



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

INFORME TÉCNICO

DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA
**Lindbergh Humberto González
González**

NOMBRE DEL PROYECTO

**Evaluación de los metabolitos secundarios de la hoja,
semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*)**

PERIODO DE REALIZACIÓN

AGOSTO-DICIEMBRE 2012

Contenido

	<i>Página</i>
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	iii
1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	6
3. Caracterización del área.....	7
3.1 Políticas y normas.....	7
3.2 Objetivos de la institución	7
3.3 Servicios que presta la institución.....	7
3.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	8
3.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	9
4. Problemas a resolver	11
5. Objetivos	12
5.1 Objetivo General	12
5.2 Objetivos específicos	12
6. Alcances y Limitaciones	13
6.1 Alcances	13
6.2 Limitaciones	13
7. Fundamento Teórico	14
7.1 Los compuestos polifenólicos	14
7.1.1 Flavonoides	15
7.1.2 Cumarinas	16
7.1.3 Taninos	17

7.2 Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	17
7.2.1 Fenoles totales.....	17
7.2.2 Flavonoides totales	18
7.2.3 Taninos	18
7.3 Especies reactivas (ROS)	20
7.3.1 Actividad antirradical	20
7.3.2 Cuantificación de la actividad antirradical	21
8. Metodología.....	23
8.1 Obtención de los extractos de <i>Persea americana</i> (hoja, cáscara y semilla)	23
8.1.1 Tratamiento de las muestras	23
8.1.2 Extracto metanólico	23
8.2 Cuantificación de polifenoles	24
8.2.1 Fenoles totales.....	24
8.2.2 Flavonoides totales	24
8.3 Análisis de los Extractos de hoja, semilla y cáscara de <i>Persea americana</i> por cromatografía en capa fina (CCF).....	25
8.3.1 Compuestos polifenólicos	25
8.3.1.1 Flavonoides	25
8.3.1.2 Cumarinas	26
8.3.2 Saponinas.....	26
8.4 Medición de la actividad antirradical de los extractos de hoja, semilla y cáscara de <i>Persea americana</i>	27
9. Resultados y Discusión	28
9.1 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.....	28
9.2 Cromatografía en capa fina.....	28

9.4 Actividad antirradical	33
10. Conclusiones.....	37
11. Bibliografía	38
12. Anexos	40
Anexo A: Curva patrón de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).....	40
Anexo B: Curva patrón de flavonoles totales (Método de $AlCl_3$)	41

Lista de Figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. El aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) A) Árbol, B) fruto, C) hojas y D) semillas.	2
Figura 2. Constituyentes químicos de la hoja del aguacate (<i>Persea americana</i>).	4
Figura 3. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de cumaril CoA y malonil CoA (Arranz 2010).	14
Figura 4. Estructura general de los flavonoides.	16
Figura 5. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (AH) sobre radical DPPH. Mecanismos de transferencia de electrones e intercepción de radicales libres (Brand et al., 1995).	22
Figura 6. A) Placa de gel de sílice con muestras. B) Placa en el cromatotanque con el sistema de cromatografía.	25
Figura 7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Quercetina (Q), naringenina (N). Fase móvil (S1): Hexano: acet. etilo: ac. acético (31:14:5).	29
Figura 8. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Rutina (R). Fase móvil (S2): acet. etilo: ac. acético: ac. Fórmico: agua (100:11:11:22)	30
Figura 9. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Fase móvil (S3): Cloroformo: metanol (60:40)	31
Figura 10. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. (N). fase móvil (S4): butanol: ac. Acético: agua (50:10:40)	32
Figura 11. Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de hoja de aguacate.	34
Figura 12. Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de cascara de aguacate.	34

Figura 13 . Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de semilla de aguacate..... 35

Figura 14 . IC₅₀ de los extractos de hoja, semilla y cáscara de los extractos de *Persea americana* y estándares..... 36

Lista de Tablas

	<i>Página</i>
Tabla 1. Sistemas usados para la identificación de flavonoides en CCF.	26
Tabla 2. Concentración de fenoles y flavonoides totales.	28
Tabla 3. R _f de la cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y de hoja, cáscara y semilla de <i>Persea americana</i>	33

1. Introducción

Persea americana, comúnmente conocido como "aguacate pera", "aguacate mexicano", o "aguacate", es ampliamente cultivado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo por sus frutos comestibles y para usos económicos y terapéuticos (Oluwole et al., 2011)

La historia del aguacate en México, de acuerdo a los antecedentes, podemos mencionar que en un inicio en la época precolombina ya realizaban selección de frutos de aguacate encaminados a obtener los de mayor tamaño y de semilla pequeña, sin embargo, desde el descubrimiento de América permaneció desconocido hasta finales del siglo XIX, cuando se produjo el acontecimiento que marcó la expansión de la primera industria productora de aguacate con la introducción de la variedad Fuerte a California, en 1911, con material procedente de Atlixco, Puebla (Sánchez et al., 2001).

El aguacate, (*P.americana* Mill.), en México y Centroamérica está incorporado a la dieta de la población desde hace muchos siglos, y muy posteriormente a la colonización llegó a otros puntos fuera del continente, y en estos últimos años Europa y Asia empiezan a importar aguacate en forma creciente. El aguacate pertenece a la familia Lauraceae y en la actualidad el género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, y la mayoría se encuentran desde el sur de los Estados Unidos (*P. borbonia*) hasta Chile (*P. lingue*) (Sánchez et al., 2001).

El aguacate es un árbol mediano o grande, a veces hasta de 20 m de altura (Figura 1A). Sus hojas perennes (Figura 1C) son más largas que anchas y con la punta alargada, de color verde oscuro arriba y pálidas abajo, cuando se estrujan son olorosas. Las flores se encuentran en la unión de la hoja con el tallo y son de color crema-verdusco. Los frutos, en forma de pera (Figura 1B), son verde oscuro, muy carnosos y aceitosos, con una semilla (Figura 1D) que mide de 5 a 6 cm de largo (Mexicana, 2009).

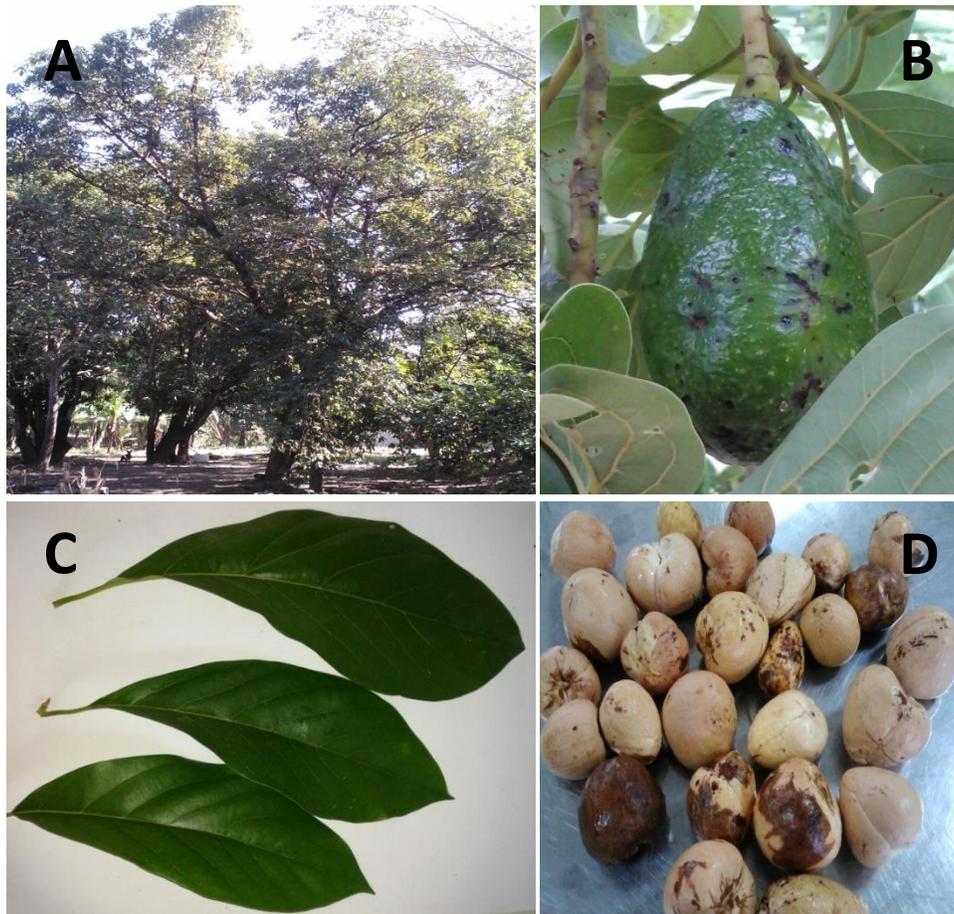


Figura 1. El aguacate (*Persea americana* Mill.) A) Árbol, B) fruto, C) hojas y D) semillas.

México es uno de los países con una amplia diversidad de aguacates y existen al menos 20 diferentes especies relacionadas con este fruto. Esta gran variabilidad puede ser debida a diferentes condiciones ambientales presentes a lo largo y ancho del territorio nacional, mecanismos que han potenciado el cruzamiento con otros tipos, incrementando la variabilidad genética y por ende ampliando la adaptación a un mayor número de ambientes (Sánchez et al., 2001).

Los aguacates son ricos en ácidos grasos insaturados, vitaminas C, B, E y otros nutrientes. También son una fuente abundante de fibra dietética y potasio. La parte comestible de la fruta contiene altas cantidades de ácidos oleicos, linoleicos, linolénico y α -ácidos que son valiosos componentes de la dieta humana (Kosińska et al., 2012).

Es la semilla la parte de la planta de la que se tiene más información química. Esta contiene un aceite fijo en el que se han detectado los ésteres 5- y 7-dehidroavenasterol, campesterol, colesterol, estigmasterol y β -sitosterol; así como el α -tocoferol. Otros componentes de la semilla son los flavonoides catequina y el epíisómero, perseá gratissima biscatequina y perseá proantocianidina, el heterociclo de oxíno-2-tridecinil-furano; el sesquiterpeno ácido absícico; alquenos y alquinos y alquinos de cadena corta. En las hojas se han detectado los flavonoides (Figura 2) catequina, epicatequina, cianidina, procianidina-1, A-2, B-1, B-2, B-3, B-4, B-5, C-1, D-1, D-2, E y G y quercetina. La cáscara del fruto contiene los flavonoides catequina y glucosil-para-cumarato y galactósido de cianidina, procianidina B-1, B-2, C-1, E y G; el componente fenílico estragol. En el fruto se han identificado los sesquiterpenos ácidos absícico, dihidro-faseico y su glucósido y el alcaloide de isoquinolina y del indol 5-hidroxi-triptamina (Mexicana, 2009).

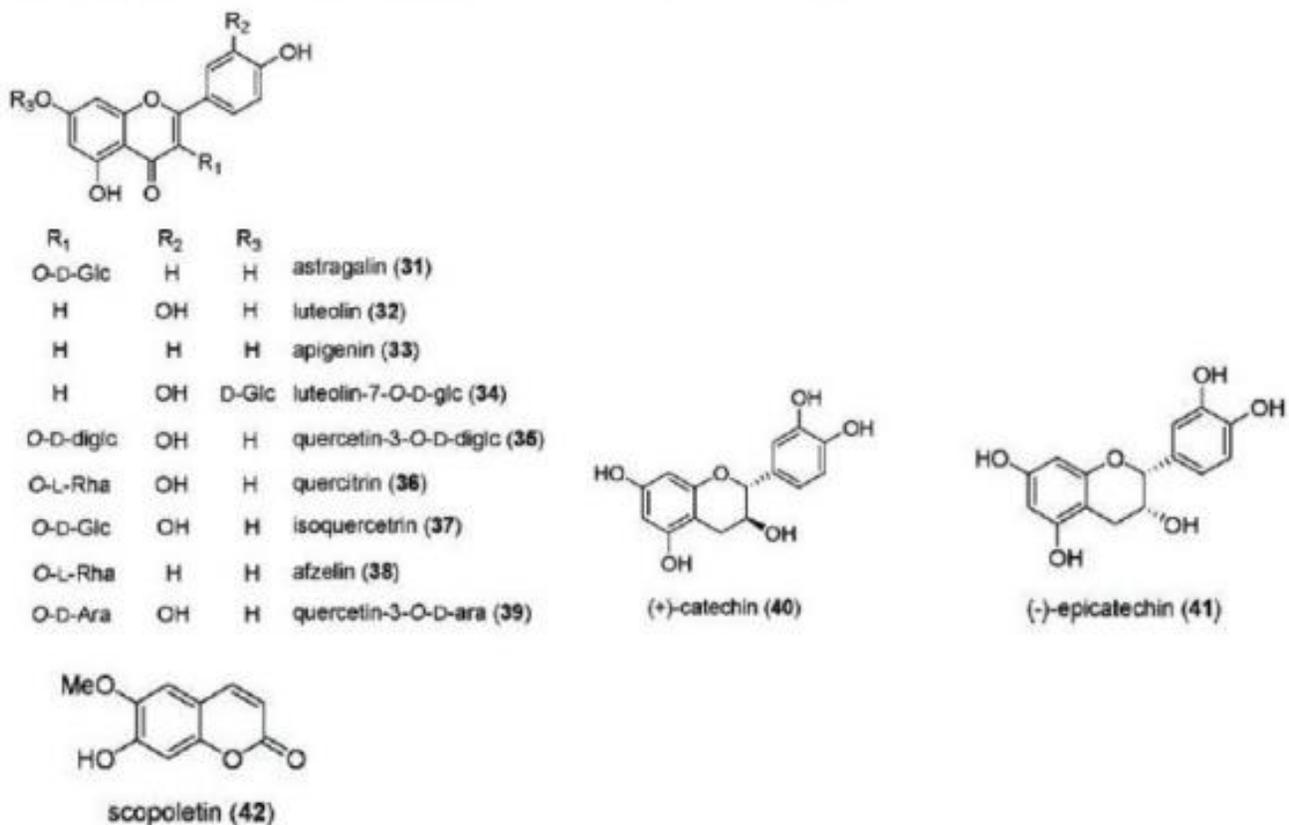


Figura 2. Constituyentes químicos de la hoja del aguacate(*Persea americana*).

El aguacate se ha destacado por sus diferentes usos: medicinales utilizando hojas, cáscaras, semillas y corteza, extracción de aceites, el cual se le compara con el aceite de oliva; además se utiliza como materia prima en la fabricación de shampoo y cosméticos como cremas, aceites y películas protectoras y limpiadoras de la piel. Pero la principal forma de utilización del aguacate es el consumo de la fruta en fresco o pulpa procesada en forma de guacamole, situación muy favorable en la dieta del ser humano considerando el alto valor proteínico de esta fruta, y lo más importante es que no contiene colesterol (Anacafé, 2004).

Además de sus propiedades sensoriales agradables, el consumo de productos derivados del aguacate ha alcanzado una considerable atención debido a su alto valor nutritivo y han reportado beneficios para la salud, incluyendo la actividad contra el cáncer. Sin embargo, muy pocos estudios son enfocados a la composición fitoquímica del aguacate(Rodríguez et al., 2011).

Kosińska et al. (2012) mencionan que existe un interés actual en el uso de subproductos de la industria alimentaria como una fuente potencial de antioxidantes naturales o ingredientes alimentarios funcionales.

Hurtado et al (2011) nos dice que la fracción fenólica del aguacate no se ha estudiado en profundidad hasta el momento.

2. Justificación

Chiapas es un estado rico en recursos naturales, con una amplia vegetación que hasta hoy en día no ha sido explorada en su totalidad. En Chiapas muchas especies de plantas son usadas de manera artesanal como medicina tradicional. Sin embargo, hay pocos estudios que documenten la actividad que tienen las plantas sobre diversas enfermedades.

Hoy en día, existe un interés creciente sobre fitoquímicos como alternativas a las sustancias sintéticas que se utilizan comúnmente en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Rodríguez et al., 2011).

Las plantas poseen una extensa variedad de compuestos. Entre ellos los polifenoles que en muchos estudios se han reportado los efectos beneficiosos a la salud humana, en especial a enfermedades cardiovasculares. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes (Quiñones et al., 2011). Dentro de las plantas que se usan como remedios caseros encontramos al aguacate (*Persea americana*). Este ha sido usado para curar enfermedades como diarreas y contra organismos como hongos, bacterias y parásitos. Se han reportado propiedades antitumorales en pacientes infectados con el virus de Epstein Barr, y actividad antibiótica frente a las especies de bacterias *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea*, además de otros reportes en contra de enfermedades (Mexicana, 2009). Es por ello que la identificación de los polifenoles en esta planta es muy importante, ya que podríamos encontrar una relación con el contenido de estos compuestos y sus efectos benéficos.

3. Caracterización del área

Este proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología y Analítica y Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, el cual se encuentra ubicado en la carretera Panamericana Km1080.

3.1 Políticas y normas

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

3.2 Objetivos de la institución

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

3.3 Servicios que presta la institución

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería

Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el posgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que se cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.
- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

3.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaria de

Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

3.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- ✓ Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.
- ✓ Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.

- ✓ Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- ✓ Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.
- ✓ Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.
- ✓ Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

4. Problemas a resolver

La cuantificación y la identificación de compuestos polifenólicos traen consigo muchas variables que pueden interferir en estos estudios. Estos van desde el momento de la recolección de las muestras, hasta su análisis en el laboratorio, ya que estos compuestos pueden degradarse o reaccionar fácilmente, por ejemplo puede afectar la luz y la temperatura.

Al trabajar con plantas puede traer consigo variaciones de los compuestos en cuanto a la temporada de recolección.

El sistema de solventes para la extracción puede causarnos diferentes resultados. Para esto son usados diversos sistemas de extracción, por lo general mezclas acuoso-orgánico (en diversas proporciones), o solo solventes orgánicos como metanol, etanol, hexano, acetato de etilo entre otros así como extracciones acuosas. Cada tipo de sistema tendrá diversas variaciones ya que una parte de los compuestos de la planta no será extraída y pueden escapar del análisis.

La cromatografía en capa fina puede traer consigo dificultades al ser analizadas ya que las muestras pueden contener una gran cantidad de flavonoides y necesitaremos muchos estándares para obtener resultados más precisos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos metanólicos de hoja, semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*) y su actividad anti radical.

5.2 Objetivosespecíficos

- Evaluar la presencia de polifenoles en extractos metanólicos de hoja, semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*)
- Identificación de flavonoides en los extractos de hoja, semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*).
- Cuantificación de flavonoides de los extractos de hoja, semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*).
- *Evaluar la actividad anti radical de los extractos metanólicos de hoja, semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana L.*)*

6. Alcances y Limitaciones

6.1 Alcances

Con este proyecto de residencia profesional se logró, con análisis espectrofotométrico la determinación de fenoles y flavonoides totales de hoja, cáscara y semilla del aguacate (*Persea americana*). Con la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) se observó la presencia de flavonoides así como de cumarinas, también se midió el porcentaje de la actividad antirradical de las muestras.

6.2 Limitaciones

Una de las limitaciones que se tuvieron para realizar este proyecto de residencia profesional fue la disponibilidad en algunas ocasiones de los equipos, ya que también otros alumnos se encontraban realizando diversas pruebas. Además que si la institución contara con otros equipos se podría tener resultados con mayor exactitud.

La determinación de taninos tuvo dificultades, ya que el valor obtenido del espectrofotómetro fue muy bajo incluso se llegó a leer valores negativos. Esta prueba se realizó en diversas ocasiones y los resultados fueron los mismos.

7. Fundamento Teórico

7.1 Los compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son los antioxidantes bioactivos más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de moléculas, producto del metabolismo secundario de las plantas (Figura 3), donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos o herbívoros y son pigmentos que atraen a los polinizadores. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante (Arranz 2010).

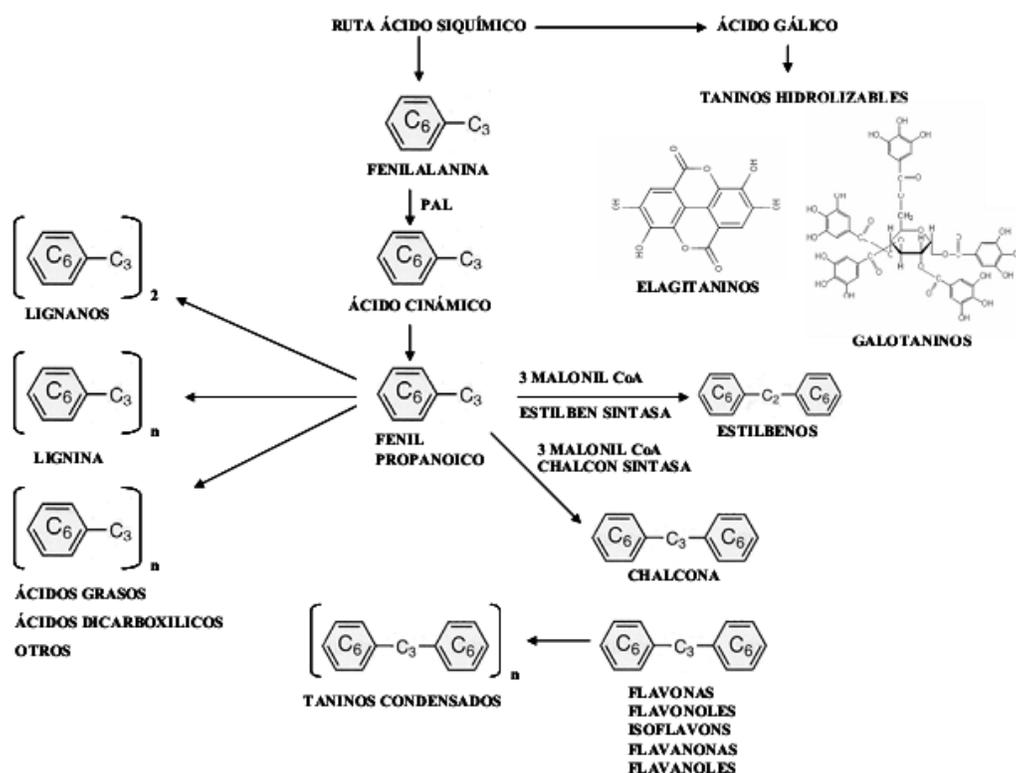
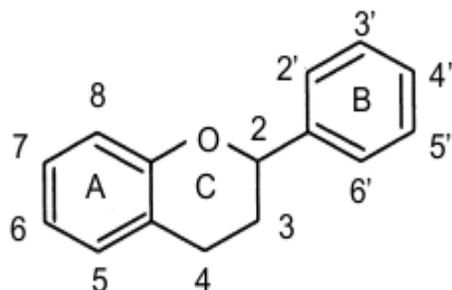


Figura 3. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de cumaril CoA y malonil CoA (Arranz 2010).

Los compuestos polifenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos. Además de las propiedades vasodilatadoras que favorecen el control del tono arterial, se han descrito otras propiedades de los flavonoides que favorecen también su efecto cardioprotector. Los polifenoles poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos. Habría además que señalar, que algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2011).

7.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos constituyentes de la dieta humana no energética. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estos polifenoles, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común (Figura 4) de difenil-pirano (C6-C3-C6) compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Martínez-Flores et al., 2002).



Flavonoide

Figura 4. Estructura general de los flavonoides.

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato (Figura 3). La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glucosilados sulfatados. Estos polifenoles se ubican principalmente en las hojas y en la superficie de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos (Martínez-Flores et al., 2002).

7.1.2 Cumarinas

Son benzo- α -pironas, con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina.

Sobre esta estructura se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas.

Prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente hidroxílico (OH) en posición 7, ya sea libre, como sucede en la umbeliferona, o combinado (metilo, azúcares, etc.).

7.1.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos que están ampliamente clasificados en dos grupos principales: los taninos hidrolizables, que consta de un núcleo central de hidratos de carbono a los que los ácidos carboxílicos fenólicos están unidos por enlace éster; y los taninos condensados o proantocianidinas, que consiste en oligómeros de dos o más flavan-3-oles, tales como catequina, epicatequina, galocatequina entre otros (Makkar *et al*, 2009).

7.2 Cuantificación de compuestos polifenólicos

7.2.1 Fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales en extractos vegetales se emplean métodos espectrofotométricos, basándose en una reacción colorimétrica de óxido reducción. El método de Folin-Ciocalteu, se fundamenta en su carácter reductor, y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra seca (Singleton *et al.*, 1999 y Kuskoski *et al.*, 2005).

7.2.2 Flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales en extractos vegetales, se realiza principalmente por espectrofotometría. El principio del método colorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl_3) descrito por Chang et al. (2002), es la formación de complejos ácidos con los grupos "cetos" de C-4 y con los grupos hidroxilo de C-3 ó C-5 de las flavonas y flavonoles. Además, el AlCl_3 forma complejos ácidos con los grupos orto-dihidroxil en los anillos A o B de los flavonoides. Chang et al. (2002), mencionan que los compuestos formados con los grupos orto-hidroxil (rutina, quercetina y mircenol) muestran una máxima absorción en la longitud de onda de 415-440 nm. Eligiendo la λ_{max} de 415 nm como la longitud de onda para la cuantificación.

7.2.3 Taninos

La determinación de taninos se puede llevar a cabo con relación a un estándar como ácido tánico, ácido gálico, catequina, entre otros, utilizando método espectrofotométricos y gravimétricos. El método descrito por Makkaret al. (2009) relaciona ambos. El método gravimétrico se fundamenta en la formación de complejos entre los taninos y el reactivo Polivinilpirrolidona (PVPP) con el que es tratado la muestra a analizar; los taninos se unen al PVPP (complejo) que se separan por centrifugación para luego ser analizadas espectrofotométricamente. La diferencia entre las lecturas de absorbancia antes y después de que se trata con PVPP da un valor muy próximo a los valores que han sido reportados en análisis de hojas de árboles y en investigaciones.

7.3 Cromatografía en capa fina

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía.

Los métodos de cromatografía plana incluyen la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía en papel (PC). Las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas; esta es la capa estacionaria. Las partículas son semejantes a las descritas en cromatografía en columna de adsorción, de reparto en fase normal y en fase inversa, y las fases móviles también son similares a las utilizadas en cromatografía de líquidos de alta eficacia en columna. El desarrollo de la placa es un proceso análogo a la elución en la cromatografía de líquidos, en el que la muestra es transportada por la fase móvil a través de la fase estacionaria. La forma más común de desarrollar la placa consiste en depositar una gota de la muestra cerca de uno de los extremos de la placa, y marcar su posición con un lápiz. Tras la evaporación del disolvente en el que estaba disuelta la muestra, se coloca la placa en un recipiente cerrado y saturado con los vapores del disolvente con el que se efectuará el desarrollo. Uno de los extremos de la placa se introduce en el eluyente procurando evitar el contacto directo de este con la muestra. El eluyente asciende por la placa gracias al efecto de capilaridad ejercido entre las finas partículas. A medida que el eluyente se desplaza pasa por el punto de aplicación de la muestra, la disuelve y la arrastra por la placa distribuyéndose entre el disolvente que se desplaza y la fase estacionaria. Después que el disolvente ha pasado a través de la mitad o las dos terceras partes de la longitud de la placa, se retira esta del recipiente y se seca. Las posiciones de la muestra se pueden determinar por distintos procedimientos. Dos de ellos se usan con la mayoría de las mezclas de sustancias orgánicas. Consisten en nebulizar sobre la placa una disolución de yodo o de ácido sulfúrico, ya que ambos reaccionan con los compuestos orgánicos para dar productos oscuros. También se utilizan reactivos específicos (como la ninhidrina) para localizar las especies separadas. Otro método de detección se basa en incorporar un material fluorescente a la fase estacionaria. Una vez ha finalizado el desarrollo, se examina la placa bajo luz ultravioleta. Los componentes de la muestra amortiguan la fluorescencia del material de tal forma que, toda la placa exhibe fluorescencia menos los lugares

donde están los componentes de la muestra, no fluorescentes. (Gómez-Ullate R, 2009)

7.4 Especies reactivas (ROS)

El término especies reactivas de oxígeno (ROS) se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos (Lamb & Dixon, 1997).

Por otro lado, en los últimos veinte años se ha incrementado la evidencia que demuestra que las ROS pueden ser las causantes de distintos padecimientos incluyendo las enfermedades coronarias, el cáncer y el envejecimiento. La reacción del radical hidroxilo con lípidos insaturados es la cascada más familiar de daño inducido por radicales, aunque existen muchos ejemplos de daños a proteínas o al ADN. Por ejemplo, la reacción de radicales con proteínas puede llevar a la oxidación de cadenas laterales reactivas de aminoácidos, al entrecruzamiento de proteínas, a la desnaturalización, e incluso dañar a las proteínas cercanas. La oxidación de ADN conlleva a la ruptura de cadenas y a la liberación de bases oxidadas. Consecuentemente el papel de los antioxidantes, los cuales suprimen dicho daño oxidativo, ha recibido gran atención (Helaine & Hagerman, 2006).

7.4.1 Actividad antiradical

Los radicales libres se forma cuando una molécula con un par de electrones no apareados en la órbita externa recibe o pierde un electrón. El radical libre más común en la atmósfera es la molécula de oxígeno, la cual tiene dos electrones no apareados en la última órbita, por lo que forma una molécula birradical. La distribución particular de electrones hace del oxígeno un excelente aceptor de electrones. Cada molécula de oxígeno diatómico puede aceptar cuatro electrones y cuatro protones, produciendo dos moléculas de agua. En un sistema biológica ideal, la reducción de

oxígeno a agua sucede secuencialmente. Si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones, se forman las especies reactivas de oxígeno. El término especies reactivas de oxígeno se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos (Lamb & Dixon, 1997).

Muchos compuestos químicos tienen la capacidad de inhibir a los radicales libres en el organismo o impedir su formación y se le conoce como compuestos antioxidantes, que por definición son sustancias que han estado presentes a baja concentración con respecto a una molécula oxidable, retarda o previene la oxidación de este sustrato.

7.3.2 Cuantificación de la actividad antirradical

Para la medición de la capacidad antiradical se utiliza principalmente el método del 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Este método permite medir la capacidad de transferencia de protones y electrones del compuesto polifenólico. El catión radical estable DPPH• es un cromóforo que absorbe a 515 nm, donde la decoloración del DPPH• es ocasionada por el proceso de reducción promovida por el compuesto antioxidante (Figura 5).

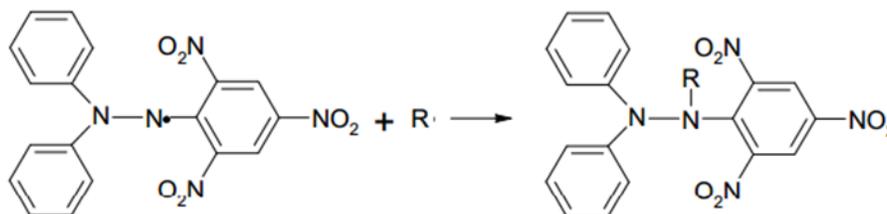
Aunque el mecanismo de transferencia de electrones del método DPPH es similar al método ABTS, el método DPPH es un método de muy baja sensibilidad debido a que el potencial de reducción del DPPH• es mucho mayor que el del ABTS (Brand et al.1995).



Capacidad de transferencia de electrones



Capacidad de intercepción de Radicales libres



$\lambda = 515 \text{ nm}$

Violeta

Incoloro

Figura 5. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (AH) sobre radical DPPH. Mecanismos de transferencia de electrones e intercepción de radicales libres (Brand et al., 1995).

La quercetina y la miricetina, seguidas por el kenferol, son los flavonoides que poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres. El grupo fenólico que poseen puede actuar directamente capturando electrones desapareados de las ROS, y genera así especies menos reactivas. Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados.

8. Metodología

8.1 Obtención de los extractos de *Persea americana* (hoja, cáscara y semilla)

8.1.1 Tratamiento de las muestras

Se trabajó con tres diferentes órganos del aguacate: hoja, cáscara y semilla. Los cuales fueron obtenidos del mismo árbol y recolectados en el municipio de Acala, Chiapas, en el mes de julio del 2012. El lote de muestras se recolectó al azar, las hojas fueron cortadas directamente del árbol. La cáscara y la semilla se obtuvieron de frutos que se encontraban en el árbol y en el suelo, descartando aquellos que presentaban pudrición.

Los frutos se cortaron para extraer la cáscara y semilla, posteriormente se lavaron con agua y jabón al igual que la hoja. Fueron secados con papel absorbente, almacenados en bolsas negras para evitar el contacto con la luz y congeladas a -4°C para su posterior liofilización.

Para el secado de las muestras, se utilizó una liofilizadora marca LABCONCO y se liofilizó por 24 horas a 0.100 mBar. Posteriormente las muestras ya secas fueron trituradas en una licuadora y guardadas en frascos ámbar.

8.1.2 Extracto metanólico

Se pesaron 20 g de muestra seca, en una balanza analítica. Se depositó en un frasco ámbar y se agregó 200 mL de metanol absoluto (50 mL por cada 5g de muestra), se sonicó por 2 horas. Después de sonicar se filtró utilizando vacío en papel Whatman núm. 5. La masa de materia que quedó en el papel se resuspendió en 200 mL de metanol absoluto y se sonicó por 20 min. Se volvió a filtrar utilizando el procedimiento anterior. El filtrado se recuperó en tubos falcon de 50 mL y centrifugados a 1000 Xg por 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un matraz bola previamente pesado y se llevó a sequedad a presión reducida en un

rotavaporR-210 marca BUCHI. Una vez evaporado el solvente (metanol) se obtuvo el nuevo peso del matraz. El residuo obtenido se resuspendió con 10mL de metanol absoluto y se guardó en refrigeración a -4°C en oscuridad hasta su análisis.

8.2 Cuantificación de polifenoles

8.2.1 Fenoles totales

A 0.05 mL de muestra se le adicionó 2.1 mL de agua destilada y 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, después de mezclar por un minuto, se añadió 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 20% y 2.1 mL de agua destilada. La mezcla se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Después se midió la absorbancia a 765 nm. La concentración obtenida de fenoles totales se expresó en términos de equivalentes de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Se comparó las muestras con una curva de calibración. Se utilizó como solución patrón de ácido gálico a diferentes concentraciones: 0, 100, 300, 500, 800, 900 ppm (Singleton et al., 1999).

8.2.2 Flavonoides totales

A 0.5 mL de la muestra se le adicionó 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad, la absorbancia de la mezcla se midió a una longitud de onda de 415 nm.

La determinación de la concentración se realizó comparando con una solución patrón de quercetina. Se preparó disolviendo 10 mg de quercetina en etanol al 80% y se diluyó para obtener la curva patrón a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se sustituyó la cantidad de cloruro de aluminio al 10% por la misma cantidad de agua destilada para el blanco (Chang et al., 2002).

8.3 Análisis de los Extractos de hoja, semilla y cáscara de *Persea americana* por cromatografía en capa fina (CCF)

8.3.1 Compuestos polifenólicos

8.3.1.1 Flavonoides

La identificación de flavonoides se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F₂₅₄ de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se emplearon como estándares quercetina, rutina y naringenina grado analítico, marca Sigma-Aldrich, a una concentración de 0.1 mg·mL⁻¹, se aplicaron 5 µL de cada estándar y 10 µL de los extractos a una concentración de 20 $\frac{mg MS}{mL}$.

Los extractos y los estándares se aplicaron en las placas de gel de sílice a 1 cm de la orilla en la parte inferior y a 1 cm entre ellas (Figura 6A). Las placas ya cargadas se desarrollaron utilizando diferentes sistemas de solventes (Tabla 1) dejando llegar el frente de la elución hasta 1 cm antes del límite superior de la placa (Figura 6B).

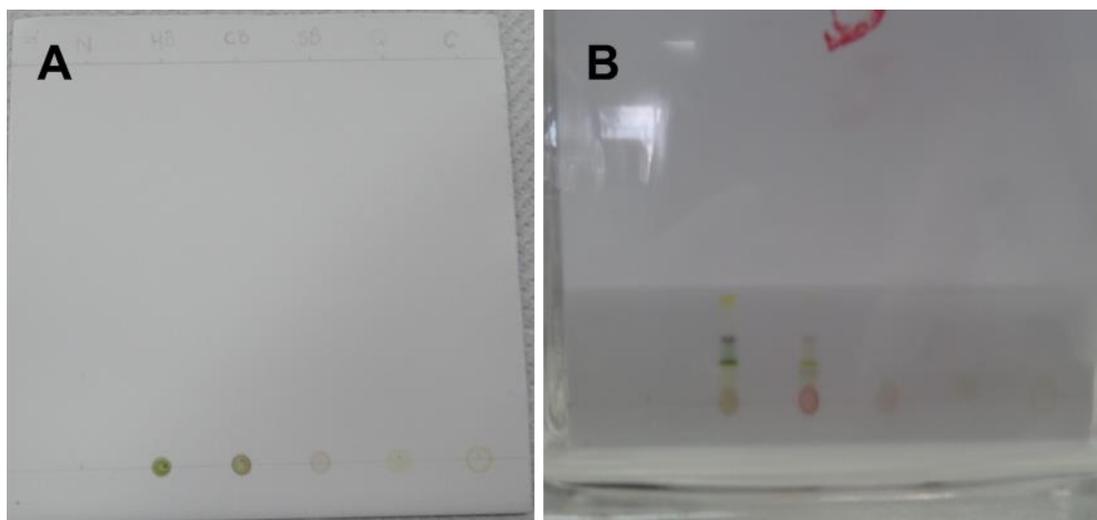


Figura 6. A) Placa de gel de sílice con muestras. B) Placa en el cromatotank con el sistema de cromatografía.

Tabla 1. Sistemas usados para la identificación de flavonoides en CCF.

Sistema	Componentes	Proporciones
S ₁	Hexano:ETOAc:HOAc	31:14:5
S ₂	ETOAc:HOAc: Ac. Fórmico:H ₂ O	100:10:11:26
S ₃	Cloroformo : MeOH	60:40
S ₄	ETOAc:MeOH:H ₂ O	40:10:50

ETOAc: Acetato de etilo; **HOAc:** Ácido acético; **MeOH:** Metanol.

Los cromatofolios fueron revelados utilizando una solución de 2-amino-etil-difenil-borinato al 1% p/v (1g del reactivo 2-aminoetildifenil-borinato en 100 mL de etanol). La solución fue asperjada y, después de secar, fueron observadas bajo luz UV.

8.3.1.2 Cumarinas

La identificación de cumarinas se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F₂₅₄ de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se utilizó un sistema de solventes de cloroformo: metanol (60:40). Como revelador se utilizó hidróxido de potasio al 10% y se calentó en un horno a una temperatura de 100°C hasta observar el desarrollo de color.

8.3.2 Saponinas

La identificación de saponinas se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F₂₅₄ de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se empleó como estándar 5 µL de diosgenina (0.1 mg·mL⁻¹) y 10 µL de cada uno de los extractos.

Se desarrolló la placa con el sistema de solventes CHCl₃: MeOH: H₂O (70:30:04) y como reactivos reveladores, una solución al 5% de H₂SO₄ en metanol y luego de secar, con una de vainillina al 1% en metanol.

Después de ser asperjada y secada, la placa se calentó en una parrilla a una temperatura aproximada de 110°C, hasta observar el desarrollo de color. El desarrollo de color verde-azul, indica la presencia de saponinas.

8.4 Medición de la actividad antirradical de los extractos de hoja, semilla y cáscara de *Persea americana*

La actividad antirradical de los extractos se determinó en términos de la habilidad de donar hidrógeno o de atrapar radicales utilizando el radical estable DPPH^{*}(1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) de acuerdo a la metodología empleada por Castañeda et al. (2008) y consideraciones de Sharma & Bhat (2009). A 0.3 mL de muestra se agregó 2.7 mL de una solución metanólica de DPPH (60.4µM) y luego de 5 minutos de reacción se leyó su absorbencia a 517 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000 que se calibró con metanol. El blanco de muestra se preparó con 0.3 mL del extracto y 2.7 mL del solvente correspondiente. El experimento se llevó a cabo en una habitación con poca iluminación y a temperatura ambiente (~25 °C). El porcentaje de inhibición del radical DPPH^{*} se determinó con la fórmula de Castañeda et al. (2008):

$$AAr(\%) = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_c} \right] \times 100$$

Donde:

AAr: actividad antirradical

A_m: Absorbencia de la muestra

A_{bm}: Absorbencia del blanco de muestra

A_c: Absorbencia del control

La actividad antirradical se determinó en términos del valor IC₅₀ (concentración de muestra para inhibir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH^{*}) que presentaron los extractos y estándares. El resultado se expresó como media de tres determinaciones. Quercetina, rutina y Butil hidroxitolueno(BHT) se usaron como referencias positivas (estándares).

9. Resultados y Discusión

9.1 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

La cuantificación de fenoles totales ($R^2=0.992$, anexo A) mostró que la mayor concentración de estos compuestos se encuentra en la semilla. La muestra de hoja tubo un valor bajo en comparación con cascara y semilla. Muños (2010) reporta mayores concentraciones para la muestra de hoja. Además de mencionar que reporta valores mucho menores (por debajo de $20 \left[\frac{mg \text{ ac.g}}{g \text{ MS}}\right]$) a los obtenidos en este estudio (Tabla 2). Para flavonoides totales ($R=0.999$, anexo B) las concentraciones más altas se obtuvieron en la muestra de hoja, y las más bajas en la muestra de semilla. Contrario a los resultados obtenidos para fenoles totales. Mientras que para la muestra de cascara se obtuvo un valor significativamente más bajo que el de hojas pero mayor que semilla.

Tabla 2. Concentración de fenoles y flavonoides totales.

Muestra	Fenoles totales $\left[\frac{mg \text{ ac.g}}{g \text{ MS}}\right]$	Flavonoides totales $\left[\frac{mg Q}{g MS}\right]$
Hoja	88.58 ± 0.63	28.82 ± 0.87
Cáscara	183.30 ± 1.16	9.71 ± 0.09
Semilla	216.68 ± 5.75	1.75 ± 0.10

ac. g= Ácido gálico

Q=Quercetina

g MS=gramos de muestra seca

9.2 Cromatografía en capa fina

Se obtuvieron tres extractos para la CCF, H (hoja), C (cáscara), S (semilla) para los cuales se utilizaron tres sistemas de solventes (Tabla 1). Como estándares se utilizaron quercetina, naringenina y rutina.

En el análisis por CCF empleado el sistema S1 (Hexano: ETOAc: HOAc) para la identificación de flavonoides se usaron como estándares quercetina y naringenina. La

muestra de cáscara presentó tres manchas, una de ellas, C1, tuvo un $R_f = 0.19$ igual al R_f de la quercetina, sin embargo, la coloración fue diferente (Figura 7). Esto sugiere que podría ser un compuesto muy similar a este. En la muestra de la hoja se observa la separación de dos compuestos coloridos en hoja. Para la muestra de semilla no se observó separación de compuestos, sin embargo, se observa en la línea base la presencia de flavonoides ya que la mancha fluoresce debido a la reacción con el 2-amino-etil-difenil-borinato.

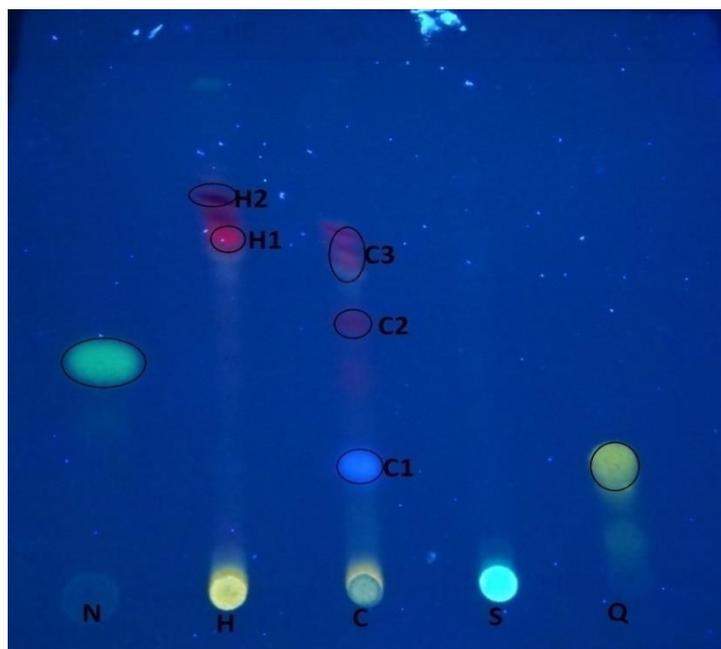


Figura 7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Quercetina (Q), naringenina (N). Fase móvil (S1): Hexano: acet. etilo: ac. acético (31:14:5).

Para la CCF utilizando el sistema S2 se utilizó como estándar rutina, la cual eluyó con un $R_f = 0.24$. Se observó una mejor separación de los compuestos (Figura 8). Sin embargo, ninguno coincidió con el estándar. Se observan compuestos azules (H1, H3, C1, S1), los cuales se podrían deber a fenoles con ácidos carboxílicos como el

ácido clorogenico(Wanger H., 1996) así como otros con una coloración naranja tenue (H2, C2) por lo que podría deberse a la presencia de flavonoles glucosilados.

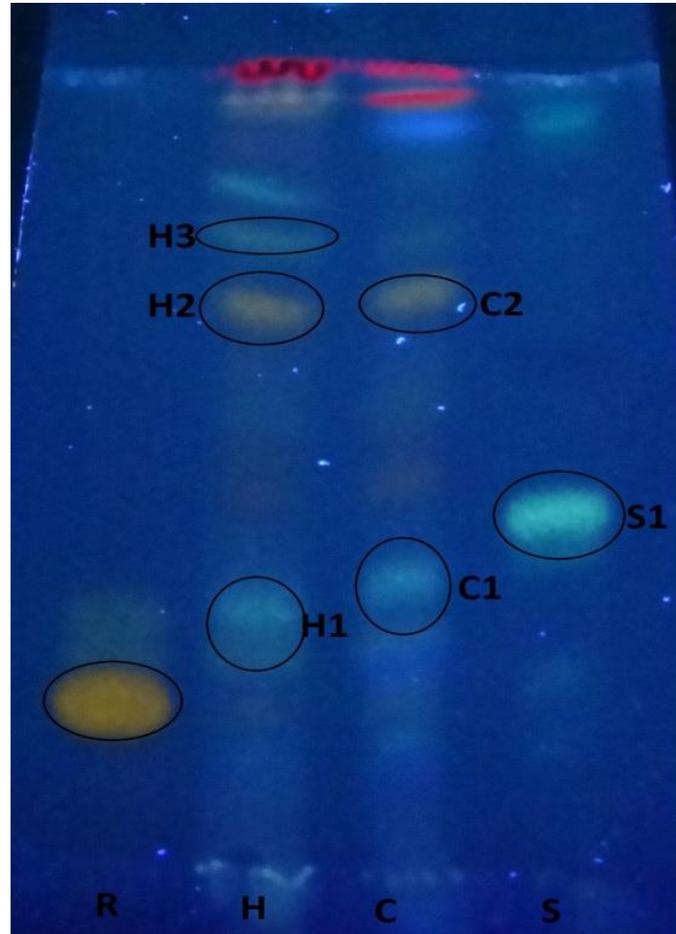


Figura 8. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Rutina (R). Fase móvil (S2):acet. etilo:ac. acético: ac. Fórmico: agua (100:11:11:22)

El sistema S4 se utilizó con la finalidad de identificar cumarinas. La muestra de cáscara se presentó un compuesto con $R_f=0.36$ (C1) y por la coloración (Figura 9) podríamos suponer que hay presencia de cumarinas.

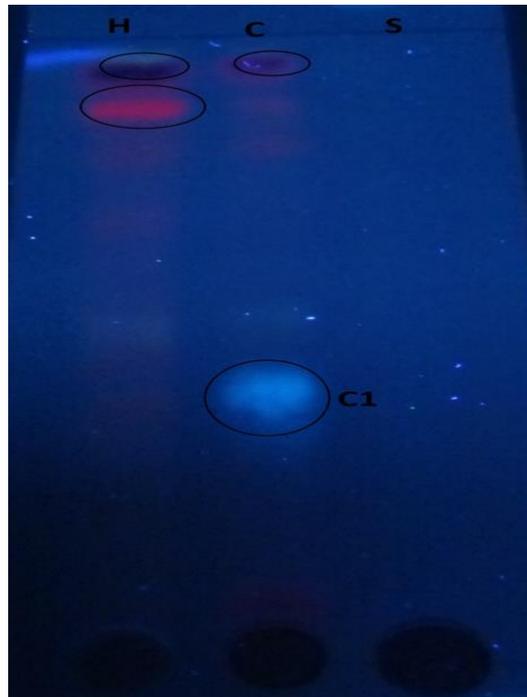


Figura 9. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. Fase móvil (S3): Cloroformo: metanol (60:40)

El sistema S4 se utilizó para detectar saponinas, sin embargo, no lograron apreciarse con claridad. En la figura 10 se puede ver la placa de sílice y unas manchas muy tenues que podrían indicarnos la presencia de saponinas.

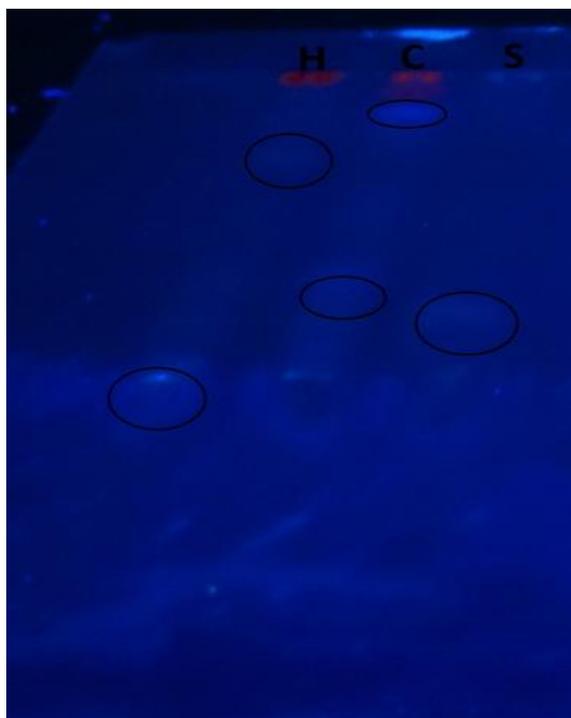


Figura 10. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de hoja (H), cáscara (C) y semilla (S) de aguacate. (N). fase móvil (S4): butanol: ac. Acético: agua (50:10:40)

A continuación (Tabla 3) se presentan los R_f de las manchas obtenidas de las cromatografías de los extractos de aguacate, de cada uno de los solventes que se utilizaron. Como se puede observar en la tabla solo en el sistema de solvente S4 no se pudo realizar un análisis como para los otros sistemas de solventes ya que las manchas no fueron tan notorias. Al igual que para la muestra de semilla del sistema S1 que no tuvo separación.

Tabla 3. R_f de la cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y de hoja, cáscara y semilla de *Persea americana*.

Sistema de solventes	Estándares		Extractos			
	R _f		Color	R _f		Color
S1	Quercetina Naringenina	0.188 0.388	Amarillo azul tenue	Hoja	0.625(H1)	Rojo
					0.688(H2)	Rojo
				Cáscara	0.188(C1)	Azul tenue
					0.425(C2)	Rojo tenue
					0.625(C3)	Rojo
S2	Rutina	0.24	Naranja	Hoja	0.310(H1)	Azul
					0.68(H2)	Naranja
				Cáscara	0.36(C1)	Azul
					0.69(C2)	Naranja
				Semilla	0.430(S1)	Azul
S3				Cáscara	0.360(C1)	Azul
S4	Diosgenina	----	-----	-----	-----	-----

9.3 Actividad antirradical

Para la actividad antirradical se realizaron cinéticas a diferentes concentraciones de extracto para obtener la IC₅₀ que es la concentración requerida por la muestra para disminuir la absorbancia del DPPH a un 50 %.

Como podemos observar en las siguientes cinéticas (Figuras 11,12 y 13) al aumentar la concentración de los extractos se aumentó el porcentaje de inhibición del radical DPPH. Para los extractos de cascara se necesitó una concentración menor para obtener un mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH en comparación con los extractos de hoja. También se puede observar para los tres extractos que a una determinada concentración se alcanzan valores elevados del porcentaje de inhibición

del radical DPPH y este ya no tiene un aumento significativo por lo que se nota una tendencia lineal.

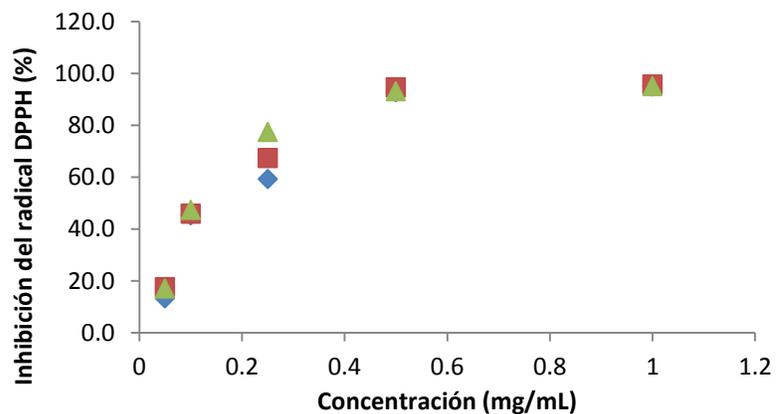


Figura 11. Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de hoja de aguacate.

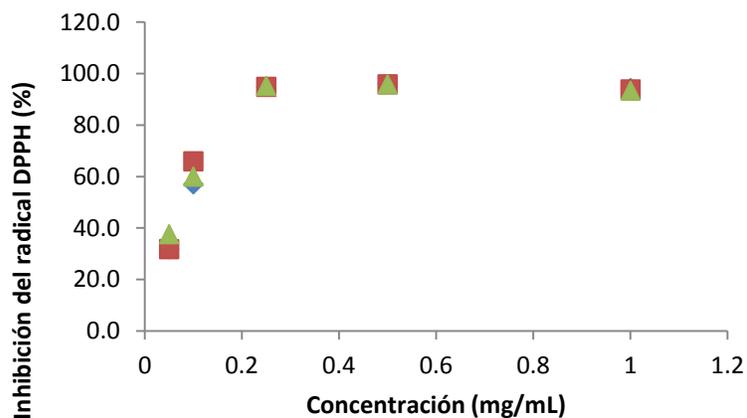


Figura 12. Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de cascara de aguacate.

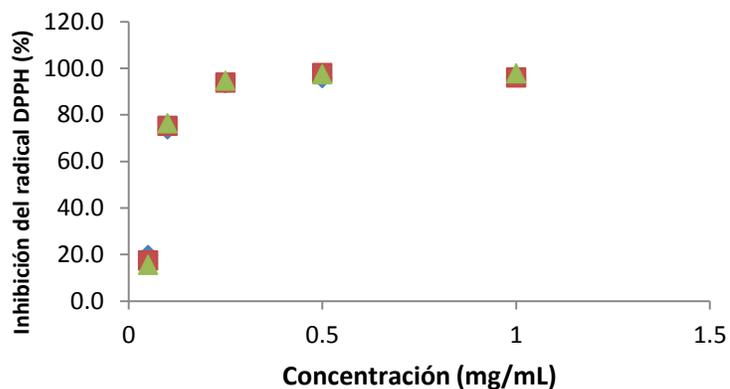


Figura 13 . Cinética de inhibición de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra de semilla de aguacate.

El mejor resultado lo obtuvo la quercetina como se puede apreciar en la figura 14, al obtener el valor mas bajo de IC_{50} , esto nos indica que a una menor concentración de esta se alcanza el 50% de la inhibición del DPPH. La semilla mostro mejor IC_{50} que las muestras de cáscara y hoja. Comparando los resultados obtenidos para cáscara con los estándares estos no muestran grandes variaciones Aunque numéricamente si hay diferencias con los estándares de quercetina y rutina. Sin embargo, hay que recordar que quercetina y rutina son estándares puros y la muestra de cáscara es una mezcla de compuestos de origen natural.

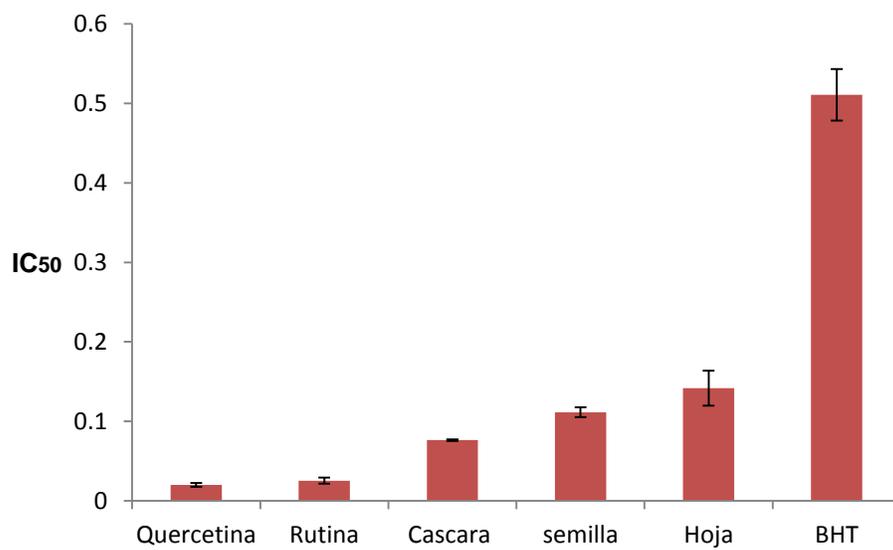


Figura 14 . IC₅₀ de los extractos de hoja, semilla y cáscara de los extractos de *Persea americana* y estándares.

10. Conclusiones

En la cuantificación de fenoles totales la semilla obtuvo mayor concentración de estos, contrario a la cuantificación de flavonoides totales donde esta obtuvo la menor concentración, y siendo la muestra de hoja en la que se encontraron mayor cantidad de estos compuestos. Coincidiendo con Martínez et al (2002) que menciona que la mayor concentración de flavonoides se encuentra en hojas y en el exterior de las plantas.

De Los resultados de los análisis de las cromatografías podemos concluir que los extractos de las muestras de *Persea americana* contienen flavonoides, aunque en la separación ningún compuesto coincidió con los estándares. Pero en las placas se pudo observar compuestos que fluorescen. Se creen que estos compuestos son flavonoides, pero no se cuentan con los estándares necesarios.

Los análisis de los IC_{50} de las muestras mostraron que en la cáscara se obtuvieron los valores más bajos (siendo estos los mejores). Las muestras de semilla y hoja no presentaron diferencias significativas entre sí. En comparación con los estándares las tres muestras obtuvieron mejores resultados que BHT. Pero fueron mejores los estándares de quercetina y rutina. Comparando los resultados obtenidos para cascara con los estándares estos no muestran grandes variaciones Aunque numéricamente si hay diferencias con los estándares de quercetina y rutina. Sin embargo hay que recordar que quercetina y rutina son estándares puros y la muestra de cascara es una mezcla de compuestos de origen natural.

11. Bibliografía

Anacafé. (junio de 2004). *Escuela Internacional de Agricultura y Ganadería de Rivas*. Recuperado el 20 de noviembre de 2012, de <http://www.eiag.edu.ni/Pwebs/Carreras/FRUTYWEB/CONFERENCIAS%202011/UNIDAD%20I.%20Citricos%20y%20Aguacate/Materiales%20de%20Inter%20C3%A9s/Aguacate/Cultivo%20de%20Aguacate.pdf>

Bielefeld, J. (2004). *Zumos y bebidas saludables*. Hispano Europea.

Casseres, E. (1998). *Producción de hortalizas*. IICA.

Gómez-Ullate R, S. Á. (02 de Marzo de 2009). *scribd*. Recuperado el 09 de enero de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>

Hurtado F.E., C. P. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS Method for the Determination of Phenolic Metabolites from Avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 2255–2267.

Kosińska A., K. M. (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 4613–4619.

Larkcom, J. (1996). *Oriental Vegetables*. Frances Lincoln.

Martinez-Flores S, G.-G. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria* , 271-278.

Mexicana, B. D. (2009). *biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana*. Recuperado el 1 de diciembre de 2012, de biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

Oluwole F.S, O. S. (2011). Effects of Aqueous and Methanolic Extracts of *Persea* . *European Journal of Scientific Research* , 474-481.

Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1995). *Procesamiento de Semillas y Leguminosas de Grano*. FAO.

Quiñones M., .. M. (2011). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion hospilataria* , 76-89.

Rodriguez C.G., M. D. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 5625–5635.

S., A. M. (2010). *COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES) EN ALIMENTOS DE LA DIETA ESPAÑOLA: METODOLOGÍA PARA SU DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN*.

Saldivar Serna, S. (2009). *Industrializacion y Almacenamiento de los Cereales*. Acribia.

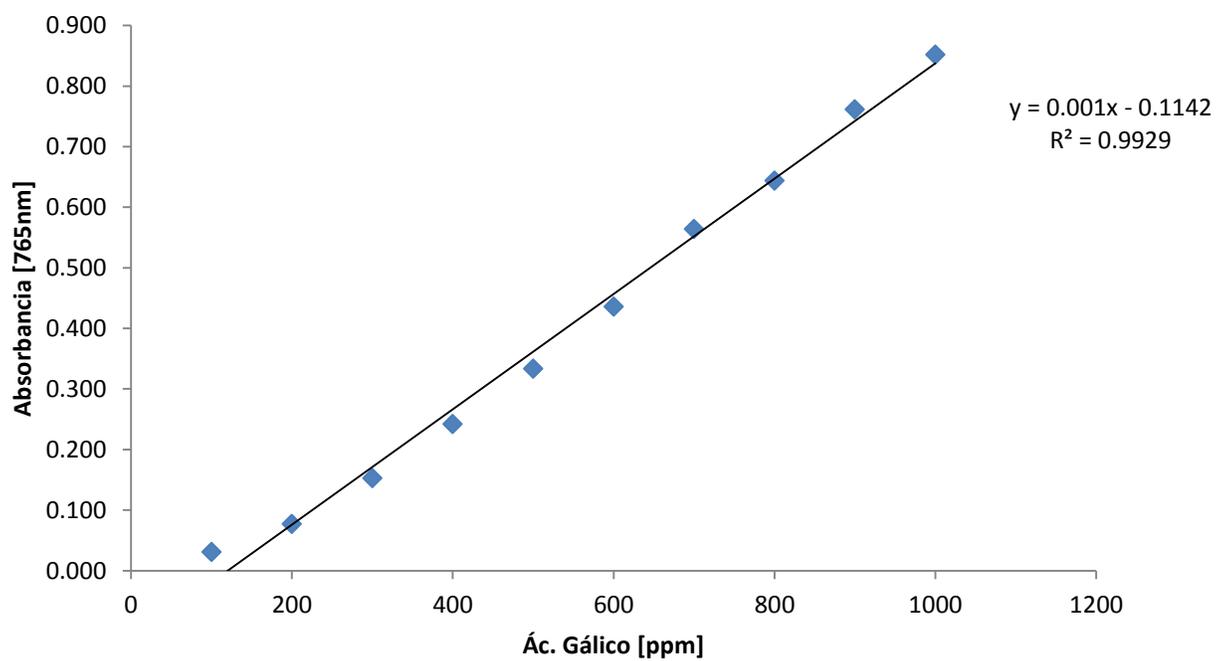
Sánchez S.C., M. P. (2001). HISTORIA DEL AGUACATE EN MÉXICO. 171-187.

Scade, J. (1973). *Cereales*. Acribia.

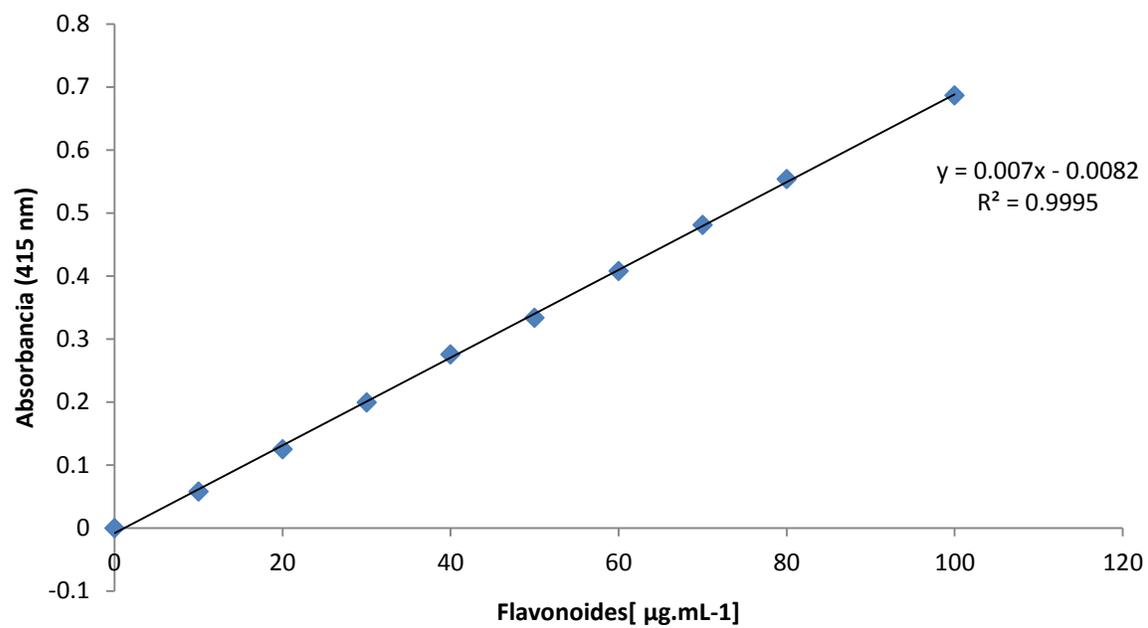
wanger H., B. S. (1996). *plant drug analysis*. Munich: Springer.

12. Anexos

Anexo A: Curva patrón de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).



Anexo B: Curva patrón de flavonoles totales (Método de AlCl₃)



Anexo C. Curva de fenoles totales para taninos.

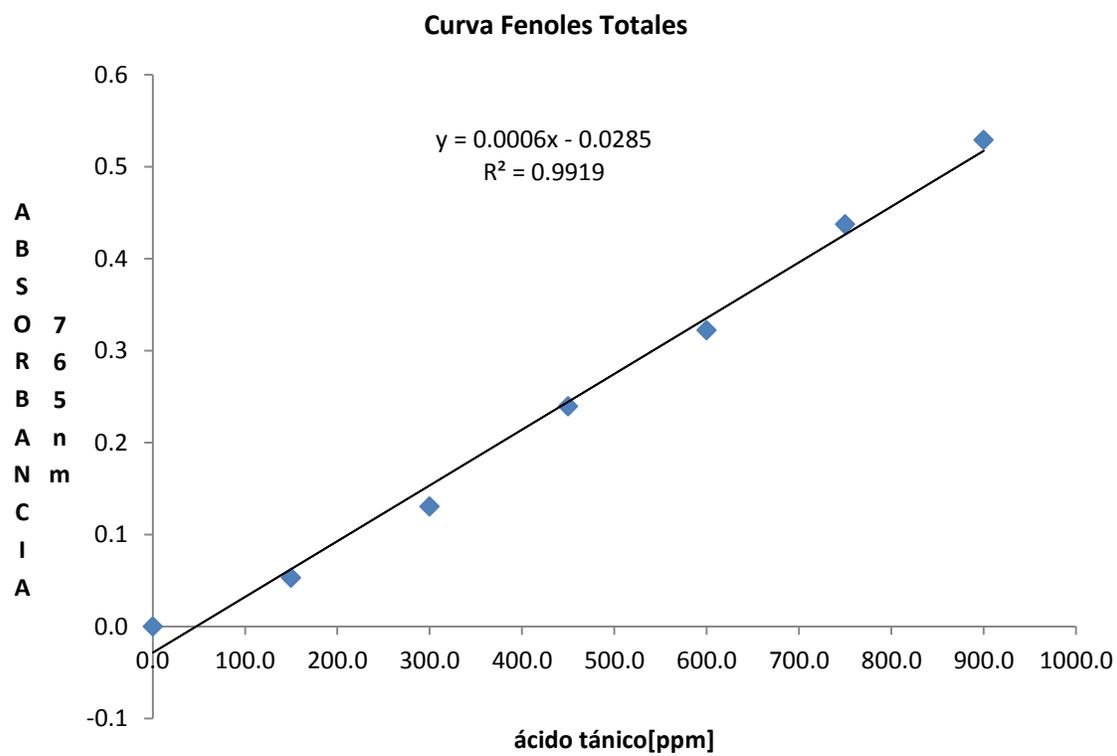


Diagrama del proceso de extracción.



Muestreo.



Limpieza de las muestras.



Las muestras fueron cubiertas y congeladas a -20°C .



Se liofilizó protegiendo las muestras de la luz, a -20°C y 0.100psi.



Las muestras se trituraron y almacenaron en frascos ámbar.



Se colocaron 20g de muestra y se agregó 200 mL de MeOH.



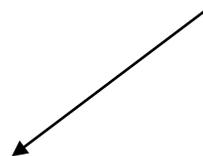
Se sónico por 20 min.



Se filtraron las muestras con papel whatman núm. 5



Se sónico por 2^o vez, 15 min y se volvió a filtrar.





La muestra se centrifugó por 10 min a 3000g.



Se recuperó el sobrenadante en un matraz bola (previamente pesado). Se evaporó a vacío con un rotavapor.



Ya evaporado el solvente se pesó el matraz. Y se resuspendió en 10 mL de metanol absoluto.



Las muestras se guardaron en refrigeración a -20°C y protegidas de la luz.