



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**LIBERACIÓN Y ABSORCIÓN PASIVA (*in vitro*) DE
COMPUESTOS LIPOFÍLICOS E HIDROFÍLICOS DE
AGUACATE CV. 'HASS' Y SU POTENCIAL
ANTIOXIDANTE Y ANTIPROLIFERATIVO**

Por:

Q.B.C. Cinthya Araceli Ruiz Pardo

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

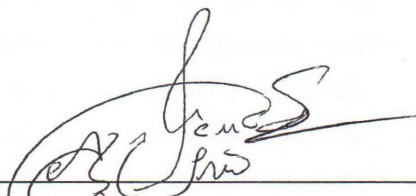
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Septiembre del 2014

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cinthya Araceli Ruiz Pardo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Director de tesis



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor



Dr. Humberto Astiazarán García
Asesor

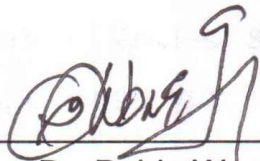
Dr. José de Jesús Ornelas Paz
Asesor

Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por permitirme formar parte de esta institución, y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A la Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, por su respaldo académico.

A mi Director de Tesis, Dr. Gustavo Adolfo Aguilar, por confiar en mí y permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Agradezco y valoro cada una de sus enseñanzas.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, Dr. Humberto Astiazarán García, Dr. José de Jesús Ornelas Paz y Dra. Isela Olivas, por el apoyo, consejos y contribuciones otorgadas a este proyecto de investigación.

A la Q.B Mónica Villegas Ochoa, por su apoyo técnico, paciencia e interés en mi formación y en la realización del proyecto.

A la Dra. Maribel Ovando, por toda su paciencia, sugerencias y trabajo en equipo, pero sobre todo por tu humildad, positivismo y alegría ante todo.

Al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Sonora por brindarme sus instalaciones para la realización de una parte fundamental de mi trabajo de tesis, especialmente a Heriberto Torres, Raúl Díaz y Luis Zamora, por el apoyo técnico y su valiosa amistad que sé que perdurará.

A los integrantes del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Antioxidantes, Tavo Velderraín, Ana Quirós, Mayra Salmerón, Francisco Olivas, Maribel Martínez,

Elena Moreno, Ramón Pacheco y Jacqueline Ruiz, por su apoyo incondicional, enseñanzas, y buenos momentos. Gracias por todo amigos, siempre los llevaré en el corazón.

A mis entrañables amigos Ignacio Valenzuela Chavira y Leonardo Fox Uribe, sin ustedes no habría sido igual. Espero nuestra amistad siga muchos años más.

A mis amigos de generación en especial Thalía, Gaby, David y Heriberto. Los momentos a su lado nunca los olvidaré, hicieron mi estancia en CIAD más agradable.

DEDICATORIA

A mis padres, Irma Pardo y David Ruiz, quienes siempre con amor y ejemplo inculcaron en mí la inquietud por la superación profesional y personal. La culminación de este proyecto corona todos sus esfuerzos. Este logro es suyo.

A mí abuela, María Luisa Guzmán, por su eterno apoyo y amor, quien observó muy de cerca mi trayectoria durante todo este proceso.

A mí abuelo, Abel Pardo García, quien desde el cielo se regocija por este logro.

A mí hermano, David Ruiz, por el interés y alegría que siempre le genera cada uno de mis proyectos.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Frutas Tropicales Como Fuente Natural de Compuestos Antioxidantes con Potenciales Beneficios a la Salud.....	5
Compuestos Fitoquímicos en el Aguacate	6
Compuestos de Naturaleza Hidrofílica	9
Compuestos de Naturaleza Lipofílica	10
Biodisponibilidad y Bioaccesibilidad en Modelos de Digestión <i>in vitro</i>	13
Factores Químico-Enzimáticos y Fisiológicos del Tracto Gastrointestinal y su Efecto Sobre la Bioaccesibilidad y Bioactividad	16
Modelos de Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> Utilizados Actualmente	19
Potencial Antiproliferativo del Fruto de Aguacate cv. 'Hass'	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Material Vegetal.....	23
Parámetros Físicoquímicos	23
Color.....	23
Firmeza	24
Materia Seca	24
Contenido de Aceite	24
Extracción de Compuestos Bioactivos.....	25
Extractos Hidrofílicos.....	25
Fenoles Totales.....	25

Fenoles no extraíbles.....	25
Taninos hidrolizables.....	26
Taninos condensados.....	26
Contenido de Fenoles Totales.....	27
Extractos Lipofílicos.....	27
Contenido de Ácidos Grasos Libres.....	28
Capacidad Antioxidante.....	28
Capacidad Para Reducir al Radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolín-ácido-6-sulfónico)).....	28
Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC).....	29
Ensayo de Liberación.....	29
Ensayo de Absorción por Difusión Pasiva.....	30
Líneas Celulares y Actividad Antiproliferativa (AAP).....	31
Análisis Estadístico.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Parámetros Físicoquímicos.....	33
Liberación y Absorción por Difusión Pasiva de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos.....	34
Capacidad Antioxidante de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos.....	50
Liberados y Absorbibles por Difusión Pasiva Durante las Etapas del Modelo de Digestión <i>in vitro</i>	50
Actividad Antiproliferativa de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos Absorbibles por Difusión Pasiva de Aguacate cv. 'Hass'.....	57
CONCLUSIÓN.....	61
RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS.....	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Efecto de la matriz alimentaria sobre la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos.....	15
2. Actividad antiproliferativa de extractos lipofílicos e hidrofílicos de pulpa de aguacate y provenientes de un modelo de digestión <i>in vitro</i> en la línea celular humana de cáncer cérvico-uterino “HeLa”.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Propiedades bioactivas de frutas tropicales involucradas en la protección celular.	8
2. Aguacate, una fuente de fitoquímicos de naturaleza lipídica.	12
3. Contenido de fenoles totales en pulpa de aguacate cv 'Hass'.....	36
4. Liberación de compuestos hidrofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión <i>in vitro</i>	39
5. Absorción por difusión pasiva de los compuestos fenólicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión <i>in vitro</i>	43
6. Liberación de los compuestos lipofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión <i>in vitro</i>	46
7. Absorción por difusión pasiva de compuestos lipofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión <i>in vitro</i>	48
8. Capacidad antioxidante de extractos lipofílicos e Hidrofílicos de pulpa de aguacate cv. 'Hass' evaluada por los métodos de ORAC y TEAC.	52
9. Cambios en la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos liberados de aguacate cv. 'Hass' en un modelo de digestión <i>in vitro</i> evaluada por los métodos de ORAC y TEAC.	55
10. Cambios en la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos de aguacate cv. 'Hass' (Persea americana) absorbibles por difusión pasiva evaluados por los métodos de ORAC y TEAC.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Grasos Libres
CF	Compuestos Fenólicos
CAOX	Capacidad Antioxidante
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidracilo
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
ET	Equivalentes Trolox
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano) di-hidrocloruro
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol -2-yl)-2,5-difeni l bromuro de tetrazolio
TGI	Tracto Gastrointestinal
TH	Taninos Hidrolizables
TC	Taninos Condensados
EH	Extracto Hidrofílico
EL	Extracto Lipofílico
HD	Extracto Hidrofílico Dializado
LD	Extracto Lipofílico Dializado

RESUMEN

El aguacate se considerada una fuente rica en compuestos bioactivos, como vitaminas, minerales y fitoquímicos, los cuales se han asociado a la prevención de diversas enfermedades. Se han identificado diversos fitoquímicos en el aguacate cv. 'Hass'. Sin embargo, para que estos ejerzan una actividad biológica, es necesario que sean liberados y absorbidos en el tracto gastrointestinal. El objetivo del presente estudio fue evaluar la bioaccesibilidad (fracción indigestible) y biodisponibilidad (modelo de difusión pasiva) de compuestos lipofílicos e hidrofílicos de aguacate y su potencial antioxidante (TEAC y ORAC) y antiproliferativo en la línea celular humana HeLa. La mayor cantidad de compuestos fenólicos liberados tuvo lugar en la etapa gástrica ($\approx 74.8\%$) y la tasa de absorción intestinal fue superior a los 180 minutos ($1.69 \mu\text{g EAG/gps}$), atribuido a la inestabilidad causada por los cambios de pH durante el modelo. En contraste, se observó una mayor liberación de ácidos grasos libres en la etapa intestinal en comparación al contenido inicial en la pulpa analizada y alrededor de 50% de absorción por difusión pasiva de estas biomoléculas. Así mismo, la liberación de los compuestos se relacionó a su capacidad antioxidante donde, se obtuvieron valores superiores para los extractos lipofílicos provenientes de la digestión. Por último, la concentración de inhibición de la población celular al 50% (IC_{50}) para los extractos dializados fue de 6.25 y 12,25 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos lipofílicos e hidrofílicos dializados. Por lo anterior, se concluye que los compuestos lipofílicos del aguacate cv. 'Hass' representan una opción para el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras clave: Aguacate, Bioaccesibilidad, Biodisponibilidad, Capacidad Antioxidante, Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos, Actividad antiproliferativa.

ABSTRACT

Avocado is considered a rich source of bioactive compounds such as vitamins, minerals and phytochemicals with potential health benefits. The presence of the phytochemicals has been correlated with the biological activity highlighting its lipophilic nature. However, to exert a biological activity, it is necessary the release from food matrix by digestive enzymes. The present study aims to assess the bioaccessibility (digestible fraction) and bioavailability (passive diffusion model) of hydrophilic and lipophilic extracts from avocado cv. 'Hass' as well as their antioxidant activity (TEAC and ORAC assays) and antiproliferative in the human cellular line "HeLa". The large amount of released phenols was observed in gastric phase ($\approx 74.8\%$) with a major absorption rate at 180 min ($1.69 \mu\text{g EAG/gps}$), which could be attributed to low stability of phenolic compounds at digestion conditions. In contrast, a major bioaccessibility rate of free fatty acids was observed during intestinal phase compared with the initial content of analyzed avocado pulp. Otherwise around the 50% of these biomolecules were absorbed by passive diffusion. Likewise, bioaccessibility and bioavailability of hydrophilic and lipophilic compounds was correlated with the antioxidant capacity. Finally, lipophilic dialyzed extracts had a greater antiproliferative activity ($\text{IC}_{50} 6.25 \mu\text{g/mL}$) compared with hydrophilic dialyzed extracts ($\text{IC}_{50} 50 \mu\text{g/mL}$). We concluded that lipophilic compounds of avocado cv. 'Hass' represent a good alternative for the development of functional foods.

Keywords: Avocado, bioaccessibility, bioavailability, antioxidant capacity, lipophilic and hydrophilic compounds, antiproliferative activity.

INTRODUCCIÓN

El aguacate es un fruto subtropical altamente comercializado, el cual además, de ser una fuente de energía y nutrientes esenciales, contiene diferentes tipos de compuestos bioactivos (Werner *et al.*, 1987). Los compuestos fenólicos representan a los compuestos bioactivos más abundantes en la mayoría de los frutos y demás alimentos de origen vegetal. Sin embargo, en aguacate son los fitoquímicos de naturaleza lipofílica los que predominan en la matriz vegetal, encontrando entre estos a los tocoferoles, carotenoides, fitoesteroles y ácidos grasos (Villa-Rodriguez *et al.*, 2011). Estos compuestos tienen la capacidad de prevenir y disminuir diferentes tipos de enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer (Baur y Sinclair, 2006). Los efectos benéficos que estos compuestos ejercen hacia la salud se deben a su capacidad para actuar como moléculas antioxidantes, estabilizando radicales libres que dañan principalmente biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN (Lee *et al.*, 2004).

Los fitoquímicos antioxidantes presentes en el aguacate son químicamente diferentes y se localizan en sitios celulares distintos; además difieren en tamaño, solubilidad y susceptibilidad a la oxidación (Lee *et al.*, 2004). Los mecanismos de liberación y absorción de estos compuestos dependen de su naturaleza química y su asociación con la matriz alimentaria, por lo que algunos pueden ser más bioaccesibles y biodisponibles que otros (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Estos factores influyen en la funcionalidad propia de la planta, en los alimentos y en el cuerpo, lo cual puede actuar combatiendo el desarrollo de distintas patologías. Sin embargo, el hecho que los compuestos bioactivos contenidos en el alimento puedan ejercer su función saludable, no depende directamente de su liberación. Este fenómeno, permite la absorción de

los compuestos bioactivos en el tracto gastrointestinal para su posterior metabolismo y acción en sitios celulares específicos (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Por otro lado, la funcionalidad de los compuestos fitoquímicos se ve limitada por el efecto de las condiciones químico-enzimáticas y fisiológicas del tracto gastrointestinal dado a los cambios estructurales propiciados (Porrini y Riso, 2008). En términos prácticos, su absorción no garantiza su bioactividad y se ve afectada por múltiples fenómenos como son la matriz alimentaria, estructura química, peso molecular, solubilidad entre otros (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). Por otro lado, cabe señalar que la habilidad de los compuestos bioactivos para prevenir ciertas patologías como el cáncer se ve influenciada por el grado absorción de los mismos así como, por las diversas transformaciones que estos sufren durante el proceso digestivo (Bergeon y Toth, 2007; Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). En el caso específico del aguacate, estudios revelan que sus extractos lipofílicos e hidrofílicos poseen actividad antiproliferativa en distintas líneas celulares humanas (D'Ambrosio *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2007). Sin embargo, pese a ello, no se ha evaluado su efecto en un modelo de digestión *in vitro*. En este sentido, el presente trabajo se evalúa la bioaccesibilidad y capacidad antioxidante de los compuestos lipofílicos e hidrofílicos en pulpa de aguacate cv. 'Hass', en un modelo de digestión *in vitro* y su actividad antiproliferativa en líneas celulares.

ANTECEDENTES

Frutas Tropicales Como Fuente Natural de Compuestos Antioxidantes con Potenciales Beneficios a la Salud

En el mundo, el consumo de frutas tropicales ha aumentado debido a su reconocido valor nutricional y terapéutico (Rufino *et al.*, 2010). Estudios epidemiológicos han demostrado que una dieta equilibrada en donde abunda un alto contenido en frutas tropicales frescas ayuda a mantener una vida saludable (Barreto *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2012; Santiago-Silva *et al.*, 2011). Actualmente, el consumo de frutas no es simplemente consecuencia de gustos y preferencias del consumidor, éste se encuentra ligado a la prevención de enfermedades crónico degenerativas debido a su alto contenido de nutrientes (Alves-Brito *et al.*, 2010). Varios estudios han demostrado que las frutas tropicales son ricas en compuestos bioactivos, algunos de estos son vitaminas, fibra y también una amplia gama de fitoquímicos. Entre los principales podemos encontrar a los compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles y ácidos grasos; los cuales exhiben capacidad antioxidante (Baur y Sinclair, 2006).

Los compuestos bioactivos son originados a partir del metabolismo secundario de las plantas, y son sintetizados como defensa ante el ataque de patógenos, insectos y animales herbívoros, así como otros tipos de estrés biótico y abiótico (Lewinsohn y Gijzen, 2009; Puerta-Gomez y Cisneros-Zevallos, 2011). Se estima que hasta el momento se han identificado más de 5000 y 25,000 compuestos fitoquímicos en frutas, vegetales y granos (Liu, 2004). Algunos estudios han demostrado que muchos de los fitoquímicos ya identificados presentan actividad antioxidante *in vitro* e inhiben la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como mecanismo de defensa para evitar/prevenir el daño a biomoléculas (Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, el contenido de antioxidantes entre plantas varía considerablemente dependiendo

del tipo de fitoquímicos presentes en el fruto, el estado de madurez y las condiciones de manejo (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

Los fitoquímicos antioxidantes presentes en frutas y hortalizas son químicamente diferentes y se localizan en sitios celulares distintos; además difieren en tamaño, solubilidad y susceptibilidad a la oxidación (Lee *et al.*, 2011). Estos son absorbidos y metabolizados por múltiples mecanismos, por lo que algunos son más biodisponibles que otros (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Estos factores influyen en la funcionalidad propia de la planta, en los alimentos, y en el cuerpo, lo cual puede actuar combatiendo el desarrollo de distintas patologías. La **Figura 1** describe el papel de las frutas tropicales en la prevención de enfermedades crónico degenerativas. Los fitoquímicos contenidos en estas frutas son capaces de actuar como moléculas antioxidantes al estabilizar radicales libres y revertir el estrés oxidativo celular. Este efecto contribuye en gran medida a propiciar una mejor calidad de vida y prevención de diversas patologías (Bacchetti *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2012).

Compuestos Fitoquímicos en el Aguacate

El aguacate es un fruto subtropical altamente consumido y comercializado (Wang *et al.*, 2012). Por su amplio contenido de compuestos bioactivos el aguacate puede ser clasificado como un alimento funcional debido a su alto valor nutricional y a los probados efectos pro-salud (ADA, 1999). La divulgación del conocimiento sobre estos efectos ha impulsado el consumo del aguacate en los últimos años, colocándolo entre uno de los de mayor demanda y comercialización a nivel mundial (Ding *et al.*, 2007; Donetti y Terry, 2014; Meyer y Terry, 2010). Este fruto posee un alto contenido de grasa vegetal (3-30 %), es rico en vitaminas, fibra dietética, minerales, compuestos nitrogenados y bajo en carbohidratos. Además, de ser una fuente de energía y vitaminas, el aguacate contiene diferentes tipos de compuestos fitoquímicos (Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes, 2012; Wang *et al.*, 2012; Wedding *et al.*, 2013). Entre los que podemos destacar a los compuestos fenólicos. Sin embargo, son los

fitoquímicos de naturaleza lipofílica los que predominan en la matriz vegetal representada en su mayoría por ácidos grasos insaturados (Donetti y Terry, 2014). Encontrando además, tocoferoles, carotenoides y fitoesteroles los cuales presentan un alto potencial antioxidante y de captación de radicales libres (Zhang *et al.*, 2013).

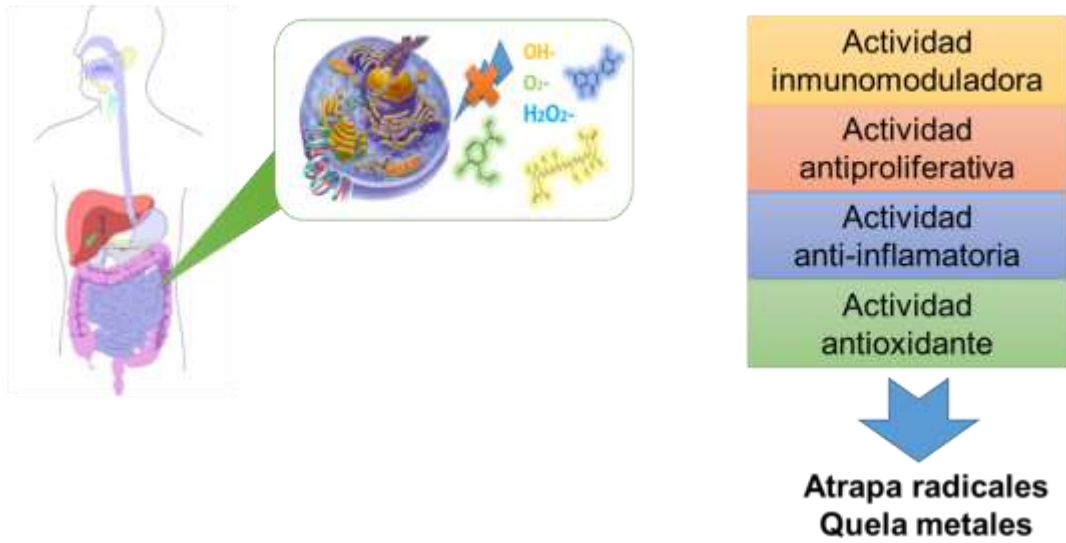


Figura 1. Propiedades bioactivas de frutas tropicales involucradas en la protección celular.

Compuestos de Naturaleza Hidrofílica

Investigaciones recientes han caracterizado e identificado el contenido de especies hidrofílicas en pulpa y semilla de aguacate 'Hass'. En el estudio elaborado por Wang *et al.* (2010) se encontró un mayor contenido de fenoles totales y mayor capacidad antioxidante (ORAC y DPPH) en pulpa y cáscara, respectivamente. Así mismo, identificaron procianidinas, incluyendo a catequina y epicatequina A y dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros tipo B mediante HPLC-MS. Por otro lado, Hurtado-Fernández *et al.* (2013) identificaron una diversidad de compuestos fenólicos entre los que destacan los ácidos homovanílico, *trans*-cinámico, clorogénico, isovanílico, sinápico y gentísico, los cuales han mostrado capacidad antioxidante *in vitro* (Chen *et al.*, 2012; Gündüz y Özdemir, 2014; Nour *et al.*, 2014). Lo anterior, sugiere que tanto la cáscara y pulpa del fruto de aguacate, pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica para ser explotados por sus propiedades funcionales.

La presencia de compuestos fenólicos se ha asociado con el color y propiedades organolépticas del fruto (Crecente-Campo *et al.*, 2012; González-Talice *et al.*, 2013). Por ello, el estudio de estos compuestos se ha enfocado en el papel que ejercen sobre la salud tras su ingesta. Dada su capacidad como modulador del metabolismo humano, su papel ha sido descrito ampliamente en la literatura por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas y anti-inflamatorias (Luo *et al.*, 2011; Malta *et al.*, 2013; Salem *et al.*, 2013; Živković *et al.*, 2014). A pesar de los estudios realizados sobre el efecto benéfico a la salud que los compuestos fenólicos otorgan tras su consumo, es necesario profundizar en el estudio del mecanismo molecular que estos exhiben, así mismo, la posible interacción con la matriz y otros fitoquímicos. Aunado a esto, para poder comprender dichos mecanismos es necesario evaluar parámetros de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos.

Compuestos de Naturaleza Lipofílica

El aguacate es un fruto oleaginoso con un contenido mayor al 70% de aceite en pulpa seca (Landahl *et al.*, 2009). Dentro de esta fracción se encuentran compuestos de naturaleza lipofílica, principalmente ácido oleico (50-60% del contenido total de ácidos grasos), palmítico (15–20%), palmitoleico (6–10%), linoleico (11–15%) y ácido linolénico (1%) (Meyer y Terry, 2010; Ozdemir y Topuz, 2004; Villa-Rodriguez *et al.*, 2011). Amplios estudios clínicos y epidemiológicos respaldan los beneficios a la salud otorgados por los ácidos grasos insaturados predominantes en el aguacate. En un estudio realizado por **Enns *et al.* (2014)** se evaluó el papel de una dieta rica en ácidos grasos polinsaturados y monoinsaturados en ratas, encontrando cambios en la regulación de proteínas y metabolismo de ácidos grasos en tejido adiposo pero no hubo alteración en otros marcadores de inflamación. En general, los estudios sobre los efectos benéficos que se tiene con el consumo de estos compuestos se ha dirigido hacia su efecto antiobesogénico y de regulación en los niveles de insulina (Enns *et al.*, 2014).

Los carotenoides son otro grupo de fitoquímicos identificados con acción biológica conocida, estos son isoprenoides, solubles en lípidos (Lu *et al.*, 2005; Rao y Rao, 2007; Shardell *et al.*, 2011). Están presentes como micro-componentes de frutas y vegetales y son responsables de las coloraciones amarillas, naranjas y rojas (Rao y Rao, 2007). En el aguacate, se han identificado diferentes tipos de carotenoides entre los que se encuentran luteína, zeaxantina, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, violaxantina y neoxantina (Villa-Rodriguez *et al.*, 2011). Assmann Gerd. *et al.* (2006) sugieren una relación inversa entre los niveles séricos de β -criptoxantina y luteína y el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Estas implican un potencial efecto cardioprotector temprano de los carotenoides (Bacchetti *et al.*, 2014; Koh *et al.*, 2011; Lidebjer *et al.*, 2007). La **Figura 2** muestra los principales compuestos lipofílicos con actividad biológica presentes en el aguacate.

Por otro lado, el mecanismo ejercido por los fitoesteroles se basa en su habilidad para reducir la absorción del colesterol, disminuyendo consecuentemente los niveles plasmáticos del colesterol LDL (Brufau *et al.*, 2008). Para la acción hipocolesterolemiantes, se ha propuesto que la relación dosis-efecto empieza tras la ingesta de aproximadamente 500 mg/día (Marangoni y Poli, 2010), mientras que las cantidades superiores parecen estabilizar los niveles de colesterol LDL (Micallef y Garg, 2009). De igual forma, se ha evaluado el posible rol en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que la Vitamina E posee (Nadeem *et al.*, 2012). Estos resultados indican que la suplementación a largo plazo con los fitoquímicos contenidos en el aguacate, pueden actuar atenuando la peroxidación lipídica de las LDL y alteraciones en la homeostasis vascular dependientes de la inflamación.

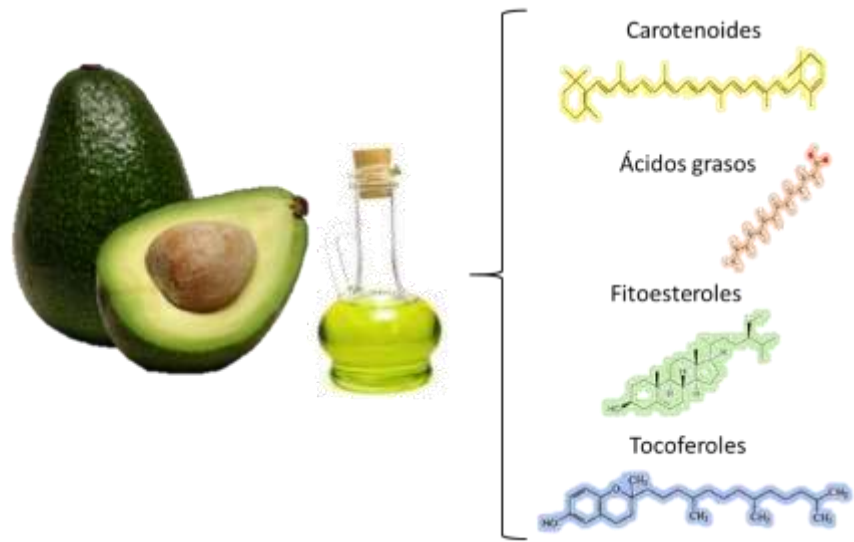


Figura 2. Aguacate, una fuente de fitoquímicos de naturaleza lipídica.

Biodisponibilidad y Bioaccesibilidad en Modelos de Digestión *in vitro*

En términos alimenticios la bioaccesibilidad se define como la fracción de un nutriente o compuesto ingerido que tiene el potencial para ser liberado de la matriz alimentaria por acción de las enzimas digestivas (Rein *et al.*, 2013). Sin embargo, para que estos puedan ejercer un efecto benéfico para la salud es necesario que sean biodisponibles o absorbidos en el tracto gastrointestinal con el fin de alcanzar circulación sistémica y los sitios específicos en los que puede ejercer su efecto biológico (Porrini y Riso, 2008b; Tagliazucchi *et al.*, 2010). Entre los principales factores reconocidos que interfieren en el proceso de digestión podemos enlistar la cantidad consumida, la interacción con otros ingredientes de la dieta, las transformaciones moleculares, los diferentes transportadores celulares, el metabolismo y la interacción con la microbiota intestinal (Neilson y Ferruzzi, 2011). Otros factores relacionados con el huésped que se pueden subdividir aún más en factores intestinales son por ejemplo, secreción de HCl y de enzimas, el tiempo de tránsito intestinal, la actividad enzimática y los factores sistémicos, por ejemplo, género, edad, estado hormonal, genética, estado fisiológico (por ejemplo, embarazo), y trastornos y/o patologías (por ejemplo, del tracto gastrointestinal) (Porrini y Riso, 2008).

El conocer la biodisponibilidad y bioaccesibilidad es esencial para lograr la evaluación de las propiedades bioactivas y actividad biológica de los compuestos. Pese al gran número de artículos científicos en los cuales se ha evaluado la actividad biológica *in vitro* de los compuestos bioactivos en aguacate, es necesario tener especial cuidado al momento de extrapolar los resultados (Aqil *et al.*, 2013; Ortega *et al.*, 2011; Villanueva-Carvajal *et al.*, 2013). Puesto que, la biodisponibilidad y bioaccesibilidad juegan un papel importante en la acción biológica de los compuestos, y se ve afectada por múltiples fenómenos como son la matriz alimentaria, estructura química, peso molecular, solubilidad entre otros. Por ello, el estudio de estos fenómenos es imprescindible para poder elucidar los mecanismos por los cuales los compuestos bioactivos ejercen su acción biológica. En este sentido, el aguacate representa un fruto con un gran

potencial para abordar este tipo de investigación en trabajos futuros. En el **Cuadro 1** se enlistan algunos estudios en donde se evalúa la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes lipofílicos e hidrofílicos. De acuerdo a los autores, se hicieron evaluaciones *in vitro* siguiendo las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal (TGI), las diferencias en los rangos de liberación y absorción entre estudios pueden ser atribuidas al tipo de alimento y matriz vegetal. Es importante destacar que no hay reportes que indiquen la evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos de manera simultánea por ello, la importancia de su evaluación en trabajos futuros.

Cuadro 1. Efecto de la matriz alimentaria sobre la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos.

Fitoquímico	Fruto	Matriz alimentaria	Modelo	Biodisponibilidad	Referencia
β -caroteno	<ul style="list-style-type: none"> Espinaca y Tomate Zanahoria 	<ul style="list-style-type: none"> Pasta Molida 	<ul style="list-style-type: none"> <i>In vivo</i> Celular 	<ul style="list-style-type: none"> 9.5 % 20.5 % 	<ul style="list-style-type: none"> Castenmiller <i>et al.</i>, (2000)
Lycopeno	<ul style="list-style-type: none"> Tomate 	<ul style="list-style-type: none"> Pasta 	<ul style="list-style-type: none"> <i>In vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 84.9 μmol/L 	<ul style="list-style-type: none"> Van Het Hot <i>et al.</i>, (2000)
α -tocoferol	<ul style="list-style-type: none"> Brocóli 	<ul style="list-style-type: none"> Entera 	<ul style="list-style-type: none"> Digestion gastrointestinal 	<ul style="list-style-type: none"> 1.54 mg/100 g 	<ul style="list-style-type: none"> Bernardt y Schlich, (2006)
Ácidos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> Uva-Naranja-Chabacano 	<ul style="list-style-type: none"> Jugo 	<ul style="list-style-type: none"> Digestión gastrointestinal 	<ul style="list-style-type: none"> 403 mg EAG/100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> Cilla <i>et al.</i>, (2009).
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> Uva 	<ul style="list-style-type: none"> Jugo 	<ul style="list-style-type: none"> Digestión gastrointestinal 	<ul style="list-style-type: none"> 1066 mg EAG/100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> Cilla <i>et al.</i>, (2011)

Factores Químico-Enzimáticos y Fisiológicos del Tracto Gastrointestinal y su Efecto Sobre la Bioaccesibilidad y Bioactividad

Una vez ingeridos los compuestos bioactivos son expuestos a diferentes condiciones que representan un factor importante para su liberación. Entre estos encontramos a las enzimas del TGI, tiempos de residencia y pH (Hur *et al.*, 2011). Por otro lado, existen factores intrínsecos como es la matriz alimentaria en la cual están embebidos los compuestos bioactivos y nutrientes (Porrini y Riso, 2008). La matriz alimentaria forma una microestructura en la cual, los compuestos bioactivos son contenidos. De esta manera, estos pueden sufrir interacciones entre sí, limitando la liberación y absorción en el TGI (Proudfoot, 1991; Parada y Aguilera, 2007; Walton *et al.*, 2009).

Los alimentos ingeridos sufren una serie de transformaciones durante su paso a lo largo del TGI, desde la ingesta a la evacuación (Turgeon y Rioux, 2011). Durante la masticación, los pedazos del alimento son impregnados de saliva la cual contiene la enzima α -amilasa responsable de hidrolizar almidón en sus constituyentes más simples (Hur *et al.*, 2011). Durante la masticación en presencia de saliva se provoca una ruptura celular en el fruto que libera compuestos como carotenoides y CF presentes en la vacuola o ligados a la pared celular (Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Ornelas-Paz *et al.*, 2008). Pese a ello, el tiempo de residencia de los alimentos en esta etapa es corto (alrededor de 1 minuto), así como los cambios que se sufren durante este proceso (Oomen *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha encontrado que la boca contiene receptores capaces de detectar grasa y liberan señales que estimulan enzimas digestivas que permiten digerir y absorber lípidos (Lopez, 2011). En consecuencia, la fase salival no debe despreciarse al momento de evaluar la liberación y absorción de compuestos bioactivos ya que, esta fase no se encarga sólo de la disrupción de la matriz vegetal, sino de producción de enzimas que más adelante se encargarán de la hidrólisis de la misma.

En el estómago, el proceso de digestión se debe principalmente a la acción de proteasas y sus condiciones ácidas (pH 1.5-3). El tiempo de residencia en ésta es de 1-2 horas (Hur *et al.*, 2011), el cual puede influir en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad en intestino delgado (Hellström *et al.*, 2006). La principal enzima es la proteasa aspártica llamada pepsina, responsable de la ruptura de proteínas a cadenas cortas de péptidos o aminoácidos (Hur *et al.*, 2011). El acceso de esta enzima a los lípidos del alimento es crucial, ya que estos pueden encontrarse embebidos en proteínas de la matriz vegetal y limitar su liberación (McClements y Li, 2010). Por otro lado, la acción de la pepsina y las condiciones de acidez en el estómago, facilitan la hidrólisis de enlaces peptídicos y carbohidratos en la matriz del alimento. Esta hidrólisis favorece la liberación de CF unidos a los diversos macronutrientes dentro de la matriz alimentaria (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha observado que durante la digestión estomacal puede ocurrir la absorción de algunos flavonoides; quercetina, daidzeína o antocianinas (Bouayed *et al.*, 2012). Lo anterior, es sugerido dada la estabilidad de los CF a las condiciones ácidas del estómago (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, la estabilidad de los CF depende de factores como pH y temperatura, así como de la presencia de inhibidores o enzimas que facilitan la absorción (Bouayed *et al.*, 2011). Se ha sugerido que el potencial antioxidante de los CF puede ser mayor en el intestino, el cual se encuentra en un rango de pH entre 7 y 8, ya que una de las características de los CF es que son pH-dependientes. Por otro lado, durante el proceso digestivo el estómago pasa a través de una variedad de movimientos de contracción mezclando el bolo alimenticio con los jugos digestivos. Estos movimientos de contracción varían en amplitud, frecuencia y duración dependiendo el componente ingerido, los cuales intervienen en gran manera en el transporte y liberación de compuestos bioactivos hacia el intestino delgado (Hellström *et al.*, 2006; Schulze, 2006).

Seguida a la etapa gástrica, los alimentos llegan al intestino, donde continúa su hidrólisis enzimática con la ayuda del complejo enzimático

denominado pancreatina (Hur *et al.*, 2011). En esta etapa de digestión en el intestino delgado, el tiempo de residencia es mayor (1-6 horas) y es éste el principal sitio de absorción de micro y macro-nutrientes. El intestino delgado humano, se divide en 3 partes: duodeno, yeyuno e íleon. Las vellosidades del duodeno y el yeyuno son mayores y más numerosas que las del íleon. Estas vellosidades son las unidades de absorción del intestino (Pérez, 2006). Discutiendo un poco de la absorción de CF, la mayoría están presentes en forma de ésteres, glucósidos, o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa (Manach *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos de estos CF, pueden ser absorbidos gracias a distintos transportadores presentes en las células epiteliales del intestino.

Por otro lado, durante el proceso de digestión los CF sufren a menudo distintos cambios en su estructura (glicosilación, glucuronidación y conjugación) por efecto de la microbiota intestinal o durante la absorción y biotransformación por las enzimas del metabolismo de fase II (metilación, glucuronidación y sulfatación) en el hígado (Boersma y van der Woude, 2002). Estas enzimas pertenecen principalmente a la superfamilia de enzimas microsomales de la citocromo P450, encontradas en abundancia en el hígado, tracto gastrointestinal, pulmón y riñón (Xu *et al.*, 2005). Esta superfamilia consiste en enzimas que incluyen a las sulfotransferasas (Shimada, 2006), UDP-glucuronosil transferasa (Laakkonen y Finel, 2010; Rowland *et al.*, 2013), (DT-diaforasa o NADPH: quinona oxidoreductasa o NADPH: m enadione reductasa , epóxido hidrolasas , glutatión S-transferasa y N-acetiltransferasas (Chen y Kong, 2004; Cheung y Kong, 2010). Típicamente, la inducción de enzimas del metabolismo de fase II interviene en la movilización de fármacos que puede contribuir a una función detoxificante pero a interacciones indeseables entre los CF (Olinga *et al.*, 2008). Este fenómeno puede provocar diferencias en las propiedades funcionales y/o bioactividad de las moléculas dependiendo del tipo de cambio estructural.

Por todo lo anterior, para poder asegurar el efecto bioactivo de los compuestos fitoquímicos observados *in vitro*, es necesario tomar a consideración

parámetros de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, así mismo, los posibles cambios estructurales y bioactivos debido a las condiciones fisicoquímicas del tracto gastrointestinal y enzimas del metabolismo de fase II. Numerosos estudios indican que el aguacate posee diversos efectos bioactivos; sin embargo, existe la necesidad de evaluar el efecto propiciado sobre sus compuestos bioactivos tras seguir un modelo de digestión *in vitro* para así, poder estimar y extrapolar su efecto *in vivo*.

Modelos de Digestión Gastrointestinal *in vitro* Utilizados Actualmente

En la actualidad, existen diversos estudios enfocados en la digestión gastrointestinal. Estos difieren con base en los componentes del alimento y la naturaleza de la matriz alimentaria de estudio, los cuales, influyen directamente en el proceso: 1. afectando el número y tipo de pasos incluidos en la secuencia de la digestión, por ejemplo, boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso (Zhu *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2013); 2. en la composición de los fluidos digestivos utilizados en cada paso, por ejemplo, enzimas, sales, tampones, polímeros biológicos, y componentes de superficie activa (Li *et al.*, 2011; Zangenberg *et al.*, 2001); así como, 3. en los esfuerzos mecánicos y flujos de fluidos utilizados en cada paso en la secuencia de la digestión, por ejemplo, la magnitud y dirección de las tensiones aplicadas, geometrías de flujo, y perfiles de flujo (McClements y Li, 2010).

Además, hay diferencias considerables en el tipo de parámetros experimentales medidos en los distintos modelos de digestión. Estos incluyen cambios químicos (tales como la hidrólisis de lípidos, proteínas y/o polisacáridos) (Fernández-García *et al.*, 2012; Tulipani *et al.*, 2012), cambios de ubicación como, la liberación de los componentes encapsulados, los procesos de absorción competitiva, la formación de varias capas y cambios estructurales (ruptura de estructuras específicas, agregación o coalescencia de gotas en emulsión) (Golding y Wooster, 2010; Kim *et al.*, 2005; Singh y Vingkar, 2008). Salvia-Trujillo *et al.* (2013) evaluaron el tamaño de una nano emulsión acarreadora de β -

caroteno a base de aceite de maíz y agua en su liberación en boca, estómago e intestino. Observando una disminución apreciable en el tamaño de la partícula que se atribuyó a la coalescencia y floculación por efecto de las enzimas del TGI. Por otro lado, la velocidad y el grado de liberación de lípidos y β -caroteno aumentaron tras la disminución del tamaño de las gotas en emulsión por aumento en la exposición de la lipasa pancreática al área superficial.

Un factor importante que influye en el tiempo de digestión es la naturaleza de la muestra que está siendo probada. Se sabe que partículas alimentarias grandes se mueven más lentamente a través del estómago, pues estas tienen que ser de aproximadamente <1 mm para pasar a través de la válvula píloro que separa el estómago y el intestino delgado. Por ello, los tipos de enzima incluidas son dirigidas a la disrupción de la matriz vegetal en estudio y liberación de compuestos bioactivos específicos, por ejemplo, lipasas para la digestión de lípidos, proteasas para la digestión de proteínas y amilasas para la digestión del almidón (Berton *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2014). En general, las enzimas y moléculas biológicas utilizadas con mayor frecuencia en modelos de digestión *in vitro* son pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, α -amilasa, lipasa, sales biliares, y mucina (McClements y Li, 2010).

Por otro lado, cabe señalar que las diferentes enzimas se añaden de forma secuencial en el modelo con el fin de simular los diferentes pasos del proceso digestivo. Por ejemplo, algunos modelos *in vitro* se basan en incubaciones consecutivas con pepsina para simular el estómago y seguido de pancreatina para simular el intestino delgado (Goni *et al.*, 2009). A menudo, la composición de los jugos digestivos puede simularse mediante la mezcla de cantidades apropiadas de enzimas puras (Boisen y Eggum, 1991). Otro aspecto que debe considerarse son los requisitos de operación de la enzima, por ejemplo, la lipasa pancreática requiere la presencia de calcio y sales biliares (Devraj *et al.*, 2013). Así mismo, cabe señalar que la actividad hidrolítica de una enzima puede disminuir con el tiempo, por ello, con el fin de obtener resultados correlacionables es necesario la preparación inmediata de la misma (Hur *et al.*, 2011). Por último,

pese a la variación entre los componentes de los jugos gástricos es importante mantener los parámetros fisiológicos (temperatura, pH y tiempos de incubación) como ocurren en el cuerpo humano.

Los resultados arrojados en un modelo de digestión *in vitro* corresponden a una aproximación de los rangos de concentración y absorción de los compuestos bioactivos evaluados, así mismo su potencial función benéfica en tejido diana. Estos parámetros pueden ser explotados en el desarrollo de ingredientes/alimentos funcionales, matrices acarreadoras y sistemas de liberación controlada (Aqil *et al.*, 2013; Yahia *et al.*, 2011). Sin embargo, pese a su amplia aplicación, extrapolar los resultados *in vitro* con lo que ocurre *in vivo* es difícil. Esto se debe principalmente a la incapacidad para imitar ampliamente los procesos fisiológicos propios de cada individuo como son: sistema nervioso, estado hormonal y nutricio, movimientos peristálticos, actividad celular y sistema inmune (Guerra *et al.*, 2012).

Potencial Antiproliferativo del Fruto de Aguacate cv. 'Hass'

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (Vossenaar *et al.*, 2011). De acuerdo a estimaciones de la OMS en el 2008, se reportaron alrededor de 12.7 millones de casos con un 59.84% de muertes por cáncer. Entre los principales casos de cáncer diagnosticados en mujeres está el de mama con una tasa de morbi-mortalidad de 23 y 14%, respectivamente. En el caso de los hombres el tipo de cáncer más común es el de pulmón con una tasa de morbi-mortalidad de 17 y 23%, respectivamente. Se prevé que el número de muertes atribuibles al cáncer puede incluso aumentar hasta 13 millones de casos en 2030 (GLOBOCAN, 2012). Estos hallazgos han estimulado extensas investigaciones sobre tratamientos quimiopreventivos eficaces. Estudios recientes revelan que el consumo de frutas tropicales como el aguacate, puede reducir el riesgo cáncer en humanos (Reagan-Shaw *et al.*, 2010;

Yu *et al.*, 2005). Este efecto protector se basa en la acción los compuestos bioactivos constituyentes.

Diversos investigadores se han dado a la tarea de estudiar el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos como agentes quimiopreventivos, proponiendo que su bioactividad es mediada por efectos anti-iniciadores de esta patología. Estos son: 1. inhibición de la formación de un promutagen/procarcinógeno; 2. atrapamiento de las moléculas procarcinogénicas; 3. inhibición de las isoenzimas del citocromo P450; 4. modulación de las enzimas de biotransformación de fase II; 5. captación de moléculas electrofílicas y 6. estimulación de procesos de reparación (Maru *et al.*, 2014).

Existen pocos estudios en relación a la actividad anticancerígena del fruto de aguacate. En el estudio conducido por Ding *et al.* (2007) se evaluó el efecto del fruto de aguacate que fue extraído con cloroformo sobre la inhibición en el crecimiento de células normales (TE1177), premalignas (SCC83-01-82) y malignas (SCC83-01-82CA) de líneas celulares humanas de cáncer oral. Encontrándose que el extracto con código D003 presentó mayor actividad reduciendo la concentración inhibitoria media máxima (IC-50) de las líneas celulares malignas a una concentración de 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el caso de las líneas celulares normales fue 2.7 veces más elevada con 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, hubo una disminución de los niveles de ciclina D, A y CDK2, proteínas que impiden la progresión del cáncer regulando el ciclo celular (Brown *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2007). Estos datos sugirieron que los fitoquímicos en el extracto de cloroformo (D003) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento al dirigir proteínas reguladoras del ciclo celular.

Por otro lado, Lu *et al.* (2005) desarrollaron extractos lipofílicos de aguacate a base de acetona, identificando principalmente carotenoides (luteína, zeaxantina, α -caroteno y β -caroteno), y vitamina E. Estos estudios demostraron inhibir el crecimiento de células dependientes de andrógenos (LNCaP) y células independientes de andrógenos (PC3) en líneas celulares de cáncer de próstata

in vitro. Además, se observó interrupción del ciclo celular en G2/M acompañado por un aumento en la expresión de la proteína p27. Sin embargo, en estos estudios solo se evaluó el efecto anticancerígeno de extractos que contienen compuestos bioactivos de naturaleza lipofílica, por ello, es importante evaluar el efecto de los compuestos hidrofílicos como son los fenoles. Además, aún falta estudiar este efecto a las concentraciones biodisponibles para que estos resultados puedan ser extrapolables a organismos vivos.

HIPÓTESIS

Los compuestos lipofílicos de aguacate cv. 'Hass' se liberan y absorben por difusión pasiva (*in vitro*) con mayor eficiencia que los de naturaleza hidrofílica, proporcionando una mayor actividad antioxidante y antiproliferativa.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la liberación y absorción pasiva (*in vitro*) de compuestos lipofílicos e hidrofílicos de aguacate y su potencial antioxidante y antiproliferativo, en la línea celular humana de cáncer cervicouterino “HeLa”.

Objetivos Específicos

- Evaluar la liberación y absorción pasiva de los compuestos lipofílicos e hidrofílicos presentes en pulpa de aguacate, en un modelo de digestión *in vitro*.
- Determinar la capacidad antioxidante de los compuestos lipofílicos e hidrofílicos liberados y absorbibles por difusión pasiva, durante las etapas del modelo de digestión *in vitro*.
- Evaluar el potencial antiproliferativo de los compuestos lipofílicos e hidrofílicos absorbibles, por difusión pasiva de aguacate cv. ‘Hass’.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se emplearon frutos de aguacate cv. 'Hass', los cuales fueron seleccionados en base a su tamaño, peso, color triestímulo y apariencia externa, asegurando la obtención del fruto en el estado de madurez 3 según los parámetros establecidos por Cox *et al.* (2004). La materia prima seleccionada fue desinfectada con agua clorada (200 ppm) durante 2 minutos y secada para posteriormente destinar el fruto a 4 lotes con 20 unidades experimentales cada uno. Se tomaron muestras al azar y se liofilizaron para su utilización en los distintos ensayos.

Parámetros Fisicoquímicos

Color

Los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) fueron medidos en el mesocarpio del fruto utilizando un colorímetro (Konica Minolta CR-300, Singapur) en tres puntos de la zona ecuatorial de cada unidad experimental. El Angulo $^{\circ}\text{Hue}$ se calculó como $^{\circ}\text{Hue} = \arctan b^*/a^*$ y el croma se obtuvo como $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. Los resultados representan el promedio de 3 repeticiones de 3 unidades experimentales para cada uno de los lotes.

Firmeza

La firmeza fue medida con un texturómetro modelo (CHATILLON® DFM50), utilizando un punzón de 8 mm de diámetro en la zona ecuatorial del fruto. Se realizaron tres repeticiones por fruto. Los resultados expresados en Newton (N) representan el promedio de 3 repeticiones de 3 unidades experimentales.

Materia Seca

Para la determinación del contenido de humedad se usó la metodología descrita por Ozdemir y Topuz (2004). Para ello, 5 gramos de aguacate se colocaron en una estufa al vacío a 70 °C y 40 kPa de presión, durante un periodo de 7 horas. Posteriormente, se colocó la muestra durante 30 minutos en un desecador para registrar su peso. Para determinar el peso de la materia seca se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de humedad: } \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

Contenido de Aceite

El contenido de aceite fue determinado por el método descrito por la AOAC (2006) con modificaciones menores. Aproximadamente, 2 g de pulpa de aguacate fueron pesados y homogenizados en un ultra Turrax®T25 Basic (IKA Works, Willmington, NC, EUA) a temperatura ambiente. Estos fueron puestos a secar durante 1 hora a 100 °C en estufa. Se registró el peso del aceite extraído de la muestra seca mediante un equipo Goldfish utilizando éter de petróleo como solvente a 60 °C durante 4 horas. El % extraído fue calculado mediante diferencia de peso para ello, se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de aceite extraído} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

Extracción de Compuestos Bioactivos

Extractos Hidrofílicos

Fenoles Totales. Los extractos hidrofílicos fueron obtenidos mediante el método descrito por Shivashankara *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se tomaron 10 g de pulpa de aguacate los cuales fueron homogenizados en una solución metanol/agua (80:20 v/v) utilizando un homogenizador UltraTurrax ®T25 (IKAWorks, Willmington, EUA) a temperatura ambiente durante 1 min a velocidad media. Posteriormente, el homogenizado fue sometido a sonicación durante 30 min en un sonicador Bransonic 2210 (Emerson Electric Co. ®, Danbury) y centrifugado a 9400 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y el residuo extraído dos veces con 10 mL de la solución de extracción bajo las condiciones previamente descritas. Los sobrenadantes fueron mezclados y filtrados en papel Whatman No. 1. Los concentrados fueron diluidos y aforados a 50 mL con la solución extractora y almacenados a -35 °C hasta su uso para la determinación de fenoles, así como para los ensayos de capacidad antioxidante por los métodos de TEAC (Actividad antioxidante en equivalentes de trolox) y ORAC (Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno) y actividad antiproliferativa por el método de MTT (3-(4,5-[dimetil-tiazol](#)-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio). El proceso de extracción se realizó por triplicado para cada determinación.

Fenoles no extraíbles. Este grupo de CF está conformado por polímeros conocidos como taninos, entre los cuales destacan los taninos hidrolizables y condensados. Para la extracción de este tipo de CF no extraíbles se realizaron dos tipos de extracción, según los compuestos de interés. De esta manera, se

realizó la extracción de taninos hidrolizables y condensados para la completa caracterización de los frutos de estudio.

Taninos hidrolizables. Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Hartzfeld *et al.* (2002). Esta técnica parte de la hidrólisis de los residuos obtenidos en la extracción metanólica de CF, realizada previamente. A estos residuos, se les añaden 20 mL de metanol y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) en tubos de teflón de 50 mL. Este residuo es incubado en agitación a 85 °C por 20 horas. Posteriormente, el producto de la incubación es centrifugado a 5175 g por 10 minutos, recuperando el sobrenadante colocándolo en matraces de 50 mL. El residuo fue lavado 2 veces con 10 mL de agua destilada y centrifugado en las condiciones ya descritas, recuperando el sobrenadante y aforando con agua destilada. Para su cuantificación se utilizó el método de fenoles totales con una curva de calibración de ácido gálico de acuerdo al método descrito por Singleton y Rossi (1965).

Taninos condensados. Esta metodología parte de residuos obtenidos de la extracción metanólica descrita anteriormente. Estos residuos, son dispersados con ayuda de una varilla de vidrio y se les añade 10 mL de una solución de Butanol/HCl/FeCl₃, manteniéndose en baño a 100°C durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugan a 5175 g durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante en matraces de 25 mL. El residuo obtenido es lavado 2 veces con la solución de butanol/HCl/FeCl₃ y es centrifugado bajo las condiciones descritas anteriormente, aforándose a un volumen final de 25 mL con la solución de Butanol/HCl/FeCl₃. Para su cuantificación se lee la absorbancia de los extractos a 555 nm utilizando una curva de calibración de ácido gálico, de acuerdo al método descrito previamente por Reed *et al.* (1982).

Contenido de Fenoles Totales

La concentración de fenoles totales se midió por el método descrito por Singleton y Rossi, (1996) con algunas modificaciones. El extracto (30 μ l) se mezcló con 150 μ L de reactivo de folin (1:10) y 120 μ L de Na₂CO₃ (7,5 %). Posterior a una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó absorbancia a 765 nm utilizando un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc., USA). El contenido de fenoles totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico y se expresó como mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/100 g de peso seco (gps).

Extractos Lipofílicos

La extracción de la fracción lipofílica se realizó de acuerdo al método descrito por Huang *et al.* (2007). Una muestra de pulpa de aguacate 'Hass' (6 g) se homogenizó en 10 mL de acetona 100 %, utilizando un homogenizador UltraTurrax ®T25 basic (IKA Works, Willmington, NC, EUA) a temperatura ambiente. Posteriormente, el homogenizado fue centrifugado a 9400 g durante 15 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se tomó una alícuota (1 mL) de solución de acetona/agua (50:50 v/v) la cual contenía β -ciclodextrina al 7 % y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital a 1890 g. Posteriormente, los extractos se almacenaron a -35 °C hasta su uso para la medición de ácidos grasos libres y capacidad antioxidante por los métodos de TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox) y ORAC (Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno) y actividad antiproliferativa por el método de MTT (3-(4,5-[dimetil-tiazol](#)-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio).

Contenido de Ácidos Grasos Libres

La hidrólisis de triglicéridos a partir de los extractos obtenidos en el proceso de digestión se midió por titulación según lo reportado por Helbig *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Se utilizó NaOH (0.24 M) y fenolftaleína como indicador. El vire de la fenolftaleína marca el cambio de pH 7.5 y la saponificación de los ácidos grasos. El volumen de NaOH consumido se expresó como la cantidad de ácidos grasos libres (ácidos grasos libres/ mL de solución) y se representó como una función del tiempo de digestión.

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante fue determinada tanto en la fracción hidrofílica como en la lipofílica de la pulpa de aguacate 'Hass' previamente caracterizado y en el sobrenadante obtenido en el modelo de digestión.

Capacidad Para Reducir al Radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolín-ácido-6-sulfurónico))

El valor de TEAC se determinó de acuerdo con Miller *et al.* (1996). El radical ABTS^{•+} catiónico se genera a través de la mezcla de 19.2 mg de ABTS en 5 mL de agua grado HPLC y 88 µL de persulfato potásico (K₂S₂O₈) (0,0378 g ml⁻¹). Este se incubó bajo condiciones de oscuridad en una habitación a temperatura durante 16 h, a continuación se tomó 1 mL de ABTS radical activado y se añadió 88 mL de etanol. El radical se ajustó a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. La reacción se inició añadiendo 245 µL de ABTS^{•+} + y 5 µL del extracto o solución estándar Trolox disuelto en metanol. La absorbancia fue monitoreada a 734 nm por cinco minutos. El porcentaje de inhibición se calculó y los resultados fueron expresados como mg ET/100 gps.

Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

La determinación de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mide el efecto de los compuestos antioxidantes de una muestra sobre la disminución de fluoresceína inducida por el generador de radicales peroxilo AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride] (Ou *et al.*, 2001). La mezcla de reacción contiene 150µL de fluoresceína 10nM, 25 µL del estándar Trolox (curva estándar 6.25–200 µM), 25 µL de buffer de fosfatos (75mM, pH 7.4) como blanco y 25 µL del extracto. La reacción se inicia por la adición del AAPH (240mM). La disminución de la fluorescencia se midió cada 90 segundos por un período de hora y media a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc., USA). Los valores de ORAC se calcularon empleando una ecuación de regresión lineal utilizando una curva estándar de trolox. Los resultados se expresan como µmoles de equivalentes trolox por gramo de peso seco (µMET/100 gps).

Ensayo de Liberación

Para la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal se siguió la metodología de fracción indigestible propuesta por Saura-Calixto *et al.* (2000) con ligeras modificaciones. Esta metodología se basa en la simulación de las condiciones químico-enzimáticas del tracto gastrointestinal, con la finalidad de estudiar la liberación de los componentes que se encuentran embebidos en la matriz vegetal en las etapas de la digestión. Por lo cual, el proceso se llevó de manera continua y fue dividido en tres etapas. La primera etapa salival: con la finalidad de simular la masticación, 3 g de muestra fueron molidos y se pusieron en contacto con 100 µL de saliva humana durante 1 min. La saliva de 30 donantes fue recolectada en condiciones de ayuno. Para la etapa gástrica, se añadieron 10 mL de buffer HCL-KCl con el fin de alcanzar el pH fisiológico (1.5). En esta etapa, se añadió 0.2 mL de pepsina (300 mg/mL) para garantizar la hidrólisis de las proteínas contenidas en el alimento. La reacción se llevó a cabo durante 1 h

a 40 °C. Posteriormente, fue necesario enfriar la solución de reacción, y añadir 4.5 mL de buffer fosfato (pH 7.5) para interrumpir la reacción. Por último, en la etapa intestinal, fue agregado 1 mL de pancreatina (5 mg/mL) con el fin de catalizar la hidrólisis lipídica. En cada una de las etapas se tomaron alícuotas antes y después de completarse la reacción, y fueron utilizadas para evaluar el contenido de fenoles totales, ácidos grasos libres y capacidad antioxidante durante distintos tiempos del proceso gastrointestinal, con las técnicas descritas anteriormente. Los resultados fueron expresados como % liberado.

Ensayo de Absorción por Difusión Pasiva

Debido a que el contenido total de compuestos bioactivos del fruto no garantiza el conocimiento de los rangos de absorción de los mismos, en este estudio se ha optado por la utilización de un proceso de diálisis para simular la absorción pasiva. En este contexto, el contenido dializable corresponde a todos los compuestos que pasan a través del lumen intestinal hacia circulación sistémica para dirigirse a un sitio diana en el cual pueden ejercer su efecto benéfico. Por otro lado, el contenido no dializable serán aquellos compuestos que pueden llegar a colon para ejercer su acción biológica. Para ello, se utilizaron bolsas de diálisis con un tamaño de poro de 14-15 kDa, con una longitud aproximada de 15.5 cm. Estos se enjuagaron con buffer de fosfatos 1 M para facilitar su manejo, y cada extremo fue sellado con clips. Las bolsas fueron llenadas con los sobrenadantes obtenidos en la última fase del modelo de digestión gastrointestinal. Las bolsas se sumergieron en buffer de fosfatos 1 M manteniéndolas en agitación a 37°C con el fin de simular la absorción pasiva de compuestos. Se tomaron, alícuotas del contenido dializable y no dializable durante diferentes tiempos del proceso el cual tuvo una duración de 3 horas. Para la evaluación de los tratamientos lipofílicos se adicionarán sales biliares según lo reportado por Ortega *et al.* (2011) para muestras ricas en aceite. Una vez completado el proceso el contenido no dializable se combinó con su precipitado.

Se realizarán extractos hidrofílicos y lipofílicos para el análisis de fenoles totales, ácidos grasos libres, capacidad antioxidante y actividad antiproliferativa.

Líneas Celulares y Actividad Antiproliferativa (AAP)

El efecto de los extractos dializables sobre la viabilidad de la línea celular “HeLa” (Rockville, MD, EUA) se determinó por el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Hansen et al., 1989). Se sembraron 1×10^4 células (50 μL) en cada uno de los pocillos de una micro placa de 96 pocillos (Costar) en condición estéril. Se incubaron 24 horas para su adaptación y adherencia a placas a 37 °C con 5 % de CO_2 . Posteriormente, las células se incubaron durante 72 horas en presencia de 50 μL de diversas concentraciones de los extractos lipofílicos e hidrofílicos crudos (EH y EL) e lipofílicos e hidrofílicos dializados (HD y LD) (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dímtil-sulfóxido (DMSO)). Valencia *et al.* (2012) reportaron que el DMSO a concentraciones de 0.06-2.0 % no causa daño celular en condiciones experimentales semejantes a este estudio. Después de la incubación, 10 μL de MTT (5mg/mL) se añadieron a cada pocillo y las células se incubaron a 37 °C durante 4 h. A continuación, se añadieron 100 μL de alcohol isopropílico ácido a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. Las placas se leyeron inmediatamente en forma dual a 570 nm y 630 nm en un lector de microplacas (Multiskan, Ex, ThermoLabSystem). La actividad anti proliferativa de los extractos se reportó como valores de IC_{50} (concentración de extracto requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%).

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4. Los factores fueron los extractos lipofílicos e hidrofílicos, y las etapas de la digestión (etapa salival, gástrica e intestinal y absorción por difusión pasiva). Las variables de respuesta fueron el contenido de fenoles totales, ácidos grasos libres y capacidad antioxidante. Se realizó un análisis de varianza GLM al 95 % de confianza. En caso de encontrar significancia estadística se procedió a la realización de una comparación de medias con una prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$) en el programa NCSS versión 2012. Para el análisis de actividad antiproliferativa se realizó un análisis de varianza de una vía al 95 % de confianza y se reportó la IC₅₀ de cada uno de los extractos. Todas las determinaciones fueron evaluadas por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Físicoquímicos

En cuanto a los parámetros físico-químicos, en nuestro estudio se observaron los siguientes valores: firmeza 12.06 N; L* 25; °Hue 67; Croma 8.48; aceite 12.83 % y materia seca 34.0 %. Resultados similares fueron descritos para el estado de madurez 3 en un estudio desarrollado por Villa-Rodríguez *et al.* (2011) los cuales fueron: Firmeza 19,92 N; L* 26,29; °Hue 90.62; Croma 8.79; aceite 19.89 % y materia seca 36.52 %. Es importante señalar que la etapa de madurez del fruto durante la cosecha es el factor más importante que afecta su calidad. Dado que, el aguacate es un fruto climatérico, el cual madura después de su cosecha experimentando un aumento rápido en la tasa de respiración y de etileno (pico climatérico) (Chanderbali *et al.*, 2008). Durante este proceso se presentan diversos cambios fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la biosíntesis y acumulación de pigmentos, lípidos vitaminas y antioxidantes, entre otros (Goulao y Oliveira, 2008).

Por ejemplo, se han reportado cambios en la calidad de la fruta como materia seca, color, firmeza y ácidos grasos. Mientras, la variación en los CF ha sido relacionada con diferentes cultivares y estado de madurez (Wang *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Villa-Rodríguez *et al.*, (2011) se monitoreó el perfil de ácidos grasos y compuestos fenólicos (CF) a los 0, 4, 8 y 12 días post-cosecha del fruto de aguacate, correspondientes a los estados de madurez M1, M2, M3 y M4, respectivamente. Se mostró un aumento en el contenido de aceite y CF en función a su estado de madurez no mostrando diferencias significativas entre M3 y M4. Por esta razón, en este estudio la materia prima

fue seleccionada con base en los parámetros fisicoquímicos descritos para M3 por Villa-Rodríguez *et al.*, (2011).

Liberación y Absorción por Difusión Pasiva de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos

La **Figura 3** muestra el contenido de fenoles totales determinados en la pulpa de aguacate. En dicha determinación se considera la obtención de los compuestos fenólicos extraíbles y los no extraíbles (taninos hidrolizables y condensados). El contenido de fenoles totales fue de 153.58 mg EAG/100 g superior a lo reportado por Villa-Rodríguez *et al.* (2011), quienes encontraron un valor de 31.80 mg EAG/g. Sin embargo, en un estudio desarrollado por Wang *et al.* (2010) se reportó un valor inferior correspondiente a 49.00 mg EAG/g. Estas diferencias se pueden atribuir a que en ambos estudios solo cuantificaron como fenoles totales a aquellos correspondientes a los compuestos fenólicos extraíbles, sin tomar en cuenta a los compuestos fenólicos no extraíbles. Cabe mencionar que en este trabajo sólo se utilizó la pulpa del fruto, y de acuerdo a los resultados encontrados no se detectó la presencia de taninos condensados (TC). Esto concuerda con lo reportado por King y Young (1999), quienes reportaron que los taninos condensados se encuentran principalmente en cáscara y en muy bajas concentraciones en su pulpa. Así mismo, estas diferencias en los valores encontrados en el presente estudio y lo reportado en la bibliografía, puede deberse a diferencias como la variedad y/o región de cultivo, así como los métodos de extracción utilizados (González-Aguilar *et al.* 2010).

Por otra parte, se han presentado comportamientos similares para otros frutos en donde se ha cuantificado el contenido de fenoles totales (extraíbles y no extraíbles). En mango, papaya y piña, se han obtenido valores de 274.0 mg EAG/100 g, 212.0 mg EAG/100 g y 139.0 mg EAG/100 g, respectivamente (Velderráin-Rodríguez *et al.*, 2013). En dicho estudio, los autores reportaron que

los niveles de taninos hidrolizados representaron aproximadamente la mitad del contenido de fenoles totales para los frutos antes mencionados. Tales resultados fueron similares a los observados en nuestro estudio con pulpa de aguacate. Sin embargo, no se detectó la presencia de taninos condensados. Lo anterior, se fundamenta en que los taninos condensados se desarrollan en la vacuola celular en respuesta a estrés biótico o abiótico, formando uniones covalentes y no covalentes en la matriz vegetal del fruto. Dada la poca cantidad de proteína encontrada en la pulpa de aguacate, es de esperarse bajos o nulos niveles de TC. Por otro lado se ha reportado en pulpa de otros frutos, la presencia de taninos hidrolizables, como en el caso del fruto de assaí, en el que se reportan valores de 227 mg/100 g por lo que este fruto es considerado como una fuente importante de taninos hidrolizables (Rufino *et al.*, 2011a). Además, los valores reportados para pulpa de assaí son superiores a los encontrados otras frutas como durazno (52.80 mg/100 gpf) y manzana (80.30 µg/100 g) (Arranz *et al.*, 2009).

No obstante, pocos trabajos se han enfocado en la cuantificación de taninos hidrolizables en pulpa de frutos tropicales. Sin embargo, diversos trabajos se han enfocado en la caracterización de la cáscara de frutos como granada (Saad *et al.*, 2012; Seeram *et al.*, 2005). De igual forma, Seeram *et al.* (2005) estudiaron el contenido de CF en cáscara de diferentes variedades de granada, encontrando valores de taninos hidrolizables que varían entre 470-504 mg EAG/g. Así mismo, se ha realizado la identificación de estos en cáscara y pulpa de mango (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2013), plátano (Uclés Santos *et al.*, 2010) y uva (Vivas *et al.*, 2004).

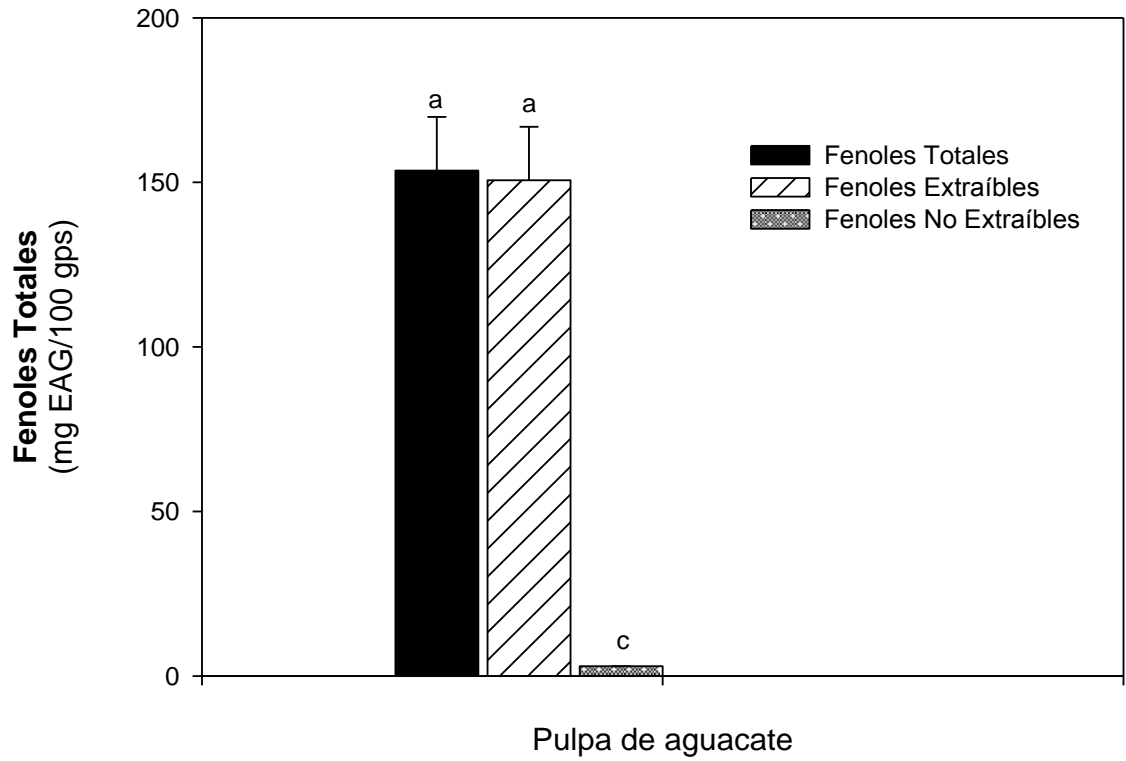


Figura 3. Contenido de fenoles totales en pulpa de aguacate cv 'Hass'. Los datos son la media de al menos tres determinaciones ($n=3$) \pm la desviación estándar. Los valores se expresaron como μg equivalentes de ácido gálico/100g peso seco.

En cuanto al contenido de ácidos grasos libres (AGL) en pulpa de aguacate se encontró un valor de $8.23 \pm 0.71 \mu\text{mol/mL}$. Por lo general, en los alimentos existen bajos niveles de AGL dado que estos son generados en su mayoría por acción lipolítica de enzimas que influyen en la rancidez (Antonelli M.L. *et al.*, 2002). Además, diversos estudios han enfatizado que su ingesta contribuye a la reducción de la señalización de insulina (Corpeleijn *et al.*, 2009) y a una mayor producción de triacilglicerolos (TAG) y AGL en tejidos no adiposos, como el músculo esquelético, la reducción de la capacidad oxidativa mitocondrial muscular y el aumento de la acumulación de lípidos intramusculares (Schrauwen, 2007).

En otros estudios han identificado y cuantificado a los ácidos grasos predominantes en la matriz del fruto de aguacate. Villa-Rodríguez *et al.* (2011) reportaron que el ácido graso predominante es el oleico (18:1) representando el 70 % del total de ácidos grasos, seguido de palmítico (16), linoleico (18:2), palmitoleico (16:1), y α -linolénico (18:3) con un 13.5, 12.6, 3.26 y 1% respectivamente. Además, los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados representaron el 9, 76 y 15 %, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores en aguacate cv 'Hass' (Landahl *et al.*, 2009; Ozdemir y Topuz, 2004; Plaza *et al.*, 2009). Lo anterior, sugiere que el aceite y fruto de aguacate son apropiados para el consumo humano dado a los bajos contenidos de ácidos grasos saturados. Además, este puede ser una excelente alternativa para el diseño de dietas lipídicas desarrolladas para la reducción de enfermedades cardiovasculares.

Los resultados de bioaccesibilidad de CF encontrados en el presente trabajo se muestran en la **Figura 4**. En la etapa salival se puede apreciar una liberación del 1.94 % de los CF de la muestra de aguacate agregada al sistema de simulación. Lo anterior se debe principalmente a la poca concentración de enzimas salivales y al corto tiempo de acción de las mismas (aquí el proceso de masticación se lleva a cabo en segundos). Pese a ello, estudios realizados por Ginsburg *et al.* (2013) indican que las enzimas digestivas, la microbiota presente

en la saliva y la masticación, tienen un papel importante en la liberación de CF y otros compuestos antioxidantes. De igual manera, en la etapa gástrica se liberó un 74.8 % de los CF, lo cual puede ser explicado por condiciones ácidas de pH que ayudan a debilitar enlaces entre carbohidratos simples y activar a la enzima pepsina. Esta última responsable de la hidrólisis de las proteínas presentes en el fruto. En esta etapa se observó una mayor liberación de los CF presentes en el fruto, lo cual podría deberse a que las enzimas digestivas propiciaron una disminución en la superficie de contacto y exposición de los CF al medio de simulación. Por otro lado, en la etapa intestinal se observó una menor liberación de 51.4 % de CF comparado con lo observado con la etapa gástrica.

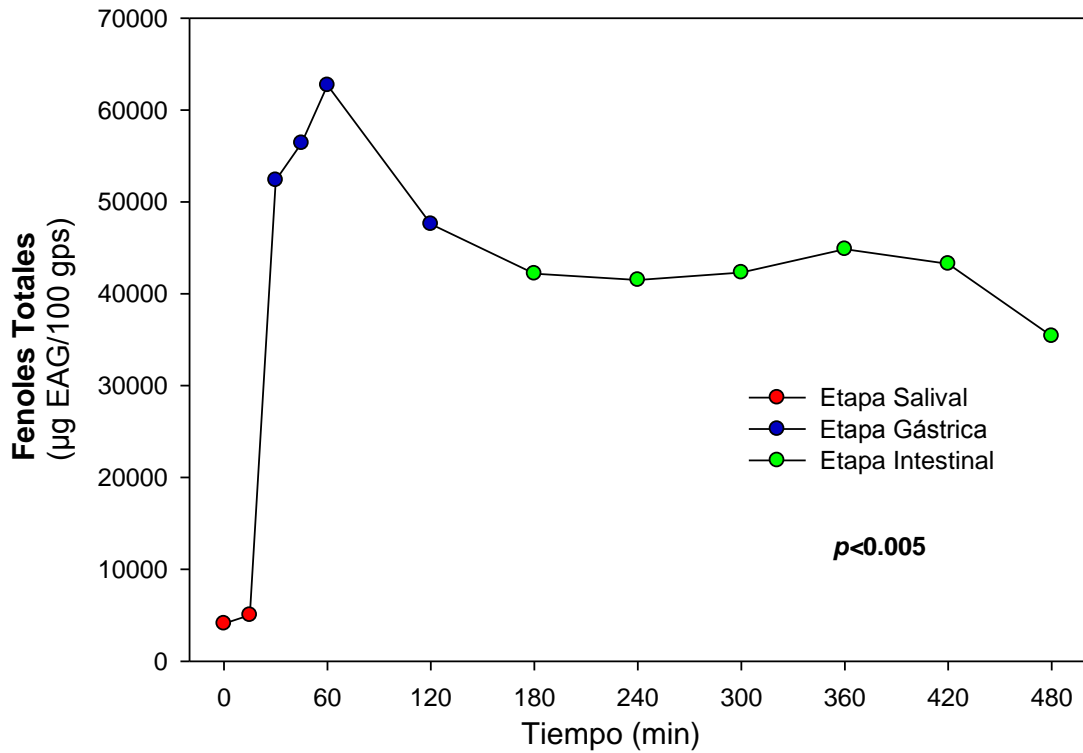


Figura 4. Liberación de compuestos hidrofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión *in vitro*. Los datos son la media de al menos 3 determinaciones ($n=3$) \pm la desviación estándar. Los valores se expresaron como μg Equivalentes de ácido gálico/100g peso seco.

Estos resultados sugieren que los CF de aguacate pueden estar sufriendo diversas transformaciones estructurales debido a las condiciones del TGI. Estudios previos han atribuido a las condiciones fisiológicas del estómago (pH 1-3) un aumento en la liberación y estabilidad de los CF (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). Así mismo, ha sido descrito que a $\text{pH} \geq 4$, la estabilidad de los CF disminuye, lo que propicia transformaciones estructurales menos estables (Nielsen *et al.*, 2003). Concordante con lo descrito en un estudio realizado por Correa-Betanzo *et al.* (2014) que tras someter a los CF a digestión *in vitro* observaron disminución en la liberación de CF en la etapa intestinal debida a sus condiciones de básicas ($\text{pH} \geq 7$).

Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Velderraín-Rodríguez (2014) quienes evaluaron la liberación de CF en los frutos de piña, papaya y mango obteniendo rangos superiores al 50% en la etapa gástrica. Del mismo modo, estudios previos elaborados por Bouayed *et al.* (2011a) en diferentes variedades de manzana reportan el mismo comportamiento. Adicionalmente, en un estudio realizado en bayas de aronia (Black Chokeberry) por Nielsen *et al.* (2003) se monitoreó la liberación de CF como antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles y derivados del ácido cafeíco, tras ser sujeto a un modelo de digestión *in vitro*. Contrastante a nuestros resultados, ambos estudios afirman que existe un ligero incremento en la liberación de CF en la etapa intestinal menor al 10%. Estas diferencias, pueden ser explicadas por la naturaleza oleaginoso del fruto, en estudios previos se ha sugerido una relación entre la bioaccesibilidad de los CF y la composición de la matriz alimentaria. Por ejemplo, estudios recientes muestran fuertes variaciones en la bioaccesibilidad de carotenoides según la matriz alimentaria como, en el caso de brócoli, espinaca y acelgas (Van Het Hof *et al.*, 2000; Reboul *et al.*, 2006).

Por otro lado, los porcentajes de liberación de CF fueron inferiores a los encontrados para fenoles totales del fruto (153.58 mg EAG/gps) lo cual, puede deberse a la interacción de fenoles no extraíbles con las enzimas del TGI. Reportes indican que la presencia de taninos hidrolizables inhibe enzimas

gastrointestinales en particular, las encargadas de la asimilación de carbohidratos como, aminoglucosidas/maltasa, sucrasa y α -amilasa (Carmona *et al.*, 1996). En un estudio realizado por Tong *et al.* (2014) se introdujeron taninos hidrolizables en concentraciones que van de 0.6 $\mu\text{g/mL}$ a 1.25 $\mu\text{g/mL}$ de manera individual a un sistema de digestión *in vitro* adecuado para carbohidratos amiláceos. Se mostró una inhibición dosis-dependiente de la enzima α -amilasa para todas las concentraciones probadas de hasta 40% de su actividad inicial. Sin embargo, dichos valores pueden variar con respecto a los componentes de la matriz vegetal, contenido proteico y la unión de fenoles no extraíbles a proteínas. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han informado que los taninos pueden formar complejos con enzimas digestivas de almidón y unirse por enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, atracción electrostática y unión covalente, para formar complejos menos digeribles (Chung *et al.*, 1998). Lo anterior, indica que los fenoles no extraíbles presentes en el fruto de aguacate pueden inhibir la enzima α -amilasa, la cual, se encuentra presente en la saliva y en el complejo pancreático correspondiente a la etapa intestinal. Cabe señalar que en dichas etapas se mostraron porcentajes de liberación inferiores con respecto a la etapa gástrica.

Así mismo, de acuerdo con la investigación realizada por McDougall *et al.* (2005), tras el consumo de frambuesas con otros alimentos como pan, cereales, helados o carne cocida el porcentaje de CF liberados disminuyó; no obstante, la liberación de antocianinas no se vio afectada. Lo anterior sugiere que la composición de la matriz del alimento en el que se encuentran los CF ha demostrado ser un factor en su estabilidad y liberación. Estas observaciones pueden ser de importancia nutricional debido a que su bioaccesibilidad y consecuente biodisponibilidad, podrían modificarse con otros nutrientes de la dieta, como las proteínas, fibra dietaria, contenido lipídico, carbohidratos, minerales y otros, presentes en la matriz alimentaria (Porrini y Riso, 2008). Sin embargo, se necesitan más estudios que ayuden a esclarecer los mecanismos de interacción de CF-matriz vegetal y su digestibilidad a nivel fisiológico.

La **Figura 4** muestra los cambios en absorción pasiva de los CF con el paso del tiempo en un modelo de diálisis. La tasa de absorción aumentó hasta alcanzar un pico, al minuto 180 después de dializado con un 5.14 % de CF; posteriormente, se observó una ligera disminución. Estos valores son similares a lo reportado por Gonthier *et al.* (2003) y Wu *et al.* (2002) en bayas con valores menores a 1% de antocianinas y Borges *et al.* (2013) y Takumi *et al.* (2012) en frutas cítricas con valores de 3-9%. Lo anterior se puede explicar por la baja solubilidad acuosa, peso molecular de los CF del fruto y estabilidad gastrointestinal de acuerdo a Li *et al.* (2013). Por ejemplo, compuestos de alto peso molecular como las proantocianidinas no son solubles en agua, lo cual, conduce a una absorción baja (Ou *et al.*, 2012).

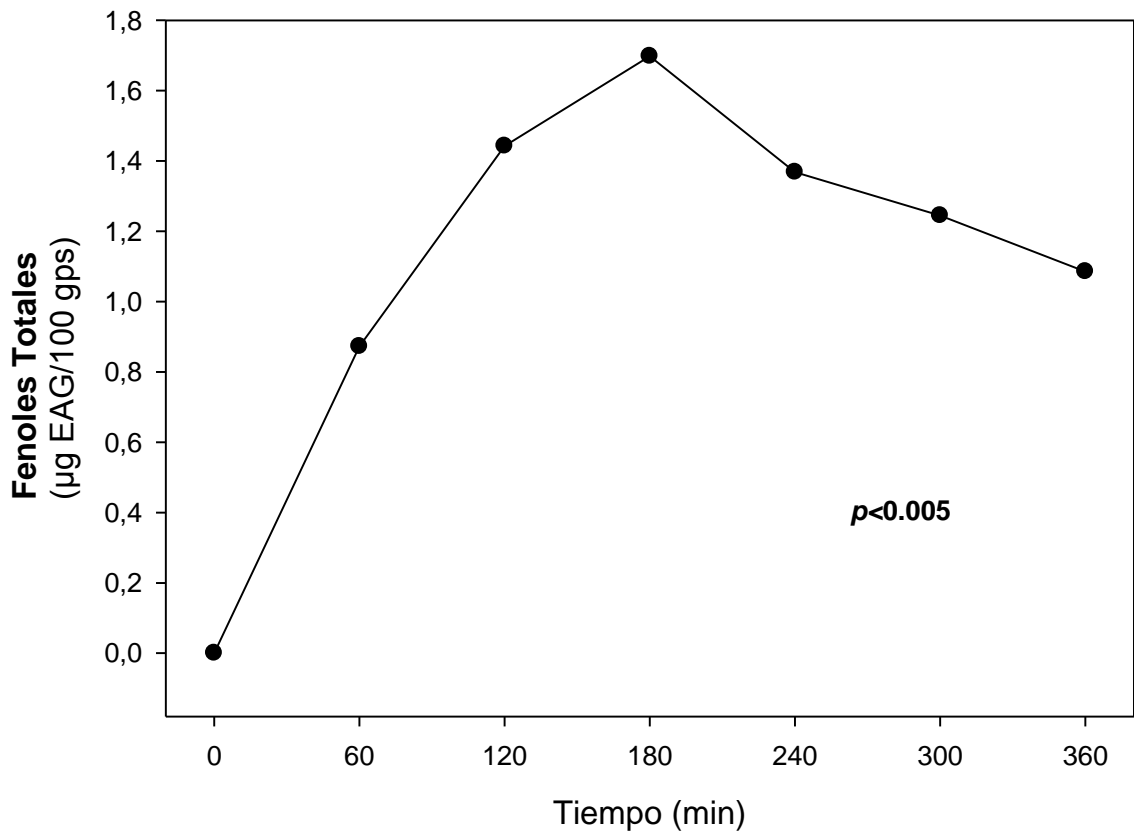


Figura 5. Absorción por difusión pasiva de los compuestos fenólicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión *in vitro*. Los datos son la media de al menos 3 determinaciones ($n=3$) \pm la desviación estándar. Los valores se expresaron como μg Equivalentes de ácido gálico/100g peso seco.

Por otro lado, las interacciones entre CF y otros constituyentes de la matriz vegetal pueden favorecer la formación de complejos de baja solubilidad o alto peso molecular que pueden no ser absorbibles por difusión pasiva (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). De igual manera, estudios indican que los CF de alto peso molecular poseen baja capacidad para atravesar hacia el lumen del intestino delgado (Scalbert y Williamson, 2000). En un estudio realizado por (Saura-Calixto y Díaz-Rubio, 2007) se observó que la solubilidad de los CF y otros constituyentes de la matriz vegetal como fibra, hierro y lípidos pueden favorecer la formación de complejos de baja solubilidad o alto peso molecular lo cual, impide el cruce a través de la membrana de diálisis, reduciendo el contenido de CF biodisponibles. Además, Argyri *et al.* (2005) identificaron en vino tinto, ácidos fenólicos como hidroxibenzoico, rutina y catequina, los cuales, no fueron detectados en la fracción dializada tras ser sometidos a una digestión *in vitro*. Por lo anterior, la baja absorción de CF obtenida en nuestro estudio para el fruto de aguacate puede ser atribuida a la baja solubilidad, estabilidad, y metabolismo en el TGI de los CF. En este sentido, es posible que los CF estén siendo atrapados por los lípidos en emulsión tras la formación de micelas mixtas en la última etapa digestiva, limitando su biodisponibilidad. Sin embargo, estudios consistentes indican que los compuestos bioactivos no absorbidos son transportados hasta colón en donde pueden propiciar un ambiente antioxidante y actuar como inmunomodulador de la microbiota intestinal (Jayaprakasha *et al.*, 2009; Laparra y Sanz, 2010).

En la **Figura 6** se pueden apreciar los cambios en la liberación de los ácidos grasos de pulpa de aguacate en el modelo de digestión *in vitro*. Nuestros resultados muestran un aumento en la tasa de liberación de ácidos grasos con respecto a las etapas de digestión. La tasa de liberación de ácidos grasos fue superior en la etapa intestinal en una proporción 1:16 en comparación a la pulpa. Esto concuerda con lo reportado por Mandalari *et al.* (2008) para almendras, en donde se observó una liberación secuencial con valores superiores en la etapa intestinal (0.05 μmol en 60 min) a lo largo del TGI durante una digestión *in vitro*. Estos resultados muestran que los compuestos lipofílicos se liberan con mayor

eficiencia de la pulpa de aguacate en comparación a los compuestos hidrofílicos dado que, la tasa de liberación de ácidos grasos es un indicador de bioaccesibilidad de compuestos lipofílicos (Li *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios afirman que la digestión de compuestos lipofílicos comienza en el estómago por acción de la lipasa gástrica (5-30% de hidrólisis triacil-gliceroles (TAG)) y continúa en el duodeno con la acción sinérgica de sales biliares y secreciones pancreáticas (30-75% de hidrólisis TAG) (Phan y Tso, 2001).

El efecto de la liberación secuencial de ácidos grasos puede ser explicado por la alta estabilidad de los compuestos lipofílicos bajo condiciones neutras (etapa salival) y ácidas (etapa gástrica) lo cual, limita su liberación. Estudios previos reportan que lípidos en emulsión cargados con surfactantes no iónicos son relativamente estables a la exposición de las condiciones de los fluidos orales y gástricos simuladas (Golding y Wooster, 2010). Por otro lado, en la etapa intestinal ocurre un aumento en el tamaño de partícula por acción de la enzimas lipasa lo que provoca cambios estructurales, interfaciales y pérdida de estabilidad ocasionado una mayor liberación (Rao y McClements, 2011).

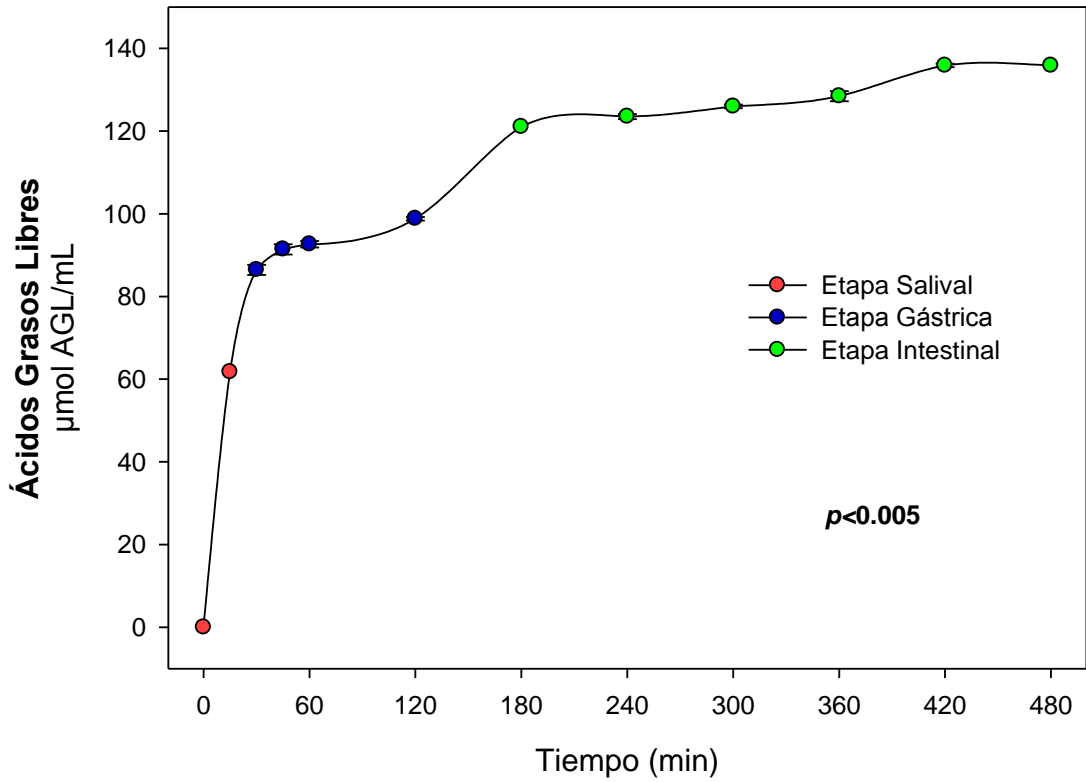


Figura 6. Liberación de los compuestos lipofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión *in vitro*. Los datos son la media de al menos 3 determinaciones ($n=3$) \pm la desviación estándar. Los valores se expresaron como $\mu\text{mol/mL}$.

En la **Figura 7** se muestran los parámetros de absorción pasiva de los compuestos lipofílicos en pulpa de aguacate durante un modelo de digestión *in vitro*. La biodisponibilidad de compuestos lipofílicos (52.91%) fue superior a la de los CF. La liberación de compuestos lipofílicos pudo ser favorecida por el pH de la etapa intestinal. Estudios indican que la enzima lipasa pancreática puede activarse a pH neutro, y presencia de sales biliares (Wilde y Chu, 2011). Por otro lado, la actividad de lipasas implica una etapa previa de absorción. Por ello, el tamaño de la interfaz puede ser influenciada por el anclaje de las lipasas a los TAG dado que desempeñan un papel importante en la digestibilidad de compuestos lipofílicos (Golding y Wooster, 2010; Mun *et al.*, 2007). Estudios *in vitro* reportan que algunas características fisicoquímicas de las gotas de grasa como 1. tamaño, 2. estructura molecular 3. organización de superficie y la composición, controlan el proceso de la digestión gastrointestinal de los lípidos de la dieta (Brockman, 2000).

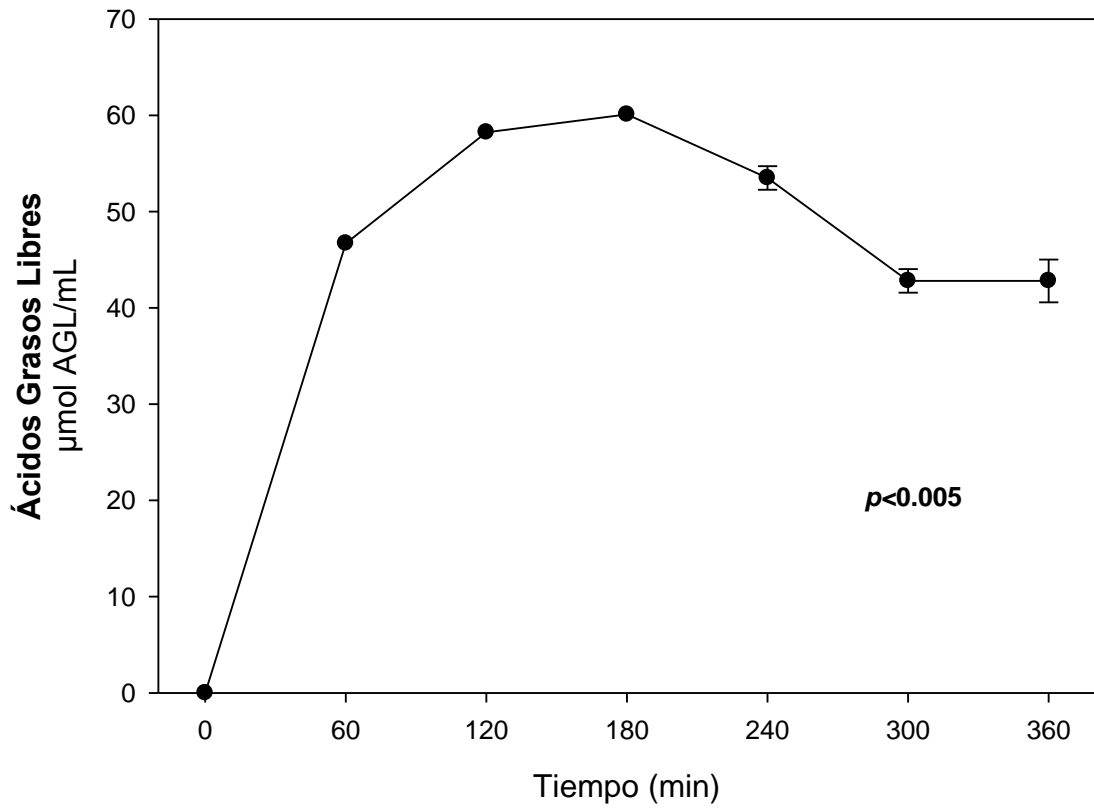


Figura 7. Absorción por difusión pasiva de compuestos lipofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión *in vitro*. Los datos son la media de al menos 3 determinaciones ($n=3$) \pm la desviación estándar. Los valores se expresaron como $\mu\text{mol AGL/mL}$.

En un estudio realizado por Zhu *et al.* (2013) se revela que los ácidos grasos saturados (C16:0 y C18:0) se liberaron más rápido que los insaturados (C18:1n9, C18:2n6 y C18:3n3) en una emulsión de soya. Así mismo, se observó una mayor liberación de ácidos de cadena corta en comparación a los de cadena larga en leche y una liberación más lenta en ácidos poliinsaturados como los ácidos eicosapentanoico y docosahexaenoico en aceite de pescado. Los resultados confirman que el comportamiento de liberación de ácidos grasos durante la digestión se relaciona no sólo con la posición de los ácidos grasos en los TAG en emulsiones/micelas mixtas, sino también a la longitud de la cadena carbonada del ácido graso. En este sentido, podemos suponer que ácidos grasos con actividad biológica como el esteárico, palmitoleico, α -linoleico y linolénico fueron los más susceptibles a hidrólisis por la enzima lipasa y son los posibles candidatos a absorberse por difusión pasiva.

Capacidad Antioxidante de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos Liberados y Absorbibles por Difusión Pasiva Durante las Etapas del Modelo de Digestión *in vitro*.

Actualmente, existen muchos métodos para evaluar capacidad antioxidante de compuestos fenólicos, los cuales están basados en distintos sistemas generadores de radicales libres. Esto ha provocado dificultad para interpretar y comparar los datos obtenidos. Por ello, se recomienda el uso de diferentes técnicas con el fin de obtener resultados más representativos, reproducibles y confiables (a Sancho y Yahia, 2010). La actividad antioxidante de diferentes frutos ha sido reportada ampliamente por los métodos de TEAC, DPPH y ORAC. Los métodos de TEAC y DPPH son métodos que comúnmente se utilizan como confirmación dado que pueden efectuar su mecanismo antioxidante por transferencia de átomos de hidrogeno (TAH) o por transferencia de electrones (TE). Por otro lado, el método de ORAC tiene la ventaja de ser más específico empleando el mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno (TAH) (Prior *et al.*, 2005).

En general, la actividad antioxidante evaluada por el método de TEAC y ORAC mostró un comportamiento similar. Sin embargo, diferencias significativas con respecto a los valores de capacidad antioxidante fueron observadas para los extractos hidrofílicos y lipofílicos ($p \leq 0.05$) (**Figura 8**). De igual manera, se ha observado que algunos polifenoles (como flavonoles, antocianidinas, proantocianidinas y elagitaninos) pueden inhibir la actividad de proteasa y de la enzima pancreatina afectando la digestión de enzimas y lípidos (McDougall *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan por lo reportado por Slavin *et al.* (2009) en extractos de soya, en donde los extractos hidrofílicos obtuvieron menos capacidad antioxidante en comparación con los de naturaleza lipofílica por los métodos ORAC, DPPH y HOSC (Hydroxyl radical scavenging capacity). Sin embargo, en un estudio en donde se evaluaron extractos de quince se mostró una mayor actividad antioxidante por el método de DPPH para los extractos hidrofílicos (Pacífico *et al.*, 2014). No obstante, es importante tomar en cuenta la

estructura de los compuestos fitoquímicos y su mecanismo antioxidante para la elección del método y la evaluación de su capacidad antioxidante. En general, los compuestos lipofílicos ejercen su mecanismo antioxidante tras la formación de un radical de oxígeno singulete (electrofílo) que puede unirse directamente al doble enlace de la cadena carbonada dando lugar a la formación de radicales peróxilo (Laguerre *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Lucas-Abellán *et al.* (2011) se evaluó la robustez y precisión de los métodos de DPPH, TEAC y ORAC. Se encontró que ORAC es el mejor método para la evaluación de compuestos lipofílicos dada su sensibilidad a AAPH.

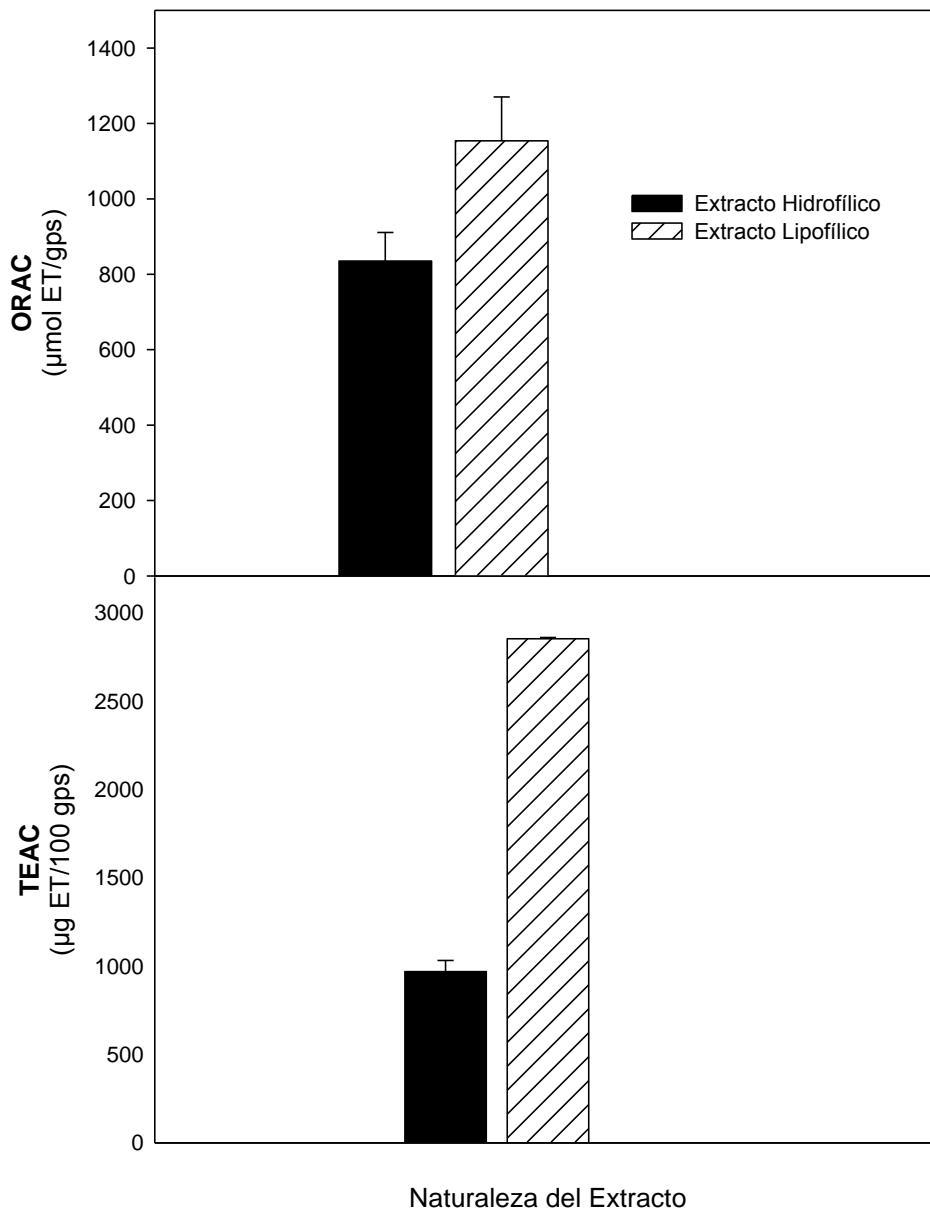


Figura 8. Capacidad antioxidante de extractos lipofílicos e Hidrofílicos de pulpa de aguacate cv. 'Hass' evaluada por los métodos de ORAC (a) y TEAC (b). Los valores se expresaron como µg Equivalentes trolox/100g peso seco.

Por otro lado, la liberación de los compuestos fenólicos influencia en gran medida el ambiente antioxidante propiciado por los compuestos fitoquímicos en el TGI, promoviendo una buena salud intestinal (Masibo y He, 2008). Sin embargo, no solo la liberación de los compuestos fenólicos embebidos en la matriz alimentaria es importante, sino el potencial para actuar como moléculas antioxidantes (Velderráin-Rodríguez *et al.*, 2013). En la **Figura 9** se muestran los cambios en la capacidad antioxidante ejercida por los compuestos hidrofílicos y lipofílicos de pulpa de aguacate en un modelo de digestión *in vitro*. Se observó un aumento considerable en la CAOX de los compuestos hidrofílicos y lipofílicos en función a las etapas del modelo, contrastante a lo observado en la liberación de CF. Valores superiores se mostraron en todas las etapas para los compuestos lipofílicos, concordante con la CAOX del extracto crudo y su bioaccesibilidad. Estos resultados concuerdan con lo observado por Pérez-Vicente *et al.* (2002) quienes afirman que la pérdida de CF durante condiciones gástricas afecta su capacidad antioxidante. Además, estos resultados podrían ser relacionados con la bioaccesibilidad de los CF. Por otro lado, el aumento en la capacidad antioxidante en la etapa intestinal podría ser debida a la transformación de los CF (McDougall *et al.*, 2005). Estos resultados están altamente relacionados con lo descrito por Fazzari *et al.* (2008) en el que se reportó un aumento de 123% en el contenido de fenoles totales en extractos de cereza durante la digestión gástrica. Sin embargo, no se observó ningún cambio importante para la capacidad antioxidante.

La **Figura 10** muestra los valores de CAOX de los compuestos hidrofílicos y lipofílicos absorbibles mediante un modelo de difusión pasiva. Encontrando bajos valores en la CAOX evaluada por los métodos de TEAC y ORAC en ambos extractos con ligeras diferencias para el extracto lipofílico. Así mismo, la biodisponibilidad de los compuestos se encuentra dada en función a su bioaccesibilidad. Desde un punto de vista práctico, todos los componentes de la matriz vegetal que fueron liberados y posteriormente absorbidos en el intestino delgado pueden ser transportados al torrente sanguíneo para ejercer su actividad biológica (Porrini y Riso, 2008). En este sentido, cabe mencionar que estudios

han correlacionado la disminución de enfermedades crónico-degenerativas con el consumo de frutas tropicales ricas en moléculas antioxidantes (Yahia *et al.*, 2011).

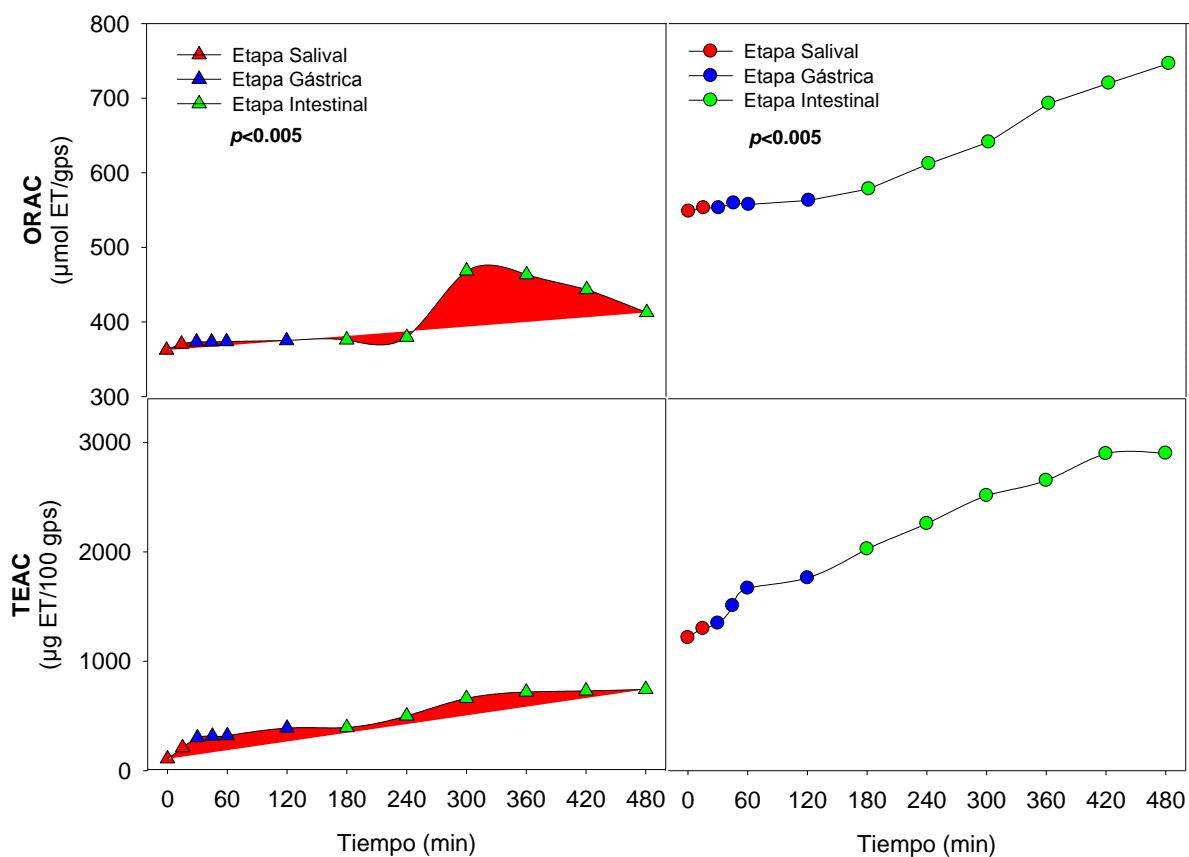


Figura 9. Cambios en la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos (▲) y lipofílicos (●) liberados de aguacate cv. 'Hass' en un modelo de digestión *in vitro* evaluada por los métodos de ORAC y TEAC. Los valores se expresaron como μg Equivalentes equivalentes trolox/100g peso seco

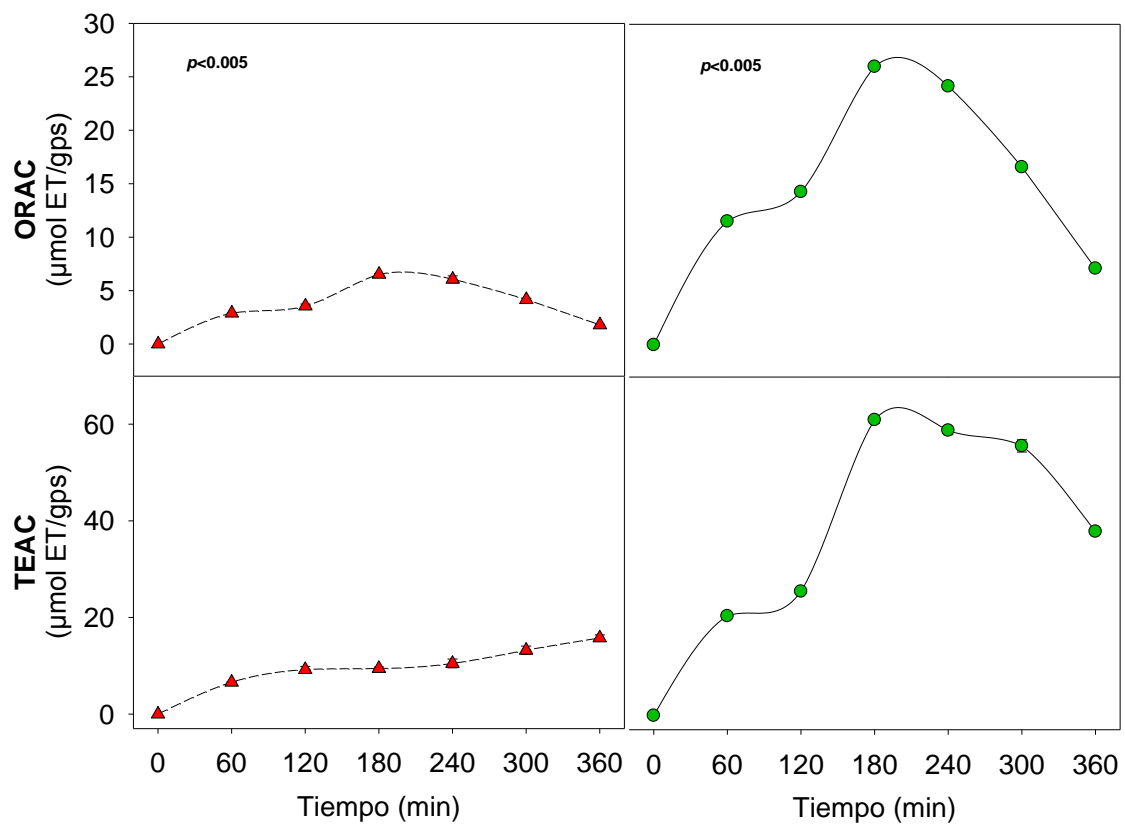


Figura 10. Cambios en la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos (▲) y lipofílicos (●) de aguacate cv. 'Hass' (*Persea americana*) absorbibles por difusión pasiva evaluados por los métodos de ORAC y TEAC.

Actividad Antiproliferativa de los Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos
Absorbibles por Difusión Pasiva de Aguacate cv. 'Hass'.

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos lipofílicos e hidrofílicos biodisponibles de aguacate cv. 'Hass', los cuales fueron comparados con los extractos crudos de pulpa de aguacate. Ambos extractos mostraron un efecto dosis dependiente. En comparación con su extracto crudo, los extractos dializables (HD) o biodisponibles mostraron una mayor proliferación celular con una concentración inhibitoria de la población celular del 50% (IC_{50}) de 12.5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, para extractos lipofílicos e hidrofílicos, respectivamente. Por otro lado, para los extractos lipofílicos dializables (LD) mostraron diferencias con respecto su extracto crudo con una IC_{50} de 6.25 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 2. Actividad antiproliferativa de extractos lipofílicos e hidrofílicos de pulpa de aguacate y provenientes de un modelo de digestión en la línea celular humana de cáncer cérvico-uterino “HeLa”.

Tipo de extracto	Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) µg/mL
Extracto crudo:	
Hidrofílico	6.25 a
Lipofílico	6.25 a
Extracto biodisponible:	
Hidrofílico	50 c
Lipofílico	12.5 b

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres determinaciones (n=3). Se asignaron letras diferentes a los valores de los promedios que presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Las diferencias entre los extractos dializables y el extracto crudo (EH) pueden ser atribuidas al efecto del proceso de digestión *in vitro*. Estudios realizados por Hagerman *et al.* (2012) reportan inestabilidad y degradación de algunos CF como epigallocatequina y taninos hidrolizables a pH superior a 7. Así mismo, Bermúdez-Soto *et al.* (2007) aseveran que la inestabilidad a condiciones alcalinas de los CF dietarios genera transformaciones estructurales y por consecuencia, diferente bioaccesibilidad, biodisponibilidad y actividad biológica. Por ello, dado que la etapa intestinal se llevó a cabo a un pH de 7.5, podemos suponer que compuestos de esta naturaleza fueron menos estables posterior a esta etapa ocasionando pérdidas en su bioactividad. Adicionalmente, estos resultados se relacionan con la CAOX mostrada por los extractos lipofílicos (crudo y dializado) con valores superiores en comparación con su contraparte hidrofílica.

En un estudio realizado por Wu *et al.* (2006) en pitahaya se determinó la actividad antiproliferativa en células "HeLa" de sus extractos, encontrando una relación dosis-dependiente al contenido de CF y correlación positiva con su capacidad antioxidante. Meyers *et al.* (2003) evaluaron la actividad antiproliferativa de extractos de fresa, afirmando que ésta no es debida a los CF. Lo anterior, sugiere que otras moléculas antioxidantes pueden estar actuando en la proliferación celular e incluso poseer mayor actividad como es el caso de los compuestos lipofílicos. En un estudio realizado por Wu *et al.* (2006) en las líneas celulares HepG2, A549, y HeLa se observó la disminución de la población celular debido al estímulo con extractos lipofílicos de quince. Adicionalmente, se mostró citotoxicidad a una concentración de 48.9 µg/mL, previniendo la formación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico y actividad atrapadora de radicales libres por el método de DPPH. Estos hallazgos, denotan que los compuestos fitoquímicos presentes en frutos pueden desempeñar un papel protector contra diversos procesos fisiológicos debido a su capacidad para actuar como moléculas antioxidantes.

Contrastante a lo encontrado, en el estudio realizado por Pacífico *et al.* (2014) en cereza dulce (*Prunus avium*L.), se encontró una IC₅₀ de 86.5 y 53.4 µg/mL para los extractos Pa-DR2b (hidrofílicos) y Pa-DM2b (lipofílicos) en células “HeLa”. Por otro lado, Krishna *et al.* (2011) probaron el efecto de naringenina (CF encontrado en diversas frutas tropicales) en células HeLa, reportando una IC₅₀ de 30 µg/mL. De acuerdo a lo mencionado, en nuestro estudio los extractos probados mostraron una mayor actividad alcanzando una IC₅₀ a concentraciones inferiores que las reportadas para otros estudios. Sin embargo, este hallazgo, puede ser asociado al patrón de los fitoquímicos contenidos en ambos extractos y a un posible efecto aditivo o sinérgico que potencia su actividad biológica como lo reportado para la mezcla de CF (apigenina, epigallocatequina, resveratrol y quercetina) proveniente de extractos de jamaica los cuales mostraron una mayor actividad adipogénica con respecto al CF aislado (Herranz-López *et al.*, 2012). Cabe señalar, que los estudios mencionados se realizaron a partir de extractos crudos del fruto y las condiciones del TGI pueden ejercer cambios en la actividad biológica de los compuestos fitoquímicos.

Por otro lado, el desarrollo de carcinoma cervical es provocado en primera instancia por la infección con el virus de papiloma humano (VPH), especialmente por la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 en el huésped (Pozzi *et al.*, 2009). Por ello, los resultados arrojados por nuestro estudio, sugieren que los compuestos contenidos en los extractos de aguacate podrían involucrarse en la regulación de la expresión de estas proteínas, previniendo la translocación de factores de transcripción como, NF-κβ y AP-1, restableciendo la expresión de proteínas supresoras de tumores como, p53 y Rb, induciendo efectivamente apoptosis e inhibiendo la movilidad celular (Divya y Pillai, 2006; Maher *et al.*, 2011). Por otro lado, reportes sugieren que los compuestos fitoquímicos modulan el sistema redox intracelular, lo cual puede contribuir a un efecto genoprotectivo. Este último ha sido relacionado directamente a su potencial como estabilizador de ROS, quelador de metales y regulador de genes de reparación de DNA (Maher *et al.*, 2011).

CONCLUSIÓN

Se concluye que los compuestos lipofílicos de aguacate cv. 'Hass', presentan una mayor liberación en las distintas etapas de la digestión *in vitro*, en comparación con los compuestos hidrofílicos, siendo en la etapa intestinal donde se liberó una mayor cantidad y se encontró mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, los compuestos lipofílicos presentaron una mayor absorción por difusión pasiva y actividad antiproliferativa en la línea celular humana "HeLa" que aquellos de naturaleza hidrofílica.

RECOMENDACIONES

Se sugiere la identificación de los compuestos fenólicos presentes en aguacate para así elucidar sus posibles transformaciones a lo largo del tracto gastrointestinal, con el fin de comprender mejor su proceso de liberación y absorción. Técnicas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a masas, ayudaría a reconocer las distintas especies de compuestos fenólicos que pueden estarse liberando en las diferentes etapas de digestión. Así mismo, el uso de técnicas como la de resonancia magnética nuclear (RMN) puede ayudar a seguir las posibles variaciones en estructura química de estos compuestos durante el proceso de digestión. Este tipo de estudios aportarían información sobre los cambios en las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos biodisponibles en las matrices alimentarias. Se sugiere el marcaje de CF para observar su motilidad hacia diferentes sitios celulares e indagar en su posible mecanismo molecular como antiproliferativo mediante el uso de microarreglos y expresión de pro-oncogenes y proteínas reguladoras del ciclo celular.

REFERENCIAS

- a Sancho, L. E. G.-G., y Yahia, E. M. (2010). Effect of maturity stage of papaya maradol on physiological and biochemical parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(2), 194.
- Alves-Brito, A., Meléndez, J., Asplund, M., Ramírez, I., y Yong, D. (2010). Chemical similarities between Galactic bulge and local thick disk red giants: O, Na, Mg, Al, Si, Ca, and Ti. *Astronomy and Astrophysics*, 513.
- Antonelli M.L., Curini R., Scricciolo D., y Vinci G. (2002). Determination of free fatty acids and lipase activity in milk: quality and storage markers. *Talanta*, 58(3), 561-568.
- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., y Vadhanam, M. V. (2013). Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Letters*, 334(1), 133-141. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.032>
- Assmann Gerd., Cullen Paul., Erbey John., Ramey Dena R., Kannenberg Frank., y Schulte Helmut. (2006). Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: Results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(1), 13-21.
- Bacchetti, T., Tullii, D., Masciangelo, S., Gesuita, R., Skrami, E., Brugè, F., et al. (2014). Effect of black and red cabbage on plasma carotenoid levels, lipid profile and oxidized low density lipoprotein. *Journal of Functional Foods*, 8(0), 128-137.
- Barreto, G. P. M., Benassi, M. T., y Mercadante, A. Z. (2009). Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of Brazilian Chemical Society, São Paulo*, 20(10), 1856-1861.
- Baur, J. A., y Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506.
- Bergeon, J. A., y Toth, I. (2007). Enhancement of oral drug absorption—Effect of lipid conjugation on the enzymatic stability and intestinal permeability of l-Glu-l-Trp-NH₂. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(22), 7048-7057. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.040>
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., y García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.
- Berton, A., Rouvellac, S., Robert, B., Rousseau, F., Lopez, C., y Crenon, I. (2012). Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their *in vitro* digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 123-134.
- Boersma, M. G., y van der Woude, H. (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chemical research*

- Boisen, S., y Eggum, B. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition research reviews*, 4(01), 141-162.
- Borges, G., Lean, M. E., Roberts, S. A., y Crozier, A. (2013). Bioavailability of dietary (poly) phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food & function*, 4(5), 754-762.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., y Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Brockman, H. (2000). Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid system. *Biochimie*, 82(11), 987-995.
- Brown, L., Boswell, S., Raj, L., y Lee, S. W. (2007). Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 17(1).
- Brufau, G., Canela, M. A., y Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28(4), 217-225. doi: 10.1016/j.nutres.2008.02.003
- Carmona, A., Borguud, L., Borges, G., y Levy-Benshimol, A. (1996). Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(8), 445-450.
- Corpeleijn, E., Saris, W., y Blaak, E. (2009). Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obesity reviews*, 10(2), 178-193.
- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., y Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165(0), 522-531.
- Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., y Genovese, M. I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. [Article]. *Food Science and Technology International*, 18(6), 539-547. doi: 10.1177/1082013211433077
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., y Woolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 287-294.
- Crecente-Campo, J., Nunes-Damaceno, M., Romero-Rodríguez, M. A., y Vázquez-Odériz, M. L. (2012). Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria cv Selva*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(1), 23-30.

- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., et al. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *Bioessays*, 30(4), 386-396.
- Chen, C., y Kong, A.-N. T. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(12), 1505-1516.
- Cheung, K. L., y Kong, A.-N. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *The AAPS journal*, 12(1), 87-97.
- Chung, K.-T., Wei, C.-I., y Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 168-175.
- D'Ambrosio, S. M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., y Ding, H. (2011). Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(3), 465-469. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.027>
- Devraj, R., Williams, H. D., Warren, D. B., Mullertz, A., Porter, C. J. H., y Pouton, C. W. (2013). In vitro digestion testing of lipid-based delivery systems: Calcium ions combine with fatty acids liberated from triglyceride rich lipid solutions to form soaps and reduce the solubilization capacity of colloidal digestion products. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), 323-333.
- Ding, H., Chin, Y.-W., Kinghorn, A. D., y D'Ambrosio, S. M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 386-394.
- Divya, C. S., y Pillai, M. R. (2006). Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Molecular carcinogenesis*, 45(5), 320-332.
- Donetti, M., y Terry, L. A. (2014). Biochemical markers defining growing area and ripening stage of imported avocado fruit cv. Hass. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), 90-98.
- Enns, J. E., Hanke, D., Park, A., Zahradka, P., y Taylor, C. G. (2014). Diets high in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decrease fatty acid synthase protein levels in adipose tissue but do not alter other markers of adipose function and inflammation in diet-induced obese rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 90(2-3), 77-84.
- Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M. A., Tesoriere, L., y Marco, L. D. (2008). In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3561-3568.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., y Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from

- foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438-450.
- Golding, M., y Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 90-101.
- Goni, I., Elena Diaz-Rubio, M., Perez-Jimenez, J., y Saura-Calixto, F. (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*, 42(7), 840-846.
- González-Talice, J., Yuri, J. A., y del Pozo, A. (2013). Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae*, 151(0), 83-89.
- Goulao, L. F., y Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 4-25.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., y Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11), 591-600.
- Helbig, A., Silletti, E., Timmerman, E., Hamer, R. J., y Gruppen, H. (2012). In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 10-19.
- Hellström, P. M., Grybäck, P., y Jacobsson, H. (2006). The physiology of gastric emptying. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 20(3), 397-407.
- Herranz-López, M., Fernández-Arroyo, S., Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Beltrán-Debón, R., Menéndez, J. A., et al. (2012). Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine*, 19(3-4), 253-261.
- Hu, J.-L., Nie, S.-P., Min, F.-F., y Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1143-1150.
- Huang, R., Xia, R., Hu, L., lu, Y., & Wang, M. (2007). Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae*, 113(2), 166-172.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
- Hurtado-Fernández, E., Contreras-Gutiérrez, P. K., Cuadros-Rodríguez, L., Carrasco-Pancorbo, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Merging a sensitive capillary electrophoresis-ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. *Food Chemistry*, 141(4), 3492-3503.
- Jacobo-Velázquez, D. A., y Hernández-Brenes, C. (2012). Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16(0), 121-128.

- Jayaprakasha, G., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G., y Patil, B. S. (2009). Bioactive compounds from sour orange inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell cycle arrest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 180-186.
- Kim, S. K., Lee, E. H., Vaishali, B., Lee, S., Lee, Y.-k., Kim, C.-Y., et al. (2005). Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. *Journal of Controlled Release*, 105(1–2), 32-42.
- Krook, M. A., y Hagerman, A. E. (2012). Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International*, 49(1), 112-116.
- Laakkonen, L., y Finel, M. (2010). A molecular model of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A1, its membrane orientation, and the interactions between different parts of the enzyme. *Molecular pharmacology*, 77(6), 931-939.
- Laguette, M., Lecomte, J., y Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.
- Landahl, S., Meyer, M. D., y Terry, L. A. (2009). Spatial and temporal analysis of textural and biochemical changes of imported avocado cv. Hass during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7039-7047.
- Laparra, J. M., y Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- Lee, J., Koo, N., y Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x
- Lewinsohn, E., y Gijzen, M. (2009). Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science*, 176(2), 161-169.
- Li, S., Sui, Y., Xiao, J., Wu, Q., Hu, B., Xie, B., et al. (2013). Absorption and urinary excretion of A-type procyanidin oligomers from Litchi chinensis pericarp in rats by selected ion monitoring liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1536-1542.
- Li, Y., Hu, M., y McClements, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126(2), 498-505.
- Lidebjer, C., Leanderson, P., Ernerudh, J., y Jonasson, L. (2007). Low plasma levels of oxygenated carotenoids in patients with coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(6), 448-456.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(5), 391-404.

- Lu, Q.-Y., Arteaga, J. R., Zhang, Q., Huerta, S., Go, V. L. W., y Heber, D. (2005). Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(1), 23-30.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Gabaldón, J. A., y Núñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1255-1260.
- Luo, W., Zhao, M., Yang, B., Ren, J., Shen, G., y Rao, G. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, 126(1), 277-282.
- Maher, D. M., Bell, M. C., O'Donnell, E. A., Gupta, B. K., Jaggi, M., y Chauhan, S. C. (2011). Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, rb, and ptpn13 proteins and inhibits benzo [a] pyrene-induced upregulation of HPV E7. *Molecular carcinogenesis*, 50(1), 47-57.
- Malta, L. G., Tessaro, E. P., Eberlin, M., Pastore, G. M., y Liu, R. H. (2013). Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, 53(1), 417-425.
- Mandalari, G., Faulks, R. M., y Rich, G. T. (2008). Release of protein, lipid, and vitamin E from almond seeds during digestion. *Journal of agricultural*
- Marangoni, F., y Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61(3), 193-199.
- Maru, G. B., Kumar, G., Ghantasala, S., y Tajpara, P. (2014). Chapter 87 - Polyphenol-Mediated In Vivo Cellular Responses during Carcinogenesis. In R. R. Watson, V. R. Preedy y S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 1141-1179). San Diego: Academic Press.
- Masibo, M., y He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4), 309-319.
- McClements, D. J., y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & function*, 1(1), 32-59.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., y Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896-5904.
- Meyer, M. D., y Terry, L. A. (2010). Fatty acid and sugar composition of avocado, cv. Hass, in response to treatment with an ethylene scavenger or 1-methylcyclopropene to extend storage life. *Food Chemistry*, 121(4), 1203-1210.
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., y Liu, R. H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6887-6892.

- Miao, M., Xiong, S., Jiang, B., Jiang, H., Cui, S. W., y Zhang, T. (2014). Improved the slow digestion property of maize starch using partially β -amylolysis. *Food Chemistry*, 152(0), 128-132.
- Micallef, M. A., y Garg, M. L. (2009). Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(12), 927-939.
- Mun, S., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770-781.
- Nadeem, N., Woodside, J. V., Kelly, S., Allister, R., Young, I. S., y McEneny, J. (2012). The two faces of α - and γ -tocopherols: an in vitro and ex vivo investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(7), 845-851.
- Neilson, A. P., y Ferruzzi, M. G. (2011). Influence of Formulation and Processing on Absorption and Metabolism of Flavan-3-Ols from Tea and Cocoa. In M. P. Doyle y T. R. Klaenhammer (Eds.), *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 2 (Vol. 2, pp. 125-151).
- Nielsen, I. L. F., Haren, G. R., Magnussen, E. L., Dragsted, L. O., y Rasmussen, S. E. (2003). Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5861-5866.
- Olinga, P., Elferink, M., Draaisma, A., Merema, M., Castell, J., Perez, G., et al. (2008). Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4), 380-389.
- Ornelas-Paz, D. J., Failla, M. L., Yahia, E. M., y Gardea-Bejar, A. (2008). Impact of the stage of ripening and dietary fat on in vitro bioaccessibility of β -carotene in 'Ataulfo' mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1511-1516. doi: 10.1021/jf072751r
- Ortega, N., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., y Motilva, M.-J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry*, 124(1), 65-71.
- Ou, K., Percival, S. S., Zou, T., Khoo, C., y Gu, L. (2012). Transport of cranberry A-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1390-1396.
- Ozdemir, F., y Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, 86(1), 79-83.
- Pacifico, S., Di Maro, A., Petriccione, M., Galasso, S., Piccolella, S., Di Giuseppe, A. M. A., et al. (2014). Chemical composition, nutritional value and antioxidant

- properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from Campania Region. *Food Research International*, 64(0), 188-199.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6-R15.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., y García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Phan, C. T., y Tso, P. (2001). Intestinal lipid absorption and transport. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 6, D299-319.
- Plaza, L., Sanchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S., de Ancos, B., y Cano, M. P. (2009). Fatty Acids, Sterols, and Antioxidant Activity in Minimally Processed Avocados during Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3204-3209.
- Porrini, M., y Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647-650.
- Pozzi, E., Basavecchia, V., Zanotto, C., Pacchioni, S., Morghen, C. D. G., y Radaelli, A. (2009). Construction and characterization of recombinant fowlpox viruses expressing human papilloma virus E6 and E7 oncoproteins. *Journal of Virological Methods*, 158(1-2), 184-189.
- Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Puerta-Gomez, A. F., y Cisneros-Zevallos, L. (2011). Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 220-224.
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Álvarez-Parrilla, E., et al. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & function*. doi: 10.1039/c4fo00073k
- Rao, A. V., y Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.
- Rao, J., y McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1413-1423.
- Reagan-Shaw, S., Eggert, D., Mukhtar, H., y Ahmad, N. (2010). Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells. *Nutrition and cancer*, 62(4), 517-524.

- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., y da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., y Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212.
- Rowland, A., Miners, J. O., y Mackenzie, P. I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(6), 1121-1132.
- Rufino, M. d. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., y Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002.
- Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., y Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, 40(0), 239-246.
- Salem, M. Z. M., Ali, H. M., El-Shanhorey, N. A., y Abdel-Megeed, A. (2013). Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(10), 785-791.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., y McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2), 1472-1480.
- Santiago-Silva, P., Labanca, R. A., y Gloria, M. B. A. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, 44(5), 1264-1268.
- Saura-Calixto, F., y Díaz-Rubio, M. E. (2007). Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine Polyphenols gap? *Food Research International*, 40(5), 613-619. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.005>
- Scalbert, A., y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schrauwen, P. (2007). High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(01), 33-41.
- Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., y Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and purification technology*, 41(1), 49-55.
- Shardell, M. D., Alley, D. E., Hicks, G. E., El-Kamary, S. S., Miller, R. R., Semba, R. D., et al. (2011). Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutrition Research*, 31(3), 178-189.

- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21(4), 257-276.
- Shivashankara, K., Isobe, S., Al-Haq, M. I., Takenaka, M., & Shiina, T. . (2004). Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1281-1286.
- Singh, K. K., y Vingkar, S. K. (2008). Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1-2), 136-143.
- Singleton, V. L., & Rossi J.A., . (1996). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Takumi, H., Nakamura, H., Simizu, T., Harada, R., Kometani, T., Nadamoto, T., et al. (2012). Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *Food & function*, 3(4), 389-398.
- Tong, W. Y., Wang, H., Waisundara, V. Y., y Huang, D. (2014). Inhibiting enzymatic starch digestion by hydrolyzable tannins isolated from *Eugenia jambolana*. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 389-395.
- Tulipani, S., Martinez Huelamo, M., Rotches Ribalta, M., Estruch, R., Ferrer, E. E., Andres-Lacueva, C., et al. (2012). Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: Evidence from a human pilot study. *Food Chemistry*, 130(3), 581-590.
- Uclés Santos, J.-R., Bakry, F., y Brillouet, J.-M. (2010). A preliminary chemotaxonomic study on the condensed tannins of green banana flesh in the *Musa* genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 1010-1017.
- Villa-Rodriguez, J. A., Javier Molina-Corral, F., Fernando Ayala-Zavala, J., Olivas, G. I., y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. *Food Research International*, 44(5), 1231-1237.
- Villanueva-Carvajal, A., Bernal-Martínez, L. R., García-Gasca, M. T., y Dominguez-Lopez, A. (2013). In vitro gastrointestinal digestion of *Hibiscus sabdariffa* L.: The use of its natural matrix to improve the concentration of phenolic compounds in gut. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 260-265.
- Vivas, N., Nonier, M.-F., de Gaulejac, N. V., Absalon, C., Bertrand, A., y Mirabel, M. (2004). Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems

- of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 247-256.
- Vossenaar, M., Solomons, N. W., Valdés-Ramos, R., y Anderson, A. S. (2011). Agreement between dietary and lifestyle guidelines for cancer prevention in population samples of Europeans and Mesoamericans. *Nutrition*, 27(11-12), 1146-1155.
- Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T., y Lovatt, C. J. (2012). Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in 'Hass' avocado during storage. *Food Chemistry*, 135(2), 694-698.
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., y Marcone, M. F. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44(1), 14-22.
- Wang, W., Bostic, T. R., y Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122(4), 1193-1198.
- Wedding, B. B., Wright, C., Grauf, S., White, R. D., Tilse, B., y Gadek, P. (2013). Effects of seasonal variability on FT-NIR prediction of dry matter content for whole Hass avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 75(0), 9-16.
- Werner, J. S., Donnelly, S. K., y Kliegl, R. (1987). Aging and human macular pigment density: Appended with translations from the work of Max Schultze and Ewald Hering. *Vision Research*, 27(2), 257-268.
- Wilde, P. J., y Chu, B. S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 14-22.
- Wu, L.-c., Hsu, H.-W., Chen, Y.-C., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., y Ho, J.-a. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95(2), 319-327.
- Wu, X., Cao, G., y Prior, R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of nutrition*, 132(7), 1865-1871.
- Xu, C., Li, C. Y. T., y Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*.
- Yahia, E. M., De Jesus Ornelas-Paz, J., y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). 2 - Nutritional and health-promoting properties of tropical and subtropical fruits. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 21-78): Woodhead Publishing.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M., y Patil, B. S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2009-2014.

- Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G., y Hovgaard, L. (2001). A dynamic in vitro lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 115-122. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00169-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00169-5)
- Zhang, Z., Huber, D. J., y Rao, J. (2013). Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 76(0), 58-64.
- Zhu, X., Ye, A., Verrier, T., y Singh, H. Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food Chemistry*(0).
- Zhu, X., Ye, A., Verrier, T., y Singh, H. (2013). Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 139(1–4), 398-404.
- Živković, J., Barreira, J. C. M., Stojković, D., Čebović, T., Santos-Buelga, C., Maksimović, Z., et al. (2014). Phenolic profile, antibacterial, antimutagenic and antitumour evaluation of *Veronica urticifolia* Jacq. *Journal of Functional Foods*, 9(0), 192-201.