLAEYS. Op. Cit., p.8.

**Figura 78.** Espectro de masas HPLC-ESI-MS para el compuesto 36.



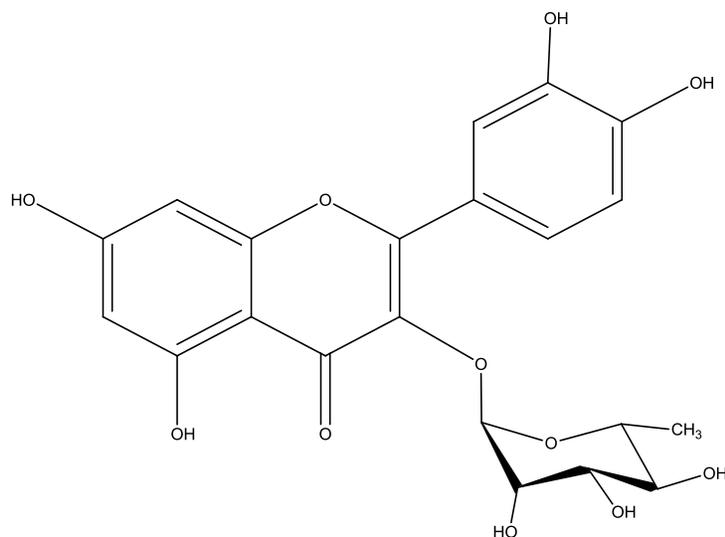
Fuente: Esta investigación.

**Figura 79.** Espectro MS/MS para el compuesto 36.



Fuente: Esta investigación.

**Figura 80.** Estructura química del compuesto 36.



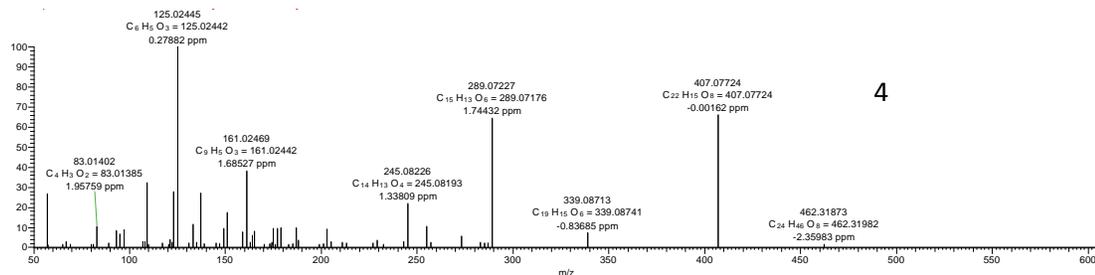
Fuente: Adaptado de VALLABHANENI, *et al.* (2012)

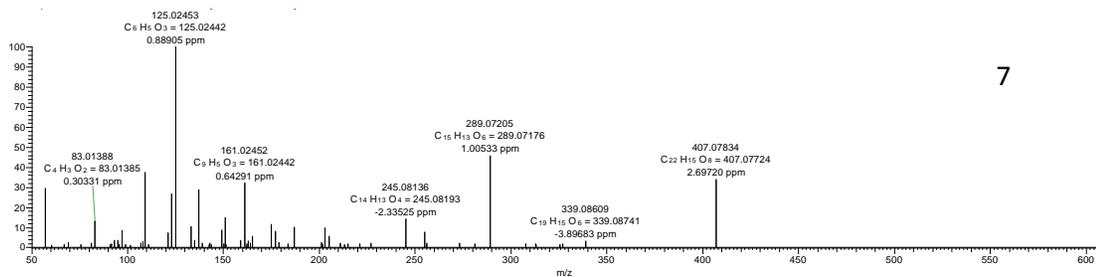
#### 4.9.2.3 Identificación de los compuestos fenólicos en F3E.

De igual forma utilizando estándares se identificaron, en la fracción tres aislada del epicarpio (F3E), compuestos presentes en el extracto purificado del epicarpio (EPE) (tabla 25). Sin embargo en esta fracción no fue posible identificar compuestos como: ácido ferúlico I, ácido ferúlico II, ácido sinápico, ácido siríngico y vainillina. En la figura 54 se muestra el cromatograma HPLC-ESI-MS de la fracción F3E en modo negativo.

Mediante el estudio de los fragmentos se identificaron parcialmente los compuestos 4, 38, 40 y 7. Los picos 4 y 7 con tiempos de retención 3,14 y 4,09 min se identificaron mediante el uso de estándares como procianidinas diméricas tipo B1 (Pico 4) y tipo B2 (Pico 7), mostrando un ión pseudomolecular a  $m/z$  577  $[M-H]^-$ ,  $C_{30}H_{26}O_{12}$ . Estos compuestos se encontraron en la fracción F2S aislada de la semilla y en la fracción F2E aislada del epicarpio. En la figura 81 se muestran los respectivos espectros MS/MS de los compuestos 4 y 7. Los espectros de masas se muestran en el anexo I.

**Figura 81.** Espectros MS-MS de los compuestos 4 y 7.



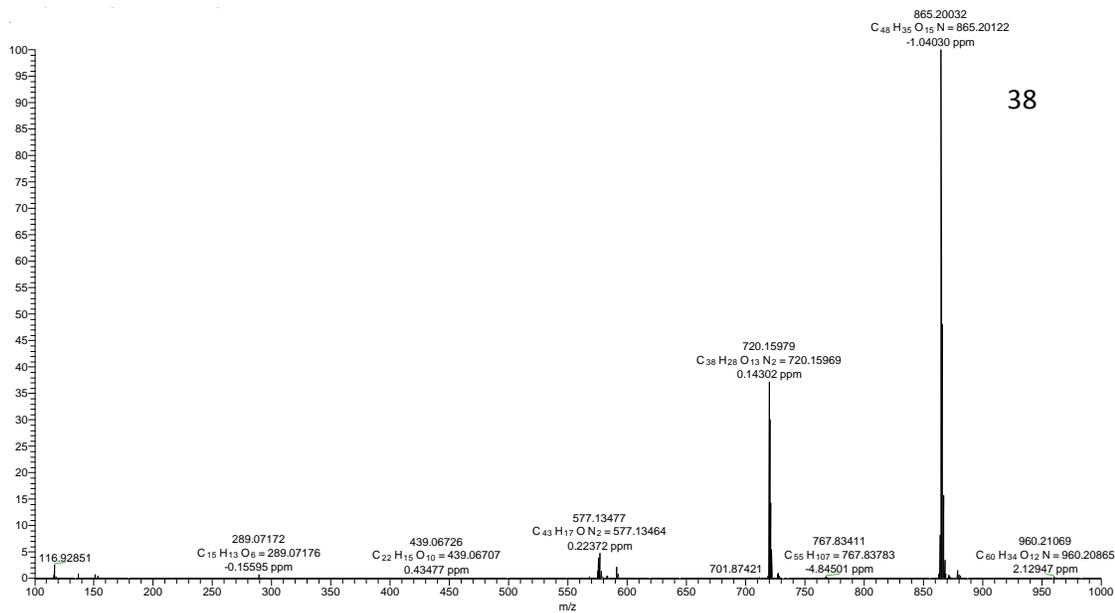


7

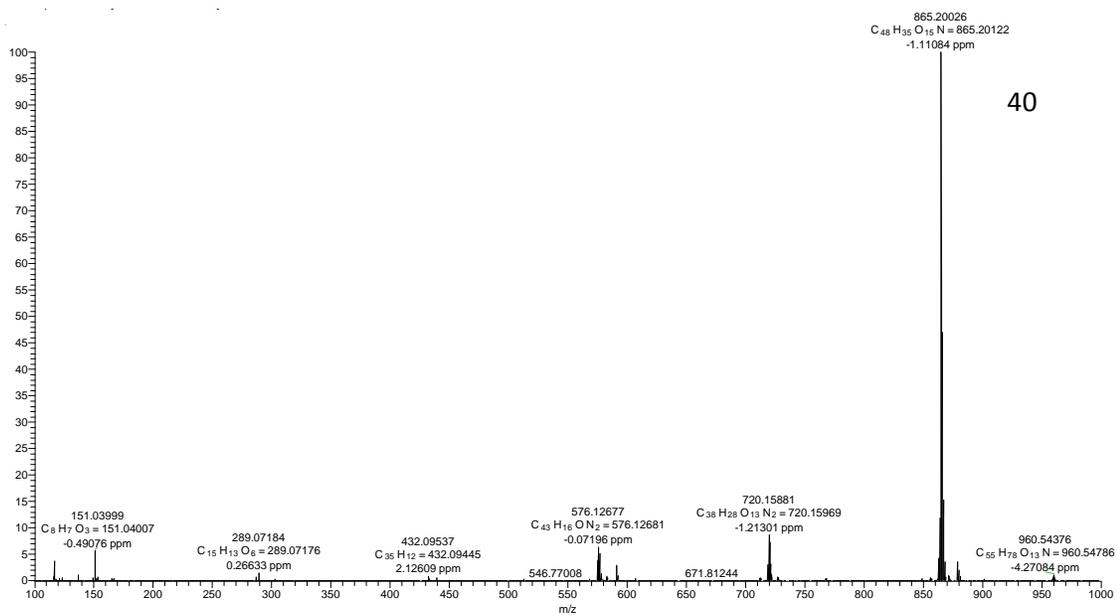
Fuente: Esta investigación.

Los picos **38** y **40** con tiempos de retención 3,35 y 3,83 min se identificaron como procianidinas triméricas tipo B. El espectro de masas muestra un ión pseudomolecular en  $m/z$  865 [M-H]<sup>-</sup>, C<sub>45</sub>H<sub>38</sub>O<sub>18</sub> (Figura 82). Estos compuestos se encontraron previamente en la fracción F3S aislada de la semilla.

**Figura 82.** Espectros de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 38 y 40.



38



Fuente: Esta investigación.

## CONCLUSIONES

- Mediante el diseño experimental se pudo establecer que los solventes empleados (acetona 70% y metanol 80%) para la extracción de fenoles y polifenoles de semilla y epicarpio del aguacate, no influyen significativamente ( $p < 0,05$ , nivel de confianza 95%) sobre el CFT y TEAC.
- Las técnicas de HPLC-ESI-MS y MS/MS permitieron la identificación en la semilla de diferentes ácidos fenólicos (ácido protocatéquico, quínico, cafeico, cafeoilquínico, p-cumárico, cumaroilquínico, ferúlico, sinápico, y cítrico), un aldehído (vainillina) y diversos compuestos fenólicos (catequina, epicatequina, rutina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina, apigenina, kaempferol, phloridzina, procianidinas diméricas tipo B1 y B2 y procianidinas triméricas tipo A y B. En el epicarpio se identificaron glicósidos de flavonoides como quercetina-3-O-glucósido, rutina, quercetina-3-O-arabinosido, quercetina-3-O-ramnosido entre otros y procianidinas diméricas y triméricas tipo A y B. En las fracciones más pesadas (F3S y F3E) aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño se identificaron principalmente procianidinas diméricas y triméricas.
- Se identificaron por primera vez en subproductos de aguacate los compuestos: ácido 4-*p*-O-cumaroilquínico, kaempferol, apigenina, phloridzina, un aducto dimérico del ácido cafeoilquínico y el ácido cafeoil-O- hexósido.
- El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y la prueba de múltiples rangos permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ , nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT y TEAC de todas las muestras (extractos purificados y fracciones). Los extractos crudos de semilla y epicarpio (ECS y ECE) mostraron valores relativamente bajos en el CFT y TEAC con respecto a los extractos purificados (EPS y EPE), se encontró que estos valores son mayores para EPE y EPS. El mayor CFT y TEAC lo presentaron las fracciones con peso molecular intermedio de la semilla y epicarpio (F2E y F2S) y las más pesadas (F3E y F3S), siendo las fracciones F2E y F2S quienes presentan los mayores valores.
- Se observó un comportamiento diferente para el caso de la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH, en donde no se obtuvo una correlación entre los valores DPPH y CFT; sin embargo las fracciones más pesadas (F3S y F3E) fueron las más antioxidantes (menor  $FRS_{50}$ ).
- Se comprobó que los subproductos de la fruta estudiada son una fuente promisoría de compuestos bioactivos que podrían ser de importancia en la industria alimentaria y farmacéutica, siendo más interesantes las fracciones con mayor peso molecular.

- La RED RIFRUTBIO continuará con las investigaciones en este campo, para las fracciones más activas (F2S, F2E, F3S y F3E) se evaluará el potencial efecto sobre la bacteria *H. pylori* asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, una enfermedad con alta ocurrencia en el Departamento de Nariño.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda la realización de la cuantificación mediante estándares de los compuestos mayoritarios de las fracciones más activas encontradas en los residuos de aguacate.

Se sugiere realizar un nuevo proceso de separación por cromatografía en columna a las fracciones más pesadas recolectadas en el proceso de fraccionamiento, y de esta forma simplificar en mayor medida este tipo de extractos facilitando el proceso de identificación de los compuestos poliméricos.

Por las características bioactivas encontradas en este trabajo para los residuos de aguacate, se recomienda seguir las investigaciones en este campo con el fin de evaluar alternativas de uso en el sector alimenticio o farmacéutico.

## PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

### PONENCIAS TIPO PÓSTER

**WARPA: 5th WORKSHOP IN RECENT ADVANCES ON SAMPLE PREPARATION, realizada desde 7 al 10 de Septiembre del 2015, Universidad de Caldas, Manizales-Colombia.**

- Resultado preliminares en la extracción y caracterización de principios activos polifenólicos con actividad antioxidante a partir de residuos de aguacate (*Persea americana*): semilla y epicarpio.

**V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, realizado desde 25 al 29 de Abril del 2016, Hotel Tequendama, Bogotá- Colombia.**

- Extracción, contenido fenólico y actividad antioxidante de los polifenoles aislados de residuos de aguacate, semilla y epicarpio (*Persea americana*).

**I Simposio de Ciencias Exactas y Naturales y III Jornada de actualización Científica en Química, realizado desde 24 al 27 de Octubre del 2016 , Universidad de Nariño , San Juan de Pasto-Colombia.**

- Extracción, contenido fenólico y actividad antioxidante de los polifenoles aislados de la semilla y epicarpio de aguacate (*Persea americana*).

### ARTÍCULO EN REDACCIÓN

- Rosero, C.J., Hurtado, N. H., Cruz S., Osorio C. Chemical study and antioxidant activity of polyphenols isolated from avocado by - products (*Persea americana* Mill) grown in Colombia. Food Chemistry.

## BIBLIOGRAFIA

ALAM, Md.Nur; JAHAN, Nusrat y RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. En: Saudi Pharmaceutical Journal, 2013. Vol. 21, no.2, p.143-152.

ALCALDÍA DE SANDONÁ- NARIÑO [en línea]. [citado el 28 de septiembre del 2016]. Disponible en: <[http://www.sandona-narino.gov.co/informacion\\_general.shtml](http://www.sandona-narino.gov.co/informacion_general.shtml)>

AMÓRTEGUI, Ignacio; CAPERA, Edgar y GODOY, José. El cultivo del aguacate: módulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. Ibagué: Corporación para la Promoción del Desarrollo Rural y Agroindustrial del Tolima (PROHACIENDO). MADR-PRONATTA, 2001. p.1-49

ARNAO, Marino. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. En: Trends in Food Science and Technology, 2011. vol.11, p. 419-421

AVELLO, M.; SUWALSKY, M. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. En : Revista Atenea- Universidad de Concepción, 2006. vol.494, p.161-172.

BASANTE, Jessica. Estudio de la composición y actividad antioxidante *In Vitro* de la fracción polifenólica de subproductos de aguacate (*Persea americana* Mill), semilla y epicarpio. San Juan de Pasto, 2016, 141p. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química.

BAZYLAK, Grzegorz; ROSIAK, Andrzej y SHI, Cheng-Yang. Systematic analysis of glucoiridoids from *Penstemon serrulatus* Menz. by high-performance liquid chromatography with pre-column solid-phase extraction. En: Journal of Chromatography A, 1996. vol. 725, no.1, p. 177-187

BERNAL ESTRADA, Jorge, *et al.* Manual técnico, actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas en el cultivo de aguacate. 2 ed. Medellín: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), 2014. p.1-410

BETANCUR-ANCONA, David, *et al.* Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. En: Food and Bioproducts Processing, 2016. vol. 100. p.457-463.

BLASA, Manuela, *et al.* Fruit and vegetable antioxidants in health. En: WATSON, Ronald y PREEDY, Victor (Eds.). Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables. San Diego, CA: Academic Press Inc., 2010. p. 37-58.

BOYSEN, Reinhard y HEARN, Milton. High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. En: LIU, Hung-wen y MANDER, Lew (Eds.). Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. Oxford: Elsevier Inc., 2010. 5-45.

BRAVO, Laura; GOYA, Luis y LECUMBERRI, Elena. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St.Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. En: Food Research International, 2007. vol. 40, no.3, p. 393–405.

CAI, Y.; SUN, M. y CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol. 51, no 8, p. 2288-2294.

CALLEMIEN, D. y COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. En: Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2008. vol. 66, p.109–115.

CARRASCO-PANCORBO, Alegría; HURTADO-FERNÁNDEZ, Elena y FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto. 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, no. 6, p 2255–2267.

CARRASCO-PANCORBO, Alegría, *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: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, no. 4. vol. 141, p.3492–3503.

ÇEKİÇ, Çetin y ÖZGEN, Mustafa . Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). En: Journal of Food Composition and Analysis, 2010. vol. 23, no.6, p.540–544

CHEN, Jun ; SONG, Yue y LI, Ping. Capillary high-performance liquid chromatography with mass spectrometry for simultaneous determination of major flavonoids, iridoid glucosides and saponins in Flos Lonicerae. En: Journal of Chromatography A, 2007. vol.1157, no.1-2 , p.217–226

CHÁVEZ, Felipe, *et al.* Los polifenoles antioxidantes extraídos 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, no.3, p. 265 - 280.

CHUL SHIN, Sung, *et al.* Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb. using liquid chromatography .tandem mass spectrometry: Contribution to the overall antioxidant activity. En: Food Chemistry, 2012. vol.134, no. 1, p. 572 –577.

CHUN, OCK, *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2011. vol.24, no. 7, p.1043-1045

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

CORRALES, M. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. En: Journal of Food Engineering, 2009.vol.90,no.4,p.415–421.

COWAN, A.K. y WOLSTENHOLME, B.N. Avocado. En: SMITHERS, Geoffrey (Ed.). Reference module in food science: Encyclopedia of food and health. Oxford: Elsevier Inc., 2016.

CUYCKENS, Filip, *et al.* Structural characterization of flavonol di-O-glycosides from *Farsetia aegyptia* by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. En: Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2005. vol.19,no.15,p. 2172–2178

CUYCKENS, Filip y CLAEYS, Magda. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. En: Journal of Mass Spectrometry, 2004.vol.39, no.1, p. 1-15.

CUYCKENS, Filip y CLAEY Magda. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. En: Journal of Mass Spectrometry, 2005.vol. 40, no. 3, p. 364–372.

D' ARCHIVIO, Massimo, *et al.* Polyphenols, dietary, sources and bioavailability. En: Annali dell' Istituto Superiore di Sanità, 2007. vol. 43, no. 4, p.348 –361.

DAI, G.H., *et al.* Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). En: European Journal of Plant Pathology,1995. vol.101, no.5, p. 541–547.

DAI,Q., *et al.* Fruit and vegetable juices and Alzheimer 's disease: The Kame Project. En: The American Journal of Medicine,2006. vol.119,no.9,p.751 .759.

DE ARRIOLA, María del Carmen; MENCHÚ, Juan Francisco y ROLZ, Carlos. The Avocado. En: INGLETT, George y CHARALAMBOUS, George (Eds.). Tropical Foods: Chemistry and Nutrition. New York: Academic Press, Inc.,1979.p. 609-624.

DE FREITAS, Victor, *et al.* Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. En: Phytochemistry, 1998. vol.38, no.4, p. 1435-1441

DE PASCUAL-TERESA, S. y SANCHEZ-BALLESTA,M.T. Anthocyanins:From plant to health.A review. En: Phytochemistry, 2008. vol. 7,p. 281 .299.

DOMINGUEZ, Mariana,*et al.* Cespedes,Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*.En: Pharmaceutycal Biology,2011.vol.49,no.2, p.118-124.

ESTÉVES, Mario, *et al.* Avocado (*Persea americana* Mill) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 59,no.10,p. 5625,5635.

ESTÉVES, Mario, *et al.* Formation of Lysine-Derived Oxidation Products and Loss of Tryptophan during Processing of Porcine Patties with Added Avocado Byproducts. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. vol. 60, no.15,p.3917-3926.

FERNÁNDEZ DE SIMÓN, Brigida, *et al.* Phenolic Compounds in Cherry (*Prunus avium*) Heartwood with a View to Their Use in Cooperage. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. vol. 58,no.8,p. 4907–4914.

GANGOPADHYAY, Nirupama, *et al.*, Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. En: Food Chemistry, 2016. vol. 210, p.212–220.

GARCÍA PARRILLA, M.C., *et al.* Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. En: Talanta, 2007.vol.71,no.1,p.230–235.

GIFFONI, J.,*et al.* Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea Americana* (avocado) seed extracts.En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009.vol. 42, no.2 ,p.110 .113.

GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, *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.

GORINSTEIN, Shela,*et al.*Comparative characterisation of durian, mango and avocado. En: International Journal of Food Science and Technology, 2010. vol. 45,no.5, p.921 -929.

GOSCH,Christian;HALBWIRTH, Heidi y STICH, Karl. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. En: Phytochemistry, 2010.vol. 71, no.8-9, p. 838 .843

GOSCH, Christian *et al.* Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.)En: Plant Science, 2009.vol.176, p. 223–231.

GOUVEIA, Sandra y CASTILHO, Paula. Validation of a HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia.En: Food Research International, 2012. vol.45,no.1,p.362-368.

GU, Liwei; BOSTIC, Terrell y WANG, Wei. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. vol. 122,no.4,p.1193-1198.

GU, Liwei y SANDHU, Amandeep. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine

Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MS. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010.vol. 58,no.8, p. 4681–4692.

GUZZETA, A. Reverse Phase HPLC Basics for LC / MS. [En línea]. [Citado el 15 de Agosto de 2016].Disponible en:<<http://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm> >.

HAIMING, Ding, *et al.* Chemopreventive characteristics of avocado fruit. En: Seminars in Cancer Biology, 2007. vol. 17,no.5,p.386–94.

HAMINIUK, Charles , *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. En: International Journal of Food Science and Technology, 2012. vol. 47, no. 10, p.1-22.

HARBORNE, Jeffrey ; BAXTER, Herbert y MOSS, Gerard. Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants.London: Taylor & Francis Ltd., 1999. p 1-985

HASLAM, E., Practical Polyphenols: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. 1998, Cambridge: Cambridge University Press, .

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. En: Pharmacology & Therapeutics, 2002. vol. 96, no. 2-3, p. 67– 202.

HELLSTRÖM , J y MATILLA, P. HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. vol.56, no.17, p. 7617-7624.

HERTOG, M. G., *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. En: The Lancet, 1993. vol. 342, no.8878, p.1007-1011.

HOFMANN, Tamas; NEBEHAJ, Esztella y ALBERT, Levente. Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of European hornbeam (*Carpinus betulus* L.)leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry.En: Industrial Crops and Products, 2016. vol. 87, p.340 –349

HOWELL, A.B., *et al* .A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity.En: Phytochemistry,2005. vol. 66, no.18,p.2281 .2291.

HUA-BIN, LiA, *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. En : Food Chemistry, 2011. vol. 129, no.2,p.345 –350

HURST, Roger y HURST, Suzanne. Fruits and vegetables as functional foods for exercise and Inflammation. En: Ronald Ross Watson y PREEDY,Victor (Eds.). Bioactive foods and chronic disease states: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Oxford: Elsevier Inc., 2013.p. 319-336.

IGNAT, Ioana ; VOLF, Irina y POPA, Valentin. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. En: Food Chemistry, 2011.vol.126,no.4, p. 1821–1835.

ISAZA MARTÍNEZ, J.H. Taninos o polifenoles vegetales. En: *Scientia Et Technica*,2007.vol.13, no.33,.p. 13-18.

ISOE, Sachihiko. Progress in the Synthesis of Iridoids and Related Natural Products. En: RAHMAN, Atta-ur (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry. Oxford: Elsevier Inc.,1995.p. 289-320.

JERZ, Gerold; GUTZEIT, Derek y WINTERHALTER, Peter. Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols.En:Journal of Chromatography A, 2007. vol. 1172, no.1, p.40–46.

KAPOOR, Harish y KAUR, Charanjit. Review Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. En: International Journal of Food Science and Technology,2001.vol.36,no. 7,p.703-725.

KIM, Dae-Ok. y LEE, Chang Yee. Extraction and isolation of polyphenolics. En: Current Protocols in Food Analytical Chemistry , 2002. NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. I:11:11.2

KOLNIAK-OSTEK, Joanna y OSZMIAŃSKI, Jan. Characterization of phenolic compounds in different anatomical part ( *Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS).En: International Journal of Mass Spectrometry, 2015. vol.392, p.154 – 163

KOLNIAK-OSTEK, Joanna; OSZMIAŃSKI , Jan y BIERNAT, Agata. The Content of Phenolic Compounds in Leaf Tissues of *Aesculus glabra* and *Aesculus parviflora* Walt. En : Molecules, 2015. vol. 20, no. 2, p. 2176-2189.

KONTOGIANNI, G. Vassiliki. Novel Techniques Towards the Identification of Different Classes of Polyphenols (Capítulo 8). En: WATSON, Ronald(Ed.).Polyphenols in plants: Isolation purification and extract preparation. San Diego CA: Academic Press Inc., 2014.p.159-185

KOSHIHARA ,Yasuko., *et al.* Cafeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis . En: Biochimica Biophysica Acta, 1984. vol. 792, no.1 , p. 92-97.

KOSIŃSKA, Agnieszka, *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, no.18, p.4615-4616.

KRISHNAIAH, Duduku.; ROSALAM, Sarbatly y RAJESH, Nithyanandam. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. En: Food Bioproducts Processing, 2011. vol. 89,no. 3, p. 217–233.

KUCHARSKA , Alicja, *et al.* Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. En: Journal of Functional Foods, 2016, vol. 21,p. 33–146

LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa María, *et al.* Improved characterization of polyphenols using liquid chromatography (Capítulo 14). En: WATSON, Ronald (Ed.). Polyphenols in plants. Oxford: Elsevier Inc.,2014. p. 261-292.

LAMUELA-RAVENTOS, Rosa, *et al.* A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC .ESI-LTQ-Orbitrap-MS). En: Food Chemistry, 2015. vol.169, p.336 –343.

LE GUERNEVE´, Christine, *et al.* New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin.En:Tetrahedron Letters, 2004.vol.45,p.6673–6677.

LI, Shao-Hua, *et al.* Analysis of flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera* ) leaves using high performance liquid chromatography/photodiode array detector tandem electrospray ionization mass spectrometry and an extraction method optimized by orthogonal design. En: Journal of Chromatography A, 2012. vol. 1227, p.145 – 153.

LIANG, Xin-miao , *et al.* Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry.En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. vol. 46,no.3, p. 418–430.

LOCK, O. Colorantes Naturales.1 ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1997. p.279

LUCCI, Paolo; SAURINA, Javier y NÚÑEZ, Oscar. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. En: Trends in Analytical Chemistry, 2017. vol.88.p.1-24.

MANCUSO, S., *et al.* Quercetin enhances transforming growth factor beta I secretion by human ovarian cancer cells. En: International Journal of Cáncer, 1994.vol.57,no.2,p.211-215.

MARCANO, D.; HASEGAWA M. Fitoquímica orgánica, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.2 ed. Venezuela: Editorial Torino, Venezuela, 2002. p.594

MARCH, Raymond E., *et al.* A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. En:International Journal of Mass Spectrometry, 2006. vol. 248,no.1-2 p. 61–85.

MARTÍNEZ-LAS,Ruth, *et al.* Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). En: Journal of Functional Foods, 2016.vol. 23,p. 370–377

MENA, Pedro, *et al.* (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Mmostróorus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach. En: Food Chemistry, 2016.vol. 212, p. 250-255.

MEYER, Anne; HEINONEN, Marinay FRANKEL, Edwin. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. En: Food Chemistry, 1998.vol. 61, no.1-2,p. 71-75.

MIDDLETON, E. Jr.; KANDASWAMI, C. y THEOHARIDES, T.C.The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. En: Pharmacological Reviews, 2000.vol 52, no.4,p. 673-751.

NAMIKI, Mitsuo. Antioxidants/antimutagens in food. En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1990.vol.29, no.4, p.273-300.

NAVARRO, M.,*et al.* Characterization of fruit products by capillary zone electrophoresis and liquid chromatography using the compositional profiles of polyphenols: application to authentication of natural extracts. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014.vol.62, no.5 ,p. 1038-1046

NIEVA MORENO, María, *et al.* Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. En: Journal of Ethnopharmacology, 2000. vol. 71.no.1-2,p. 109–114.

ORTIZ-MORENO, Alicia . Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. En: Food Research International, 2011,vol.44,no.7,p. 2160–2168

PAN, M.H.; LAI, C.S. y HO,C.T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids.En: Food and Function, 2010.vol.1,p.15-31.

PEÑARRIETA, J. M., *et al.* Total antioxidant activity in Andean food species from Bolivia. En: Revista Boliviana de Química, 2005. vol. 22, no.1,p.89-93.

PIETTA, Piergiorgio; MINOGGIO, Markus y BRAMATI,Lorenzo. Plant polyphenols:structure, occurrence and bioactivity. En: RAHMAN, Atta-ur (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry. Oxford: Elseiver Inc., 2003. p. 257-312.

PIOTROWSKA, Alicja y BAJGUZ, Andrzej. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. En: Phytochemistry, 2011. vol.72, p. 2097–2112

QIAO ,Yan-jiang, *et al.* A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap–Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in Flos Lonicerae Japonicae.En: Talanta,2016.vol. 147, p.16–27.

Química nova. [En línea]. Citado el 25 de mayo del 2017] Disponible en:<<http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/images/v37n3a19-sch03.jpg>>

RASCO, Bárbara, *et al.* Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. En: Food Chemistry, 2011.vol.129, no.2,p. 637-644

REIS GIADA, Maria de Lourdes. Food Phenolic Compounds:Main Classes,Sources and Their Antioxidant Power. En: MORALES-GONZALES, Jose A. (Ed.). Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A role for Antioxidants. p. 87-112

RESTREPO, Juan, *et al.* Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C.: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2012. p.1-75

RICE-EVANS, Katherine ; MILLER, Nicholas y PAGANDA, George. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. En: Free Radical Biology & Medicine, 1996. vol. 20, no. 7, p. 933-956

RIOS DE SOUZA, Vanessa, *et al.* Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. En: Food Chemistry, 2014. vol.156, p.362–368

RÍOS-CASTAÑO, D. Y TAFFUR-REYES,R.Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia. En: Actas V Congreso Mundial del Aguacate, 2003.vol.2,p.143-147.

ROBBINS,Rebecca. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol.51,no.10, p. 2866–2887.

RODRIGUEZ-PEREZ,C.,*et al.* A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. En: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2013.vol. 77,no ,p.167 .174.

SAKANAKA, Senji; TACHIBANA, Yumi y OKADA, Yuki. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). En: Food Chemistry,2005.vol. 89, no. 4, p. 569–575.

SANTOS-BUELGA,C ; KOLODZIEJ , H. y TREUTTER , D. Procyanidin trimers possessing a doubly linked structure from *Aesculus hippocastanum*. En: Phytochemistry,1995. vol.38, no.2, p. 499-504.

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,no.2, p. 270-276.

SANDHU, AK y GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As determined by HPLC-DAD-ESI-MS(n). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010.vol.58.no.8,p.4681-4692

SARIBURUN, Esra, *et al.* Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. En :Journal of Food Science, 2010. vol. 75, no.4, p. 328-335

SASSAKI, Guilherme , *et al.*UPLC-PDA .MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions,treatments and ageing. En: Food Chemistry, 2011. vol. 129, no.4, p.1453 .1461.

SEGUNDO, A. Marcela, *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. En: Analytica Chimica Acta, 2008.vol.613,no.1, p.1–19.

SEGURA-CARRETERO, Antonio, *et al.* Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). En: Food Research International, 2013. vol. 51,no.1,p.354- 362.

SEGURA-CARRETERO, Antonio,*et al.* Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. En: Food Research International, 2015. vol.78, p.246- 257.

SCALBERT, A., *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases.En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. vol.45,no.4,p.287 –306.

SHAHIDI, Fereidoon y AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. En: Journal of functional foods, 2015.vol.18,p. 820–897.

SHAHIDI, Fereidoon y NACZK, Marian. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, vol. 41,no.5, p.1523–1542

SHAHIDI, Fereidoon y ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. En: Journal of functional foods, 2015. vol.18, p.757–781

STALIKAS, Constantine. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods (Capítulo 5). En: UPPU, R.M, *et al* (Eds.). Free Radicals and Antioxidant Protocols. Serie: Methods in Molecular Biology. San Diego CA: Editorial Humana Press, 2010. p. 65–90.

STOBIECKI, Maciej. Review: Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. En: Phytochemistry, 2000. vol. 54, no. 3, p.237-256.

SU, Dan, *et al.* Comparative pharmacokinetics and tissue distribution study of mono-, and di-caffeoylquinic acids isomers of *Ainsliaea fragrans* Champ by a fast UHPLC- MS/MS method.En: Fitoterapia, 2014. vol. 99, no, p. 139-152.

SUD'INA, G. F. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. En:Federation of European Biochemical Societies,1993. vol.329, no.1-2, p.21-24.

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

SUN ,Chunli ,*et al.* Phenolics and abscisic acid identified in acacia honey comparing different SPE cartridges coupled with HPLC-PDA. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2016.vol. 53, p.91-101

SUN, Yong, *et al.* Rapid characterization of chemical constituents in Radix Tetrastigma, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant/antiproliferative activities. En: Journal of Functional Foods, 2015.vol.18, p. 300–318.

THABTI, Inés *et al.* Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian Morus species by HPLC-DAD and HPLC–MS. En: Journal of Functional Foods, 2012.vol 4,no.1, p. 367- 374.

THOMPSON, Richard. y LOBRUTTO, Rosario. Role of HPLC in process development. En: KAZAKEVICH, Yuri y LOBRUTTO, Rosario.HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.p. 641–677.

TODOROKI , Yasushi, HIRAI, Nobuhiro y OHIGASHI, Hajime. Synthesis, biological activity and metabolism of (S)-(+)-3'-Fluoroabscisic acid. En: Tetrahedron, 1995. vol.51, no. 51, p. 6911-6926.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.;FERRERES, F. y GIL, M. I., Antioxidant phenolic metabolites from fruits and vegetables and changes during postharvest storage and processing. En: RAHMAN, Atta-ur (Ed.).Studies in Natural products Chemistry: Bioactive natural products (Parte D).Amsterdam: Elseiver, 2000.p. 739-735

VALLABHANENI, Prashanthi, *et al.* Characterization of flavonol glycosides in individual Arabidopsis root tips by flow injection electrospray mass spectrometry.En: Phytochemistry, 2012. vol. 73,p. 114 .118

VASCO, Catalina; RUALES, Jenny y KAMAL-ELDIN, Afaf. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. En: Food Chemistry, 2008. vol. 111,no.4,p. 816–823.

VALLS, Josep, *et al.* Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. En: Journal of Chromatography A, 2009. vol.1216, no.43, p.7143–7172.

VAN CAMP,John, *et al.* Ultra(high)-pressure liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste. En: Journal of Chromatography A, 2014. vol. 1323, p. 39 – 48.

WU, Li-chen, *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. En: Food Chemistry, 2006. vol. 95,no.2, p. 319–327

YABRUDY, Javier. El aguacate en Colombia: Estudio del caso de los Montes de María, en el Caribe Colombiano. En: YABRUDY, Javier (Ed.). Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER). No.171. Cartagena: Editorial Banco de la República, 2012, p.1-45.

YAHIA, E. M. y WOOLF, A. B. Avocado (*Persea American Mill.*). En: YAHIA. Elhadi (Ed.). Postharvest biology technology of tropical and subtropical fruits: Açai to Citrus. No.207. Cambridge: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, 2011. p.125-185.

YANG, Baoru, *et al.* Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica L.*) Fruits by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012.vol.60,no.35,p.8672-8683.

YE, Min; YAN, Yuning y GUO,D.A.. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. En: Rapid Communication in Mass Spectrometry,2005.vol.19,no.11, p.1469–1484.

YOSHIDA, T.; ITO, H., e ISAZA MARTÍNEZ, J.H..Pentameric ellagitannin oligomers in *melastomataceous* plants--chemotaxonomic significance.En:Phytochemistry,2005.vol. 66, no. 17, p.1972-1983.

ZOHAR, Kerem, *et al.* Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica L.*). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. vol.54, no.20,p.7717-7723

ZHU, Hongbin, *et al.* Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea L.* by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. En: Food Analytical Methods, 2010.vol.3, p. 90-97

## ANEXOS.

**Anexo A.** Datos para la construcción de curvas de calibración.

**Tabla 1.** Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado en la determinación de flavonoides totales empleando como patrón catequina.

<b>Concentración de catequina(mg/L)</b>	<b>Absorbancia± desviación estándar <sup>a</sup></b>
10	0,052± 0,002
30	0,107± 0,004
60	0,201± 0,004
100	0,341± 0,012
150	0,519±0,012
200	0,768± 0,005

<sup>a</sup>DS de tres réplicas

**Tabla 2.** Datos para la curva de calibración con DPPH.

<b>Concentración de DPPH (mM)</b>	<b>Absorbancia± desviación estándar</b>
<b>0,0025</b>	0,033±0,003
<b>0,005</b>	0,058±0,001
<b>0,0075</b>	0,087±0,003
<b>0,01</b>	0,117±0,002
<b>0,02</b>	0,249±0,004
<b>0,03</b>	0,357±0,007
<b>0,04</b>	0,514±0,009
<b>0,05</b>	0,598±0,003

**Tabla 3.** Datos para la curva de calibración con patrón de ácido gálico

<b>Concentración de ácido gálico <sup>a</sup></b>	<b>%DPPH Remanente</b>
<b>30</b>	53,8295512
<b>40</b>	31,1734202
<b>60</b>	15,8404831
<b>70</b>	14,9822963

**Anexo B.** Prueba de múltiples rangos para las metodologías TEAC, DPPH y FT.

**Tabla 1.** Pruebas de Múltiple Rangos para valores CFT por fracciones y extractos purificados.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EPS - F1S	*	10,8041	1,33083
EPS - F2S	*	5,79845	1,33083
EPS - F3S	*	6,35032	1,33083
EPS – EPE	*	6,28036	1,33083
EPS - F1E	*	13,61	1,33083
EPS - F2E	*	4,65586	1,33083
EPS - F3E	*	6,43582	1,33083
F1S - F2S	*	-5,00564	1,33083
F1S - F3S	*	-4,45377	1,33083
F1S – EPE	*	-4,52373	1,33083
F1S - F1E	*	2,80595	1,33083
F1S - F2E	*	-6,14823	1,33083
F1S - F3E	*	-4,36827	1,33083
F2S - F3S		0,551864	1,33083
F2S – EPE		0,481909	1,33083
F2S - F1E	*	7,81159	1,33083
F2S - F2E		-1,14259	1,33083
F2S - F3E		0,637363	1,33083
F3S – EPE		-0,0699545	1,33083
F3S - F1E	*	7,25973	1,33083
F3S - F2E	*	-1,69445	1,33083
F3S - F3E		0,0855	1,33083
EPE - F1E	*	7,32968	1,33083
EPE - F2E	*	-1,6245	1,33083
EPE - F3E		0,155455	1,33083
F1E - F2E	*	-8,95418	1,33083
F1E - F3E	*	-7,17423	1,33083
F2E - F3E	*	1,77995	1,33083

**Tabla 2.** Pruebas de Múltiple Rangos para valores DPPH por fracciones y extractos purificados.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
EPS - F1S		-100,951	132,451
EPS - F2S		-14,1843	132,451
EPS - F3S		3,82	132,451
EPS - EPE		7,5312	132,451
EPS - F1E	*	-283,407	132,451
EPS - F2E		5,4075	132,451

EPS - F3E		10,3339	132,451
F1S - F2S		86,767	132,451
F1S - F3S		104,771	132,451
F1S - EPE		108,483	132,451
F1S - F1E	*	-182,456	132,451
F1S - F2E		106,359	132,451
F1S - F3E		111,285	132,451
F2S - F3S		18,0043	132,451
F2S - EPE		21,7155	132,451
F2S - F1E	*	-269,223	132,451
F2S - F2E		19,5918	132,451
F2S - F3E		24,5182	132,451
F3S - EPE		3,7112	132,451
F3S - F1E	*	-287,227	132,451
F3S - F2E		1,5875	132,451
F3S - F3E		6,5139	132,451
EPE - F1E	*	-290,938	132,451
EPE - F2E		-2,1237	132,451
EPE - F3E		2,8027	132,451
F1E - F2E	*	288,815	132,451
F1E - F3E	*	293,741	132,451
F2E - F3E		4,9264	132,451

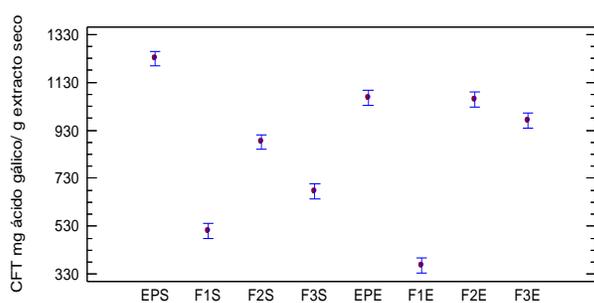
**Tabla 3.** Pruebas de Múltiple Rangos para valores FT por fracciones y extractos purificados.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
EPS - F1S	*	406,306	32,0466
EPS - F2S	*	65,3153	32,0466
EPS - F3S	*	65,7658	32,0466
EPS - EPE	*	-75,2252	32,0466
EPS - F1E	*	446,847	32,0466
EPS - F2E	*	-117,568	32,0466
EPS - F3E	*	33,7838	32,0466
F1S - F2S	*	-340,991	32,0466
F1S - F3S	*	-340,541	32,0466
F1S - EPE	*	-481,532	32,0466
F1S - F1E	*	40,5405	32,0466
F1S - F2E	*	-523,874	32,0466
F1S - F3E	*	-372,523	32,0466
F2S - F3S		0,45045	32,0466
F2S - EPE	*	-140,541	32,0466
F2S - F1E	*	381,532	32,0466
F2S - F2E	*	-182,883	32,0466
F2S - F3E		-31,5315	32,0466
F3S - EPE	*	-140,991	32,0466
F3S - F1E	*	381,081	32,0466

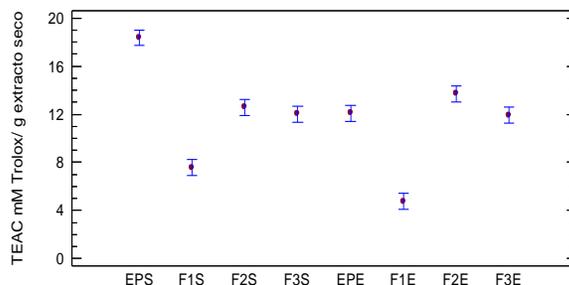
F3S - F2E	*	-183,333	32,0466
F3S - F3E		-31,982	32,0466
EPE - F1E	*	522,072	32,0466
EPE - F2E	*	-42,3423	32,0466
EPE - F3E	*	109,009	32,0466
F1E - F2E	*	-564,414	32,0466
F1E - F3E	*	-413,063	32,0466
F2E - F3E	*	151,351	32,0466

**Anexo C.** Gráficas de comparación de medias de extractos purificados y fracciones de epicarpio y semilla obtenidos en las metodologías de CFT, TEAC, DPPH y FT.

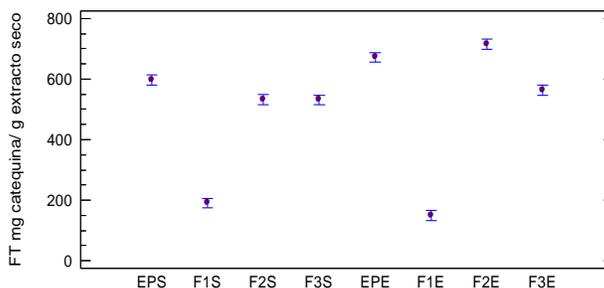
**Figura 1.** Gráfica de medias para los valores de CFT en extractos purificados y fracciones aisladas de semilla y epicarpio de aguacate.



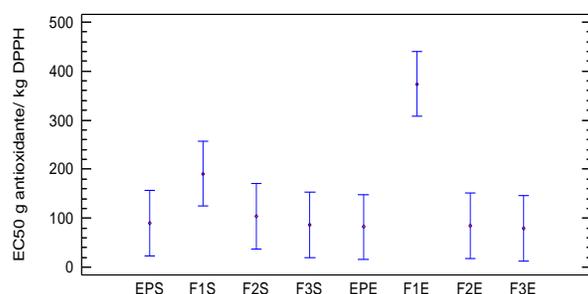
**Figura 2.** Gráfica de medias para los valores TEAC en extractos purificados y fracciones aisladas de semilla y epicarpio de aguacate.



**Figura 3.** Gráfica de medias para los valores de FT en extractos purificados y fracciones aisladas de semilla y epicarpio de aguacate.



**Figura 4.** Gráfica de medias para los valores DPPH en extractos purificados y fracciones aisladas de semilla y epicarpio de aguacate.

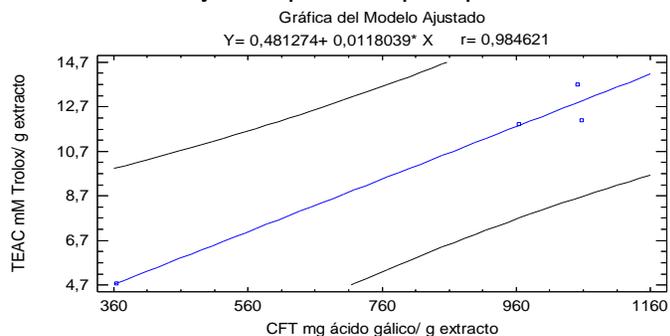


**ANEXO D.** Análisis de varianza y gráficas de correlaciones

**Tabla 1.** Análisis de varianza de valores CFT y TEAC en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	46,3409	1	46,3409	63,53	0,0154
Residuo	1,45893	2	0,729464		
Total (Corr.)	47,7999	3			

**Figura 1.** Correlación entre TEAC y CFT para el epicarpio.



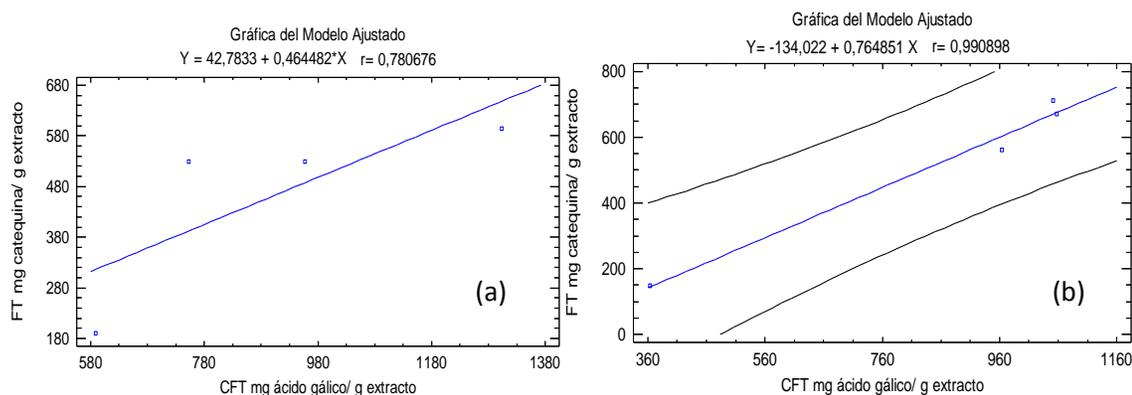
**Tabla 2.** Análisis de varianza de valores CFT y FT en fracciones y extractos purificados de semilla.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	61397,5	1	61397,5	3,12	0,2193
Residuo	39344,2	2	19672,1		
Total (Corr.)	100742,	3			

**Tabla 3.** Análisis de varianza de valores CFT y FT en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	194565,	1	194565,	108,37	0,0091
Residuo	3590,85	2	1795,42		
Total (Corr.)	198156,	3			

**Figura 2.** Correlación entre CFT y FT para la semilla (a) y epicarpio (b).



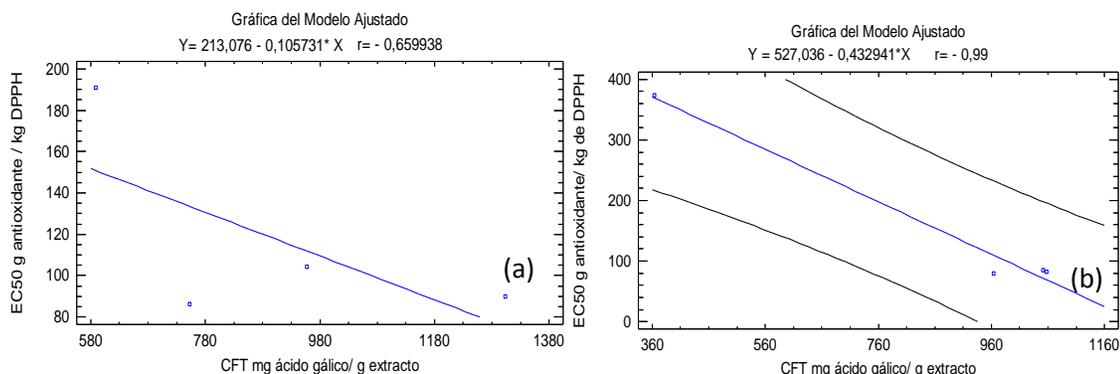
**Tabla 4.** Análisis de varianza de valores CFT y DPPH en fracciones y extractos purificados de semilla.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3181,37	1	3181,37	1,54	0,3401
Residuo	4123,43	2	2061,72		
Total (Corr.)	7304,8	3			

**Tabla 5.** Análisis de varianza de valores CFT y DPPH en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	62340,2	1	62340,2	98,50	0,0100
Residuo	1265,76	2	632,88		
Total (Corr.)	63605,9	3			

**Figura 4.** Correlación entre CFT y DPPH para la semilla (a) y el epicarpio (b).



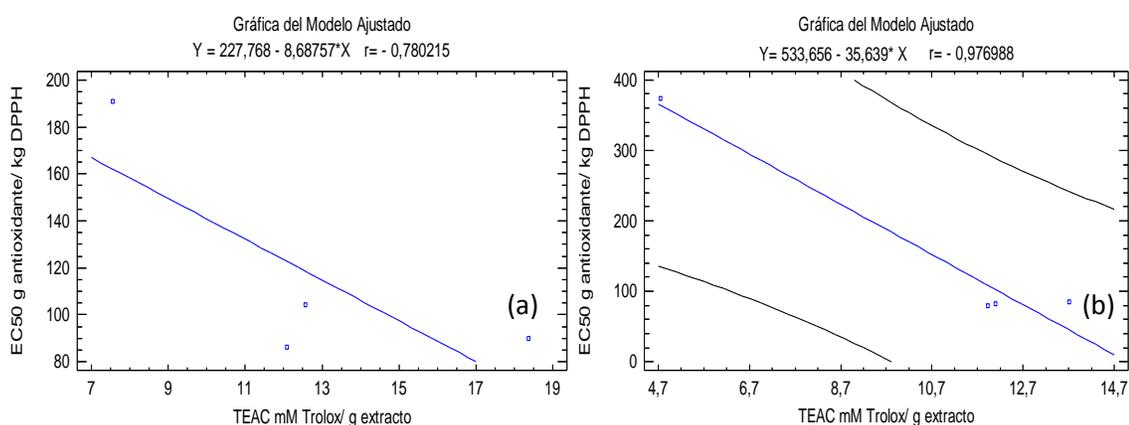
**Tabla 6.** Análisis de varianza de valores TEAC y DPPH en fracciones y extractos purificados de semilla.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4446,69	1	4446,69	3,11	0,2198
Residuo	2858,11	2	1429,05		
Total (Corr.)	7304,8	3			

**Tabla 7.** Análisis de varianza de valores TEAC y DPPH en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	60712,3	1	60712,3	41,96	0,0230
Residuo	2893,68	2	1446,84		
Total (Corr.)	63605,9	3			

**Figura 6.** Correlación entre TEAC y DPPH para la semilla (a) y el epicarpio (b).



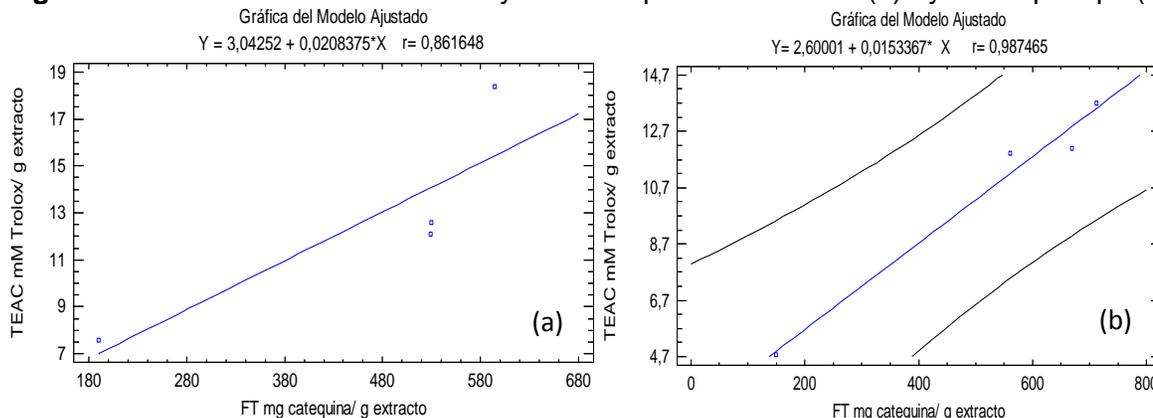
**Tabla 8.** Análisis de varianza de valores FT y TEAC en fracciones y extractos purificados de semilla.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	43,7422	1	43,7422	5,77	0,1384
Residuo	15,1748	2	7,58741		
Total (Corr.)	58,917	3			

**Tabla 9.** Análisis de varianza de valores FT y TEAC en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	46,609	1	46,609	78,28	0,0125
Residuo	1,19086	2	0,595431		
Total (Corr.)	47,7999	3			

**Figura 8.** Correlación entre FT y TEAC para la semilla(a) y el epicarpio(b).



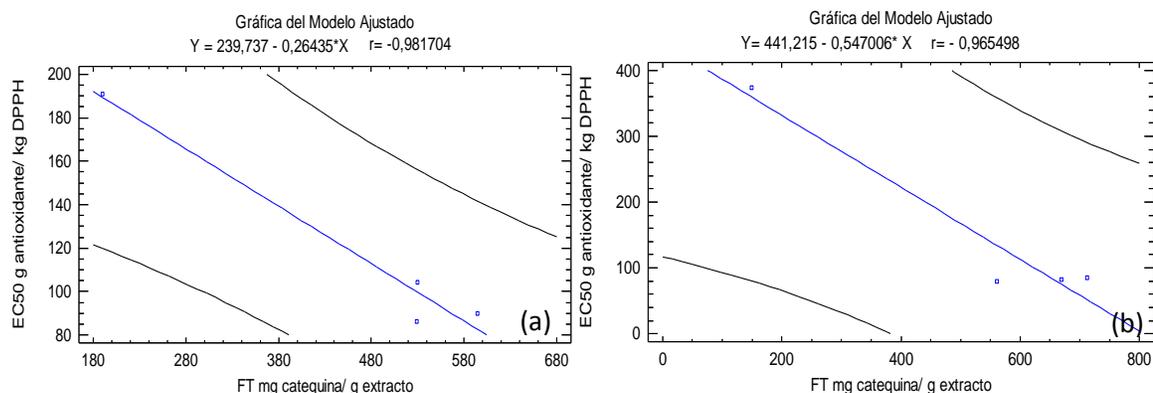
**Tabla 10.** Análisis de varianza de valores FT y DPPH en fracciones y extractos purificados de semilla.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7039,95	1	7039,95	53,16	0,0183
Residuo	264,851	2	132,426		
Total (Corr.)	7304,8	3			

**Tabla 11.** Análisis de varianza de valores FT y DPPH en fracciones y extractos purificados de epicarpio.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	59291,3	1	59291,3	27,48	0,0345
Residuo	4314,61	2	2157,31		
Total (Corr.)	63605,9	3			

**Figura 10.** Correlación entre FT y DPPH para la semilla y epicarpio.



**ANEXO E.** Concentraciones y % DPPH remanente para extractos purificados y fracciones de semilla y epicarpio.

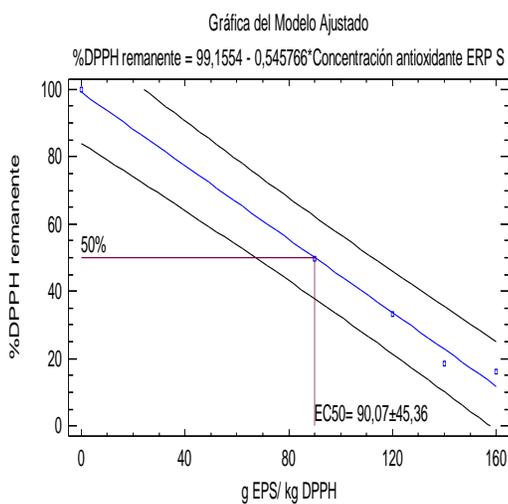
<i>Extracto</i>	<i>C extracto<sup>a</sup></i>	<i>% [DPPH ·] Remanente</i>
EPS	90	48,43645035
	120	33,91150678
	140	18,57962191
	160	15,51324493
F1S	90	82,37464068
	120	63,8568581
	140	55,43461361
	170	45,8410636
F2S	70	72,3481796
	90	57,8309739
	120	39,9725066
	140	27,7596193
F3S	90	48,85206791
	120	27,39739841
	140	14,92508387
	160	14,06689709
<i>Extracto</i>	<i>C patrón<sup>a</sup></i>	<i>% [DPPH ·] Remanente</i>
EPE	70	61,63263363
	90	48,39449874
	120	25,44839827
	140	9,841333986
F1E	120	86,9532316
	140	82,8044684
	160	80,9484427
	180	75,5987218
	200	71,6137256
F2E	70	62,73236
	90	49,8922488
	105	36,2170083

	120	26,8740005
	140	13,7207158
F3E	70	68,2284763
	90	41,4735089
	105	30,5578538
	120	17,5519669
	140	10,6774267

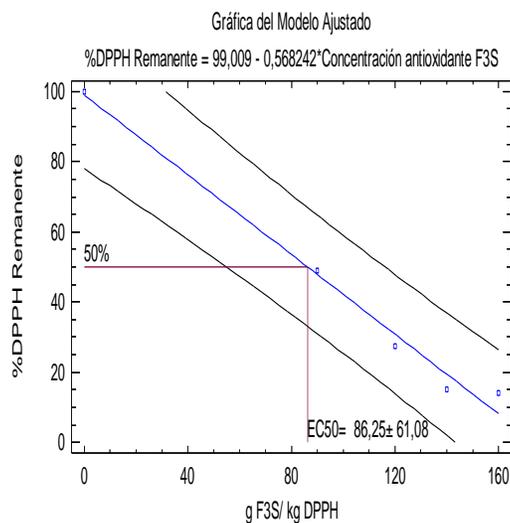
<sup>a</sup> g antioxidante/L

**ANEXO F.** Gráficas para calcular  $FRS_{50}$  para ácido gálico extractos purificados de semilla y epicarpio de aguacate y sus respectivas fracciones.

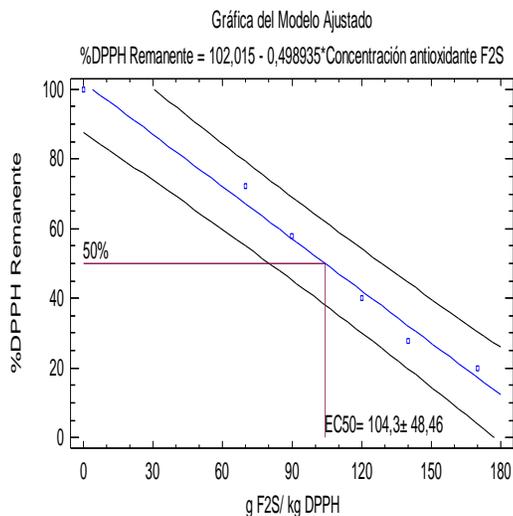
**EPS**  
 $r = -0,996111$



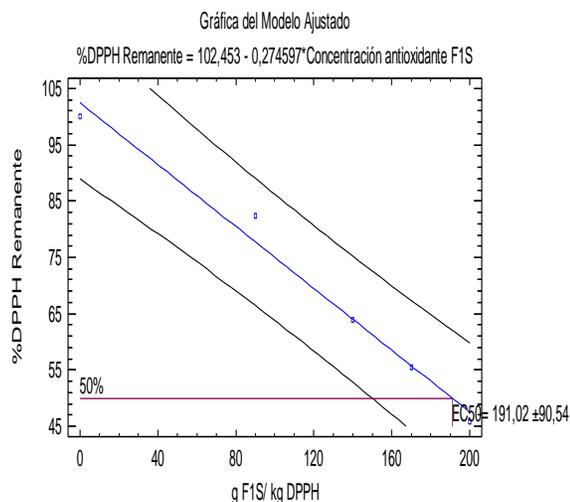
**F3S**  
 $r = -0,993167$



**F2S**  
 $r = -0,992985$



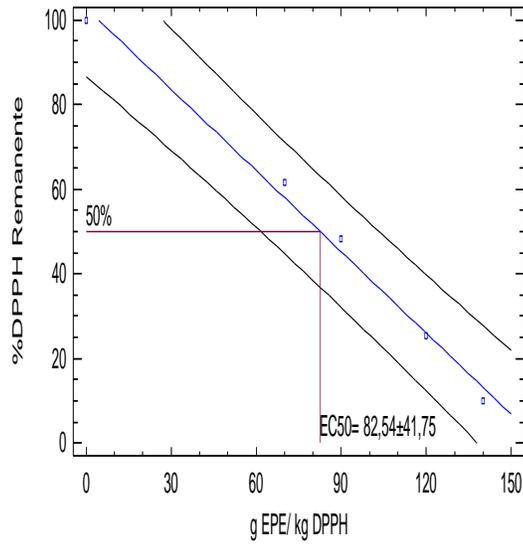
**F1S**  
 $r = -0,991877$



**EPE** $r = -0,995579$ 

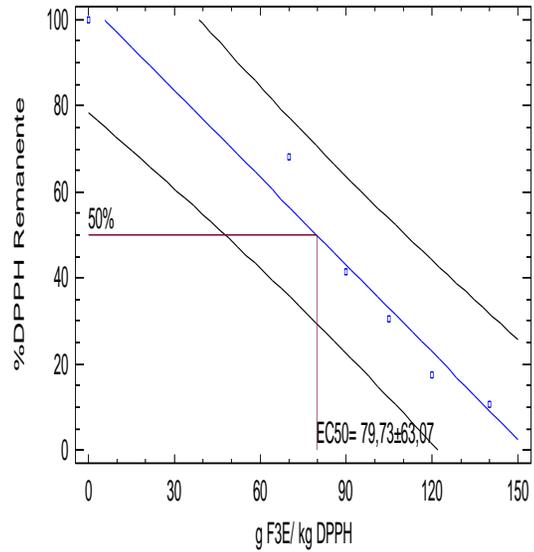
Gráfica del Modelo Ajustado

$$\%DPPH \text{ Remanente} = 102,854 - 0,640374 * \text{Concentración antioxidante EPE}$$

**F3E** $r = -0,983403$ 

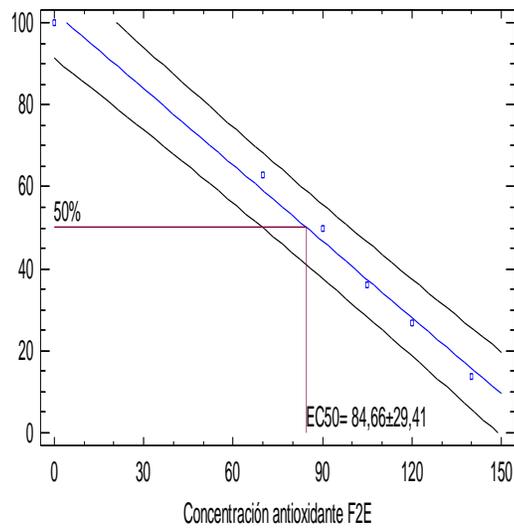
Gráfica del Modelo Ajustado

$$\%DPPH \text{ Remanente} = 103,922 - 0,676282 * \text{Concentración antioxidante F3 E}$$

**F2E** $r = -0,996106$ 

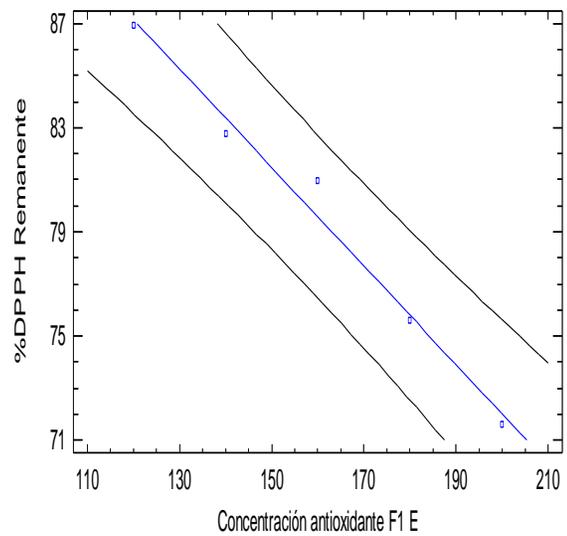
Gráfica del Modelo Ajustado

$$\%DPPH \text{ Remanente} = 102,497 - 0,620102 * \text{Concentración antioxidante F2E}$$

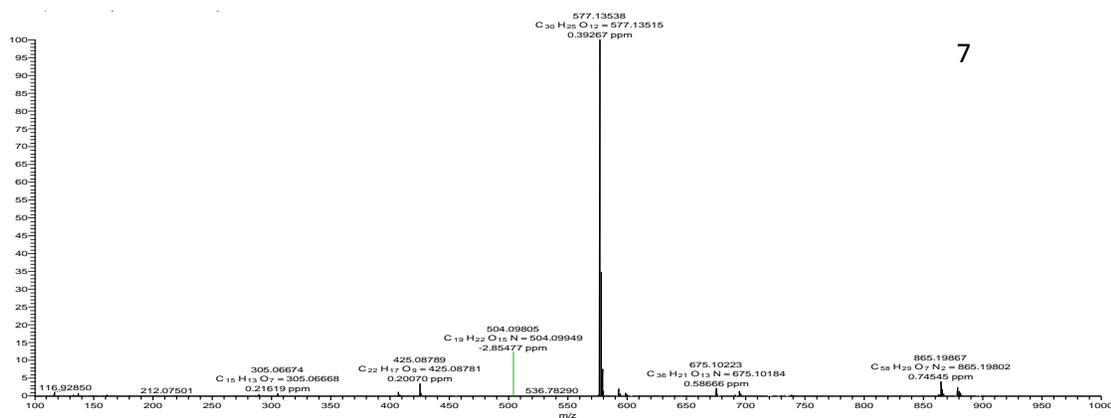
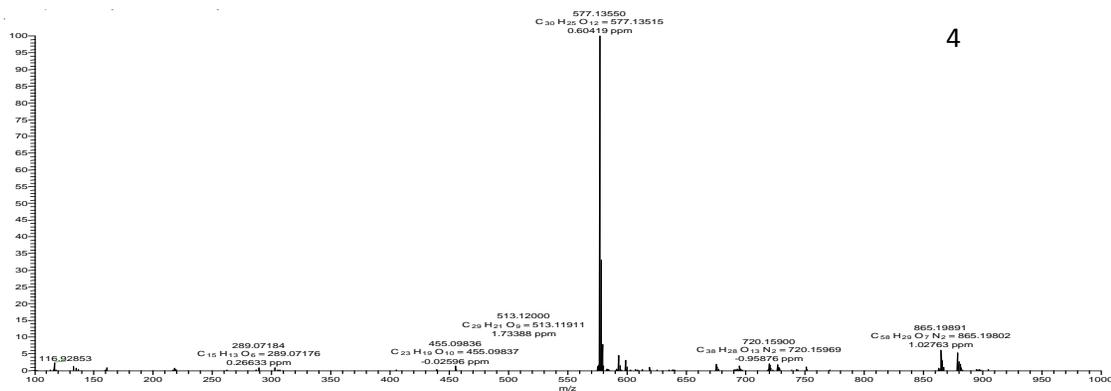
**F1E** $r = -0,984375$ 

Gráfica del Modelo Ajustado

$$\%DPPH \text{ Remanente} = 109,892 - 0,189424 * \text{Concentración antioxidante F1 E}$$

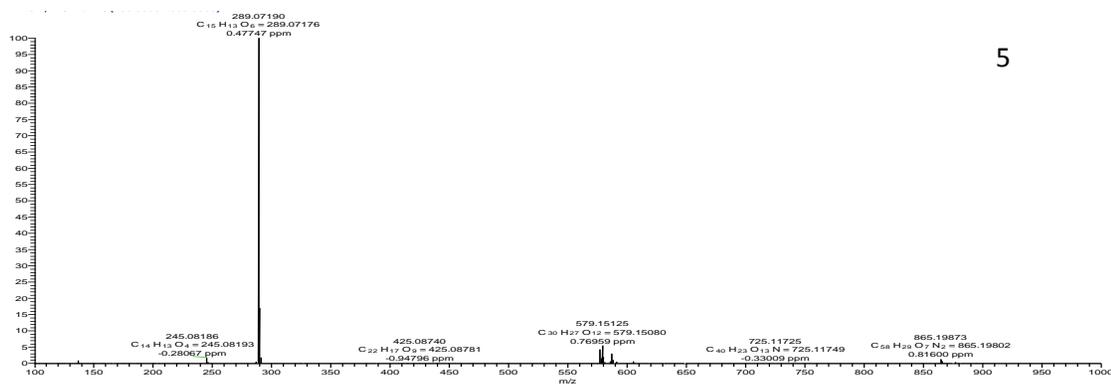


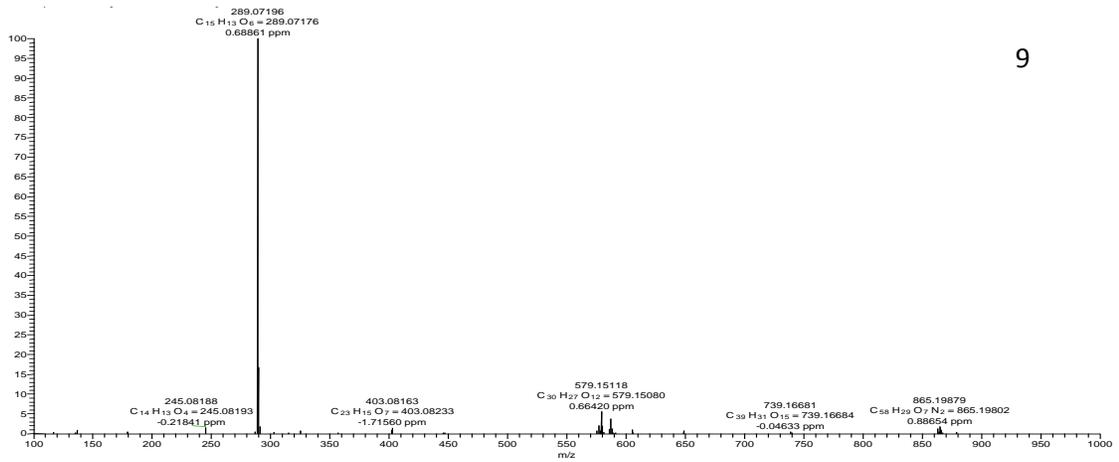
**ANEXO G. Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 4 y 7 presentes en F2E.**



Fuente: Está investigación.

**ANEXO H. Espectro de masas HPLC-ESI-MS para los compuestos 5 y 9 presentes en F2E**

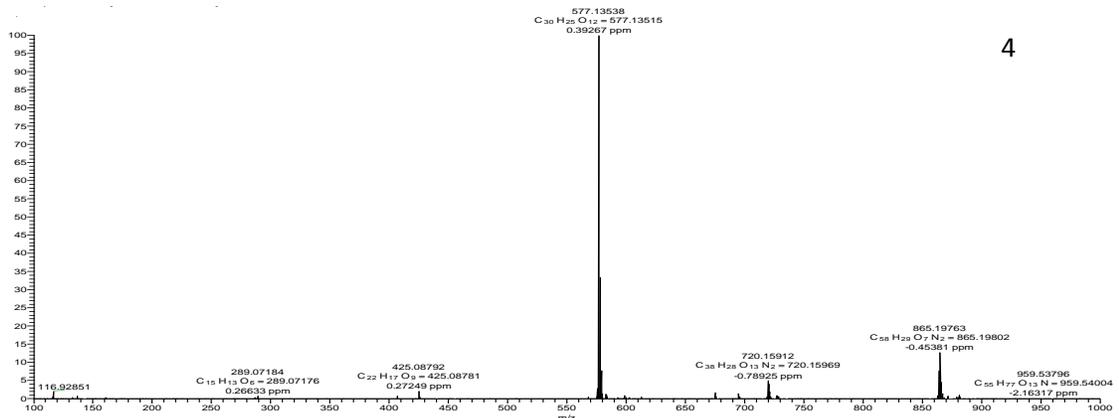




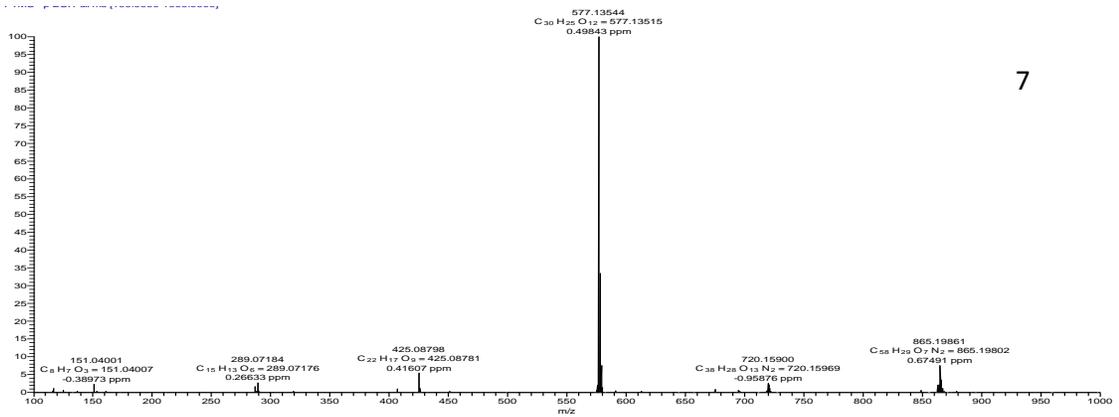
9

Fuente: Está investigación

**Anexo I. Espectro de masas HPLC-ESI-MS de los compuestos 4 y 7 presentes en F3E.**



4



7