



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis

Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE HOJAS, FRUTOS, CÁSCARAS Y SEMILLAS DE *Persea americana***

(Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Licenciado en Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Duarte C. Yenliver S.
C.I. V-26.021.362

Tutor (a):

Dra. Elizabeth Perez

Mérida, 2023

DEDICATORIA

A mis padres Yeny y Oliver, por apoyarme incondicionalmente en este camino y motivarme siempre a seguir adelante.

www.bdigital.ula.ve

Yenliver Duarte

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad de Los Andes, que me ha dado y enseñado tanto.

A mis padres que me lo han dado todo, sin ellos no estaría en donde estoy.

A mi tutora Elizabeth Pérez, por aceptarme y guiarme para culminar con éxito este proyecto.

Al Profesor Miguel Sulbarán por su apoyo incondicional y motivarme siempre.

A mis amigas Andrea, Verónica y Tairos por siempre estar para mi.

A cada persona que a lo largo de mi carrera me han ayudado y apoyado.

www.bdigital.ula.ve

Yenliver Duarte

Tabla de Contenido

INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE ESQUEMAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación de la Investigación	8
Objetivos de la Investigación	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Alcances y Limitaciones de la Investigación	10
Alcances de la Investigación	10
Limitaciones de la Investigación	10
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	12
Trabajos Previos	12
Antecedentes Históricos	17
Bases Teóricas	18
Bioactividad de las plantas	18
Metabolitos Primarios	18
Metabolitos Secundarios	19
Compuestos fenólicos	20
Actividad antioxidante de las plantas	21
Sistema de Defensa Antioxidante	22
1) Interacción directa con especies reactivas:	22
2) Interacción indirecta con especies reactivas:	25
Radicales libres	26
Mecanismos de formación de radicales libres	27
Producción de radicales libres en la célula	28
Beneficios de los radicales libres	28
Efectos nocivos de los radicales libres	29

Mecanismos de defensa de las células ante ataques de los radicales libres.....	29
Generalidades de <i>Persea americana</i>	30
Clasificación taxonómica	30
Descripción.....	31
Composición química y nutricional.....	31
Definición Operacional de Términos	32
Especies Reactivas del Oxígeno (EROs).....	32
Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)	32
Extractos Etanólicos	32
Operacionalización de las Variables	33
Hipótesis	35
Hipótesis de Investigación (Hi)	35
Hipótesis Nula (Ho)	35
CAPÍTULO III.....	36
MARCO METODOLÓGICO.....	36
Tipo de investigación	36
Diseño de Investigación.....	36
Población y Muestra.....	37
Unidad de Investigación	37
Selección del Tamaño Muestral	38
Sistema de Variables.....	38
Procedimientos de la Investigación.....	39
Preparación de la Muestra.....	39
Determinación de la Actividad Antioxidante.....	39
Método del Radical Hidroxilo (OH[•]).....	39
Método de la Actividad Antioxidante (AOA)	40
Método del Cation Radical ABTS^{•+}	43
Determinación de la Concentración de Fenoles Totales	44
Determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio.....	44
Diseño de Análisis	45

Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)	45
Prueba Post-Hoc	46
CAPÍTULO IV	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Resultados	47
Caracterización química de los extractos etanólicos de <i>P. americana</i>	48
Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de <i>P. americana</i>	49
Discusión	52
Caracterización química	52
Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos 57	
CAPÍTULO V	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
Conclusiones	63
Recomendaciones	65
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Operacionalización de la variable dependiente actividad antioxidante <i>in vitro</i>.....	33
Tabla 2: Operacionalización de la variable independiente extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas.	34
Tabla 3: Volúmenes necesarios para el método AOA.	42
Tabla 4: Concentración media de flavonoides y grupos fenólicos de las muestras analizadas.....	48
Tabla 5: Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos analizados por los métodos de AOA, radical hidróxilo y ABTS•+.	50
Tabla 6: Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.....	51

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Sistema de defensa de los antioxidantes.....	24
Esquema 2: Representación esquemática método de Halliwell et al., (1987) para la medición del Radical Hidróxilo.....	40

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

La actividad antioxidante en productos de origen vegetal se debe principalmente a la presencia de antioxidantes naturales, los cuales actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, inhibiendo o retardando la oxidación de otras moléculas. Al igual que otras frutas y hortalizas, los aguacates son ricos en compuestos bioactivos con actividad antioxidante. En tal sentido en esta investigación fue confirmada la actividad antioxidante *in vitro* de extractos etanólicos de hojas, pulpa, cáscaras y semillas de *Persea americana*, a partir de extractos crudos (poco procesados). La actividad antioxidante fue determinada por los métodos del radical Hidroxilo, AOA y *ABTS*^{•+}. El contenido total de polifenoles se determinó por el reactivo de Folin- Ciocalteau y el Contenido de Flavonoides, por el Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio. El mayor contenido de flavonoides se presentó en el extracto etanólico de la cáscara, la mayor concentración de polifenoles se presentó en el extracto de semilla. En este estudio no se demostró una correlación positiva entre el contenido de flavonoides con la actividad antioxidante medida a través de los 3 métodos elegidos, ni el contenido de polifenoles medida a través del método de AOA y el Radical Hidroxilo, sólo se obtuvo correlación positiva entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante determinada por el método del *ABTS*^{•+}. Es evidente que la cantidad o concentración de estos compuestos bioactivos dentro de cada parte estudiada son muy variables. Las diferencias entre los valores se deben a muchos factores como el tipo de solvente de extracción, el método de extracción, uno de los más importantes, el tamaño de la fruta, la etapa de maduración, la ubicación geográfica, entre otros. La semilla y la cáscara del aguacate tienden casi siempre a mostrar un contenido fenólico y de flavonoides más alto que la pulpa, como fue evidenciado en este estudio. Asimismo, se ha reportado en muchos casos un contenido significativamente mayor de compuestos bioactivos en extractos de cáscara de aguacate en comparación con los de semillas. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los extractos etanólicos, se deduce que la misma posee compuestos bioactivos con un alto potencial.

Palabras Claves: Actividad antioxidante; *Persea americana*; Extractos etanólicos crudos.

INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia o compuesto de detener la formación de radicales libres y neutralizar los ya existentes. Los antioxidantes pueden ser sustancias propias del organismo (enzimas antioxidantes) o pueden ser sustancias derivadas de los alimentos. Un radical libre, es un átomo o molécula que posee en su orbital más externo uno o más electrones desapareados, es por ello que es una molécula muy inestable y reactiva, ya que el busca estabilizarse sustrayendo un electrón a cualquier molécula vecina, oxidando a esta molécula, alterando su estructura, dañándola y convirtiéndola a su vez en otro radical libre, generando así una reacción en cadena. (Mayen, 2006). Se ha demostrado que el estrés oxidativo, es decir, el desbalance entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa contra estos radicales, está implicado en el desarrollo de ciertas enfermedades degenerativas, tales como cáncer, Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, entre otras, por lo que los antioxidantes consumidos a través de la dieta juegan un papel muy importante para la conservación de la salud. Por otra parte, los extractos etanólicos corresponden a preparar una solución, utilizando un disolvente, en este caso etanol, y material vegetal molido. En el etanol quedaran disueltas algunas sustancias propias del material vegetal, que serán de interés en este estudio. (Santamaria, 2013).

Se han encontrado reportes en la literatura que demuestran que diversos subproductos del aguacate, como la cáscara y la semilla, poseen actividad antioxidante, lo que es interesante ya que se trata de productos de desecho que pueden ser aprovechables. Sin embargo, son muy escasos los reportes

en los que se evalúa la actividad antioxidante de hojas y fruto de *Persea americana*, que son consumidos o usados en la medicina tradicional.

Este proyecto de investigación será compilado de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado el problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones del proyecto a llevar a cabo. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico, consta de los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de análisis.

En líneas generales el objetivo de esta investigación será, confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de: hojas, frutos cáscaras y semillas de *Persea americana* en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. (Venereo, 2002)

No obstante a esto, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno, prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por glándulas suprarrenales, modificar biomembranas y favorecer la quimiotaxis. (Venereo, 2002). El verdadero problema comienza cuando ocurre un desequilibrio entre la cantidad de radicales libres y los sistemas que se encargan de eliminar estos radicales libres, lo que se conoce como estrés oxidativo.

Se considera como antioxidante a toda aquella sustancia o compuesto que en pequeñas concentraciones puede inhibir o retrasar el daño, deterioro o destrucción de otras moléculas provocadas por la oxidación. Los antioxidantes pueden inhabilitar la iniciación y/o propagación de las

reacciones en cadena de los radicales libres. Los radicales libres actúan mediante oxidación y cuando estos provocan un daño celular, es ahí donde actúan los antioxidantes (Youngson, 1994).

Existen diversas sustancias sintéticas como el Butilhidroxianisol (BHA) o el Butilhidroxitolueno (BHT) que son eficientes secuestradores de radicales libres; sin embargo, dichos antioxidantes sintéticos están siendo restringidos porque pueden ser carcinogénicos. Es por ello, que existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas del oxígeno y además son capaces de inhibir enzimas productoras de radicales libres. (Doroteo, 2013)

En los últimos años se ha evidenciado el aumento del interés en evaluar la actividad antioxidante de diversas fuentes vegetales, debido a la correlación existente entre los radicales libres y el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas. El enorme interés por el origen vegetal de los antioxidantes viene aunado al hecho de que son la fuente principal de este tipo de sustancias, a que las plantas tienen metabolismos secundarios altamente diversos que producen una amplia gama de metabolitos, ya que son fáciles de obtener a través de la dieta, estando *P. americana* entre las fuentes de antioxidantes que han incrementado su interés recientemente. (Quiñonez, 2013).

Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos, la mayoría de estos son útiles en el control de enfermedades, en la agricultura, la medicina humana y en la preservación de alimentos. Muchos de estos compuestos

son metabolitos secundarios, que tienen funciones importantes en la interacción entre las plantas y el medio ambiente que las rodea. Los metabolitos secundarios de las plantas son de gran importancia farmacológica, y dentro de estos se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales se destacan en la actualidad por ser atractivos en el campo de la nutrición, la salud y la medicina debido a las evidencias de que pueden actuar como potentes antioxidantes, anticancerígenos, antifúngicos, entre otros. (Quiñonez, 2013)

Lo anteriormente expuesto se puede evidenciar en el trabajo titulado: Estudio fitoquímico preliminar y actividad antioxidante de un extracto acuoso de las hojas de aguacate (*Persea americana*), en el cual el material vegetal fue sometido a pruebas químicas para la identificación de su composición y además se determinó la capacidad antioxidante usando el método DPPH. Se pudo evidenciar que las hojas de aguacate contienen ciertos compuestos tales como alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, saponinas, quinonas, antocianidinas, triterpenoides, compuestos grasos, entre otros. Y con respecto a la actividad antioxidante se demostró que el porcentaje de decoloración del radical DPPH resultó ser de un 86,1% para la máxima concentración ensayada, mientras que tan solo para una concentración de 6,2µg/mL de extracto, se decoloró más del 50% del radical (62,56%).

Del mismo modo, para el año 2020, se publicó un artículo titulado: Evaluación de la actividad antioxidante de la semilla de Aguacate (*Persea americana Mill*) variedad *Hass* a través del método DPPH. En este estudio al evaluarse la actividad antioxidante frente a la solución patrón (Ácido ascórbico) en los extractos acuosos y etanólicos a diferentes concentraciones, la fracción acuosa es la que presenta un porcentaje de inhibición más alto.

Por último, se publicó un trabajo titulado: Exploración de subproductos del aguacate como fuentes naturales de compuestos bioactivos, el cual tuvo como objetivo evaluar las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citotóxicas y la composición fenólica de las cáscaras y semillas de las variedades Hass y Fuerte de aguacate utilizando solventes verdes. Los subproductos agroindustriales de ambas variedades mostraron una alta actividad de eliminación de radicales contra los radicales libres sintéticos (DPPH y ABTS) y las especies reactivas de oxígeno (peróxido, superóxido y ácido hipocloroso) y una alta capacidad para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Los principales compuestos con una contribución significativa a la actividad antioxidante fueron procianidina B2 y epicatequina en la cáscara y ácido trans-5-O-cafeína-D-quinico, procianidina B1, catequina y epicatequina en la semilla. La cáscara de la variedad Fuerte suprimió significativamente la liberación de TNF- α y óxido nítrico (NO), posiblemente debido al alto contenido fenólico y la actividad antioxidante detectada. Como conclusión, los subproductos agroindustriales del aguacate se pueden utilizar para fines alimentarios y farmacéuticos debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Tremocoldi *et al.*, 2018).

Los extractos equivalen a preparar una solución, en la que se adiciona agua u otro solvente (por ejemplo, etanol) y las plantas (Olaya *et al.*, 2003). Los disolventes como el etanol, ofrecen la capacidad de formar enlaces de puentes de hidrógeno y de ceder pares de electrones, como el agua, pero además también poseen un extremo lipófilo que puede ayudar a la solvatación de sustratos orgánicos. Debido a esta combinación de propiedades, los disolventes como el alcohol etílico pueden considerarse óptimos como lo mejor bajo todos los conceptos (Dupont y Gokel, 1985).

En los estudios *in vitro*, el organismo o el sistema se mantiene aislado de su entorno, con lo que se produce una perturbación del mismo. En contrapartida, es más fácil controlar las variables que pueden influir sobre el sistema (Roca *et al.*, 2003)

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio, los autores de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación causa-efecto entre la actividad antioxidante *in vitro* y los extractos etanólicos de hojas, cáscaras, semillas y frutos de *Persea americana*, en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en el periodo desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023?.

www.bdigital.ula.ve

Justificación de la Investigación

La justificación alude a las razones que llevaron al investigador a seleccionar el tema en cuestión. Estas razones sirven de fundamento para realizar el trabajo y pueden estar sustentadas en: necesidades, motivaciones, intereses, inquietudes y potencialidades (Hurtado, 2015).

Esta investigación debe llevarse a cabo ya que en trabajos de investigación anteriores se ha determinado que la cáscara y semillas de aguacate poseen propiedades antioxidantes, siendo capaces así de eliminar radicales libres y especies reactivas al oxígeno (peróxido, superóxido y ácido hipocloroso). (Tremocoldi *et al.*, 2018)

Por ello, los autores de esta investigación han encontrado una gran razón de interés y potencialidad en analizar y comprobar si las hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana* también poseen dicha propiedad, ya que los antioxidantes juegan un papel muy importante en el organismo inhibiendo o retrasando el daño de otras moléculas provocados por la oxidación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Youngson, 1994).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana* en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

Objetivos Específicos

- Identificar la concentración de grupos fenólicos y flavonoides en extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*.
- Demostrar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*.
- Correlacionar la concentración de grupos fenólicos y flavonoides con la actividad antioxidante de extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista (2010), el alcance de una investigación indica el resultado que se espera obtener del estudio. Por lo que la presente investigación tendrá un alcance evaluativo, ya que se estudiará la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana* en el proceso de neutralización de radicales libres mediante el uso del método AOA, radical ABTS^{•+} y radical Hidroxilo (OH[•]). Así como también, se determinará el contenido de fenoles y flavonoides de dichos extractos, para luego correlacionar las concentraciones de estos compuestos con la posible actividad antioxidante obtenida. Estos alcances se esperan cumplir entre el período de tiempo de septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

Limitaciones de la Investigación

Durante el desarrollo de la investigación se pueden presentar distintas limitaciones relacionadas con aspectos teóricos, técnicos y de recursos económicos (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). En este sentido, para llevar a cabo esta investigación, se han presentado limitaciones teóricas, tales como dificultad para conseguir trabajos previos actuales, así como problemas con el servicio de internet, el cual es de suma importancia para la búsqueda de información que sustente la presente investigación. En la parte experimental se pueden presentar limitaciones tales como, adquirir algunos materiales y/o reactivos, bien sea por motivos de adquisición o por falta de recursos económicos. También puede ser considerada una limitación que el

Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, donde se llevará a cabo la parte experimental no cuenta con un espectrofotómetro de absorción molecular, el cual es de suma importancia, ya que para los métodos que se pondrán en práctica, se necesita de dicho instrumento para realizar las lecturas de absorbancia.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Se revisaron varios trabajos relacionados con el evento de estudio, los cuales se mencionan a continuación:

Iglesias *et al.*, (2021), en la Universidad Técnica de Manabí en Portoviejo, Ecuador realizaron un trabajo de investigación titulado: Estudio fitoquímico preliminar y actividad antioxidante del extracto acuoso de las hojas de aguacate (*Persea americana Mill.*), en dicho trabajo el objetivo fue realizar el estudio fitoquímico preliminar de las hojas de aguacate y determinar la capacidad antioxidante. Se elaboró un extracto fluido mediante el método de reperlación con mezcla hidroalcohólica al 50% (v/v) para corroborar la presencia de polifenoles. Para ello se usaron tres percoladores, cada uno con 280g de material vegetal y un tiempo de extracción entre un percolador y otro de 48 horas. Este proceso se realizó hasta el agotamiento de cada uno de los percoladores y se obtuvo aproximadamente un litro de extracto, que luego fue sometido a fraccionamiento. Todas las fracciones fueron sometidas a cromatografía en capa delgada empleando gel de sílice sobre soporte de aluminio, la fase móvil usada fue butanol, ácido acético y agua. El revelado de la placa se realizó en el espectro UV-VIS con una lámpara UV de baja intensidad a 254 y 365nm, sin y con vapores de amoníaco. También fueron empleados como reveladores el ácido sulfúrico, vainillina y solución salina de cloruro férrico. Elaboraron un extracto acuoso a partir del material vegetal por el método de infusión, con una relación masa del material/disolvente de 0,05g/mL. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método del

DPPH, este consiste en la medición a 517nm de la reducción del radical libre estable 2,2-difenil-1picril hidrazilo (DPPH). La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (que sea capaz de capturar un electrón libre) u otro radical. Con respecto a los resultados, determinaron que las hojas de aguacate contienen ciertos compuestos tales como: compuestos grasos, alcaloides fenoles, taninos, flavonoides, saponinas, quinonas, antocianidinas, triterpenoides, entre otros. En cuanto a la actividad antioxidante, el extracto elaborada 0,05 g/mL presentó un alto poder antioxidante. El porcentaje de decoloración del radical DPPH resultó ser de un 86,1% para la máxima concentración ensayada, mientras que tan solo para una concentración de 6,2µg/mL de extracto, se decoloró más del 50% del radical (62,56%).

Coello y Saltos (2020), en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, realizaron el siguiente trabajo de investigación que se tituló: Evaluación de la actividad antioxidante de la Semilla de Aguacate (*Persea americana Mill*) variedad *Hass* a través del método DPPH. El objetivo de dicha investigación fue analizar la actividad antioxidante de la semilla de *Persea americana Mill* var. *Hass* por el método anteriormente mencionado. Para ello, recolectaron los frutos, lavaron con agua destilada para eliminar residuos y suciedad, posteriormente se removieron las semillas manualmente y se llevaron a la estufa en una plancha de aluminio a 60°C por un periodo de 12 horas por 3 días. Una vez el material estuvo seco se procedió a molerlo en mortero de cerámica hasta llegar a polvo fino y se almacenaron en envases completamente estériles. Luego se aplicaron algunos métodos para la determinación de algunos parámetros de calidad tales como: ensayo de humedad, ensayo de cenizas totales, cenizas insolubles en agua, entre otros. En cuanto a la preparación del extracto para determinar la capacidad antioxidante, tomaron material sólido sin grasa y

adicionaron etanol para extraer compuestos de alta polaridad durante 48 horas, finalmente se filtró para obtener el extracto etanólico. Al evaluarse la actividad antioxidante mediante el método DPPH frente a la solución patrón (ácido ascórbico) en los extractos acuosos y etanólicos, se observaron los siguientes resultados: en el extracto acuoso obtenido en 2 μ L tuvo un porcentaje de inhibición del 88,15%, en 4 μ L 91,47%, en 10 μ L 92,20%, en 20 μ L 92,38%, en 40 μ L 92,46%, en 100 μ L 93,12%, en 160 μ L 93,08%. Mientras que en el extracto etanólico se obtuvo en 2 μ L un porcentaje de inhibición de 7,98%, en 4 μ L 10,74%, en 10 μ L 15,63%, en 20 μ L 16,27%, en 40 μ L 30,43%, en 100 μ L 42,43% y en 160 μ L 46,72%. Siendo la fracción acuosa la que presenta un porcentaje de inhibición más alto.

Por último, Tremocoldi *et al.*, (2018), en Brasil realizaron un trabajo de investigación titulado: Exploración de subproductos del aguacate como fuentes naturales de compuestos bioactivos, el cual tuvo como objetivo evaluar las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citotóxicas, así como la composición fenólica de las cáscaras y semillas de las variedades Hass y Fuerte de aguacate. Para la determinación del contenido fenólico total se utilizó el método de Folin- Ciocalteu. Mientras que para la determinación de la actividad antioxidante, se llevaron a cabo los métodos de captación de radicales libres mediante DPPH, de eliminación de radicales libres ABTS^{•+} y capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). También evaluaron la capacidad de los extractos para desactivar las especies reactivas del oxígeno (ROS) utilizando tres especies reactivas diferentes (peróxido, superóxido y ácido hipocloroso). Con respecto a la citotoxicidad y actividad antiinflamatoria, se realizó un cultivo de células RAW264.7 de macrófagos de ratón. Determinaron y cuantificaron la producción de TNF- α mediante la técnica de ELISA. La determinación de la producción de óxido nítrico (NO) se realizó midiendo el nivel acumulado de nitrito, un indicador de NO, en el

sobrenadante, utilizando el reactivo de Griess. Los autores obtuvieron que los extractos de cáscara de ambas variedades de aguacate probadas, Hass y Fuerte, mostraron un mayor contenido fenólico (63,5 y 120,3 mg/g respectivamente que los extractos de semilla (57,3 y 59,2 mg/g respectivamente).

Con respecto a la actividad antioxidante, los análisis de la eliminación de radicales libres sintéticos de DPPH mostraron que todos los extractos de cascara y semillas probados mostraron actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto de semilla Fuerte (464,9 μ mol/g) fue significativamente diferente de la del extracto de cáscara (420,5 μ mol/g). Con respecto al radical ABTS^{•+}, ambas variedades probadas mostraron una mayor capacidad antioxidante en extractos de cáscara (791,5 y 1004,5 μ mol/g, respectivamente) que en extractos de semilla (645,8 y 580,8 μ mol/g, respectivamente). Por su parte, los resultados de los análisis de actividad antioxidante con FRAP revelaron que los extractos de ambas variedades redujeron el doble de Fe³⁺ a Fe²⁺ en comparación con los extractos de semillas. La actividad antioxidante de los extractos de cascara Hass y Fuerte fue de 1.175,1 μ mol Fe²⁺ /g y 1.881,4 μ mol Fe²⁺ /g, respectivamente. Referente a la eliminación de especies reactivas del oxígeno, los extractos de cáscara y semillas de Fuerte mostraron una capacidad de eliminación de ROO (peróxilo) (9,9 y 10,6 μ mol/g, respectivamente) más alta que los de Hass (2,8 y 2,2 μ mol/g, respectivamente). En ambas variedades probadas, los extractos de cáscara mostraron una mayor capacidad de eliminación de radicales superóxido (52 μ g/mL en Hass y 12 μ g/mL en Fuerte) que los extractos de semilla, comparable a la observada para la rutina (60 μ g/mL), el ácido gálico (27 μ g/mL), quercetina (14 μ g/mL) y extractos de pulpa de fresa guayaba

(20 μ g/mL). Además, los extractos de cascara de ambas variedades exhibieron una mayor capacidad de captación de radicales superoxido que los estándares de catequina (90 μ g/mL) y epicatequina (227 μ g/mL), utilizados como referencias en este estudio. Los extractos de cáscara de ambas variedades de aguacate también mostraron una mayor capacidad de eliminación de HClO (5,2 μ g/mL en Hass y 17,3 μ g/mL en Fuerte) que los extractos de semillas, valores similares a los informados por para los extractos de café (5,1 μ g/mL), pero inferiores a los encontrados para Trolox estándar (134 μ g/mL). Con respecto a la citotoxicidad, ninguno de los extractos analizados mostro citotoxicidad hasta 10 μ g/mL. Sobre la actividad antiinflamatoria, se encontró que el extracto de variedad Fuerte suprimió la liberación de TNF- α y NO en macrófagos RAW 264.7 activados. En conclusión, la cáscara y semilla de las variedades Hass y Fuerte de aguacate tienen gran capacidad antioxidante debido a su alto contenido de compuestos fenólicos bioactivos, así como también gran capacidad antiinflamatoria, suprimiendo la producción de TNF- α y NO.

Antecedentes Históricos

La investigación de las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales y alimenticias lleva décadas marcando un crecimiento sostenido. Un número importante de compuestos obtenidos del reino vegetal, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes, los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*. (Pastene, 2009).

El aguacate (*Persea americana*) es bien conocido por el hombre desde hace milenios, así lo muestran las evidencias más antiguas de su consumo provenientes de una cueva de Coaxcatlán, Puebla, México; con una antigüedad de 7mil a 8mil años, y más allá de su uso comestible en fresco y procesados tiene amplias aplicaciones como materia prima para la extracción de aceite y en la industria cosmética. (Álvarez *et al.*, 2015).

La *Persea americana* es originaria de las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y México. Los arqueólogos encontraron semillas de *Persea americana* en Perú, las cuales fueron enterradas con momias incas que datan hasta del año 750 a.C. y hay evidencias de que su cultivo en México es tan temprano como en el 1500 a.C. Luego de la llegada de los españoles y de la conquista de América la especie se diseminó a muchos lugares del mundo. (Álvarez *et al.*, 2015).

Bases Teóricas

Bioactividad de las plantas

Así como otros organismos, las plantas han desarrollado diversos mecanismos o estrategias de defensa ante condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de orígenes microbianos. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Este tipo de respuestas, se combinan con el desarrollo de estructuras como espinas, espigas, pelos glandulares, los cuales ayudan en la defensa ante el depredador. A su vez, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana o con actividad antioxidante. (Sepúlveda et al. Citado por Croteau *et al.*,2000).

Las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivadas de sus sistemas de defensa. Se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. (Castro *et al.*, 2012)

Metabolitos Primarios

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los organismos vivos para sintetizar (anabolismo) o degradar

(catabolismo) moléculas complejas. La mayor parte del carbono, nitrógeno y energía termina en moléculas que se dirigen a todas las células necesarias para su funcionamiento. Estos metabolitos primarios son: aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos. (Ávalos y Pérez, 2009).

Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios tienen funciones distintas entre cada uno de ellos, muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo insectos polinizadores; otros tienen función protectora contra predadores, actuando como repelentes, proporcionando a las plantas sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos actuando como pesticidas naturales. Cabe destacar que estos metabolitos también reciben el nombre de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico. (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que tienen gran importancia ecológica, pues no solo participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos; sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a situaciones adversas, tales como el consumo por herbívoros, el ataque por microorganismos como: virus, bacterias y hongos, también por la competencia del espacio del suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de las plantas y finalmente la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico. (Sepúlveda *et al.*, 2003). Los metabolitos secundarios se

agrupan en cuatro clases principalmente: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidróxilo. Los fenoles son un grupo muy diverso, que comprenden desde los ácidos fenólicos, los cuales son moléculas sencillas, hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina, también se encuentran pigmentos flavonoides en el grupo.

Existen dos rutas básicas para la biosíntesis de estos compuestos fenólicos: la ruta del ácido malónico la cual es poco empleada en plantas superiores, es fuente importante de fenoles en hongos y bacterias. Y la ruta del ácido shikímico, que es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas.

Entre los fenoles se encuentran los flavonoides, su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función de grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales: antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre las funciones de estos se encuentra la defensa y la pigmentación. (Ávalos y Pérez, 2009).

Actividad antioxidante de las plantas

La actividad antioxidante en productos de origen vegetal se debe principalmente a la presencia de antioxidantes naturales. Los nutrientes son los componentes de los alimentos aprovechables por el organismo que hacen posible la vida, estos nutrientes están repartidos de forma desigual y desempeñan funciones diferentes según su naturaleza. Uno de los componentes principales son los antioxidantes, sustancias existentes en determinados alimentos que provienen de plantas, los cuales actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, que causan envejecimiento y otras enfermedades. (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. (Pastene, 2009). Existen alimentos que poseen gran variedad de fitonutrientes, muchos de los cuales tienen propiedades antioxidantes. Además de las vitaminas C y E y los carotenoides, existen otros compuestos como los flavonoides (incluyendo flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y catequinas) que son fuertes antioxidantes y contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total.

El consumo de frutas y vegetales brindan una gran protección contra el envejecimiento, contra enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Esta protección se le atribuye a su alto contenido de varios antioxidantes, como vitamina E, C y carotenos, así como de diferentes polifenoles. (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Se pueden distinguir dos categorías de antioxidantes: sintéticos y naturales. Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides. (Pastene, 2009).

Sistema de Defensa Antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias y/o mecanismos que, al estar en contacto con el sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado ambiente. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de biomoléculas funcionalmente vitales o más importantes. (Venereo, 2002)

Este sistema se da principalmente de dos maneras:

1) Interacción directa con especies reactivas: la cual previene ya sea el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a los sustratos biológicos, siendo la forma más conocida (Esquema 1). Se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como estabilizadores o inactivadores de diversas especies reactivas. Los antioxidantes pueden ejercer su acción directa mediante 3 mecanismos

distintos. El primero es la transferencia simple de un electrón (SET), el cual permite que el radical libre pierda su condición por apareamiento de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. El segundo mecanismo es por transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT), el cual implica la transferencia directa de un átomo de hidrogeno (un electrón con su protón), gracias a ello, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente.

Los antioxidantes que usan los mecanismos SET y HAT son mayoritariamente los antioxidantes no enzimáticos, sean estos biosintetizados por el organismo humano, o que ingresen al organismo a través de la dieta.

La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química, como grupos funcionales hidroxilos fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). También otros antioxidantes, no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos ascórbico, dihidro-lipóico y úrico.

Junto a los mecanismos SET y HAT, algunos antioxidantes pueden actuar por un tercer mecanismo, el cual es la estabilización de radicales por adición directa a su estructura. El resultado de esto, es que, el radical libre pierde su condición y el antioxidante es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados con menor reactividad. Los carotenos como beta-caroteno, son ejemplo de antioxidantes que promueven este tipo de acción.

Esquema 1: Sistema de defensa de los antioxidantes.

1) Interacción directa con especies reactivas

- Transferencia simple de un electrón (SET).
 - Transferencia de un átomo de hidrogeno.
 - Estabilización por adición directa del radical a su estructura
- Fenólicos: polifenoles y tocoferoles.
 - No fenólicos: glutatión, melatonina y los Ácidos ascórbico, dihidro- lipoico y úrico.
 - Los carotenos como beta-carotenos

2) Interacción indirecta con especies reactivas

- Prevención de la formación enzimática de especies reactivas.
 - Prevención de la formación de especies reactivas dependiente de metales.
 - Activación o inducción de enzimas antioxidantes
- Polifenoles
 - Alopurinol
 - Febuxostat
 - Ferritina: transporta, almacena y/o excreta hierro.
 - Metalotioneina y ceruloplasmina: transporta, almacena y/o excreta cobre
 - Ciertos polifenoles
 - Desferroxamina.
 - Penicilamina o tetratiomolibdato
 - Algunos polifenoles
 - Isocianatos.
 - Algunos curcuminoides.

Fuente: Autor, 2018.

2) Interacción indirecta con especies reactivas: el cual ocurre mediante 3 mecanismos (Esquema 1). El primero es, la prevención de la formación enzimática de especies reactivas, que es posible ya que algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), inhibiendo la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como la NADPH- oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y la óxido nítrico sintasa (NOS). Ciertos polifenoles que son capaces de inhibir la NOX, la MPO y la XO, algunos agentes empleados en la terapia de la gota, como alopurinol y febuxostat que inhiben la xantina oxidasa, son ejemplos de inhibidores de la actividad de estas enzimas.

En segundo lugar, se tiene la prevención de la formación de especies reactivas dependientes de metales, este mecanismo al igual que el anterior implica la inhibición de la formación de especies reactivas. Se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar (mediante actividad redox) la formación de radicales superóxido a partir de la reducción de oxígeno y de radicales hidróxilo, a partir de peróxido de hidrógeno. Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales, formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de estos, previniendo así la formación de especies reactivas anteriormente mencionadas. Como ejemplos de antioxidantes que actúan mediante este mecanismo, se pueden mencionar ciertos péptidos y proteínas normalmente biosintetizadas por el organismo y cuya función fisiológica les implica transportar, almacenar y/o excretar hierro (como ferritina) o cobre (como metalotioneina y ceruloplasmina), también ciertos polifenoles que acceden al organismo a través de la dieta y cuya característica distintiva es presentar en su estructura

flavonoídea un grupo catecol en el anillo B, y algunos agentes que son empleados en la terapia de remoción de metales como desferroxamina que atrapa hierro, y penicilamina o tetratiomolibdato que atrapan cobre.

Por último, se encuentra el mecanismo de activación o inducción de la actividad de las enzimas antioxidantes. Los organismos biosintetizan como parte de la defensa antioxidante ciertas enzimas cuya función es remover especies reactivas, principalmente ROS. Entre estas enzimas, destacan las siguientes: superóxido dismutasa (en sus isoformas Cu/Zn y Mn-dependientes) que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrogeno, catalasa (hierro-dependiente) que reduce peróxido de hidrogeno a agua, glutatión peroxidasa (Se-dependiente) que reduce lipo-hidroperoxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa en su tipo peroxidasa que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, glutatión reductasa que reduce glutatión oxidado (GSSG) a reducido (GSH), y sulfoxi-metionina-reductasa que regenera metionina a partir de su metabolito sulfoxi-oxidado.

Entonces, existe evidencia de que ciertos compuestos presentes en la dieta humana podrían inducir la expresión de genes que codifican para la síntesis de algunas de las enzimas antioxidantes descritas anteriormente. Ejemplos de dichos compuestos son algunos polifenoles presentes en frutas y hortalizas, diversos isocianatos (como sulforafano), algunos curcuminoides. (PortalAntioxidantes.com).

Radicales libres

Los radicales libres son cualquier especie química capaz de existir de forma independiente, y que presenta uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, es por ello que los radicales libres o especies

reactivas como también son llamados, son altamente reactivos. Las especies reactivas más importantes a nivel celular son las derivadas del oxígeno y del nitrógeno. (Gutiérrez, 2006). Éstos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastrointestinales, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están involucrados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por ejercicio físico agotador y otros. (Leos *et al.*, 2016).

Mecanismos de formación de radicales libres

Los radicales libres pueden formarse por medio de dos tipos de reacciones. En principio, por fusión homolítica, en la cual se rompe un enlace covalente y cada especie que lo formaba se queda con un electrón del enlace; o por fusión heterolítica, que es cuando ocurre la ruptura de un enlace covalente entre dos especies químicas y una de ellas se queda con los dos electrones. Además, los radicales libres pueden formarse también como consecuencia de una reacción metabólica dentro de la célula o formarse de manera espontánea si las condiciones del medio lo permiten. Las especies reactivas (radicales libres) derivadas del oxígeno pueden formarse espontáneamente por medio de dos reacciones, la reacción Haber-Weiss, en la que una especie reactiva reacciona con un pro-radical y de esa manera se forman varios radicales libres; y la reacción de Fenton, en la que un compuesto pro-radical reacciona con un catalizador (generalmente un metal de transición como por ejemplo el hierro) para formar a los radicales libres. (Gutiérrez, 2006)

Producción de radicales libres en la célula

Dentro de las células existen muchos sitios de formación de radicales libres, bien sea de los derivados del oxígeno o del nitrógeno. La cadena respiratoria de las mitocondrias es el principal sitio de producción de radicales libres derivados del oxígeno, seguido por peroxisomas y el citosol. Por otro lado, una de las células en donde existe la mayor producción de radicales libres derivados del oxígeno es el eritrocito, seguido del cerebro, hígado y riñón, los cuales son órganos que presentan gran actividad metabólica. Por su parte, los radicales libres del nitrógeno se producen principalmente en reacciones metabólicas en el citosol de la célula y como producto de la acción de enzimas localizadas en las membranas celulares de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. (Gutiérrez, 2006)

Beneficios de los radicales libres

Dentro del metabolismo oxidativo de las células, existen muchas reacciones en las cuales se presentan una participación importante de los radicales libres derivados del oxígeno o del nitrógeno. En el caso de los derivados del oxígeno, han sido implicados en la síntesis de hormonas, proteínas, carbohidratos e incluso la reacción de fusión del ovulo con el espermatozoide. Por su parte, las especies reactivas derivadas del nitrógeno fueron inicialmente descritas como responsables del proceso de contracción del músculo liso en las células que componen el endotelio de los vasos sanguíneos y actualmente han sido involucradas en los procesos de regulación del metabolismo de las neuronas. (Gutiérrez, 2006).

Efectos nocivos de los radicales libres

Los radicales libres (especialmente derivados del oxígeno) son especies fuertemente oxidativas y atacan preferentemente moléculas que contienen dentro de su estructura dobles enlaces, carbono-carbono o anillos de carbono. Es por ello, que aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que componen a las macromoléculas de las células, pueden ser “atacadas” y alterar la función o la estructura de las células.

Para que exista un daño a la célula, los radicales libres deben efectuar al menos tres pasos: 1) Iniciación, que consiste en la producción inicial de los radicales libres ya sean por alteraciones internas de las células o por elementos externos a ellas; 2) Propagación, la cual consiste en que los radicales libres producen otros radicales libres y estos a su vez atacan otras moléculas diseminando el daño a través de las células; 3) Terminación, cuando las reacciones se terminan y se han producido metabolitos secundarios que la célula no puede utilizar por lo que son eliminados de la misma. (Gutiérrez, 2006)

Mecanismos de defensa de las células ante ataques de los radicales libres.

Existen varios sistemas que contrarrestan a los radicales libres y que protegen a las células de la acción de estos. Dichos mecanismos de defensa se clasifican en: a) Agentes que remueven a los radicales libres por medio de una reacción catalítica con ellos (por ejemplo enzimas antioxidantes); b) Proteínas que minimizan la actividad pro-oxidante de los radicales libres al contener un metal de transición y llevar a cabo una reacción tipo Fenton controlada (por ejemplo, ceruloplasmina, hemina); c) Proteínas que protegen

a las biomoléculas en contra del daño producido por los radicales libres (por ejemplo, proteínas tipo heat-shock); d) Metabolitos de bajo peso molecular que actúan como “atrapadores” de radicales libres, mejor conocidos como antioxidantes (por ejemplo, vitaminas E, C y A; sistema de glutatión oxidado/glutatión reducido; bilirrubina). (Gutierrez, 2006).

Generalidades de *Persea americana*

Se considera que la especie que dio origen al aguacate proviene de la zona montañosa del occidente de México y Guatemala. Su distribución natural va desde México hasta Perú, pasando por Centro América, Venezuela, Colombia y Ecuador. (Polania, 2014). Entre los países productores a nivel mundial se encuentran México, República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia. El principal cultivar que se consume a nivel mundial es el “Hass”. El aguacate, es un cultivo que se ha adaptado a las zonas subtropicales como son las Islas Canarias, de tal forma que la superficie de cultivo se ha incrementado en un 58% en tan solo ocho años (desde 2007 hasta 2015), siendo las variedades más cultivadas Hass y Fuerte. (Ezzeddine, 2018).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Division: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana*.

(Santamaria, 2013)

Descripción

El aguacate, es un árbol que mide desde 5 a 25 metros de altura, y se cultiva desde el Ecuador hasta zonas de clima mediterráneo. También se conoce al árbol con el nombre de palto y su fruto se denomina palta. El fruto es una drupa de color verdoso y piel fina o gruesa, según la especie. Cuando está maduro la pulpa tiene una consistencia como de mantequilla dura y su sabor recuerda levemente al de la nuez. (Pérez, 2006).

Composición química y nutricional

El aguacate destaca por su alto valor nutritivo. Posee carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas A, C, D, B6 y E (importante antioxidante), fibra, agua y minerales, siendo abundante en potasio y magnesio y pobre en sodio. Además de ser un alimento completo también es considerado como un alimento funcional, es decir, va más allá de sus ingredientes nutricionales básicos y presenta propiedades específicas benéficas para la salud.

En cuanto a la grasa es mayoritaria monoinsaturada: el 72% del total de grasas es ácido oleico, característico del aceite de oliva. (Villar, 2016). Además del ácido oleico; la pulpa también contiene ácidos palmíticos, linoleico y palmitoleico, siendo bajos los niveles de ácido esteárico. Entre los azúcares destacan los contenidos de heptosas tales como D-manoheptulosa y perseitol, y en menor concentración se encuentran sacarosa, glucosa y fructosa. La D-manoheptulosa es el azúcar mayoritario en el mesocarpio del aguacate.

Al igual que otras frutas y hortalizas, los aguacates son ricos en compuestos bioactivos tales como: vitamina E, flavonoides, carotenoides y

esteroles, entre otros, con actividad antioxidantes, los cuales previenen daños oxidativos para la salud humana. (Ezzeddine, 2018).

Definición Operacional de Términos

Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)

Son moléculas muy reactivas, como el superóxido, el hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales. Estos resultan nocivos para las células cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular. (Macedo, 2012).

Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)

Se forman por interacción del óxido nítrico con otros radicales y con oxígeno. Pueden dañar y matar las células por distintos mecanismos como la inactivación de los diferentes complejos de la cadena respiratoria. (Airaki, 2012).

Extractos Etanólicos

Son una disolución formada por el disolvente (etanol) y las sustancias de origen vegetal disueltas en él. Estos resultan de una extracción sólido-líquido, la cual consiste en poner en contacto un sólido molido con un líquido (disolvente) en el que son solubles algunas de las sustancias que incorpora el sólido en su composición. (Santamaria, 2013).

Operacionalización de las Variables

La Operacionalización de variables consiste en determinar el método a través del cual las variables serán medidas o analizadas. Comprende la definición conceptual y operacional de las variables pasando de un nivel abstracto a un nivel concreto y específico a efectos de poder observarla y manipularla, con el propósito de contrastar la hipótesis (Arias, 2006).

Tabla 1: Operacionalización de la variable dependiente actividad antioxidante *in vitro*.

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual
Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	Dependiente	La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia o compuesto para inhabilitar la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Youngson, 1994).
Definición Operacional	Dimensión	Indicador
Los datos de la actividad antioxidante se derivan de 3 métodos. - Estudio de la capacidad antioxidante sobre el radical hidroxilo. -Método de la actividad antioxidante (AOA). -Método del catión radical ABTS ^{•+} : Ensayo de decoloración en solución etanólica	Presencia de actividad antioxidante Ausencia de actividad antioxidante	Reacción Colorimétrica. - Lectura de la absorbancia a 532 nm. -Lectura de la absorbancia a 532 nm. -Lectura de la absorbancia a 734 nm.

Fuente: Autor, 2018.

La definición conceptual constituye una abstracción articulada en palabras para facilitar su comprensión y su adecuación a los requerimientos prácticos de la investigación. La definición operacional está constituida por indicadores que describe cómo será medida la variable en estudio (Balestrini, 2006).

Tabla 2: Operacionalización de la variable independiente extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas.

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de <i>Persea americana</i>	Independiente	Los extractos equivalen a preparar un jugo agregando la planta de interés y un disolvente ideal (Olaya y Méndez, 2003). El etanol tiene la capacidad de disolver moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, por lo que en este caso es el disolvente ideal (Dupont y Gokel, 1985).
Definición Operacional ¿Cómo se mide?	Dimensión	Indicador
Se usaran 2 métodos: - Determinación de la concentración de grupos fenólicos. -Determinación del contenido fenólico de flavonoides: Método colorimétrico del cloruro de aluminio.	-Presencia o ausencia de grupos fenólicos. -Presencia o ausencia de flavonoides.	Reacciones colorimétricas - Lectura de absorbancia a 765nm. -Lectura de la absorbancia a 415 nm.

Fuente: Autor, 2018.

Hipótesis

Hipótesis de Investigación (Hi)

Si existe relación entre la actividad antioxidante *in vitro* y las concentraciones de polifenoles y flavonoides de los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*, estudiados en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

Hipótesis Nula (Ho)

No existe relación entre la actividad antioxidante *in vitro* y las concentraciones de polifenoles y flavonoides de los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*, estudiados en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Los tipos de investigación se definen por el objetivo del estudio. Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios, donde se señala el grado de profundidad y el tipo de resultado. Los tipos de investigación representados en la espiral holística son: investigación exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010).

En este sentido, la presente investigación será de tipo Confirmatoria, ya que indaga acerca de las posibles relaciones entre eventos, a partir del control de una serie de variables extrañas, y su propósito es verificar las hipótesis derivadas de las teorías (Hurtado, 2010).

Diseño de Investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental (Arias, 2006). Adicionalmente, el diseño de investigación tiene relación con la amplitud, el donde y el cuándo de la información que se recolectará (Hurtado, 2010).

Al respecto, esta investigación tendrá un diseño mixto (de campo y de laboratorio) ya que los datos se tomarán directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar las variables, y posteriormente serán procesados en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

De acuerdo a la amplitud y el tiempo de la investigación, será bivariable, longitudinal y contemporánea, ya que se estudian dos variables diferentes, los datos serán recolectados a lo largo de un período de tiempo y en el presente. (Hernández *et al.*, 2010).

Población y Muestra

www.bdigital.ula.ve
Unidad de Investigación

La población es definida como el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones (Hernández *et al.*, 2005). Para el presente estudio, el grupo poblacional estará representado por las hojas, frutos, cáscaras y semillas de los árboles de *Persea americana* seleccionados para la valoración de actividad antioxidante, que cumplan con los siguientes criterios de inclusión:

- Las hojas y frutos deberán ser recolectadas directamente del árbol.
- Las hojas deber ser verdes y estar en buenas condiciones.
- El fruto debe estar maduro y estar en buenas condiciones.

Selección del Tamaño Muestral

La muestra es un subgrupo de la población (Hernández, *et al.*, 2005). Al respecto, se seleccionará al azar y a conveniencia 10Kg de frutos (aguacates) maduros y 50 hojas verdes del árbol de *Persea americana*, en la finca “Flamingo”, ubicada en el sector Santa Elena de Arenales, municipio Obispo Ramos de Lora, estado Mérida.

Sistema de Variables

En el desarrollo del trabajo investigativo, el científico indaga sobre ciertas propiedades que se modifican a las que se les denomina variables; en este sentido, una variable es una característica o cualidad, magnitud o cantidad que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. Según su función las variables se clasifican en: independientes, dependientes e intervinientes. (Arias, 2006).

De acuerdo a lo descrito, la variable independiente de la investigación corresponde a los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*, ya que es quien genera y explica los cambios en la variable dependiente. Por su parte, la variable dependiente de la investigación está representada por la actividad antioxidante que pueden presentar los extractos etanólicos de hojas, frutos, cáscaras y semillas de *Persea americana*. (Arias, 2006).

Procedimientos de la Investigación

Preparación de la Muestra

Las hojas y aguacates seleccionados de los árboles de *Persea americana*, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar por 10 minutos al aire. Posteriormente, se separaron manualmente los frutos de las semillas y las cáscaras, para luego colocar las hojas, frutos, cáscaras y semillas por separado en vidrios de reloj previamente esterilizados y ser llevados a la estufa a 65°C por 24 horas.

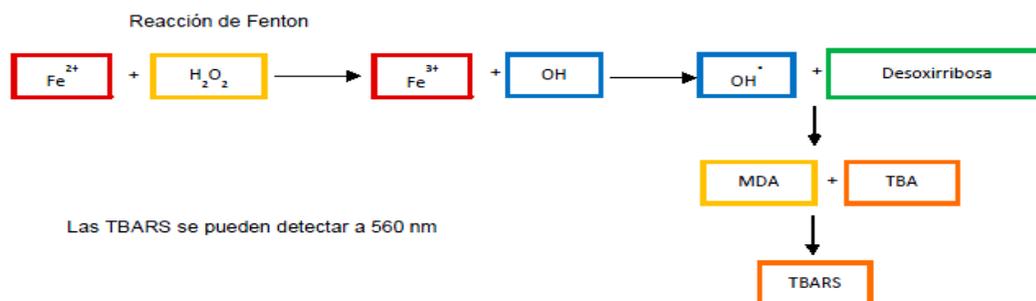
Se pulverizaron las hojas, frutos, cáscaras y semillas ya deshidratados hasta convertirlos en polvo. Se pesaron 5g de cada material por separado y se les agregó 50mL de etanol. Se dejaron 7 días en cuarto oscuro. Posteriormente, se filtraron los extractos por separado y se congelaron a -4°C hasta el día del análisis.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Método del Radical Hidroxilo (OH•)

En este método, el radical hidroxilo se generó por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso reduce al peróxido de hidrógeno para formar la especie OH•. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa se fragmenta hasta Malondialdehído (MDA) que forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico conocido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). (Esquema 2) (Haliwell *et al.*, 1987)

Esquema 2: Representación esquemática método de Halliwell *et al.*, (1987) para la medición del Radical Hidroxilo.



Para la producción del radical hidroxilo por la reacción de Fenton se agregaron los siguientes reactivos: 0,1 mL de desoxirribosa (28 mM), 0,5 mL de buffer fosfato (pH 7,4) 40 mM, 0,1 mL de FeCl₃ (1 mM), 0,1 mL de EDTA (1,04 mM), 0,1 mL de H₂O₂ (1 mM), 0,1 mL de ácido ascórbico (1 mM) y 0,2 mL de cada extracto etanólico. Esta mezcla se incubó por 1 h a 37°C, posteriormente se agregaron 0,5 mL de TBA (1% p/v) en 0,05 mM de NaOH y 0,5 mL de ácido tricloroacético (2,8% v/v). Luego se dejó reaccionar por 10 min a 100°C para registrar la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro (Halliwell *et al.*, 1987).

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

El valor de la AOA (Actividad antioxidante) se determinó por el método de Koracevic *et al.* (2001). En este método una solución estandarizada de Fe-EDTA reacciona con el peróxido de hidrógeno, produciendo la formación del radical hidroxilo (OH·). Este radical libre degrada el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Esta reacción es monitoreada espectrofotométricamente, y la inhibición del desarrollo de color en presencia del antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar.

Los reactivos preparados fueron los siguientes: (1) Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,4, (2) Benzoato de sodio 10 mM, (3) NaOH 50 mM, (4) EDTA 2 mM en buffer fosfato (Solución 1), (5) $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2 mM, (6) solución Fe-EDTA (preparado fresco mezclando iguales volúmenes de las soluciones 4 y 5, y dejando reposar 60 minutos a temperatura ambiente), (7) Peróxido de Hidrógeno 10 mM, (8) ácido acético 20% (v/v), (9) ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (p/v) en 50 mM de NaOH, (10) ácido úrico 1 mM en 5 mM de NaOH.

Cada muestra (A1) tenía su propio control (A0, muestra blanco) en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H_2O_2 se agregaron después del ácido acético 20%.

Para cada serie de análisis se preparó un control negativo (K1 y K0) por triplicado, conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0, excepto que la muestra antioxidante fue reemplazada con buffer fosfato.

Los estándares contenían 1 mM de ácido úrico (UA1 y UA0) y fueron usados para la calibración.

Para el análisis se pipetearon en los tubos los volúmenes en microlitros especificados en la Tabla 3.

Tabla 3: Volúmenes necesarios para el método AOA.

	A1	A0	K1	K0	UA1	UA0
Muestra	10	10	-	-	-	-
Ácido úrico	-	-	-	-	10	10
Buffer	490	490	500	500	490	490
Benzoato de Sodio	500	500	500	500	500	500
Ácido acético	-	1000	-	1000	-	1000
Fe-EDTA	200	200	200	200	200	200
H ₂ O ₂	200	200	200	200	200	200
Incubar por 60 minutos a 37°C						
Ácido acético	1000	-	1000	-	1000	-
TBA	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Los tubos se incubaran por 10 minutos a 100 °C en baño de agua, y se enfriaran en baño de hielo. Se medirá la absorbancia a 532 nm usando agua destilada como blanco. La actividad antioxidante será calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{AOA (mM)} = (\text{CUA}) * (\text{K}-\text{A}) / (\text{K}-\text{UA}), \text{ donde.}$$

K= absorbancia del control (K1-K0), A= absorbancia de la muestra (A1-A0), UA= absorbancia de la solución de ácido úrico (UA1-UA0), y CUA es la concentración de ácido úrico (en mM).

Método del Cation Radical $ABTS^{\bullet+}$

Se usó el método desarrollado por Robertare *et al.* (1999). En este método el $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó en agua a una concentración de 7mM. El catión radical ($ABTS^{\bullet+}$) se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS 7mM, con persulfato de potasio a una concentración final de 2.45mM (en agua), en oscuridad durante 12- 16 h antes de su uso. Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734nm a 30°C, lo cual se logra mezclando aproximadamente 40 μ l de la solución del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ y 960 μ l de etanol al 20% (v/v). Se tomaron 10 μ l de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparados en etanol y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 ml de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ diluida. Entonces se midieron los valores de densidad óptica a 734 nm a 1 minuto y 6 minutos después de la mezcla. Se usó como estándar una solución de 8 mM de Trolox, la cual se diluyó para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 μ M, en buffer PBS 5 mM (pH 7,4).

Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ a 734nm después de 6 min de reacción, y se realizó una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y poder reportar el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada es el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevaron a cabo tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

Determinación de la Concentración de Fenoles Totales

El contenido total de polifenoles se determinó por espectrofotometría a 765 nm usando el reactivo de Folin- Ciocaltecau (Singleton et al.,1999). Se mezclaron 100 µl del reactivo de Folin Ciocaltecau diluido 1/10 con agua, y se le agregaron 400 µl de carbonato de sodio 7,5% (p/v). Se registró la absorbancia después de 10 minutos de reacción a 37°C, usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración total de polifenoles se determinó usando una curva de calibración usando una solución de 0,1 g/L de ácido gálico como estándar (se prepararon diluciones de 0,025, 0,05 y 0,1 g/L) (Singleton *et al.*,1999).

Determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio

El método colorimétrico del cloruro de aluminio se modificó del procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998). En este método, la Quercetina fue usada como estándar para construir una curva de calibración para lo cual 10 miligramos de Quercetina se disolvieron en etanol al 80% (v/v), y entonces se diluyó hasta concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) se mezclaron por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio se sustituyó por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos etanólicos de las muestras en estudio se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides como se describió anteriormente.

Diseño de Análisis

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y se les aplicaron los test o pruebas paramétricas, para analizar si los datos se ajustan a una distribución normal, y si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras. Los datos numéricos fueron analizados bajo un diseño cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas. Se hizo un análisis de la varianza, empleando la prueba ANOVA *post hoc* Scheffé.

Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)

El análisis de varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblacionales ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado (Sote, 2005). El análisis de varianza (ANOVA) de un factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, y se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. La hipótesis nula ($H_0: p \geq 0,05$ las medias poblacionales son iguales) traducirá la idea de que en los diferentes grupos se obtienen resultados similares y la hipótesis alternativa ($H_1: \leq 0,05$ al menos dos medias poblacionales son distintas) lo negará. La significación del contraste nos dará una idea de si las diferencias observadas en los diferentes grupos son imputables al azar (significación grande) o hay una diferencia intrínseca entre algunos grupos (significación pequeña) (Sote, 2005).

Prueba Post-Hoc

Una vez que se determinó que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango *post-hoc* y las comparaciones múltiples por parejas permitieron determinar que medias difieren. Las pruebas de rango son aquellas que buscan identificar grupos homogéneos (medias parecidas). Las comparaciones múltiples buscan establecer diferencias entre grupos basándose en diferencia dos a dos, y generan una matriz donde los asteriscos indican las medias de grupo significativamente diferentes a un nivel alfa de 0,05. En este caso, se llevó a cabo la prueba *post-hoc* conocida como Test de Scheffé. Por medio de esta prueba se hacen todas las comparaciones posibles, por ejemplo, el primer grupo con respecto a cada uno de los restantes, pero también el primero con respecto al grupo formado por la unión de dos de los restantes, etc. Posteriormente, es necesario interpretar el nivel de significación, si esta es menor que 0,05, las diferencias entre los grupos tomados por la variable en estudio son significativas, allí mismo se observa entre que grupos exactamente hay diferencias. Si el nivel de significación es mayor o igual a 0,05, no hay diferencias significativas (Blair y Taylor, 2008).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Para este trabajo de investigación se prepararon extractos etanólicos de hojas, pulpas, cáscaras y semillas de *Persea americana*, de la cual se depositó una muestra testigo en el Herbario MERF Dr. Luis Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Las muestras son originarias de la finca “Flamingo”, ubicada en el sector Santa Elena de Arenales, municipio Obispo Ramos de Lora, estado Mérida-Venezuela. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, donde se determinó la concentración de polifenoles y flavonoides; además se logró determinar la actividad antioxidante a través de diferentes métodos (Método Radical hidroxilo, *ABTS*^{•+} y del AOA).

Las distintas determinaciones que se realizaron fueron comparadas con una serie de métodos estadísticos en los cuales se pudo observar la relación entre la concentración de los componentes con la actividad antioxidante que se encontraba presente en la muestra analizada.

Caracterización química de los extractos etanólicos de *P. americana*.

En la Tabla 4 se observan las concentraciones medias obtenidas de flavonoides y polifenoles de los extractos etanólicos en estudio. Para la determinación de flavonoides se utilizó el método colorimétrico del cloruro de aluminio, en el que se utiliza una solución de quercetina como estándar, observándose valores que van desde 2,2 hasta 430,3 mg equivalentes de quercetina/g de extracto, presentándose el mayor contenido de flavonoides en el extracto etanólico de la cáscara. En el caso de la determinación de la concentración de polifenoles, se utilizó una curva de calibración con ácido gálico, obteniendo valores de polifenoles, medidos en mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, de 23,8 para la semilla, 1,7 para la pulpa, 0,7 para la cáscara y 0,4 para las hojas; observándose mayor concentración de polifenoles en el extracto de semilla (Tabla 4).

Tabla 4: Concentración media de flavonoides y grupos fenólicos de las muestras analizadas.

EXTRACTO	Flavonoides (mg equivalentes de quercetina/g de extracto)	Grupos Fenólicos (mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto)
Semilla	49,8 ± 0,0b	23,8 ± 0,6d
Pulpa	2,2 ± 11,6a	1,7 ± 0,1c
Cáscara	430,3 ± 1,0d	0,7 ± 0,0b
Hoja	158,1 ± 1,6c	0,4 ± 0,0a

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé ($p < 0.05$).

Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *P. americana*.

Una vez realizada la caracterización química de los extractos en estudio, se procedió a determinar la actividad antioxidante a través de los métodos AOA, *ABTS*^{•+} y Radical Hidroxilo, los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 5.

El método AOA tiene como finalidad evaluar la actividad antioxidante de una muestra usando como medio de comparación el ácido úrico como estándar, reacción que es monitoreada espectrofotométricamente y que al observarse inhibición en la formación de color indica presencia de antioxidante siendo definida como AOA.

Los valores obtenidos en los extractos analizados fueron de semillas 9,81; pulpa 32,15; cáscaras 4,67 y hojas 4,63 mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto, observándose el mayor valor de AOA en la pulpa.

A su vez, se compararon los valores de AOA de los extractos en estudio con antioxidantes comerciales, siendo los valores de AOA de semillas, pulpa, cáscaras y hojas, superiores a los de la quercetina, melatonina y ácido lipoico (Tabla 5).

Por último, no se encontró una correlación positiva entre el contenido de flavonoides ($R^2 = -1,2$) y polifenoles ($R^2 = -0,978$) con la actividad antioxidante medida a través del método de AOA (Tabla 6).

Tabla 5: Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos analizados por los métodos de AOA, radical hidroxilo y ABTS•+.

EXTRACTO	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto)	Radical Hidroxilo (% de inhibición/g de extracto)	ABTS•+	
			mmoles equivalentes de Trolox/g de extracto	µg equivalentes de Trolox/mL de extracto
Semilla	9,81 ± 4,39d	90,6 ± 1,63d	0,0217 ± 0,0015	543,45± 37,63g
Pulpa	32,15 ± 0,74e	95,9 ± 1,49d	0,00	0,00
Cáscara	4,67 ± 0,72c	45,8 ± 1,00b	0,0035 ± 0,0001	88,39±1,84f
Hoja	4,63 ± 0,55c	91,2 ± 0,25d	0,0010 ± 0,0000	23,88±0,25e
Antioxidantes Comerciales (preparados a 1 Mm)				
Quercetina	0,86±0,03b	53,89 ± 1,07c	0,00011 ± 0,0000	2,64 ± 0,34d
Melatonina	0,83±0,02b	53,07 ± 1,13c	0,00007 ± 0,0000	1,75 ± 0,14c
Ácido Lipoico	0,71±0,07 ^a	27,94 ± 0,98 ^a	0,00004 ± 0,0000	1,06 ± 0,11b

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P<0.05).

En cuanto a la inhibición del Radical Hidroxilo, se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.*, (1987), encontrándose porcentajes de inhibición de 90,6; 95,9; 45,8 y 91,2% de inhibición/g de extracto para la semilla, pulpa, cáscara y hojas, respectivamente, siendo la cáscara el menor de todos. Al compararlo con los antioxidantes comerciales usados, los extractos etanólicos tanto de semilla, pulpa y hoja presentaron porcentajes

de inhibición superiores a todos los antioxidantes usados, mientras que el de la cáscara fue inferior a los de la quercetina y melatonina, y superior al ácido lipoico (Tabla 5). Al igual que para el método del AOA, no se observó una correlación positiva entre el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo y la concentración de flavonoides ($R^2=-12,38$) y polifenoles ($R^2=-9,717$) (Tabla 6).

Tabla 6: Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.

Parámetro	Flavonoides	Polifenoles	AOA	RH	<i>ABTS</i> ^{•+}
Flavonoides	1	X	-1,2	-12,38	-0,506
Polifenoles		1	-0,978	- 9,717	0,9645
AOA			1	X	X
RH				1	X
<i>ABTS</i> ^{•+}					1

Por último, se evaluó la actividad antioxidante a través del método catión radical *ABTS*^{•+}, con la finalidad de determinar la actividad antioxidante total (AAT), usando como estándar el Trolox, proceso que consiste en secuestrar el catión radical *ABTS*^{•+}, observándose la inhibición del desarrollo de color. Con este método se obtuvieron valores de 0,0217 μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto para la semilla; 0,0 para la pulpa; 0,0035 para la cáscara y 0,0010 para la hoja, también expresados como μ g/mL obteniendo 543,45 μ g equivalentes de Trolox/mL de extracto para la semilla; 0,0 para la pulpa; 88,39 para la cáscara y 23,88 para la hoja respectivamente (Tabla 5). En base a esto se observó que los valores de AAT de la semilla, cáscara y hoja, son superiores a los de los antioxidantes comerciales usados para comparación, a excepción de la pulpa que presentó un valor de AAT inferior al de todos los antioxidantes comerciales analizados (Tabla 5). Así mismo, se evidenció una correlación positiva entre el contenido de polifenoles

($R^2=0,9645$) y los valores de AAT obtenidos por el método de catión radical $ABTS^{\bullet+}$, pero no se observó correlación positiva entre el contenido de flavonoides ($R^2= - 0,506$) con los valores de AAT (Tabla 6).

Discusión

Caracterización química

Persea americana, comúnmente conocida como aguacate, ha ganado recientemente una gran popularidad y, a menudo, se comercializa como un "superalimento" debido a su composición nutricional única, contenido de antioxidantes y perfil bioquímico. Sin embargo, el término "superalimento" puede ser vago y engañoso, ya que a menudo se asocia con declaraciones de propiedades saludables poco realistas. Ahora bien, debido a su inmensa popularidad y contenido bioquímico diverso, los aguacates también se han utilizado ampliamente en las industrias alimentaria, nutracéutica, farmacéutica y cosmética. Además, por sus propiedades beneficiosas para la salud se han investigado en varios estudios preclínicos y clínicos en las últimas décadas. Es por ello, que esta investigación tuvo como objetivo determinar la composición química y actividad antioxidante de extractos etanólicos de las semillas, frutos, cáscaras y hojas de *P. americana*, con el propósito de confirmar las propiedades que según la literatura posee, además de aportar a la sociedad mayor información sobre los beneficios que ofrece el consumo de la misma.

En cuanto a la composición química, el contenido de flavonoides fue de 49,8, 2,2, 430,3 y 158,1 mg equivalentes de quercetina/g de extracto, para semilla, pulpa, cáscara y hojas, respectivamente; a su vez, el contenido de

polifenoles obtenido para la semilla fue de 23,8, pulpa 1,7, cáscara 0,7 y hojas 0,4 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto (Tabla 4).

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados por Kemadjou, *et al.*, (2021), en un trabajo titulado: "Contenido total de polifenoles y flavonoides y capacidad antioxidante de algunas variedades de cáscara de *Persea americana* consumido en Camerún" se observó que el contenido de polifenoles totales en cáscara (el cual se estimó mediante el método de Folin-Ciocalteu para cada extracto) reportado para cada variedad y para cada solvente utilizado, fue superior al obtenido en la presente investigación, ya que los valores de polifenoles totales en este estudio variaron desde 2407 (Fuerte florido) a 804 (Anaheim) mg GAE/g MS para extractos etanólicos, de 1037 (Fuerte florido) a 703 (Collinson) mg GAE/g MS para extractos hidroetanólicos, y de 867 (Fuerte florido) a 673 (Semil) mg GAE/g MS para extractos acuosos. Con respecto al contenido de flavonoides totales en cáscara (determinado mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio), los resultados obtenidos por Kemadjou, *et al.*, (2021), variaron de 986,26 (Fuerte florido) a 635 (Anaheim) mg QE/g MS para extractos etanólicos, de 724 (Fuerte florido) a 311 (Hickson) mg QE/g MS para extractos hidroetanólicos, y de 427 (Fuerte florido) a 119 (Hickson) mg QE/g MS para extractos acuosos. Estos valores también fueron superiores a los reportados en el presente estudio, con respecto principalmente al contenido de flavonoides totales en extractos etanólicos de cáscara.

Del mismo modo en un estudio realizado por da Silva (2022), titulado "Residuos fitoquímicos de aguacate como potenciales inhibidores de la acetilcolinesterasa, agentes antioxidantes y neuroprotectores", realizado en semilla y cáscara de *P. americana*, reportaron valores de polifenoles totales

(estimado mediante el método de Folin-Ciocalteu para cada extracto) en cáscara de 26,33 mg para el extracto en hexano y de 35,40 mg de ácido gálico/g de extracto para el extracto en etanol; y en semilla de 32,48 mg para el extracto en hexano y 32,15 mg de ácido gálico/g de extracto para el extracto en etanol. Con respecto a los valores de flavonoides totales (determinados mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio) obtuvieron valores de 640,72 y 694,06 mg de quercetina/g de extracto para los extractos de semilla en hexano y etanol, respectivamente; y de 1243,78 y 1199,04 mg de quercitina/g de extracto para los extractos de cáscara en hexano y etanol, respectivamente. En tal sentido, el extracto etanólico de cáscara presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos totales ($35,40 \pm 0,599$ mg de ácido gálico/g de extracto etanólico), y tanto en cáscara como en semilla ambos valores fueron superiores a los reportados en este trabajo de investigación. Con respecto a los flavonoides, los extractos de cáscara presentaron un contenido de flavonoides significativamente mayor, que los extractos de semillas en ambos solventes y ambos valores también fueron superiores a los reportados en el presente trabajo.

Segovia *et al.*, (2018), realizaron un estudio titulado “Semilla de aguacate: un estudio comparativo del contenido y capacidad antioxidante y protección de los modelos de aceite contra la oxidación” donde determinaron el contenido fenólico total en semilla, por medio del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, reportando valores de 30,98 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto utilizando como solvente de extracción etanol/agua 50:50 a 4 °C durante la noche, valores que son superiores a los reportados por los extractos etanólicos de semillas evidenciados en la presente investigación, pero similares a los obtenidos por da Silva (2022) para los extractos de semilla utilizando como solvente el etanol y determinado por el mismo método colorimétrico.

En base a los resultados obtenidos y a los reportados en estas investigaciones, es evidente que la cantidad o concentración de estos compuestos bioactivos dentro de cada parte estudiada son muy variables. Ahora bien, según García (2022), las diferencias entre los valores se deben a muchos factores entre los cuales se pueden mencionar el tipo de solvente de extracción, el método de extracción, el tamaño de la fruta, la etapa de maduración, la ubicación geográfica, entre otros. Además, influye el hecho de que la reacción de reducción del método de Folin-Ciocalteu es bastante genérica, lo que permite que muchas moléculas interfieran en el ensayo (Cádiz-Gurrea, 2020). Esto es importante mencionarlo ya que hay que recordar que en el presente trabajo se partió de extractos crudos, poco procesados.

Con respecto a la madurez de la fruta, la misma regula la composición fitoquímica del fruto y sus derivados, junto con las condiciones de crecimiento y variedad del aguacate (Dabas, 2013). Por lo tanto, a medida que aumenta la madurez, el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de la semilla también parecen aumentar, por lo que también se relaciona con el color del fruto (Sánchez-Quezada, 2021). Además, el color y la textura de la cáscara del aguacate cambian con los tipos y cantidades de fenoles, por ejemplo, todas las estructuras formadas por unidades de (epi)catequina disminuyen sus niveles en la maduración temprana (Akan, 2021), por lo que es un factor importante a la hora de determinar la concentración de los compuestos bioactivos.

De acuerdo a los trabajos presentados anteriormente, la semilla y la cáscara del aguacate tienden casi siempre a mostrar un contenido fenólico y de flavonoides más alto que la pulpa (Ben-Othman, 2020). Asimismo, el

extracto de semilla muestra menor contenido fenólico que el observado en el extracto de cáscara de aguacate, en la mayoría de los casos. Esta comparación apenas se ha abordado, pero se ha reportado en muchos casos un contenido significativamente mayor de compuestos bioactivos en extractos de cáscara de aguacate en comparación con los de semillas (García, 2022). Esta diferencia en el contenido fenólico y de flavonoides podría atribuirse a distintas exposiciones a los factores de estrés ambiental. Como Oboh *et al.*, (2016), informó, los factores de estrés provocan una síntesis intensa de compuestos fenólicos para prevenir el daño oxidativo de las estructuras celulares de las plantas. La semilla, que está protegida por la parte comestible del fruto, está menos expuesta a factores de estrés como, por ejemplo, los rayos ultravioletas de la luz solar, razón por la cual la síntesis de fenoles puede ser menor. Adicionalmente a esto, según García (2022), el extracto de cáscara de aguacate está compuesto principalmente por flavonoides monoméricos glicosilados y condensados, considerado como el principal grupo fenólico de la piel (20 compuestos), formado en su mayoría por derivados de flavonoles glicosilados.

En base a estas afirmaciones y a pesar de que los valores del presente trabajo están por debajo de los valores reportados en la bibliografía, en algunos casos los valores de las muestras reportadas en este trabajo coinciden con los datos bibliográficos, específicamente en lo que se refiere al contenido de flavonoides totales, ya que en el extracto de cáscara el valor de concentración de flavonoides fue de 430,3 mg; seguido de hojas con 158,1 mg; semilla 49,8 mg y pulpa de 2,2 mg de quercetina/g de extracto (Tabla 4). Para fenoles la mayor concentración obtenida en este estudio fue de 23,8 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto en semilla (Tabla 4).

Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos

El potencial antioxidante está relacionado con la capacidad de proteger un sistema biológico contra el efecto nocivo de los procesos oxidativos. Estos antioxidantes son fundamentales para la preservación del sistema biológico de especies reactivas potencialmente dañinas. La complejidad de las reacciones que ejercen los antioxidantes para realizar su actividad dificulta la determinación de su poder biológico en una muestra. Además, dado que la capacidad antioxidante medida por un ensayo específico solo refleja las condiciones aplicadas en ese ensayo, usar un tipo de reacción sería ineficiente para predecir cada detalle oxidativo de un sistema. Por ello, es habitual realizar diversas metodologías basadas en diferentes mecanismos a través de los compuestos fenólicos ejerciendo su poder antioxidante en función de su estructura (Rodríguez, 2013).

Ahora bien, la determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos en este estudio fue evaluada a través de tres métodos: AOA, % de inhibición del radical hidroxilo y ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}. En el caso del método del AOA se obtuvieron valores de: 9,81; 32,15; 4,67 y 4,63 mM equivalente de ácido úrico/g de extractos de semilla, pulpa, cáscara y hoja, respectivamente. Por otra parte, el % de inhibición del radical hidroxilo arrojó valores para los extractos etanólicos de semilla de 90,6; pulpa 95,9; cáscara 45,8 y hoja 91,2 % de inhibición/g de extracto. Del mismo modo, la determinación de AAT mediante el método ABTS^{•+} expresó valores de 543,45; -41,70; 88,39; y 23,88 µg equivalentes de Trolox/mL de extracto de semilla, pulpa, cáscara y hoja, respectivamente. Estos valores de AAT también fueron expresados en mmoles equivalentes de Trolox/g de extracto, esto con la finalidad de facilitar la comparación de los mismos con

los reportados en la bibliografía (Tabla 5). En base a esto, los extractos que reflejaron mayor actividad antioxidante dependiendo del método fueron: para AOA la pulpa, para radical hidroxilo pulpa y para $ABTS^{\bullet+}$ semilla. Es importante mencionar, que en este estudio no se demostró una correlación positiva entre el contenido de flavonoides con la actividad antioxidante medida a través de los 3 métodos elegidos, ni el contenido de polifenoles medida a través del método de AOA y el Radical Hidroxilo, sólo se obtuvo correlación positiva entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante determinada por el método del $ABTS^{\bullet+}$ (Tabla 6).

En el estudio realizado por Segovia *et al.*, (2018), titulado “Semilla de aguacate: un estudio comparativo del contenido y capacidad antioxidante y protección de los modelos de aceite contra la oxidación” obtuvieron un valor de la actividad antioxidante por medio del método del $ABTS^{\bullet+}$ y para un extracto de semilla en etanol-agua (50/50) de 263 $\mu\text{mol TE/g PS}$. Este valor está por encima del valor reportado en la presente investigación, el cual fue de 21,7 $\mu\text{mol TE/g PS}$ para semilla (Tabla 5). Es importante resaltar que en este trabajo de Segovia *et al.* (2018) se realizó la comparación entre los valores obtenidos por los distintos métodos de determinación de actividad antioxidante utilizados (valores de captación de radicales) con los diferentes valores de captación de radicales encontrados en la bibliografía, reportando para el método de $ABTS^{\bullet+}$, valores que van desde 58,45 hasta 725 $\mu\text{mol TE/g PS}$, para distintas variedades de semilla de aguacate y condiciones de extracción variadas, demostrando las grandes diferencias que se presentan en los resultados debido principalmente a estos dos parámetros. Vale la pena resaltar que, aunque estos valores están por encima de los obtenidos en este estudio el valor reportado para semilla se acerca al límite inferior de los valores reportados por la bibliografía antes mencionados.

En otro estudio realizado por Rosero (2019), titulado "Análisis de la Composición Fenólica de Subproductos (Semillas y Cáscaras) de Aguacate (*Persea americana* Mill.), cultivado en Colombia", donde emplearon el método de catión radical $ABTS^{\bullet+}$, reportaron valores de 0,177 mmol Trolox/g semilla seca y 0,340 mmol Trolox/g de cáscara seca, valores superiores a los reportados en la presente investigación (Tabla 5). Es importante resaltar que en comparación con extractos de semillas de la variedad Hass (0,094 mmol Trolox/g seco peso) y semillas de la variedad Shepard (0,091 mmol Trolox/g de peso seco) y cáscaras de Shepard (0,112 mmol Trolox/g de peso seco) (Kosinska, 2013), los extractos de semillas de este estudio (cultivar Nariño) presentaron una mejor capacidad de captación de radicales $ABTS^{\bullet+}$.

Asimismo, Castro-López (2019), en su estudio titulado "Perfil polifenólico y actividad antioxidante de extractos de hoja hidroalcohólicos purificados de siete cultivares mexicanos de *Persea americana*", determinó la capacidad antioxidante de extractos de hoja empleando el método del catión radical $ABTS^{\bullet+}$, reportando valores que van desde 269,56 a 442,72 $\mu\text{g TE/mL}$ de extracto, valores igualmente superiores a los reportados en la presente investigación, específicamente para el extracto de hoja (Tabla 5). Esta diversidad de valores también se obtuvo con los métodos de DPPH y LPO, concluyendo que la diversidad y variación fitoquímica son evidentes cuando se comparan los cultivares, lo que podría ser el resultado de la constitución genética ya que se cultivaron en las mismas condiciones climáticas y las muestras se tomaron de árboles de aguacate maduros y productivos.

En el trabajo realizado por García (2022), se reportaron valores de actividad antioxidante por el método de $ABTS^{\bullet+}$ a partir de extractos de semilla y cáscara de 496 y 1510 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto seco, respectivamente y en este estudio un mayor contenido fenólico en la cáscara

de aguacate también reportó valores más altos de FRAP, TEAC y ORAC que la semilla de aguacate. Esto coincide con los informes de que los compuestos fenólicos son responsables de la actividad antioxidante de los extractos de frutos y plantas (Rodríguez, 2013), lo que podría demostrarse por la correlación existente entre el TPC y los valores antioxidantes en los extractos de subproductos. Para comprender esta destacada actividad antioxidante, en este estudio, se revisaron los resultados de la caracterización de la cáscara de aguacate realizados por HPLC-ESI-qTOF-MS, mostrando una mayor diversidad de moléculas fenólicas de alto peso molecular y mayor polimerización que las encontradas en la semilla, tales como dímeros, trímeros y tetrámeros de procianidinas. Estas características se han relacionado anteriormente con un poder antioxidante significativo (Zeng, 2020).

Además, la actividad antioxidante depende en gran medida de la estructura química: la categoría fenólica, la disposición de los grupos hidroxilo y otros grupos funcionales unidos a los anillos aromáticos, así como la conformación del propio anillo, que afectan su poder (Veiko, 2021). Con base en esto, y respaldado por los resultados del TEAC, Rice-Evans *et al.* afirmó que el perfil bioactivo y antioxidante más impresionante lo proporciona la quercetina y sus características estructurales (Song, 2020). Ahora bien, sabiendo que este compuesto en este estudio, solo se identificó en la cáscara del aguacate en grandes cantidades formando varios tipos de enlaces glucosídicos, además de la presencia de algunos ácidos fenólicos con esqueleto de orto-difenol y varias procianidinas altamente polimerizadas, podría confirmar la capacidad apagante y el poder reductor de la cáscara de aguacate, en este estudio.

En base a todo lo expuesto, es evidente que la actividad antioxidante del fruto y la planta de aguacate depende de múltiples factores como el uso de diferentes técnicas de extracción, uno de los más importantes, la variedad, condiciones de extracción, el uso de disolventes con naturalezas y proporciones distintas, constitución genética, mayor diversidad de moléculas fenólicas, la polimerización, entre otros (Figuroa *et al.*, 2018). Factores que pueden justificar la variabilidad en la amplia gama de valores que se han obtenido y que están reportados en la bibliografía, así como los valores obtenidos en el presente estudio. Adicionalmente, en la presente investigación se determinó que los compuestos fenólicos son en parte responsables de la actividad antioxidante de los extractos estudiados, ya que se observó correlación entre el TPC y los valores antioxidantes obtenidos por el método de *ABTS*^{•+}. Ahora, con respecto a los bajos valores obtenidos, es importante indicar que los métodos utilizados para este tipo de medición son extremadamente dependientes de las condiciones de reacción y de los sustratos o productos, por lo que no todos los métodos arrojan los mismos valores de actividad (Cádiz-Gurrea, 2014), permitiendo que muchas moléculas interfieran en el ensayo (Cádiz-Gurrea, 2020) y más cuando se trabaja con extractos crudos, poco procesados, como en este caso, que a su vez está relacionado con la técnica de extracción, factor catalogado como uno de los más importantes para la obtención de resultados idóneos en cuanto a los compuestos bioactivos y actividad antioxidantes de los extractos.

Una fruta de aguacate promedio se compone de pulpa (entre 65 y 73%), cáscara (entre 11 y 15%) y semilla (entre 16 y 20%) (Calderón-Oliver, 2016). Estudios recientes han demostrado que el fruto del aguacate posee una alta calidad nutricional. La pulpa es reconocida por sus altos niveles de vitaminas, minerales, proteínas y fibras, así como altas concentraciones de ácidos

grasos insaturados y compuestos bioactivos como carotenoides, ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, procianidinas, taninos condensados y flavonoides. Las cáscaras y semillas también han sido identificadas como matrices interesantes debido a su alto contenido en compuestos bioactivos como carotenoides, tocoferoles y especialmente compuestos fenólicos (Bhuyan, 2019). Los principales fenoles identificados hasta ahora en el aguacate son derivados del ácido clorogénico (ácidos cafeoilquínico y cumaroilquínico) y flavonoides (catequinas, glucósidos de quercetina y procianidinas) (Velderrain-Rodríguez, 2021).

Los compuestos fenólicos derivados del aguacate ya se han asociado con una serie de beneficios relacionados con la salud: actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antienvjecimiento, antiagregante, antibacteriana y antifúngica, entre otros (Melgar, 2018). Muy a pesar de su bioactividad comprobada, estas partes no comestibles se desechan comúnmente. Anualmente, se estima que al menos 1,6 millones de toneladas de semillas y cáscaras de aguacate se desechan en todo el mundo (Salazar-López, 2020), lo que las convierte en una fuente notable de contaminación ambiental y provoca un gran desperdicio de valor nutricional. En cambio, con este tipo de investigaciones se podría llegar a incentivar el uso de estos residuos para obtener una amplia variedad de ácidos fenólicos y flavonoides a bajo costo y con un alto potencial funcional para la formulación de alimentos, productos nutraceuticos o cosméticos (Del Castillo-Llamosas, 2021).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La concentración de polifenoles, reportada como mg equivalentes de ácido gálico/gramos de peso seco, fue de 23,8 para la semilla, 1,7 para la pulpa, 0,7 para la cáscara y 0,4 para la hoja. El mayor contenido de polifenoles para los extractos etanólicos se reportó para la semilla.
- La concentración de flavonoides obtenida en los extractos de cáscaras, semillas, pulpas y hojas fue de 430,3; 49,8, 2,2 y 158,1 mg equivalentes de quercetina/gramo de peso seco, respectivamente. El mayor contenido de flavonoides para los extractos etanólicos se reportó para la cáscara.
- Los valores de AOA, medidos como mM equivalentes de ácido úrico/g de peso seco, fueron de 9,81 para las semillas, 32,15 para la pulpa, 4,67 para la cáscara y 4,63 para la hoja. Los valores de % de inhibición de radical hidroxilo/g de peso seco fueron de 90,6, 95,9, 45,8 y 91,2 para semilla, pulpa, cáscara y hoja, respectivamente. Por último, los valores de AAT (μ moles equivalente de Trolox/g de peso seco) fueron 21,7 para la semilla, 1,7 para la pulpa, 3,5 para la cáscara 1,0 para la hoja.
- Solo se obtuvo correlación positiva entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante medida a través del método *ABTS*^{•+}, lo

que indica al menos por este método, que la actividad antioxidante en el aguacate esta correlacionada con la concentración de polifenoles.

- De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los extractos etanólicos de semilla, pulpa, cáscara y hojas de *P. americana*, se deduce que la misma posee compuestos bioactivos con un alto potencial funcional que le pudieran otorgar algún tipo de beneficio relacionado con la salud, formulación de alimentos, productos nutracéuticos o cosméticos principalmente en base a los residuos derivados del fruto.
- Este es uno de los primeros estudios donde se realiza un análisis formal de la actividad antioxidante y contenido de polifenoles y flavonoides de extractos etanólicos de semilla, pulpa, cáscara y hoja de *P. americana* proveniente de Mérida (Venezuela), contribuyendo significativamente con el conocimiento de la especie, así como de sus posibles aplicaciones.

Recomendaciones

- Para una mejor evaluación de la composición química y actividad antioxidante, se sugiere incrementar el número de muestras a analizar.
- Realizar la comparación de la actividad antioxidante y análisis químico de muestras de *P. americana* obtenidas en distintas localizaciones geográficas, y con extractos llevados a cabo con diferentes solventes.
- Se sugiere la realización de estudios basados en la determinación de los tipos de compuestos fenólicos y de flavonoides presentes en las muestras de extractos etanólicos de semilla, pulpa, cáscara y hoja de *P. americana*, pudiendo de esta manera evaluar si las diferencias de concentración se deben a los distintos polifenoles y flavonoides que contienen estas muestras.
- Realizar estudios sobre la actividad terapéutica presente en los extractos etanólicos de semilla, pulpa, cáscara y hojas de *P. americana*, específicamente sobre la actividad antibacteriana.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Airaki, M. (2012). Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura. (Tesis de grado). Universidad de Granada, Granada, España.
- Akan, S. (2021). Phytochemicals in avocado peel and their potential uses. *Food Health*, 7, 138–149.
- Álvarez, S.; Ávila, G; Coto, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales* 36(2).
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica*. Caracas – Venezuela. Editorial Episteme. 106–109
- Ávalos, A.; Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3), 119-145.
- Balestrini, A. (2006). *Cómo se Elabora el Proyecto de Investigación*. (7ma. ed) Caracas, Venezuela: Consultores Asociados.
- Ben-Othman, S.; Jõudu, I.; Bhat, R. (2020). Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules* 25, 510, **pág.**
- Bhuyan, D.J.; Alsherbiny, M.A.; Perera, S.; Low, M.; Basu, A.; Devi, O.A.; Barooah, M.S.; Li, C.G.; Papoutsis, K. (2021). The odyssey of bioactive compounds in Avocado (*Persea Americana*) and their health benefits. *Antioxidants*, 8, 426.
- Blair, C.; Taylor, R. (2008). *Bioestadística*. Peason Prentice Hall. pp. 126.
- Cádiz-Gurrea, M.L.; Fernández-Arroyo, S.; Segura-Carretero, A. (2014). Pine bark and green tea concentrated extracts: Antioxidant activity and comprehensive characterization of bioactive compounds by HPLC-

ESI-QTOF-MS. International Journal of Molecular Science 15, 20382–20402.

- Cádiz-Gurrea, M.L.; Fernández-Ochoa, Á.; Leyva-Jiménez, F.J.; Guerrero-Muñoz, N.; Del Carmen Villegas-Aguilar, M.; Pimentel-Moral, S.; Ramos-Escudero, F.; Segura-Carretero, A. (2020). LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru cocoa by-products for commercial applications. *Molecules*, 25, 3177.
- Calderón-Oliver, M.; Escalona-Buendía, H.B.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverri, J.; Pedroza-Islas, R.; Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT Food Sci. Technol*, 65, 46–52.
- Castro, V., Mendoza, Y., Serrano C. y Del Carpio, C. (2012). Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólico y clorofórmico de *Flourensia polycephala* Dillon (phauka) y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su evaluación *in vivo* en infecciones dérmicas por *Staphylococcus aureus*. *Folia dermatol*. 23(2):53-59.
- Castro-López, C.; Bautista-Hernández, I.; González-Hernández, M.D.; Martínez-Ávila, G.C.G.; Rojas, R.; Gutiérrez-Díez, A.; Medina-Herrera, N.; Aguirre-Arzola, V.E. (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaf Purified Hydroalcoholic Extracts from Seven Mexican *Persea americana* Cultivars. *Molecules*, 24, 173.
- Da Silva, G.G.; Pimenta, L.P.S.; Melo, J.O.F.; Mendonça, H.d.O.P.; Augusti, R.; Takahashi, J.A. (2022). Phytochemicals of Avocado Residues as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors, Antioxidants, and Neuroprotective Agents. *Molecules*, 27, 1892. <https://doi.org/10.3390/molecules27061892>

- Dabas, D.; Shegog, R.M.; Ziegler, G.R.; Lambert, J.D. (2013). Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Curr. Pharm. Des.*, 19, 6133–6140.
- Del Castillo-Llamosas, A.; Rodríguez-Martínez, B.; del Río, P.G.; Eibes, G.; Garrote, G.; Gullón, B. (2021). Hydrothermal treatment of avocado peel waste for the simultaneous recovery of oligosaccharides and antioxidant phenolics. *Bioresour. Technol.*, 342, 125981.
- Doroteo, V., Diaz, C., Terry, C. y Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1).
- Dupont, H y Gokel, G. (1985). *Química Orgánica Experimental*. España: Editorial Reverté.
- Ezzedine, K. (2018). Antioxidantes en el Aguacate. (Tesis de grado). Universidad de la Laguna, Tenerife, España.
- Figueroa, JG; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A. (2018). Caracterización integral de compuestos fenólicos y otros compuestos polares en la semilla y cubierta de semilla de aguacate por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Alimentos Res. En t.*, 105, 752–763.
- Gutiérrez, A., Ledezma, L., García, I. y Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*. 33(1).
- Gutiérrez, J. (2006). ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4):69-79.
- Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. (1987).The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación* (5ta ed.). México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.

- Hurtado J. (2010). Guía para la comprensión Holística de la Ciencia. Fundación Sypal: Caracas.
- Kemadjou, R; Tonou, B; Nguedjo, M; Yves Martial Tongue, Y; Nyobe, E; Ebouel, F; Godam, M; Dibanda, R and Medoua, G. (2021). Total Polyphenol and Flavonoid Content and Antioxidant Capacity of Some Varieties of *Persea americana* Peels Consumed in Cameroon. The Scientific World Journal, 04, Article ID 8882594, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2021/8882594>.
- Koracevic, D.; Koracevic, G.; Djordjevic, V.; Andrejevic, S.; Cosic, V. (2001). Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of Clinical Pathology 54: 356-61.
- Kosinska, A.; Karamac, M.; Estrella, I.; Hernández, T.; Bartolomé, B.; Dykes, G. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill peels and seeds of two varieties, 60, 4615–4616.
- Leos, C., Rivas, C. y Garcia, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76
- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Sacharomyces cerevisiae*. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas*. 15(2):97-103.
- Mayen, M. (2006). Radicales libres y antioxidantes. [Página web en línea]. Diario Cordoba, Educacion, El rincón de la Ciencia. Consultado el 10 de febrero de 2019 en: https://www.diariocordoba.com/noticias/educacion/radicales-libres-antioxidantes_240820.html
- Melgar, B.; Dias, M.I.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Garcia-Castello, E.M.; Rodriguez-Lopez, A.D.; Barros, L.; Ferreira, I.C.R.F. (2018). Bioactive

characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants, 111, 212–218.

Oboh, G.; Odubanjo, V.O.; Bello, F.; Ademosun, A.O.; Oyeleye, S.I.; Nwanna, E.E.; Ademiluyi, A.O. (2016). Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities *in vitro*. *J. Basic Clin. Physiol.Pharmacol*, 27, 131–140.

Olaya, J y Méndez, J. (2002). *Guía de Plantas y productos medicinales*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.

Parella, S. y Martins, F. (2004). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas: Fedupel.

Pastene, E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 449-455.

Pérez, A. (2006). Estudio del fenómeno de la comercialización de aguacate criollo (*Persea americana*) en los municipios de San Juan Comalapa, San Jose Poaquil, San Martin Jitotepeque y San Pedro Yepocapa del Departamento de Chimaltenango. (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Polania, W. (2014). Actividad antioxidante de los residuos del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var Hass) sometidos a extracciones clásicas y a fluidos presurizados. (Tesis de post grado). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

PortalAntioxidantes.com. (2019). [Página web en línea]. Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>

Quiñonez, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quiros, Y. y Hernandez, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2).

- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933–956.
- Robertare, R.; Pellegrini, N.; Protopggnte, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical in Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Roca, P., Oliver, J. y Rodríguez, A. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos*. España: Editorial Hélice.
- Rodriguez, F.; Palmeira-de-Oliveira, A.; das Neves, J.; Sarmiento, B.; Amaral, M.H.; Oliveira, M.B.(2013). *Medicago* spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Ind. Crops Prod.*, 49, 634–644.
- Rojas-García, A.; Fuentes, E.; Cádiz-Gurrea, M.d.I.L.; Rodriguez, L.; Villegas-Aguilar, M.d.C.; Palomo, I.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.(2022). Biological Evaluation of Avocado Residues as a Potential Source of Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 11, 1049. [https://doi.org/ 10.3390/antiox11061049](https://doi.org/10.3390/antiox11061049)
- Rosero, J.C.; Cruz, S.; Osorio, C.; Hurtado, N. (2019). Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*, 24, 3209.
- Salazar-López, N.J.; Domínguez-Avila, J.A.; Yahia, E.M.; Belmonte-Herrera, B.H.; Wall-Medrano, A.; Montalvo-González, E.; González-Aguilar, G.A. (2020) Avocado fruit and by-products as potential sources of bioactive compounds. *Food Res. Int.*,138,109774.
- Sánchez-Quezada, V.; Campos-Vega, R.; Loarca-Piña, G. (2021) Prediction of the Physicochemical and Nutraceutical Characteristics of ‘Hass’ Avocado Seeds by Correlating the Physicochemical Avocado Fruit

- Properties According to Their Ripening State. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 76, 311–318.
- Santamaria, J. (2013). Comprobacion del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcoholicos de Malva (*Malva sylvestris* L.) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*). (Tesis de grado). Escuela Politecnica Superior de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Segovia, F.J.; Hidalgo, G.I.; Villasante, J.; Ramis, X.; Almajano, M.P. (2018) Avocado seed: A comparative study of antioxidant content and capacity in protecting oil models from oxidation. *Molecules*, 23, 2421.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003).La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.
- Singleton, VL.; Orthofer; R.; Lamuela-Raventos, RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152–178.
- Song, X.;Wang, Y.; Gao, L. (2020) Mechanism of antioxidant properties of quercetin and quercetin-DNA complex. *J. Mol. Model.*, 26,133.
- Sote, A. (2005). Principios de Estadística. Editorial Panapo de Venezuela. Caracas. pp. 143.
- Steinbruck, I. (2017). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de mieles comerciales de origen Asiático y Europeo. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Tremocoldi, M., Rosalen, P., Franchin, M., Mossarioli, A., Denny, C., Daiuto, E., Paschoal, J., Melo, P. y Alencar, S. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *eCollection*. 13(2).

- Veiko, A.G.; Lapshina, E.A.; Zavodnik, I.B. (2021). Comparative analysis of molecular properties and reactions with oxidants for quercetin, catechin, and naringenin. *Mol. Cell. Biochem.*, 476, 4287–4299.
- Velderrain-Rodríguez, G.R.; Quero, J.; Osada, J.; Martín-Belloso, O.; Rodríguez-Yoldi, M.J. (2021) Phenolic-rich extracts from avocado fruit residues as functional food ingredients with antioxidant and antiproliferative properties. *Biomolecules*, 11, 977.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Med Milit*, 31(2): 126-133.
- Villar, M. (2016). Composición nutricional y componentes bioactivos de cuatro variedades de paltas (*Persea americana*) comerciales Chilenas. Comparación de componentes Bioactivos, cosechas 2011-2012. (Tesis de grado). Universidad de Chile, Chile.
- Woisky, R.; Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apiculture Research* 37: 99-105.
- Youngson, R. (1994). Antioxidantes y Radicales Libres. Madrid: Editorial EDAF.
- Zeng, Y.; Song, J.; Zhang, M.; Wang, H.; Zhang, Y.; Suo, H. (2020) Comparison of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of six flavonoids with similar structures. *Antioxidants*, 9, 732.