



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

**FRACCIÓN INDIGESTIBLE, BIOACCESIBILIDAD *in vitro*  
Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE AGUACATE CV.  
'HASS'**

---

Por:

I.B. Mayra Lizeth Salmerón Ruiz

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

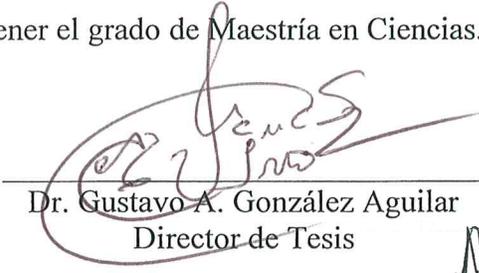
Hermosillo, Sonora

Agosto del 2014

---

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de I.B. Mayra Lizeth Salmerón Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dr. Gustavo A. González Aguilar  
Director de Tesis



---

Dra. Sonia G. Sáyago Ayerdi  
Asesor

Sañudo Barajas J. Adriana

---

Dra. J. Adriana Sañudo Barajas  
Asesor



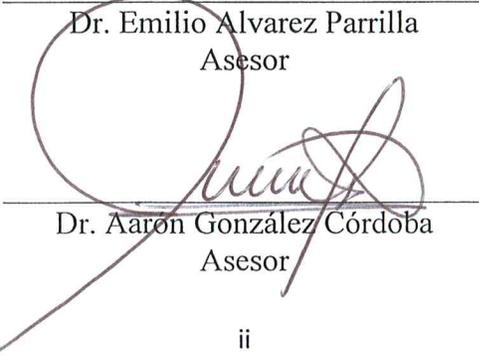
---

Dr. J. Fernando Ayala Zavala  
Asesor



---

Dr. Emilio Alvarez Parrilla  
Asesor



---

Dr. Aaron González Córdoba  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante estos dos años de estudio y por facilitarme los recursos para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Lleida, España.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y de esta manera alcanzar una meta importante en mi formación profesional.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)** por abrirme las puertas de sus instalaciones y facilitarme sus equipos para realizar mi proyecto de investigación. De igual forma agradezco al personal que labora en esta coordinación.

Manifiesto especial gratitud a mi director de tesis el Dr. **Gustavo A. González Aguilar** por su asesoría y tolerancia en la realización de mi tesis, por su apoyo incondicional y su confianza. ¡Muchas gracias Dr.!...

Agradezco infinitamente a mi comité de tesis integrado por las **Dras. Sonia G. Sáyago Ayerdi y J. Adriana Sañudo Barajas**, el **Dr. J. Fernando Ayala Zavala**, **Dr. Emilio Alvarez Parrilla** y el **Dr. Aarón González Córdoba** por su asesoría durante la realización de mi tesis.

A **I.Q. Mónica Villegas** principalmente por su apoyo técnico en el laboratorio, por su amistad y los buenos momentos vividos como compañeras de voleibol.

Igualmente, agradezco a **M.C. Martín Valenzuela Melendres** por facilitarme los materiales para algunas determinaciones de este estudio.

## DEDICATORIAS

A **Dios** por acompañarme en cada paso que doy dándome sabiduría para aceptar lo que no puedo cambiar y fortaleza para cambiar aquello que si puedo.

A mis padres **Leticia Ruiz** y **Rigoberto Salmerón**, primeramente por darme la vida, por no ponerme límites y por enseñarme a ganarme la vida a base de trabajo y esfuerzo. Ustedes son y serán siempre mi motor, gracias por todo su apoyo.

A toda mi familia en general por creer en mí, especialmente a mis hermanos **Dalia, Julián, Rigo** y **Brenda**.

A la persona que ha cambiado mi vida: **Caín Soto**. Gracias por escuchar mis pensamientos, por comprender mis sueños, por convivir con mis defectos, por tu apoyo en las situaciones adversas y en los momentos de felicidad. Solo tú haces posible lo que parece imposible, espero algún día poderte pagar todo lo que haces por mí, *emchi nc noctehoa...*

A mis compañeritos de laboratorio: **Cinthia, Maribel, Ana, Elena, Kenia, Samira, Jacqueline, Gustavo, Ramón**, y **Francisco** por permitirme vivir con ustedes momentos muy agradables. Los extrañaré mucho pero me los llevo en el corazón y siempre podrán contar conmigo para todo.

A mis **compañeros de maestría** de la CTAOV y a todos los miembros del **Laboratorio de Tecnologías Emergentes** por los buenos momentos de esta travesía.

A esas personas que me han dado una mano en alguna situación difícil de este caminar y que con un gesto o una buena acción hicieron más amena esta estadía.

¡Mil gracias ☺!

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE CUADROS .....	IX
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES.....	3
Valor Nutritivo e Importancia Económica del Aguacate cv. 'Hass' .....	3
La Industrialización del Aguacate .....	4
Subproductos del Aguacate .....	4
La Cáscara de Aguacate Como Potencial Fuente de Compuestos Bioactivos .....	5
Compuestos Fenólicos (CF) de la Cáscara de Aguacate .....	10
Interacciones Entre CF y Macromoléculas de la Matriz Alimentaria .....	13
Bioaccesibilidad de CF.....	15
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS .....	21
Objetivo General .....	21
Objetivos Específicos .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
Material Vegetal .....	22
Obtención de la Cáscara de Aguacate .....	23
Etapa 1: Contenido de CF y Actividad Antioxidante de la Cáscara .....	23
Obtención de Extractos Metanólicos .....	23
Determinación de CF.....	25
Fenoles totales. ....	25
Determinación de taninos hidrolizables y condensados .....	25
Evaluación de la Actividad Antioxidante .....	27

## CONTENIDO (Continuación)

	Página
DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracilo) .....	27
ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) .....	28
Poder antioxidante de reducción del fierro (FRAP) .....	28
Etapa 2: Determinación de la Composición Química de la Fracción Indigestible (FI), Contenido de CF y Actividad Antioxidante .....	29
Composición Química de la FI .....	29
Determinación de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina klason .....	31
Determinación de proteína resistente .....	32
Determinación de cenizas .....	33
Cuantificación de CF y Actividad Antioxidante de la FI .....	34
Etapa 3: Evaluación de la Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de los CF y Actividad Antioxidante de la Fracción Bioaccesible .....	34
Análisis de los Datos .....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
Parámetros Físicoquímicos del Aguacate cv. 'Hass' y Composición Química de la Cáscara .....	39
Etapa 1: Contenido de CF y Actividad Antioxidante de la Cáscara .....	41
Concentración de CF de la Cáscara de Aguacate .....	41
Actividad Antioxidante de la Cáscara de Aguacate .....	44
Etapa 2: Composición Química de la FI, Contenido de CF y Actividad Antioxidante .....	45
Composición Química de la FI .....	45
Concentración de CF de la FI .....	49
Actividad Antioxidante de la FI .....	52
Etapa 3: Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de los CF y Actividad Antioxidante .....	54
CONCLUSIÓN .....	57
RECOMENDACIONES .....	58
REFERENCIAS .....	59

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Constituyentes en porcentaje del fruto de aguacate cv. 'Hass' obtenidos en el Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. ....	6
2. Estructuras químicas de los principales tipos de compuestos fenólicos. Modificado de Scarlbert y Williamsom (2000). ....	11
3. Destino de los compuestos fenólicos que se consumen en la dieta. (a) Los compuestos son liberados de la matriz en el tracto gastrointestinal por acción de las enzimas digestivas constituyendo la fracción de compuestos fenólicos bioaccesibles (Shim <i>et al.</i> , 2009). (b) Los compuestos fenólicos que no son bioaccesibles permanecen en la fracción indigestible y podrían liberarse en el colon por efecto de la microbiota (Saura-Calixto, 2010).....	16
4. Componentes de la fracción indigestible soluble e insoluble de los alimentos vegetales (Saura-Calixto <i>et al.</i> , 2000). ....	18
5. Esquema general de la estrategia experimental para la evaluación de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. ....	24
6. Esquema general para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. ....	26
7. Diagrama que muestra el procedimiento para la determinación de la fracción indigestible (soluble e insoluble) y compuestos fenólicos asociados de cáscara de aguacate cv. 'Hass'. ....	30
8. Esquema general para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la fracción indigestible de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. ....	35
9. Figura 9. Esquema general de la digestión <i>in vitro</i> de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' para la determinación de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos. ....	36

## LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>	Página
1. Composición química* (%) de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. .....	8
2. Patentes que promueven el aprovechamiento de subproductos vegetales como fuente de compuestos bioactivos para aplicaciones alimentarias. ....	9
3. Parámetros fisicoquímicos del aguacate y composición química proximal de la cáscara. ....	40
4. Contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y taninos) y actividad antioxidante determinados a partir de extractos y sus residuos de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. ....	42
5. Composición química de la fracción indigestible (FI) de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' (% ps). ....	46
6. Contenido de fenoles totales y taninos determinados a partir de la fracción indigestible de la cáscara y después de la digestión gastro-intestinal <i>in vitro</i> (CF biaccesibles y no digeribles). ....	50
7. Actividad antioxidante ( $\mu$ moles ET/g de ps) determinada a partir de extractos y sus residuos de la fracción indigestible de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y de después de la digestión gastro-intestinal <i>in vitro</i> (CF bioaccesibles y no digeridos). ....	53

## RESUMEN

La cáscara de aguacate constituye una fuente económica potencial para la obtención de ingredientes funcionales o compuestos fenólicos (CF). Sin embargo, la microestructura de los tejidos vegetales juega un papel importante en la bioaccesibilidad de los CF y gran parte de ellos permanecen asociados a la fracción indigestible (FI). Los CF asociados a la FI podrían liberarse en el intestino grueso por acción de la microbiota y proteger contra el estrés oxidativo. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar la bioaccesibilidad y actividad antioxidante (AA) de los CF de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y caracterizar la FI. Se determinó el contenido de CF y taninos a partir de extractos metanólicos de la cáscara, así como la AA. La bioaccesibilidad se evaluó mediante digestión *in vitro* y la FI, como la suma de polisacáridos no amiláceos, lignina, proteína resistente, cenizas y CF. El contenido de CF totales de la cáscara fue 6.11% de la materia seca de los cuales el 0.74% fueron taninos hidrolizables y condensados que juntos mostraron una AA de 275.02  $\mu$ moles equivalentes trolox (ET)/g de peso seco (ps). Los principales componentes de la FI fueron polisacáridos no amiláceos (54.73%) y lignina (23.19%). El contenido fenólico de la FI fue 3.86% equivalente al 63.2% del total de CF de la cáscara. Esta porción de CF fue superior a la fracción bioaccesible (33%). De igual forma, los CF de la FI presentaron más AA que los CF bioaccesibles (108.72 $\pm$ 8.11  $\mu$ moles ET/g ps). La AA de los CF presentes en la FI medida con el ensayo FRAP fue 424.73  $\mu$ moles ET/g ps. Los resultados sugieren el potencial de la cáscara de aguacate como fuente de CF con posible impacto en la salud intestinal.

**Palabras clave:** Cáscara de aguacate, fracción indigestible, bioaccesibilidad, compuestos fenólicos, actividad antioxidante.

## ABSTRACT

Avocado peel is a potential economical source to obtain functional ingredients or phenolic compounds (PC). However, the microstructure of plant tissue plays an important role in the bioaccessibility of the PC and most of them remain within the indigestible fraction (IF). The PC associated to IF could be released in the large intestine by the action of the microbiota and protect against oxidative stress. In this sense, the objective of this study was to evaluate the bioaccessibility and antioxidant activity (AA) of PC of avocado peel cv. 'Hass' and characterize the IF. The PC content, tannins and AA were determined from extracts of avocado peel; the bioaccessibility was evaluated by *in vitro* digestion and the IF, as the sum of non-starch polysaccharides, lignin, resistant protein, ash and PC. Peel PC content was 6.11% of which tannins hydrolysable and condensed content was 0.74% showing together AA of 275.02  $\mu\text{mol}$ s trolox equivalents (TE)/g dry weight (dw). The major components of IF were non-starch polysaccharides (54.73%) and lignin (23.19%). Phenolic content of the IF was 3.86% that equal to 63% of the total found in the peel. This portion of PC is higher than the bioaccessible fraction (33%). Similarly, the AA of PC contained in the IF was higher than the bioaccessible PC ( $108.72 \pm 8.11$   $\mu\text{mol}$ s TE/g dw). The AA of PC associated to FI by FRAP assay was 424.73  $\mu\text{mol}$ s TE/g dw. The results suggest the potential of avocado peel as source of PC with possible impact on intestinal health.

**Keywords:** Avocado peel, indigestible fraction, bioaccessibility, phenolic compounds, antioxidant activity.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana*) cv. 'Hass' es una de las frutas de mayor importancia en México desde el punto de vista nutricional y económico (Villa-Rodríguez *et al.*, 2011). La industria alimentaria ha mostrado interés en el procesamiento de este fruto para aumentar el valor agregado y rentabilidad del cultivo (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Sin embargo, tanto la industrialización del aguacate como el consumo directo han propiciado la generación de grandes cantidades de cáscara como subproducto, lo cual repercute negativamente en el medio ambiente y constituye un costo por su disposición sanitaria.

Los subproductos de algunos frutos concentran gran cantidad de compuestos de importancia en la alimentación y en la salud humana, entre ellos, los compuestos fenólicos (Balasundram *et al.*, 2006; Ayala-Zavala *et al.*, 2011). Sin embargo, los subproductos del aguacate han recibido poca atención, especialmente la cáscara del fruto, siendo la semilla y la porción comestible los puntos focales de los reportes existentes. El contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la cáscara de aguacate se ha investigado por algunos autores (Golukcu y Ozdemir, 2010; Wang *et al.*, 2010; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Encontrándose, cantidades superiores respecto a otros subproductos como cáscara de uva (Santos *et al.*, 2011), corteza de papa roja (Singh y Saldaña, 2011) y cáscara de naranjilla (Contreras-Calderón *et al.*, 2011). Estos subproductos han sido considerados en la literatura como fuente de compuestos fenólicos, lo cual sugiere el potencial de la cáscara como fuente de estos bioactivos.

Los principales compuestos fenólicos que se han encontrado en la cáscara de aguacate son oligómeros de procianidinas, catequina, epicatequina y ácido 5-O-cafeoilquínico (Hirasawa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Kosińska *et al.*, 2012). Debido

a los grupos funcionales que poseen en su estructura, estos compuestos pueden asociarse a los componentes de la matriz vegetal formando complejos con proteínas y polisacáridos (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007; Vitaglione *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009). Este tipo de interacciones puede repercutir en la digestibilidad de macronutrientes y en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. La bioaccesibilidad se define como aquella fracción de compuestos que son liberados de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y se encuentran disponibles para su absorción (Shim *et al.*, 2009). Cantidades significativas de compuestos fenólicos se absorben en el intestino delgado (Gee y Johnson, 2001); sin embargo, una gran proporción de compuestos fenólicos de la dieta aparentemente no se absorbe y se concentra en el colon junto con otros compuestos no digeribles de los alimentos (Gee y Johnson, 2001). En este sentido, la fracción indigestible fue definida como la parte de los vegetales que no se digiere ni se absorbe en el intestino (Saura-Calixto *et al.*, 2000). Los principales componentes de la fracción indigestible son polisacáridos no amiláceos, proteína resistente, cenizas y CF. Actualmente, se sabe que los compuestos fenólicos que permanecen en la fracción indigestible pueden liberarse mediante procesos fermentativos de la microbiota, lo cual puede tener efectos significativos en la salud intestinal (Saura-Calixto, 2010).

La concentración de compuestos fenólicos de distintas matrices vegetales se define comúnmente a partir de su extracto hidrofílico; no obstante, los compuestos fenólicos bioaccesibles y los que permanecen ligados a la fracción indigestible, no son considerados en los ensayos de extracción química convencionales (Arranz *et al.*, 2009). La ventaja de diferenciar el tipo de compuestos fenólicos podría servir para definir el uso adecuado de los subproductos agroindustriales, ya sea como ingredientes funcionales, como vehículo para liberar antioxidantes en el intestino grueso o simplemente como una matriz para obtener extractos ricos en compuestos fenólicos. Por lo anterior, en consideración de las características estructurales de la cáscara de aguacate (alto contenido de fibra), hipotéticamente gran parte de los CF permanecen en la FI y la cáscara de aguacate podría utilizarse como una matriz natural con beneficios a la salud intestinal. En este sentido, el objetivo de este estudio consistió en evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* y actividad antioxidante de los CF de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y caracterizar su fracción indigestible.

## ANTECEDENTES

### Valor Nutritivo e Importancia Económica del Aguacate cv. 'Hass'

El fruto de aguacate cv. 'Hass' es uno de los cultivares más populares en el mundo (Dreher y Davenport, 2013). Contiene gran variedad de nutrientes esenciales como ácidos grasos insaturados, proteínas, vitaminas, minerales y fibra dietética. Adicionalmente, proporciona diferentes fitoquímicos antioxidantes como carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles y compuestos fenólicos (Lee *et al.*, 2004; Liu, 2004; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011). El consumo de frutos ricos en estos compuestos ha demostrado una relación inversa con la incidencia de enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer, por esta razón el consumo de aguacate se ha relacionado con efectos protectores de la salud humana (Grünewald y Beal, 1999; Ding *et al.*, 2009; Yahia, 2010). En este sentido, por sus características intrínsecas (alto valor nutricional y terapéutico) el aguacate podría considerarse como un alimento funcional (Dreher y Davenport, 2013).

La divulgación de los efectos benéficos de una alimentación saludable y la tendencia del consumidor hacia productos sanos y naturales, han estimulado el consumo y demanda de aguacate a nivel mundial (SAGARPA, 2011). De los 4 millones de toneladas de aguacate producidas en el mundo durante el 2010, México contribuyó con el 34% a la producción global y el cultivo se convirtió en el segundo más exportado del país y el quinto con mayor producción en el territorio nacional. México también ocupa el primer lugar en consumo de aguacate, se estima que el consumo *per cápita* por habitante es alrededor de 10 kg/año. Lo anterior, ha propiciado un aumento en las superficies plantadas así como un incremento progresivo en los volúmenes cosechados, pronosticándose un aumento en el futuro tanto en su cultivo como en su industrialización.

## La Industrialización del Aguacate

El aguacate es un fruto muy apreciado por su sabor delicado y dulce, generalmente de consumo fresco, pero también como ingrediente en ensaladas y en la pasta conocida como guacamole (Guzmán-Gerónimo *et al.*, 2008). Actualmente, la comercialización del aguacate procesado se está desarrollando en diferentes partes del mundo sobre todo en las regiones productoras de aguacate. Los productos que se elaboran son pulpas deshidratadas donde se utilizan distintos métodos como el de liofilización, aspersión, deshidratación osmótica, deshidratación por microondas y otros en forma combinada (Grajales-Lagunes *et al.*, 1999; Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes, 2011). De igual forma, la pulpa del aguacate se está procesando para extraer el aceite mediante procesos de centrifugación o prensado hidráulico, en este caso la pulpa se deshidrata ya sea por deshidratación solar, microondas o por secado por aspersión (spray drier) y posteriormente se extrae el aceite (Eyres *et al.*, 2001).

Otros productos procesados son la pulpa congelada, en pasta y en rodajas, guacamole y aceite extra virgen (Olaeta, 2003). La variedad 'Hass' se ha considerado la más adecuada para estos procedimientos por su alto contenido de pulpa y aceite. Para la elaboración de estos productos se destina el 16% de la producción de aguacate y a partir de este volumen, se obtienen 75 mil toneladas de productos con un valor de 73.7 millones de dólares (CONAPA, 2010). Sin embargo, el problema que enfrenta la industria del aguacate es que no cuenta con la capacidad técnica para el aprovechamiento integral del fruto, lo que repercute negativamente en el medio ambiente debido a la generación de grandes cantidades de subproductos que contaminan, suelos, agua de ríos, lagunas y corrientes subterráneas.

### Subproductos del Aguacate

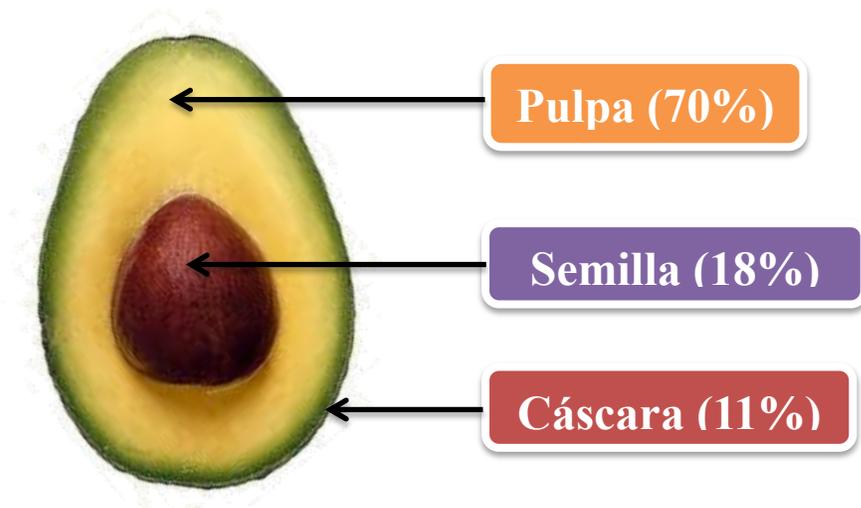
Un subproducto es un residuo de la producción que se puede utilizar directamente sin ningún otro tratamiento, o bien, puede ser transformado para otra aplicación industrial (Santana-Méridas *et al.*, 2012). Las actividades industriales generan una gran variedad

de subproductos (800,000 ton de residuos vegetales/año), en la mayoría de los casos sin aplicación comercial y generadores de problemas ambientales (Ginés *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2010). Algunos residuos se utilizan para la formulación de alimentos para animales (Cerezal *et al.*, 1995) pese a que son ricos en compuestos bioactivos benéficos para la salud animal y humana (Machmudah *et al.*, 2012). Por esta razón, existe el interés en el aprovechamiento de los subproductos vegetales para obtener mayores beneficios económicos y reducir el impacto ambiental (Cerezal y Duarte, 2005).

La mayoría de los subproductos presentan un contenido de compuestos bioactivos similar o incluso mayor que la porción comestible de los frutos (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011). El consumo e industrialización del aguacate generan dos o tres subproductos: cáscara, semilla y residuo seco de la extracción del aceite (pulpa desgrasada) (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). De acuerdo con reportes de Bressani (2009), la cáscara representa entre el 11 y 16% del peso de la fruta, la semilla entre el 14 y 24% y el residuo seco del 5 al 10%. Valores similares (Figura 1) fueron obtenidos en el Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (datos aún no publicados). Las distintas fracciones del fruto podrían ser aprovechadas para la obtención de compuestos bioactivos con aplicaciones en el desarrollo de suplementos alimenticios o como ingredientes funcionales para el desarrollo de alimentos saludables.

#### La Cáscara de Aguacate Como Potencial Fuente de Compuestos Bioactivos

El consumo directo del aguacate como fruta fresca o procesada genera grandes cantidades de cáscara. Considerando que durante el 2013 la producción nacional de aguacate cv. 'Hass' fue de 1,423,005.93 toneladas (SAGARPA, 2013) y que la cáscara del fruto representa entre un 11 y 16%, teóricamente, se estarían desechando 192,106.00 toneladas de cáscara al año. A pesar de que existe interés en la recuperación de los subproductos vegetales para ser utilizados como fuente de compuestos bioactivos, la cáscara del aguacate 'Hass' ha recibido muy poca atención y la información existente no



**Figura 1.** Constituyentes en porcentaje del fruto de aguacate cv. 'Hass' obtenidos en el Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

está muy disponible en la literatura. Bressani *et al.* (2009) y Rodríguez-Carpena *et al.* (2011) reportaron valores de la composición química proximal de la cáscara de aguacates cv. 'Hass' cultivados en Colombia y España, respectivamente (Cuadro 1). Estos autores, informaron que la humedad de este subproducto oscila alrededor del 75 %, mientras que la grasa y proteína varían del 1 al 2 %, según la región de cultivo del fruto. El contenido de cenizas es de 0.85 a 1.45 % y el contenido de fibra es relativamente alto (12.28%).

Lo anterior, sugiere el bajo valor nutritivo de esta materia prima. Sin embargo, se ha reportado que la cáscara de aguacate contiene cantidades apreciables de compuestos bioactivos (Wang *et al.*, 2010). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la salud, produciendo bienestar o reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad (Hooper y Cassidy, 2006). Algunos procedimientos para la obtención de compuestos bioactivos de subproductos vegetales han sido patentados (Cuadro 2). La cáscara de cacao (Nakamura *et al.*, 2008) y residuos de la industria procesadora de bayas (Zúñiga *et al.*, 2013) son algunos ejemplos de subproductos vegetales que se han aprovechado para la obtención de compuestos bioactivos con aplicaciones alimentarias, incluyendo fibra dietética soluble y compuestos fenólicos (Cuadro 2).

En la cáscara de aguacate se han encontrado compuestos bioactivos como: clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos (Wang *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos se han estudiado extensivamente en términos de su uso potencial en la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades (Liu, 2013). Esto ha propiciado que en la última década numerosas investigaciones se enfoquen en estudiar un sinnúmero de matrices vegetales como fuente de compuestos fenólicos, especialmente las frutas y los subproductos de su procesamiento. Se ha reportado, que el epicarpio de varios vegetales contiene más compuestos fenólicos que la porción comestible. Por ejemplo, Gorinstein *et al.* (2001) encontraron que el contenido de compuestos fenólicos de las cáscaras de limones, naranjas y toronjas fue 15% superior al de las frutas sin cáscara.

**Cuadro 1.** Composición química\* (%) de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.

<b>Región de cultivo</b>	<b>Humedad</b>	<b>Grasa</b>	<b>Proteína</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Fibra cruda</b>
Colombia	75.96	1.01	1.77	0.85	-
España	75.75	2.22	2	1.47	12.28%

\*Valores expresados en base húmeda.

**Cuadro 2.** Patentes que promueven el aprovechamiento de subproductos vegetales como fuente de compuestos bioactivos para aplicaciones alimentarias.

Fuente vegetal	Compuestos bioactivos	Aplicación	No. de patente	Inventores
Residuos de industria procesadora de bayas	Compuestos fenólicos	Antioxidantes en productos susceptibles a la oxidación.	WO 2013171545 A1	(Zúñiga y Soto, 2013)
Cáscara de cacao	Fibra dietética soluble	Fortificación de bebidas Suplemento dietético	EP 1352570 B1 US7226626 B2	(Nakamura y Nagaoka, 2008) (Yatcilla y Gluck, 2007)
* Mezcla de vegetales y subproductos	Complejo fenoles-proteínas	Mejoramiento de la actividad antioxidante en aceite de oliva	US6358542 B2	(Cuomo y Rabovski, 2002)
Pulpa y aguas residuales de la producción de aceite de oliva	** Mezcla de antioxidantes			
Orujo de arándano	Antocianinas y fibra dietética	Suplemento dietético (CRAN-MAX)	US6440467 B2	(Mann, 2002)
Orujo de uva	Fibra dietética con antioxidantes asociados	Suplemento dietético (GADF)	WO 1999025209 A1	(Larrauri y Saura-Calixto, 1999)

\* Alforfón, semillas de girasol, soja, lúpulo, semillas de mostaza, semillas de algodón, maní, semillas de cártamo, colza y semillas de lino.

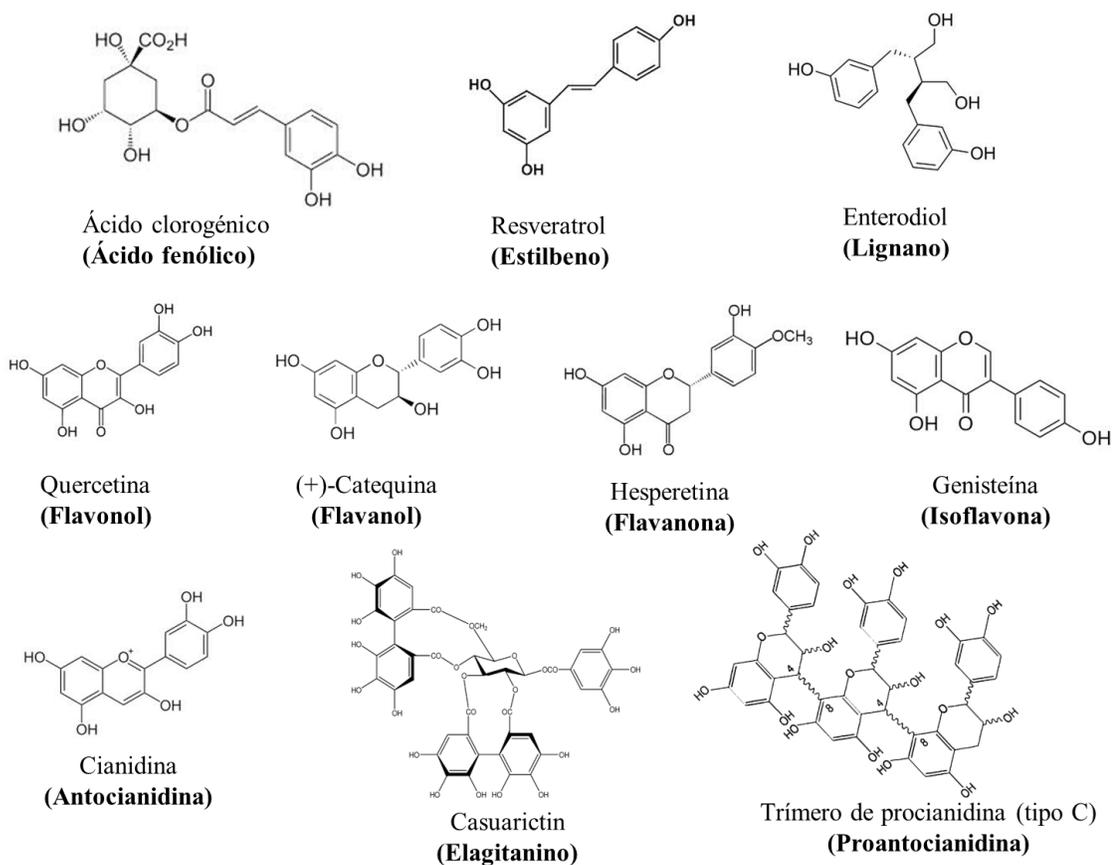
\*\* Oleuropeína, ácido gálico, tirosol, ácido hidroxitirosol.

En otro estudio realizado por Ribeiro *et al.* (2008) encontraron que la cáscara y la semilla de Mango 'Uba' contienen 0.0572 y 0.08254 mg/g de materia seca de compuestos fenólicos, estos valores fueron de 4.6 y 7.3 veces más altos que los de la pulpa, respectivamente. Li *et al.* (2006) informaron que el contenido de compuestos fenólicos en las cáscaras de granada es igual a 249.4 mg/g en comparación con sólo 24.4 mg/g de la pulpa. Otros autores también reportan un contenido mayor de compuestos fenólicos en la cáscara de otras frutas respecto a la fracción comestible (D'Abrosca *et al.*, 2007; Del Caro y Piga, 2008; Contreras-Calderón *et al.*, 2011). Adicionalmente, Hirasawa *et al.* (2008) reportaron que la cáscara de aguacate posee considerablemente cantidades más altas de compuestos fenólicos que otras porciones de la fruta. En este sentido, es generalmente aceptable que los subproductos vegetales son una fuente abundante de compuestos fenólicos y la cáscara de aguacate podría ser una de ellas. Si este enfoque es posible, el uso de este subproducto como fuente de compuestos fenólicos podría ser de beneficio económico considerable para los productores de aguacate o industrias procesadoras de aceite, pulpas congeladas o guacamole.

### Compuestos Fenólicos (CF) de la Cáscara de Aguacate

Los CF son los antioxidantes más abundantes en la dieta y están presentes en todos los tejidos vegetales (Scalbert *et al.*, 2002). Estos fitoquímicos, se sintetizan durante el metabolismo secundario de las plantas cuando son expuestas a la radiación ultravioleta, daños fisiológicos por patógenos o algún otro tipo de estrés (biótico o abiótico) (Yedidia *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2012). Estructuralmente, los CF contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos sustituyentes que pueden variar desde moléculas simples hasta grandes compuestos polimerizados (Figura 2). Según su estructura, se clasifican en: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos (hidrolizables y condensados) (Balasundram *et al.*, 2006; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos subgrupos según su estructura: ácidos hidroxibenzoico y los ácidos hidroxicinámicos (León-González *et al.*, 2013). Respecto a



**Figura 2.** Estructuras químicas de los principales tipos de compuestos fenólicos. Modificado de Scarlbert y Williamsom (2000).

los flavonoides, son el mayor grupo de compuestos fenólicos de las plantas (Martins *et al.*, 2011). Las variaciones en su estructura dan como resultado las principales clases de flavonoides, es decir, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, y antocianidinas (Bravo, 1998). En la Figura 2 se observan ejemplos de CF más comunes presentes en los vegetales. Como se puede observar, los CF varían ampliamente en su estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta grandes moléculas polimerizadas de alto peso molecular como los taninos hidrolizables y condensados.

Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de CF como ácido gálico o elágico, respectivamente (Hartzfeld *et al.*, 2002). Respecto a los taninos condensados o proantocianidinas, provienen de la esterificación de flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles (Scalbert *et al.*, 2002). Éstos compuestos presentan diversos grados de polimerización y pesos moleculares superiores a 300 unidades de masa atómica. Los CF de bajo peso molecular como monómeros y oligómeros, así como algunas fracciones poliméricas son fácilmente extraíbles y solubles en solventes orgánicos (Arranz *et al.*, 2010; Saura-Calixto, 2011). Mientras que los CF de alto peso molecular como taninos hidrolizables y proantocianidinas se encuentran asociados a las paredes celulares o formando complejos con macromoléculas como proteínas y carbohidratos. En consecuencia, permanecen en los residuos de la extracción y para liberarlos de la matriz es necesaria la realización de una hidrólisis ácida.

Numerosas propiedades han sido atribuidas a los CF, entre ellas la actividad antioxidante. Esta propiedad es debida a los grupos funcionales que poseen en su estructura, que les permiten quelar metales, inhibir enzimas y capturar radicales libres (Alamed *et al.*, 2009). Algunos estudios asocian la actividad antioxidante de los CF con la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, ciertos tipo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Dai *et al.*, 2006; Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008; Pan *et al.*, 2010). El conocimiento cada vez más sustentado sobre el papel que desempeñan los antioxidantes en la salud, ha propiciado que muchas investigaciones se enfoquen en el estudio de distintos materiales vegetales como posibles fuentes de CF y otros compuestos bioactivos.

En la cáscara de aguacate se ha reportado una concentración de fenoles totales de 1,260 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g peso fresco (Wang *et al.*, 2010). En comparación con otros materiales vegetales descritos en la literatura como fuentes de CF, la cáscara de aguacate posee cantidades superiores de estos bioactivos. Por ejemplo, el contenido de CF reportado en arándano fue de 530 EAG mg/100 g, mientras que verduras como la remolacha y zanahoria contienen 40 y 740 mg EAG/100 g, respectivamente. Incluso, la cáscara de uva (143 a 246 EAG/100 g) (Santos *et al.*, 2011), la corteza de papa roja (46.36 mg EAG/100 g) (Singh y Saldaña, 2011), cáscara de naranjilla (83.6 mg EAG/100 g) (Contreras-Calderón *et al.*, 2011) y piel de manzana 'Golden Delicious' (Vieira *et al.*, 2011) (128.33 mg EAG/100 g), presentaron una concentración menor de CF que la cáscara aguacate cv. 'Hass'.

Adicionalmente, un análisis de CF por GC-MS reveló la presencia de flavonoides como catequina, epicatequina y ácidos clorogénicos en un extracto de la cáscara (Hirasawa *et al.*, 2008). Igualmente, Terasawa *et al.* (2006) identificaron (+)-catequina y (-)-epicatequina como los CF principales de la cáscara de aguacate. Además, se ha reportado la presencia de procianidinas, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Dada la diversidad estructural de estos compuestos y los múltiples grupos funcionales que poseen, fácilmente pueden interactuar con macromoléculas de la matriz vegetal viéndose comprometida la digestibilidad de ciertos nutrientes y su posible actividad biológica (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). En este sentido, no es suficiente conocer la concentración y tipo de CF para definir si un subproducto podría utilizarse como ingrediente funcional, también los distintos tipos de interacciones deberían de considerarse como punto crítico en el diseño de alimentos funcionales.

### Interacciones Entre CF y Macromoléculas de la Matriz Alimentaria

Los CF por lo general están presentes en la matriz alimentaria, en forma libre, como glucósidos o asociados a los componentes de la pared celular (León-González *et al.*,

2013). En los tejidos vegetales, los CF interactúan principalmente con los carbohidratos y proteínas (Manach *et al.*, 2005). En general, la unión no covalente de CF con macronutrientes es impulsada principalmente por fuerzas de van der Waals (Bordenave *et al.*, 2014). Sin embargo, otro tipo de interacciones pueden darse dependiendo del tipo de CF y macromoléculas.

Particularmente, los taninos hidrolizables y condensados se unen a proteínas ricas en aminoácidos como prolina, glicina y ácido glutámico, así como a péptidos por dos interacciones importantes: puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Cheynier, 2005). Los puentes de hidrógeno se forman entre el grupo carbonilo de los péptidos y los hidrógenos del grupo hidroxilo de los monómeros del tanino. Mientras que la interacción hidrofóbica se da entre los aminoácidos neutros y los anillos aromáticos de los taninos. Estas interacciones dependen de la preferencia de cada molécula de tanino para arreglarse tridimensionalmente, así como de su estado coloidal (Cala *et al.*, 2010).

Una de las desventajas de la formación del complejo tanino-proteína es la disminución en la absorción de este macronutriente y es el principal motivo por el cual la ingesta de taninos puede influir negativamente en la salud (Reed, 1995). En cambio, en medicina se ha aprovechado esta interacción para el tratamiento de úlceras gástricas, debido a que la formación de este complejo protege el estómago y brinda una mayor resistencia a lesiones o irritación química y mecánica (de Jesus *et al.*, 2012). También, los taninos interactúan con minerales divalentes como el hierro no hemático, lo cual constituye otra desventaja ya que se inhibe la absorción de los metales (Perron y Brumaghim, 2009). Esto puede llegar a ser un problema en poblaciones de riesgo como anémicos y población vegetariana.

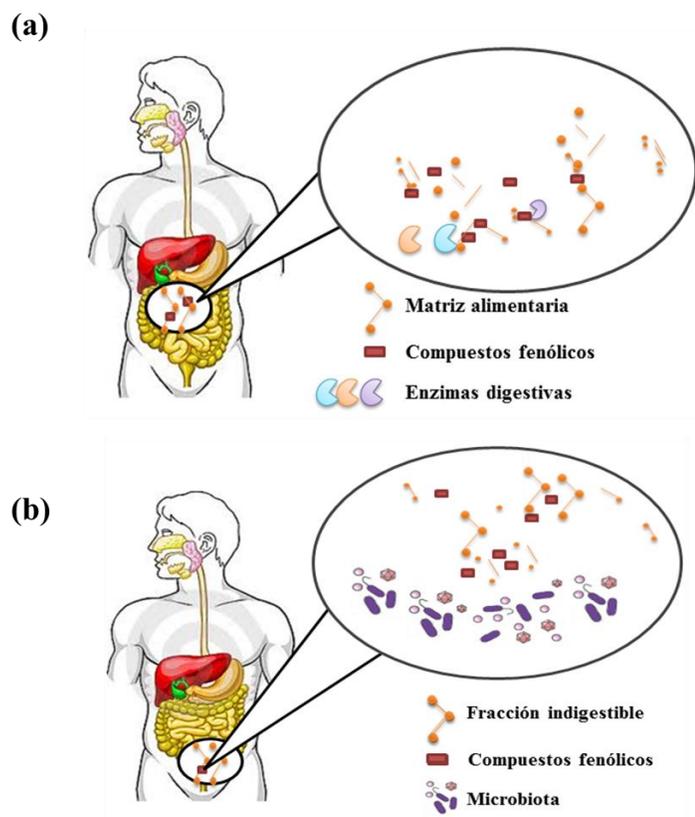
Otra interacción muy común en alimentos de origen vegetal se da entre polisacáridos o fibra dietética y CF. Los CF poseen anillos aromáticos hidrofóbicos y grupos hidroxilo hidrofílicos con la capacidad de unirse a los polisacáridos de la pared celular (Serrano *et al.*, 2009). Este tipo de interacciones puede darse por puentes de hidrógeno (entre el grupo hidroxilo de los CF y los átomos de oxígeno de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos), interacciones hidrofóbicas y enlaces éster, éste último entre ácidos fenólicos y polisacáridos (Saura-Calixto, 2010). Los CF asociados a la fibra

dietética se caracterizan por presentar diferentes propiedades biológicas como capacidad antioxidante en plasma y colon, además de otras propiedades relacionadas con la salud (Saura-Calixto, 2010). Este tipo de asociación ha sido aprovechada para el desarrollo de alimentos saludables y suplementos dietéticos que combinan los efectos benéficos de la fibra dietética y los CF (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007; Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Sin embargo, una de las desventajas de este tipo de interacción es que la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los CF puede verse afectada, lo que a su vez repercute en las propiedades biológicas que puedan ejercer a nivel intestino delgado, entre ellas la actividad antioxidante (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

En este contexto, es de suma importancia tener en cuenta el tipo de interacciones entre los CF y los constituyentes de la matriz alimentaria ya que no basta con valores relativos de contenido fenólico para definir el uso potencial de los subproductos vegetales. Información acerca del contenido de CF que puede liberarse de la matriz vegetal en el tracto gastrointestinal puede dar información valiosa acerca del uso potencial de la cáscara de aguacate para diferentes fines alimenticios.

### Bioaccesibilidad de CF

Los principales efectos biológicos atribuidos a los CF dependen principalmente de su bioaccesibilidad en el tracto gastrointestinal, y en segundo lugar, de su biodisponibilidad (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014). Shim *et al.* (2009) definen la biodisponibilidad como la cantidad de un determinado compuesto que está presente en el intestino humano, como consecuencia de su liberación de la matriz del alimento, y que puede atravesar la barrera intestinal. En cambio, la bioaccesibilidad se define como aquella fracción de compuestos que son liberados de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y se encuentra disponibles para su absorción (Figura 3a) (Shim *et al.*, 2009). La bioaccesibilidad de CF se ve afectada por diferentes factores tales como la matriz alimentaria y las interacciones con otros componentes de los alimentos (Boyer y Liu, 2004). En la literatura, la información sobre la bioaccesibilidad de CF de subproductos vegetales es escasa. La bioaccesibilidad *in vitro* de CF ha sido evaluada en

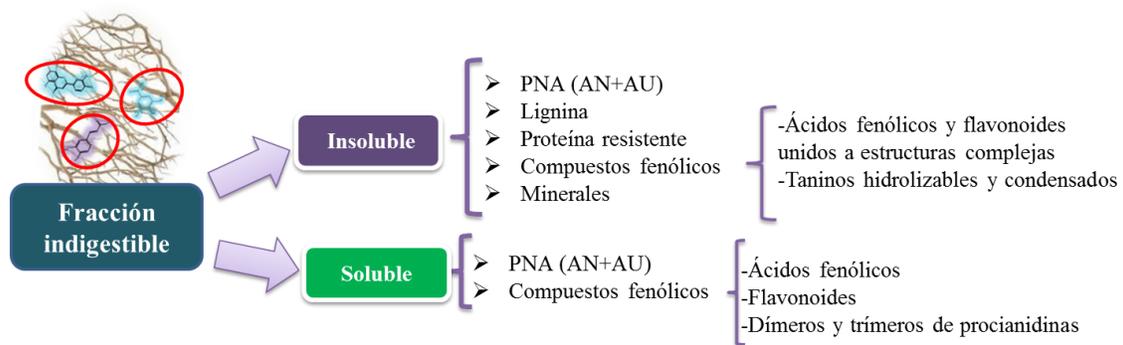


**Figura 3.** Destino de los compuestos fenólicos que se consumen en la dieta. **(a)** Los compuestos son liberados de la matriz en el tracto gastrointestinal por acción de las enzimas digestivas constituyendo la fracción de compuestos fenólicos bioaccesibles (Shim *et al.*, 2009). **(b)** Los compuestos fenólicos que no son bioaccesibles permanecen en la fracción indigestible y podrían liberarse en el colon por efecto de la microbiota (Saura-Calixto, 2010).

otros vegetales como: higos frescos y secos (*Ficus carica*) (Kamiloglu y Capanoglu, 2013), pistachos (Mandalari *et al.*, 2013) y manzana (Bouayed *et al.*, 2011). Los resultados fueron dependientes de la matriz analizada; en hongos la bioaccesibilidad fue alrededor del 20%, en pistachos se obtuvo la liberación total de CF en la fase duodenal y en manzana un 55% fueron CF dializables.

Los resultados anteriores demuestran que gran parte de los CF de los vegetales pueden absorberse en el intestino delgado pero este proceso es dependiente de la matriz en la cual estén embebidos los CF. De hecho, la absorción intestinal de CF se considera muy variable, a menudo lenta y en gran medida incompleta (Scalbert *et al.*, 2002). Por ejemplo, cantidades significativas de quercetina, miricetina y kaempferol, son absorbidas en el intestino (Gee y Johnson, 2001). Pero, una gran proporción de CF de la dieta sigue siendo aparentemente no absorbida en el intestino delgado, y pueden concentrarse en el íleon y lumen colorrectales (Gee y Johnson, 2001). En este sentido, la fracción indigestible fue definida como aquella parte de los alimentos vegetales que no se digiere ni se absorbe en el intestino delgado, sino que alcanza el colon proporcionando un sustrato fermentativo para la microbiota (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

Los principales componentes de la fracción indigestible son: polisacáridos no amiláceos, lignina, proteína resistente, cenizas y CF (Figura 4). La porción de CF que permanecen en la fracción indigestible pueden liberarse en el intestino grueso por acción de la microbiota (Figura 3b) (Saura-Calixto, 2010). Los CF que son liberados de la fracción indigestible pueden dar origen a metabolitos absorbibles como urolitinas A y B, entre otros, que también han demostrado propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Cerdá *et al.*, 2005; Bialonska *et al.*, 2009; Saura-Calixto, 2010). Los CF que no son absorbidos y los metabolitos no fermentables permanecen cierto tiempo en el lumen del colon donde podrían contribuir a un ambiente antioxidante minimizando los efectos pro-oxidantes que se producen a nivel intestino grueso (Selma *et al.*, 2009). Cabe mencionar, que solamente los CF liberados de la matriz del alimento por la acción de enzimas digestivas (intestino delgado) y la microflora bacteriana (intestino grueso) son bioaccesibles en el intestino y potencialmente biodisponibles. Por lo tanto, la comprensión y conocimiento de la concentración tanto de CF bioaccesibles como de los



PNA: Polisacáridos no amiláceos; AN: Azúcares Neutros; AU: Ácidos Urónicos

**Figura 4.** Componentes de la fracción indigestible soluble e insoluble de los alimentos vegetales (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

que permanecen en la fracción indigestible, es importante para definir la bioeficacia de estos compuestos.

Por otra parte, la concentración de CF de distintas matrices vegetales se define comúnmente a partir de su extracto hidrofílico; no obstante, las concentraciones de CF bioaccesibles y ligados a la fracción indigestible, no son considerados en los ensayos de extracción química convencionales. La ventaja de diferenciar el tipo de CF puede servir para definir el uso adecuado de los subproductos agroindustriales, ya sea como ingredientes funcionales, como vehículo para liberar antioxidantes en el intestino grueso o simplemente como matriz para obtener extractos ricos en CF. Dada las características estructurales de la cáscara (alto contenido de fibra), hipotéticamente gran parte de los CF permanecen en la fracción indigestible. Si este enfoque es posible, la cáscara de aguacate podría utilizarse como una matriz natural para mejorar la salud intestinal.

## **HIPÓTESIS**

La concentración y actividad antioxidante de compuestos fenólicos de la cáscara de aguacate cv. 'Hass', es mayor en la fracción indigestible con respecto a la fracción bioaccesible.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* y actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y caracterizar su fracción indigestible.

### Objetivos Específicos

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales (fenoles totales, taninos hidrolizables y condensados) y actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.
- Obtener y determinar la composición química de la fracción indigestible soluble e insoluble de la cáscara de aguacate.
- Extraer y cuantificar los compuestos fenólicos (fenoles totales, taninos hidrolizables y condensados) de la fracción indigestible y determinar su actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y FRAP.
- Determinar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de la cáscara de aguacate y su actividad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se adquirieron frutos de aguacate (*Persea americana*) cv. 'Hass' en un mercado local de Hermosillo, Sonora (México) los cuales se cosecharon en el mes de agosto del 2013 y se seleccionaron (n=30) aleatoriamente. Los frutos se transportaron (5–7 °C) al Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm de cloro libre, pH 7) durante 2 min y se secaron a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se determinaron parámetros físicos y químicos para definir el estado de madurez de los frutos previamente a la obtención de la cáscara.

Se midió el color, firmeza, contenido de materia seca y aceite. Las variables de color CIE L\*,  $a^*$  y  $b^*$  se midieron en tres puntos del epicarpio de 30 frutos utilizando un colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta Sensing, Inc., EUA). Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  se utilizaron para calcular el valor Croma ( $\text{Croma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ) y el ángulo Hue ( $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} (b^* a^{*-1})$ ) (Odrizola-Serrano *et al.*, 2008). La firmeza se midió en tres puntos de la región ecuatorial de 10 frutos por el método de punción utilizando un penetrómetro Chatillon (modelo DFM50, Ametek Inc., EUA), al cual se le adaptó un cilindro de cabeza plana de acero inoxidable con un diámetro de 8 mm. Los resultados se reportaron en Newtons (N). El contenido de materia seca se determinó de acuerdo a la metodología seguida por Ozdemir y Topuz (2004). El contenido de aceite se estableció por extracción Soxhlet, utilizando éter de petróleo como lo describe la IUPAC (1979) en el método 1.122. Los resultados se expresaron como porcentaje de materia seca y aceite, respectivamente.

## Obtención de la Cáscara de Aguacate

Se obtuvo la cáscara mediante pelado de la corteza de 30 frutos (peso del fruto entre 200 y 225 g) con ayuda de un cuchillo afilado y previamente sanitizado; se descartaron las semillas y la porción comestible. Posteriormente, 50 g de la cáscara se utilizó para determinar la composición química proximal (humedad, lípidos totales, proteína, cenizas y carbohidratos totales por diferencia). El resto de la cáscara se congeló a -80 °C por 24 h y se deshidrató en un liofilizador Labconco (modelo 1, Labconco Corp., Kansa City, EUA) a -50 °C durante 72 h. Las muestras liofilizadas se trituraron en un procesador de alimentos (marca Oster, 1655) para la reducción del tamaño de partícula (<100 µm). Finalmente, las muestras de cáscara se colocaron dentro de bolsas de polietileno, se sellaron herméticamente (Impulse sealer, NT 300-2) y se almacenaron en desecador hasta su análisis.

El contenido de humedad se determinó por el método 985.14 de la AOAC (1990) y los lípidos totales por extracción Soxhlet, utilizando éter de petróleo como lo describe la IUPAC (1979) en el método 1.122. El contenido de proteínas se determinó por microKjeldahl utilizando el método 960.52l de la AOAC (1990) y el contenido de cenizas mediante el método 942.05 (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron como % de materia seca. A partir de este punto metodológico, los experimentos posteriores se organizaron en tres etapas. En la Figura 5 se muestra un esquema con la estrategia experimental diseñada para el análisis de la cáscara de aguacate.

### Etapa 1: Contenido de CF y Actividad Antioxidante de la Cáscara

#### **Obtención de Extractos Metanólicos**

Se prepararon 6 extractos metanólicos de la cáscara de acuerdo a la metodología descrita por Palafox-Carlos *et al.* (2012). Se utilizó 1 g de muestra y se homogeneizó con 20 mL de una solución de metanol:agua (80:20, v/v) utilizando un Ultra Turrax<sup>®</sup>T25 (IKA Works, EUA). El homogeneizado se colocó durante 30 min en un sonicador (Bransonic



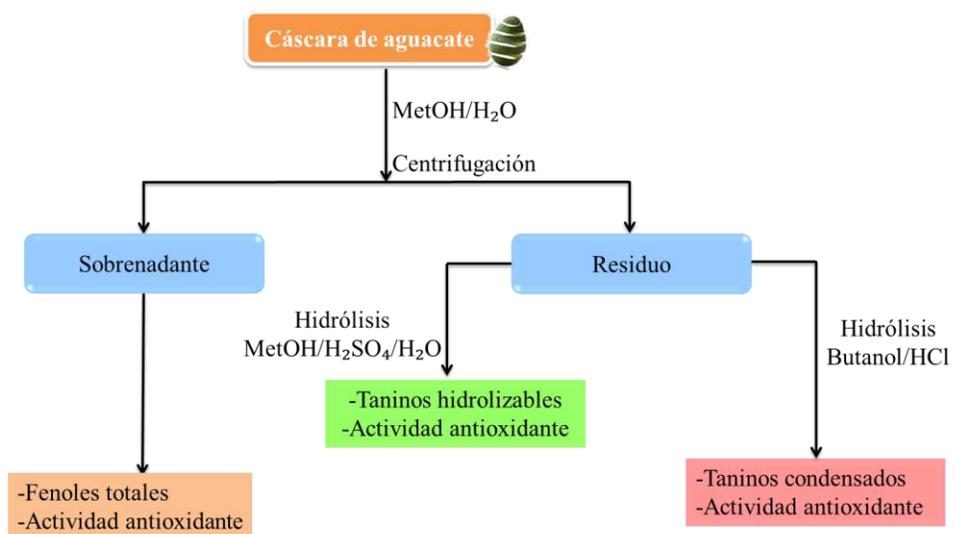
**Figura 5.** Esquema general de la estrategia experimental para la evaluación de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.

2510, EUA) y se centrifugó (centrífuga Beckman Coulter, Allegra™ 64R, EUA) a 9,400 g durante 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y los residuos de la extracción se lavaron dos veces más con 10 mL de metanol al 80% bajo las condiciones antes descritas. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y el volumen obtenido se enrasó a 30 mL con metanol al 80%. El extracto obtenido se almacenó a -25 °C para ser utilizado en la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante (Figura 6). Los pellets de la extracción (6 residuos) también fueron almacenados a -25 °C hasta la determinación de taninos hidrolizables y condensados.

### **Determinación de CF**

Fenoles totales. El contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se mezclaron 15 µL de extracto con 75 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) y 60 µL de carbonato de sodio al 75% (p/v). Después de 30 min se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Durham, EUA). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de peso seco (ps).

Determinación de taninos hidrolizables y condensados. El contenido de taninos hidrolizables y condensados se determinó a partir de los residuos de la extracción metanólica de la cáscara de acuerdo a Hartzfeld *et al.* (2002) y Reed *et al.* (1982), respectivamente. Para la determinación de taninos hidrolizables, tres de los pellets recuperados en la extracción metanólica se sometieron a una hidrólisis con 20 mL de metanol y 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado durante 20 h a 85 °C bajo condiciones de agitación constante (baño Thermo Scientific, modelo 270) (Hartzfeld *et al.*, 2002). Posteriormente, los hidrolizados se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de papel Whatman No. 1 y colectado en un matraz aforado de 50 mL. El residuo se sometió a dos lavados adicionales con 10 mL de agua destilada, en cada lavado, la muestra se centrifugó y se filtró bajo las condiciones descritas anteriormente. El volumen que se recuperó de la hidrólisis y de los lavados se mezcló y se enrasó con agua destilada hasta



**Figura 6.** Esquema general para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.

un volumen de 50 mL. Esta solución, se utilizó para la cuantificación de taninos hidrolizables como monómeros de ácidos fenólicos por el método de Singleton y Rossi (1965) descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como mg EAG/100 g de ps.

El resto de los residuos recuperados de la extracción metanólica (3 pellets) se hidrolizaron para liberar las antocianinas de los taninos condensados. Se añadieron 10 mL de una solución que contenía 975 mL de butanol y 25 mL de HCl (37% de pureza) a cada residuo y se colocaron en baño maría (baño Thermo Scientific, modelo 270) a 100 °C durante 3 h (Reed *et al.*, 1982). Después de la hidrólisis, se recuperó la solución por centrifugación (15,000 rpm, 15 min y 4°C) y se realizaron 2 lavados más con 10 mL de la solución anterior. Los sobrenadantes colectados se aforaron a 50 mL y, a partir de esta solución, se cuantificaron taninos condensados como monómeros de antocianinas a 555 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Durham, EUA). Los resultados se reportaron como mg equivalentes de cianidina (EC)/100 g de ps. Una vez llevada cabo la cuantificación de taninos hidrolizables y condensados, los extractos se almacenaron a -25°C hasta el análisis de actividad antioxidante.

### **Evaluación de la Actividad Antioxidante**

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrácilo). La actividad antioxidante se midió en los extractos metanólicos de la cáscara y en los hidrolizados preparados para la determinación de taninos hidrolizables y condensados, esto de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Se prepararon 2.5 mg del radical estable DPPH• en 100 mL de metanol puro. La absorbancia de la solución de DPPH• se ajustó a una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  ( $t_0$ ) a 515 nm con un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Durham, EUA). Posteriormente, 10 µL de muestra se mezclaron con 140 µL de solución de DPPH•, la mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 30 min ( $t_{30}$ ), a partir de entonces, se midió la pérdida de absorbancia nuevamente a 515 nm. El porcentaje de inhibición del DPPH• se calculó de acuerdo a la ecuación 1. Por último, la actividad antioxidante de las muestras se expresó como

equivalentes Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (ET)/g de ps.

(1)

$$\% \text{ de Inhibición} = [( \text{absorbancia } t_0 - \text{absorbancia } t_30) / \text{absorbancia } t_0] \times 100$$

ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). El ensayo ABTS•+ se llevó a cabo según el método de Re *et al.* (1999). Este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes para secuestrar el radical catión ABTS•+. El radical ABTS•+ fue generado por una reacción de ABTS 7 mM con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a 2.45 mM. La mezcla de reacción se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido el tiempo, la solución de ABTS•+ se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0.70±0.02 (t0) a 734 nm. Posteriormente, se añadieron 245 µL de solución de ABTS•+ diluida con metanol a 5 µL de muestra. La reducción del radical fue monitoreada durante 6 min (t6) a 734 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Durham, EUA). El porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo con la ecuación 2 y la actividad antioxidante de las muestras se expresó como µmoles ET/g de ps.

(2)

$$\% \text{ de Inhibición} = [( \text{absorbancia } t_0 - \text{absorbancia } t_6) / \text{absorbancia } t_0] \times 100$$

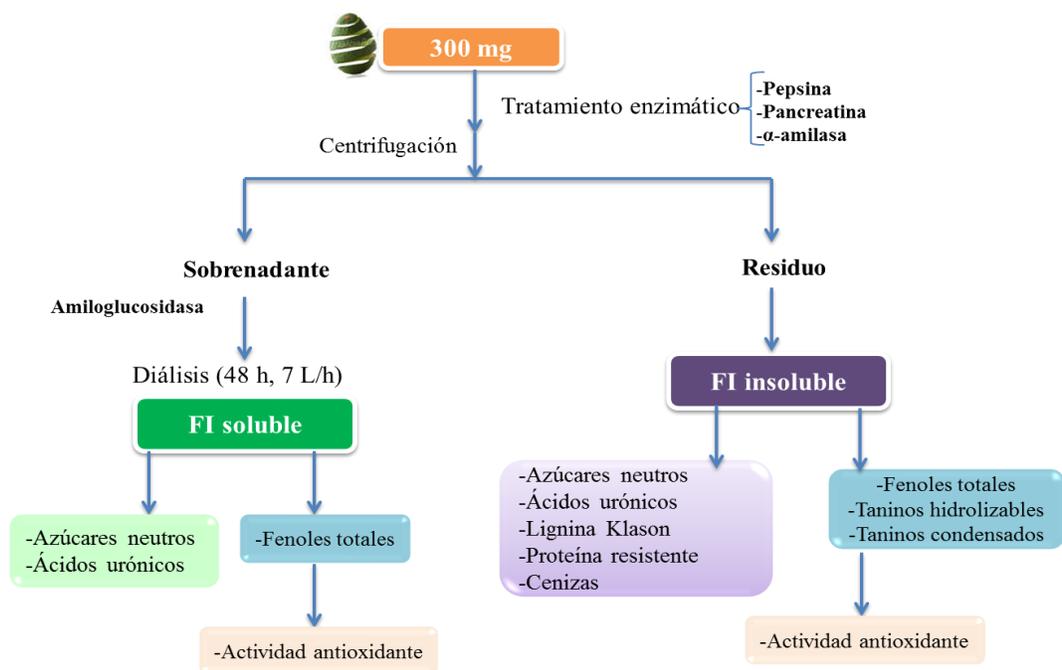
Poder antioxidante de reducción del hierro (FRAP). El FRAP se determinó en las muestras (extractos metanólicos e hidrolizados de taninos hidrolizables y condensados) de acuerdo con Benzie y Strain (1996). El método se basa en la capacidad de la muestra para reducir los iones Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. En la presencia de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) el complejo Fe<sup>2+</sup>-TPTZ presenta color azul a 630 nm. Se preparó el reactivo FRAP con 5 mL de tampón de acetato de sodio a 300 mM y pH 3.6, 0.5 mL de TPTZ a 10 mM en HCl (40 mM) y 0.5 mL de FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O 20 mM. Brevemente, 280 µL de reactivo FRAP se añadieron a 20 µL del extracto o bien, del hidrolizado obtenido en la determinación de taninos hidrolizables y condensados. La mezcla se mantuvo durante 30 minutos en la oscuridad y, posteriormente, se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Durham, EUA). Los resultados se expresaron como µmoles ET/g de ps.

## Etapa 2: Determinación de la Composición Química de la Fracción Indigestible (FI), Contenido de CF y Actividad Antioxidante

### **Composición Química de la FI**

Los componentes de la FI se determinaron de acuerdo al procedimiento descrito por Saura-Calixto *et al.* (2000) por el cual, es posible diferenciar entre los CF asociados con macromoléculas en las formas soluble e insoluble. Este método combina tratamientos enzimáticos utilizando condiciones fisiológicas (temperatura y pH) con la separación de compuestos digeribles por diálisis, obteniéndose la FI de los alimentos o de los tejidos vegetales. La Figura 7 muestra los principales constituyentes de la FI que se determinaron en este estudio. La FI está compuesta por azúcares neutros y ácidos urónicos que son los polisacáridos no amiláceos (PNA), además de lignina, proteína resistente, cenizas y CF que no se encuentran bioaccesibles en el intestino delgado y que alcanzan potencialmente el colon. La FI total se calculó como la suma de la FI insoluble (constituida por PNA, lignina Klason, proteínas resistentes, cenizas, CF, taninos condensados y taninos hidrolizables) y FI soluble (constituidas por PNA y CF).

Se colocaron 300 mg de cáscara liofilizada (tamaño de partícula <100  $\mu\text{m}$ ) en tubos de teflón® previamente tarados y pesados. Las muestras de cáscara se incubaron con las enzimas: Pepsina (0.2 mL de una solución a 300 mg/mL en solución HCl-KCl 0.08 M, pH 1.5, 40 °C, 1h, P-7000, Sigma-Aldrich), pancreatina (1 mL de una solución a 5 mg/mL en tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.5, 37 °C, 6 h, P-1750, Sigma-Aldrich) y  $\alpha$ -amilasa (1 mL de una solución a 120 mg/mL en tampón Tris-maleato 0.1 M, pH 6.9, 37 °C, 16 h, A-3176, Sigma-Aldrich). Posteriormente, las muestras se centrifugaron (15 min, 3,000 g) y los sobrenadantes se retiraron. Los residuos se lavaron dos veces con 5 mL de agua destilada y todos los sobrenadantes fueron combinados. Cada sobrenadante se incubó con 100  $\mu\text{L}$  de amiloglucosidasa (A-9913, Sigma-Aldrich) a 60 °C durante 45 min.



**Figura 7.** Diagrama que muestra el procedimiento para la determinación de la fracción indigestible (soluble e insoluble) y compuestos fenólicos asociados de cáscara de aguacate cv. 'Hass'.

Para eliminar los compuestos digeribles, los sobrenadantes fueron transferidos a membranas de celulosa (D9652-30.48 m avg, Flat width 33 mm, 12400 Da., Sigma-Aldrich) y posteriormente, se dializaron bajo una corriente de agua (7 L/h) durante 48 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo de diálisis, el contenido de las membranas fue colocado en tubos falcon de 50 mL y almacenados a -25 °C hasta el análisis de PNA, CF y actividad antioxidante. En concreto, los productos de todos los tratamientos fueron: un sobrenadante que fue dializado, el cual corresponde a la FI soluble y un residuo después del tratamiento enzimático, que corresponde a la FI insoluble (Figura 7).

Los tubos que contenían la FI insoluble se colocaron en una estufa a 100 °C durante 16 h y posteriormente se pesaron para determinar gravimétricamente el contenido de FI insoluble en la muestra. Después, la FI insoluble se dividió en tres fracciones para analizar sus diferentes componentes (Figura 7). Una primera fracción se utilizó para determinar PNA y lignina Klason, una segunda fracción del residuo se utilizó para determinar proteína resistente y cenizas. La tercera fracción se utilizó para obtener extractos metanólicos de la FI insoluble y así poder determinar el contenido de CF, taninos y actividad antioxidante como se describe en la etapa 1.

Determinación de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina klason. En la FI soluble, los PNA se hidrolizaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M a 100 °C durante 90 min y se cuantificaron como la suma de azúcares neutros y ácidos urónicos expresados en porcentaje de peso seco (% de ps). Los azúcares neutros se derivatizaron a acetatos de alditol por el método de Blakeney *et al.* (1983) para lo cual, 500 µL de la FI soluble hidrolizada se colocaron bajo un flujo de N<sub>2</sub> hasta sequedad total. Posteriormente, se añadieron 100 µL de NaBH<sub>4</sub> y la mezcla permaneció durante 1 h a 25 °C. Enseguida, se agregaron 200 µL de anhídrido acético y 20 µL de 1-metilimidazol como catalizador. Adicionalmente, 2 mL de H<sub>2</sub>O y 3 mL de cloroformo fueron añadidos a la mezcla. Se recuperó la fase clorofórmica y se llevó a sequedad con ayuda de un flujo de N<sub>2</sub>. El producto derivatizado se resuspendió en 150 µL de acetona y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Varian CP-3800) provisto con detector FID (250 °C), una columna capilar DB-23 de 30 m x 0.25 mm (210 °C) y helio a flujo constante (3 mL/min) como gas acarreador. Se usó *mio*-inositol como estándar interno y la concentración de azúcares neutros se

calculó a partir de curvas de calibración de ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa (Sigma®).

Respecto a los ácidos urónicos, se determinaron con el método simplificado de Ahmed y Labavitch (1978). A una alícuota de 200  $\mu$ L del hidrolizado de la FI soluble se le agregaron 1.2 mL de borato de sodio (12.5 mM) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y la mezcla se mantuvo por 5 min en baño de agua a 100 °C. La coloración se produjo al añadir 20  $\mu$ L de *m*-fenil fenol (0.15 %, p/v) diluido en NaOH al 0.5 % (p/v). Posteriormente, se midió la absorbancia a 520 nm con un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc, Durham, EUA). Para la cuantificación, se utilizó ácido galacturónico (Sigma®) como patrón de calibración.

La FI insoluble fue hidrolizada con 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M durante 1 h en baño de agua a 37 °C (baño Thermo Scientific, modelo 260). Posteriormente, se añadieron 33 mL de agua destilada y nuevamente se colocaron en baño con agua, esta vez a 100 °C por espacio de 90 minutos. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de papel Wathman no. 1. Se realizaron 3 lavados adicionales de los residuos con 10 mL de agua destilada centrifugando y recuperando los sobrenadantes en cada caso. De este hidrolizado, se tomaron 500  $\mu$ L y 200  $\mu$ L para la determinación de azúcares neutros y ácidos urónicos, respectivamente. Las metodologías utilizadas fueron las descritas anteriormente. Los residuos que quedaron después de los lavados realizados se secaron en estufa a 100 °C durante 12 h, se enfriaron y se pesaron. El peso registrado (gravimetría) correspondió al contenido de lignina Klason de la FI insoluble (Southgate, 1969).

Determinación de proteína resistente. El contenido de proteína resistente de la FI insoluble se determinó por microKjeldahl de acuerdo al método 960.52l de la AOAC (1990). En un papel encerado se pesaron 0.2 g de FI insoluble y se colocaron dentro de un matraz microKjeldahl de 100 mL junto con 1.5-2 g de una mezcla de catalizadores (5 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O y 93 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se colocaron en un digestor microKjeldahl a temperatura media hasta que la muestra quedó

totalmente digerida. Se dejó enfriar el matraz y se agregaron 10 mL de agua destilada para disolver bien la muestra. Posteriormente, se vació el contenido del matraz en el receptor de un equipo de destilación microKjeldahl marca Labconco (modelo 6500000).

En la salida del equipo se colocó un vaso de recuperación con 25 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 4% (p/v) y dos gotas de indicador rojo de metilo modificado (0.125 g rojo de metilo y 0.0825 g de azul de metileno en 100 mL de alcohol). Se colocó una solución de NaOH al 40% (p/v) en el receptor del destilador microKjeldahl hasta que se formó una mezcla uniforme color café. A partir del cambio de coloración de la solución de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, se contó un tiempo de 5 minutos y; transcurrido éste, se retiró el vaso de recuperación con sumo cuidado. El destilado que se recuperó en el vaso fue titulado con HCl 0.1N, previamente valorado con CaCO<sub>3</sub>. Se registró el volumen de HCl gastado en el vire y se calculó el porcentaje de proteína (base seca) multiplicando el valor de nitrógeno total por el factor 6.25 como lo indica la ecuación 3.

(3)

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(0.01401)(\text{Normalidad del HCl})(\text{mL gastados de HCl})(6.25)}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Determinación de cenizas. Para la determinación de cenizas se utilizó el método 942.05 de la AOAC (1990). El procedimiento consistió en colocar crisoles de porcelana en una mufla Termolyne tipo F6000 (Furance, EUA) a 550 °C durante 1 hora para lograr el peso constante. Cuando la temperatura del equipo bajó, se sacaron los crisoles y se colocaron en un desecador por un tiempo de 30 minutos. Se registró el peso de los crisoles (peso del crisol) y 1.5 g de FI insoluble se colocó dentro de cada crisol. Posteriormente, las muestras se pre-incineraron utilizando una placa de calentamiento a temperatura media para evitar pérdidas por arrastre en el humo. Las muestras se calcinaron en la mufla a 550°C durante 12 horas hasta obtener cenizas blancas. Transcurrido el tiempo, los crisoles se enfriaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron (peso del crisol con la ceniza) y se calculó el contenido de ceniza por diferencia de peso de acuerdo a la ecuación (4).

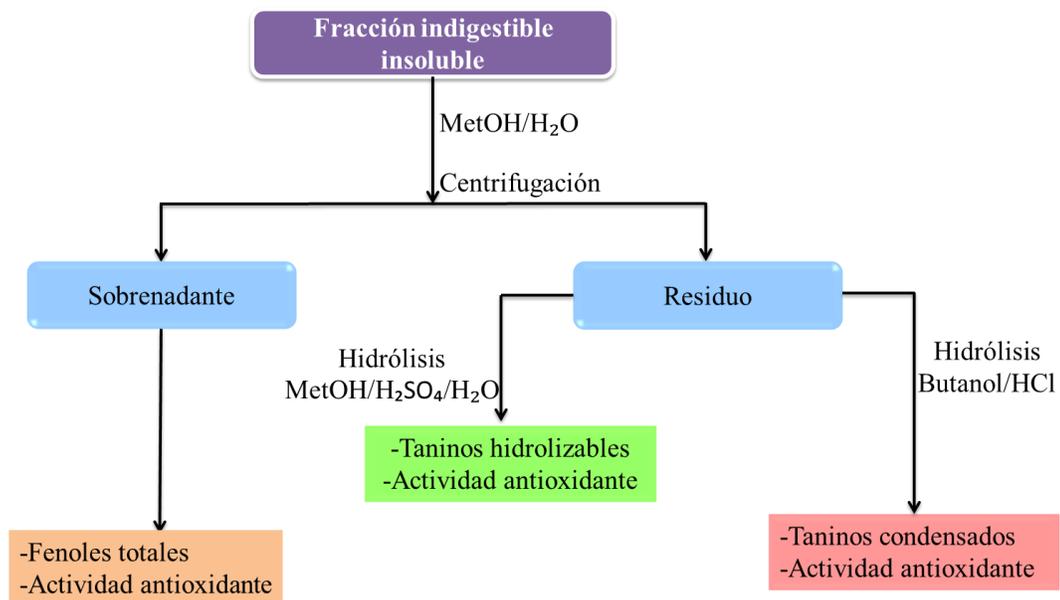
$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso del crisol con la ceniza} - \text{Peso del crisol})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (4)$$

### **Cuantificación de CF y Actividad Antioxidante de la FI**

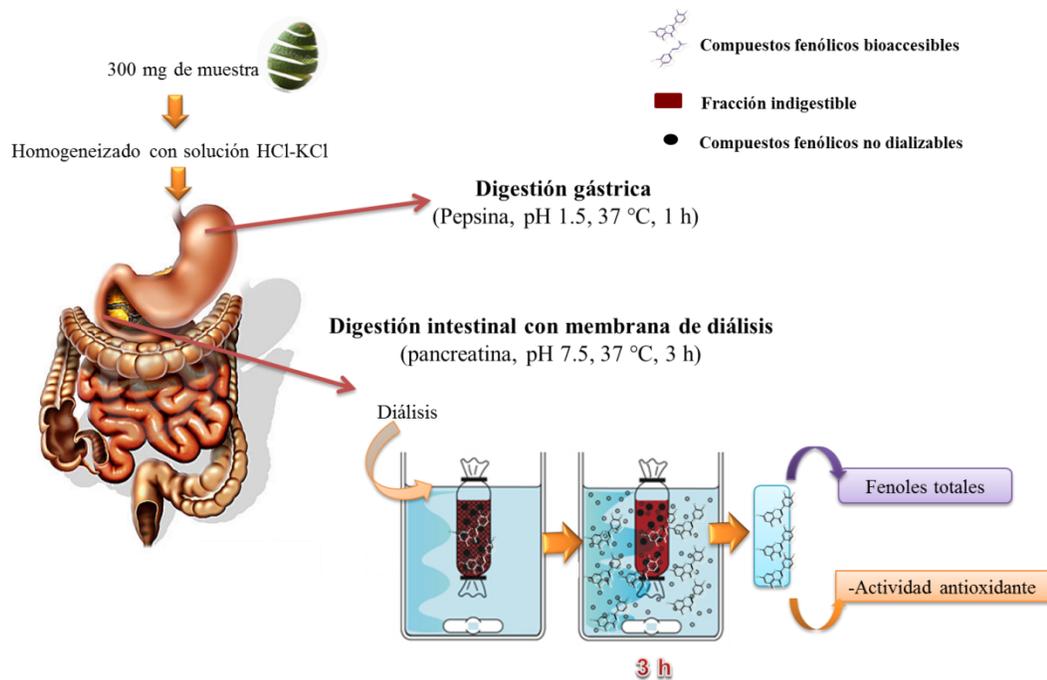
La Figura 8 muestra el esquema general para la determinación de CF de la FI de la cáscara de aguacate. En la solución de FI soluble obtenida después de la diálisis, se determinó el contenido de fenoles totales de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) y la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS y FRAP, descritos previamente. Mientras que en la FI insoluble, fue necesario realizar una extracción con metanol para la determinación de fenoles totales y posteriormente, a partir de los residuos de la extracción se determinaron taninos hidrolizables (Hartzfeld *et al.*, 2002) y condensados (Reed *et al.*, 1982). La actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) fue determinada en el extracto utilizado para la determinación de fenoles totales de la FI insoluble y los hidrolizados obtenidos para la determinación de taninos de la FI insoluble de acuerdo a los métodos descritos previamente. Los resultados de actividad antioxidante fueron expresados en  $\mu\text{moles ET/g}$  de ps y los de fenoles totales en  $\text{mg EAG}/100 \text{ g}$  de ps. Por último, la concentración de taninos hidrolizables y condensados se reportó en  $\text{mg EAG}/100 \text{ g}$  de ps y  $\text{mg EC}/100 \text{ g}$  de ps, respectivamente.

#### **Etapa 3: Evaluación de la Bioaccesibilidad *in vitro* de los CF y Actividad Antioxidante de la Fracción Bioaccesible**

La liberación de CF de la matriz alimentaria se determinó por digestión *in vitro* en dos fases secuenciales: la digestión gástrica e intestinal (incluyendo diálisis), de acuerdo a la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.* (2000) y Rodríguez-Roque *et al.* (2013), con algunas modificaciones (Figura 9). Primeramente, se colocaron 300 mg de muestra en tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL. Posteriormente, se agregaron 10 mL de



**Figura 8.** Esquema general para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la fracción indigestible de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.



**Figura 9.** Esquema general de la digestión *in vitro* de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' para la determinación de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos.

solución HCl-KCl 0.2 M a pH 1.5 y se homogeneizó la muestra con un Ultra Turrax® T25 (IKA Works, EUA) durante 1 minuto. Para la digestión gástrica, se ajustó el pH a 1.5 con HCl (12 M) y se adicionaron 0.2 mL de una solución que contenía 300 mg/mL de pepsina (P-700, Sigma-Aldrich) en solución de HCl-KCl. La mezcla se colocó en baño maría (Thermo Scientific, modelo 270) con agitación (90 rpm) a 37 °C durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo de la digestión gástrica, se añadieron 4.5 mL de tampón fosfato (0.1 M, pH 7.5) y se ajustó el pH a 7.5 por adición de NaOH (2 M). Enseguida se añadió 1 mL de una solución que contenía 5 mg/mL de pancreatina (P-1750, Sigma-Aldrich) en tampón fosfato. Para simular la digestión intestinal, las muestras se colocaron en membranas de diálisis (D9652-30.48 m avg, Flat width 33 mm, 12400 Da., Sigma-Aldrich) previamente hidratadas con tampón fosfato. Posteriormente las membranas se colocaron dentro de un recipiente de vidrio que contenía 150 mL de tampón fosfato durante 3 h a 37 °C y 90 rpm. Después de la digestión intestinal se obtuvieron dos fracciones: una fracción dializada y una fracción duodenal. La fracción duodenal corresponde a la muestra que permaneció dentro de la membrana de diálisis (compuestos no dializables) y se consideraron como compuestos no absorbibles. La fracción dializada contenía los CF que migraron hacia afuera de la membrana de diálisis y se consideraron compuestos bioaccesibles, potencialmente biodisponibles.

Se tomaron alícuotas de la fracción dializada para determinar la concentración y actividad antioxidante de los CF bioaccesibles. Se determinaron fenoles totales (Singleton y Rosi, 1965) y actividad antioxidante por los métodos DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995), ABTS (Re *et al.*, 1999) y FRAP (Benzie y Strain, 1996). Los resultados de actividad antioxidante fueron expresados en  $\mu$ moles ET/g de ps y los de fenoles totales en mg EAG/100 g de ps, este valor fue utilizado para calcular el % de bioaccesibilidad de acuerdo a la ecuación (5) utilizada por Rodríguez-Roque *et al.* (2013) y Hithamani y Srinivasan (2014).

(5)

$$\% \text{ de Bioaccesibilidad} = \frac{\text{Fenoles totales dializables}}{\text{Fenoles totales en la cáscara}} \times 100$$

## Análisis de los Datos

Todos los análisis se realizaron al menos por triplicado. La información obtenida se analizó por estadística descriptiva (pruebas de normalidad, media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación). Se realizó una prueba de  $t$  ( $t$  de Student) para dos muestras independientes (CF y actividad antioxidante de la FI vs CF y actividad antioxidante de la fracción bioaccesible) a un  $\alpha=0.05$  utilizando el paquete estadístico NCSS versión 8.0 (Number Cruncher Statistical System, 2012, Kaysville UTA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros Fisicoquímicos del Aguacate cv. 'Hass' y Composición Química de la Cáscara

Los parámetros físicos y químicos de los aguacates a partir de los cuales se obtuvo la cáscara, se muestran en el Cuadro 3. Los valores obtenidos para L\*, Hue, Croma y % de aceite concuerdan con los reportados por Villa-Rodríguez *et al.* (2011) para el estado de madurez 3 (L\*=26.29±0.52, Hue=90.62±3.11, Croma=8.79±0.55 y % de aceite=19.89). Durante el proceso de maduración, los frutos se someten a cambios fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la biosíntesis y acumulación de pigmentos y antioxidantes como CF, entre otros (Goulao y Oliveira, 2008; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011). Por esta razón, es de suma importancia determinar el estado de madurez sobre todo cuando se analiza el contenido de CF y actividad antioxidante de alguna matriz vegetal. En este caso, la cáscara obtenida para los análisis corresponde a frutos en estado de madurez comercial.

La composición química de la cáscara se muestra en el Cuadro 3. Se encontró un contenido de proteína que representa el 13.72% de la materia seca, cenizas alrededor del 5% y lípidos totales en un 9.83%. Los valores anteriores son cercanos a los reportados Bressani *et al.* (2009) para la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. Cabe mencionar, que la aplicación potencial de los subproductos depende de su composición química (Happi Emaga *et al.*, 2007). Los subproductos con alto contenido proteico, por lo general más del 20% de la materia seca, son comúnmente utilizados en la alimentación animal (Buitrago, 1990); mientras que los subproductos de bajo valor nutritivo son aprovechados para la extracción de otros compuestos de interés industrial (Balasundram *et al.*, 2006). La cáscara de aguacate podría ser aprovechada para este fin, considerando

**Cuadro 3.** Parámetros fisicoquímicos del aguacate y composición química proximal de la cáscara.

<b>Aguacate</b>	<b>Valor</b>
Firmeza (N)	7.45±0.88
L*	25.97±0.90
Hue	83.76±5.03
Croma	8.11±0.90
Materia seca (%)	29.03±0.42
Aceite (%)	18.44±1.53
<b>Cáscara</b>	<b>% ms</b>
Lípidos totales	9.83±0.72
Proteína	13.72±0.14
Cenizas	5.09±0.05
*Carbohidratos totales	71.36

Valores como la media±la desviación estándar, humedad=75.66%, ms: materia seca.

\* Calculado por diferencia (100-lípidos- proteína-cenizas).

que es un material libre de compuestos tóxicos y es un subproducto ampliamente disponible (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011).

## Etapa 1: Contenido de CF y Actividad Antioxidante de la Cáscara

### **Concentración de CF de la Cáscara de Aguacate**

El Cuadro 4 muestra los resultados del contenido de fenoles totales y taninos determinados a partir de extractos de la cáscara de aguacate y sus residuos. La cáscara mostró un contenido de fenoles totales de  $5,367.27 \pm 115.06$  mg EAG/100 de ps. Este valor fue cuantificado a partir de un extracto hidrofílico de la cáscara y corresponde a los CF de bajo peso molecular solubles en solvente acuoso-orgánico. El resultado concuerda con los niveles más bajos de los intervalos reportados por Rodríguez-Carpena *et al.* (2011a) con un valor de fenoles totales de  $8,997 \pm 3103$  mg EAG/100 g ps y  $7,841 \pm 2447$  mg EAG/100 g ps en un segundo reporte (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b).

El contenido de CF en cáscara de aguacate cv. 'Hass' es 4 veces mayor al reportado para cáscara de manzana cv. 'Fuji' (Drogoudi *et al.*, 2008) y similar al de la cáscara de mango 'Badami' (5,400 mg EAG/100 g ps) (Ajila *et al.*, 2007). Incluso, la cáscara de aguacate cv. 'Fuerte' presentó un contenido de fenoles totales menor al reportado en este estudio (4,054 mg EAG/100 g ps) (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Los subproductos anteriores, se consideraron fuente de CF en la literatura citada. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos cabe considerar a la cáscara de aguacate cv. 'Hass' como una matriz fuente de CF.

Por otra parte, el contenido de CF reportado en la literatura se refiere normalmente a compuestos de bajo peso molecular que son solubles en solventes acuoso-orgánicos (Arranz *et al.*, 2009). En extractos de cáscara de aguacate cv. 'Hass' se han encontrado compuestos de bajo peso molecular como ácidos clorogénicos, y flavonoides tales como

**Cuadro 4.** Contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y taninos) y actividad antioxidante determinados a partir de extractos y sus residuos de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'.

Compuestos	Concentración	Actividad antioxidante ( $\mu$ moles ET/g ps)		
		DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles totales (mg EAG/100 g ps)*	5367.27 $\pm$ 115.06	683.19 $\pm$ 9.57	751.54 $\pm$ 59.06	472.85 $\pm$ 13.59
Taninos hidrolizables (mg EAG/100 g ps)	579.88 $\pm$ 4.64	31.19 $\pm$ 0.39	34.62 $\pm$ 1.62	70.24 $\pm$ 0.38
Taninos condensados (mg EC/100 g ps)	163.25 $\pm$ 1.32	n.d.	115.82 $\pm$ 3.29	204.78 $\pm$ 4.62

Valores como la media $\pm$ la desviación estándar (n=3). EAG: Equivalentes de Ácido Gálico, EC: Equivalentes de Cianidina, ps: peso seco. ET: Equivalentes Trolox. \*Compuestos fenólicos solubles en metanol:agua (80:20, v/v).

(+)-catequina y (-)-epicatequina (Hirasawa *et al.*, 2008). También se ha reportado la presencia de ácido 5-O-cafeoilquínico y dímeros de procianidina (Kosińska *et al.*, 2012). Sin embargo, cantidades significativas de CF que normalmente no se consideran en los estudios nutricionales permanecen en los residuos de los extractos, sobre todo CF de alto peso molecular como taninos hidrolizables y condensados (Arranz *et al.*, 2009). Esto sugiere, que en muchos estudios sobre CF se subestima el contenido real de CF. Por lo tanto, es importante considerar en la cuantificación los compuestos que se encuentran en ambas fracciones del extracto (sobrenadante y residuo).

Los CF presentes en el residuo de los extractos metanólicos fueron determinados. El contenido de taninos hidrolizables y condensados fue de  $579.88 \pm 4.64$  mg EAG/100 g ps y  $163.25 \pm 1.32$  mg EC/100 ps, respectivamente. Un estudio realizado por Wang *et al.* (2010) reveló la presencia de oligómeros de procianidinas o taninos condensados en la cáscara de aguacate cv. 'Hass'. El contenido total de procianidinas reportado por dichos autores fue  $3,890 \pm 50$  mg/100 g de peso fresco, un resultado hasta 95 veces superior al que se obtuvo en nuestro estudio ( $40.81$  mg EC/100 g de peso fresco). Estas diferencias pueden deberse a que en el estudio de referencia utilizaron procianidinas de cocoa y mora azul para generar las curvas estándar. Sin embargo, los taninos condensados procedentes de diversas fuentes vegetales difieren químicamente y tienen distinto grado de polimerización, por esta razón la utilización de taninos de plantas como patrones para la cuantificación, puede ser inapropiado (Schofield *et al.*, 2001). Otro factor que pudo haber influido en la inconsistencia de los resultados es el solvente utilizado para la extracción, en nuestro estudio se utilizó *n*-butanol acidificado y los autores citados emplearon acetona/agua/ácido acético (70:29.7:0.3, v/v/v). Variaciones en las concentraciones de taninos condensados han sido reportadas con el uso de distintos solventes (Chavan *et al.*, 2001). Además, el contenido de CF de los distintos vegetales podría verse afectado por diversos factores, como la variedad, las condiciones agronómicas, la manipulación postcosecha, así como el estado de madurez de la fruta y condiciones de almacenamiento (Kevers *et al.*, 2007).

En comparación con otros materiales vegetales como cebada (*Hordeum vulgare*), la cáscara de aguacate posee una concentración mayor de taninos condensados respecto a

74.2±3.0 mg/100 g de peso fresco reportado en dicho cereal (Gu *et al.*, 2004). En subproductos de *Opuntia ficus-indica* no se detectó la presencia de estos compuestos (Bensadón *et al.*, 2010). Mientras que en assái (*Euterpe oleraceae*) se encontró una concentración de taninos hidrolizables y condensados de 1,590 mg/100 g de ps y 1,240 mg/g ps, respectivamente (Rufino *et al.*, 2011). Estas concentraciones son 2.9 y 7.6 veces superiores a las de la cáscara de aguacate. También, en residuos de la decocción *H. sabdariffa* cv. 'Criolla' se encontró una concentración mayor de taninos hidrolizables (850 mg/100 g) y condensados (1,850 mg/100g) (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014). No obstante, el impacto positivo de la ingesta de taninos no depende únicamente de la concentración a la que se encuentran en el material vegetal sino también del tipo de tanino, de la fuente de la cual proviene, así como de su bioaccesibilidad y absorción en el intestino (Serrano *et al.*, 2009).

La cáscara aguacate solo contiene 0.74% de taninos y estos compuestos no fueron tan abundantes como los CF de bajo peso molecular (5.37%). Sin embargo, posiblemente esta concentración puede potenciar algún efecto fisiológico positivo para la salud. Adicionalmente, una alta concentración de CF de bajo peso molecular encontrada en la cáscara de aguacate sugiere el potencial de este subproducto como fuente natural para la obtención de extractos ricos en CF.

### **Actividad Antioxidante de la Cáscara de Aguacate**

El Cuadro 4 muestra los resultados de actividad antioxidante determinada a partir de extractos de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y sus residuos (hidrolizados de taninos condensados e hidrolizables). Los CF de bajo peso molecular (fenoles totales) contribuyeron en mayor medida a la actividad antioxidante de la cáscara de aguacate. El valor obtenido para DPPH fue 683.19±9.57 µmoles ET/g de ps. Este valor fue cercano a lo reportado por Wang *et al.* (2010) y Rodríguez-Carpena *et al.* (2011). Los taninos condensados a pesar de que se encontraban en menor proporción presentaron alta actividad antioxidante, alrededor del 30% de la actividad antioxidante total. Un estudio sobre la actividad antioxidante de taninos condensados, demostró su capacidad para

secuestrar radicales libres e inhibir la oxidación de tejidos incluso mejor que las vitaminas C y E, consideradas como potentes antioxidantes (Fine, 2000). Mediante un estudio *in vitro*, se demostró que los taninos condensados tienen afinidad por neutralizar el radical libre hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) (Fine, 2000). Además, se informó que estos compuestos tienen la capacidad de actuar como inhibidores no competitivos de la enzima xantina oxidasa, una enzima generadora de radicales libres en el metabolismo celular.

Sumado a lo anterior, Wang *et al.* (2010) reportaron que los taninos condensados fueron los CF del aguacate que contribuyeron en mayor medida a la capacidad antioxidante. Dichos autores encontraron una buena correlación ( $r=0.79$ ) entre la concentración de estos compuestos y la actividad antioxidante. También, Rufino *et al.*, (2011) evaluaron la actividad antioxidante de CF de bajo peso molecular y taninos hidrolizables de *Euterpe oleraceae* utilizando el ensayo FRAP, encontrando valores de  $128.44\pm 44$  y  $109.87\pm 5.19$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$ , respectivamente. Los valores de actividad antioxidante de la cáscara de aguacate obtenidos en el ensayo FRAP fueron  $472.85\pm 13.59$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$  para fenoles totales y  $70.24\pm 0.38$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$  para taninos hidrolizables. Por lo tanto, la actividad antioxidante atribuida a CF de bajo peso molecular es 3.7 veces mayor a la reportada para *Euterpe oleraceae*. En este sentido, cabe la posibilidad de considerar a la cáscara de aguacate como fuente de antioxidantes comparada con dicho fruto, el cual se consideró fuente de antioxidantes en base a los resultados obtenidos en su estudio.

Etapa 2: Composición Química de la FI, Contenido de CF y Actividad Antioxidante

### **Composición Química de la FI**

El Cuadro 5 muestra la composición química de la FI de la cáscara de aguacate, incluidos azúcares neutros, ácidos urónicos, lignina Klason, proteína resistente y cenizas. El 96.85% de la materia seca no fue digerido por enzimas gastrointestinales. La mayor parte de la FI es de naturaleza insoluble (89.39%) y sólo un 7.46% corresponde a

**Cuadro 5.** Composición química de la fracción indigestible (FI) de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' (% ps).

Componente	FI soluble	FI insoluble	FI total
Azúcares neutros totales	0.48	34.40	34.88
Arabinosa	0.04±0.001	2.55±0.01	2.59
Fucosa	0.02±0.0002	4.75±0.02	4.77
Galactosa	n.d.	1.01±0.03	1.01
Glucosa	0.26±0.01	22.24±0.74	22.50
Manosa	0.008±0.0004	1.71±0.02	1.72
Ramnosa	n.d.	n.d.	-
Xilosa	0.15±0.0001	2.14±0.01	2.29
Ácidos urónicos	6.98±0.16	12.87±0.20	19.85
Lignina Klason	-	23.19±0.71	23.19
Proteína resistente	-	13.53±1.19	13.53
Cenizas	-	5.40±0.10	5.40
<b>FI Total</b>	<b>7.46±0.31</b>	<b>89.39±0.78</b>	<b>96.85</b>

Valores como la media ± la desviación estándar. ps: peso seco, n.d.: no detectado.

FI soluble. La fracción soluble, a pesar de estar en menor proporción, es de 2.5 hasta 4 veces superior a las concentraciones de fibra dietética soluble reportadas por Velderrain-Rodríguez (2013) para frutas tropicales como papaya (2.91%), mango (2.42%) y piña (1.82%). Las frutas tropicales son utilizadas como fuente de fibra soluble en la industria de bebidas, la FI soluble de la cáscara podría ser aprovechada en este ramo de los alimentos; sin embargo, una técnica de extracción y purificación deberá ser estudiada para su explotación adecuada. Un procedimiento para la extracción de fibra dietética soluble de cáscara de cacao fue patentado por Nakamura y Nagaoka (2008). La extracción se lleva a cabo bajo presión a un rango de temperatura que va de 100 a 130 °C y pH entre 2 y 6.5. El producto final es una fibra soluble que puede utilizarse para la fortificación de bebidas y como aditivo alimentario. Un proceso similar podría diseñarse para la extracción de fibra soluble de la cáscara aguacate.

Los principales constituyentes de la FI fueron PNA (suma de azúcares neutros y ácidos urónicos) en un 54.73% y lignina (23.19%). La glucosa y xilosa fueron los principales azúcares neutros de la FI soluble, mientras que fucosa y glucosa fueron los principales monosacáridos en la FI insoluble. La fucosa es una aldosa constituyente de pectinas, hemicelulosa y de algunas glicoproteínas (Reiter *et al.*, 1993). Un alto contenido de glucosa (22.50 %) sugiere la presencia de celulosa. De hecho, la celulosa, hemicelulosa y la pectina son los principales polisacáridos del aguacate (Hirasawa *et al.*, 2008). Estos carbohidratos no digeribles pueden llegar al colon y ser fermentados por las enzimas de la microbiota. Algunos de los metabolitos generados durante la fermentación colónica de carbohidratos principalmente butirato, se reportan como benéficos para la salud intestinal (Wong *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que la información sobre el contenido de carbohidratos no digeribles de la cáscara de aguacate es muy limitada. Hasta el momento, solamente se ha encontrado en la bibliografía un estudio realizado en Colombia por Bressani (2009) que reporta el 54% de fibra cruda. Por lo tanto, en vista del interés actual sobre los efectos biológicos de compuestos no digeribles y el poco conocimiento sobre su contenido en los subproductos, es necesario realizar estudios para su caracterización.

Respecto a la lignina, se considera el segundo polímero orgánico más abundante en las plantas (15-40%), después de la celulosa (Ghaffar y Fan, 2013). En plantas y tejidos vegetales, estos compuestos juegan un papel importante al unirse de manera covalente a hemicelulosas brindando fuerza y rigidez a los tejidos que componen a la pared celular (Vanholme *et al.*, 2008). El contenido de lignina no se ha reportado previamente en la cáscara de aguacate. No obstante, se sabe que la lignificación disminuye la digestibilidad de algunos componentes de las paredes celulares de los vegetales (Jung, 1989). Y, algunos CF como ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico suelen asociarse a estos polímeros (Scalbert *et al.*, 1985). Estos dos aspectos son importantes en el estudio de subproductos vegetales como fuente de ingredientes funcionales. Una desventaja de la presencia de lignina en una matriz vegetal sería que puede afectar la digestibilidad de otros compuestos, una ventaja es que podría ser utilizada como un vehículo de ácidos fenólicos con destino al intestino grueso.

Adicionalmente, la proteína resistente fue cuantificada como un componente de la FI, encontrándose en un 13.53%. La proteína que resiste el proceso de digestión constituye la principal fuente de nitrógeno para la microbiota, se estima que entre 3 y 9 g de proteína resistente alcanzan el intestino grueso diariamente, dependiendo de la forma física de la matriz alimentaria y del tipo de proteína que se consume (Chacko y Cummings, 1988). Los taninos forman complejos fácilmente con proteínas viéndose comprometida la digestibilidad de este nutriente. Lo cual no es del todo negativo ya que en modelos experimentales de úlcera gástrica, se ha demostrado que el complejo tanino-proteína promueve la reparación de tejidos y presenta efectos anti-*Helicobacter pylori* (de Jesus *et al.*, 2012).

Los compuestos inorgánicos, que permanecen en los residuos después de la digestión, también se cuantificaron como parte de la FI de la cáscara de aguacate. Los minerales (cenizas), probablemente se adhieren a la pared celular de los vegetales, después de la digestión enzimática (Saura-Calixto *et al.*, 2000). Por lo tanto, no serían absorbidos en el intestino delgado, la absorción de estos micronutrientes podría tener lugar en el colon después de la fermentación de polisacáridos de la pared celular. En la FI de la cáscara de aguacate, estos compuestos constituyen una pequeña fracción

(5.40%). Se ha reportado que los taninos interactúan con minerales divalentes, entonces esta podría ocasionar una mala absorción en el intestino delgado (Perron y Brumaghim, 2009).

Habitualmente, en las determinaciones actuales de compuestos no digeribles como fibra dietética el contenido de lignina, proteína y cenizas suelen restarse de la cuantificación. Sin embargo, hay evidencia científica sobre el hecho de que la fibra dietética sólo representa una parte de los sustratos que escapan de la acción de las enzimas digestivas en el intestino delgado (Saura-Calixto *et al.*, 2010; Rufino *et al.*, 2011). En este sentido, las metodologías actuales para la cuantificación de compuestos no digeribles, deberían actualizarse para estar acorde a los conceptos actuales. Es evidente, que los CF suelen asociarse a los distintos constituyentes de la matriz alimentaria. Específicamente, la FI de la cáscara de aguacate incluye componentes que suelen asociar distintos CF. Estos compuestos podrían liberarse en el intestino grueso y actuar como antioxidantes minimizando el estrés oxidativo que se produce en el colón. Estudios sobre interacciones de CF con macromoléculas, metabolismo de CF y fermentación colónica de este material vegetal, son necesarios para comprobar lo mencionado anteriormente.

### **Concentración de CF de la FI**

En el Cuadro 6 se observan los resultados del contenido fenólico de la FI soluble (sobrenadante de la digestión enzimática) e insoluble (residuo de la digestión enzimática). La concentración total de CF asociados a la FI fue 3.86% (fenoles totales+taninos hidrolizables y condensados) de la materia seca (3,854.81 mg/100 g) que representa el 63% del total encontrado en la cáscara (6.11%). En su mayoría, se encontraron CF de bajo peso molecular asociados principalmente a la fracción soluble (2,165.52±40.11 mg EAG/100 g ps). También, se encontró un alto contenido de taninos en su mayoría, hidrolizables (954.72±19.45). Esto indica que gran parte de los CF de la cáscara del aguacate no se liberan de la matriz alimentaria y podrían no ser absorbidos en el intestino delgado.

**Cuadro 6.** Contenido de fenoles totales y taninos determinados a partir de la fracción indigestible de la cáscara y después de la digestión gastro-intestinal *in vitro* (CF biaccesibles y no digeribles).

Muestra	Fenoles Totales (mg EAG/100 g ps)	Taninos hidrolizables (mg EAG/100 g ps)	Taninos condensados (mg EC/100 g ps)
Fracción indigestible			
Insoluble	492.85±4.94	954.72±19.45	250.72±7.12
Soluble	2,165.52±40.11	-	-
Fracción bioaccesible	2,006.49±34.59*	-	-

Valores como la media±la desviación estándar (n=3). EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; EC: Equivalentes de Cianidina; ps: peso seco, CF: Compuestos Fenólicos.\*Equivale al 33% de bioaccesibilidad.

Los valores obtenidos en la cuantificación de taninos de la FI fueron superiores a los encontrados en la cáscara liofilizada mediante extracción química. Se sabe que los CF que son liberados por la extracción e hidrólisis química pueden diferir de los liberados en el intestino humano (Arranz *et al.*, 2010); posiblemente, debido a que se trata de procedimientos que involucran distintos tratamientos de la muestra. Los taninos determinados en la cáscara fueron producto de una extracción mecánica con solventes acuosos-orgánicos e hidrólisis. La cuantificación de taninos en la FI consistió en someter la muestra a un tratamiento enzimático bajo condiciones fisiológicas y posteriormente se realizó la extracción acuosa-orgánica y la hidrólisis. No obstante, otras investigaciones utilizan el valor de CF cuantificado mediante extracción con solventes, como referencia para determinar la proporción de CF liberados de la matriz alimentaria bajo condiciones fisiológicas (Bouayed *et al.*, 2012; Hithamani y Srinivasan, 2014).

Son escasos los estudios que evalúan el contenido de CF que permanece en la FI. Rufino *et al.* (2011) reportaron que la FI de assaí (*Euterpe oleraceae*) contenía CF de bajo peso molecular a una concentración de  $1,120 \pm 130$  mg/100 g de ps en la fracción soluble y  $420 \pm 20$  mg/100 g de ps en la insoluble. Estos valores son menores a los obtenidos para la cáscara de aguacate donde los fenoles totales en la FI soluble e insoluble fueron de  $2,165.52 \pm 40.11$  y  $492.85 \pm 4.94$  mg EAG/100 g de ps, respectivamente. El contenido de taninos hidrolizables y condensados en assaí fue  $570 \pm 50$  y  $1,940 \pm 100$  mg/100 g ps, respectivamente. En la cáscara de aguacate, se encontró una concentración mayor de taninos hidrolizables ( $954.72 \pm 19.45$  mg EAG/100g de ps) y menor para taninos condensados ( $250.72 \pm 7.12$  mg EC/100 g de ps). Estos compuestos al estar asociados a la FI, podrían llegar intactos al colon convirtiéndose en sustratos fermentables para la microbiota. La fermentación de esos compuestos puede liberar metabolitos antioxidantes que posiblemente favorezcan la salud intestinal (Gonthier *et al.*, 2003; Cerdá *et al.*, 2005).

Los taninos presentan efectos benéficos para la salud, tales como anti-inflamatorio, anti-úlceras y efecto neuroprotector (Lü *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007; Nobre-Junior *et al.*, 2008). Además, los taninos que se obtienen de frutos son mucho más benéficos para la salud que aquellos extraídos de fuentes como resinas o cortezas de árbol, los cuales

pueden contener residuos tóxicos (Mennen *et al.*, 2005). No se encontraron estudios en la literatura sobre toxicidad de la cáscara de aguacate. En la medicina tradicional se utiliza comúnmente para el tratamiento de malestares estomacales, hasta el momento no hay registros sobre algún riesgo potencial para la salud tras la ingesta de compuestos derivados de la cáscara de aguacate. Lo anterior, propone un potencial de la cáscara de aguacate como fuente de compuestos relacionados con efectos protectores de la salud humana.

### **Actividad Antioxidante de la FI**

En el Cuadro 7 se pueden observar los resultados de actividad antioxidante de CF asociados a la FI soluble e insoluble de la cáscara de aguacate. En general, los CF de la FI mostraron alta actividad antioxidante, principalmente los taninos condensados. Éstos, presentaron alrededor del 60% de la actividad antioxidante total, seguido por los CF de bajo peso molecular (fenoles totales) y en menor medida, los taninos hidrolizables. Los CF de bajo peso molecular presentes en la FI soluble mostraron mayor actividad antioxidante por los tres métodos ensayados, respecto a los de la fracción insoluble. En el fruto de assaí se encontró que la actividad antioxidante (ensayo FRAP) de la FI soluble fue  $46.82 \pm 4.65$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$  (Rufino *et al.*, 2011). Mientras que los taninos hidrolizables y CF de bajo peso molecular de la fracción insoluble, mostraron una actividad antioxidante de  $11.64 \pm 0.84$  y  $11.91 \pm 0.92$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$ , respectivamente. En la cáscara de aguacate, la FI soluble mostró una actividad antioxidante medida por el mismo ensayo de  $68.79 \pm 4.29$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$ . En la FI insoluble, los taninos hidrolizables y condensados mostraron una actividad antioxidante de  $119.91 \pm 1.55$  y  $196.66 \pm 7.24$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$ , respectivamente.

Los CF de bajo peso molecular de la FI insoluble presentaron una actividad antioxidante equivalente a  $39.37 \pm 1.76$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$ . Los valores encontrados en la cáscara de aguacate son superiores a los reportados en el fruto de assaí, una fruta considerada fuente de fibra dietética antioxidante por el contenido de CF y actividad antioxidante asociada a compuestos no digeribles, como la fibra dietética. Saura-Calixto

**Cuadro 7.** Actividad antioxidante ( $\mu$ moles ET/g de ps) determinada a partir de extractos y sus residuos de la fracción indigestible de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' y de después de la digestión gastro-intestinal *in vitro* (CF bioaccesibles y no digeridos).

<b>Muestra</b>	<b>CF</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>	<b>FRAP</b>
Fracción indigestible				
Soluble	Fenoles totales	49.85 $\pm$ 0.95	52.37 $\pm$ 0.23	68.79 $\pm$ 4.29
Insoluble	Fenoles totales	33.24 $\pm$ 1.76	33.48 $\pm$ 1.80	39.37 $\pm$ 1.76
	Taninos hidrolizables	47.54 $\pm$ 0.69	44.92 $\pm$ 1.14	119.91 $\pm$ 1.55
	Taninos condensados	n.d.	106.39 $\pm$ 0.60	196.66 $\pm$ 7.24
Fracción bioaccesible	Fenoles Totales	33.92 $\pm$ 7.51	159.19 $\pm$ 11.71	108.72 $\pm$ 8.11

Valores como la media $\pm$ la desviación estándar (n=3). ET: Equivalentes Trolox, CF: Compuestos fenólicos.ps: peso seco, n.d.: no determinado.

(1998) propuso por primera vez el concepto de fibra dietética antioxidante, bajo los criterios de que 1 g de fibra debe tener capacidad antioxidante equivalente a al menos 200 mg de vitamina E. Otro criterio es que el contenido de fibra debe ser mayor que el 50% de la materia seca y dicha capacidad antioxidante debe ser intrínseca. Particularmente, la FI de la cáscara de aguacate concentra cantidades importantes de CF con actividad antioxidante intrínseca e incluso mayor a la reportada para una fruta a la cual se le ha atribuido este concepto. Por lo tanto, la cáscara de aguacate puede proponerse como fuente de fibra dietética antioxidante.

### Etapa 3: Bioaccesibilidad *in vitro* de los CF y Actividad Antioxidante

En el Cuadro 6 se reporta la concentración de CF bioaccesibles de la cáscara de aguacate determinados después de la digestión gastrointestinal *in vitro* con membrana de diálisis. La concentración de CF bioaccesibles (dializables) fue de  $2,006.49 \pm 34.59$  mg EAG/100 g de ps. Este valor fue utilizado para calcular el porcentaje de bioaccesibilidad (ecuación 5) que fue 33 % del contenido fenólico total. Esta fracción de CF puede liberarse de la matriz alimentaria por efecto de las condiciones químico-enzimáticas de la digestión, por lo tanto, se encuentran potencialmente disponibles para su absorción. La liberación de los CF a lo largo del tracto gastrointestinal, es crucial para la bioeficacia de los CF en el organismo (Porrini y Riso, 2008). No obstante, para su adecuado aprovechamiento, los CF bioaccesibles deben absorberse a nivel intestinal y estar presentes en el torrente sanguíneo, donde serán transportados a los distintos tejidos del cuerpo humano (D'Archivio *et al.*, 2010).

La bioaccesibilidad de CF en diferentes matrices vegetales ha sido el punto focal de investigaciones recientes, por ejemplo, en semillas de mijo se reportó el 25.5 % de bioaccesibilidad (Hithamani y Srinivasan, 2014) y en manzana 'Golden Delicious' el 21.60 % (Bouayed *et al.*, 2012). Estos valores son menores que el reportado para la cáscara de aguacate, estas diferencias pueden atribuirse a que los CF presentes en la cáscara de aguacate son más estables que los de semilla de mijo y manzana. Los

principales CF de la cáscara de aguacate son flavonoides, mientras que en las semillas de mijo y manzana son los taninos (5.93 mg/g) y ácidos hidroxicinámicos, respectivamente. Se ha reportado que algunos CF como epigallocatequina y taninos hidrolizables como penta-galoil glucosa son inestables a pH mayor a 7 (Krook y Hagerman, 2012). Además, Bouayed *et al.* (2012) reportaron que alrededor del 41-77% del ácido clorogénico bioaccesible, el ácido hidroxicinámico más abundante en las manzanas, se degradó durante la digestión intestinal, con isomerización parcial a ácido criptoclorogénico y ácido neoclorogénico. La digestión intestinal se lleva a cabo a un pH de 7.5; por lo tanto, es probable que los CF de semillas de mijo y manzana se degradaran durante esta etapa digestiva, viéndose comprometida la bioaccesibilidad de dichos compuestos.

En contraste, en pulpa y cáscara de mango 'Ataulfo', la bioaccesibilidad fue 56% (Velderrain-Rodríguez, 2013) y 40.53% (Blancas-Benítez, 2014), respectivamente. Éstos valores son superiores a los de la cáscara de aguacate, las diferencias pueden atribuirse a los constituyentes de la matriz alimentaria, uno de los principales factores involucrados en la liberación de los compuestos bioactivos presentes en los alimentos (Porrini y Riso, 2008). Particularmente, la cáscara de aguacate es rica en carbohidratos, lignina y proteína, éstas macromoléculas fueron prácticamente indigestibles bajo las condiciones químico-enzimáticas utilizadas en este estudio. La presencia de estos compuestos en la matriz analizada posiblemente fue el factor principal que limitó la liberación de CF y en consecuencia, la mayor parte de los CF de la cáscara de aguacate permanecieron asociados a la FI. Sin embargo, tanto los CF bioaccesibles como los que permanecen en la FI pueden ejercer algún efecto fisiológico en el organismo, teniendo esto en consideración, los estudios sobre caracterización de ingredientes funcionales deberían de considerar el contenido fenólico de la fracción bioaccesible e indigestible.

Por otra parte, la actividad antioxidante de la fracción de CF bioaccesibles de la cáscara de aguacate evaluada por los métodos DPPH, ABTS y FRAP se muestra en el Cuadro 7. Los valores obtenidos fueron:  $33.92 \pm 7.51$ ,  $159.19 \pm 11.71$  y  $108.72 \pm 8.11$   $\mu\text{moles ET/g de ps}$  para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Los resultados de actividad antioxidante de CF bioaccesibles suelen ser muy diferentes entre un método y otro. Esto, debido a los diferentes mecanismos antioxidantes en los que se basa cada

método analítico, ya sea transferencia de átomos de hidrogeno o transferencia de electrones (Prior *et al.*, 2005). De hecho, se ha sugerido que el método FRAP es más adecuado para la medición de capacidad antioxidante en digestión gástrica debido a que la reacción es favorecida en medio ácido; mientras que ABTS, resulta una técnica más adecuada para la medición de la capacidad antioxidante a nivel intestinal por el pH alcalino del medio (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

La actividad antioxidante medida por los tres métodos fue inferior a la que presentaron los CF de la FI. En primera instancia, este resultado puede atribuirse a que la concentración de CF de la FI fue superior respecto a la fracción de CF bioaccesibles. Se ha reportado que la actividad antioxidante de los CF depende de su concentración, de su estructura y del tipo de interacciones que puedan tener entre ellos ya sean sinérgicas, aditivas o antagónicas (Palafox-Carlos *et al.*, 2012). Por lo tanto, es probable que alguno de estos factores haya influido en los valores de actividad antioxidante obtenidos. Además, una menor actividad antioxidante de los CF bioaccesibles podría atribuirse a los cambios de pH durante la transición de la etapa gástrica a la etapa intestinal que podrían ocasionar cambios en las moléculas fenólicas, afectar su estabilidad y en consecuencia las propiedades antioxidantes.

## CONCLUSIÓN

La cáscara de aguacate cv. 'Hass' constituye una fuente natural para obtener extractos ricos en CF con actividad antioxidante. La mayor proporción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, se encontró en la fracción indigestible y sólo el 33% del contenido fenólico fue bioaccesible, lo cual corrobora la hipótesis de nuestro trabajo. Los principales constituyentes de la fracción indigestible fueron polisacáridos no amiláceos, lignina y proteína resistente. A esta porción no digerible de la cáscara de aguacate se asocian principalmente CF de bajo peso molecular, sin embargo, los taninos presentaron una mayor actividad antioxidante. Esto sugiere el potencial de la cáscara de aguacate cv. 'Hass' como ingrediente funcional o fuente de antioxidantes, para el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos, que promuevan beneficios a la salud intestinal del consumidor.

## RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio donde la cáscara de aguacate presentó alto contenido de CF y actividad antioxidante tanto en la matriz natural como en la fracción indigestible. Será importante realizar un análisis cualitativo y cuantitativo del perfil fenólico por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS). Además, estudios sobre interacciones de estos compuestos con macromoléculas por espectroscopía infrarroja, metabolismo de CF y fermentación colónica de este material vegetal ya sea *in vivo* o *in vitro*, serán cruciales para el pleno esclarecimiento de la bioeficacia de estos compuestos. La información obtenida servirá como punto de partida para definir la utilización adecuada de la cáscara de aguacate en aplicaciones alimentarias o farmacéuticas. El desarrollo y evaluación de cápsulas comprimidas de liofilizados de cáscara de aguacate y en combinación con pulpa, es un enfoque interesante para dar el primer paso en cuanto al aprovechamiento de los compuestos bioactivos de este subproducto en el desarrollo de suplementos alimenticios.

## REFERENCIAS

- Ahmed, A. E. y Labavitch, J. M. (1978). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*, 1(4), 361-365.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G. y Rao, U. J. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982-988.
- Alamed, J., Chaityasit, W., McClements, D. J. y Decker, E. A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976.
- AOAC. (1990). "Association of Official Agricultural Chemistry. Official Methods of Analysis of the AOAC." 12th. De Washington D.C.U.S.A.
- Arranz, S., Manuel Silvan, J. y Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11), 1646-1658.
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S. y Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298-7303.
- Arranz, S., Silván, J., M y Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the spanish diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11), 1646-1658.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E., *et al.* (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G. y Goñi, I. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 210-216.
- 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.
- Bialonska, D., Kasimsetty, S. G., Khan, S. I. y Ferreira, D. (2009). Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 57(21), 10181-10186.

- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. y Stone, B. A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113(2), 291-299.
- Blancas-Benítez, F. J. (2013). Estudio de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos asociados a la fibra dietética en subproductos (pasta y cáscara) de mango (*Mangifera indica* L.) 'Ataulfo'. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Tepic.
- Bordenave, N., Hamaker, B. R. y Ferruzzi, M. G. (2014). Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food & Function*, 5(1), 18-34.
- Bouayed, J., Deuber, H., Hoffmann, L. y Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466-1472.
- 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.
- Boyer, J. y Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(5), 12.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. L. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bressani, R., Rodas, B. y Ruiz, A. S. (2009). La composición química, capacidad antioxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de aguacate. *Tegucigalpa (Guatemala): Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología-FONACYT, Universidad del Valle de Guatemala-UVG*.
- Buitrago, J. A. 1990. La yuca en la alimentación animal. *CIAT*, Cali, Colombia. 80 p.
- Cala, O., Pinaud, N., Simon, C., Fouquet, E., Laguerre, M., Dufourc, E. J. y Pianet, I. (2010). NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *The FASEB Journal*, 24(11), 4281-4290.
- Cerdá, B., Periago, P., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. (2005). Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5571-5576.
- Cerezal, P. y Duarte, G. (2005). Utilización de cáscaras en la elaboración de productos concentrados de tuna (*Opuntia ficus-índica* L. Miller). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 61-83.
- Cerezal, P., Larrauri, J. A. y Piñera, R.-M. (1995). Influencia de factores en el aprovechamiento de subproductos de la industria de frutas y vegetales en Cuba. *Alimentaria* (268), 101-105.
- Chavan, U. D., Shahidi, F., y Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75(4), 509-512.

- Chacko, A. y Cummings, J. H. (1988). Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut*, 29(6), 809-815.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E. y García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053.
- Cuomo, J. y Rabovskiy, A. B. (2002). "Antioxidant compositions extracted from olives and olive by-products", US 6358542 B2, Marzo 19, 2002.
- CONAPA. (2010). *Memorias del tercer congreso del sistema producto aguacate*. Recuperado el 10 abril de 2013, de <http://www.productoresdeaguacate.com/eventos.php>.
- D'Abrosca, B., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C. y Fiorentino, A. (2007). 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104(4), 1333-1337.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B. y Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1321-1342.
- Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C. y Larson, E. B. (2006). Fruit and vegetable juices and alzheimer's disease: The kame project. *The American Journal of Medicine*, 119(9), 751-759.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U. y Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 49(2), 173-183.
- de Jesus, N. Z., Falcão, H. S., Gomes, I. F., Leite, T. J., Lima, G. R., Barbosa-Filho, J. M., Tavares, J. F., *et al.* (2012). Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3203-3228.
- Del Caro, A. y Piga, A. (2008). Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars (*Ficus carica* L.). *European Food Research and Technology*, 226(4), 715-719.
- Ding, H., Han, C., Guo, D., Chin, Y., Ding, Y., Kinghorn, A. y D'Ambrosio, S. M. (2009). Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nutrition and cancer*, 61(3), 348-356.
- Dreher, M. y Davenport, A. (2013). 'Hass' avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 738-750.
- Drogoudi, P. D., Michailidis, Z. y Pantelidis, G. (2008). Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 115(2), 149-153.
- Eyres, L., Sherpa, N. y Hendriks, G. (2001). Avocado oil: a new edible oil from Australasia. *Lipid Technologies*, 13(4), 84-88.
- Fine, A. M. (2000). Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 5(2), 144-151.

- Gee, J. M. y Johnson, I. T. (2001). Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8(11), 1245-1255.
- Ghaffar, S. H. y Fan, M. (2013). Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57(0), 264-279.
- Ginés, J. M., Bravo, E. M., Moreno, M., Carrasco, M. T. y Santos, B. C. (2008). Obtención de ingredientes funcionales a partir de subproductos. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*(398), 76-79.
- Golukcu, M. y Ozdemir, F. (2010). Changes in phenolic composition of avocado cultivars during harvesting time. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(1), 112-115.
- Gonthier, M. P., Donovan, J. L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C. y Scalbert, A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(8), 837-844.
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M., 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.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspi, A., *et al.* (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3), 309-315.
- Goulao, L. F. y Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 4-25.
- Grajales-Lagunes, A., Garcia-Galindo, H. S., Angulo-Guerrero, O. y Monroy-Rivera, J. A. (1999). Stability and sensory quality of spray dried avocado paste. *Drying Technology*, 17(1-2), 318-326.
- Grünewald, T. y Beal, M. F. (1999). Bioenergetics in huntington's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 203-213.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., *et al.* (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 613-617.
- Guzmán-Gerónimo, R. I., López, M. G. y Dorantes-Alvarez, L. (2008). Microwave processing of avocado: Volatile flavor profiling and olfactometry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 501-506.
- Happi Emaga, T., Andrianaivo, R. H., Wathelet, B., Tchango, J. T. y Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry*, 103(2), 590-600.
- 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.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A. y Ibanez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511.
- Hirasawa, M., Shimura, K., Shimizu, A., Mura, K., Tokue, C. y Arai, S. (2008). Quantification and functional analysis of dietary fiber and polyphenols in

- avocado (*Persea americana*). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 55.
- Hithamani, G. y Srinivasan, K. (2014). Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 164, 55-62.
- Hooper, L. y Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1805-1813.
- IUPAC. (1979). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. *Oxford: Pergamon Press*.
- Jacobo-Velázquez, D. A. y Hernández-Brenes, C. (2011). Sensory shelf-life limiting factor of high hydrostatic pressure processed avocado paste. *Journal of Food Science*, 76(6), S388-S395.
- Jung, H. G. (1989). Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*, 81(1), 33-38.
- Kamiloglu, S. y Capanoglu, E. (2013). Investigating the *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 48(12), 2621-2629.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J. O., Dommes, J. y Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8596-8603.
- 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.
- Krook, M. A. y Hagerman, A. E. (2012). Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International*, 49(1), 112-116.
- Larrauri, G. J. y Saura-Calixto, F. D. (1999). "Concentrate of natural antioxidant dietetic fiber from grape, and preparation process", WO 1999025209 A1, Mayo 27, 1999.
- Lee, J., Koo, N. y Min, D. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33.
- León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Barradas, M. C. y Martín-Cordero, C. (2013). Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 58-63.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. y Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78(s1), A18-A25.
- Lü, L., Liu, S. W., Jiang, S. B. y Wu, S. W. (2004). Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41. *Acta Pharmacol Sin*, 25(2), 213-218.

- Machmudah, S., Zakaria, Winardi, S., Sasaki, M., Goto, M., Kusumoto, N. y Hayakawa, K. (2012). Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 290-296.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. y Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- Mandalari, G., Bisignano, C., Filocamo, A., Chessa, S., Sarò, M., Torre, G., Faulks, R. M., *et al.* (2013). Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. *Nutrition*, 29(1), 338-344.
- Mann, D. G. (2002). "Infused vegetable, herb, and/or seed fiber product and dietary supplements containing same", US 6440467 B2, Agosto 27, 2002.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. y Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C. y Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 326S-329S.
- Nakamura, A. F., Yoshida, R. F., Maeda, H. F. y Nagaoka, S. F. (2008). "Cacao-origin water soluble dietary fiber, process for producing the same, foods and drinks with the use thereof and process for producing the same", EP 1352570 B1, Febrero 20, 2008.
- Nobre-Junior, H. V., Maia, F. D., de Oliveira, R. A., Bandeira, M. A., do Ó Pessoa, C., Moraes, M. O., Cunha, G. M., *et al.* (2008). Neuroprotective actions of tannins from myracrodruon urundeuva on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(2), 41-57.
- 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.
- Olaeta, J. A. (2003). *Industrialización del aguacate: estado actual y perspectivas futuras*. Paper presented at the Actas V Congreso Mundial del Aguacate.
- Ozdemir, F. y Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, 86(1), 79-83.
- 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), R6-R15.
- Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., y González-Aguilar, G. A. (2012). Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*, 17(11), 12657-12664.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M. y González-Aguilar, G. A. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135(1), 105-111.

- Pan, M. H., Lai, C. S. y Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 1(1), 15-31.
- Pascual-Teresa, S. y Sanchez-Ballesta, M. T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 281-299.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., *et al.* (2008). Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*, 24(7-8), 646-653.
- Perron, N. y Brumaghim, J. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100.
- Porrini, M. y Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647-650.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- 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), 1231-1237.
- Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1516-1528.
- Reed, J. D., McDowell, R. T., Van Soest, P. J. y Horvath, P. R. (1982). Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(3), 213-220.
- Reiter, W. D., Chapple, C. C. y Somerville, C. R. (1993). Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science-New York Then Washintong*, 261, 1032-1032.
- Ribeiro, S. M., Barbosa, L. C., Queiroz, J. H., Knoedler, M. y Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110(3), 620-626.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P. y Estévez, M. (2011a). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D. y Estévez, M. (2011b). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89(2), 166-173.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P. y Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212.
- Rufino, M. S., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S. y Saura-Calixto, F. (2011). Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, 44(7), 2100-2106.
- SAGARPA. (2011). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. Recuperado el 3 de marzo de 2014, de <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.

- SAGARPA. (2013). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. Recuperado el 18 de agosto de 2014, de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. y Borderías, A. J. (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*, 101(1), 372-378.
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A. y Sánchez-Vioque, R. (2012). Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 447-466.
- Santos, L. P., Morais, D. R., Souza, N. E., Cottica, S. M., Boroski, M. y Visentainer, J. V. (2011). Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. *Food Research International*, 44(5), 1414-1418.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303-4306.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49.
- 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.
- Saura-Calixto, F., Garcia-Alonso, A., Goni, I. y Bravo, L. (2000). *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., & Goñi, I. (2014). By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(5), 898-904.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J. Y., Guittet, E. y Rolando, C. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, 24(6), 1359-1362.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. y Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. y Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 21-40.
- Selma, M. V., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M. y Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S310-S329.

- Shim, S., Ferruzzi, M., Kim, Y., Janle, E. y Santerre, C. (2009). Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, 112(1), 46-50.
- Singh, P. P. y Saldaña, M. D. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44(8), 2452-2458.
- 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.
- Southgate, D. A. (1969). Determination of carbohydrates in foods II. Unavailable carbohydrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(6), 331-335.
- Souza, S. M., Aquino, L. C., Jr, A. C., Bandeira, M. A., Nobre, M. E. y Viana, G. S. (2007). Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from myracrodruon urundeuva allemão (*Anacardiaceae*) in rodents. *Phytotherapy Research*, 21(3), 220-225.
- Tagliacuzzi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. y Conte, A. (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Terasawa, N., Sakakibara, M. y Murata, M. (2006). Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. *Food Science and Technology Research*, 12(1), 55-58.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. y Boerjan, W. (2008). Lignin engineering. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 278-285.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., *et al.* (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function*, 5(2), 189-197.
- Velderrain-Rodríguez, G. R. (2013). Efecto de la fibra dietaria en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de frutos tropicales durante un modelo de digestión *in vitro*. Tesis de Maestría, CIAD, AC.
- Vieira, F. G., Borges, G. S., Copetti, C., Di Pietro, P. F., Nunes, E. C. y Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 261-266.
- Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivás, 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.
- Vitaglione, P., Napolitano, A. y Fogliano, V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 451-463.
- Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T. y Lovatt, C. J. (2012). Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in 'Hass' avocado during storage. *Food Chemistry*, 135(2), 694-698.
- Wang, 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.
- Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A. y Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235-243.

- Yahia, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In L. A. de la Rosa, E. Alvarez-Parilla & G. Gonzalez-Aguilar (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional and stability* (pp. 3–52): Wiley-Blackwell.
- Yatcilla, M. T. y Gluck, G. (2007). "Food products and dietary supplements containing phenolated proteins and process for preparing the same", US 7226626 B2, Junio 5, 2007.
- Yedidia, I., Lipsky, A., Golan, A., Yishay, M., Ion, A. y Luzzatto, T. (2008). Polyphenols induction in the defense response of calla lily towards *Pectobacterium carotovorum*. Paper presented at the X International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials 886.
- Zúñiga, H. M., Poirrier, G. P. y Soto, M. C. (2013). "Commercial process for the recovery of phenolic compounds with antioxidant capacity from waste from the berry-processing industry", WO 2013171545 A1, Noviembre 21, 2013.