



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

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, BIOACCESIBILIDAD E  
INTERACCIONES MOLECULARES DE COLESTEROL Y LOS  
FITOQUÍMICOS DE LA PASTA DE AGUACATE CV. 'HASS'**

---

Por:

**Bagdi Shain Zuñiga Martínez**

TESIS APROBAR POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

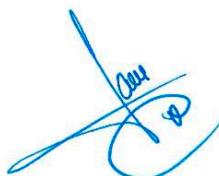
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisión de la propuesta de tesis de Bagdi Shain Zúñiga Martínez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



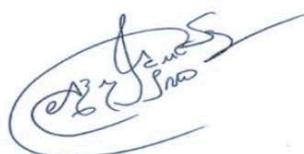
---

Dr. Jesús Abraham Domínguez Avila  
Director de tesis



---

Dr. Abraham Wall Medrano  
Codirector de tesis



---

Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización Química, Bioaccesibilidad e Interacciones Moleculares de Colesterol y los Fitoquímicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass” 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 de la autora Bagdi Shain Zuñiga Martínez, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios en este proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme ingresar en el programa de Maestría en Ciencias y así llevar a cabo una meta muy importante en mi formación profesional.

A los proyectos “Inducción de saciedad y modulación de la digestión intestinal de lípidos ejercidos por los compuestos fenólicos de aguacate Hass” (Instituto de Bebidas de la Industria Mexicana de Coca-Cola, PNCTA, 2019) y “Acciones de inducción de saciedad y modulación de digestión de lípidos ejercidas por los compuestos fenólicos de subproductos de aguacate. Un estudio enteroendócrino y conductual” (CONACYT, 265216).

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por facilitarme sus equipos para realizar mi proyecto de investigación, así como todo el personal que siempre tuvo la disponibilidad de ayudarme.

Especialmente a mi director de tesis el Dr. Jesús Abraham Domínguez Ávila, por aceptarme como su estudiante, por su apoyo incondicional, paciencia y la disponibilidad que me brindó siempre que lo necesité para realizar este proyecto.

Agradezco a mi codirector de tesis el Dr. Abraham Wall Medrano, a mis asesores el Dr. Gustavo González Aguilar y Dr. Fernando Ayala Zavala, por su disponibilidad, sus grandes aportaciones y formación académica a lo largo de la maestría.

A el Dr. Javier Hernández Paredes y al M.C. Orlando Tortoledo por su apoyo, paciencia y disponibilidad para concluir este proyecto.

A la Q.B. Mónica Villegas, por su apoyo técnico, sus aportaciones en este proyecto, paciencia y disponibilidad en todo momento para llevar a cabo este proyecto, gracias Moni.

A la M.C. Yessica Enciso, M.C Jacqueline Ruiz, M.C. Alejandra Preciado y Dr. Ignacio Valenzuela Chavira, gracias por su disponibilidad, paciencia, sus aportaciones en lo académico y por su valiosa amistad.

A la M.C. Jeanette Arredondo Damián por su amistad y sobre todo por ser la persona que me motivó a realizar este posgrado, gracias por tus palabras “no importa en el lugar en que tu estés, siempre vas a sobresalir”.

A el M.C Ezequiel Hernández Mendoza, por todo el apoyo que brindado tanto en CIAD como en los momentos difíciles, eres muy especial para mí.

A mis amigas de CIAD Yessica Enciso, María Concepción Cruz, Karen Quintero, Albani Rivera y Brisa Yan por su valiosa amistad, los días de estudios y los ánimos que siempre nos dábamos.

A mis amigos Liliana Roman, Omar García, Carolina Valenzuela, Carolina Figueroa, Jorge Inurriaga, Aaron Díaz, Mario Urrea y Fernanda Zamora, por siempre darme ánimos, estar en todo momento conmigo.

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiarme y permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida, siempre cuidarme y nunca permitir que abandone mis sueños.

A mi ángel Humberto Zuñiga, gracias por ser mi ángel terrenal y pilar todos estos años, por siempre darme ánimos y llevarme a todas partes siempre. El cielo tiene mucha suerte de tenerte.

A la familia Zúñiga Martínez, con todo mi amor, Mama Lulu, Tatis, Sughey, Lilian y Donovan gracias por siempre estar conmigo, su apoyo incondicional en cualquier cosa que se me ocurra.

A los niños de mi vida Alely, Marquitos, Mina y Magaly.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Hipercolesterolemia: Problema de Salud Pública .....	15
2.2. Prevención y Tratamiento de la Hipercolesterolemia.....	16
2.2.1. Opciones no Farmacológicas .....	16
2.2.2. Opciones Farmacológicas .....	19
2.2.3. Compuestos Fenólicos con Efectos Inhibitorios sobre la Absorción del Colesterol ..	25
2.3. Proceso de Absorción Intestinal del Colesterol.....	30
2.4. El Aguacate ( <i>Persea americana</i> ) y sus Subproductos: Valor funcional y Nutracéutico ....	34
2.4.1. Aguacate cv. 'Hass' y sus Efectos sobre el Perfil Lipídico Sérico .....	35
2.4.2. Subproductos del Aguacate como Fuente Potencial de Compuestos Bioactivos .....	38
2.4.3. Posible Mecanismo de Acción de los Compuestos Fenólicos del Aguacate cv. 'Hass' sobre la Micelización de Colesterol .....	40
2.5. Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad Enteral de Compuestos Fenólicos .....	41
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	45
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	46
4.1. Objetivo General.....	46
4.2. Objetivos Específicos .....	46
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
5.1. Material Vegetal .....	47
5.2. Reactivos .....	47
5.3. Características Físicoquímicas y Análisis Proximal de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	48
5.3.1. Color .....	48
5.3.2. Sólidos Solubles Totales, Acidez Titulable y pH .....	48
5.3.3. Humedad.....	48
5.3.4. Proteína .....	49
5.3.5. Lípidos Totales .....	50
5.3.6. Ceniza .....	50

## CONTENIDO (continuación)

5.4. Obtención de Extractos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'.....	51
5.5. Cuantificación de Compuestos Bioactivos de la Pasta de Aguacate cv.'Hass' .....	51
5.5.1. Compuestos Fenólicos Totales .....	51
5.5.2. Flavonoides Totales .....	52
5.5.3. Taninos Hidrolizables y Condensados.....	52
5.5.4. Carotenoides Totales.....	53
5.5.5. Clorofilas Totales.....	54
5.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	55
5.6.1. FRAP .....	55
5.6.2. DPPH .....	55
5.6.3. TEAC .....	55
5.6.4. ORAC .....	56
5.7. Perfil de Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	56
5.8. Perfil de Carotenoides y Tocoferoles de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	57
5.9. Perfil de Ácidos Grasos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	58
5.10. Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante en la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' en un Modelo de Digestión <i>in vitro</i> . .....	59
5.11. Análisis <i>in silico</i> .....	62
5.12. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	63
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
6.1. Características Físicoquímicas y Análisis Proximal de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'....	64
6.2. Cuantificación de Compuestos Bioactivos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	68
6.3. Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	73
6.4. Perfil de Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	75
6.5. Perfil de Carotenoides y Tocoferoles de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	77
6.6. Perfil de Ácidos Grasos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' .....	81
6.7. Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass', en un Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	83
6.8. Evaluación <i>in silico</i> de la Interacción de los Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' y el Colesterol.....	92
<b>7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>102</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Regulación del colesterol sérico por fármacos .....	21
2. Proceso de micelización intestinal.....	32
3. Los nutraceuticos actúan como inhibidores de la absorción intestinal de colesterol y potenciadores de la excreción de colesterol. ....	34
4. Posibles mecanismos involucrados en el efecto benéfico del aguacate en la prevención y control de enfermedades cardiovasculares. ....	37
5. Posibles mecanismos de inhibición de la absorción del colesterol por los compuestos bioactivos presentes en el aguacate 'Hass' (pulpa y subproductos).....	41
6. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la pasta de aguacate en un modelo <i>in vitro</i> . ....	60
7. Pasta de aguacate: cáscara, semilla y pulpa desgrasada .....	64
8. Cromatograma de la fracción ácida de la pasta de aguacate cv. 'Hass' .....	77
9. Liberación de compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass', en las diferentes etapas de una digestión <i>in vitro</i> . ....	84
10. Capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass' en las diferentes fases de digestión simulada.....	87
11. Difusión pasiva de los compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass' en un modelo de digestión <i>in vitro</i> . ....	89
12. Cinética de la capacidad antioxidante durante la fase intestinal de una digestión <i>in vitro</i> de pasta de aguacate cv. 'Hass' .....	90
13. Molécula optimizada y mapa electrostático de la molécula del colesterol.....	93
14. Molécula optimizada y mapa electrostático de la molécula del ácido protocatéico.....	95
15. Molécula optimizada y mapa electrostático de la molécula del ácido ferúlico. ....	95
16. Molécula optimizada y mapa electrostático de la molécula del ácido <i>p</i> -cumárico .....	96
17. Distancia y ángulos de los puentes de hidrógeno del complejo ácido protocatéico – colesterol .....	98
18. Distancia y ángulos de los puentes de hidrógeno del complejo ácido ferúlico – colesterol. ....	98
19. Distancia y ángulos de los puentes de hidrógeno del complejo ácido <i>p</i> -cumárico – colesterol. ....	99

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Fuentes vegetales con efecto inhibitorio sobre la micelización del colesterol <i>in vitro</i> .....	27
2. Preparación de soluciones madre de fluidos de digestión simulada.....	61
3. Características fisicoquímicas y análisis químico de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.....	64
4. Cuantificación de compuestos bioactivos de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.....	68
5. Capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.....	73
6. Perfil de compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass' .....	75
7. Perfil de Carotenoides y tocoferoles de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.....	78
8. Perfil de Ácidos grasos de la pasta de aguacate cv. 'Hass' .....	82
9. Energías de interacción de las moléculas optimizadas y de los complejos .....	94

## RESUMEN

La pasta de aguacate (*Persea americana*) cv. 'Hass' es un subproducto derivado de la extracción en frío de su aceite, el cual contiene diversos compuestos bioactivos con capacidad de interactuar con el colesterol, lo cual no ha sido evaluado. En este estudio se realizó una caracterización de las propiedades fisicoquímicas, análisis proximal, perfil fitoquímico y capacidad antioxidante de este subproducto, también se realizó una digestión estática *in vitro* de la pasta y se estudiaron *in silico* las interacciones de algunos de sus compuestos fenólicos (CF) con el colesterol. El análisis proximal (g/100 g) mostró un contenido alto de carbohidratos (41.2), seguido de lípidos (14.2), proteína (13.8) y ceniza (2.8) con un contenido de humedad de 27.8. El contenido de CF fue de 2.1 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de peso seco (ps) y una capacidad antioxidante de entre 1.6 (DPPH) a 9.2 (ORAC) mg equivalentes de Trolox (ET)/g ps. Mediante técnicas cromatográficas se evidenció la presencia de diversos CF ( $\mu\text{g/g}$  ps), tales como los ácidos ferúlico (40), protocatéico (22.9) y *p*-cumárico (22.5), además de quercetina (4.6), kaempferol (2.4), quercetina-3- $\beta$ -D-glucósido (1.0) y ácido gálico (0.9). El perfil de carotenoides ( $\mu\text{g}/100$  g ps) se compuso de  $\beta$ -caroteno (99), zeaxantina (63) y  $\alpha$ -caroteno (18), el de tocoferoles ( $\mu\text{g}/100$  g ps) de  $\alpha$ -tocoferol (10,412) y  $\gamma$ -tocoferol (3,120) y el de ácidos grasos de ácido oleico (49.8 %), linoleico (20.5 %) y palmítico (17.8 %). Los compuestos fenólicos totales fueron mayormente liberados en la fase gástrica, en comparación con la intestinal; la capacidad antioxidante mostró un comportamiento similar. El análisis *in silico* mostró que los ácidos protocatéico y ferúlico presentan una mayor energía de interacción con el colesterol, en comparación con el ácido *p*-cumárico, lo cual indica que dichos compuestos interactúan con el colesterol, probablemente a través de puentes de hidrógeno. Esto sugiere que los principales CF caracterizados podrían interactuar con el colesterol formando complejos insolubles con éste, impidiendo con ello su absorción entérica. En conjunto, los resultados permiten proponer que la pasta de aguacate cuenta con diversos macro- y micronutrientes cuyas bioactividades han sido poco estudiadas, entre ellos destacan los CF, los cuales pudieran contribuir a mantener un perfil lipídico adecuado, al impedir su absorción y promover su excreción.

**Palabras clave.** Lípidos, *Persea americana* Mill, antioxidantes, ingrediente funcional.

## ABSTRACT

Avocado (*Persea americana*) paste cv. 'Hass' is a by-product derived from the cold extraction of its oil, which contains various bioactive compounds with potential hypocholesterolemic effect that has not been evaluated. In this study, a characterization of the physicochemical properties, proximate analysis, phytochemical profile, and antioxidant capacity of this by-product was carried out; a static *in vitro* digestion of the paste was also performed, and the interactions of some of its phenolic compounds (PC) with cholesterol were studied *in silico*. Proximate analysis (g/100g) showed a high carbohydrate content (41.2), followed by lipids (14.2), protein (13.8) and ash (2.8), with a moisture content of 27.8. The PC content was 2.1 mg of gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight (dw) and an antioxidant capacity in the range of 1.6 (DPPH) to 9.2 (ORAC) mg of Trolox equivalents (TE)/g dw. Through chromatographic techniques, the presence of various PC ( $\mu\text{g/g dw}$ ) was evidenced, such as ferulic (40), protocatechuic (22.9) and *p*-coumaric (22.5) acids, in addition to quercetin (4.6), kaempferol (2.4), quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside (1.0) and gallic acid (0.9). The carotenoid profile ( $\mu\text{g/100 g dw}$ ) was composed of  $\beta$ -carotene (99), zeaxanthin (63) and  $\alpha$ -carotene (18), while the profile of tocopherols ( $\mu\text{g/100 g dw}$ ) showed  $\alpha$ -tocopherol (10,412) and  $\gamma$ -tocopherol (3,120); also, oleic (49.8%), linoleic (20.5%) and palmitic (17.8%) fatty acids were quantified. Total phenolic compounds were mainly released in the gastric phase, as compared to the intestinal phase, and the antioxidant capacity showed a similar behavior. The *in silico* analysis showed that protocatechuic and ferulic acids have a higher interaction energy with cholesterol, as compared to *p*-coumaric acid, which indicates that these compounds interact with cholesterol, probably through hydrogen bonds. This suggests that the main PCs characterized could form insoluble complexes with cholesterol, thereby preventing its enteric absorption. As a whole, the results allow to propose that avocado paste has various macro- and micronutrients whose bioactivities have been minimally studied, among them, its PC could contribute to maintaining an adequate lipid profile, by preventing cholesterol absorption and promoting its excretion.

**Keywords.** Lipids, *Persea americana* Mill, antioxidants, functional ingredient.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han presentado a nivel mundial varios problemas de salud relacionados a la hipercolesterolemia. Este trastorno ha ido en aumento, ocasionando cerca de 2.6 millones de muertes al año a nivel mundial, además de acompañarse frecuentemente de hipertrigliceridemia, los cuales son altamente prevalentes en adultos Mexicanos (43.6 y 31.5%), lo que conlleva a un gasto en salud pública de aproximadamente 85,000 millones de pesos anuales (Mendoza-Herrera *et al.*, 2019; OMS, 2017a,b). Entre las principales causas de hipercolesterolemia se encuentran factores genéticos, socioculturales, dietarios y de estilo de vida, destacando específicamente el alto consumo de grasas y azúcares refinadas en conjunto con inactividad física (Mata *et al.*, 2015). La hipercolesterolemia se asocia al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hígado graso e hipertensión, entre otras condiciones.

Existen actualmente varios fármacos para disminuir la absorción intestinal de colesterol, con la finalidad de normalizar su concentración sérica, aunque se ha reportado que éstos tienen efectos adversos a la salud, lo cual ha incitado la búsqueda de nuevas alternativas a partir de fuentes naturales que sean efectivas y seguras. Extractos obtenidos de orquídea (*Dendrobium nobile*), espino, bayas de goji, frijol negro, semilla de uva y té verde, han mostrado efectos inhibitorios sobre la esterasa de colesterol pancreática, el transporte de colesterol por el receptor Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) y la micelización del colesterol, efectos que parecen estar relacionados a su composición fenólica (Aissata *et al.*, 2019; Ngamukote *et al.*, 2011). En el aguacate se han identificado diversos compuestos bioactivos con potencial reductor del colesterol sérico, dentro de los que destacan diversos compuestos fenólicos, tocoferoles, carotenoides y ácidos grasos (Dreher y Davenport, 2013), cuyos efectos están mediados por diversos mecanismos a nivel luminal y sistémico.

Por otro lado, a partir de su procesamiento para la extracción de aceite de aguacate, se obtiene una pasta como subproducto, constituida por pulpa desgrasada, semilla y cáscara. Ésta es generalmente descartada, siendo una cantidad significativa de residuos sólidos, al representar del 21 al 30 % del peso de la fruta (López-Cobo *et al.*, 2016); se ha demostrado que la pulpa, semilla y cáscara de

aguacate contienen diversos compuestos fenólicos, tales como la epicatequina, catequina, procianidina B2, entre otros, los cuales son caracterizados por ser altamente bioactivos (Dreher y Davenport, 2013; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los compuestos presentes en el extracto de pasta de aguacate tiene acción larvicida, antifúngica, antibacteriana y antiprotozoaria (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010), además de efectos hipocolesterolémicos, antihipertensivos, antidiabéticos y antioxidantes. Cabe señalar que se han realizado diversos estudios en cáscara y semilla aislados obtenidos en condiciones de laboratorio, mas no se ha estudiado lo generado por la industria de manera real. Asimismo, existe una tendencia actual hacia el estudio de la bioactividad de subproductos de la industria alimentaria, con el fin de validar y aprovechar su bioactividad.

Investigaciones recientes han demostrado que los compuestos fenólicos de diversas fuentes naturales tienen un efecto inhibitorio sobre la micelización de colesterol, disminuyendo así su absorción intestinal. Por ejemplo, a partir de un extracto de cacao rico en procianidinas, se observó una inhibición del 98 % en la micelización del colesterol (Osakabe y Yamagishi, 2009), mientras que el té oolong (también abundante en catequinas) mostró un valor similar del 98 % (Ogawa *et al.*, 2015b). Subproductos de café y salvado de arroz han ejercido también capacidad de inhibición de la micelización del colesterol (Bhaskaragoud *et al.*, 2016; Ontawong *et al.*, 2019). El aguacate contiene compuestos similares a los presentes en dichos subproductos, sin embargo, no existen actualmente estudios acerca del potencial inhibitorio de la pasta de aguacate sobre la micelización del colesterol. El objetivo de este estudio fue realizar una caracterización química de la pasta de aguacate cv. 'Hass', y evaluar la bioaccesibilidad e interacciones de sus principales compuestos fenólicos con el colesterol.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Hipercolesterolemia: Problema de Salud Pública

La prevalencia de hipercolesterolemia ha aumentado en los últimos años, relacionándose con 2.6 millones de muertes a nivel mundial (OMS, 2017a, 2017b). Ésta es uno de los principales factores involucrados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, las cuales son de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México (OMS, 2017b). La NOM-037-SSA2-2012 (Solís y Hernández, 2013) establece los puntos de corte para dislipidemias en la población mexicana; en el caso de la hipercolesterolemia, se define por niveles séricos  $> 200$  mg/dL de colesterol total y colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL)  $\geq 130$  mg/dL. Existen además otra clase de dislipidemias en donde pueden presentarse alteraciones en la concentración de triacilglicerolos (TAG  $> 150$  mg/dL) o colesterol en lipoproteínas de alta densidad (HDL)  $< 40$  mg/dL. La hipercolesterolemia favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares a través de diversos mecanismos, tales como la aterosclerosis, la cual es a su vez multifactorial. La hipercolesterolemia y las enfermedades cardiovasculares se relacionan estrechamente con la edad, factores genéticos, tabaquismo, vida sedentaria, dieta alta en grasas y azúcares refinadas, sobrepeso/obesidad e hiperglicemia (Mata *et al.*, 2015; Solís y Hernández, 2013). Por lo anterior, la prevención, control y tratamiento de la hipercolesterolemia es de suma importancia para evitar el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares.

La Asociación Americana del Corazón (AHA por sus siglas en inglés) reportó que, en 2017, 94 millones de personas padecían enfermedades cardiovasculares en Estados Unidos, colocándolo en primer lugar a nivel mundial, seguido de Japón, Alemania y México. En nuestro país, se reportó que el 4 % del gasto total en salud en 2015 fue destinado al tratamiento de estas enfermedades (Mendoza-Herrera *et al.*, 2019). Esto sugiere que la hipercolesterolemia y las muertes relacionadas no son problemas únicos de países desarrollados. La magnitud de esta epidemia es profunda y difícil de abordar, ya que no existe una solución única, por lo cual se han tratado de proponer alternativas para su tratamiento, pero sobre todo de tipo preventivas.

Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de hipercolesterolemia. Uno de ellos es su relación directa con el estrés oxidativo sistémico, lo cual conduce a peroxidación lipídica y disminución de la capacidad antioxidante endógena. También, la elevada de síntesis de VLDL y alteración de su catabolismo por defecto del sistema de la lipasa, en conjunto con una reducción del colesterol HDL, favorecen su desarrollo, así como el de otras dislipidemias. La dieta destaca como un factor de suma importancia que interviene en su desarrollo. Cabe señalar que el patrón alimentario mexicano ha experimentado múltiples transformaciones en las últimas décadas, caracterizadas por un aumento en el consumo de alimentos procesados, bebidas azucaradas y una baja ingesta de frutas, verduras y granos enteros (Mendoza-Herrera *et al.*, 2019). Una dieta con estas características conlleva a una ingesta excesiva de colesterol y lípidos, sobre todo saturados, lo cual reduce el número de receptores periféricos para LDL y eleva sus concentraciones en individuos susceptibles. Aunado a esto, el alto consumo de azúcares simples y/o refinados, provoca un aumento del colesterol LDL y TAG (Mata *et al.*, 2015). Es por ello que se buscan tratamientos efectivos para prevenir la hipercolesterolemia, dando prioridad a cambios en el estilo de vida, lo cual se relaciona también con mantener un peso adecuado y estable.

## 2.2 Prevención y Tratamiento de la Hipercolesterolemia

### 2.2.1. Opciones no Farmacológicas

Las estrategias dirigidas a prevenir y tratar la hipercolesterolemia tienen diferentes enfoques. Una de ellas se basa en hacer cambios en el estilo de vida, lo que representa además la principal forma de perder peso de manera no invasiva y sin efectos secundarios. Se ha demostrado que las dietas integrales como la dieta mediterránea, que se compone principalmente de frutas, verduras, legumbres, granos, nueces y aceite de oliva, reducen el LDL en un 10 % después de 5 semanas, sin embargo, este método es difícil de implementar en ciertos pacientes, por ejemplo, por poca fuerza de voluntad, falta de tiempo, entre otras razones (Wadhera *et al.*, 2016).

Se han evaluado otras intervenciones no farmacológicas para normalizar la concentración de colesterol total y LDL, además de otros parámetros relacionados. Entre estas se encuentra modificar el consumo de ácidos grasos en la dieta, ya que existe evidencia de estudios prospectivos que indican que el aumento de consumo de grasas *trans* (ácidos grasos de origen industrial) aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Asimismo, restringiendo la ingesta de lípidos al 30-35% de las calorías totales, ya que esto es adecuado para controlar los niveles de colesterol total y LDL (Nicholls *et al.*, 2006; Poli *et al.*, 2008). Con base en los hábitos nutricionales de la población, es también aconsejable utilizar principalmente aceite de oliva extra virgen como la grasa dietética de elección, a pesar de que sus efectos sobre los niveles de colesterol total y LDL son modestos. La ingesta de lípidos saturados debe limitarse a 7-10 % de las calorías totales, mientras que la ingesta de lípidos *trans* debe limitarse sólo a la de productos lácteos. El uso de aceites de semillas ricos en poliinsaturados n-6 mejora también el colesterol total y LDL (Nicholls *et al.*, 2006), por lo que su inclusión en la dieta debe también considerarse.

Existen otras pautas que recomiendan limitar la ingesta de colesterol a 300 mg/día en la población general y a 200 mg/día en pacientes hipercolesterolémicos, diabéticos o con enfermedades cardiovasculares, además, se recomienda una ingesta de lípidos saturados < 10 % de las calorías totales (AHA, 2017; Ye y Kwiterovich Jr, 2000). Se ha reportado que el consumir alimentos de índice glucémico bajo pueden ayudar a mejorar, aunque de forma limitada, la concentración de colesterol HDL y TAG, mientras que una ingesta de fibra de 25-30 g/día puede contribuir a normalizar el perfil lipídico de manera significativa. La fibra soluble permite la formación de geles, y es más efectiva que la fibra insoluble en cuanto al perfil lipídico del consumidor, ya que aumentar su ingesta en 5 g/día puede reducir los niveles de colesterol total y LDL (Mensink, Temme, y Hornstra, 1994; Poli *et al.*, 2008).

Se ha observado que el consumo de alimentos que contienen 2 g de fitoesteroles, reduce la concentración de colesterol total y LDL en aproximadamente un 10 %, sin efectos significativos sobre el HDL y TAG (de Jong, Plat, y Mensink, 2003). La inclusión de 25 g de proteína de soya en la dieta como reemplazo parcial de la proteína animal reduce también la concentración de colesterol total y LDL (Descovich *et al.*, 1980), lo cual ha sido corroborado en estudios recientes. Por ejemplo, Blanco Mejia *et al.* (2019) realizaron un metaanálisis, donde observaron que el

consumo de proteína de soya a una dosis media de 25 g/día, durante un seguimiento medio de 6 semanas, disminuyó el colesterol total y el LDL, en comparación con los casos controles (dieta sin proteína de soya). Los efectos benéficos son proporcionalmente mayores en sujetos con hipercolesterolemia, sin cambios en los niveles de HDL y TAG.

La obesidad está involucrada en el desarrollo de una serie de enfermedades crónicas no transmisibles, además de aumentar el riesgo cardiovascular a través de múltiples mecanismos. Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol son evidentes en la obesidad, y están estrechamente vinculadas al desarrollo y/o mantenimiento de la inflamación metabólica y la resistencia a la insulina. Las elevaciones de las lipoproteínas ricas en TAG y las reducciones del colesterol HDL, a su vez, son dos alteraciones importantes que acompañan a la obesidad (Curley *et al.*, 2020). En la mayoría de los estudios disponibles, el control del peso corporal puede reducir significativamente, aunque no drásticamente, los niveles de colesterol total y LDL, especialmente en sujetos obesos. Además, generalmente se observa una disminución en TAG, mientras que el HDL tiende a aumentar con la pérdida de peso paulatina (Curley *et al.*, 2020; Poli *et al.*, 2008).

En general, se encuentran correlaciones significativas entre la reducción de peso y la disminución de las concentraciones de colesterol total, LDL, VLDL y TAG. Por ejemplo, por cada kg de disminución en el peso corporal, los niveles de colesterol total y LDL se reducen 2 mg/dL y 0.8 mg/dL, respectivamente. Asimismo, se produce una reducción de 0.3 mg/dL de HDL en quienes pierden peso activamente, mientras que se produce un aumento de 0.4 mg/dL en quienes mantienen un peso estable (Schaefer, Gleason, y Dansinger, 2005). A través de un metaanálisis, se ha demostrado una disminución en la concentración de LDL por cada 10 kg de peso perdido (Nordmann *et al.*, 2006). Esto sugiere que mantener un peso corporal adecuado impacta significativamente sobre el perfil lipídico sérico.

La inactividad física aumenta la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles, incluidas las cardiovasculares. Estudios observacionales indican que el impacto de la actividad física en las fracciones lipídicas tiende a aumentar los niveles de HDL y a disminuir TAG en quienes la realizan de manera activa. El aumento en los niveles de HDL observados en personas activas con respecto a sujetos sedentarios, varía de 9 a 50 %, mientras que la reducción

de TAG varía de 19 a 50 % (Dragan, Serban, y Banach, 2014; Poli *et al.*, 2008). Por el contrario, los cambios en el colesterol total y LDL son inconsistentes y disminuyen en muchos estudios después de ajustar otros componentes del estilo de vida (hábitos alimenticios, tabaquismo y consumo de alcohol, entre otros), mediante análisis multivariado. A pesar de ello, la mayoría de los estudios observacionales muestran una estrecha relación entre la actividad física y cambios en los perfiles lipídicos (Poli *et al.*, 2008).

La cirugía bariátrica puede proporcionar una pérdida continua de peso, y por ende disminuir los niveles de colesterol, pero sólo es adecuada en pacientes con un índice de masa corporal (IMC)  $\geq$  40 (obesidad tipo 3). Además, pueden presentarse graves complicaciones post-operatorias como una malabsorción intestinal, puede exacerbar anormalidades preexistentes, aunque sutiles, en el metabolismo de calcio (Chang *et al.*, 2018). Existe también la aféresis lipídica, la cual es un procedimiento que separa el colesterol de la sangre, pero es un proceso invasivo que presenta complicaciones como toxicidad relacionada con el citrato, hipotensión o complicaciones relacionadas al catéter (Gupta *et al.*, 2019). Es por ello que las opciones más adecuadas para el manejo del perfil lipídico sérico, son los hábitos alimenticios y de estilo de vida adecuados.

### **2.2.2 Opciones Farmacológicas**

En conjunto con los cambios en el estilo de vida, el uso de algunos fármacos para tratar la hipercolesterolemia es común, debido a su fácil acceso y bajo costo. Estos disminuyen la concentración de colesterol sérico a través de diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra inhibir la absorción intestinal de colesterol dietario y endógeno. Sin embargo, en contraste con sus beneficios, estos ejercen efectos adversos a la salud, por lo cual surge el interés de minimizar su uso y reemplazarlos por fuentes naturales que ejerzan acciones similares, pero sin efectos secundarios.

Existen numerosas alternativas farmacológicas para la normalización y control de la concentración de colesterol sérico. En la Figura 1 se esquematiza el mecanismo de acción de los fármacos

mencionados a continuación sobre el perfil lipídico sérico. Uno de los fármacos más utilizados es la ezetimiba, la cual bloquea la absorción de colesterol dietario y biliar, a través de la inhibición del transportador NPC1L1 (Simon *et al.*, 2005), el cual es responsable del transporte de colesterol de la luz intestinal hacia el interior de los enterocitos. Éste es un fármaco hipolipemiante, que no ejerce efectos sobre la absorción de nutrientes liposolubles (Phan *et al.*, 2012). Su uso reduce la cantidad de colesterol que llega al hígado, por lo que en respuesta al menor aporte de colesterol, este órgano reacciona aumentando la expresión del gen del receptor de LDL (LDLR), lo que produce una reducción de LDL (20 %) y aumento simultáneo del HDL (5 %) (Catapano y Graham, 2016; Shukr *et al.*, 2019). Sin embargo, se han reportado efectos adversos al utilizarse de manera prolongada; entre el 2004 y 2015 se reportó que en Australia el 42 % de la población tratada con ezetimiba presentó mialgia, artralgia (10 %) y espasmos musculares (9 %), así como problemas gastrointestinales como náuseas (19 %), diarrea (11 %) y dolor abdominal (10 %) (Hollingworth *et al.*, 2017). Asimismo, Stolk *et al.* 2006 reportaron que durante el tratamiento con ezetimiba por tres meses, algunos pacientes fueron diagnosticados con hepatitis colestásica y hepatitis autoinmune inducida por el fármaco. Es por esto que se buscan compuestos con efecto hipocolesterolemiante que no presenten los efectos secundarios anteriormente mencionados.

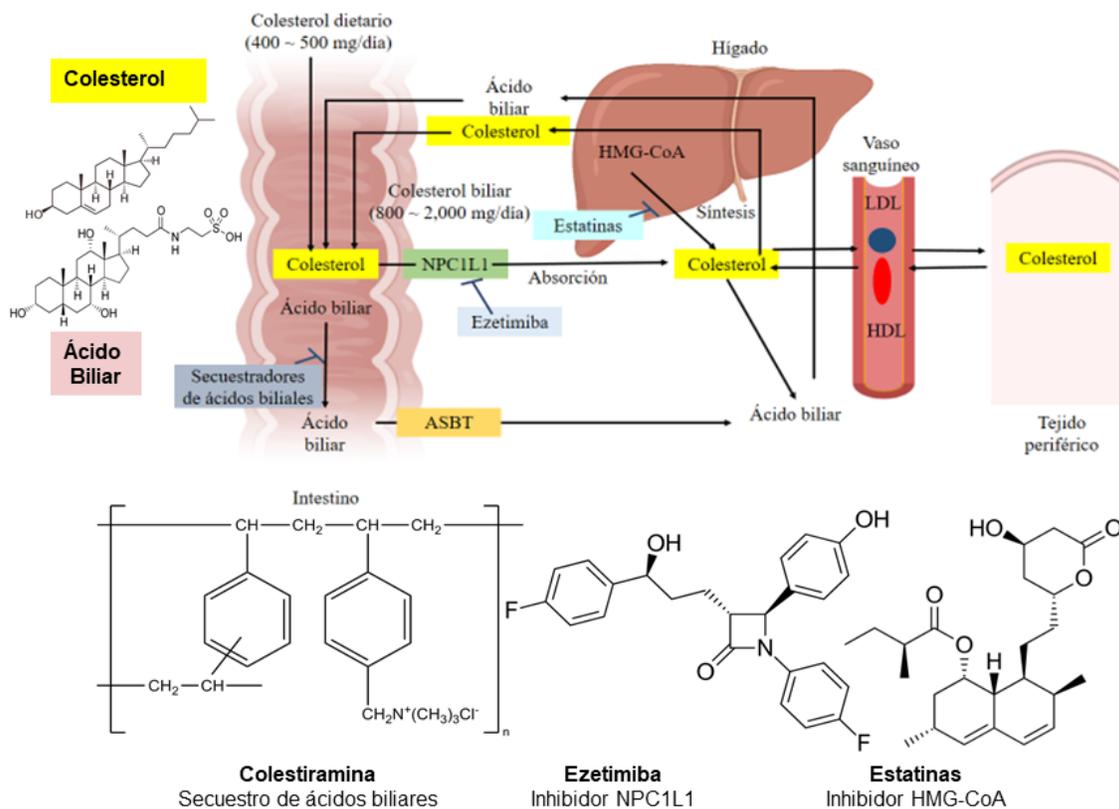


Figura 1. Mecanismos de acción generales de fármacos que regulan la concentración de colesterol sérico. Transportador apical de ácido biliar dependiente de sodio (ASBT), lipoproteínas de alta (HDL) y baja (LDL) densidad, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1).

Las estatinas son otra clase de fármacos administrados como monoterapia o en conjunto con la ezetimiba. Estas son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), enzima limitante de la ruta de síntesis de colesterol endógeno a nivel hepático. Cuando las estatinas se unen a la HMGCR, bloquean el acceso del sustrato natural (HMG-CoA) al sitio catalítico, y, por lo tanto, interfieren con la síntesis de colesterol. Como resultado, la concentración de colesterol en la membrana del retículo endoplásmico disminuye, provocando la activación de la proteína activadora de SREBP (SCAP, por sus siglas en inglés), que luego transporta la proteína 2 de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP2, por sus siglas en inglés) al aparato de Golgi. En el aparato de Golgi, SREBP2 se activa al sufrir cortes para luego ser translocado al núcleo. Una vez ahí, SREBP2 activo se puede unir al elemento regulador de esteroides (SRE-1), para regular la expresión del LDLR, así como otros genes relacionados al metabolismo de lípidos. Al haber un mayor número de copias de LDLR en la membrana celular, se favorece una

disminución en la concentración de colesterol LDL sérico, contribuyendo así a una regulación del perfil lipídico (Schonewille *et al.*, 2016).

En contraste con sus beneficios, se han reportado diversos efectos secundarios por tratamiento con estatinas, tales como dolor y daño muscular en el 30 % de los pacientes, causados por falta de adherencia o interrupción del tratamiento. Esto se debe a que las estatinas tienen un impacto adverso sobre el tejido muscular, al alterar la función mitocondrial y utilización de energía celular, así como agotar los niveles de coenzima Q10. También se ha reportado un incremento en la glicemia, debido a los estilos de vida de los pacientes (una dieta alta en calorías, con alimentos ricos en grasas *trans*, sobrepeso/obesidad y fumar) (Davies *et al.*, 2016). Se cree que los efectos anti-diabetogénicos de las estatinas surgen de varios mecanismos que intervienen en la regulación del metabolismo de carbohidratos y las células  $\beta$  pancreáticas. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de isoprenoides y la posterior inhibición de la absorción de glucosa por las células  $\beta$ , una mayor absorción de LDL que conduce a la inhibición de la glucoquinasa (inhibiendo así la glucólisis) y sobreproducción de óxido nítrico inducida por citocinas que conduce a la apoptosis de las células  $\beta$ . También se ha reportado hepatotoxicidad, ya que el 3 % de los pacientes presentan un incremento en actividad de transaminasas séricas, lo cual se debe a un aumento de la permeabilidad de la membrana del hepatocito. Otros efectos secundarios incluyen problemas digestivos, efectos cognitivos y el desarrollo de erupciones y enrojecimiento (Davies *et al.*, 2016; Sultan *et al.*, 2019).

Los secuestradores de ácidos biliares tales como la colestiramina, colestipol y colesevelam (Scaldferrri *et al.*, 2013), son otra clase de fármacos con efecto sobre la absorción de colesterol. Estos se unen a los ácidos biliares en el intestino, evitando su reabsorción en el íleon terminal, lo cual aumenta su excreción fecal (Meissner *et al.*, 2013). A la disminución en la reabsorción de ácidos biliares y colesterol se le conoce como bloqueo de la circulación enterohepática. Esto reduce la cantidad de ácidos biliares y colesterol que se recicla por esta vía, lo cual estimula la conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado para ser excretados nuevamente. Dicho aumento en la síntesis de ácidos biliares disminuye la concentración de colesterol hepático, lo que conduce a la activación de SREBP para continuar estimulando la expresión de las proteínas requeridas para la excreción de colesterol, tales como el LDLR. El aumento en la expresión de LDLR hepático

promueve una eliminación mayor y continua de LDL, disminuyendo así su concentración sérica (Benson *et al.*, 1994; Ticho *et al.*, 2019). Al igual que las estatinas y la ezetimiba, los secuestradores de ácidos biliares reducen los niveles de colesterol LDL sérico, pero presentan efectos secundarios como estreñimiento (el más común), molestias abdominales y agravamiento de las hemorroides.

Existen otros fármacos que tienen un efecto inhibitorio o que modulan el colesterol total y LDL. Los inhibidores de la pro-proteína convertasa de subtilisina kexina 9 (PCSK9) presentan un mecanismo de acción que se relaciona con la reducción del nivel plasmático de esta proteína, que a su vez no está disponible para unir el LDLR (Mach *et al.*, 2019). Dado que esta interacción desencadena la degradación intracelular de LDLR, los niveles más bajos de PCSK9 circulante darán como resultado una mayor expresión de LDLR en la superficie celular, y por lo tanto, una reducción de los niveles circulantes de LDL (Norata, Tibolla, y Catapano, 2014). Ensayos clínicos han demostrado que alirocumab y evolocumab, ambos inhibidores de PCSK9, ya sea como monoterapia o en combinación con estatinas y/u otras terapias hipolipemiantes, reducen significativamente los niveles de LDL en promedio en un 60%, dependiendo de la dosis. En combinación con estatinas de alta intensidad o máximamente toleradas, ambos fármacos redujeron el LDL en un 46-73 % más que el placebo, y en un 30 % más que la ezetimiba. En pacientes a los que no se les pueden administrar estatinas, la inhibición de PCSK9 en combinación con ezetimiba redujo el LDL de manera significativa (Cho *et al.*, 2016). Se ha demostrado que tanto el alirocumab como el evolocumab reducen eficazmente los niveles de LDL en pacientes con alto riesgo de ECV, incluidos pacientes diabéticos (Schmidt *et al.*, 2017). Dado su mecanismo de acción, esta clase de fármacos son efectivos para reducir el colesterol LDL en todos los pacientes capaces de expresar LDLR en el hígado.

En contraste con sus beneficios, la administración de inhibidores de PCSK9 presenta efectos secundarios, siendo picazón en el sitio de inyección y síntomas similares a los de la gripe de los reportados con mayor frecuencia (Cicero, Tartagni, y Ertek, 2014). En algunos estudios se ha descrito un aumento de los efectos neurocognitivos informados por los pacientes (Lipinski *et al.*, 2016). Los estudios de aleatorización mendeliana también han sugerido que la inhibición de PCSK9 puede aumentar el riesgo de diabetes mellitus con un efecto relacionado al LDL, como aparentemente ocurre con las estatinas (Schmidt *et al.*, 2017). Un problema potencial del

tratamiento con anticuerpos (tales como los inhibidores de PCSK9) a largo plazo, es la aparición de autoanticuerpos. Hasta la fecha, se han reportado pocos casos de anticuerpos y no se ha observado una reducción de la disminución de LDL, pero el uso a largo plazo requiere ser monitoreado. De hecho, el programa de desarrollo para un tercer inhibidor de PCSK9, bococizumab, un anticuerpo humanizado, se suspendió debido a un aumento de anticuerpos neutralizantes, que resultó en la atenuación del efecto reductor de LDL con el tiempo, así como una mayor tasa de reacciones en el lugar de inyección (Ridker *et al.*, 2017).

Debido a los efectos secundarios que presentan estos fármacos, ha surgido un gran interés por el uso de productos naturales para tratar o mitigar el desarrollo de hipercolesterolemia. La evidencia de numerosos ensayos controlados aleatorios y metaanálisis también ha confirmado su eficacia hipolipidémica, así como la seguridad de ciertos nutraceuticos (Johnston *et al.*, 2017). Se han desarrollado combinaciones de agentes hipolipemiantes naturales para reducir sus dosis, mejorar la tolerabilidad y enfocarse en múltiples factores de riesgo de lípidos. En este sentido, las combinaciones nutraceuticas que contienen fibra, esteroides, polisacáridos de lavadura, betaglucanos y compuestos fenólicos se han probado principalmente en pacientes con hipercolesterolemia y han demostrado resultados prometedores (Pirro *et al.*, 2013; Pirro *et al.*, 2016). Todos estos compuestos/terapias hipolipidémicas sintéticas y de origen natural representan estrategias de tratamiento alternativas para disminuir el colesterol sérico, especialmente el colesterol LDL, con la finalidad de prevenir enfermedades cardiovasculares en pacientes resistentes o intolerantes a algunos fármacos (Johnston *et al.*, 2017). La mayoría de los compuestos tienen como objetivo interrumpir uno o más pasos clave involucrados con el metabolismo de los lípidos.

Estudios recientes han demostrado que muchos compuestos fenólicos de origen vegetal pueden contribuir al control del perfil lipídico. Un metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados realizados con suplementos a base de flavonol, estableció una reducción modesta pero significativa de los niveles de colesterol LDL (Poli *et al.*, 2018). Esto también ha sido evidenciado en estudios realizados en sujetos con alto riesgo de eventos cardiovasculares (Tome-Carneiro y Visioli, 2016), sin embargo, el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos aún no se ha aclarado del todo.

Los secuestradores de ácidos biliares como la colestiramina también podrían secuestrar el colesterol dietario. Asimismo, se ha informado que el aluminosilicato nanoestructurado (NSAS), que está cargado negativamente, en comparación con los secuestradores de ácidos biliares cargados positivamente, pueden adsorber específicamente el colesterol, secuestrándolo de la fase acuosa del medio intestinal. Este es un mecanismo comparable al de la colestiramina, ya que se une de manera inespecífica a los ácidos biliares, el colesterol y los TAG (Yuwono *et al.*, 2018). La especificidad de la filtración del colesterol, la falta de exposición sistémica y la capacidad de reducir la formación de lesiones ateroscleróticas en modelos animales sugieren que el NSAS protonado puede convertirse en una terapia complementaria viable para reducir los niveles de colesterol (Shetkar y Singh, 2016). Las fibras dietéticas solubles en agua tienen propiedades de unión al colesterol intraluminal, y los compuestos han mostrado una reducción del LDL. Posteriormente, se desarrollaron muchas fibras sintéticas (surfomer y olestra) con una eficacia mejorada para secuestrar el colesterol (Shetkar y Singh, 2016). Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados iniciales, el desarrollo adicional de estos agentes se detuvo debido a su falta de eficacia en ensayos aleatorizados y efectos secundarios gastrointestinales significativos, lo cual sugiere que aún existen oportunidades de desarrollo para compuestos con mecanismos similares que ejerzan efectos significativos.

### **2.2.3 Compuestos Fenólicos con Efectos Inhibitorios sobre la Absorción del Colesterol**

Los compuestos fenólicos están presentes en alimentos de origen vegetal. Estos ejercen diversos efectos fisiológicos, además de su bien conocida acción antioxidante, promoviendo la salud al prevenir distintas enfermedades. En particular, diversos extractos naturales de plantas están ganando atención como tratamientos alternativos para la prevención y control de la hipercolesterolemia y otros efectos anti-ateroscleróticos. Uno de los mecanismos reductores del colesterol que se ha estudiado recientemente es su capacidad para inhibir la micelización luminal del colesterol y con ello evitar su absorción. Este y otros mecanismos se discuten a continuación, mientras que en el Cuadro 1 se presentan algunos de los estudios más relevantes en donde se describe el efecto de diversos compuestos fenólicos sobre la micelización de colesterol *in vitro*.

Ogawa *et al.* (2015) reportaron que las oolongteaninas presentes en el té oolong pueden inhibir el 98 % de la micelización del colesterol, mientras que Ontawong *et al.* (2019) reportan que un extracto del subproducto de café mostró una inhibición del 44 %. Se ha reportado que la curcumina inhibe la absorción de colesterol al disminuir los niveles de proteína y mRNA de NPC1L1 en líneas celulares Caco-2 (Feng *et al.*,2010). Se han descrito algunos mecanismos a través de los cuales las catequinas presentes en el té verde (*Camellia sinensis*) disminuyen la solubilidad micelar del colesterol. Desde un punto de vista molecular, se ha reportado la existencia de un dominio hidrófobo en catequinas galoiladas, las cuales tienen una mayor afinidad por las bicapas lipídicas hidrófobas presentes en las micelas, en comparación a las catequinas libres (Kajiya, Kumazawa, y Nakayama, 2001), que a su vez les permite interactuar directamente con el colesterol a través de interacciones hidrofóbicas (Kobayashi y Ikeda, 2013).

Cuadro 1. Fuentes vegetales con efecto inhibitorio sobre la micelización del colesterol *in vitro*.

Compuestos fenólicos	Extracto	% de inhibición	Referencia
Procianidinas	Cacao	98	Osakabe y Yamagishi, 2009
	Manzana	85	Ogino <i>et al.</i> 2007
Flavan-3-oles, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido gálico	Corteza de canela	98.1	Prabhashini <i>et al.</i> 2017
	Té oolong	98	Ogawa <i>et al.</i> 2015a
Catequinas	<i>Spirogyra neglecta</i>	83	Duangjai <i>et al.</i> 2016
	Café	44	Ontawong <i>et al.</i> 2019
	Té ( <i>Camellia sinensis</i> )	33.5	Sakakibara <i>et al.</i> , 2019
	Semilla de uva	11.8	Ngamukote <i>et al.</i> 2011
Epicatequina	Semilla de uva	19.5	Ngamukote <i>et al.</i> 2011
Ácido gálico	Semilla de uva	22.2	Ngamukote <i>et al.</i> 2011
Cianidina-3-glucósido (C3G)	Moras	30	Thilavech y Adisakwattana, 2019
Ácido clorogénico, catequina, epicatequina	Manzana ‘Annurca’	58.3	Carlo <i>et al.</i> 2018
Antocianinas	Arándano	51.5	Wang <i>et al.</i> 2018
Curcumina	Curcumina	40	Feng <i>et al.</i> 2010
Catequina, galato de epigalocatequina, kaempferol	Té halcón	36.8	Feng <i>et al.</i> 2019
Epigalocatequina y catequina	Té blanco	32.4	Carlo <i>et al.</i> 2013
Ácido ferúlico	Salvado de arroz	29	Bhaskaragoud <i>et al.</i> 2016

También se han reportado interacciones entre el galato de epigallocatequina con el ácido taurocólico, lo cual está mediado por puentes de hidrógeno formados con el grupo carbonilo y los enlaces hidrofóbicos con el anillo aromático (Sakakibara *et al.*, 2019). Asimismo, se ha reportado que los compuestos fenólicos de un extracto de manzana ‘Annurca’, disminuyeron la solubilidad micelar *in vitro* del colesterol. En este caso, el mecanismo de acción se basa en la interacción de los compuestos fenólicos con ácidos biliares y con el grupo trimetilamina de la fosfatidilcolina de las micelas, lo cual lleva a la precipitación del colesterol (Carlo *et al.*, 2018).

De acuerdo con el estudio de Aissata *et al.* (2019), en donde se analizó el efecto de varias fuentes de compuestos fenólicos, la orquídea (*Dendrobium catenatum*) presentó la actividad inhibitoria más alta (42.33 %), seguido de *Lycium barbarum* (33.08 %), té verde (26.33 %) y espino (*Crataegus monogyna*) (19.73 %). De acuerdo con esto, los extractos de dichas plantas son capaces de retrasar la digestión y absorción de colesterol, a través de mecanismos ejercidos a nivel gastrointestinal. Diferencias en los efectos inhibitorios entre ellas sugieren que variaciones en el perfil y concentración de sus compuestos bioactivos afecta significativamente su bioactividad. Otro estudio *in vitro* demostró que un extracto de melón amargo inhibió en un 82 % la micelización del colesterol, lo cual se atribuyó a que los compuestos ahí presentes favorecieron su precipitación (Su *et al.*, 2015). Se sabe que la cianidina-3-glucósido (C3G), catequina y ácido clorogénico presentes en un extracto de *Lonicera caerulea*, inhiben la micelización del colesterol, además de ejercer efectos complementarios como inhibir la expresión de los genes NPC1L1 y ACAT2 (acetil-CoA acetil transferasa 2), ambos relacionados a la absorción de colesterol en células Caco-2 tratadas con solución micelar de colesterol (Liu *et al.*, 2018).

Un estudio reciente reveló que la C3G presente en moras y zarzamoras, precipitó el colesterol de una solución micelar y formó un complejo insoluble, lo cual secuestra el colesterol antes de ser absorbido. Asimismo, exhibió capacidad de unión a ácidos biliares (ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico y ácido glicodesoxicólico), formando un complejo insoluble que es dirigido a excreción por vía fecal. Estos resultados sugieren que la C3G puede actuar como secuestrante de ácidos biliares, lo que resulta en un aumento del metabolismo del colesterol y una disminución de la absorción de colesterol intestinal (Thilavech y Adisakwattana, 2019)(Thilavech y Adisakwattana, 2019). Duangjai *et al.* (2016) reportaron los efectos de los extractos de cinco

plantas utilizadas en la medicina tradicional, sobre la inhibición de la micelización del colesterol. El extracto de *Polygonum odoratum* presentó la mayor actividad inhibitoria (86 %), seguido de *Citrus hystrix* (82 %), *Bombax ceiba* (80 %), *Azadirachta indica*. var. *Siamensis* (78 %) y *Solanum torvum* (76 %) (Duangjai, Limpeanchob, Trisat, y Ounaroon, 2016). Los autores sugieren que la unión de los compuestos bioactivos de estas plantas y los ácidos biliares es un posible mecanismo para reducir la solubilidad del colesterol micelar, y por lo tanto disminuir los niveles de colesterol sérico.

Feng *et al.* (2019) evaluaron el efecto de epigallocatequina y catequina de té blanco sobre la micelización de colesterol en un modelo *in vitro*. Se demostró que los ésteres de galato de catequina muestran una mayor afinidad por la bicapa lipídica, y, por lo tanto, por el colesterol, lo cual es más efectivo para reducir su solubilidad micelar. Se sugiere también que los ésteres de galato de catequina podrían actuar como las  $\beta$ -ciclodextrinas, al promover la formación de complejos similares a micelas en los que el colesterol se incorpora de forma selectiva, evitando así su absorción y dando una falsa impresión de transporte (Carlo *et al.*, 2013). Otros han evaluado el efecto de catequina, galato de epigallocatequina, kaempferol y quercetina presentes en té halcón, sobre la absorción de colesterol. Los autores proponen que los compuestos bioactivos inhiben la absorción de colesterol libre mediada por NPC1L1, lo que conduce a una disminución en los niveles de colesterol intracelular, seguido de la activación de la vía SREBP2 y la regulación por aumento de la expresión de LDLR. En conjunto, esto promueve la eliminación del LDL en un modelo *in vitro* utilizando células Caco-2 (Feng *et al.*, 2019).

Se ha propuesto que las antocianinas presentes en arándanos pueden unirse a los ácidos biliares, disminuyendo así su reabsorción e incrementando su excreción fecal, de manera similar a los secuestradores de ácidos biliares (Lijun *et al.*, 2018). Otros demuestran que los taninos condensados presentes en manzana verde son capaces de precipitar colesterol (43.9 %), a través de interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Zeng *et al.*, 2020). Asimismo, estos pueden interactuar con los ácidos biliares de las micelas a través del grupo trimetilamonio de la fosfatidilcolina, conduciendo así a la precipitación del colesterol *in vitro*, sugiriendo que la interacción directa de los taninos con colesterol, así como con ácidos biliares podría contribuir a los efectos hipocolesterolemiantes de estos compuestos.

Se ha reportado el efecto inhibitorio de la micelización del colesterol por los compuestos fenólicos presentes en canela, así como inhibición de la enzima colesterol esterasa y su unión con ácidos biliares *in vitro* (Prabhashini *et al.*, 2017). Se ha demostrado también que los principales compuestos fenólicos de semilla de uva (ácido gálico, catequina y epicatequina), disminuyen la concentración de colesterol, al unirse a los ácidos biliares y disminuir la solubilidad del colesterol en las micelas, así como inhibir la actividad de la enzima colesterol esterasa pancreática (Ngamukote *et al.*, 2011).

Sin embargo, en comparación con un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*, existen pocos estudios *in silico* donde han explorado los patrones de interacción entre el colesterol y los compuestos fenólicos. Zheng *et al.* (2020) realizaron simulaciones de la teoría funcional de la densidad (DFT) para estudiar la interacción de las catequinas y el colesterol, así como también analizaron los sitios de unión entre ellos. La interacción entre las catequinas y el colesterol está mediada principalmente por enlaces de hidrógeno que se forman entre ambos, sin embargo, las transferencias de carga intermolecular e intramolecular (entre el anillo aromático y el grupo hidroxilo) promovidas por las catequinas mejoran en gran medida estos enlaces. Por lo cual, se sugiere hasta cierto punto que las catequinas pueden influir en la micelización del colesterol formando sustancias insolubles con él, de modo que se reduce su absorción intestinal. Giangreco *et al.* (2018) realizaron simulaciones de dinámica molecular para comprender mejor el proceso de formación de micelas mixtas, y, en consecuencia, cómo el galato de epigallocatequina podría posiblemente interferir en este proceso. Los autores observaron que este compuesto se incorpora a la superficie micelar, por lo que está posicionado para interferir con el reconocimiento de otras partículas o la recombinación micelar, conduciendo así a una reducción significativa del movimiento de difusión de los lípidos micelares, y modulando la absorción del colesterol en micelas fisiológicas.

### 2.3. Proceso de Absorción Intestinal del Colesterol

Los fenómenos fisiológicos y bioquímicos que intervienen en el metabolismo pre-sistémico

(intestinal) del colesterol (Figura 2), son importantes en el diseño de fármacos para su control sistémico. En el tramo duodeno-yeyuno proximal es donde la absorción de colesterol dietario y endógeno es más eficaz. Este proceso inicia a nivel intra-luminal por acción de enzimas pancreáticas que hidrolizan TAG (lipasa) y colesterol esterificado (colesterol esterasa), ambas contribuyendo con los sustratos que habrán de contenerse dentro de las micelas (Lima y Fonollosa 2005; Trisat *et al.*, 2017). A medida que avanza la lipólisis, los ácidos grasos, monoacilgliceroles y colesterol libre tienden a acumularse en la interfaz de la emulsión, desplazando por su naturaleza anfipática a estas enzimas y otros componentes de la interface aceite-agua y formando gotas pequeñas.

Dado que el colesterol libre (y otros lípidos simples) es insoluble, su incorporación en micelas es necesaria. Este proceso requiere la formación de agregados de sales biliares y fosfolípidos, distribuyéndose el colesterol y los ácidos grasos al núcleo de la micela (Lima y Fonollosa, 2005), orientando las especies anfipáticas (fosfolípidos) al exterior de ella y conformando complejos esféricos denominados micelas mixtas. La partición de cada producto de lipólisis en micelas mixtas completa la etapa intra-luminal de la digestión y en la capa de agua sin agitar (“unstirred water layer”; USWL, Figura 2), el colesterol se libera y absorbe en el enterocito (Sakakibara *et al.*, 2019), por absorción activa principalmente (por ejemplo, mediante CD36 y NPC1L1).

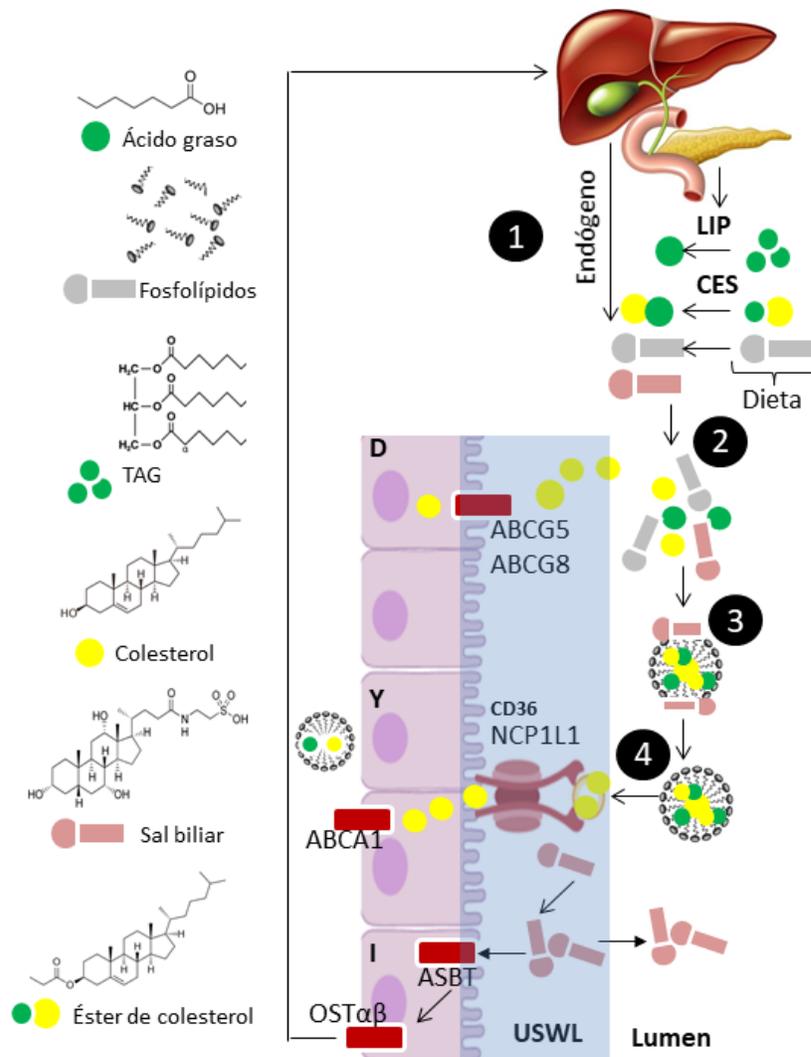


Figura 2. Proceso de micelización y absorción intestinal del colesterol. (1) Los TAG y colesterol esterificado provenientes de la dieta son degradados hasta sus componentes monoméricos por enzimas pancreáticas [lipasa (LIP) y colesterol esterasa (CES)], y se juntan con los provenientes del metabolismo endógeno en el lumen intestinal. (2) La acumulación secuencial de estos sustratos junto con las sales biliares y fosfolípidos (dietarios y endógenos) conduce a una reorganización de cada molécula de acuerdo con su polaridad, lo que conduce al ensamblaje de las micelas (3). Las micelas recién formadas migran hacia la capa de agua no agitada (USWL), para encontrarse con los dos sistemas de transporte de colesterol más conocidos (CD36 y NPC1L1), los cuales internalizarán al colesterol libre hacia el interior del enterocito (4). Con esto se inicia el metabolismo enteral y sistémico del colesterol y sales biliares que habrá de ser controlado, entre muchos otros factores, por diversos transportadores intestinales apicales (ABCG5, ABCG8, ASBT) y basolaterales (OST $\alpha$ ,  $\beta$ , ABCA1).

Este proceso de ensamblaje de micelas y entrega de contenidos al epitelio intestinal aparenta ser

sencillo, pero en realidad, la compleja biofísica que lo rige se ve afectada por varios factores como los cambios locales en la fuerza iónica, el pH y la concentración luminal y tasa de recambio de las diferentes sales biliares (Lentle y Janssen 2011). Cabe señalar que mientras que las micelas mixtas difunden más lentamente que sus monómeros constituyentes, el aumento local en la concentración de ácidos grasos dentro de la propia micela acelera su difusión al menos cien veces (Trisat *et al.*, 2017). Los procesos en el intestino antes y después de la formación de micelas, se han identificado como posibles objetivos potenciales para inhibir la absorción de lípidos y colesterol. Por ejemplo, se han estudiado diversos fármacos y productos naturales como inhibidores de la lipasa y esterasa de colesterol pancreático, inhibidores de transporte (anti-CD36 y anti-NPC1L1) y secuestradores del colesterol y sales biliares, todo esto impidiendo el ensamblaje final y absorción micelar (Figura 3). La ventaja que ofrecen las fuentes naturales es que en una misma se pueden encontrar fitoquímicos con efectos que actúen sobre todos y cada uno de estos puntos, teniendo un efecto sinérgico, y muy comúnmente, sin efectos colaterales como los observados con fármacos. (Zeng *et al.*, 2020) Por último, los nutraceuticos con efectos hipolipemiantes pueden presentar mecanismos de acción como inhibidores de la síntesis de colesterol hepático y potenciadores de la excreción de LDL (Figura 3). Sin embargo, hay muchos alimentos funcionales/suplementos nutricionales con mecanismos de acción múltiples o poco esclarecidos (Cicero *et al.*, 2017). Los nutraceuticos descritos en la literatura son numerosos y muestran diferentes niveles de efectividad y evidencia de su efecto hipolipemiante.

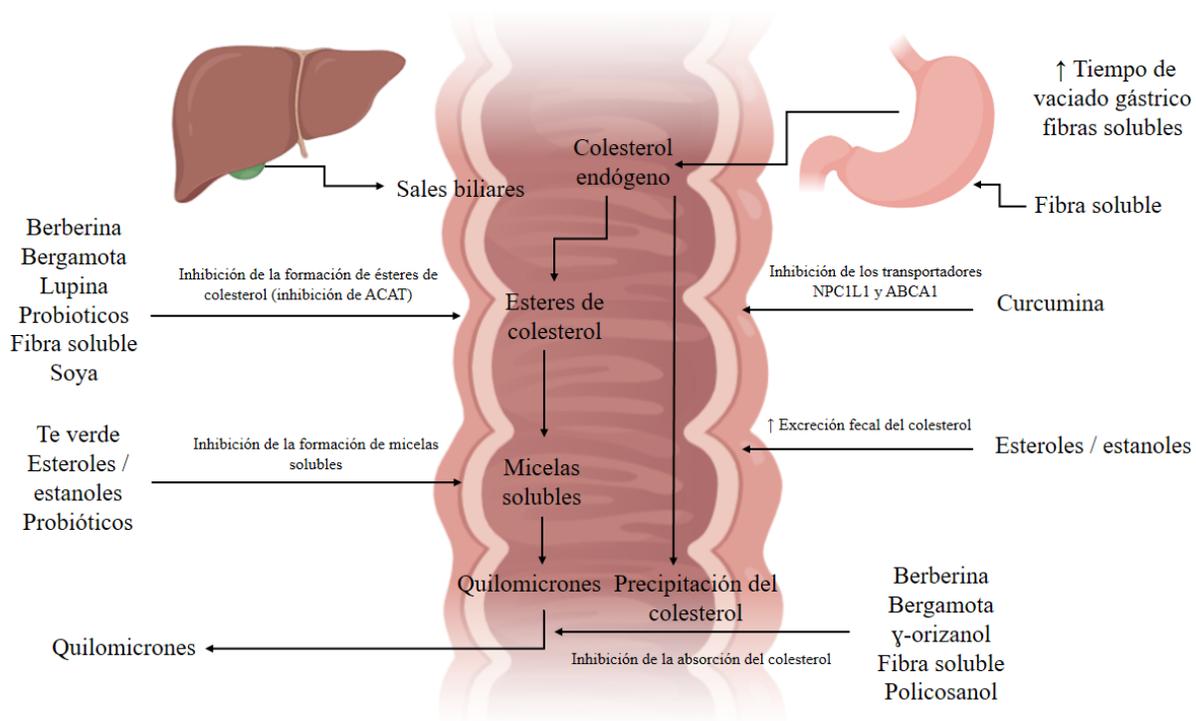


Figura 3. Los fitoquímicos actúan como inhibidores de la absorción intestinal de colesterol y potenciadores de la excreción de colesterol. ABCA1: transportador de casete de unión a ATP; NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1.

#### 2.4. El Aguacate (*Persea americana*) y sus Subproductos: Valor Funcional y Nutracéutico

El aguacate es un fruto perteneciente a la familia de las Lauráceas y a las especies *Persea gratissima* y *Persea americana* Mill, y es cultivado en las partes altas del Centro y Este-Central de México. Michoacán es el principal estado productor de aguacate, ya que en 2018 aportó el 76.7 % de la producción nacional, seguido de Jalisco y el Estado de México, con 9.2 y 4.5 % de la producción total, respectivamente. La superficie cosechada fue de 206,000 hectáreas, de las cuales, 73.8 % se encuentran en Michoacán, seguido de Jalisco y el Estado de México, con 9 y 4.3 %, respectivamente (Hernández, 2015). El aguacate es considerado un producto perenne, debido a que se cultiva durante todo el año. Existen aproximadamente 400 variedades que presentan diferentes formas, y cuyo peso ronda de 150 a 350 g. Una de las variedades más populares a nivel internacional es la variedad 'Hass', llamada así en honor a su desarrollador Rudolph Hass. Esta variedad proviene de injerto y es una mezcla de diferentes variedades de aguacate. Puede llegar a

producir entre 1,000 a 1,500 frutos al año, aproximadamente, los cuales se recolectan unos días antes de que maduren. Cuando ha madurado (después de su recolección), su cáscara adquiere un tono oscuro, casi negro, así como un gran sabor a nuez y avellana, con textura suave-cremosa y una semilla de pequeña a mediana (SAGARPA, 2017).

El aguacate se califica para su comercialización nacional (la cual se satisface completamente por producción interna) y exportación, aplicando los criterios de calidad y tamaño. En 2013, el valor de la producción total de aguacate fue de 18,175.74 millones de pesos, siendo la del aguacate 'Hass' de 17,915.42 millones de pesos (98.57 % del valor total de la producción). El precio al mayoreo del aguacate 'Hass' en las centrales de abasto del país fue de 38,689 pesos por tonelada, mientras que las importaciones mundiales han aumentado un 171.97 % en la última década, principalmente por Estados Unidos (76.5 %), Canadá (7.5 %) y Japón (5.6 %). En 2018 se exportaron 1.2 millones de toneladas, lo que representó un incremento de 21.1 % con respecto al año anterior. De acuerdo a esto, el aguacate contó con un valor de exportación de 2,625 millones de dólares en 2018 (Hernández, 2015; SAGARPA, 2017), lo que lo convierte en un producto de importancia económica para el país.

El aguacate tienen una alta calidad nutricional debido a su alto contenido de vitaminas, minerales, proteína y fibra, así como altas concentraciones de ácidos grasos insaturados que ejercen diversos beneficios a la salud (Yahia, 2010). La cáscara y semilla de aguacate tienen también un alto contenido de fitoquímicos bioactivos como ácidos fenólicos, taninos condensados y flavonoides, incluidas las procianidinas, flavonoles, hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Figuroa *et al.*, 2018; Hurtado-Fernández *et al.*, 2011). Estos compuestos han demostrado diversas actividades biológicas, como las propiedades antioxidantes e hipocolesterolémicas, las cuales se discuten a continuación.

#### **2.4.1 Aguacate cv. 'Hass' y sus Efectos sobre el Perfil Lipídico Sérico**

El aguacate contiene una gran variedad de compuestos bioactivos con beneficios a la salud, gracias

principalmente al mantenimiento de un perfil lipídico estable y efectos cardioprotectores relacionados. Su composición nutricional y fitoquímica se caracteriza por ácidos grasos monoinsaturados (AGMIs), fibra, vitaminas, minerales, fitoesteroles y compuestos fenólicos, todos con acción directa o indirecta sobre la salud cardiovascular (Figura 4). Furlan *et al.* (2017) evidenciaron los efectos cardioprotectores del consumo de aguacate, los cuales se atribuyeron a la presencia de fitoesteroles en la fracción lipídica. Los fitoesteroles son más hidrófobos que el colesterol, por lo que se retienen en las estructuras micelares y compiten con éste por ser micelizados, y, en consecuencia, disminuyen la absorción intestinal de colesterol. Los fitoesteroles son algunos de los compuestos más estudiados en el aguacate, sin embargo, el fruto contiene otros fitoquímicos capaces de ejercer bioactividades similares.

Se ha demostrado que el aguacate tiene efectos positivos sobre el peso corporal, debido a su contenido de fibra y su perfil de ácidos grasos. Al entrar en contacto con el agua, las fibras solubles forman un retículo donde ésta queda atrapada, originando soluciones de alta viscosidad que retardan el vaciamiento gástrico, lo cual prolonga la sensación de saciedad. Más del 70 % de la fibra del aguacate es insoluble, la cual tienen un efecto laxante, además de incrementar la motilidad y reducir el tiempo de tránsito intestinal (Salgado y Mansi 2008), disminuyendo así la absorción de los nutrientes energéticos y por tanto el peso corporal.

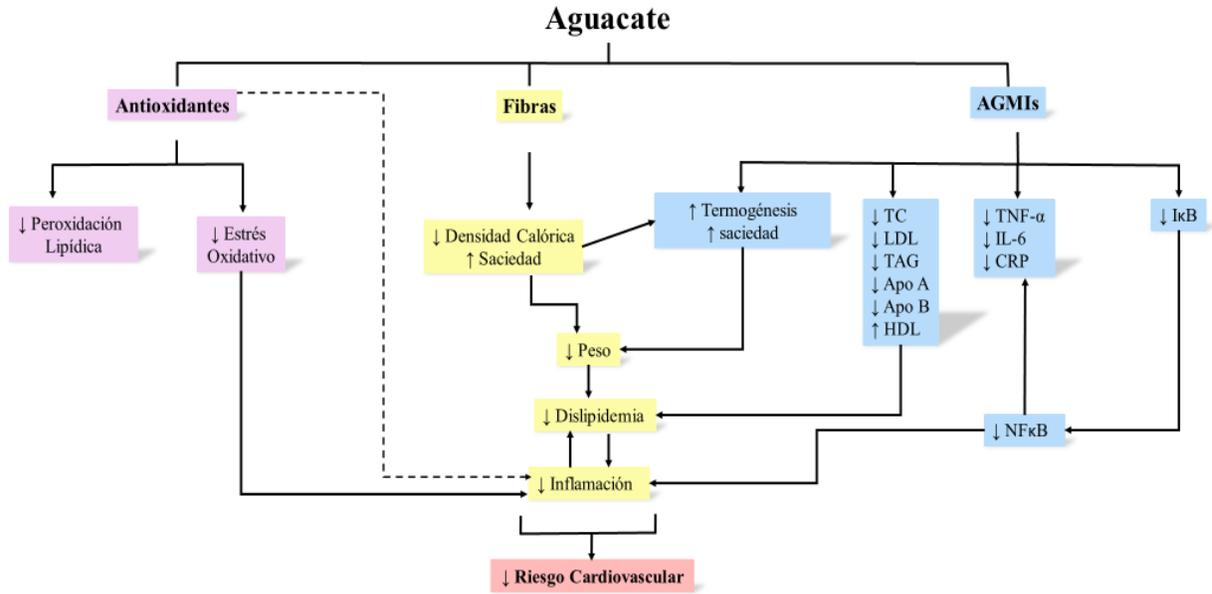


Figura 4. Posibles mecanismos involucrados en el efecto benéfico del aguacate en la prevención y control de enfermedades cardiovasculares. ApoA, apolipoproteína A; ApoB, apolipoproteína B; PCR, proteína C reactiva; HDL, lipoproteína de alta densidad; IκB: proteína inhibidora kappa B; IL-6, interleucina 6; LDL, lipoproteína de baja densidad; AGMIs: ácidos grasos monoinsaturados; NFκB: factor nuclear kappa B; PPAR α: receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas; CT, colesterol total; TAG, triacilgliceroles; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa.

Diversos beneficios se han atribuido al consumo de ácidos grasos del aguacate. El ácido oleico (C18:1) es el más abundante, el cual se ha reportado que puede reducir la concentración sérica de LDL, sin causar su oxidación. Éste es el sustrato principal de la ACAT, enzima hepática que cataliza la formación de ésteres de colesterol, por lo tanto, la presencia en exceso de colesterol libre se esterifica rápidamente, no conduce a la supresión de los receptores de LDL y favorece su catabolismo, disminuyendo así su concentración sérica. El ácido oleico puede también inducir una síntesis de colesterol endógeno más baja, en comparación con los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), de forma que los ácidos grasos del aguacate también interfieren en los mecanismos clave que promueven la reducción de colesterol endógeno y LDL (Silva-Caldas *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha sugerido que el ácido oleico puede reducir la concentración de marcadores inflamatorios como la interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), ejerciendo propiedades antiinflamatorias y protectoras vasculares. Éste y otros ácidos grasos presentes en el aguacate, pueden interferir en la vía de NFκB, evitando la aparición de una cascada inflamatoria de una manera dependiente de AMPK (Salvadó *et al.*, 2013; Villa-Rodríguez

*et al.*, 2011). Además, la capacidad antiinflamatoria de otros AGMIs también puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Se sabe claramente que el tipo de ácidos grasos consumidos en la dieta puede afectar significativamente el peso corporal, al presentar diferentes comportamientos metabólicos. El 64 % de los lípidos de aguacate son AGMIs, los cuales aumentan la termogénesis y se oxidan fácilmente, promoviendo un mayor gasto de energía y menor almacenamiento de la misma. El aumento en la termogénesis puede ocurrir por estímulo al sistema nervioso simpático, ejercido por los AGMIs, el cual es capaz de estimular a la lipasa sensible a hormonas, incrementando la  $\beta$ -oxidación a partir de lípidos presentes en los adipocitos, lo cual promueve la reducción del peso corporal (Silva Figueiredo *et al.*, 2017). Además, la fibra insoluble y AGMIs presentes en el aguacate pueden aumentar la saciedad, lo que contribuye a una menor ingesta calórica y almacenamiento en forma de tejido adiposo.

El aguacate contiene también compuestos fenólicos con potencial cardioprotector, entre los que destacan las proantocianidinas (PACs) y ácidos fenólicos. Las PACs son polímeros de catequina y epicatequina encontrados principalmente en la pulpa. Tanto las PACs como los monómeros que las constituyen, son conocidas por sus potentes capacidades antioxidantes. Los ácidos fenólicos más representativos presentes en el aguacate son el ácido *p*-cumárico y ácido quínico, entre otros, los cuales ejercen también altas capacidades antioxidantes (López-Cobo *et al.*, 2016; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos pueden tener efectos benéficos como reducir el estrés oxidativo, control glicémico, reducción de la oxidación del colesterol LDL y así mantener la salud cardiovascular. Sin embargo, sus efectos sobre la absorción y micelización del colesterol no han sido analizados.

#### **2.4.2 Subproductos del Aguacate como Fuente Potencial de Compuestos Bioactivos**

La producción industrial de aceite de aguacate y otros productos (por ejemplo, guacamole), genera subproductos como pulpa desgrasada, semilla y cáscara, lo que resulta en una gran cantidad de

residuos sólidos, ya que estos representan del 21 al 30 % del peso de la fruta (López-Cobo *et al.*, 2016). Normalmente, los residuos de aguacate no se utilizan y se descartan directamente, lo que representa un problema ambiental grave (Salazar-Lopez *et al.* 2020). Es por ello que resulta importante aprovechar estos subproductos, tanto para reducir su impacto negativo en el medio ambiente, como para agregarles valor, ya que pueden ser fuentes importante de compuestos fitoquímicos bioactivos (Siqueira *et al.*, 2015; Tremocoldi *et al.*, 2018).

Estos compuestos pueden ser aislados mediante extracción verde para reducir el impacto ambiental de la cadena de producción. Este es un procedimiento que considera un menor consumo de energía, uso de disolventes alternativos y productos naturales renovables, además de asegurar la obtención de extractos seguros y de alta calidad. El etanol es el bio-solvente más común y juega un papel importante en el reemplazo de solventes petroquímicos. Debido a su polaridad y muy alto poder disolvente, el etanol puede usarse para la extracción de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales (Tremocoldi *et al.*, 2018). Los subproductos de aguacate representan una fuente potencial de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos, los cuales ejercen una alta capacidad antioxidante, pudiendo incluso ser superior a lo encontrado en la pulpa (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Kosińska *et al.*, 2012; López-Cobo *et al.*, 2016), tales como catequina, PACs y polímeros de catequina (Soong y Barlow, 2004), los cuales pueden ser extraídos mediante química verde.

Se ha reportado que el extracto de subproductos de aguacate cuenta con aplicaciones potenciales como larvicidas, antifúngicas y antibacteriales, asimismo, pueden ser consumidas por el ser humano para ejercer efectos antioxidantes, antiprotozoarias, antidiabéticas, antihipertensivas e hipocolesterolémicas (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). Estas actividades sugieren que los subproductos de aguacate contienen compuestos bioactivos importantes que pueden recuperarse y aprovecharse para diferentes aplicaciones, sin embargo, estos siguen siendo subutilizados. Se han realizado diversos estudios en cáscara y semilla obtenidos en condiciones de laboratorio bajo condiciones controladas, mas no se ha estudiado lo generado por la industria de manera real. Cabe mencionar también que existen pocos estudios que utilicen subproductos obtenidos de la industria para analizar su bioactividad.

### **2.4.3. Posible Mecanismo de Acción de los Compuestos Fenólicos del Aguacate cv. 'Hass' sobre la Micelización de Colesterol**

La interrupción (directa o indirecta) de la formación y destino de las micelas mixtas ricas en colesterol y otros compuestos lipofílicos, es un mecanismo que se ha utilizado para disminuir la hipercolesterolemia con fármacos y ciertos compuestos fenólicos que podrían encontrarse en el aguacate y sus subproductos (Figura 5). Para ello, los compuestos fenólicos se unen al colesterol, formando un complejo de un tamaño mayor que no permite su incorporación a la micela. La micela puede ser transportada hacia el enterocito sin colesterol, mientras que el complejo colesterol-compuesto fenólico es excretado por vía fecal. En este sentido, los compuestos fenólicos presentes en la pasta de aguacate pudieran inhibir la micelización del colesterol a través de la formación de complejos con él, sin embargo, se necesitan estudios más detallados para aclarar cómo estos compuestos inhiben la absorción de colesterol en la luz intestinal y en los enterocitos.

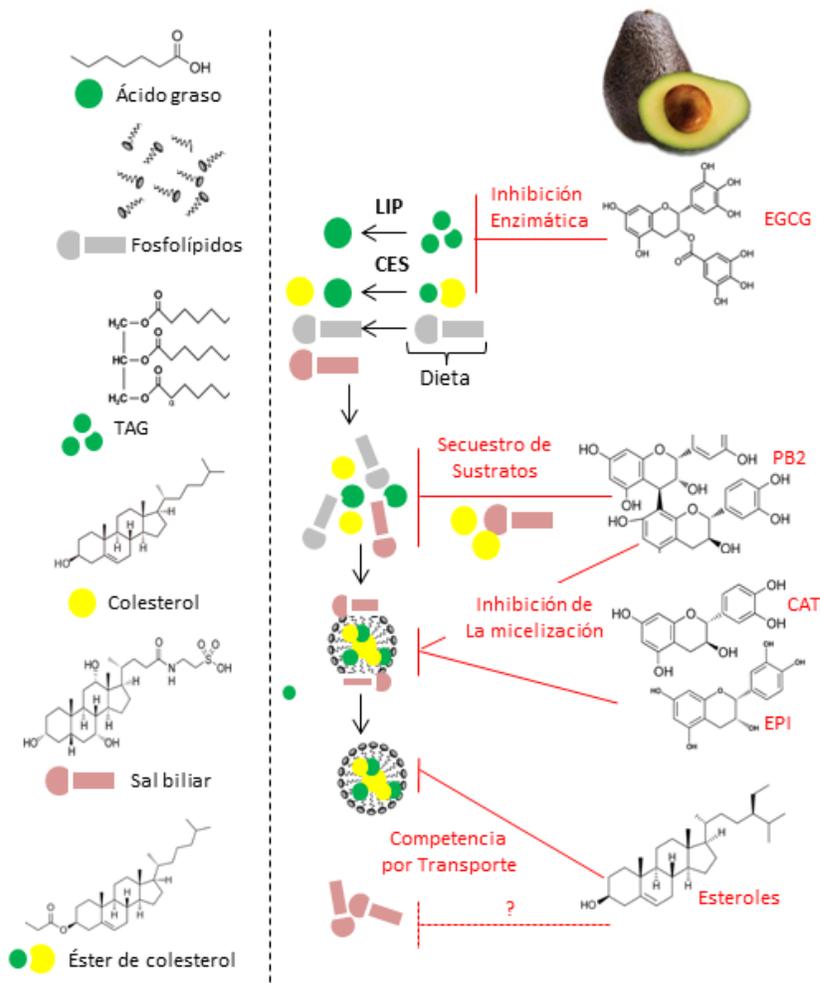


Figura 5. Posibles mecanismos de inhibición de la absorción del colesterol por los compuestos bioactivos presentes en el aguacate 'Hass' (pulpa y subproductos). Catequina (Cat), colesterol esterasa (CES), epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina (EPI), Lipasa (LIP), procianidina B2 (PB2).

## 2.5. Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad Enteral de Compuestos Fenólicos

Las múltiples bioactividades de los fitoquímicos del aguacate mencionadas anteriormente dependen de que estos sean liberados de la matriz alimentaria, se mantengan estables a nivel luminal, sean absorbidos y posteriormente distribuidos. Para determinar sus posibles efectos, es importante determinar cómo el proceso de digestión afecta su estabilidad y regula su absorción (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Domínguez-Avila *et al.*, 2017; Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2018).

Los modelos de digestión *in vitro* se han aplicado ampliamente con esta finalidad y ofrecen una herramienta alternativa a los estudios en animales, permitiendo así predecir la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos debido a su simplicidad y velocidad (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). A pesar de que los modelos *in vivo* proporcionan resultados más precisos, su uso puede ser limitado debido a restricciones éticas y prácticas.

La bioaccesibilidad de un compuesto se refiere a la fracción del mismo que se libera de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y está disponible para su absorción, mientras que la biodisponibilidad se define como la proporción que es efectivamente absorbida por el organismo (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). Los compuestos bioactivos, así como otros nutrientes, se hacen biodisponibles mediante transformaciones digestivas que los hidrolizan en compuestos más simples, quedando listos para ser absorbidos por las células del epitelio intestinal y sufrir un metabolismo pre-sistémico intestinal y hepático. Los efectos a la salud de los bioactivos dependen en gran medida de su biodisponibilidad, la cual está determinada por su liberación luminal y posterior absorción intestinal. El contenido y tipo de fibra dietéticas es uno de los factores más importantes que regula el proceso digestivo de los bioactivos, a través de interactuar y crear asociaciones con ellos a lo largo del tracto digestivo (Jakobek y Mati, 2019). Las fibras dietéticas son polímeros de carbohidratos resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, y pueden fermentarse parcial o completamente en el intestino grueso (Goñi *et al.*, 2009). Según su solubilidad, se pueden clasificar como solubles e insolubles. Las fibras solubles incluyen pectinas,  $\beta$ -glucanos, gomas, oligosacáridos, inulina y otros, mientras que las insolubles se encuentran celulosa, hemicelulosa, quitina y almidón resistente (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de compuestos vegetales que se pueden dividir en varias categorías, tales como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). Estos compuestos han mostrado muchas bioactividades potenciales; algunas están conectadas a sus interacciones con otros componentes alimenticios, como las fibras dietéticas. Estos compuestos pueden entrar en contacto con fibras dietéticas y unirse a su superficie, lo cual altera su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. La fracción no absorbida puede ser transportada por las fibras y llegar al colon, donde pueden ser liberados por la acción de las bacterias. Aquí, pueden ejercer directamente diversos efectos benéficos (Macdonald y Wagner, 2012), o bien, ellos o sus

catabolitos podrían ser absorbidos. Debido a sus acciones en el colon, se ha propuesto que transportar compuestos fenólicos hacia este tejido puede ser una de las funciones esenciales de las fibras dietéticas (Saura-Calixto, 2011).

Tanto los compuestos fenólicos como las fibras poseen numerosos grupos hidroxilo, lo que brinda la posibilidad de formar múltiples enlaces de hidrógeno entre sí (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014), y dado que ambos cuentan además con otros grupos funcionales, también son posibles las fuerzas de Van der Waals. Si primero se crean enlaces de hidrógeno, la distancia entre el compuesto fenólico y la fibra dietética puede acortarse, lo que permite las interacciones de Van der Waals (Wu *et al.*, 2011). Existe también la posibilidad de formar interacciones hidrofóbicas entre estos compuestos, disminuyendo así la energía superficial creada cuando las moléculas no solubles se agregan juntas en un entorno acuoso. Algunas fibras y compuestos fenólicos no son solubles en agua, lo que facilita la formación de agregados mediante interacciones hidrofóbicas. Los anillos aromáticos hidrofóbicos son los principales grupos funcionales presentes en los compuestos fenólicos que respaldan las interacciones hidrofóbicas (Saura-Calixto, 2011).

Se ha demostrado que varias fibras dietéticas unen compuestos fenólicos; las condiciones del tracto digestivo (pH, fuerza iónica y temperatura) tienen papeles importantes en ese proceso, controlando el mecanismo y la intensidad de la unión. Los compuestos fenólicos pueden liberarse de la matriz alimenticia en las partes superiores del tracto digestivo (bioaccesibles), sin embargo, su bioaccesibilidad es altamente variable, desde un porcentaje mínimo hasta más del 80 %, lo cual depende en gran medida de las fibras dietéticas que disminuyen o retrasan su bioaccesibilidad. Esto sugiere que la porción de compuestos fenólicos que llega al intestino grueso es mayor si el alimento es rico en fibra (Jakobek y Mati, 2019). Por lo cual, es importante determinar el comportamiento de la pasta de aguacate bajo condiciones del tracto digestivo.

Para el caso que nos ocupa, se ha evidenciado que el aguacate mejora la absorción de nutrientes cuando se usa en combinación con otros alimentos y suplementos (Unlu *et al.*, 2005). Los alimentos de origen vegetal suelen presentar una matriz desafiante para la utilización de la vitamina A, lo que dificulta la absorción y conversión de la provitamina A en vitamina A (Tang *et al.*, 2005). La absorción de provitamina A de fuentes vegetales es típicamente pobre; se ha demostrado que el

consumo de alimentos ricos en lípidos mejora la absorción de vitaminas liposolubles, incluida la vitamina A. La presencia de grasas solubles durante la digestión facilita la formación de micelas mixtas que facilitan su absorción (Reboul, 2013). Las absorciones de provitamina A, incluidos  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína y zeaxantina, mejoraron cuando se consumieron juntamente con aguacate, lo cual puede atribuirse al alto contenido de AGMI del aguacate. Se ha demostrado que el aguacate mejoró la utilización de provitamina A al aumentar su tasa de conversión a vitamina A en participantes con baja eficacia de conversión (Kopeck *et al.*, 2014). La mayor absorción de provitamina A se ha atribuido a la formación mejorada de micelas mixtas en el lumen, aumentando la solubilidad y facilitando la absorción por los enterocitos. Debido a su matriz alimentaria rica en esteroides vegetales y AGMI, los aguacates pueden proporcionar una absorción mejorada de compuestos lipofílicos en comparación con otras frutas y verduras. Como se estableció para la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno, es probable que la absorción de otros compuestos lipofílicos se mejore de manera similar con el consumo con aguacate. La literatura actual proporciona poca información sobre el efecto de la matriz de aguacate en la absorción de vitaminas y fitoquímicos solubles en agua (Bhuyan *et al.*, 2019).

### **3. HIPÓTESIS**

Los compuestos bioactivos de la pasta de aguacate cv. 'Hass' son bioaccesibles en la fase gástrica, y sus principales compuestos fenólicos podrían interactuar con el colesterol

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Realizar una caracterización química de la pasta de aguacate cv. 'Hass', y evaluar la bioaccesibilidad e interacciones de sus principales compuestos fenólicos con el colesterol.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Realizar una caracterización fisicoquímica, proximal, perfil de los principales compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.
2. Evaluar el efecto de las diferentes etapas de una digestión *in vitro*, sobre la liberación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en la pasta de aguacate cv. 'Hass'.
3. Caracterizar *in silico* las interacciones de los principales compuestos fenólicos identificados en la pasta de aguacate cv. 'Hass' con el colesterol.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material Vegetal

La pasta de aguacate cv. 'Hass' utilizada en el presente estudio fue amablemente donada por el Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario (CIDAM) de Michoacán, la cual proviene del procesamiento industrial de aguacate para la extracción de su aceite y se compone de pulpa desgrasada, cáscara y semilla. La pasta fue transportada al Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), donde se almacenó a  $-25^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó durante 72 h, para su uso posterior.

### 5.2 Reactivos

Se utilizó etanol 99.5% (459836-1L), hexano 95% (296090-1L), butanol 99.5% (537993-1L), acetona 99.5% (179124-1L), acetato de sodio (S8625), 2, 4, 6-Tris-(2-piridil)-S-triazina (TPTZ, T1253), 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH, 257621-100MG), ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS, A1888), diclorhidrato de 2,2'-azobis 2-metilpropionamida (AAPH, 440914-25G), ácido clorhídrico (320331-6X2.5L), cloruro de sodio (S7653),  $\alpha$ -amilasa (A3176), sales biliares (1071304), reactivo de Folin-Ciocalteu (F9252), carbonato de sodio (S7795-500G) y cloruro férrico (157740-5G), adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA). El papel filtro Whatman No.1 (10292221) se adquirió de Thermo Fisher Scientific (EUA).

## 5.3 Características Fisicoquímicas y Análisis Proximal de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

### 5.3.1 Color

Las variables de color CIE L\*, a\* y b\* se midieron en tres puntos de la pasta liofilizada, utilizando un colorímetro CR-400HS (Konica Minolta Sensing Inc., EUA) (Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny, y Martín-Belloso, 2008). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron como °Hue.

### 5.3.2 Sólidos Solubles Totales, Acidez Titulable y pH

Se cuantificaron los sólidos solubles totales (SST, °Brix) en una muestra de 10 g de pasta de aguacate y 50 mL de agua destilada (Quirós-Sauceda *et al.*, 2019). La mezcla se filtró y los SST se midieron directamente a partir del residuo filtrado, usando un refractómetro digital Abbe (E-Inginst Electron Corp., EUA). También se determinó la acidez en una mezcla que contenía 5 mL de pasta de aguacate, 50 mL de H<sub>2</sub>O y 0.1 % de fenolftaleína., la cual se tituló con NaOH 0.1 M a un pH de 8.1. La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico (Bartolomé, Rupérez, y Fúster, 1995). Asimismo, el pH se determinó utilizando un medidor de pH electrónico (Fisher Scientific, EUA.).

### 5.3.3 Humedad

El porcentaje de humedad se determinó por el método de Ozdemir y Topuz (2004), con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de pasta liofilizada de aguacate en una charola de aluminio previamente seca y pesada. Ésta se colocó en una estufa al vacío a una temperatura de 70 °C durante

un periodo de 24 h. Posteriormente, la muestra se colocó durante 30 min en un desecador y se registró el peso. El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia del peso de la muestra antes y después del secado. Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### 5.3.4 Proteína

El contenido de proteína se determinó por la técnica de micro Kjeldahl, de acuerdo a la metodología reportada por la AOAC (1990). Para ello, se pesaron 0.2 g de pasta de aguacate y se colocaron dentro de un matraz micro Kjeldahl de 100 mL. Se añadieron también 1.5 g de una mezcla de 5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  y 93 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , además de 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, y se colocaron en el digestor a temperatura media, hasta que la muestra fue digerida durante aproximadamente 5 min. Luego se agregaron 10 mL de agua destilada para disolver la muestra y se vació el contenido del matraz en el equipo de destilación.

Se colocó un vaso de recuperación con 25 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4 % (p/v) en la salida del equipo, se agregaron dos gotas de rojo de metilo (0.125 g rojo de metilo y 0.08 g de azul de metileno en 100 mL de alcohol). Posteriormente, se agregó una solución de NaOH al 40 % (p/v) en el receptor del destilador, hasta que se formó una mezcla color café, a partir del cambio de coloración de la solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . El destilado que se recuperó fue titulado con HCl 0.1 N. Se registró el volumen de HCl que se añadió. Se calculó el porcentaje de nitrógeno como se muestra en la Ecuación 1.

$$(1) \quad \% \text{ Nitrogeno} = \frac{N \times V \times 14.007}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde N es la normalidad del ácido de valoración, V es el volumen en mL del ácido gastado y 14.007 es el peso atómico del nitrógeno.

Una vez obtenido el porcentaje de nitrógeno, se calculó el porcentaje de proteína como se muestran en la Ecuación 2. Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína, realizando las determinaciones por triplicado.

$$(2) \quad \% \text{ Proteína} = \%N \times F$$

Donde N es el porcentaje de nitrógeno y F es el factor de conversión a proteína (6.25).

### **5.3.5 Lípidos Totales**

El contenido de lípidos totales se determinó por el método de la IUPAC (1979), utilizando un equipo Soxhlet. Se pesaron 2 g de pasta liofilizada de aguacate, la cual se colocó dentro de un dedal de extracción, y se registró el peso del vaso para extracción de lípidos totales. El dedal de extracción se colocó en el aparato, añadiendo después suficiente éter de petróleo para la extracción de lípidos de la muestra. El proceso se llevó a cabo por un período de 4 h, posteriormente, el vaso con los lípidos extraídos se colocó en una estufa a 100 °C durante 15 min, luego en un desecador durante 15 min y finalmente se registró su peso. El contenido de lípidos totales se obtuvo por diferencia de peso entre el vaso con lípidos extraídos, con respecto al vaso vacío.

### **5.3.6 Ceniza**

El contenido de ceniza se cuantificó mediante la metodología reportada por la AOAC (1990), en una mufla (Termolyne, EUA). Se calentaron tres crisoles de porcelana a 550 °C por 1 h para eliminar la humedad, se enfriaron a 25 °C en un desecador por 30 min y se registró su peso. Posteriormente, se colocaron 1.5 g de pasta de aguacate en cada uno de ellos. Las muestras se pre-

incineraron en una placa de calentamiento a temperatura media, luego, se calcinaron en la mufla a 550 °C durante 12 h hasta obtener cenizas blancas. El porcentaje de ceniza se calculó por diferencia de peso de los crisoles antes y después de la incineración.

#### 5.4 Obtención de Extractos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

Se preparó un extracto de pasta de aguacate de acuerdo a la metodología descrita por Palafox-Carlos *et al.* (2012). Para ello, se utilizó 1 g de muestra y se homogeneizó con 20 mL de etanol: agua (80:20, v/v). Se colocó durante 30 min en un sonicador (Branson, EUA) y se centrifugó (Beckman Coulter, EUA) a 9,400 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y los residuos de la extracción se lavaron dos veces más con 10 mL de etanol al 80%. Los sobrenadantes obtenidos se combinaron y filtraron a través de papel Whatman No. 1. El extracto obtenido fue alícuotado y almacenado a -20 °C en contenedores ámbar en una atmósfera de nitrógeno. Las alícuotas se utilizaron para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante descritos a continuación.

#### 5.5 Cuantificación de Compuestos Bioactivos de la Pasta de Aguacate cv.'Hass'

##### **5.5.1 Compuestos Fenólicos Totales**

El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, basado en el procedimiento reportado por Singleton y Rossi, (1965), utilizando ácido gálico como estándar. Brevemente, se mezclaron 30 µL de extracto etanólico de pasta de aguacate, 150 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (previamente diluido 1:10 en agua destilada) y 120 µL de carbonato de sodio al 7.5%. La absorbancia de la solución resultante se midió a 765 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, EUA) después de un periodo de

incubación en oscuridad de 30 min. Las absorbancias obtenidas se utilizaron para cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales, el cual se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de peso seco (ps). Los análisis fueron realizados por triplicado.

### **5.5.2 Flavonoides Totales**

El contenido de flavonoides totales se determinó utilizando el método espectrofotométrico descrito por Floegel *et al.* (2011). Brevemente, se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar (catequina) con 1 mL de agua destilada y 75  $\mu\text{L}$  de solución de nitrito de sodio al 5 % (p/v). Después de 5 min de incubación, se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio, tras 1 min se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 1 M y 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se agitaron vigorosamente y se pipetearon 300  $\mu\text{L}$  a un pocillo de microplaca. La absorbancia se midió inmediatamente a 496 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. El contenido de flavonoides se expresó como mg equivalentes de catequina (EC)/g ps. Los análisis se realizaron por triplicado.

### **5.5.3 Taninos Hidrolizables y Condensados**

El contenido de taninos hidrolizables y condensados se determinó a partir de los residuos de la extracción etanólica antes mencionada, utilizando la metodología de Hartzfeld *et al.* (2002). Para determinar taninos hidrolizables, se recuperaron tres pellets de la pasta de aguacate de la extracción etanólica, los cuales se sometieron a una hidrólisis con 20 mL de metanol y 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por 20 h a 85 °C bajo condiciones de agitación constante en un baño de agua (Thermo Scientific, EUA). Posteriormente, los taninos hidrolizados se incubaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Después, el sobrenadante fue filtrado a través de papel Whatman No. 1 y se aforó a 50 mL con agua destilada. Se realizaron dos lavados adicionales con 10 mL de agua destilada; en cada lavado, la muestra se centrifugó y filtró. El volumen que se recuperó se aforó a 50 mL utilizando agua destilada. La absorbancia del

sobrenadante obtenido se midió a 530 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. Los resultados se expresaron como mg EAG/g ps.

Para la determinación de antocianinas presentes en los taninos condensados, se utilizaron tres pellets de pasta de aguacate recuperados de la extracción. Se añadieron 10 mL de una solución que contenía 975 mL de butanol y 25 mL de HCl (37 %) a cada pellet de pasta de aguacate, posteriormente, se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 3 h. La solución se centrifugó a 15,000 rpm, durante 15 min a 4 °C, posteriormente, se realizaron 2 lavados más con 10 mL de butanol y HCl. Los sobrenadantes se aforaron a 50 mL y su absorbancia se midió a 555 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. Los resultados se reportaron como mg equivalentes de cianidina (ECid)/g ps.

#### 5.5.4 Carotenoides Totales

La extracción de carotenoides se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Davis *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.6 g de la pasta de aguacate, los cuales se mezclaron con 5 mL de BHT (hidroxitolueno butilado) al 0.05 % en acetona más 5 mL de etanol al 95 % y 10 mL de hexano. Las mezclas se colocaron en una placa agitadora a 180 rpm por 15 min. Se agregaron 3 mL de agua destilada, posteriormente, se separó la parte superior (hexano) y se midió su absorbancia a 450 nm en una celda de espectrofotómetro de 1 cm de longitud (Varian, EUA). La concentración de carotenoides se calculó en base al peso de la muestra, absorbancia y coeficiente de extinción molar, como se muestra en la Ecuación 3.

$$(3) \quad C = \frac{A \times V}{E \times g} \times FD$$

Dónde: A = absorbancia; V = volumen recuperado de la fracción hexánica; E = coeficiente de extinción molar de  $\beta$ -caroteno ( $2500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); g = masa de la muestra (g).

Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de carotenoides/g ps, realizando las determinaciones por triplicado.

### 5.5.5 Clorofilas Totales

La cuantificación de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$  se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por León-Chan *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.3 g de muestra, se mezclaron con 30 mL de acetona y se homogeneizaron por 1 min en un equipo Ultra Turrax (IKA Works, EUA). Posteriormente, la mezcla se incubó en la oscuridad por 30 min en hielo, se filtró con papel Whatman No. 1 y se aforó con acetona a 25 mL. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro en una celda de 1 cm de longitud, leyendo la clorofila  $\alpha$  a 661.6 nm y la clorofila  $\beta$  a 644.8 nm. Las concentraciones de clorofila  $\alpha$  y clorofila  $\beta$  se determinaron utilizando la Ecuación 4. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de clorofila/g de peso seco.

$$(4) \quad C\alpha \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 11.24 A_{661.6} - 2.04 A_{644.8} \quad C\beta \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6}$$

Donde  $C\alpha$  y  $C\beta$  son las concentraciones de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente,  $A_{661.6}$ ,  $A_{644.8}$  y son las absorbancias máximas de la muestra a 661.6 y 644.8 nm, respectivamente.

## 5.6 Determinación de la Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

### 5.6.1 FRAP

La capacidad antioxidante se determinó por el método de FRAP, de acuerdo a la metodología de Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP se preparó mezclando 0.5 mL de TPTZ 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM con 5 mL de tampón de acetato de sodio 0.3 M (pH 3.6) y 0.5 mL de solución de cloruro férrico 20 mM. Se mezclaron 20 µL del extracto etanólico de la pasta de aguacate y 280 µL del reactivo FRAP. La mezcla se incubó durante 30 min, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. Se preparó una curva de calibración usando Trolox como estándar. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox (ET)/g ps.

### 5.6.2 DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante por medio del radical DPPH, utilizando la metodología descrita por Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Se preparó una solución mezclando 2.5 mg de radical DPPH con 100 mL de etanol. Para la reacción, se mezclaron 20 µL de extracto de la pasta de aguacate con 280 µL de radical DPPH en una microplaca y se incubó durante 30 min. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. Los resultados se expresaron como mg ET/g ps.

### 5.6.3 TEAC

El ensayo para determinar capacidad antioxidante por TEAC se llevó a cabo siguiendo el método de Re *et al.* (1999). La solución madre del catión radical ABTS se generó mezclando 7 mM de

ABTS con 2.55 mM de persulfato de potasio en 10 mL de agua desionizada y se incubó en la oscuridad durante 16 h. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución madre ABTS con etanol absoluto a una absorbancia de  $0.70 \pm 0.05$  a 754 nm. Se mezclaron 5  $\mu$ L del extracto etanólico de la pasta de aguacate con 245  $\mu$ L de solución ABTS diluida. Después de incubar en oscuridad durante 5 min a 25 °C, se midió la absorbancia de la mezcla frente a un blanco (etanol) a 734 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega. Se preparó una curva de calibración usando Trolox como estándar. Los resultados se expresaron como mg ET/g ps.

#### 5.6.4 ORAC

Se determinó la capacidad antioxidante por el método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), de acuerdo a la metodología reportada por Robles-Sánchez *et al.* (2011). Se mezclaron 100  $\mu$ L del extracto etanólico de pasta de aguacate, 1.65 mL de tampón de fosfato 75 mM a pH 7, 150  $\mu$ L del reactivo AAPH (0.8 M) como generador de radicales peroxilo y 100  $\mu$ L de 35 fluoresceína (0.106  $\mu$ M). Posteriormente, las muestras fueron pre-incubadas a 37 °C durante 15 min y se adicionó el reactivo AAPH para iniciar la reacción. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 484 nm y 515 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron como mg ET/g ps.

#### 5.7 Perfil de Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

El perfil de compuestos fenólicos fue caracterizado mediante cromatografía líquida. Para ello, se obtuvieron extractos según lo descrito por Shivashankara *et al.* (2004) con algunas modificaciones. La pasta de aguacate liofilizada (0.5 g) se homogeneizó en 20 mL de etanol al 80 %, usando un homogeneizador básico Ultra Turrax a 25 °C. La mezcla se sonicó durante 30 min y se centrifugó a 9400 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y se realizó una extracción adicional sobre el residuo, como se describió previamente. Luego, los sobrenadantes se combinaron

y filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1. A partir de ahí, se tomó una alícuota de 10 mL, la cual se sometió a hidrólisis alcalina mediante la adición de 10 mL de NaOH 4 M, seguido de incubación durante 4 h a temperatura ambiente bajo luz tenue. Después de la incubación, los extractos se acidificaron a pH 2.0 con HCl 4 N. La solución acidificada se extrajo dos veces con 20 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron a sequedad a 35 °C en un evaporador rotativo. La extracción se realizó por triplicado.

Las muestras obtenidas se inyectaron en un equipo UPLC (Acquity, Waters, EUA.) equipado con un detector de díodos (DAD) siguiendo el método descrito por Velderrain-Rodríguez *et al.* (2018) con ligeras modificaciones. La separación se realizó en una columna Acquity UPLC™ BEH C18 (1.7 µm, 3.0 x 100 mm) a 60 °C. Se usó un sistema de fase binaria, siendo el solvente A agua con 0.5 % de ácido fórmico y B 100 % metanol. El gradiente aplicado fue: 0-0.25 min 20 % de B (flujo 0.4 mL/min); 5 min 20 % de A (0.2 mL/min); 12 min 45 % de B (0.180 mL/min); 25 min 100 % de B (0.1 mL/min); 16 min (40 % de B, 0.2 mL/min); 30 min 20 % de B (0.4 mL/min). La detección de ácido gálico, quercetina y rutina se realizó a 240 nm, 280 nm y 360 nm, respectivamente. La detección de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico se realizó a 320 nm. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó con curvas establecidas utilizando estándares externos. Los resultados se expresaron como µg/g ps.

### 5.8 Perfil de Carotenoides y Tocoferoles de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

La extracción de carotenoides y tocoferoles se llevó a cabo utilizando los métodos de Hess *et al.* (1991) con algunas modificaciones. La pasta de aguacate liofilizada (0.2 g) se mezcló con 1 mL de etanol con BHT y 1 mL de hidróxido de potasio al 50 %; la mezcla se agitó en vórtex durante 15 s y se incubó en un baño de agua a 70 °C (previamente calentado). Después de 10 min de saponificación, las mezclas se agitaron en vórtex durante 5 s y se devolvieron inmediatamente al baño de agua para continuar el proceso durante otros 20 min. Al final de esta etapa, los tubos se enfriaron en agua helada, se añadieron 5 mL de hexano se agitaron por vórtex durante 15 s y se centrifugaron a 1,500 rpm a 10 °C durante 7 min. Se transfirieron 600 µL de la capa superior de

hexano a un tubo Eppendorf, en donde el hexano se evaporó hasta sequedad y el extracto se reconstituyó en 200  $\mu$ L del etanol. Estas muestras se colocaron en viales con insertos para inyectar al equipo de HPLC.

El análisis de carotenoides se realizó en un HPLC-DAD serie HP1100, leyendo las absorbancias a 430, 450 y 471 nm, después de una separación a través de una columna de fase reversa C30 de 150  $\times$  4.6 mm y 3  $\mu$ m (YMC Inc., EUA). La fase móvil consistió en metanol/agua (96:4, v/v) que contenía acetato de amonio 0.05 M y una fracción en volumen de 0.05 % de trietilamina (solvente A) y metil ter-butyl éter (MTBE) (solvente B). El gradiente de elución fue (1) 10 min de solvente A de 100 a 90 %, (2) de 9 min a 69 % de solvente A y 31 % de solvente B, (3) de 16 min a 35 % de solvente A y 65 % de solvente B, y (4) una retención de 0.1 min a 65 % de solvente A y 35 % de solvente B. El contenido de carotenoides individuales (zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno) se obtuvo usando curvas de calibración de estándares puros.

Se analizó el contenido de tocoferoles en un equipo HPLC serie HP1100 equipado con un detector de fluorescencia (FLD), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 294 y 326 nm, respectivamente. El sistema de HPLC estaba equipado con una columna Prodigy C 18 de 250  $\times$  4.6 mm ID, 3  $\mu$ m (YMC Inc.) mantenida a 30 °C. La fase móvil fue metanol/agua (95:5 v/v), a flujo de 0.75 mL. La identificación de los tocoferoles se realizó comparando su tiempo de retención con el de los estándares. El contenido de tocoferoles individuales ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol) se obtuvo usando curvas de calibración de estándares puros.

### 5.9 Perfil de Ácidos Grasos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

La extracción de aceite para caracterizar el perfil de ácidos grasos se realizó según la metodología de Metcalfe *et al.* (1961) con ligeras modificaciones. Brevemente, se homogeneizaron 2 g de pasta liofilizada durante 1 min con 10 mL de metanol usando un Ultra Turrax. Se añadieron 20 mL de cloroformo, se homogeneizó durante 2 min y se filtró usando papel filtro Whatman No. 1. El sedimento se extrajo tres veces. El sobrenadante recuperado se transfirió a un embudo de

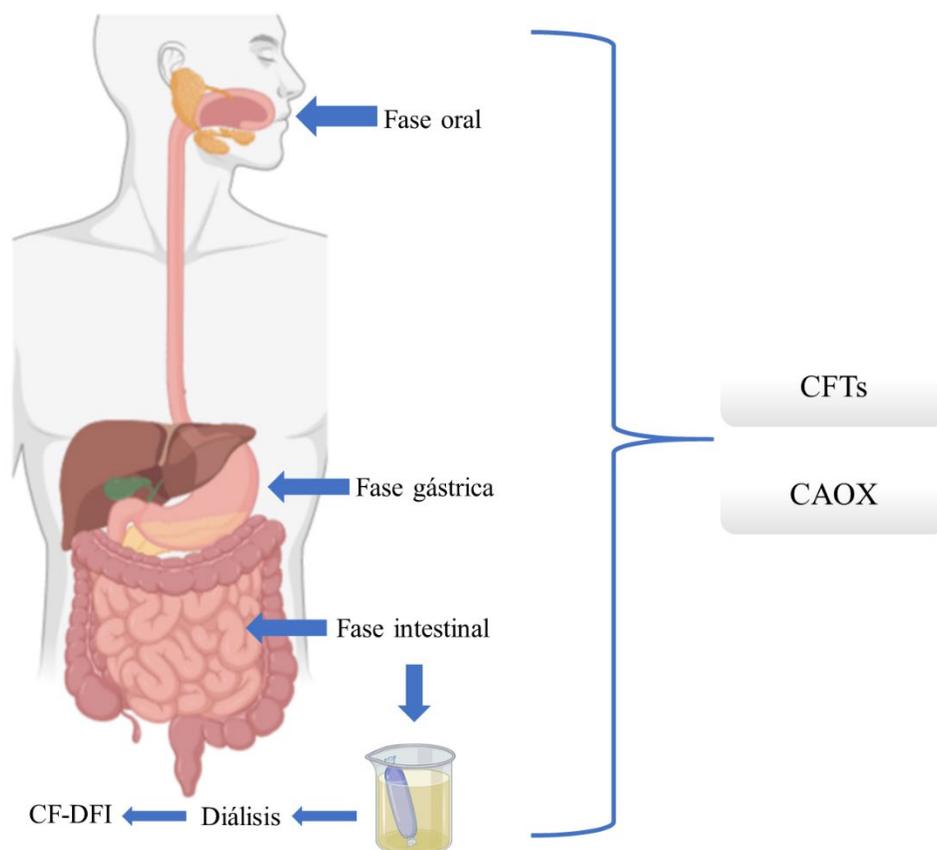
separación y se le añadieron 25 mL de cloruro de potasio al 0.88 % hasta que se observó la separación de fases. Se recogió una muestra de la fase inferior y se evaporó a sequedad usando un evaporador rotativo (Büchi, Suiza).

La muestra concentrada se colocó en un matraz de destilación y se unió a un condensador, después de agregar 10 mL de hidróxido de sodio (0.5 N) en metanol. Luego, las muestras se calentaron hasta ebullición y se colocaron en reflujo durante 10 min. Después, se añadieron 12 mL de trifluoruro de boro y se calentó a reflujo durante 3 min. Finalmente, se añadieron 4 mL de heptano y se calentó a reflujo durante 2 min. La muestra se transfirió a un tubo de ensayo y se añadió cloruro de sodio hasta que se observó un color blanco. Se añadió 1 g de sulfato de sodio y se agitó hasta que se separaron las fases.

La fase superior se separó con una pipeta Pasteur y se recuperó en un vial de 2 mL. La muestra se secó con nitrógeno y se almacenó congelado hasta el análisis. Los ácidos grasos se identificaron tras inyectar 1  $\mu$ L del extracto final en un sistema de cromatografía de gases (Agilent, EUA), equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de 30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m (Supelco, EUA). La cuantificación de los ácidos grasos se realizó utilizando el área bajo la curva de los picos identificados.

#### 5.10. Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante en la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' en un Modelo de Digestión *in vitro*.

El modelo de digestión *in vitro* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Minekus *et al.* (2014), e ilustrada de manera general en la Figura 6.



**Figura 6.** Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la pasta de aguacate en un modelo *in vitro*. Fase oral:  $\alpha$ -amilasa; Fase gástrica: pepsina; fase intestinal: pancreatina y sales biliares; diálisis 30, 60, 90 y 120 min; CF-DFI: liberación de compuestos fenólicos por difusión pasiva de la fase intestinal; determinación de CFTs: compuestos fenólicos totales; CAOX: capacidad antioxidante por los métodos de FRAP, DPPH y ABTS.

La digestión consistió en tres fases para simular secuencialmente la fase oral, gástrica e intestinal. Para la fase oral, se mezcló 1 g de pasta de aguacate liofilizada con 3.5 mL de solución oral (Cuadro 2), 0.5 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa, 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.3 M y 0.975 mL de agua destilada para alcanzar un volumen final de 5 mL. La mezcla fue incubada a 37 °C en un baño de agua con agitación durante 2 min. Después de la fase oral, se recogieron alícuotas de 2 mL de la muestra.

**Cuadro 2.** Preparación de soluciones madre de fluidos de digestión simulada

Sales	Fase oral (pH 7)	Fase gástrica (pH 3)	Fase intestinal (pH 7)
	Concentración mM		
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	-	47.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.15	0.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.06	0.5	-

Para la fase gástrica, se agregaron 6 mL de solución gástrica (Cuadro 2), 1.28 mL de solución de pepsina, 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M y el pH se ajustó a 3.0 usando HCl 1 M. Posteriormente, el volumen total de la mezcla se aforó a 8 mL con la adición de agua destilada y la mezcla se incubó en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 2 h. Después de la digestión gástrica simulada, se recogieron alícuotas de 2 mL de la muestra.

Para simular la digestión intestinal, el digesto de la fase gástrica se mezcló con 7.7 mL de fase intestinal (Cuadro 2), 3.5 mL de pancreatina, 1.75 mL de sales biliares y 28 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M. El pH de la mezcla se ajustó a 7.0 usando NaOH 1 M. Luego, el volumen total se aforó a 14 mL con agua destilada y la mezcla se incubó en un baño de agua con agitación a 37 °C durante otras 2 h. Se realizó una cinética de esta fase tomando una alícuota de 2 mL a los 30, 60, 90 y 120 min. Después de la fase intestinal, se tomó nuevamente una alícuota de 2 mL de la muestra.

El blanco (digestión sin muestra) también se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente y se usó para la corrección de interferencias enzimáticas. Las alícuotas de cada una de las fases se centrifugaron a 3,000 g, a 4 °C durante 10 min y los sobrenadantes se recuperaron y mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su posterior análisis. El contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en cada una de las fases fueron analizados de acuerdo a las metodologías mencionadas anteriormente.

### 5.11 Análisis *in silico*

Se evaluaron tres compuestos fenólicos previamente identificados por UHPLC-DAD en la pasta de aguacate cv. 'Hass': ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido protocatéquico utilizando la metodología descrita por Zheng *et al.* (2020). Se realizaron simulaciones basadas en la teoría funcional de la densidad (DFT) para estudiar la interacción entre los compuestos fenólicos y el colesterol, con el fin de encontrar los complejos más estables de estas moléculas. Primero se realizó un análisis conformacional, del cual se obtuvieron las diez conformaciones más estables para cada una de las moléculas (Schmidt *et al.*, 1993) utilizando el programa Gamess (V 2.0, Lynux, EUA), empleando el funcional Becke-Lee-Yang-Parr (BLYP) (Becke, 1988; Lee *et al.*, 1988) y un conjunto de bases con valencia doble zeta polarizada (6-31G\*) (Becke, 1988; Miehlich *et al.*, 1989; Pople *et al.*, 1993). Posteriormente, se seleccionó el conformero más estable para tomar sus coordenadas atómicas y generar el archivo de entrada para la optimización de geometría en fase gaseosa (enfoque estándar que proporciona una exitosa descripción de las longitudes y ángulos de enlace para moléculas biológicas típicas), con la intención de evaluar la reactividad que presenta dichas moléculas.

Por otro lado, los cálculos en solvente para obtener la energía (o energía libre), tienen una convergencia errónea y a menudo terminan la optimización de la geometría en un punto estacionario incorrecto. Cada molécula optimizada sirvió como input para hacer un cálculo de energía y de las propiedades de mapa electrostático (ESP) y cargas de Hirshfield. Los archivos de salida se analizaron utilizando el programa Mercury 2020.1 (Macrae *et al.*, 2008) y las energías de las moléculas optimizadas se expresaron en Hartrees, asimismo las energías de unión de los complejos, las energías de interacción de los complejos se determinaron utilizando la Ecuación 5.

$$(5) \quad E_{interacción} = (E_{molécula\ 1}) + (E_{molécula\ 2}) - (E_{complejo})$$

Donde *E* es energía.

## 5.12. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva (media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación). Las variables respuestas fueron la concentración de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Se realizó una correlación de Pearson entre la concentración de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante durante la digestión *in vitro* y se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias y la prueba de Tukey-Kramer para evaluar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), donde los factores de variación fueron las fases de digestión *in vitro* y como variable respuesta fueron los valores de fenoles totales y capacidad antioxidante resultantes de los métodos de Folin-Ciocalteu, FRAP, ABTS y DPPH. Los datos se analizaron en el paquete estadístico NCSS versión 2012.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Características Fisicoquímicas y Análisis Proximal de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

En la Figura 7 se presenta una imagen de la pasta de aguacate obtenida y procesada en el presente estudio, mientras que las características fisicoquímicas y el análisis proximal de la pasta de aguacate cv. 'Hass' se presentan en el Cuadro 3.



Figura 7. Pasta de aguacate: cáscara, semilla y pulpa desgrasada

**Cuadro 3.** Características fisicoquímicas y análisis químico de la pasta de aguacate cv. 'Hass'

Parámetro	Valor
<b>Características fisicoquímicas</b>	
<i>L</i> *	11.3 ± 0.7
<i>a</i> *	2.7 ± 0.3
<i>b</i> *	11.2 ± 0.8
<i>C</i> *	11.5 ± 0.8
°Hue	14.2 ± 13.3
°Brix	0.7 ± 0.1
Acidez titulable	0.5 ± 0.0
pH	4.3 ± 0.0

<b>Composición química (g/100g)</b>	
Humedad	27.8 ± 0.6
Proteína	13.8 ± 0.2
Lípidos	14.2 ± 0.2
Ceniza	2.8 ± 0.1
Carbohidratos*	41.4 ± 1.2

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (DE). \*Calculado por diferencia.

Los resultados obtenidos de  $L^*$  ( $11.3 \pm 0.7$ ),  $^{\circ}\text{Hue}$  ( $14.2 \pm 13.3$ ) y  $C^*$  ( $11.5 \pm 0.8$ ) presentaron valores bajos, debido al estrés mecánico que hubo durante la extracción de aceite. Además, esto se asocia al fenómeno de pardeamiento enzimático que se produjo durante y después del proceso. El pardeamiento enzimático es principalmente una consecuencia de la actividad de la enzima polifenol oxidasa, la cual cataliza la oxidación de sustratos fenólicos en quinonas, que posteriormente se polimerizan en pigmentos marrones (Tinello y Lante, 2018), lo cual conduce a una alteración del color y degradación de dichos compuestos.

Estos valores son menores a los reportados por Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) en cáscara de aguacate, quienes reportaron valores de  $L^*$   $26 \pm 0.9$ ,  $^{\circ}\text{Hue}$   $83.8 \pm 5.0$  y  $C^*$   $8.1 \pm 0.9$ , mientras que Villa-Rodríguez *et al.* (2011) obtuvieron valores  $L^*$  de  $26.3 \pm 0.5$ ,  $^{\circ}\text{Hue}$  de  $90.6 \pm 3.1$  y  $C^*$  de  $8.8 \pm 0.6$ . De manera similar, Ruiz-Pardo *et al.* (2014) encontraron valores  $L^*$  de 25,  $^{\circ}\text{Hue}$  de 67 y  $C^*$  de 8.5 en pulpa aguacate en estado de madurez 3. A este respecto, no se esperaba que la pasta de aguacate muestre características similares de color con la cáscara y pulpa de aguacate, debido a que ésta es una mezcla de varios tejidos. Existen estudios que mencionan que la disminución de los valores de  $L^*$ ,  $^{\circ}\text{Hue}$  y  $C^*$  está asociado a la degradación de la clorofila; un mecanismo de protección de las plantas contra la radiación solar, es disminuir su concentración de clorofila para evitar una sobrecarga de energía que pueda dañar irreversiblemente el sistema fotosintético de la planta, un aumento de C3G (Cox *et al.*, 2004; Medina-Carrillo *et al.*, 2017) y la biosíntesis del complejo enzimático que degrada el pigmento por etileno (Gwanpua *et al.*, 2018), además de estar influenciado por la temperatura de maduración. Estos procesos pudieron también contribuir a generar las tonalidades medidas en la pasta de aguacate.

Los parámetros fisicoquímicos encontrados en la pasta de aguacate considerablemente bajos, lo cual puede deberse a que la pasta de aguacate se almacenó durante largos periodos en la planta aceitera, sin contar con las condiciones óptimas de almacenamiento. Durante ese periodo, la pasta fue expuesta a la intemperie (sin control de temperatura, exposición al sol, etc.), lo cual posiblemente desencadenó una mayor degradación de compuestos, así como la activación de procesos enzimáticos. De acuerdo a los valores obtenidos, se observa que difieren a los reportados por Astudillo-Ordóñez y Rodríguez. (2018) en pulpa de aguacate cv. 'Hass' cosechados en diferentes localidades. Estos autores obtuvieron rangos de °Brix de 5.07-7.26, acidez titulable 9.24%-19.47% y pH 6.58-7.14. No se espera que la muestra aquí analizada presente valores similares a la pulpa, debido a que la pasta, como se mencionó anteriormente, está compuesta por una combinación de subproductos que presentan diferentes valores de estas propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, los valores aquí encontrados sí son similares a los reportados por Alissa *et al.*, (2020) en un extracto de semilla de aguacate, específicamente  $1.2 \pm 0.0$  de °Brix y  $5.8 \pm 0.0$  de pH.

Se ha reportado que almacenar aguacates durante periodos prolongados (más de 5 semanas), puede ocasionar una disminución de los °Brix, lo cual podría estar asociado a una mayor degradación de azúcares, proceso que ocurre principalmente en la etapa de maduración del fruto. La degradación de estos azúcares ocurre para utilizarlos como fuente de carbono y energía para la producción de etileno, procesos enzimáticos, así como modificaciones en el color de la cáscara (Astudillo-Ordóñez y Rodríguez, 2018; Liu *et al* 1999). En el caso de la acidez titulable, ésta tiende a disminuir debido al consumo de los ácidos orgánicos utilizados en diferentes ciclos metabólicos, así como los ácidos y carbohidratos que son utilizados para proporcionar energía durante el proceso de maduración (Taiti *et al.*, 2015). El comportamiento del pH está relacionado con el contenido de ácidos orgánicos presentes en este subproducto, ya que estos tienden a disminuir durante el periodo de maduración, conforme estos se consumen en diferentes ciclos metabólicos, además de que actúan como precursores de sustancias volátiles (Márquez *et al.*, 2017). En consecuencia, una mayor disminución del pH está asociada con la utilización en exceso de ácidos orgánicos almacenados en las vacuolas como sustrato respiratorio (Maftoonazad y Ramaswamy, 2008; Medlicott, Sigrist, Reynolds, y Thompson, 1987).

El análisis proximal de la pasta de aguacate se muestra en el Cuadro 3. Se obtuvieron valores altos de humedad, así como de proteína y lípidos, aunque el macronutriente mayoritario fueron los carbohidratos. Esto indica que la pasta conserva valores considerables tanto de lípidos como proteínas, debido a que el procesamiento para la producción de aceite de aguacate empleada por la industria no los extrae en su totalidad, dejando a la pasta como una fuente aprovechable de estos macronutrientes. El conocer el porcentaje de humedad permite identificar qué método de conservación utilizar para impedir el desarrollo de microorganismos y evitar deterioros enzimáticos. Los valores obtenidos son similares con los reportados por Araújo *et al.* (2018) en pulpa de aguacate, la cual contiene aproximadamente de 12-24% de lípidos, 1-3% de proteína, 0.8-1.5% de ceniza, pero difiere en el porcentaje de humedad (67-78%), esto se debe a que la pulpa contiene mayor contenido de agua (aproximadamente  $79.9 \pm 0.5$  g/100 g) (dos Santos, Alicieo, Pereira, Ramis-Ramos, y Mendonça, 2014), mientras que la pasta de aguacate contiene cáscara, semilla y pulpa desgrasada, los cuales contienen menor porcentaje de agua.

Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) reportaron que la cáscara de aguacate contiene 9.8 g/100g de lípidos, 13.7 g/100 g de proteína y 5.1 g/100 g de cenizas, valores menores tanto de lípidos y proteínas que los aquí reportados. Pahuá-Ramos *et al.* (2012) reportaron que la harina de semilla de aguacate contiene 4.4 g/100 g de lípidos, 4.8 g/100 g de proteína, 2.2 g/100 g de ceniza y 4 g/100 g de humedad, valores que también difieren a los reportados en la pasta de aguacate. De acuerdo a esto, la pasta de aguacate podría representar una fuente potencial de ingredientes alimenticios, debido a sus valores considerables de lípidos y proteínas (Araújo *et al.*, 2018). También se han reportado las aplicaciones del orujo de uva o el residuo de uvas prensadas, donde se observó que contienen entre un 6%-15% de proteína, 14-17% de lípidos, minerales y compuestos fenólicos, que su contenido varía dependiendo de los cultivares. Este subproducto se ha utilizado para el desarrollo de condimentos, fortificación de productos como productos de cereales, lácteos, cárnicos o pure. (García-Lomillo y González-SanJosé, 2017). Asimismo, se han estudiado nuevas posibilidades de utilización del orujo de *Aronia melanocarpa*, con el fin de limitar su impacto negativo en el medio ambiente, donde reportaron que contiene 45.12%, 4.49% lípidos, 6.44% proteína, 1.95% de ceniza y humedad 93.80%. Estos subproductos ricos en compuestos bioactivos podrían usarse como componentes funcionales de alimentos y nutracéuticos (Witczak *et al.*, 2020). Estos datos se pueden utilizar durante el diseño, producción y almacenamiento de nuevos productos. Además, los

parámetros de almacenamiento críticos para el orujo se han determinado en función del concepto de actividad del agua, que se utiliza principalmente para evaluar la estabilidad microbiana (Leonard *et al.*, 2020). Por tanto, la explotación del contenido fitoquímico de la pasta de aguacate puede dar lugar a nuevos productos con valor agregado, que tendrían un impacto significativo tanto en la industria del aguacate como en la de procesamiento de alimentos. Es importante implementar estrategias de cooperación con el sector industrial del aguacate para mejorar el aprovechamiento de estos subproductos (cáscara, semilla y pulpa desgrasada), para así recuperar nutrientes que puedan utilizarse en otras aplicaciones.

## 6.2 Cuantificación de Compuestos Bioactivos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

La concentración de compuestos bioactivos en la pasta de aguacate se muestra en el **Cuadro 4**.

**Cuadro 4.** Cuantificación de compuestos bioactivos de la pasta de aguacate cv. 'Hass'.

Compuesto	Concentración
Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g ps)	2.1 ± 0.1
Flavonoides totales (mg EC/g ps)	3.9 ± 0.3
Taninos hidrolizables (mg EAG/g ps)	11.1 ± 1.8
Taninos condensados (mg ECid/g ps)	0.6 ± 0.0
Carotenoides totales (µg/g ps)	48.1 ± 1.6
Clorofilas totales (µg/g ps)	145.5 ± 0.3

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). EAG: Equivalentes de ácido gálico, EC: equivalentes de catequina, ECid: equivalentes de cianidina, µg de carotenoides/g, ps: peso seco.

Varios estudios señalan que la cáscara y la semilla de aguacate cv. 'Hass' contienen un mayor contenido fenólico y capacidad antioxidante que los demás cultivares (Wang *et al.*, 2010). Se han reportado también varias propiedades benéficas a la salud, tales como efectos hipolipidémicos, antiinflamatorios, prevención de aterosclerosis, etc., ejercidos por los compuestos presentes en la semilla y la cáscara de aguacate (Pahua-Ramos *et al.*, 2012), lo cual sugiere la importancia de

caracterizarlos y cuantificarlos. Los resultados de composición muestran un contenido de compuestos fenólicos totales de  $2.1 \pm 0.1$  mg EAG/g ps; generalmente, tanto la cáscara como la semilla de aguacate presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos que la pulpa, por lo que los compuestos cuantificados en la pasta pueden provenir de dichos tejidos. Los valores aquí mostrados son mayores a los reportados por Ruiz-Pardo *et al.* (2014) en pulpa de aguacate, quienes encontraron 1.5 mg EAG/g ps, asimismo, Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) estudiaron el contenido de compuestos fenólicos en cáscara de aguacate y obtuvieron 53.7 mg EAG/g ps, corroborando que la cáscara tiene una mayor concentración de estos compuestos que la pulpa. Es interesante resaltar que, a pesar de que la pasta de aguacate analizada no se produjo bajo condiciones óptimas de laboratorio, sí presentó una cantidad considerable de compuestos fenólicos. Tanto a la cáscara como a la semilla de aguacate se les atribuyen propiedades nutracéuticas y farmacéuticas para la reducción de los niveles de colesterol y la inhibición de la oxidación de LDL (Rupasinghe, Wang, y Thilakarathna, 2013), lo cual es posible que se asocie con su contenido de los compuestos fenólicos.

Otros estudios realizados en subproductos de aguacate reportan 12.5 mg EAG/g ps en semilla y 26.1 mg EAG/g ps en cáscara (Saavedra *et al.*, 2017), valores superiores a los aquí reportados. Esto se puede deber a que el manejo de los subproductos ahí analizados se llevó a cabo bajo condiciones óptimas de laboratorio a lo largo de todo el proceso, en contraste con el origen industrial del proceso de extracción del aceite de aguacate de la muestra aquí reportada. Durante este proceso, los subproductos sufren estrés mecánico debido al rompimiento de la membrana celular y tejidos vegetales, además de largos periodos de almacenamiento y exposición a la intemperie con protección mínima o nula.

Además de las condiciones de procesamiento, el contenido de compuestos fenólicos puede variar significativamente gracias a múltiples variables. Por ejemplo, este valor varía en los diferentes tejidos del fruto, encontrándose generalmente concentraciones mayores en la cáscara y en la semilla, ya que se acumulan ahí como una forma de protección contra la radiación UV y defensa contra patógenos y depredadores (Amado *et al.*, 2019; Dixon y Paiva, 1995). Los compuestos fenólicos son generalmente susceptibles a cambios de pH, presencia de iones metálicos, exposición a la luz, temperatura, oxígeno y actividad de diversas enzimas, lo cual influye significativamente

sobre su contenido, e induce diferencias en su concentración (Rawson *et al.*, 2011). Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos encontrado resalta la posibilidad de usar la pasta de aguacate como fuente de dichas moléculas.

Los flavonoides presentan una potente actividad antioxidante, y a menudo son los compuestos que reciben la mayor atención dentro de las familias de compuestos fenólicos. El contenido de flavonoides totales encontrados en la pasta de aguacate fue  $3.9 \pm 0.39$  mg EC/g ps, valor menor al reportado por Athaydes *et al.* (2019), quienes determinaron que la semilla de aguacate contiene 28.1 mg EC/g ps. Esta diferencia pudiera deberse a que la mayor concentración de flavonoides suele estar en la semilla de aguacate, así como de otros frutos, en comparación con la cáscara y pulpa. Puede haber variación debido a otros factores como el grado de madurez del fruto, diferencias genéticas y condiciones ambientales a las que fue expuesto el fruto durante su desarrollo y maduración (Zadernowski, Naczki, y Nesterowicz, 2005). En contraste, Amado *et al.* (2019) reportaron 0.8 mg EC/g ps en cáscara, 0.3 mg EC/g ps en pulpa y 0.3 mg EC/g ps en semilla, valores menores a los encontrados en la pasta de aguacate. Esta diferencia probablemente se deba a que la pasta es una mezcla de los subproductos analizados individualmente en ese estudio, por lo cual, presenta un mayor contenido. Asimismo, las diferencias pueden atribuirse a la utilización de diferentes solventes y condiciones utilizadas para la extracción, lo cual se basa en la diferente permeabilidad del disolvente en las células, la disolución de sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal, mientras que condiciones de temperatura, pH, tiempo de extracción y presencia de agentes pro-oxidantes como metales o luz modifican también el rendimiento de extracción (Amado *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 1998).

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos cuyas estructuras suelen ser de gran tamaño y contar con múltiples grupos hidroxilo. Se ha demostrado que tienen una alta actividad antioxidante, antiinflamatoria y de prevención de aterosclerosis, lo cual los convierte en moléculas de interés. Los resultados muestran que la pasta de aguacate presenta aproximadamente 18 veces más taninos hidrolizables que condensados (Cuadro 4). Esto puede deberse a la afinidad entre los taninos condensados y los polisacáridos presentes en la pasta de aguacate, especialmente las pectinas, que forman una especie de bolsa hidrofóbica que puede encapsularlos (Le Bourvellec, Bouchet, y Renard, 2005), impidiendo de esta manera su cuantificación real. Estos resultados difieren a los

reportados por Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) en semilla de aguacate, donde se obtuvieron concentraciones de taninos hidrolizables 2 veces menores que los reportados para la pasta, así como un tercio de la concentración de taninos condensados. Ejiófor *et al.* (2018) encontraron que la semilla de aguacate contiene 0.1 mg EAG/g ps de taninos totales, concentración menor a la encontrada en el presente estudio, posiblemente debido a que la pasta es una mezcla que incluye tanto cáscara como semilla, los cuales se ha reportado que contienen una mayor concentración de taninos que la pulpa desgrasada. También se ha estudiado el contenido de taninos en otras variedades de aguacate cultivadas en China, por ejemplo, la variedad RN-7 presentó 0.0009 mg EAG/g ps en la pulpa y 0.02 mg EAG/g ps en semilla, mientras que la variedad RN-8 presentó 0.005 mg EAG/g ps en pulpa y 0.0245 mg EAG/g ps en semilla (Ge *et al.*, 2017). Estos valores son menores a los encontrados en este estudio, lo cual se atribuye a la diferencia de variedad y condiciones de cultivo, sin embargo, se observa que el contenido de taninos en semilla es mayor a lo cuantificado en pulpa, de manera similar a lo que otros autores reportan. De acuerdo a esta información, se propone que la pasta de aguacate puede ser una fuente aprovechable de taninos como aditivos de alimentos funcionales.

En cuanto a las concentraciones de clorofilas y carotenoides, se observó que la de clorofila fue 3 veces mayor a la de carotenoides (Cuadro 4). Estos valores son mayores a los reportados por Wang *et al.* (2010) en subproductos de aguacate, donde la semilla presentó un contenido 7 veces menor de carotenoides y 3 veces menor de clorofilas, con respecto a los datos aquí reportados. En la pulpa, la concentración de carotenoides fue 7 veces menor y la de clorofilas 5 veces menor, con respecto a lo aquí reportado. En el caso de la cáscara, la concentración de carotenoides fue 3 veces menor y la de clorofilas 5 veces menor, en comparación a los resultados aquí reportados. La mayor concentración de estos compuestos se atribuye en parte a la mezcla de subproductos que conforman la pasta, lo cual permite concentrarlos, en comparación con los tejidos individuales. También se ha realizado la cuantificación de estos compuestos bioactivos en otras variedades de aguacate, por ejemplo, Krumreich *et al.* (2018) encontraron que la pulpa de la cv. 'Breda' contiene 0.18  $\mu\text{g/g}$  ps de carotenoides y 4.63  $\mu\text{g/g}$  ps de clorofilas, valores menores a los reportadas en el presente estudio. Los carotenoides se encuentran en los cloroplastos de las células vegetales, en donde funcionan principalmente como pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (Sun *et al.*, 2018). La fotoprotección es un mecanismo que las plantas han empleado para sobrevivir mejor bajo un alto

estrés lumínico. Los carotenoides desempeñan papeles irremplazables en este proceso, al apagar los estados excitados de la clorofila, eliminar las especies reactivas de oxígeno y disipar el exceso de energía en calor. Para el humano, los carotenoides desempeñan funciones como antioxidantes y son los precursores más conocidos de la vitamina A, cuyo consumo está asociado con una baja incidencia de ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Amengual, 2019). Los carotenoides en el aguacate se concentran en la cáscara y la semilla, mientras que su color verde se debe al alto contenido de clorofila en la pulpa y cáscara (Wang *et al.*, 2010). Las clorofilas son los pigmentos que le dan a las plantas su color característico; estos son componentes esenciales de la fotosíntesis a través de la cual las plantas obtienen energía metabólica (Santana *et al.*, 2019). El consumo de clorofilas ejerce efecto sobre la inhibición de la oxidación del colesterol LDL, así como actividades antioxidantes, inducción de apoptosis y actividad antiinflamatoria (Alvarez-Parrilla, Laura, Amarowicz, y Shahidi, 2012; Zepka, Jacob-Lopes, y Roca, 2019). Ambos tipos de compuestos han sido poco estudiados en el aguacate y sus subproductos, por lo cual es de suma importancia conocer su concentración, así como validar sus efectos benéficos a la salud.

El fruto del aguacate tiene aplicaciones en las industrias cosmética y alimentaria. Además, la semilla de aguacate ha mostrado potencial como biocombustible, una fuente alternativa de almidón y un pigmento de color natural (Hatzakis *et al.*, 2019). De acuerdo a su composición aquí reportada, se propone a la pasta de aguacate como una alternativa interesante para la obtención de compuestos bioactivos a partir subproductos que son descartados por la industria. Este subproducto puede tener diferentes usos en formulaciones alimentarias o usarse como material de partida para la producción de concentrados o aislados de compuestos fenólicos. Se pueden convertir en polvos como productos almacenables ricos en nutrientes. Los consumidores se pueden beneficiar de su contenido de ácido oleico y la presencia de fitoquímicos como carotenoides, clorofilas y  $\alpha$ -tocoferol. Estos fitoquímicos actúan como antioxidantes, que promueven acciones antiinflamatorias, regulan los perfiles de lípidos sanguíneos saludables y aumentan la biodisponibilidad de las vitaminas liposolubles (Permal *et al.*, 2020).

### 6.3 Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

La capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass' fue analizada por cuatro metodologías diferentes. En el Cuadro 5 se presentan los resultados de estos análisis, en donde se observa que el mayor valor se obtuvo a partir del método de ORAC, seguido en orden descendente por TEAC, FRAP y DPPH.

**Cuadro 5.** Capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass'

<b>Metodología</b>	<b>Capacidad antioxidante (mg ET/g ps)</b>
ORAC	9.2 ± 0.8
ABTS	5.9 ± 0.3
FRAP	3.5 ± 0.3
DPPH	1.6 ± 0.1

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3).

Estos valores son menores a los reportados por Salmerón-Ruiz *et al.* (2014), quienes determinaron la actividad antioxidante de la cáscara de aguacate por los métodos de DPPH (170.8 mg ET/g ps), TEAC (187.9 mg ET/g ps) y FRAP (118.2 mg ET/g ps). Estas diferencias pueden deberse a que la pasta de aguacate no fue generada bajo condiciones óptimas de laboratorio, en contraste con Salmerón-Ruiz *et al.* (2014), lo cual pudo favorecer la oxidación de algunos compuestos antioxidantes, contribuyendo así a una menor capacidad antioxidante. Se ha reportado que los subproductos de aguacate presentan mayor capacidad antioxidante que la pulpa, por ejemplo, Pahua-Ramos *et al.* (2012) determinaron la capacidad antioxidante de una harina de semilla de aguacate por medio del método TEAC. Los autores reportan valores menores (43.3 mg ET/g ps) a los encontrados en el presente estudio, lo cual también puede deberse al manejo óptimo del subproducto en un ambiente controlado de laboratorio, en contraste con las condiciones industriales de la muestra aquí analizada.

Calderón-Oliver *et al.* (2016) determinaron la capacidad antioxidante de subproductos de aguacate.

En semilla, encontraron 0.4 mg ET/g ps (ORAC), valor menor al encontrado en la pasta, sin embargo, presentó una mayor capacidad antioxidante por el método de FRAP (9.5 mg ET/g ps); en la cáscara, reportaron valores mayores con 54.2 mg ET/g ps (ORAC) y 23.1 mg ET/g ps (FRAP). Wang *et al.* (2010) reportaron la capacidad antioxidante en semilla (107.2 y 41.2 mg ET/g ps), cáscara (157.9 y 47.5 mg ET/g ps) y pulpa (2.9 y 0.3 mg ET/g ps) utilizando los métodos de ORAC y DPPH, siendo los valores en pulpa menores a los encontrados en el presente estudio. Las diferencias observadas pueden deberse a diferencias en el grado de madurez del fruto, además de condiciones de almacenamiento y solventes utilizados a lo largo del proceso. La capacidad antioxidante de diversas moléculas presentes en frutos se suele caracterizar mediante varios métodos y bajo diferentes condiciones experimentales. Es por ello que los resultados de la misma molécula pueden variar cuando se utilizan diferentes métodos, además, es importante tener en cuenta la naturaleza química de otras moléculas que se están probando para emplear el método más adecuado, con el fin de obtener resultados más confiables y reproducibles (Lewoyehu y Amare, 2019). Es por ello que no existe un método único y universal para caracterizar las capacidades antioxidantes de todas las moléculas, por lo que el uso de múltiples métodos resulta complementario.

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos mediante diferentes métodos dependen de múltiples factores, tales como la afinidad entre los compuestos con los radicales utilizados (debido a diferencias estructurales), la extracción de compuestos utilizando solventes de distinta polaridad, así como el patrón de hidroxilación y metilación particular de cada compuesto. La composición de la matriz alimentaria, pH del medio, el mecanismo de acción de cada método, son también factores críticos, por ejemplo, la metodología de ORAC se basa en una reacción de transferencia de átomos de hidrógeno, mientras que el ensayo DPPH utiliza un mecanismo de transferencia de electrones (Rodríguez-Bonilla *et al.*, 2017). Asimismo, TEAC utiliza una especie de radical moderadamente estable (ABTS) que permite evaluar muestras polares y no polares, mientras que los compuestos antioxidantes que exhiben capacidad antioxidante en el ensayo FRAP suelen ser donadores de protones (Karatoprak *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2018). De cualquier manera, la capacidad antioxidante es un indicador *in vitro* importante del potencial de un compuesto o extracto como promotor de salud (de Moraes Barros, de Castro Ferreira, y Genovese, 2012).

Se han utilizado diversos residuos como el de *Aronia melanocarpa* para hacer vino de frutas; preparar infusiones de hierbas, se utilizan para aromatizar y dar color a mezclas de jugos y fortalecer las propiedades antioxidantes. Se ha reportado que los residuos de *Aronia melanocarpa* han presentado una capacidad antioxidante de residuos de *Aronia melanocarpa*, de 0.00017 mg ET/g ps de ABTS, 0.00012 mg ET/g ps de DPPH y 0.000075 mg ET/g ps de ORAC (Grunovaitė, Pukalskienė, Pukalskas, y Venskutonis, 2016), valores menores a los encontrados en la pasta de aguacate. Asimismo Yanık, 2017 reportó la capacidad antioxidante del orujo de oliva, 25 mg ET/g ps de DPPH, mayor a la de la pasta de aguacate. A pesar de ser considerada un subproducto, la pasta de aguacate presenta valores considerables de capacidad antioxidante, lo cual sugiere su potencial para ser utilizada como una fuente de compuestos con esta bioactividad, que no es aprovechada actualmente. Es necesario el desarrollo de técnicas y tecnologías innovadoras para la recuperación de componentes de valor añadido a partir de residuos alimentarios.

#### 6.4 Perfil de Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

En la naturaleza, la mayoría de los compuestos fenólicos existen vinculados a otras estructuras complejas como proteínas y fibra, por lo que son necesarios pre-tratamientos antes de la extracción convencional para obtener el perfil fenólico completo de la planta. Generalmente, la hidrólisis alcalina puede romper los enlaces éster que unían a los compuestos fenólicos a los componentes de la pared celular y liberar la mayoría de los fenólicos unidos, mientras que la hidrólisis ácida rompe los enlaces glucosídicos, y, por lo tanto, libera las agliconas (Blancas-Benitez *et al.*, 2015). En el Cuadro 6 se presentan los compuestos fenólicos identificados y cuantificados en la pasta de aguacate.

**Cuadro 6.** Perfil de compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass'

Compuesto	Total	F. Libre	F. Ácida	F. Alcalina
Ácido gálico	0.9 ± 0.01	0.9 ± 0.01	-	-
Ácido protocatéico	22.9 ± 2.3	-	9.9 ± 0.5	13.1 ± 1.8
Ácido <i>p</i> -cumárico	22.5 ± 6.4	-	6.7 ± 0.9	15.8 ± 0.3

Ácido ferúlico	40.0 ± 12.8	-	11.0 ± 1.7	29.0 ± 1.2
Quercetina-3-β-D-glucósido	1.0 ± 0.3	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.05
Kaempferol	2.4 ± 0.1	-	2.4 ± 0.1	-
Quercetina	4.6 ± 0.0	-	4.6 ± 0.0	-

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3); por debajo del nivel de detección o cuantificación (-); F: fracción.

Se observa que el ácido ferúlico fue el más abundante, seguido en orden descendente por el ácido protocatéico, ácido *p*-cumárico, quercetina, kaempferol, quercetina-3-β-D-glucósido y ácido gálico. En la Figura 8 se muestra un cromatograma representativo de la fracción acida, obtenido a una longitud de onda de 320 nm durante el proceso de identificación de los compuestos fenólicos. Las hidrólisis ácida y alcalina se encargaron de romper las uniones covalentes entre los compuestos fenólicos y la matriz alimentaria, lo cual permitió identificar un perfil más completo, ya que sólo dos de un total de siete pueden ser detectados sin hidrolizar. Este perfil de compuestos es similar al reportado por Villa-Rodriguez *et al.* (2020) en pulpa de aguacate, quienes encontraron que la quercetina fue el compuesto más abundante en frutos en estado de madurez 2 (58.4 µg/g ps), mientras que el kaempferol (3.2 µg/g ps), ácido gálico (2.4 µg/g ps) y ácido protocatéico (0.74 µg/g ps) fueron los más abundantes en el estado de madurez 3. Pahua-Ramos *et al.* (2012) identificaron el ácido protocatéico (128.2 µg/g ps) y kaempferol (2.2 µg/g ps) en harina de semilla de aguacate, además, en subproductos como en la semilla de aguacate se identificaron también ácido caféico (136.9 µg/g ps) y ácido ferúlico (0.9 µg/g ps). Saavedra *et al.* (2017) identificaron ácido ferúlico (50.50 µg/g ps) y ácido *p*-cumárico (17.4 µg/g ps) en cáscara de aguacate. Estos cambios en la variación de las concentraciones de los compuestos fenólicos pueden ser el resultado de diferentes tasas de síntesis, degradación y biotransformación que ocurren durante la maduración del aguacate (Villa-Rodriguez *et al.*, 2020). Además, la quercetina-3-β-D-glucósido ha sido poco reportada, en comparación con los demás compuestos encontrados en los subproductos de aguacate.

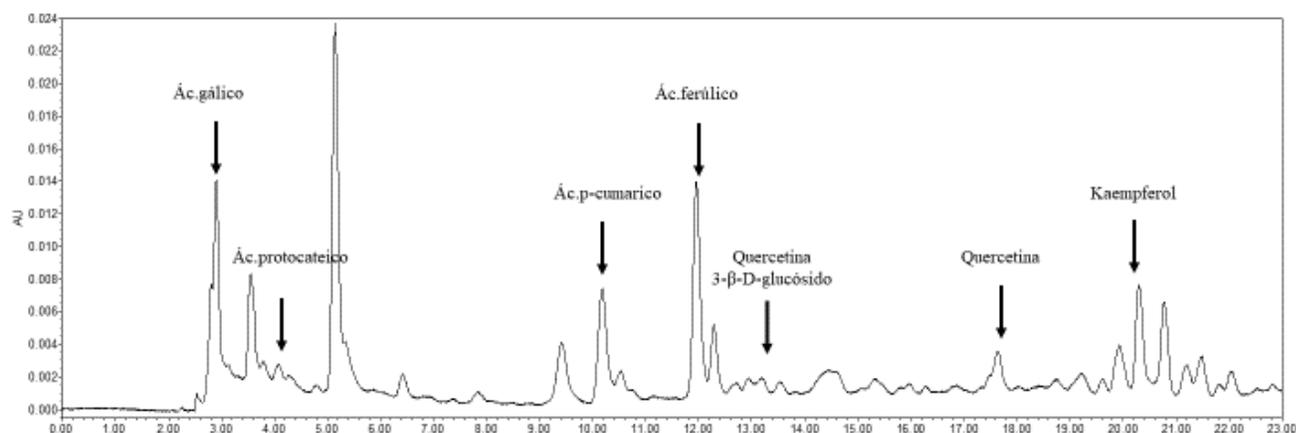


Figura 8. Cromatograma representativo de los compuestos fenólicos detectados en la fracción ácida de la pasta de aguacate cv. 'Hass' (320 nm).

El orujo de manzana es un residuo generado por las empresas productoras de sidra y jugo, es un ejemplo sorprendente de un subproducto industrial infrautilizado. La mayoría de los compuestos bioactivos (particularmente los fenólicos) en la manzana se encuentran en la cáscara, por lo que el orujo presenta mayor cantidad de estos compuestos que la fruta entera, además, sus valores varían dependiendo del cultivar. En el orujo de manzana se han identificado el ácido protocatéico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y quercetina 3-glucósido, entre otros (Barreira *et al.*, 2019), en cantidades mayores a las reportadas en la pasta de aguacate. En otro estudio realizado en las hojas de rábano, en donde se evaluó su perfil de compuestos fenólicos, se identificaron 930  $\mu\text{g/g}$  ps de ácido gálico, 320  $\mu\text{g/g}$  ps de ácido ferúlico y 470  $\mu\text{g/g}$  ps de ácido *p*-cumárico; estos valores son mayores a los encontrados en la pasta de aguacate (Lolita *et al.*, 2020). Las preparaciones ricas en compuestos fenólicos pueden tener diversas aplicaciones, por ejemplo, como aditivos alimentarios naturales en productos marinos, purés de frutas y productos cárnicos (Grunovaitė *et al.*, 2016). Dichos aditivos, al ser fuertes antioxidantes, pueden impartir a los alimentos un doble efecto, en primer lugar, protegiendo contra la autooxidación y, en segundo lugar, enriqueciéndolos con fitoquímicos beneficiosos para la salud.

### 6.5 Perfil de Carotenoides y Tocoferoles de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

La concentración de carotenoides es mayor en la cáscara del aguacate que en la pulpa. La cáscara

presenta un color verde oscuro y tiene una mayor concentración de carotenoides, hasta 1.8 veces mayor, que la pulpa de color verde pálido o amarillo (Ashton *et al.*, 2006). El alto contenido de aceite de los aguacates favorece la absorción de carotenoides y otros compuestos liposolubles (Unlu *et al.*, 2005). Los carotenoides son eficaces desactivadores de radicales libres en las células humanas, previene el desarrollo de varias enfermedades no transmisibles, además, participan en la señalización celular, influyendo en la expresión génica e inhibiendo las enzimas implicadas en la patogenia de algunas enfermedades. Asimismo, los tocoferoles son compuestos lipofílicos (Ramos-Aguilar *et al.*, 2019). La pulpa de aguacate es rica en  $\alpha$ -tocoferol, pero también contiene pequeñas concentraciones de  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol. Todos los tocoferoles son potentes captadores de radicales lipoperoxilo, sin embargo, el  $\alpha$ -tocoferol es el más estudiado a este respecto (Cerretani *et al.*, 2010). Esta propiedad del  $\alpha$ -tocoferol le permite interceptar los radicales peroxilo que participan en la reacción en cadena de la oxidación de lípidos en las membranas celulares y LDL, jugando así un papel importante en el transporte de colesterol desde el hígado a los tejidos periféricos. La oxidación de LDL se asocia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares debido al depósito de lípidos en la pared arterial (Ramos-Aguilar *et al.*, 2019; Saini y Keum, 2016), por lo que resulta importante el consumo de compuestos que contrarresten este proceso.

Como parte del perfil de los compuestos bioactivos de la pasta de aguacate cv. 'Hass', se analizó su perfil de carotenoides y tocoferoles, el cual se muestra en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Perfil de carotenoides y tocoferoles de la pasta de aguacate cv. 'Hass'

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/100 \text{ g ps}</math>)</b>
$\alpha$ -caroteno	17.9 $\pm$ 2.5
$\beta$ -caroteno	98.8 $\pm$ 8.6
Zeaxantina	63.0 $\pm$ 5.3
$\alpha$ -tocoferol	10,412 $\pm$ 436
$\gamma$ -tocoferol	3,120 $\pm$ 361

Valores presentados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3), ps: peso seco.

Se identificaron y cuantificaron tres carotenoides, siendo el  $\beta$ -caroteno el de mayor abundancia, seguido en orden descendente por la zeaxantina y  $\alpha$ -caroteno. Jimenez *et al.* (2020) reportan valores mayores de 28.9  $\mu\text{g}/100 \text{ g PF}$  de  $\alpha$ -caroteno, 6-950  $\mu\text{g}/100 \text{ g PF}$  de  $\beta$ -caroteno y 11-60

$\mu\text{g}/100\text{ g}$  PF de zeaxantina en pulpa de aguacate, mientras que Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes (2012) reportaron  $28.80\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  ps de  $\alpha$ -caroteno,  $162.08\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  ps de  $\beta$ -caroteno,  $5.20\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  ps de zeaxantina, valores menores a los obtenidos en la pasta.

Los carotenoides se almacenan principalmente en los cloroplastos, en donde el más abundante es el  $\beta$ -caroteno, encontrándose en mayor concentración principalmente en cáscara y semilla de aguacate, en comparación con la pulpa. Estos participan en el ensamblaje del fotosistema, captación de luz y fotoprotección de los frutos, además, se han observado sus efectos en contrarrestar la peroxidación lipídica (DellaPenna y Pogson, 2006), Posiblemente debido a su eficiente captación de oxígeno singlete y radicales (Böhm, Edge, y Truscott, 2012). Estos resultados sugieren que a pesar del estrés mecánico que sufrió la pasta retiene cantidades significativas de carotenoides que no fueron extraídos en su totalidad durante el procesamiento, y que pueden ser aprovechados con otros fines. Además, diversos estudios informan acerca de sus efectos sobre el perfil lipídico sérico. Por ejemplo, se reporta una correlación positiva entre el consumo de carotenoides y la concentración sérica de HDL (Jeon, Neuringer, Kuchan, y Erdman Jr, 2018; Loane, Nolan, y Beatty, 2010), Mientras que otros reportan una reducción significativa del colesterol total y LDL tras la intervención de una dieta rica en luteína y  $\beta$ -caroteno (Bacchetti *et al.*, 2016).

La principal propiedad antioxidante de los carotenoides se debe a su actividad quelante de oxígeno singlete, que da como resultado carotenoides excitados que disipan la energía adquirida por una serie de interacciones rotacionales y vibracionales con un solvente, volviendo al estado no excitado y permitiendo la eliminación de otras especies radicales (Carocho y Ferreira, 2013). El oxígeno singlete es uno de los ROS más reactivos en la oxidación del colesterol. En particular, la oxidación fotosensibilizada del colesterol se inicia por el oxígeno singlete y conduce a la formación de hidroperoxicolesteros, como el  $5\alpha$ -hidroperoxicolesterol, que pueden sufrir un reordenamiento alílico para dar lugar tanto al  $7\alpha$ -hidroperoxicolesterol como al  $7\beta$ -hidroperoxicolesterol (Boselli, Cardenia, y Rodríguez-Estrada, 2012). Por tanto, los carotenoides pueden controlar la oxidación del colesterol impidiendo el ataque oxidativo en las moléculas de colesterol por especies reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete.

El perfil de tocoferoles de la pasta de aguacate se compone principalmente de  $\alpha$ -tocoferol, cuya

concentración es aproximadamente 3 veces superior a la de  $\gamma$ -tocoferol. Al comparar estos valores con los reportados por Villa-Rodriguez *et al.* (2020) en pulpa de aguacate en estado de madurez 3, se encontró 14 veces más concentración de  $\alpha$ -tocoferol que de  $\gamma$ -tocoferol, sin embargo, Jimenez *et al.* (2020) reportaron un contenido 3 veces menor de  $\alpha$ -tocoferol, comparado con el de  $\gamma$ -tocoferol. También se reportó el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en cáscara, en donde se observó que es 7 veces mayor a lo encontrado en la pasta de aguacate y 10 veces menor a lo reportado en semilla. Esto sugiere que estos compuestos siguen estando presentes en gran proporción en la pasta de aguacate. Estos resultados pueden ser debido al contenido de semilla y cáscara de aguacate en la muestra, las cuales se han reportado que presentan un mayor contenido de tocoferoles y carotenoides que la pulpa de aguacate (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Jimenez *et al.*, 2020), por lo cual, es probable que estos compuestos provengan de estos subproductos, y no del aceite no extraído de la pulpa. El  $\alpha$ -tocoferol actúa como antioxidante, lo cual implica que, en membranas y lipoproteínas, puede contrarrestar los radicales peroxilo de ácidos grasos convirtiéndose él mismo en radical  $\alpha$ -tocoferoxilo. El daño potencial del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo se evitaría mediante su reducción mediante un agente reductor apropiado. Se ha demostrado que tal mecanismo tiene lugar en varios sistemas *in vitro* (Azzi, 2018). Por ejemplo, Zheng *et al.* (2015) evidenciaron que el  $\delta$ -tocoferol es la más potente de las ocho isoformas de vitamina E para la reducción de la acumulación de colesterol. El  $\delta$ -tocoferol tiene una concentración fisiológica baja, pero es significativamente potente en la reducción de la acumulación de colesterol (Xu *et al.*, 2012). Por ejemplo, después de un tratamiento con  $\delta$ -tocoferol, se observó que en las membranas, incluida la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos intracelulares, el movimiento de los lípidos aumentaba ligeramente, lo que explica la ligera reducción del colesterol libre en las células provocada por un aumento en la salida de colesterol (Zheng *et al.*, 2015). Por lo tanto, la presencia tanto de carotenoides y tocoferoles sugieren un posible efecto de reducción de colesterol y lipoproteínas.

Los valores considerables que se obtuvieron del perfil de carotenoides y tocoferoles pueden deberse a que la pasta de aguacate está compuesta por diferentes tejidos vegetales, además, el proceso de extracción a la que estuvo expuesta la pasta facilitó la ruptura de la matriz alimentaria, y por lo tanto la liberación de estos compuestos. Algunos estudios sugieren que los cambios en el contenido de carotenoides se deben a procesos reguladores que están estrechamente relacionados con el desarrollo de plastidios y carotenogénesis. A nivel celular, los cloroplastos normalmente

evolucionan a cromoplastos, que están asociados con una alta acumulación de carotenoides. La descomposición de la clorofila también se ha relacionado con un aumento en el contenido de tocoferol, ya que el fitol, que es liberado de la clorofila por la clorofilasa, se utiliza para la biosíntesis de estas moléculas (Lenucci *et al.*, 2012; Villa-Rodriguez *et al.*, 2020). Asimismo, el perfil de carotenoides y tocoferoles puede variar según las características agronómicas (clima, cosecha, grado de madurez) en donde se cultivan los frutos.

Las aguas residuales de aguacate son el subproducto más abundante de la extracción de su aceite por prensado en frío. El contenido de compuestos bioactivos en estas aguas residuales ha sido aprovechado, por ejemplo, al eliminar al agua y aprovechar los sólidos para ser incorporados en salchichas de cerdo como conservador para prevenir la peroxidación lipídica, efecto que se atribuye a su alto contenido en carotenoides y tocoferoles (Permal *et al.*, 2020). Esto demuestra que los subproductos del procesamiento de aguacate son fuente potencial de carotenoides y tocoferoles, compuestos que pueden ser aprovechados para aplicaciones alimenticias y nutraceuticas.

#### 6.6 Perfil de Ácidos Grasos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass'

Se detectaron e identificaron seis ácidos grasos en la pasta de aguacate, los cuales se muestran en el Cuadro 8. El ácido oleico fue el de mayor abundancia, seguido del ácido linoléico. De acuerdo con esta distribución, el 57.9 % está compuesto por AGMIs, 22.8 % de ácidos grasos poliinsaturados AGPIs y 19.3% de ácidos grasos saturados (AGS). Estos resultados difieren a los reportados por Amado *et al.* (2019) en pulpa de aguacate, quienes encontraron en mayor concentración al ácido palmítico (4,398 mg/100 g) seguido del ácido oleico (4,306 mg/100 g), además, el 48.85% de los ácidos grasos presentes en la pulpa de aguacate son AGMIs, 17.61% son AGPIs y el 33.53% AGS.

En este mismo estudio se analizó el contenido de ácidos grasos en cáscara, donde el ácido oleico (1,191 mg/100 g) fue el más abundante, seguido del ácido palmítico (1,014 mg/100 g), dando una proporción de 60.78 % de AGMIs, 0.33 % AGPIs y el 38.87 % AGS. En la semilla de aguacate se

reporta que el ácido linoleico (102.95 mg/100 g) está presente en mayor concentración, seguido del ácido oleico (75.17 mg/100 g); los AGPIs se encuentran en mayor porcentaje con 45.36 %, seguido de los AGS con 33.89 % y los AGMIs representan un 20.74 %.

**Cuadro 8.** Perfil de ácidos grasos de la pasta de aguacate cv. 'Hass'

Ácido graso	Longitud e insaturaciones	Concentración (g/100 g aceite)
Palmítico	16:0	17.8 ± 0.9
Palmitoléico	16:1	8.0 ± 0.1
Esteárico	18:0	1.5 ± 0.2
Oleico	18:1	49.8 ± 0.9
Linoleico	18:2	20.5 ± 0.3
Linolénico	18:3	2.4 ± 0.2
Σ Monoinsaturados		57.9 ± 1.0
Σ Poliinsaturados		22.8 ± 0.5
Σ Saturados		19.3±1.1

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3).

En otros estudios se ha demostrado que el contenido de ácidos grasos tiene una relación con el grado de madurez en el fruto, por lo cual la recuperación de aceite de aguacate cv. 'Hass' se incrementa al aumentar su madurez (Meyer y Terry, 2008). Esto puede deberse a la acción de las enzimas degradantes de la pared celular que hacen que el aceite se libere de los cuerpos celulares, haciéndolo más disponible para su extracción. Además, una de las ventajas es la presencia de las células oleosas idioblásticas que son menos sensibles a la acción de las enzimas que degradan la pared celular y son estables durante su maduración (Pedreschi *et al.*, 2016; Platt y Thomson, 1992). Lo cual concuerda con nuestros resultados donde se observó la presencia de ácidos grasos a pesar de un periodo prologando de almacenamiento.

Los autores de un estudio de metanálisis realizado en Estados Unidos concluyeron que el consumo de aguacate, en lugar de grasas saturadas, disminuye las concentraciones de colesterol total, LDL y TAG en adultos eutróficos sanos (Peou *et al.*, 2016). Otros autores también destacan un aumento en la concentración de HDL, debido al alto contenido de AGMIs en el aguacate (Moreno y

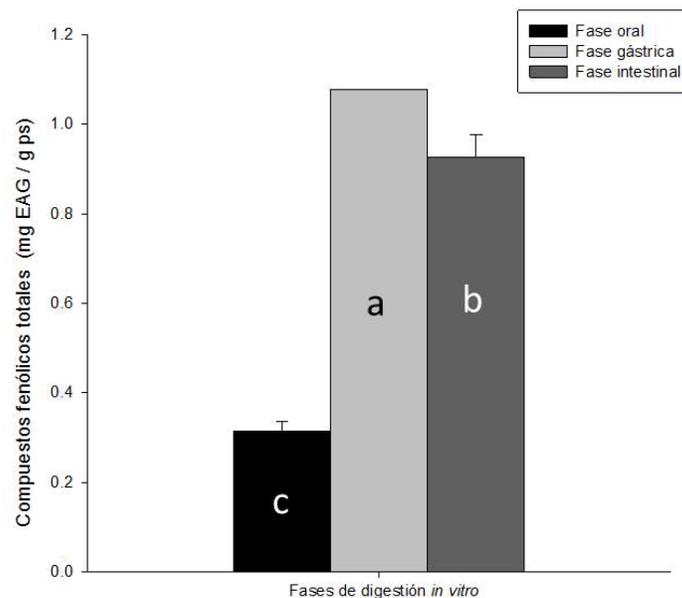
Mitjavila, 2003). Un posible mecanismo involucrado es la degradación de TAG por la enzima lipoproteína lipasa (LPL), la cual degrada preferentemente TAG que contienen ácidos grasos insaturados de cadena larga (Perona *et al.*, 2010). Luego, los ácidos grasos liberados a partir de los TAG se incorporan a las partículas de HDL, lo que aumenta la concentración de estas lipoproteínas (Kendall *et al.*, 2010). Por lo tanto, el ácido oleico presente en el aguacate, puede desempeñar un papel activo en la reducción de la concentración de TAG séricos y la elevación del HDL (Perona *et al.*, 2010).

El ácido oleico puede también reducir la concentración plasmática de LDL, sin provocar su oxidación. Este ácido graso es el sustrato principal de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), una enzima hepática que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir del colesterol. Así, la presencia de un exceso de colesterol en forma libre se esterifica rápidamente, no conduce a la supresión de los receptores de LDL y favorece la captación de LDL, disminuyendo su concentración plasmática. Además, el ácido oleico puede inducir una menor síntesis de colesterol endógeno en comparación con los AGPIs (Silva Caldas *et al.*, 2017). Por lo tanto, los ácidos grasos presentes en el aguacate también interfieren en los mecanismos clave que promueven la reducción de colesterol total y LDL.

#### 6.7 Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass', en un Modelo de Digestión *in vitro*.

En la Figura 9 se muestra la concentración de los compuestos fenólicos de pasta de aguacate cv. 'Hass', durante las diferentes etapas de una digestión *in vitro*. Después de la fase oral, el 14.76 % de los compuestos fenólicos fueron bioaccesibles, es decir, la cantidad de compuestos liberados de la matriz alimentaria, con respecto al extracto etanólico. Posteriormente, este valor aumentó ( $p < 0.05$ ) en la etapa gástrica, en comparación con la fase oral, hasta un 51.42 %, para luego disminuir significativamente ( $p < 0.05$ ) en la fase intestinal hasta un 43.80 %. El aumento de los compuestos fenólicos durante la fase gástrica puede deberse a la acción de las enzimas gástricas y

las condiciones de pH ácido, los cuales favorecen a que los compuestos fenólicos unidos a macromoléculas como proteínas estructurales, celulosa y pectina a través de enlaces covalentes, éter, éster y carbono-carbono en la matriz de la pared celular sean liberados a través de la hidrólisis de los enlaces presentes en la matriz alimentaria de la pasta de aguacate (Shahidi y Ambigaipalan, 2015). Estos valores difieren a lo reportado por Ruiz-Pardo *et al.* (2014), quienes estudiaron la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de la pulpa de aguacate; los autores reportan bioaccesibilidades de 1.94 %, 74.8 % y 51.4 % durante la fase oral, gástrica e intestinal, respectivamente. Sin embargo, se observa un comportamiento similar entre las diferentes fases al que aquí se reporta, al haber una mayor liberación de compuestos fenólicos durante la fase gástrica, en comparación con la oral e intestinal.



**Figura 9.** Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass', en las diferentes etapas de una digestión *in vitro*. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Asimismo, Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) reportan una bioaccesibilidad gastrointestinal del 33 % de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de aguacate. Esto puede deberse a la naturaleza de la matriz alimentaria de la pasta de aguacate, se considera que la fibra dietética, es un componente principal no digerible de la pared celular del material vegetal (DeVries, 2004; Palafox-

Carlos *et al.*, 2011). Existe también evidencia que indica que estos carbohidratos complejos, al igual que lípidos y proteínas, interactúan directamente con los compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria. El tipo de interacciones químicas entre los compuestos fenólicos y la matriz alimentaria incluye la formación de uniones ordenadas, estabilizadas por matrices de enlaces no covalentes entre grupos hidroxilo de compuestos fenólicos y grupos polares de moléculas del polisacárido (enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y dipolares, atracciones de van der Waals) (Eastwood y Morris, 1992). Debido a que estos enlaces son débiles individualmente, las interacciones son estables, y su formación y ruptura a menudo ocurren por los cambios de pH o las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, lo que conduce a cambios conformacionales de los compuestos fenólicos (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

El procesamiento previo de prensado de la pasta de aguacate puede tener efectos positivos sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, ya que, en la matriz alimentaria, estos compuestos están unidos a componentes estructurales como carbohidratos, proteínas, fibra y paredes celulares, así como a otros compuestos fenólicos por enlaces covalentes, enlaces de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas (Burgos-Edwards *et al.*, 2017). Tras el procesamiento mecánico, se difunden fuera de las paredes vacuolares y se unen de forma no covalente a proteínas y polisacáridos (Minekus *et al.*, 2014). Los primeros pasos de la digestión pueden considerarse como una extracción, en donde la acción tanto mecánica como bioquímica (enzimas digestivas y pH) contribuyen a alterar el tejido vegetal y la liberación de compuestos fenólicos de la matriz.

La transición de la pasta de aguacate de la fase gástrica a la fase intestinal causó una disminución considerable de la bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos. Se ha reportado que esta disminución puede estar asociada con los cambios de pH, debido a que estos compuestos son inestables y pueden degradarse en un medio neutro o alcalino, como el intestino delgado (pH 7.5), mostrando una mejor resistencia y estabilidad a las condiciones gástrica (pH 3) (Burgos-Edwards *et al.*, 2017; Celep *et al.*, 2015; Sanz-Buenhombre *et al.*, 2016). Bajo condiciones ácidas, los compuestos fenólicos unidos fuertemente a los componentes estructurales de las paredes celulares de la pasta de aguacate mediante enlaces covalentes (compuestos fenólicos insolubles, unidos o no extraíbles) son liberados, por lo cual, es en esta etapa en donde se observa un aumento en su liberación (Lingua *et al.*, 2018; Rosero *et al.*, 2019).

Otro factor que contribuye a la disminución durante la etapa intestinal, es el efecto de las enzimas digestivas, ya que estimulan la liberación de los compuestos fenólicos, lo que deja a la matriz alimentaria como una estructura inestable, sujeta a hidrólisis de algunos compuestos fenólicos unidos a proteínas y carbohidratos de la matriz alimentaria (Bouayed *et al.*, 2011; McDougall *et al.*, 2005; Saura-Calixto, Serrano, y Goñi, 2007). Por lo tanto, estos resultados muestran que fue en la fase gástrica donde hubo mayor liberación de fenoles, debido al entorno fisicoquímico, con especial influencia de los cambios de pH y las enzimas digestivas, que afectaron su estabilidad y bioaccesibilidad. Una vez liberados, estos compuestos fenólicos pueden interactuar con el colesterol y disminuir su absorción (Collado *et al.*, 2016). Estas interacciones pueden ocurrir dentro de las micelas, en donde las moléculas de colesterol dirigen los compuestos fenólicos hacia la membrana micelar, mientras que los compuestos fenólicos disminuyen la acumulación de colesterol dentro de las micelas (Boulet *et al.*, 2016). Al disminuir la incorporación de colesterol a las micelas, los compuestos fenólicos disminuyen su solubilidad y dificultan su absorción entérica (Ogino *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos también pueden inhibir la circulación enterohepática de esteroides y favorecer la excreción fecal, es por ello que conocer su bioaccesibilidad resulta de interés para estudiar sus efectos potenciales a lo largo del tracto gastrointestinal. Así, los compuestos fenólicos de diversas fuentes naturales se han comparado favorablemente con los fármacos hipocolesterolémicos (Domínguez-Avila *et al.*, 2017).

La liberación de compuestos fenólicos durante las diferentes etapas de la digestión *in vitro* modifica la capacidad antioxidante del medio, por lo cual, se utilizaron tres técnicas para cuantificarla en cada una de las etapas, cuyos resultados se muestran en la Figura 10. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la capacidad antioxidante de cada una de las fases de digestión, en los tres métodos utilizados para evaluarla. Fue en la fase gástrica en donde se presentó la mayor capacidad antioxidante, independientemente del método utilizado, lo cual concuerda con la concentración de compuestos fenólicos reportada en esta misma fase. Esto es similar a lo reportado por Ruiz-Pardo *et al.* (2014) y Salmerón-Ruiz *et al.* (2014) en pulpa y cáscara de aguacate, respectivamente, quienes observaron una correlación entre la fase donde había mayor liberación de compuestos fenólicos, con una mayor actividad antioxidante. En el presente estudio, se observa que los valores son similares al utilizar los métodos de FRAP y DPPH, mientras que el valor es menor al utilizar la metodología de TEAC. Estas variaciones pueden deberse a varios factores, por

ejemplo, los tipos de métodos para determinar la capacidad antioxidante, ya que cada una se basa en diferentes mecanismos de acción, como es la transferencia de un átomo de hidrógeno, la transferencia de un electrón o la quelación de metales (Leopoldini, Russo, y Toscano, 2011).

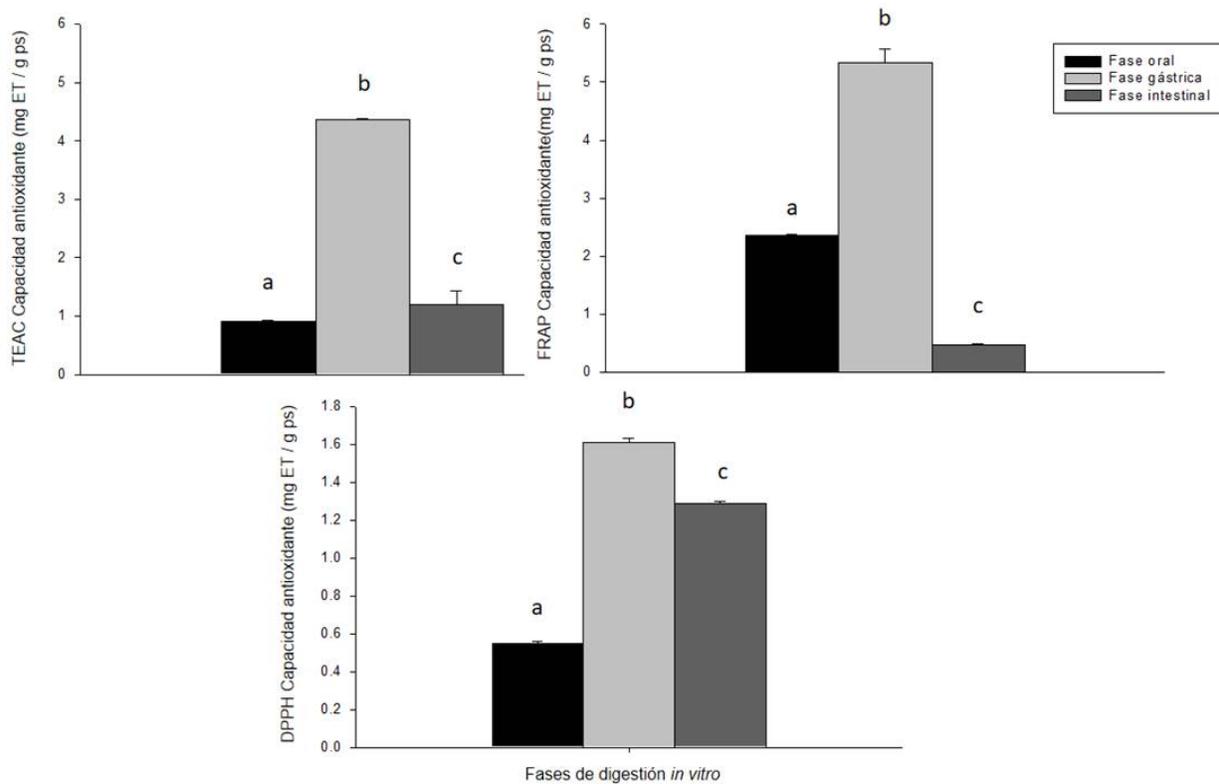


Figura 10. Capacidad antioxidante de la pasta de aguacate cv. 'Hass' durante las diferentes fases de una digestión *in vitro*, evaluada por los métodos de a) TEAC, b) FRAP y c) DPPH. Valores como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

No existe un método único (estándar de oro) para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, por lo cual, se suelen utilizar diferentes métodos que sean complementarios entre sí. Por ejemplo, los métodos de TEAC y DPPH utilizan radicales libres centrados en nitrógeno, que obstaculiza estéricamente el acceso a los antioxidantes, lo cual difiere de otras técnicas en donde el acceso es más directo, generando variaciones en los resultados generados por cada método (Schaich, Tian y Xie, 2015). En consecuencia, estos ensayos pueden subestimar la capacidad antioxidante durante la digestión *in vitro* o bajo otras condiciones. Teniendo en cuenta las condiciones de pH de los métodos de capacidad antioxidante total, se ha reportado que el método FRAP (evaluado a pH 3.6)

podría ser más apropiado para evaluarla después de la etapa gástrica de la digestión, mientras que TEAC (evaluado a pH 7.0) podría ser más adecuado para evaluarla en la intestinal (Lingua *et al.*, 2019). La capacidad antioxidante de la pasta de aguacate es un indicador importante de su potencial como promotor de salud *in vitro* (de Moraes Barros *et al.*, 2012), gracias a la presencia de compuestos fenólicos asociados a esta bioactividad.

La membrana de diálisis utilizada es una membrana de celulosa semipermeable con poros uniformes, que permiten el paso de los fenólicos por difusión libre. Basado en este mecanismo de difusión, que es una de las principales vías de absorción de los fenólicos, aquellos de bajo peso molecular la atraviesan fácilmente, mientras que los de peso molecular superior al peso molecular de corte de la membrana, son retenidos (Hemery *et al.*, 2010). La relación entre la fracción penetrable y el contenido total de dicha composición en las materias primas es la absorptividad prevista. La masa molecular de corte de esta membrana de celulosa semipermeable suele ser de alrededor de 10 kDa (Shahidi y Peng, 2018). De acuerdo a esto, en la Figura 11 se muestra el comportamiento de difusión pasiva de los compuestos fenólicos de la pasta de aguacate, con respecto al tiempo.

Debido a que el contenido total de compuestos fenólicos no explica su cinética de difusión, en este estudio se utilizó un modelo de diálisis para simular su transporte pasivo en el intestino. El contenido dializable corresponde a todos los compuestos que pasan a través de la membrana de diálisis después de la fase de digestión intestinal. Se observa una mayor concentración de compuestos fenólicos con respecto al tiempo, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada tiempo muestreado, alcanzándose el mayor valor a los 120 min. Este comportamiento es similar al reportado por Ruiz-Pardo *et al.* (2014) en pulpa de aguacate, durante los 120 min aquí reportados. Una vez que la pasta de aguacate fue digerida, los compuestos que se liberaron de la matriz alimentaria pueden interactuar con la membrana de la diálisis y migrar a través de ella. En el caso de los ácidos fenólicos aquí identificados, estos son moléculas de menor tamaño que presentan una mayor estabilidad y solubilidad, lo que les permite atravesar fácilmente la membrana de diálisis. Con el fin de examinar el mecanismo de difusión, éste se ajustó a un modelo de primer orden, donde se obtuvo un valor de  $R^2$  de 0.97. Este valor sugiere que el mecanismo de difusión se rige principalmente por una difusión Fickiana (Ritger y Peppas, 1987), en donde los compuestos

fenólicos migran de una zona de mayor concentración a una de menor concentración. Se ha demostrado que el tamaño molecular, la flexibilidad conformacional, la solubilidad y la estructura juegan un papel crucial en la capacidad de un componente de quedar atrapado dentro de la membrana de diálisis, por lo cual la distribución de los tamaños de partículas afecta el tiempo de difusión (Liu *et al.*, 2019).

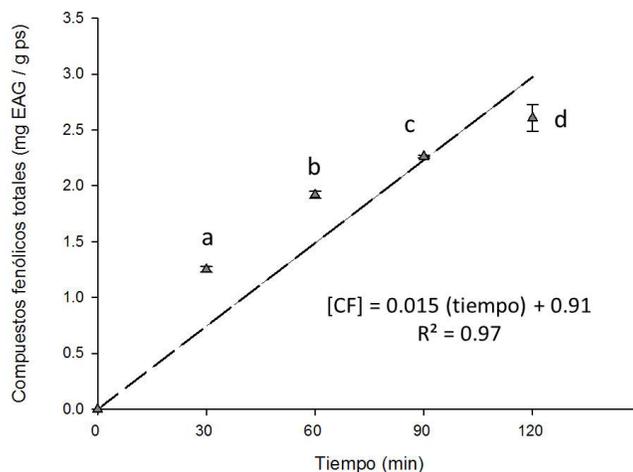


Figura 11. Difusión pasiva de los compuestos fenólicos de la pasta de aguacate cv. 'Hass' en un modelo de digestión *in vitro*. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La difusión pasiva de los compuestos fenólicos permite que la capacidad antioxidante se modifique, estos resultados se presentan en la Figura 12. Se observa que hubo un incremento lineal en los métodos de FRAP y TEAC, aumentando significativamente los valores entre cada tiempo analizado ( $p < 0.05$ ), alcanzándose el mayor valor a los 120 min. Al utilizar la metodología de DPPH, el valor máximo se alcanzó a los 60 min, manteniéndose estable hasta los 120 min, sin haber diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) después de este tiempo.

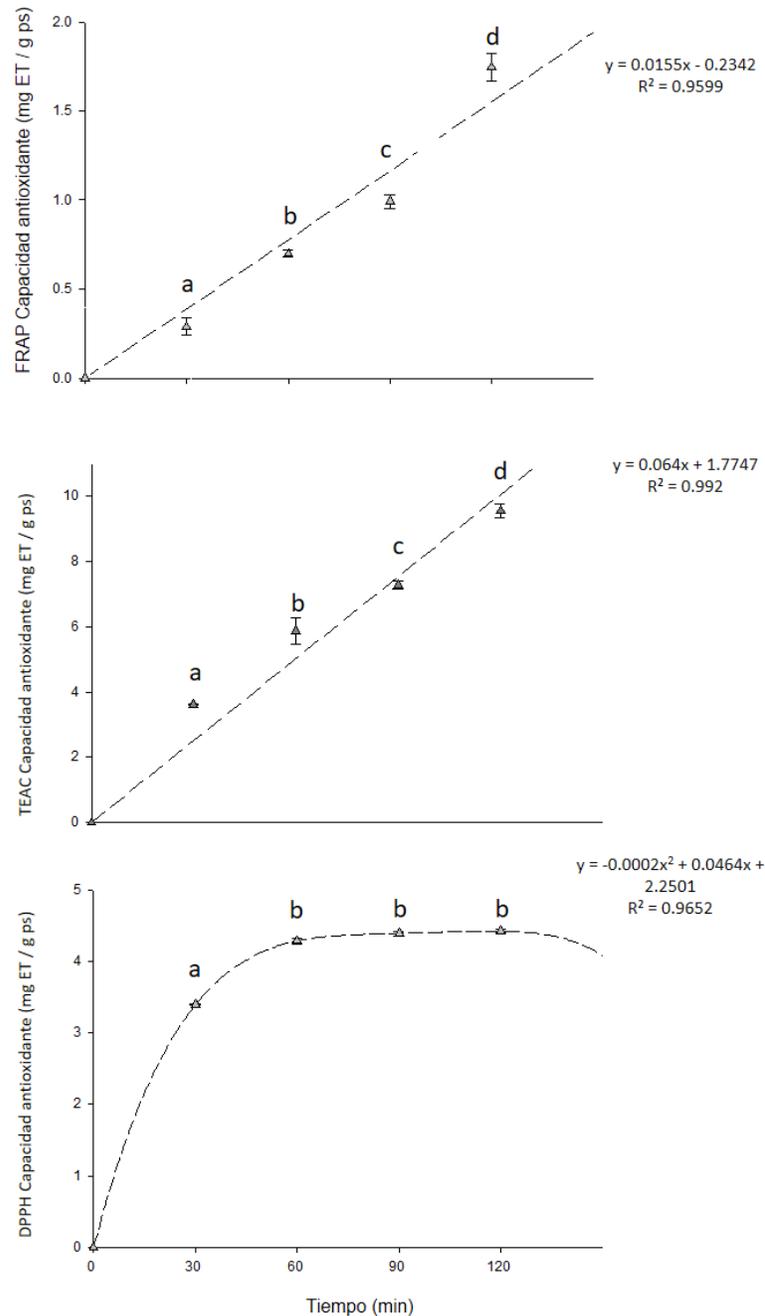


Figura 12. Cinética de la capacidad antioxidante durante la fase intestinal de una digestión in vitro de pasta de aguacate cv. 'Hass', evaluada por los métodos de A) FRAP, B) TEAC y C) DPPH. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El comportamiento de estos resultados es similar al descrito para la difusión pasiva de los compuestos fenólicos dializables discutido anteriormente. Además, se observa diferente sensibilidad y cinética de acuerdo al método, siendo FRAP y TEAC similares entre sí, pero

diferiendo de DPPH. Este comportamiento concuerda con lo reportado en pulpa de aguacate por Ruiz-Pardo *et al.* (2014), donde se reporta que la mayor capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se presenta a los 120 min. La capacidad antioxidante se atribuye a que varios compuestos con actividad reductora y quelante que se solubilizaron y fueron capaces de atravesar la membrana de la diálisis (Gullon *et al.*, 2015).

El comportamiento cinético de la capacidad antioxidante se ajustó a un modelo de primer orden para los métodos de FRAP y TEAC, obteniéndose un valor de  $R^2$  de 0.95 y 0.99, respectivamente. Estos resultados sugieren que el mecanismo de difusión se rige principalmente por una difusión pasiva de los compuestos responsables, a partir de una zona de mayor concentración a una de menor concentración (Ritger y Peppas, 1987). Respecto al método DPPH, su comportamiento se ajustó a un modelo de segundo orden, en donde se obtuvo un valor de  $R^2$  de 0.96. Se observó un aumento en capacidad antioxidante hasta los 60 min, a partir de entonces, los valores se estabilizaron sin mostrar cambios significativos ( $p > 0.05$ ) (Fraga *et al.*, 2017). Este comportamiento sugiere que la concentración se mantiene constante debido a que se obtuvo un equilibrio de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante dentro de la membrana de la diálisis, así como fuera de ella, donde la capacidad antioxidante se mantuvo después de los 60 min. Este comportamiento puede deberse a que el método DPPH presenta mayor afinidad a otros compuestos con mayor solubilidad y/o bajo peso molecular, lo cual detecto una mayor capacidad antioxidante.

Por último, se observó una alta correlación positiva ( $R^2 > 0.97$ ) entre la concentración de compuestos fenólicos totales con la capacidad antioxidante, independientemente del método utilizado para cuantificarla. Esto sugiere que la capacidad antioxidante depende en gran medida del contenido de estos compuestos fenólicos, ya que pueden reaccionar con los radicales libres, convirtiéndolos en productos más estables. Otros estudios reportan valores de correlación similares al estudiar subproductos de frutas tropicales, entre el contenido de compuestos fenólicos de la cáscara de ilama, chirimoya y la pitahaya ( $1.70 \pm 0.06$ ,  $0.59 \pm 0.04$ ,  $0.10 \pm 0.01$  g EAG/100 ps, respectivamente) y su capacidad antioxidante determinada por los métodos de ABTS y DPPH ( $11.70 \pm 1.47$  y  $4.63 \pm 0.66$ ,  $2.12 \pm 0.12$  y  $0.33 \pm 0.02$  y  $0.65 \pm 0.04$  y  $0.16 \pm 0.04$  mM ET/100 g ps para ilama, chirimoya y pitahaya, respectivamente), presentando una correlación de 0.94 en ABTS y 0.96 en DPPH (de Moraes Barros *et al.*, 2012; Omena *et al.*, 2012). Los resultados aquí descritos,

en conjunto con los de otros, sugieren que el contenido de compuestos fenólicos contribuye de manera importante a la actividad antioxidante de la pasta de aguacate de cv 'Hass'.

#### 6.8. Evaluación *in silico* de la Interacción de los Compuestos Fenólicos de la Pasta de Aguacate cv. 'Hass' y el Colesterol.

Los compuestos fenólicos bioaccesibles en el intestino delgado pueden disminuir la absorción del colesterol por medio de diferentes mecanismos, dentro de estos, se encuentra la captura de sustratos descrita en la sección de antecedentes. La interacción de los compuestos fenólicos con las sales biliares ha sido más estudiado, donde se ha reportado que los compuestos fenólicos forman enlaces de hidrogeno con ellas, lo que conduce a que estén menos disponibles para facilitar la solubilización del colesterol en el medio intestinal (Collado *et al.*, 2016). Sin embargo, existe poca literatura de cómo los compuestos fenólicos interactúan directamente con el colesterol. Por lo tanto, se propone que los compuestos fenólicos interactúan con el colesterol, evitando que éste se esterifique y quede dentro de las micelas.

Se utilizó la metodología BLYP/6-31G\* para crear las moléculas optimizadas; el proceso busca encontrar la geometría de una disposición particular de los átomos que representa un mínimo de energía local o global, donde, de acuerdo con algún modelo computacional de enlace químico, la red entre la fuerza atómica en cada átomo es aceptablemente cercana a cero, y la posición en la superficie de energía potencial (PES) es un punto estacionario (Schlege, 1989). Las estructuras optimizadas a menudo corresponden a una sustancia tal como se encuentra en la naturaleza, mientras que la geometría de dicha estructura se puede utilizar en una variedad de investigaciones experimentales y teóricas en los campos (Schlegel, 2011). Asimismo, se realizó un mapa electrostático del colesterol y los compuestos fenólicos de interés, estos resultados se presentan en la Figura 13.

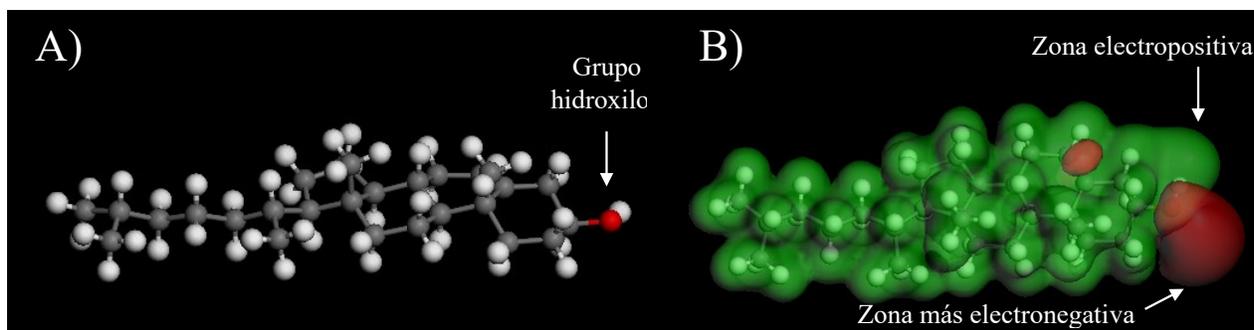


Figura 13. A) Molécula optimizada de colesterol. B) Mapa electrostático de la molécula del colesterol, en color verde se indica la zona electropositiva y en color rojo la zona electronegativa.

Las energías de las moléculas optimizadas se presentan en el Cuadro 9, así como las energías de las interacciones entre cada uno de los compuestos fenólicos con el colesterol. Las moléculas optimizadas representan, teóricamente, la forma más estable de cada compuesto, lo cual se denota por su energía, por ejemplo, el colesterol presentó una menor energía, en comparación con los compuestos fenólicos. Se observan el área de mayor electropositividad (verde) y el área de mayor electronegatividad (roja); esta última se debe a los electrones libres que posee el oxígeno en el grupo hidroxilo (-OH). De acuerdo con esto, se esperaría que la unión entre los compuestos fenólicos y el colesterol se de en esta zona. Se observa que las energías de los compuestos fueron similares entre sí, pero diferentes a la del colesterol. Las moléculas optimizadas de ácido protocatéico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico se presentan en la Figura 14, Figura 15 y Figura 16, respectivamente.

En el caso del ácido protocatéico, éste cuenta con un solo grupo carboxilo y dos hidroxilos; se observan tres áreas de mayor electronegatividad, siendo la del oxígeno del carboxilo la de mayor área. Asimismo, el protón unido al oxígeno 1 actúa como grupo donador de puente de hidrógeno, mientras que el oxígeno 2 actúa como receptor, por lo cual resulta factible que el acoplamiento molecular con el colesterol se podría llevar a cabo en este sitio. El mapa electrostático del ácido ferúlico muestra un comportamiento similar al observado en el ácido protocatéico, en donde se observa la presencia de un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. Este último actúa como donador y receptor de puente de hidrógeno, sin embargo, forma también un enlace intramolecular que lo debilita.

El ácido *p*-cumárico cuenta con un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. En este caso, el grupo carboxilo es más electronegativo, lo cual se observa claramente en el área alrededor del oxígeno de este grupo, además de la zona electropositiva cercana al hidrogeno del hidroxilo. De acuerdo con esto, este grupo puede formar un puente de hidrogeno más estable con el grupo hidroxilo del colesterol. Una vez creados los mapas electrostáticos para las moléculas anteriormente descritas, se analizaron las interacciones entre cada uno de los compuestos fenólicos con el colesterol.

**Cuadro 9.** Energías de interacción de las moléculas optimizadas y de los complejos compuesto fenólico-colesterol.

Molécula optimizada	Energía de interacción (Hartress)	Grupo funcional		
Colesterol (C)	-1131.42	Hidroxilo (-OH) del C3		
Ácido protocatéico (APCA)	-571.33	Carboxilo (COOH)		
Acido ferúlico (AF)	-689.21	Carboxilo (COOH)		
Acido <i>p</i> -coumárico (APCO)	-574.67	Hidroxilo (-OH) del fenil		

Complejo	Energía de interacción Hartrees (kcal/mol)	Distancia de los puentes de hidrógeno (Å)	Ángulo $\alpha$	Grupo funcional
C-APCA	-1703.77 (10.84)	2.762 2.866	162.14 137.16	Hidroxilo (-OH) del C3 y carboxilo (COOH)
C-AF	1820.65 (10.83)	2.854 2.746	134.68 160.45	Hidroxilo (-OH) del C3 y carboxilo (COOH)
C-APCO	-1706.10 (4.35)	2.852	128.85 96.55	Hidroxilo (-OH) del C3 e hidroxilo (-OH) del fenil

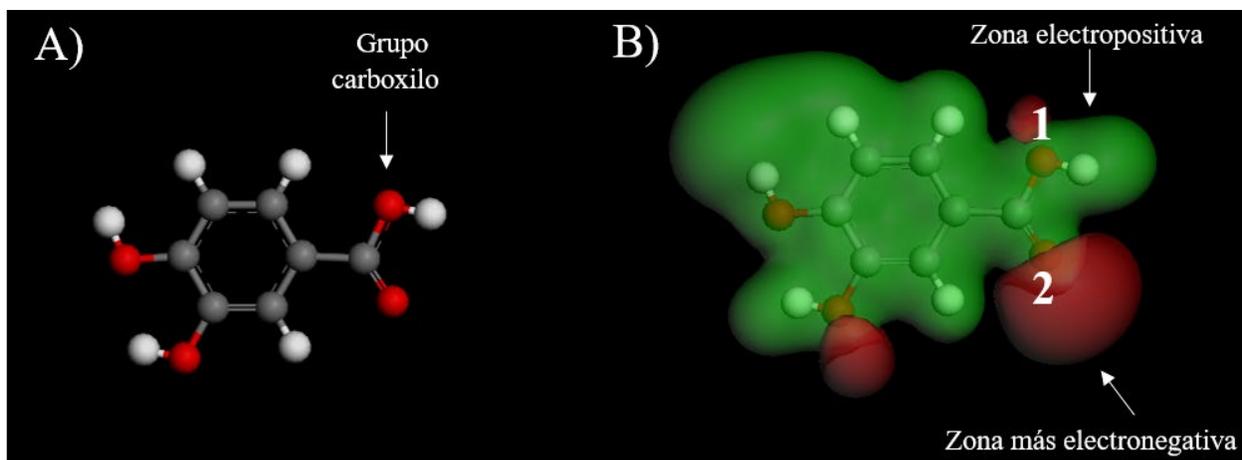


Figura 14. A) Molécula optimizada de ácido protocatéico. B) Mapa electrostático de la molécula del ácido protocatéico, en color verde se indica la zona electropositiva y en color rojo la zona electronegativa.

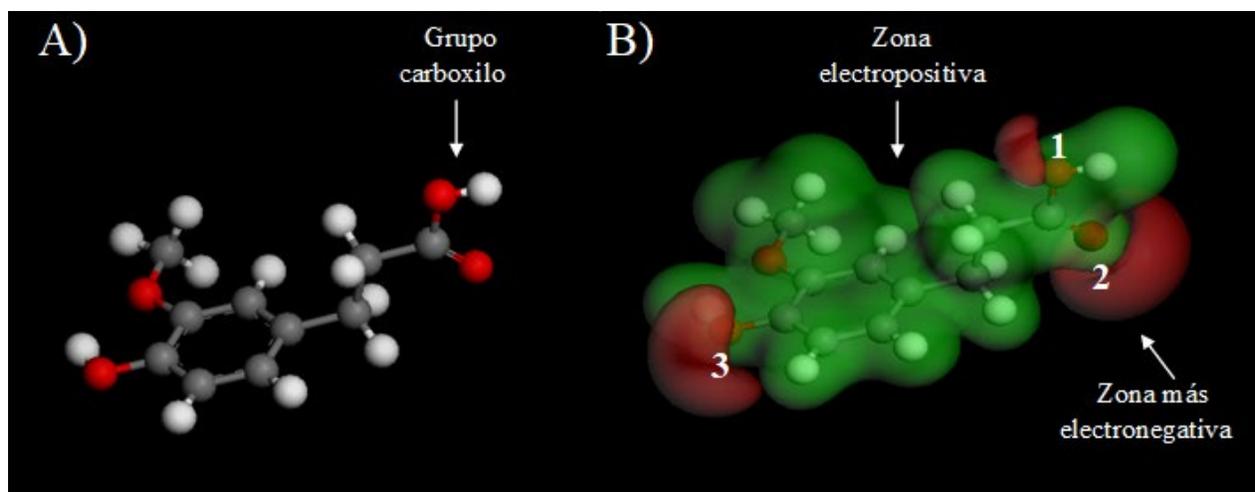


Figura 15. A) Molécula optimizada de ácido ferúlico. B) Mapa electrostático de la molécula del ácido ferúlico, en color verde se indica la zona electropositiva y en color rojo la zona electronegativa.

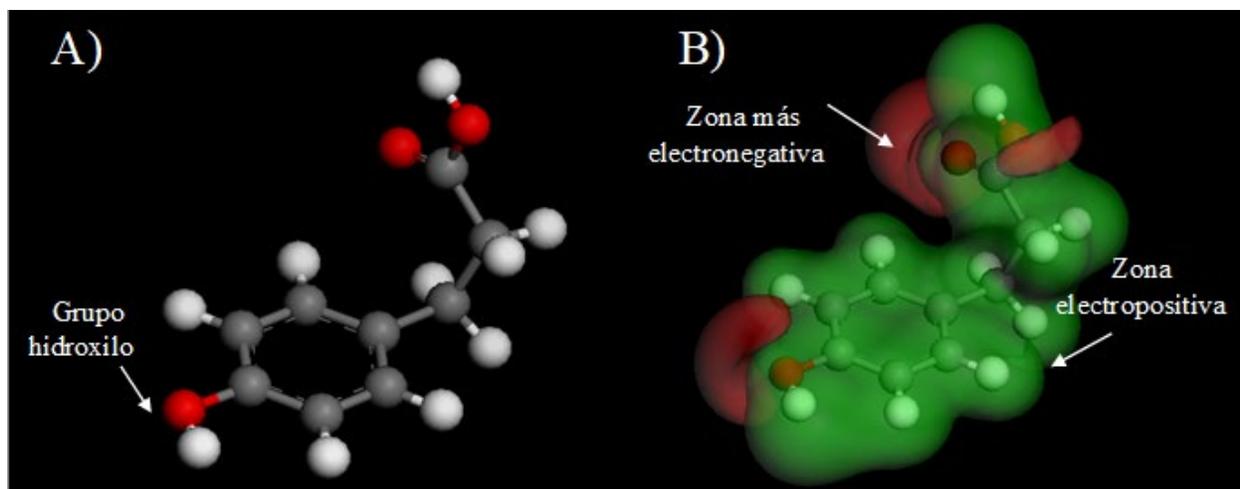


Figura 16. A) Molécula optimizada de ácido *p*-cumárico. B) Mapa electrostático de la molécula del ácido *p*-cumárico, en color verde se indica la zona electropositiva y en color rojo la zona electronegativa.

Se realizaron simulaciones utilizando la DFT para estudiar las interacciones de los compuestos fenólicos con el colesterol, analizando los sitios de unión entre ellos. Los resultados demostraron que en el complejo ácido protocatéico-colesterol (Figura 17), presentó una energía de unión de 10.8441 kcal/mol. Se formaron puentes de hidrogeno entre el oxígeno del grupo carboxílico y el oxígeno del grupo hidroxilo del carbono 3 del colesterol, con una longitud de enlace de 2.762 Å y un ángulo 162.14°. Se formó también otro puente de hidrógeno entre el oxígeno 2 del grupo carboxílico y el oxígeno del hidroxilo del colesterol, con una longitud de 2.866 Å y ángulo de 137.16°. La interacción O-H-O tiene un promedio de 2.7 Å y una fuerza de unión es de 5.2 kcal/mol (Fuller, 1959). De acuerdo al ángulo en el que se formen, es habitual clasificar a los puentes de hidrógeno como "débiles", "fuertes" o "normales", considerándose como fuertes aquellos que tienen ángulos de enlace entre 170 y 180° y débiles los que sean <120° (Luzar y Chandler, 1996). De acuerdo con esto, los ángulos de los puentes de hidrogeno formados entre el ácido protocatéico y el colesterol se consideran como fuertes, lo cual sugiere una buena interacción entre ellos.

Los resultados de la simulación de las interacciones entre el ácido ferúlico y el colesterol se muestran en la Figura 18. Este complejo presentó una energía de unión de 10.8379 kcal/mol, formando puentes de hidrógeno entre el oxígeno 1 del grupo carboxilo y el oxígeno del hidroxilo del colesterol, con una longitud de enlace de 2.854 Å y un ángulo de 134.68°. Asimismo, se formó

un segundo puente de hidrogeno entre el oxígeno 2 del grupo carboxilo y el oxígeno del hidroxilo del colesterol, con una longitud de 2.746 Å y un ángulo de 160.45°. Los valores de los puentes de hidrógeno formados en el complejo ácido ferúlico-colesterol fueron similares a los presentados en el complejo ácido protocatéico-colesterol.

Por último, los resultados para el complejo *p*-cumárico-colesterol se presentan en la Figura 19. Este complejo presentó valores menores a los de los complejos anteriores, con una energía de unión de 4.2487 kcal/mol. Además, en este complejo no se formaron uniones entre el grupo carboxilo del ácido *p*-cumárico y el grupo hidroxilo del colesterol, lo cual puede atribuirse a impedimentos estéricos causados por la conformación espacial de la molécula optimizada del ácido *p*-cumárico. Dichos impedimentos se asocian también a que alrededor del grupo carboxilo existe una zona de mayor electropositividad a la del grupo hidroxilo, por lo cual, la interacción ocurrió entre este grupo y el grupo hidroxilo del colesterol (Fuller, 1959). La unión detectada se formó mediante un puente de hidrogeno, con una longitud de 2.852 Å y ángulos de 128.85° y 96.65°. De acuerdo a esto, se propone que el ácido protocatéico y el ácido ferúlico presentan una mayor afinidad para interactuar con el colesterol, lo cual les confiere una alta capacidad para inhibir su micelización, en comparación con el ácido *p*-cumárico.

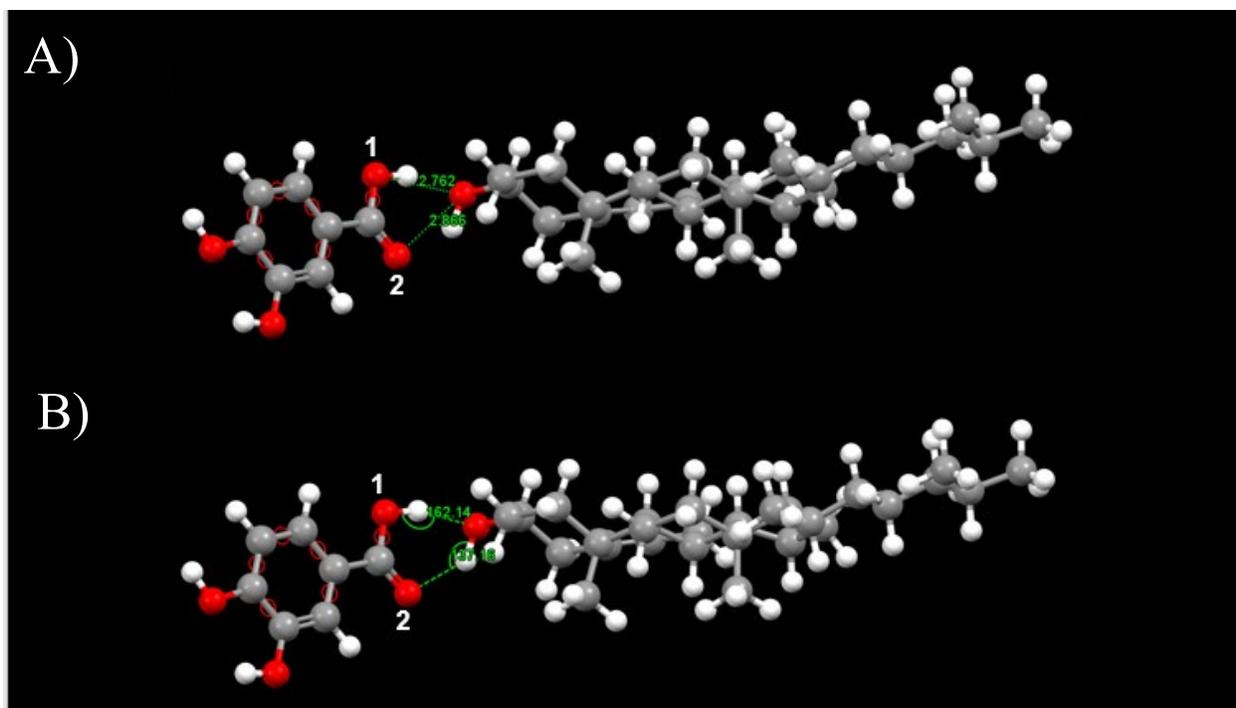


Figura 17. A) Distancia y B) ángulos de los puentes de hidrógeno del complejo ácido protocatéico – colesterol.

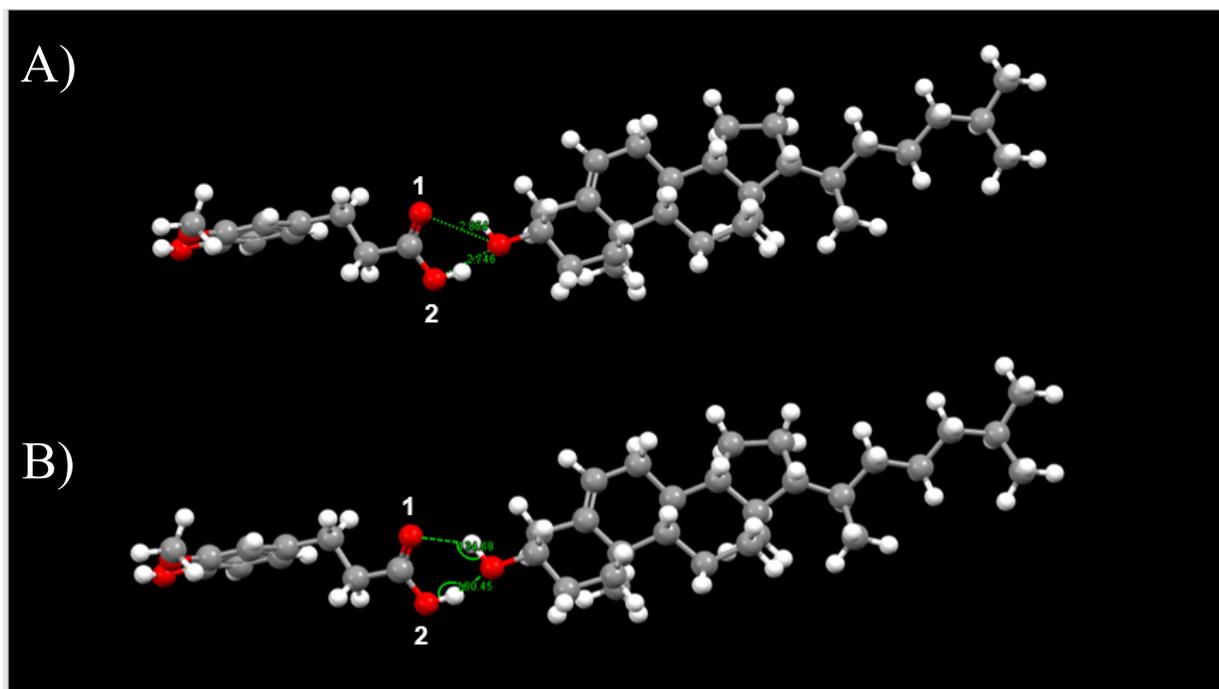


Figura 18. A) Distancia y B) ángulos de los puentes de hidrógeno del complejo ácido ferúlico – colesterol.

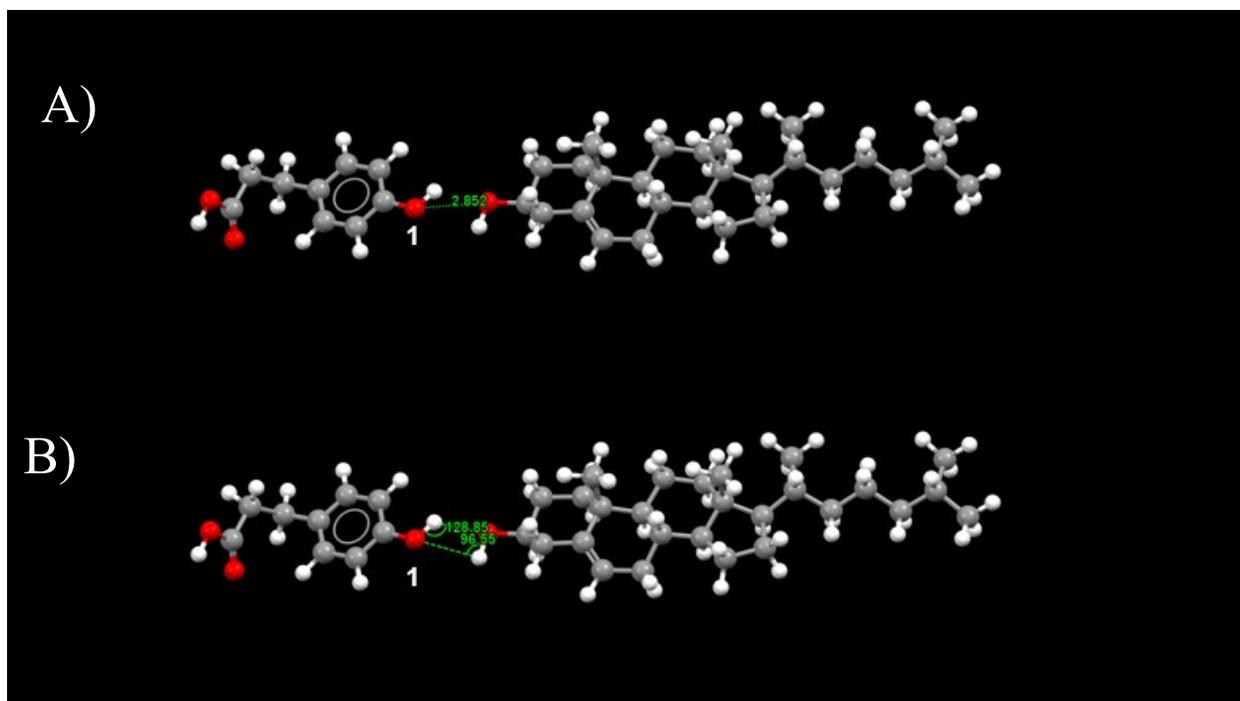


Figura 19. A) Distancia y B) ángulos de los puentes de hidrogeno del complejo ácido *p*-cumárico – colesterol.

Existen pocos estudios de investigación teórica en donde se describan las interacciones entre compuestos fenólicos con el colesterol. Zheng *et al.* (2020) analizaron las interacciones catequina-colesterol, donde observaron que en el complejo epigalocatequina-colesterol se formaban puentes de hidrógeno con distancias de 2.15 y 2.01 Å y una energía de unión de 2.6 kcal/mol. En el caso del complejo epicatequina-colesterol, se presentaron distancias de 2.12 y 1.78 Å con una energía de unión de 1.8 kcal/mol. De acuerdo con esto, se propuso que la interacción entre las catequinas con el colesterol ocurre principalmente por enlaces de hidrógeno, sin embargo, las transferencias de carga intermolecular e intramolecular (entre el anillo aromático y el grupo hidroxilo) promovidas por las catequinas, mejoran en gran medida la formación de estos puentes. Asimismo, los sitios de unión de epicatequina-colesterol y epigalocatequina-colesterol se localizan en el grupo hidroxilo del anillo A y el oxígeno hidroxílico del colesterol. Las energías de unión que se obtuvieron son mayores a las de este estudio, a pesar de esto, existe bastante evidencia *in vitro* donde las catequinas impiden la incorporación del colesterol a las micelas, dificultando la absorción del colesterol al disminuir su solubilidad. Por ejemplo, las catequinas presentes en la manzana pueden formar precipitados insolubles con productos de oxidación del colesterol y, en

consecuencia, impedir su absorción (Ogino *et al.*, 2007). Por lo tanto, se esperan resultados favorables de estudios *in vitro* e *in vivo* de los compuestos fenólicos presentes en la pasta de aguacate sobre la disminución del colesterol.

Existen estudios *in vitro* e *in vivo* que muestran la efectividad de los ácidos protocatéico, ferúlico y *p*-cumárico sobre la disminución del colesterol, sin embargo, el mecanismo de acción no está claro. Tamvra *et al.* (2004) investigaron los efectos del ácido protocatéico sobre el colesterol sérico y la expresión génica relacionada con el metabolismo del colesterol en ratas. Las ratas fueron alimentadas con una dieta libre de colesterol con o sin 5 g de ácido protocatéico/kg de dieta durante 4 semanas. Las concentraciones séricas de colesterol total, HDL, VLDL, IDL y LDL, fueron significativamente menores en el grupo tratado con ácido protocatéico, en comparación con el control durante el período de alimentación, lo cual indica el efecto del compuesto fenólico sobre el colesterol y las diversas lipoproteínas que lo contienen. Asimismo, Grzelak-Błaszczyk *et al.* (2020) observaron que el ácido protocatéico presente en subproductos de cebolla amarilla, mostraron un efecto positivo sobre los lípidos sanguíneos, aumentando la concentración de HDL, reduciendo así los factores de riesgo de lesiones ateroscleróticas, en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

El ácido ferúlico es un compuesto fenólico ubicuo en una gran variedad de frutas, verduras, bebidas y granos. Entre sus bioactividades, se encuentra su capacidad como eliminador de radicales hidroxilo y peroxilo que explican su función protectora (Jain y Surana, 2016b). Se ha observado que el extracto etanólico de *P. cineraria*, mostró una potente acción antihiperlipidémica contra la hiperlipidemia inducida por una dieta alta en grasas en ratas (Jain y Surana, 2016a). Sin embargo, la composición exacta del extracto no fue evaluada, por lo que es posible que además del ácido ferúlico, existan otros fitoquímicos responsables del efecto antihiperlipidémico observado. Yogeeta *et al.* (2006) observaron que el ácido ferúlico también disminuyó los niveles de fosfolípidos, peróxidos de lípidos, LDL y VLDL en ratas tratadas con isoproterenol. Por lo tanto, la suplementación con ácido ferúlico y otros fitoquímicos puede mejorar los perfiles de lípidos y el estrés oxidativo, mitigar la oxidación del LDL y otros parámetros relacionados en sujetos dislipidémicos.

En el caso del ácido *p*-cumárico, Shen *et al.* (2019) evaluaron su efecto en ratones alimentados con

una dieta alta en grasas. Los autores reportaron actividad antioxidante y modulación del perfil lipídico, asociadas también a efectos hepatoprotectores generales. Asimismo, Amalan *et al.* 2016, demostraron que el ácido *p*-cumárico reduce el colesterol total y TAG, tanto en plasma como en tejidos (hígado y riñón), al disminuir el LDL y VLDL y aumentar el nivel de HDL en ratas diabéticas. De acuerdo con la evidencia reportada en el presente estudio, se propone que los compuestos fenólicos mayoritarios identificados en la pasta de aguacate pueden interactuar con el colesterol a través de puentes de hidrógeno. Si las interacciones ocurren en el lumen del intestino delgado, éstas pueden influir sobre la formación de micelas de colesterol, formando complejos insolubles con él que pueden reducir su absorción entérica. Este es un posible mecanismo a través del cual estos compuestos fenólicos pueden impedir, o al menos reducir, la absorción de colesterol dietario o biliar, resultando en beneficios a la salud del consumidor. Esta evidencia soporta los resultados observados en modelos *in vitro* e *in vivo* reportados por otros autores, en donde el consumo de estos compuestos o extractos que los contienen, impacta positivamente el colesterol sérico, así como el perfil lipídico en general.

## 7. CONCLUSIÓN

La pasta de aguacate cv. 'Hass' es un subproducto que presenta valores considerables de ácidos fenólicos, principalmente ácido ferúlico, ácido protocatéico y ácido *p*-cumárico, así como carotenoides, tocoferoles y ácidos grasos, los cuales no son aprovechados. Su composición de compuestos bioactivos le permite ejercer una capacidad antioxidante importante, de acuerdo a diferentes metodologías utilizadas para cuantificarla. La digestión *in vitro* mostró que los compuestos fenólicos totales tuvieron una mayor liberación en la fase gástrica, seguido de la fase intestinal, mientras que la capacidad antioxidante mostró un comportamiento similar. Los análisis *in silico* sugieren que sus principales compuestos fenólicos interactúan con el colesterol a través de puentes de hidrógeno, siendo el ácido protocatéico el que lo hace con mayor afinidad. Esto permite sugerir que los compuestos fenólicos de la pasta de aguacate podrían inhibir la micelización de colesterol en el intestino delgado, reduciendo así su absorción entérica y contribuyendo a prevenir, mitigar o corregir la hipercolesterolemia. La pasta de aguacate cv. 'Hass' es normalmente descartada por la industria, sin embargo, la evidencia aquí presentada demuestra que podrían representar una fuente alternativa de compuestos con bioactividades importantes. Entre sus posibles aplicaciones se encuentran su incorporación en alimentos funcionales y nutracéuticos con efectos benéficos a la salud, a través de su capacidad de formar complejos con el colesterol que impidan su micelización y absorción entérica.

## **8. RECOMENDACIONES**

Las investigaciones futuras deben abordar la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y la actividad inhibitoria de la micelización del colesterol en un modelo *in vivo*, de los compuestos bioactivos presentes en la pasta de aguacate, para posteriormente considerar ensayos en seres humanos. Además, es de suma importancia mejorar el manejo y almacenamiento de la pasta de aguacate, de esta manera se evitará la degradación de sus compuestos bioactivos, maximizando así sus potenciales aplicaciones. Los resultados obtenidos de este estudio servirán como punto de inicio para definir la utilización más adecuada de la pasta de aguacate, tales como en el desarrollo de alimentos funcionales o nutraceuticos.

## 9. REFERENCIAS

- AHA, A. H. A. (2017). Resumen de estadísticas de 2017 Enfermedad del corazón y ataque cerebral. *American Heart Association.*, 1–6. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000485>
- Aissata, K. M., Wenping, L., Lamine, T. S., Barra, C. J., y Sidikiba, S. (2019). Effect of Selected Plant Extracts on Pancreatic Lipase Inhibition, Pancreatic Cholesterol Esterase Activities and Cholesterol Micellization. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 7(11), 150.
- Alissa, K., Hung, Y.-C., Hou, C. Y., Lim, G. C. W., y Ciou, J.-Y. (2020). Developing New Health Material: The Utilization of Spray Drying Technology on Avocado (Persea Americana Mill.) Seed Powder. *Foods*, 9(2), 139.
- Alvarez-Parrilla, E., Laura, A., Amarowicz, R., y Shahidi, F. (2012). Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry*, 133(3), 827–834.
- Amado, D. A. V., Detoni, A. M., de Carvalho, S. L. C., Torquato, A. S., Martin, C. A., Tiunan, T. S., y Cottica, S. M. (2019). Tocopherol and fatty acids content and proximal composition of four avocado cultivars (Persea americana Mill). *Acta Alimentaria*, 48(1), 47–55.
- Amado, D. A. V., Helmann, G. A. B., Detoni, A. M., Carvalho, S. L. C. de, Aguiar, C. M. de, Martin, C. A., y Cottica, S. M. (2019). Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (Persea americana Mill.). *Brazilian Journal of Food Technology*, 22.
- Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D., y Ramakrishnan, A. (2016). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 230–236.
- Amengual, J. (2019). Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health. *Nutrients* , Vol. 11. <https://doi.org/10.3390/nu11102388>
- AOAC. (1990). *Association of Official Agricultural Chemistry. Official Methods of Analysis of the AOAC." 12th. De Washington D.C.U.S.A.*
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., y Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51–60.
- Ashton, O. B. O., Wong, M., McGhie, T. K., Vather, R., Wang, Y., Requejo-Jackman, C., y Woolf, A. B. (2006). Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10151–10158.
- Astudillo-Ordóñez, C. E., y Rodríguez, P. (2018). Physicochemical parameters of avocado Persea americana Mill. cv. Hass (Lauraceae) grown in Antioquia (Colombia) for export. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(2), 383–392.
- Athaydes, B. R., Alves, G. M., de Assis, A. L. E. M., Gomes, J. V. D., Rodrigues, R. P., Campagnaro, B. P., y Pereira, T. M. C. (2019). Avocado seeds (Persea americana Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food Research International*, 119,

751–760.

- Ayala-Zavala, J., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., y González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, *44*(7), 1866–1874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular aspects of medicine*, *61*, 92–103.
- Bacchetti, T., Tullii, D., Masciangelo, S., Brugè, F., Silvestri, S., Orlando, P., y Ferretti, G. (2016). Correlation between plasma levels of carotenoid and oxidized low density lipoproteins: A short human intervention study. *Energy (kcal)*, *18*, 2.
- Barreira, J. C. M., Arraibi, A. A., y Ferreira, I. C. F. R. (2019). Bioactive and functional compounds in apple pomace from juice and cider manufacturing: Potential use in dermal formulations. *Trends in Food Science & Technology*, *90*, 76–87.
- Bartolomé, A. P., Rupérez, P., y Fúster, C. (1995). Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chemistry*, *53*(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)95790-D](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)95790-D)
- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical review A*, *38*(6), 3098.
- Benzie I.F y Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical biochemistry*, *239*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., y García-Conesa, M. T. (2007). (2007). Stability of polyphenols in chokeberry ( *Aronia melanocarpa* ) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, *102*, 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.025>
- Bhaskaragoud, G., Rajath, S., Mahendra, V. P., Kumar, G. S., Krishna, A. G. G., y Kumar, G. S. (2016). Hypolipidemic mechanism of oryzanol components-ferulic acid and phytosterols. *Biochemical and biophysical research communications*, *476*(2), 82–89.
- Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Perera, S., Low, M., Basu, A., Devi, O. A., y Papoutsis, K. (2019). The odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their health benefits. *Antioxidants*, *8*(10), 426.
- Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican ‘Ataulfo’ mango (*Mangifera indica* L.) by-products. *Food & function*, *6*(3), 859–868.
- Blanco Mejia, S., Messina, M., Li, S. S., Vigiuliouk, E., Chiavaroli, L., Khan, T. A., y Jenkins, D. J. A. (2019). A Meta-Analysis of 46 Studies Identified by the FDA Demonstrates that Soy Protein Decreases Circulating LDL and Total Cholesterol Concentrations in Adults. *The Journal of Nutrition*, *149*(6), 968–981. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz020>
- Böhm, F., Edge, R., y Truscott, G. (2012). Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. *Molecular nutrition & food research*, *56*(2), 205–216.
- Boselli, E., Cardenia, V., y Rodríguez-Estrada, M. T. (2012). Cholesterol photosensitized oxidation

in muscle foods. *European journal of lipid science and technology*, 114(6), 644–655.

- 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.
- Boulet, J.-C., Trarieux, C., Souquet, J.-M., Ducasse, M.-A., Caillé, S., Samson, A., y Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food chemistry*, 190, 357–363.
- Brand-Williams, W y Cuvelier, M. E . (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., y Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 237, 1073–1082.
- Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., y Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 46–52.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., y Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Carlo, G., Carotenuto, A., Caruso, D., Buonomo, G., Avino, M. D., Brancaccio, D., y Novellino, E. (2018). A nutraceutical formulation based on Annurca apple polyphenolic extract is effective on intestinal cholesterol absorption : A randomised , placebo- controlled , crossover study. *PharmaNutrition*, 6(3), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.05.001>
- Carlo, G., Stiuso, P., Campiglia, P., y Novellino, E. (2013). In vitro hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. *Food Chemistry*, 141(3), 2379–2384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.128>
- Carocho, M., y Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15–25.
- Celep, E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Acar, E. T., y Yesilada, E. (2015). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*, 78, 209–215.
- Cerretani, L., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Gallina-Toschi, T., y Simó-Alfonso, E. F. (2010). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by nanoliquid chromatography with ultraviolet– visible detection using a silica monolithic column. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 757–761.
- Chang, S., Freeman, N. L. B., Lee, J. A., Stoll, C. R. T., Calhoun, A. J., Eagon, J. C., y Colditz, G. A. (2018). Early major complications after bariatric surgery in the USA, 2003–2014: a

systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 19(4), 529–537.

- Chemat, F., Vian, M. A., y Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(ISSN 1422-0067), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Cho, L., Rocco, M., Colquhoun, D., Sullivan, D., Rosenson, R. S., Dent, R., y Stroes, E. (2016). Clinical profile of statin intolerance in the phase 3 GAUSS-2 study. *Cardiovascular drugs and therapy*, 30(3), 297–304.
- Cicero, A. F. G., Colletti, A., Bajraktari, G., Descamps, O., Djuric, D. M., Ezhov, M., y Latkovskis, G. (2017). Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutrition reviews*, 75(9), 731–767.
- Cicero, A. F. G., Tartagni, E., y Ertek, S. (2014). Safety and tolerability of injectable lipid-lowering drugs: a review of available clinical data. *Expert opinion on drug safety*, 13(8), 1023–1030.
- Collado, A. de A. M., Dupuy, F. G., Morero, R. D., y Minahk, C. (2016). Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(7), 1479–1487.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008>
- Curley, S., Gall, J., Byrne, R., Yvan-Charvet, L., y McGillicuddy, F. C. (2020). Metabolic Inflammation in Obesity—At the Crossroads Between Fatty Acid and Cholesterol Metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research*, 1900482.
- Davies, J. T., Delfino, S. F., Feinberg, C. E., Johnson, M. F., Nappi, V. L., Olinger, J. T., y Swanson, H. I. (2016). Current and emerging uses of statins in clinical therapeutics: A review. *Lipid Insights*, 9(1), 13–29. <https://doi.org/10.4137/LPI.S37450>
- Davis, A. R., Collins, J., Fish, W. W., Tadmor, Y., Webber, C. L., y Perkins-Veazie, P. (2007). Rapid method for total carotenoid detection in canary yellow-fleshed watermelon. *Journal of Food Science*, 72(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00381.x>
- de Jong, A., Plat, J., y Mensink, R. P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(7), 362–369.
- de Moraes Barros, H. R., de Castro Ferreira, T. A. P., y Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food chemistry*, 134(4), 1892–1898.
- DellaPenna, D., y Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 711–738.
- Descovich, G. C., Gaddi, A., Mannino, G., Cattin, L., Senin, U., Caruzzo, C., y Benassi, M. S. (1980). Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hypercholesterolaemic patients. *The Lancet*, 316(8197), 709–712.
- DeVries, J. W. (2004). Dietary fiber: the influence of definition on analysis and regulation. *Journal of AOAC International*, 87(3), 682–706.

- Dixon, R. A., y Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Domínguez-Avila, J. A., García, J. R., González, G. A., y Rosa, A. A. de la. (2017). The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling. *Molecules*, 1, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules22060903>
- Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C.-Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sánchez, M., y González-Aguilar, G. A. (2017). Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & function*, 8(1), 15–38.
- dos Santos, M. A. Z., Alicieo, T. V. R., Pereira, C. M. P., Ramis-Ramos, G., y Mendonça, C. R. B. (2014). Profile of bioactive compounds in avocado pulp oil: influence of the drying processes and extraction methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 19–27.
- Dragan, S., Serban, C., y Banach, M. (2014). Can we change the functionality of HDL cholesterol with nonpharmacological and pharmacological agents? *Current medicinal chemistry*, 21(25), 2927–2946.
- Dreher, M. L., y Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 738–750. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.556759>
- Duangjai, A., Limpeanchob, N., Trisat, K., y Amornlerdpison, D. (2016). Spirogyra neglecta inhibits the absorption and synthesis of cholesterol in vitro. *Integrative Medicine Research*, 5(4), 301–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.08.004>
- Duangjai, A., Limpeanchob, N., Trisat, K., y Ounaroon, A. (2016). *Effects of extraction solvents of dietary plants on lipid lowering activity*. 10(32), 538–545. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6152>
- Eastwood, M. A., y Morris, E. R. (1992). Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition*, 55(2), 436–442.
- Ejiofor, N. C., Ezeagu, I. E., Ayoola, M. B., y Umera, E. A. (2018). Determination of the chemical composition of avocado (*Persea americana*) seed. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci. Open J*, S51–S55.
- Feng, D., Ohlsson, L., y Duan, R. D. (2010). Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids in Health and Disease*, 9, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-40>
- Feng, J., Yang, J., Chang, Y., Qiao, L., Dang, H., Luo, K., y Cheng, J. (2019). Caffeine-free hawk tea lowers cholesterol by reducing free cholesterol uptake and the production of very-low-density lipoprotein. *Communications Biology*, 173(2019), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0396-4>
- Figueroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., y Segura-Carretero, A. (2018a). Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 105, 752–

- Figueroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., y Segura-Carretero, A. (2018b). Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. *Food Chemistry*, *245*, 707–716. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.011>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fraga, S. C., Kujawska, A., Kujawski, W., Brazinha, C., y Crespo, J. G. (2017). Transport of dilute organics through dense membranes: assessing impact on membrane-solute interactions. *Journal of Membrane Science*, *523*, 346–354.
- Fuller, W. (1959). Hydrogen bond lengths and angles observed in crystals. *The Journal of Physical Chemistry*, *63*(10), 1705–1717.
- Furlan, C. P. B., Valle, S. C., Östman, E., Maróstica, M. R., y Tovar, J. (2017). Inclusion of Hass avocado-oil improves postprandial metabolic responses to a hypercaloric-hyperlipidic meal in overweight subjects. *Journal of Functional Foods*, *38*, 349–354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.019>
- García-Lomillo, J., y González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *16*(1), 3–22.
- Ge, Y., Si, X. Y., Cao, J. Q., Zhou, Z. X., Wang, W. L., y Ma, W. H. (2017). Morphological characteristics, nutritional quality, and bioactive constituents in fruits of two avocado (*Persea americana*) varieties from Hainan province, China. *Journal of Agricultural Science*, *9*(2).
- Giangreco, F., Höfninger, S., Bakalis, E., y Zerbetto, F. (2018). Impact of the green tea ingredient epigallocatechin gallate and a short pentapeptide (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) on the structural organization of mixed micelles and the related uptake of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1862*(9), 1956–1963.
- Goñi, I., Díaz-rubio, M. E., Pérez-jiménez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.010>
- Grunovaitė, L., Pukalskienė, M., Pukalskas, A., y Venskutonis, P. R. (2016). Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of functional foods*, *24*, 85–96.
- Grzelak-Błaszczyk, K., Milala, J., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Czarnecki, A., Kosmala, M., y Juśkiewicz, J. (2020). Protocatechuic acid and quercetin glucosides in onions attenuate changes induced by high fat diet in rats. *Food & Function*, *11*(4), 3585–3597.
- Guía ESC/EAS 2016 sobre el tratamiento de las dislipemias. (2017). *Revista Española de Cardiología*, *70*(02), 115. Recuperado de <http://www.revespcardiol.org/es/guia-esc-eas-2016-sobre-el/articulo/90460573/>

- Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., y Viuda-Martos, M. (2015). In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, *19*, 617–628.
- Gupta, P., Sharma, D. C., Yadav, U. C., y Bindal, J. (2019). Adverse Events Encountered in Platelet Aphaeresis Procedure and Their Management: A Retrospective Study. *International Blood Research & Reviews*, 1–6.
- Gwanpua, S. G., Qian, Z., y East, A. R. (2018). Modelling ethylene regulated changes in ‘Hass’ avocado quality. *Postharvest Biology and Technology*, *136*, 12–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.002>
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., y Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 1785–1790. <https://doi.org/10.1021/jf0111155>
- Hemery, Y. M., Anson, N. M., Havenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., y Rouau, X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*, *43*(5), 1429–1438.
- Hernández, Á. L. (2015). Situación actual del sistema producto aguacate. Recuperado de Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) website: [http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/16Situación actual del sistema producto aguacate.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/16Situación%20actual%20del%20sistema%20producto%20aguacate.pdf)
- Hess, D., Keller, H. E., Oberlin, B., Bonfanti, R., y Schüep, W. (1991). Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Journal international de vitaminologie et de nutrition*, *61*(3), 232–238.
- Ho, L.-H., Ramli, N. F., Tan, T.-C., Muhamad, N., y Haron, M. N. (2018). Effect of extraction solvents and drying conditions on total phenolic content and antioxidant properties of watermelon rind powder. *Sains Malays*, *47*(47), 99–107.
- Hollingworth, S. A., Ostini, R., David, M. C., Martin, J. H., y Tett, S. E. (2017). Ezetimibe : Use , costs , and adverse events in Australia. *Cardiovascular therapeutics*, *(35)*1, 40–46. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12236>
- Hurtado-Fernández, E., Carrasco-Pancorbo, A., y Fernandez-Gutierrez, A. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(6), 2255–2267.
- IUPAC. (1979). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* (6ta ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-10129-8>
- 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*, 121–128.
- Jain, P. G., y Surana, S. J. (2016a). Evaluation of Anti-Hyperlipidemic Potential of *Prosopis cineraria* Extract Against High Fat Diet Induced Hyperlipidemia in Laboratory Rat.

*Pharmacologia*. <https://doi.org/10.5567/pharmacologia.2016.44.52>

- Jain, P. G., y Surana, S. J. (2016b). Isolation, characterization and hypolipidemic activity of ferulic acid in high-fat-diet-induced hyperlipidemia in laboratory rats. *EXCLI journal*, 15, 599.
- Jakobek, L., y Mati, P. (2019). Non-covalent dietary fiber - Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.024>
- Jeon, S., Neuringer, M., Kuchan, M. J., y Erdman Jr, J. W. (2018). Relationships of carotenoid-related gene expression and serum cholesterol and lipoprotein levels to retina and brain lutein deposition in infant rhesus macaques following 6 months of breastfeeding or formula feeding. *Archives of biochemistry and biophysics*, 654, 97–104.
- Jiménez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Ruiz-Nicolás, R., Cornejo-Garrido, J., Tapia, A., y Yépez-Mulia, L. (2013). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1–5.
- Jimenez, P., Garcia, P., Quitral, V., Vasquez, K., Parra-Ruiz, C., Reyes-Farias, M., y Soto-Covasich, J. (2020). Pulp, Leaf, Peel and Seed of Avocado Fruit: A Review of Bioactive Compounds and Healthy Benefits. *Food Reviews International*, 1–37.
- Johnston, T. P., Korolenko, T. A., Pirro, M., y Sahebkar, A. (2017). Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management. *Pharmacological research*, 120, 219–225.
- Kajiya, K., Kumazawa, S., y Nakayama, T. (2001). Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(12), 2638–2643.
- Karatoprak, G. Ş., Ilgün, S., y Koşar, M. (2016). Antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. *Turk. J. Pharm. Sci*, 13, 201–212.
- Kendall, C. W. C., Josse, A. R., Esfahani, A., y Jenkins, D. J. A. (2010). Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *British journal of nutrition*, 104(4), 465–473.
- Kobayashi, M., y Ikeda, I. (2013). Modulation of Intestinal Cholesterol Absorption by Dietary Tea Polyphenols. En *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00048-7>
- Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Schweiggert, R. M., Young, G. S., Harrison, E. H., Francis, D. M., y Schwartz, S. J. (2014). Avocado consumption enhances human postprandial provitamin A absorption and conversion from a novel high- $\beta$ -carotene tomato sauce and from carrots. *The Journal of nutrition*, 144(8), 1158–1166.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., y Dykes, G. A. (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4613–4619. <https://doi.org/10.1021/jf300090p>
- Krumreich, F. D., Borges, C. D., Mendonça, C. R. B., Jansen-Alves, C., y Zambiasi, R. C. (2018). Bioactive compounds and quality parameters of avocado oil obtained by different processes. *Food chemistry*, 257, 376–381.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., y Renard, C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides.

*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1725(1), 10–18.

- Lentle, R. G., y Janssen, P. W. M. (2011). *The physical processes of digestion* (S. S. & B. Media, Ed.). Springer Science & Business Media.
- Lenucci, M. S., Serrone, L., De Caroli, M., Fraser, P. D., Bramley, P. M., Piro, G., y Dalessandro, G. (2012). Isoprenoid, lipid, and protein contents in intact plastids isolated from mesocarp cells of traditional and high-pigment tomato cultivars at different ripening stages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1764–1775.
- León-Chan, R. G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J. A., Heredia, J. B., y León-Félix, J. (2017). Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.006>
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., y Fang, Z. (2020). Application of extrusion technology in plant food processing byproducts: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 218–246.
- Leopoldini, M., Russo, N., y Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306.
- Lewoyehu, M., y Amare, M. (2019). Comparative evaluation of analytical methods for determining the antioxidant activities of honey: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1685059.
- Lijun, W., Hanyue, Z., Yimin, Z., Rui, J., Lin, L., Jingnan, C., y Zhen-yu, C. (2018). Phytomedicine Cranberry anthocyanin as an herbal medicine lowers plasma cholesterol by increasing excretion of fecal sterols. *Phytomedicine*, 38, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.008>
- Lima, J., y Fonollosa, V. (2005). Inhibición selectiva de la absorción de colesterol : una nueva perspectiva en el tratamiento de la hipercolesterolemia. *Medicina Clínica*, 125(1), 16–23.
- Lingua, M. S., Theumer, M. G., Kruzynski, P., y Wunderlin, D. A. (2019). Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays : Comparative study with its winemaking product. *Food Research International*, 122(January), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.022>
- Lingua, M. S., Wunderlin, D. A., y Baroni, M. V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of functional foods*, 44, 86–94.
- Lipinski, M. J., Benedetto, U., Escarcega, R. O., Biondi-Zoccai, G., Lhermusier, T., Baker, N. C., y Waksman, R. (2016). The impact of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 serine protease inhibitors on lipid levels and outcomes in patients with primary hypercholesterolaemia: a network meta-analysis. *European heart journal*, 37(6), 536–545.
- Liu, Y., Liao, Y., Wei, S., Zhang, H., y Wang, X. (2019). Nanoparticles based on sodium alginate and  $\beta$ -conglycinin: Self-assembly and delivery of *Phyllanthus urinaria* phenolic compounds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(1), e13851.
- Liu, S., You, L., Zhao, Y., y Chang, X. (2018). Wild *Lonicera caerulea* berry polyphenol extract reduces cholesterol accumulation and enhances antioxidant capacity in vitro and in vivo.

*Food Research International*, 107, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.016>

- Liu, X., Robinson, P. W., Madore, M. A., Witney, G. W., y Arpaia, M. L. (1999). Hass' avocado carbohydrate fluctuations. II. Fruit growth and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 676–681.
- Loane, E., Nolan, J. M., y Beatty, S. (2010). The respective relationships between lipoprotein profile, macular pigment optical density, and serum concentrations of lutein and zeaxanthin. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11), 5897–5905.
- Lolita, T., Ruta, G., Zanda, K., y Ingmars, C. (2020). Characterization of dried horseradish leaves pomace: phenolic compounds profile and antioxidant capacity, content of organic acids, pigments and volatile compounds. *European Food Research and Technology= Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung. A*, 246(8), 1647–1660.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Pasini, F., Caboni, M. F., Segura-Carretero, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT*, 73, 505–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.049>
- Luzar, A., y Chandler, D. (1996). Hydrogen-bond kinetics in liquid water. *Nature*, 379(6560), 55–57.
- Macdonald, R. S., y Wagner, K. (2012). Influence of Dietary Phytochemicals and Microbiota on Colon Cancer Risk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6728–6735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf204230r>
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., y Wiklund, O. (2019). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 41(1), 111–188. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., y Wood, P. A. (2008). Mercury CSD 2.0—new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, 41(2), 466–470.
- Maftoonazad, N., y Ramaswamy, H. S. (2008). Effect of pectin-based coating on the kinetics of quality change associated with stored avocados. *Journal of food processing and preservation*, 32(4), 621–643.
- Márquez, C. J., Yepes, D. P., Sanchez, L., y Osorio, J. A. (2017). Cambios físico-químicos del aguacate (*Persea americana* Mill. cv.“Hass”) en poscosecha para dos municipios de Antioquia. *Universidad de Córdoba*, 19(1), 32–47.
- Martin Benson, G., y Hickey., D. (1994). Bile acid sequestrants. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 3(5), 493–500. <https://doi.org/10.1517/13543784.3.5.493>
- Mata, P., Alonso, R., Ruiz, A., Gonzalez-Juanatey, J. R., Badimón, L., Díaz-Díaz, J. L., y Pérez-Jiménez, F. (2015). Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso. *Atención Primaria*, 47(1), 56–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aprim.2013.12.015>
- Mata, P., Alonso, R., Ruiz, A., Gonzalez-juanatey, J. R., Mu, O., Galve, E., y Pérez-jiménez, F.

- (2014). Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso. *Atención Primaria*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2013.12.015>
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., y Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine—their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66(21), 2540–2548.
- Medina-Carrillo, R. E., Salazar-García, S., Bonilla-Cárdenas, J. A., Herrera-González, J. A., Ibarra-Estrada, M. E., y Álvarez-Bravo, A. (2017). Secondary Metabolites and Lignin in ‘Hass’ Avocado Fruit Skin during Fruit Development in Three Producing Regions. *HortScience*, 52(6), 852–858. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11882-17>
- Medlicott, A. P., Sigrist, J. M. M., Reynolds, S. B., y Thompson, A. K. (1987). Effects of ethylene and acetylene on mango fruit ripening. *Annals of applied biology*, 111(2), 439–444.
- Meissner, M., Wolters, H., de Boer, R. A., Havinga, R., Boverhof, R., Bloks, V. W., y Groen, A. K. (2013). Bile acid sequestration normalizes plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. No additional effect of physical activity. *Atherosclerosis*, 228(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.021>
- Mendoza-Herrera, K., Pedroza-Tobías, A., Hernández-Alcaraz, C., Ávila-Burgos, L., Aguilar-Salinas, C. A., y Barquera, S. (2019). Attributable burden and expenditure of cardiovascular diseases and associated risk factors in Mexico and other selected mega-countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijerph16204041>
- Mensink, R. P., Temme, E. H. M., y Hornstra, G. (1994). Dietary saturated and trans fatty acids and lipoprotein metabolism. *Annals of Medicine*, 26(6), 461–464.
- Metcalf, L. D., y Schmitz, A. A. (1961). The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry*, 33(3), 363–364. <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>
- Meyer, M. D., y Terry, L. A. (2008). Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7439–7445.
- Miehlich, B., Savin, A., Stoll, H., y Preuss, H. (1989). Results obtained with the correlation energy density functionals. *Chemical Physics Letters*, 157(3), 200–206.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., y Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Moreno, J. J., y Mitjavila, M. T. (2003). The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(4), 182–195.
- Ngamukote, S., Mäkynen, K., Thilawech, T., y Adisakwattana, S. (2011). Cholesterol-Lowering Activity of the Major Polyphenols in Grape Seed. *Molecules*, 5054–5061. <https://doi.org/10.3390/molecules16065054>
- Nicholls, S. J., Lundman, P., Harmer, J. A., Cutri, B., Griffiths, K. A., Rye, K.-A., y Celermajer, D. S. (2006). Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(4), 715–720.

- Norata, G. D., Tibolla, G., y Catapano, A. L. (2014). Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54, 273–293.
- Nordmann, A. J., Nordmann, A., Briel, M., Keller, U., Yancy, W. S., Brehm, B. J., y Bucher, H. C. (2006). Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*, 166(3), 285–293.
- Odrizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2008). Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. *LWT - Food Science and Technology*, 41(2), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.002>
- Ogawa, K., Hirose, S., Yamamoto, H., Shimada, M., Nagaoka, S., y Yanase, E. (2015a). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis of oolongtheanins and their inhibitory activity on micellar cholesterol solubility in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(4), 749–752. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.002>
- Ogawa, K., Hirose, S., Yamamoto, H., Shimada, M., Nagaoka, S., y Yanase, E. (2015b). Synthesis of oolongtheanins and their inhibitory activity on micellar cholesterol solubility in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(4), 749–752. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.002>
- Ogino, Y., Osada, K., Nakamura, S., Ohta, Y., Kanda, T., y Sugano, M. (2007). Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols. *Lipids*, 42(2), 151.
- Omena, C. M. B., Valentim, I. B., Guedes, G. da S., Rabelo, L. A., Mano, C. M., Bechara, E. J. H., y Ferreira, R. C. S. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits: antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*, 49(1), 334–344.
- OMS. (2017a). 10 datos sobre la obesidad. Recuperado de <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>
- OMS. (2017b). Enfermedades cardiovasculares. Recuperado de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Ontawong, A., Duangjai, A., Muanprasat, C., Pasachan, T., Pongchaidecha, A., Amornlerdpison, D., y Srimaroeng, C. (2019). Lipid-lowering effects of Coffea arabica pulp aqueous extract in Caco-2 cells and hypercholesterolemic rats. *Phytomedicine*, 52, 187–197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.021>
- Osakabe, N., y Yamagishi, M. (2009). Procyanidins in *Theobroma cacao* Reduce Plasma Cholesterol Levels in High Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 131–136. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.07-34>
- 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, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.012>
- Padilla-Camberos, E., Martínez-Velázquez, M., Flores-Fernández, J. M., y Villanueva-Rodríguez, S. (2013). Acute toxicity and genotoxic activity of avocado seed extract (*Persea americana*

Mill., cv Hass). *The Scientific World Journal*.

- Pahua-Ramos, M. E., Ortiz-Moreno, A., Chamorro-Cevallos, G., Hernández-Navarro, M. D., Garduño-Siciliano, L., Necoechea-Mondragón, H., y Hernández-Ortega, M. (2012). Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 10–16.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E., Islas-Osuna, M. A., Gutierrez-Martinez, P., Robles-Sánchez, M., y González-Aguilar, G. A. (2012). Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.027>
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., y González-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), 6–15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- Paula, S.-C. A., Chaves, L. O., Linhares, L., Silva, D., Morais, D. D. C., Cássia, R. De, y Alfenas, G. (2017). Mechanisms involved in the cardioprotective effect of avocado consumption: A systematic review. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 1675–1685. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1352601>
- Pedreschi, R., Hollak, S., Harkema, H., Otma, E., Robledo, P., Westra, E., y Defilippi, B. G. (2016). Impact of postharvest ripening strategies on ‘Hass’ avocado fatty acid profiles. *South African Journal of Botany*, 103, 32–35.
- Peou, S., Milliard-Hasting, B., y Shah, S. A. (2016). Impact of avocado-enriched diets on plasma lipoproteins: A meta-analysis. *Journal of clinical lipidology*, 10(1), 161–171.
- Permal, R., Chang, W. L., Chen, T., Seale, B., Hamid, N., y Kam, R. (2020). Optimising the Spray Drying of Avocado Wastewater and Use of the Powder as a Food Preservative for Preventing Lipid Peroxidation. *Foods*, 9(9), 1187.
- Perona, J. S., Covas, M.-I., Fitó, M., Cabello-Moruno, R., Aros, F., Corella, D., y Martínez-González, M. A. (2010). Reduction in systemic and VLDL triacylglycerol concentration after a 3-month Mediterranean-style diet in high-cardiovascular-risk subjects. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(9), 892–898.
- Phan, B. A. P., Dayspring, T. D., y Toth, P. P. (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vascular health and risk management*, 8, 415.
- Pirro, M., Lupattelli, G., Del Giorno, R., Schillaci, G., Berisha, S., Mannarino, M. R., y Mannarino, E. (2013). Nutraceutical combination (red yeast rice, berberine and policosanols) improves aortic stiffness in low-moderate risk hypercholesterolemic patients. *PharmaNutrition*, 1(2), 73–77.
- Pirro, M., Mannarino, M. R., Bianconi, V., Simental-Mendía, L. E., Bagaglia, F., Mannarino, E., y Sahebkar, A. (2016). The effects of a nutraceutical combination on plasma lipids and glucose: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological research*, 110, 76–88.
- Pirro, M., Mannarino, M. R., Ministrini, S., Fallarino, F., Lupattelli, G., Bianconi, V., y Mannarino, E. (2016). Effects of a nutraceutical combination on lipids, inflammation and endothelial integrity in patients with subclinical inflammation: a randomized clinical trial. *Scientific*

reports, 6(1), 1–9.

- Platt, K. A., y Thomson, W. W. (1992). Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *International journal of plant sciences*, 153(3, Part 1), 301–310.
- Poli, A., Barbagallo, C. M., Cicero, A. F. G., Corsini, A., Manzato, E., Trimarco, B., y Canzone, G. (2018). Nutraceuticals and functional foods for the control of plasma cholesterol levels. An intersociety position paper. *Pharmacological research*, 134, 51–60.
- Poli, A., Marangoni, F., Paoletti, R., Mannarino, E., Lupattelli, G., Notarbartolo, A., y Gaddi, A. (2008). Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(2), S1–S16.
- Pople, J. A., Scott, A. P., Wong, M. W., y Radom, L. (1993). Scaling factors for obtaining fundamental vibrational frequencies and zero-point energies from HF/6–31G\* and MP2/6–31G\* harmonic frequencies. *Israel Journal of Chemistry*, 33(3), 345–350.
- Prabhashini, W., Mendis, K., Premakumara, S., Arachchige, G., y Ratnasooriya, W. D. (2017). Bark Extracts of Ceylon Cinnamon Possess Antilipidemic Activities and Bind Bile Acids In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/7347219>
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Alvarez-Parrilla, E., y González-Aguilar, G. A. (2014). *Function Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion*. 1063–1072. <https://doi.org/10.1039/c4fo00073k>
- Quirós-Sauceda, A. E., Sañudo-Barajas, J. A., Vélez-de la Rocha, R., Domínguez-Avila, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Villegas-Ochoa, M. A., y González-Aguilar, G. A. (2019). Effects of ripening on the in vitro antioxidant capacity and bioaccessibility of mango cv. ‘Ataulfo’ phenolics. *Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 2073–2082. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03685-x>
- Ramos-Aguilar, A. L., Ornelas-Paz, J., Tapia-Vargas, L. M., Ruiz-Cruz, S., Gardea-Béjar, A. A., Yahia, E. M., y Ibarra-Junquera, V. (2019). The importance of the bioactive compounds of avocado fruit (*Persea americana* Mill) on human health. *Biotecnia*, 21(3), 154–162.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., y Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875–1887.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*, 5(9), 3563–3581.
- Ridker, P. M., Tardif, J.-C., Amarenco, P., Duggan, W., Glynn, R. J., Jukema, J. W., y Nissen, S. (2017). Lipid-reduction variability and antidrug-antibody formation with bococizumab. *New England Journal of Medicine*, 376(16), 1517–1526.
- Ritger, P. L., y Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian

and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, 5(1), 23–36.

- Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García Humberto, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., y González-Aguilar, G. A. (2011). Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44(5), 1386–1391. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.052>
- Rodríguez-Bonilla, P., Gandía-Herrero, F., Matencio, A., García-Carmona, F., y López-Nicolás, J. M. (2017). Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Analytical Methods*, 10(9), 2994–3000.
- Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., y Hurtado, N. (2019). Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*, 24(17), 3209.
- Ruiz-Pardo, C.A., González-Aguilar G.A., Ayala-Zavala, J.F., Astiazarán-García, H., José de Jesús Ornelas-Paz, J.J., y Olivás-Orozco, G. I. (2014). *Liberación y Absorción Pasiva (in vitro) de Compuestos Lipofílicos e Hidrofílicos de Aguacate cv. 'Hass' y su Potencial Antioxidante y Antiproliferativo*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Rupasinghe, H. P. V., Wang, Y., y Thilakarathna, S. K. P. H. (2013, junio 27). *Apple skin extracts for treating cardiovascular disease*. Google Patents.
- Saavedra, J., Córdova, A., Navarro, R., Díaz-Calderón, P., Fuentealba, C., Astudillo-Castro, C., y Galvez, L. (2017). Industrial avocado waste: Functional compounds preservation by convective drying process. *Journal of Food Engineering*, 198, 81–90.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, P. y A. (2017). Aguacate Mexicano. Recuperado de Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 website: [https://www.academia.edu/41978533/AGUACATE\\_Mexicano\\_planeación\\_agrícola\\_nacional?auto=download](https://www.academia.edu/41978533/AGUACATE_Mexicano_planeación_agrícola_nacional?auto=download)
- Saini, R. K., y Keum, Y.-S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59–70.
- Sakakibara, T., Sawada, Y., Wang, J., Nagaoka, S., y Yanase, E. (2019). Molecular Mechanism by Which Tea Catechins Decrease the Micellar Solubility of Cholesterol [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 7128–7135. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02265>
- Salgado, M., y Mansi, N. (2008). Efeito do abacate ( *Persea americana* Mill ) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos Effect of the hass avocado ( *American Persea* Mill ) on hipercolesterolemia rats. *Food Science and Technology*, 28(4), 922–928.
- Salmerón-Ruiz, M. L., Sáyago-Ayerdi S.G., Sañudo-Barajas J. A., Ayala-Zavala J. F., Alvarez-Parrilla E. y Gonzalez-Córdoba, A. (2014). *Fración Indigestible, Bioaccesibilidad in vitro y Actividad Antioxidante de Compuestos Fenólicos de la Cáscara de Aguacate cv. "Hass"*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Salvadó, L., Coll, T., Gómez-Foix, A. M., Salmerón, E., Barroso, E., Palomer, X., y Vázquez-Carrera, M. (2013). Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation

and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia*, 56(6), 1372–1382. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2867-3>

- Santana, I., Castelo-Branco, V. N., Guimarães, B. M., de Oliveira Silva, L., Peixoto, V. O. D. S., Cabral, L. M. C., y Torres, A. G. (2019). Hass avocado (*Persea americana* Mill.) oil enriched in phenolic compounds and tocopherols by expeller-pressing the unpeeled microwave dried fruit. *Food chemistry*, 286, 354–361.
- Sanz-Buenhombre, M., Villanueva, S., Moro, C., Tomás-Cobos, L., Viadel, B., y Guadarrama, A. (2016). Bioavailability and the mechanism of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis. *Journal of Functional Foods*, 21, 178–185.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1), 43–49. <https://doi.org/10.1021/jf1036596>
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., y Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Scaldeferri, F., Pizzoferrato, M., Ponziani, F. R., Gasbarrini, G., y Gasbarrini, A. (2013). Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Internal and emergency medicine*, 8(3), 205–210.
- Schaefer, E. J., Gleason, J. A., y Dansinger, M. L. (2005). The effects of low-fat, high-carbohydrate diets on plasma lipoproteins, weight loss, and heart disease risk reduction. *Current atherosclerosis reports*, 7(6), 421–427.
- Schaich, K. M., Tian, X., y Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125.
- Schlege, H. B. (1989). Some practical suggestions for optimizing geometries and locating transition states. En *New Theoretical Concepts for Understanding Organic Reactions* (pp. 33–53). Springer.
- Schlegel, H. B. (2011). Geometry optimization. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(5), 790–809.
- Schmidt, A. F., Pearce, L. S., Wilkins, J. T., Overington, J. P., Hingorani, A. D., y Casas, J. P. (2017). PCSK9 monoclonal antibodies for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).
- Schmidt, A. F., Swerdlow, D. I., Holmes, M. V., Patel, R. S., Fairhurst-Hunter, Z., Lyall, D. M., ... Power, C. (2017). PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 5(2), 97–105.
- Schmidt, M. W., Baldridge, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., y Su, S. (1993). General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of computational chemistry*, 14(11), 1347–1363.
- Schonewille, M., De Boer, J. F., Mele, L., Wolters, H., Bloks, V. W., Wolters, J. C., ... Groen, A. K. (2016). Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1455–1464. <https://doi.org/10.1194/jlr.M067488>

- Shahidi, F., y Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897.
- Shahidi, F., y Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, *4*, 11–68.
- Shen, Y., Song, X., Li, L., Sun, J., Jaiswal, Y., Huang, J., y Zhang, H. (2019). Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 579–587.
- Shetkar, S. S., y Singh, S. (2016). Cholesterol Absorption Inhibitors. En *Handbook of Lipidology* (1a ed., p. 156). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Shivashankara, K. S., Isobe, S., Al-Haq, M. I., Takenaka, M., y 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. <https://doi.org/10.1021/jf0302431>
- Shukr, M. H., Ismail, S., y Ahmed, S. M. (2019). Development and optimization of ezetimibe nanoparticles with improved antihyperlipidemic activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *49*, 383–395. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.12.001>
- Silva Caldas, A. P., Chaves, L. O., Linhares Da Silva, L., De Castro Morais, D., y Gonçalves Alfenas, R. de C. (2017). Mechanisms involved in the cardioprotective effect of avocado consumption: A systematic review. *International Journal of Food Properties*, *20*, 1675–1685. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1352601>
- Silva Figueiredo, P., Carla Inada, A., Marcelino, G., Maiara Lopes Cardozo, C., de Cássia Freitas, K., De Cássia Avellaneda Guimarães, R., y Aiko Hiane, P. (2017). Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, *9*(10), 1158.
- Simon, J. S., Karnoub, M. C., Devlin, D. J., Arreaza, M. G., Qiu, P., Monks, S. A., y Bayne, M. L. (2005). Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*, *86*, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.08.007>
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Siqueira, P., Prado, A., Denny, C., Ferracini, L., Franchin, M., Elias, G., y Alencar, D. (2015). Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry*, *181*, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.087>
- Soares, L. A. L., Gonzalez Ortega, G., Bassani, V. L., y Petrovick, P. R. (1998). Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L.(quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. *Caderno de farmácia. Porto Alegre, RS. Vol. 14, n. 1/2 (jan./dez. 1998), p. 21-26*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10183/19302>
- Solís, G. R. O., y Hernández, H. (2013). I. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para

la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. *Revista Mexicana de Cardiología*, 24(S1), 3–22.

- Soong, Y., y Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>
- Stolk, M. F. J., Becx, M. C. J. M., Kuypers, K. C., y Seldenrijk, C. A. (2006). *Severe Hepatic Side Effects of Ezetimibe*. 908–911. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.04.014>
- Su, J., Wang, H., Ma, C., Liu, C., y Gao, C. (2015). Hypocholesterolaemic mechanism of bitter melon aqueous extracts via inhibition of pancreatic cholesterol esterase and reduction of cholesterol micellar solubility. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(1), 20–28. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1121470>
- Sultan, S., D'Souza, A., Zabetakis, I., Lordan, R., Tsoupras, A., Kavanagh, E. P., y Hynes, N. (2019). Statins: Rationale, Mode of Action, and Side Effects. En *The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813792-5.00006-9>
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., y Li, L. (2018). Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular plant*, 11(1), 58–74.
- Taiti, C., Costa, C., Menesatti, P., Caparrotta, S., Bazihizina, N., Azzarello, E., y Giordani, E. (2015). Use of volatile organic compounds and physicochemical parameters for monitoring the post-harvest ripening of imported tropical fruits. *European Food Research and Technology*, 241(1), 91–102.
- Tamvra, A., Fukvshima, M., Shimada, K., Han, K.-H., Sekikawa, M., Watanabe, S., ... Chiji, H. (2004). Cholesterol Metabolism in Pat Is Affected by Protocatechuic Acid. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50(1), 13–18.
- Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G. G., Russell, R. M., y Grusak, M. A. (2005). Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(4), 821–828.
- The Organisation for Economic Co-operation and Development (OCDE). (2017). Obesity Update 2017. Recuperado de <http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>
- Thilavech, T., y Adisakwattana, S. (2019). Cyanidin-3-rutinoside acts as a natural inhibitor of intestinal lipid digestion and absorption. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–10.
- Ticho, A. L., Malhotra, P., Dudeja, P. K., Gill, R. K., y Alrefai, W. A. (2019). Bile acid receptors and gastrointestinal functions. *Liver Research*, 3(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.01.001>
- Tinello, F., y Lante, A. (2018). Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products. *Innovative food science & emerging technologies*, 50, 73–83.
- Tome-Carneiro, J., y Visioli, F. (2016). Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, 23(11), 1145–1174.
- Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M., Daiuto, R., Augusto, J., Massarioli, P., y Alencar, S. M. De. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PLoS ONE*, 13(2), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal>

- Trisat, K., Wong-on, M., Lapphanichayakool, P., Tiyaboonchai, W., y Limpeanchob, N. (2017). Vegetable juices and fibers reduce lipid digestion or absorption by inhibiting pancreatic lipase, cholesterol solubility and bile acid binding. *International Journal of Vegetable Science*, 23(3), 260–269.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Clinton, S. K., y Schwartz, S. J. (2005). Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *The Journal of nutrition*, 135(3), 431–436.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Wall-Medrano, A., y González-Aguilar, G. A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of “Ataulfo” mango peel on LS180 cells. *Molecules*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030695>
- Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., y González-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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- Villa-Rodríguez, J. A., Yahia, E. M., González-León, A., Ifie, I., Robles-Zepeda, R. E., Domínguez-Avila, J. A., y González-Aguilar, G. A. (2020). Ripening of ‘Hass’ avocado mesocarp alters its phytochemical profile and the in vitro cytotoxic activity of its methanolic extracts. *South African Journal of Botany*, 128, 1–8.
- Wadhwa, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P., y Foody, J. M. (2016). A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of Clinical Lipidology*, 10(3), 472–489. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.11.010>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.114>
- Wang, L., Zhu, H., Zhao, Y., Jiao, R., Lei, L., Chen, J., y Wang, T. (2018). Cranberry anthocyanin as an herbal medicine lowers plasma cholesterol by increasing excretion of fecal sterols. *Phytomedicine*, 38, 98–106.
- Witczak, T., Stępień, A., Gumul, D., Witczak, M., Fiutak, G., y Zięba, T. (2020). The influence of the extrusion process on the nutritional composition, physical properties and storage stability of black chokeberry pomaces. *Food Chemistry*, 127548.
- Wu, Z., Li, H., Ming, J., y Zhao, G. (2011). Optimization of adsorption of tea polyphenols into oat  $\beta$ -glucan using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 378–385. <https://doi.org/10.1021/jf103003q>
- Xu, M., Liu, K., Swaroop, M., Porter, F. D., Sidhu, R., Finkes, S., y Southall, N. (2012).  $\delta$ -Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39349–39360.
- Yahia, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Fruit*

*and vegetable phytochemicals*, 3–51.

- Yanık, D. K. (2017). Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. *LWT*, 77, 45–51.
- Ye, S. Q., y Kwiterovich Jr, P. O. (2000). Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *The American journal of clinical nutrition*, 72(5), 1275s-1284s.
- Yogeeta, S. K., Hanumantra, R. B. R., Gnanapragasam, A., Subramanian, S., Rajakannu, S., y Devaki, T. (2006). Attenuation of abnormalities in the lipid metabolism during experimental myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: beneficial effect of ferulic acid and ascorbic acid. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(5), 467–472.
- Yuwono, H. S., Tangke, F. R., y Farenia, R. (2018). Effects of Calcium Bentonite on High Blood Cholesterol Level. *Althea Medical Journal*, 5(3), 139–141.
- Zadernowski, R., Naczek, M., y Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124.
- Zeng, X., Du, Z., Ding, X., y Jiang, W. (2020). Characterization of the direct interaction between apple condensed tannins and cholesterol in vitro. *Food Chemistry*, 309, 125762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125762>
- Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., y Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94–100.
- Zheng, W., Marugan, JJ, Liu, K., Southall, NT y Austin, C. (2015, junio 2). *Use of delta tocopherol for the treatment of lysosomal storage disorders*. Google Patents.
- Zheng, K., Guo, K., Xu, J., Liu, W., Chen, J., Xu, C., y Chen, L. (2020). Study on the interaction between catechin and cholesterol by the density functional theory. *Open Chemistry*, 18(1), 357–368.