



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

---

---



**“EVALUACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO Y SU CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE AGUACATE CRIOLLO  
(*PERSEA AMERICANA* VAR. *DRYMIFOLIA*) OBTENIDOS MEDIANTE  
ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD”**

**TESIS PROFESIONAL**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**LICENCIADA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**  
**ARANZAZÚ SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

**ASESORA DE TESIS:**  
**DRA. EDITH CORONA JIMÉNEZ**

**CO-ASESOR DE TESIS:**  
**DR. IRVING ISRAEL RUÍZ LÓPEZ**

**AGOSTO 2016. PUEBLA, PUE.**

# AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por siempre apoyarme y estar ahí cuando mas lo he necesitado. A mis padres Fabio y Olivia, por su cariño y por ser parte fundamental en este logro alcanzado. A mis hermanos por inspirarme a concluir mis metas y por darme momentos de alegría. A Franco, por ser mi compañero día con día, por su cariño y comprensión en cada momento. A mis amigos, Pamela, Arturo, Alma, Jesús, Salvador y Valeria, por apoyarme y animarme siempre que lo necesite.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Cuerpo Académico Consolidado “Innovación en Tecnología para el Desarrollo de Procesos Alimenticios”, debido a que la presente tesis se desarrolló dentro de sus instalaciones, así como por el otorgamiento de una beca, bajo el marco del Plan de Trabajo del Cuerpo Académico 2015.

A la Secretaria de Educación Pública (SEP) por la financiación a la investigación, dentro del “Programa para el Desarrollo Profesional Docente” (PRODEP) con número de referencia BUAP-PTC-369, del cual la Dra. Edith Corona Jiménez es beneficiaria.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por el apoyo económico brindado para la adquisición del material utilizado en el desarrollo del presente trabajo, dentro del “Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos”, con clave del proyecto COJE-ING16-I, el cual está bajo la dirección de la Dra. Edith Corona Jiménez.

A mi asesora de tesis, la Dra. Edith Corona Jiménez, por guiarme en cada etapa del proyecto y por su confianza depositada.

A mi co-asesor, el Dr. Irving Israel Ruíz López, por su asesoría para el desarrollo integral del proyecto.

A los miembros del jurado, el Dr. Francisco Manuel Pacheco Aguirre y el Dr. Álvaro Sampieri Croda, por sus valiosas contribuciones y por tomarse el tiempo para evaluar este trabajo.

Al Dr. Henry Váquiro Herrera por aportar sus grandes conocimientos en el desarrollo de este proyecto.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	2
<b>I ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
1.1 Aguacate (generalidades)	3
1.2 Composición del aguacate	4
1.2.1 Compuestos volátiles presentes en la hoja de aguacate criollo ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> )	5
1.3 Antioxidantes	7
1.3.1 Capacidad antioxidante (CA)	9
1.3.2 Determinación de capacidad antioxidante	9
1.3.2.1 FRAP (Ferric Reducing Ability Power)	10
1.3.2.2 ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina) -6- sulfónico)	10
1.4 Compuestos fenólicos	11
1.4.1 Estilbenos y lignanos	11
1.4.2 Taninos	12
1.4.3 Ácidos fenólicos	12
1.4.4 Flavonoides	13
1.5 Proceso de lixiviación	15

1.5.1	Métodos de extracción de compuestos fenólicos . . . . .	15
1.5.1.1	Técnicas de extracción convencionales . . . . .	16
1.5.1.2	Técnicas de extracción no convencionales (tecnologías emergentes) . . . . .	17
1.5.2	Variables de extracción . . . . .	18
1.5.3	Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos . . . . .	19
1.6	Ultrasonido . . . . .	20
1.6.1	Generalidades . . . . .	20
1.6.2	Clasificación del ultrasonido . . . . .	20
1.6.2.1	Ultrasonido de señal (100kHz-10MHz) . . . . .	21
1.6.2.2	Ultrasonido de alta intensidad (20-100 KHz) . . . . .	21
1.7	Ultrasonido de alta intensidad . . . . .	22
1.7.1	Fenómeno de cavitación acústica . . . . .	23
1.7.2	Parámetros ultrasónicos . . . . .	25
1.7.2.1	Amplitud (%) . . . . .	25
1.7.2.2	Longitud de onda ( <i>cm</i> ) . . . . .	25
1.7.2.3	Frecuencia (Hz) . . . . .	25
1.7.2.4	Potencia (W) . . . . .	26
1.7.2.5	Intensidad ( $W/cm^2$ ) . . . . .	26
1.7.3	Extracción de compuestos fenólicos asistida con ultrasonido . . . . .	26
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1	Objetivo general . . . . .	28
2.2	Objetivos específicos . . . . .	28
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1	Materia prima . . . . .	31
3.1.1	Caracterización de la materia prima . . . . .	31
3.1.2	Preparación de la materia prima . . . . .	32
3.2	Procesos de extracción . . . . .	32
3.2.1	Método de extracción convencional por agitación (ECV) . . . . .	32
3.2.2	Método de extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad (EAU) . . . . .	32
3.3	Cuantificación total de compuestos fenólicos (CFT) . . . . .	36

3.4	Determinación de la capacidad antioxidante (CA) . . . . .	36
3.4.1	FRAP (Ferric-Reducing Ability Power) . . . . .	36
3.4.2	ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) . . . . .	37
3.5	Modelación y optimización . . . . .	38
3.6	Análisis estadístico . . . . .	38
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
4.1	Caracterización de la materia prima . . . . .	39
4.2	Procesos de extracción . . . . .	40
4.2.1	Cuantificación total de compuestos fenólicos (CFT) . . . . .	40
4.2.2	Determinación de la capacidad antioxidante (CA) . . . . .	43
4.2.3	Correlación de Pearson entre el CFT y la CA (FRAP y ABTS) . . . . .	48
4.3	Modelación y optimización . . . . .	50
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>57</b>
5.1	Conclusiones . . . . .	57
5.2	Recomendaciones . . . . .	58
<b>ANEXO I</b>		<b>67</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill). . . . .	3
1.2	Estructura química del resveratrol (Ignat, Volf, y Popa, 2011). . . . .	12
1.3	Estructura química de los ácidos fenólicos. A) Ácido hidroxybenzoico y B) Ácido hidroxycinámico (Khoddami, Wilkes, y Roberts, 2013). . .	13
1.4	Estructura química de un flavonoide (Ignat y cols., 2011). . . . .	14
1.5	Clasificación del ultrasonido en función a su frecuencia. . . . .	21
1.6	Crecimiento y colapso de las burbujas de cavitación en la fase líquida.	24
3.1	Plan de trabajo. . . . .	30
3.2	Equipo-baño ultrasónico . . . . .	34
3.3	Representación esquemática de la posición de los tubos de ensaye en el baño ultrasónico. . . . .	35
4.1	Evolución del contenido fenólico total de los extractos de hoja de aguacate criollo ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ). Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). . . . .	40
4.2	Evolución de la capacidad antioxidante de los extractos de hoja de aguacate criollo ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ) mediante la técnica de FRAP (A) y ABTS (B). Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). 43	43
4.3	Correlación de Pearson entre FRAP y ABTS. $r=0.734$ ( $p < 0.05$ ). Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). . . . .	48
4.4	Correlación entre las variables de respuesta ( $p < 0.05$ ): capacidad antioxidante (A; FRAP y B; ABTS) y contenido fenólico total. Valor promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). . . . .	50
4.5	Superficie de respuesta del CFT sobre los efectos de la amplitud y el tiempo de aplicación de ultrasonido. . . . .	51
4.6	Gráfico de contorno equivalente a la SR de la Figura 4.5. . . . .	51

4.7	Ajuste del modelo matemático sobre los datos del CFT (experimentales y estimados). . . . .	53
4.8	Superficie de respuesta de la CA (ABTS) sobre los efectos de la amplitud y el tiempo de aplicación de ultrasonido. . . . .	54
4.9	Gráfico de contorno equivalente a la SR de la Figura 4.8. . . . .	54
4.10	Ajuste del modelo matemático sobre los datos de la CA (experimentales y estimados). . . . .	55

# ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Composición química del aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill) por cada 100g de fruto fresco (Gramshaw y Sinyinda, 1998). . . . .	5
1.2	Compuestos volátiles en la hoja de aguacate criollo ( <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ). . . . .	6
1.3	Estudios de la extracción de compuestos fenólicos con ultrasonido de alta intensidad en materiales vegetales. . . . .	27
3.1	Variables del proceso de extracción. . . . .	29
4.1	Caracterización físico-química de la hoja de aguacate criollo. Valores promedio $\pm$ desviación estándar (n=3) . . . . .	39
4.2	Coefficientes del modelo matemático del CFT. . . . .	52
4.3	Coefficientes del modelo matemático de la CA. . . . .	55

# RESUMEN

El presente trabajo fue diseñado para modelar y optimizar la extracción asistida con ultrasonido de hojas del aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) con el fin de obtener un rendimiento máximo en el contenido fenólico total (CFT) y su capacidad antioxidante (CA). Para ese propósito, las extracciones se llevaron a cabo colocando el polvo de las hojas de aguacate y una solución de etanol (80 % v/v) como disolvente en una relación 1:20 (p/v) a una temperatura de 25°C. Para las extracciones asistidas con ultrasonido (EAU) se utilizaron dos amplitudes (60 y 100 %) y para la extracción convencional (ECV) se agitó la muestra constantemente (1000 rpm), ambas extracciones se realizaron a diferentes tiempos (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 y 60 min). Posteriormente, el CFT fue determinado para cada extracto con el método de Folin-Ciocalteu y la CA por medio de FRAP y ABTS. La extracción asistida con ultrasonido (EAU) fue modelada y optimizada por medio de una regresión escalonada, usando los tiempos de extracción y la potencia eléctrica como variables independientes y como variables de respuesta el CFT y la CA. El máximo valor para CFT (10009 mg GAE / 100 g m.s.) fue encontrado con 0 % de energía suministrada y 60 minutos de extracción; sin embargo, las óptimas condiciones para la CA fueron con 79 % de energía suministrada y 36 minutos de extracción (22294 mg TROLOX / 100 g m.s.). La aplicación de ultrasonido aumentó el rendimiento, aunque cuando éste se compara con la ECV se hace notar que sólo sucede a determinadas condiciones. En las cinéticas de EAU para CFT y CA, se puede notar que posterior a los 30 minutos de extracción las curvas muestran una disminución en comparación a la ECV, lo cual se le puede atribuir a las reacciones químicas inducidas por el fenómeno de cavitación acústica que puede llegar a degradar los compuestos fenólicos.

Los modelos obtenidos a partir de las superficies de respuesta (SR) representan más del 78 % de variación en comparación a los datos experimentales, obteniendo en promedio una desviación de 4.7 % de los valores reales.

La EAU en comparación a la ECV, puede considerarse como una técnica más eficiente debido a que se llega a acortar considerablemente el tiempo de extracción por lo que, es una alternativa para mejorar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*).

# ABSTRACT

The present study was designed to model and optimize the ultrasonic-assisted extraction process with the aim of getting the maximum yield of total phenolic compounds (TPC) and their antioxidant activity (AA) from avocado (*Persea Americana* var. *drymifolia*) leaves, which is a traditional Mexican fruit. For that purpose, the extractions of phenolic compounds were carried out using an ethanol-water solution (80 % v/v) at 25 °C and powder of avocado leaves. Extractions were carried out with ultrasound (USE) at two different electric powers (60 % and 100 %) and with agitation as the conventional extraction (CE) (1000 rpm) at different extraction times (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 and 60 min). After, TPC and the AA were determined for each extract by Folin-Ciocalteu and TEAC methods, respectively. Ultrasonic-assisted extraction was modeled and optimized by using stepwise regression (SR), using the extraction times and electric powers as factors and the TFC and AA as responses. The highest values of TFC (10009 mg GAE / 100 g d.m.) were reached at 0% of electric power and 60 min; however, the optimal conditions obtained for the AA were at 79 % of electric power and 36 min (22294 mg TROLOX / 100 g d.m.) of extraction. In spite of that the USE appears to increase the yield, this one only able at certain conditions of electric power and time, when this is compared with the CE. This fact could be related with the behavior of the ultrasonic assisted-extraction kinetics of TFC and their AA after 30 min, where the curves showed a decrease in comparison with the CE, it could be due to the chemical reactions induced by the cavitation phenomenon which degrades the phenolic compounds. Models obtained by SR were able to represent more than 78 % of the variation of all experimental data with estimates deviated on average 4.7 % from the real values. Compared to CE, the USE under certain conditions, can be considered a more efficient procedure, because it shortened the treatment time what could be considered an interesting alternative to improve the extraction process of phenolic compounds from Mexican avocado leaves (*Persea americana* var. *drymifolia*).

# INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha mostrado mayor interés por los antioxidantes naturales, particularmente los obtenidos por frutos y vegetales. Ésto se debe a que actuales estudios han demostrado que un consumo frecuente de estos compuestos bioactivos está asociado con la reducción para contraer enfermedades crónico-degenerativas como las cardiovasculares, cáncer, diabetes, arterosclerosis, entre otras (Noura, Trandafir, y Cosmulescu, 2014). Dichos compuestos han incrementado su demanda al ser aplicados en industrias como la alimenticia, cosmética y farmacéutica. Especialmente, materiales vegetales como lo son las hojas de *Persea americana* var. *drymifolia* que pueden ser utilizados para dar un valor agregado a gran cantidad de productos con beneficios saludables. Por lo que, se han desarrollado diversas investigaciones sobre su extracción para después ser aplicados a alimentos funcionales (Ojito Ramos, Herrera Sánchez, Vega Pérez, y Portal Villafaña, 2012).

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizada para el aislamiento de compuestos fenólicos de origen vegetal (Ignat y cols., 2011). Dicha extracción consta de dos etapas principales, en la primera se produce una rápida transferencia del compuesto deseado desde la superficie del sólido al disolvente y en una segunda etapa de transferencia desde el interior del sólido mediante difusión (Martínez Ramos, 2015). Sin embargo, existe una resistencia natural de la estructura de la planta hacia la penetración del disolvente que hace una extracción convencional inadecuada, debido al tiempo que ésta requiere.

Es por ello que se ha buscado una alternativa para obtener mayor eficiencia en el proceso de extracción, es así como las extracciones no convencionales o tecnologías emergentes han surgido. Tal es el caso de la extracción asistida con microondas, la extracción con fluidos supercríticos y por último la extracción asistida con ultrasonido. Dichas nuevas tecnologías se han caracterizado por disminuir el tiempo de extracción, el consumo de disolvente y el impacto económico (Dahmoune y cols., 2014; Talhaoui, Taamalli, Gómez Caravaca, Fernández Gutiérrez, y Segura Carretero, 2015).

Dentro de las tecnologías mencionadas, la extracción asistida con ultrasonido ha sido muy utilizada por su fácil operación y su gran eficiencia debido al fenómeno

de cavitación acústica, el cual es inducido por los mismos. La cavitación acústica consiste en la formación, crecimiento y colapso implosivo de micro-burbujas inmersas en la fase líquida (González Centeno, Comas Serra, Femenia, Rosselló, y Simal, 2014), el cual es capaz de acelerar la transferencia de masa entre el material vegetal y el disolvente. Sin embargo, además de los efectos positivos que se pueden tener sobre los compuestos fenólicos por la aplicación de ultrasonido también se pueden tener efectos negativos. Un efecto que contrarresta la aplicación de ultrasonido es la sonólisis, la cual es la formación de radicales libres ( $H^{\cdot}$  y  $OH^{\cdot}$ ) (Ulloa, Rosas Ulloa, Ramírez Ramírez, y Ulloa Rangel, 2013), debido a la disociación del agua y del disolvente, dichos radicales pueden ser capaces de cambiar la estructura de los compuestos como también de degradarlos.

No obstante, numerosas investigaciones han reportado resultados positivos sobre la aplicación de ultrasonido. Cada investigación ha determinado sus propias condiciones de operación como lo es el tipo de disolvente, tiempo de extracción, temperatura, potencia y amplitud (%), como también la fuente de donde son extraídos. Es por ello que, el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones y encontrar la mejor combinación de las variables del proceso para la extracción de los compuestos de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), obteniendo así eficiencia y mayor cantidad de compuestos posibles.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1. Aguacate (generalidades)

El aguacate (*Persea americana* Mill) (Figura 1.1) pertenece a la familia Lauraceae, compuesta por una variedad de árboles tropicales y subtropicales (Gramshaw y Sinyinda, 1998). Es originario de las áreas montañosas del centro y este de México, y de partes altas de Guatemala, de donde se ha llevado al resto del mundo (Torres Gurreola, Montes Hernández, y Espinosa García, 2009).



Figura 1.1. Aguacate (*Persea americana* Mill).

Por muchos años el aguacate ha sido un fruto muy popular en Centro América, debido a su alto valor nutricional (aceites esenciales) y su bajo contenido en azúcar. El aguacate es un fruto atractivo hacia los consumidores por su aroma, sabor, color, textura y sus beneficios hacia la salud. Contiene más proteína y potasio que otros frutos, además de compuestos con capacidades antioxidantes como lo son los fenoles, el ácido ascórbico, la vitamina E y los carotenoides (Wang, Zheng, Khuong, y Lovatt, 2016).

El árbol de aguacate puede alcanzar una altura hasta de 20 metros, sin embargo, cuando se cultiva no se deja crecer más de 5 metros para facilitar la cosecha. Es de tronco grueso y tiene hojas alargadas que terminan en punta en la parte alta del tronco. El fruto de aguacate es una drupa, en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro.

Se conocen tres razas de aguacate: Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis*) y Antillana (*Persea americana* var.

*americana*) (Alcaraz, Thorp, y Hormaza, 2013). Cada variedad se caracteriza por su tamaño y forma del fruto, textura y color de la cáscara, tamaño de la semilla y maduración del fruto, entre otras diferencias.

Actualmente, debido a las hibridaciones entre las tres razas del fruto, se han generado más variedades del mismo tal como lo son los cultivares modernos como Fuerte, Hass, Zutano y Bacon, en donde el Hass es el que predomina en la industria aguacatera y el más popular en el mercado internacional (Wang y cols., 2016).

*Persea americana* var. *drymifolia* en forma silvestre se encuentra en bosques mesófilos de montaña y Lauraceas cuyo estado de conservación es muy precario, y la superficie original ha disminuido por apertura de nuevas áreas a la agricultura y la ganadería, sobrepastoreo, incendios forestales, avance de las áreas urbanas y explotación maderera (Torres Gurrola y cols., 2009).

La var. *drymifolia* es rica en metabolitos secundarios antagónicos contra hervívoros y patógenos, particularmente los terpenoides y fenilpropanoides de los aceites esenciales foliares (hojas). En el género *Persea*, el fenilpropanoide estragol ha servido como marcador taxonómico para distinguir la variedad mexicana de otras variedades y para la identificación de híbridos (Rincón Hernández, Sánchez Pérez, y Espinosa García, 2011). Esta variedad se caracteriza por presentar un ciclo temprano de madurez fisiológica, lo cual permite que su producción se concentre en un periodo relativamente corto (Acosta Díaz, Hernández Torres, León, y Humberto, 2012).

## 1.2. Composición del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto muy consumido, como se ha mencionado, debido a su gran sabor y su alto valor nutricional. La composición varía de acuerdo a la variedad, origen y estado de madurez entre otras condiciones. Se ha indicado que el consumo de aguacate tiene efectos sobre la salud por la eliminación del colesterol de baja densidad por su alto contenido de vitamina A y de esteroides (Bressani, Rodas, y Ruiz, 2009). En la Tabla 1.1 se puede observar la composición química del aguacate.

Tabla 1.1. Composición química del aguacate (*Persea americana* Mill) por cada 100g de fruto fresco (Gramshaw y Sinyinda, 1998).

Componentes	Porcentaje (%)
Agua	65-80
Proteína	1-4
Azúcares	<1
Aceites esenciales	3-30
Vitaminas (A, B y D)	-

Existen diversos estudios acerca del aguacate y su alta capacidad antioxidante (Gramshaw y Sinyinda, 1998; Rincón Hernández y cols., 2011; Segovia, Corral-Pérez, y Almajano, 2016; Torres Gurrola y cols., 2009; Wang y cols., 2016), por ser una fuente de polifenoles extraíbles. Los compuestos compuestos fenólicos, tienen un alto potencial antioxidante que ha sido utilizado en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética (Dahmoune y cols., 2014; Segovia y cols., 2016), debido a sus beneficios para reducir el riesgo de contraer enfermedades crónico-degenerativas (enfermedades cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer) y prevenir los daños oxidativos (Wang y cols., 2016).

### 1.2.1. Compuestos volátiles presentes en la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*)

La composición de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) varia en función de su estado de madurez, es rica en compuestos volátiles los cuales han mostrado actividades biológicas en defensa ante algunos patógenos. En la literatura se han encontrado estudios sobre hojas de esta variedad de aguacate en dos estados de madurez (hojas jóvenes y maduras). En la Tabla 1.2 se muestran los compuestos presentes en la hoja de aguacate criollo.

Tabla 1.2. Compuestos volátiles en la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Madurez	Clase de compuesto	Nombre de compuesto	Referencia
Hojas jóvenes	Monoterpenoides	1S- $\alpha$ -pineno, L- $\beta$ -pineno, sabineno, $\beta$ -pineno, $\alpha$ -felandreno, $\rho$ -cimeno, 1R- $\alpha$ -pineno, eucaliptol, cis- $\beta$ -terpineol y $\beta$ -linalol	Torres Gurrola y cols. 2009
	Sesquiterpenoides	$\beta$ -cubebeno, $\alpha$ -humuleno, cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D, nerolidol y germacreno D-4-ol	
	Fenil propanoides	eugenol, eugenolmetil-éter, estragol, anetol, chavicol y chavicol-metiléter	
	Acetatos	fenol-4-(2-propenil)-acetato	
	Alcanos	5-metil-tridecano, octadecano, hexadecano y heptadecano	
Hojas maduras	Ácido graso	ácido mirístico	Rincón Hernández y cols. 2011
	Alcanos	hexadecano, octadecano, nonadecano, heneicosano, eicosano, docosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, heptacosano, octacosano y dotriacontano	
	Aldehídos	2-hexenal, 3-metoxicinamaldehído	
	Diterpeno	fitol y fitan	
	Fenil propanoides	eugenol metil éter y estragol	
	Monoterpenoides	$\alpha$ -pineno, $\alpha$ -terpineno, $\beta$ -pineno, sabineno, limoneno, eucaliptol, cis- $\beta$ -ocimeno, Z, $\beta$ -terpineol y linalool	
	Sesquiterpenoides	$\alpha$ -cubebeno, $\beta$ -cariofileno, Cis,cis,cis-4,7,10-cicloundecatrieno,1,1,4,8-tetrametil, D-germacreno, $\gamma$ -cadineno, nerolidol, $\beta$ -nerolidol, 1-hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno, D-nerolidol, óxido de cariofileno, $\beta$ -bis-,benceno,1,1'-(1,2-ciclobutanodil)	
	Sesterterpeno	2,6,10,14,18-pentametil-2,6,10,14,18-eicosapenteno	
	Triterpeno	escualeno	

La hoja de aguacate criollo es rica en terpenos, los cuales son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de isoprenos (hidrocarburo). Éstos se clasifican según su número de carbonos, siendo los monoterpenoides los más pequeños. Los terpenos son metabolitos secundarios de las plantas que dan características organolépticas y constituyen la mayor parte del aceite esencial producido, además, ejercen otras funciones como la protección contra insectos y temperaturas elevadas.

En ambos estados de madurez de la hoja, el estragol (72>60 %) es el compuesto predominante, mientras que en la hoja madura, otro compuesto en gran proporción es el cariofileno (16>9 %). Ambos compuestos han sido ampliamente utilizados como saborizantes y aromatizantes en las industrias de alimentos y bebidas alcohólicas, fueron reconocidos como sustancia segura (GRAS) y aprobados para uso en alimentos (Muñoz y cols., 2007). Las especies vegetales con este tipo de compuestos han sido muy utilizadas con propósitos industriales, debido al interés de encontrar antioxidantes provenientes de fuentes naturales con el fin de reemplazar antioxidantes sintéticos, los cuales están cada vez más restringidos por sus posibles efectos cancerígenos (Muñoz Acevedo, Kouznetsov, y Stashenko, 2009).

### **1.3. Antioxidantes**

Los antioxidantes son considerados compuestos capaces de retrasar, retardar o prevenir los procesos oxidativos (Shahidi, Janitha, y Wanasundara, 1992). En términos de alimentos, un antioxidante es una sustancia que preserva los alimentos retardando el deterioro, rancidez o decoloración debido a la oxidación. Se produce una oxidación cuando una especie (átomo o grupo de átomos) cede electrones a otra, la especie que gana electrones se reduce y la que pierde electrones se oxida (Martínez Ramos, 2015). Éstas reacciones que implican la transferencia de electrones entre las sustancias que participan, se les conoce como reacciones de óxido-reducción (redox). Las reacciones redox producen radicales libres (ROS, especies reactivas del oxígeno), los cuales, por definición son cualquier átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados, en donde los electrones no apareados alteran la reactividad química del átomo o molécula dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad la cual genera reacciones cadena. Los ROS son gene-

rados como mecanismo de respuesta por los organismos que involucran: mecanismos preventivos, mecanismos reparadores y mecanismos antioxidantes. Las defensas ante agentes oxidantes pueden ser enzimáticas (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT)) y no-enzimáticas (ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), carotenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos) (Valko y cols., 2007); de acuerdo a su mecanismos de acción los antioxidantes pueden ser clasificados como inhibidores de radicales libres o queladores de iones metálicos (Shahidi y cols., 1992). Un exceso de ROS en el cuerpo y en las plantas puede conducir a un daño acumulativo en las proteínas, los lípidos y el ADN, lo que da como resultado el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor a los oxidantes. Éste ha sido asociado como la causa del envejecimiento y diversas enfermedades en los seres humanos (Dudonné, Vitrac, Coutière, Woillez, y Mérillon, 2009).

Es así como los antioxidantes protegen al cuerpo humano, se oxidan cediendo electrones al radical libre transformándose en un radical débil que es inofensivo (Ordoñez Gómez, León Areválo, Reátegui Días, y Sandoval Chacón, 2012), retardando el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas y en los alimentos manteniendo su calidad sensorial y nutricional, aumentando la vida útil de los mismos.

En este sentido, los antioxidantes han sido un objeto de estudio para la industria de alimentos que normalmente utilizan antioxidantes sintéticos (hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT)) pero su uso ha sido limitado debido a que éstos podrían ser nocivos para la salud (Segovia y cols., 2016). Por lo tanto, se han buscado fuentes naturales para poder obtenerlos, especialmente antioxidantes de origen vegetal como lo son los flavonoides, taninos, fenoles y otros, que están presentes en diversas frutas, vegetales, semillas y hojas (Khemakhem y cols., 2017; Talhaoui y cols., 2015).

No obstante, la adición de algún compuesto antioxidante a los alimentos debe ser estudiado a profundidad. Se debe asegurar que éste no afecte la estabilidad del alimento, como también su toxicidad y la biodisponibilidad del mismo (Nilsson y cols., 2005).

### **1.3.1. Capacidad antioxidante (CA)**

La capacidad antioxidante (CA) es la evaluación indirecta del mecanismo antioxidante de los organismos el cual, como se ha mencionado, es encargado de la regulación de producción de radicales libres para enfrentar cualquier agresión oxidativa en la célula y en el organismo (Shahidi y cols., 1992).

La CA es un parámetro que ofrece una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo en cada sistema. La determinación de la CA depende del fluido, tejido o célula que se pretenda estudiar. Las técnicas desarrolladas para la CA valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donadores de hidrógeno o de electrones) presentes en el fluido o célula para reducir las especies oxidantes introducidas en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos (Quintana Escorza y Calderón Salinas, 2009).

Anteriormente, se ha mencionado que numerosos estudios han demostrado la alta CA de los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal, como también su alta actividad biológica (Noura y cols., 2014; Ordoñez Gómez y cols., 2012; Repo De Carrasco y Encina Zelada, 2008), por lo que, la CA es una de las propiedades químicas más estudiada en los compuestos fenólicos (Shahidi y cols., 1992), estas propiedades son atribuidas a los grupos hidroxilo presentes en su anillo estructural (Martínez Ramos, 2015). La CA de los compuestos fenólicos dependerá de su naturaleza (estructura química) como también de su afinidad por los radicales libres (Cyboran y cols., 2014).

### **1.3.2. Determinación de capacidad antioxidante**

Existen diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante (CA) (Nilsen y cols., 2005; Re y cols., 1999), los cuales difieren en el tipo de ensayo y sus condiciones experimentales. La mayoría de ellos se basa en estudiar la reacción de algún radical libre generado y cómo esta reacción es inhibida por la adición del compuesto o de la muestra estudiada (Paixao, Perestrelo, Marques, y Camara, 2007). La CA no puede ser evaluada únicamente con un sólo método, debido a que los antioxidantes ejercen su acción mediante mecanismos muy diversos (inhibición de radicales libres, quelantes de metales, etc) y en un mismo alimento pueden existir

una mezcla de diferentes antioxidantes, y entre ellos se pueden generar reacciones sinérgicas, por lo que es necesario considerar diversos métodos para su determinación. Dicho lo anterior, gran cantidad de autores se han encargado de combinar diferentes métodos para la determinación de la CA (Biskup, Golonka, Gamian, y Sroka, 2013; Dudonné y cols., 2009). Algunos métodos para la determinación de CA son mencionados a continuación.

### 1.3.2.1. FRAP (Ferric Reducing Ability Power)

El método FRAP, por sus siglas en inglés, mide la potencialidad de reducir iones férricos utilizando como agente cromógeno 2,4,6-tripiridil-S-triazina, el cual se ha ido extendiendo por la facilidad en la obtención de los resultados, y se ha aplicado incluso a diversos tipos de muestras biológicas. El método descrito se lleva a cabo a pH bajos, cuando el complejo  $Fe^{3+} - TPTZ$  es reducido a  $Fe^{2+}$  y se forma un color azul intenso con una absorción máxima a 595 nm. La reacción formada no es específica y cualquier reacción incompleta que tenga un menor potencial reductor llevará a la reducción del complejo  $Fe^{3+} - TPTZ$ . La reducción generada significa que existe la presencia de un agente reductor en la muestra examinada (Benzie y Strain, 1996).

### 1.3.2.2. ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina) -6-sulfónico)

El método ABTS ha sido ampliamente utilizado para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde que es soluble en agua y químicamente estable. El radical  $ABTS^{\bullet+}$  una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa y mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl]) pasa a presentar nuevas características con picos máximos de absorción de 414, 645, 734 y 815 nm. El radical  $ABTS^{\bullet+}$  es favorable para ensayos de compuestos coloreados por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm) reduciendo así, posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria (Kuskoski, Asuero, García Parilla, Troncoso, y Fett, 2004).

## 1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas y su función es determinar las propiedades sensoriales y su calidad nutricional, son derivados de la pentosa-fosfato, ácido shiquímico y los fenilpropanoides (Dahmoune y cols., 2014). Éstos son sintetizados por las plantas como respuesta a diversos procesos los cuales se pueden dividir en dos; los fenoles preformados que son sintetizados durante el desarrollo de los tejidos de las plantas y los fenoles inducidos que son sintetizados debido a lesiones físicas, infecciones o cuando las plantas se someten a estrés por la presencia de metales o sales pesadas, radiación UV, temperatura, entre otros (Talhaoui y cols., 2015). Los fenoles tienen una estructura básica formada por un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilos (unidad fenilpropanoide) (Khodami y cols., 2013). Actualmente se conocen aproximadamente 8000 polifenoles y la lista continua creciendo. Los polifenoles se clasifican en base a su número de carbonos subdividiéndose en dos grupos principales; compuestos no-flavonoides (estilbenos, lignanos, taninos, ácidos hidroxicinámicos y benzoicos) y los flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavones, flavanoles, flavanonas y isoflavones) (Paixao y cols., 2007). La clasificación de los compuestos fenólicos se explica con detalle en los siguientes apartados.

### 1.4.1. Estilbenos y lignanos

Una pequeña cantidad de estilbenos están presentes en la dieta del ser humano, el más representativo es el resveratrol (Figura 1.2), que existe en sus dos formas isómericas cis y trans. Es producido por las plantas en respuesta a alguna infección provocada por patógenos o por estrés a ciertas condiciones. Los lignanos son producidos por la dimerización de dos unidades de pentilpropanos. Estos compuestos están presentes en la naturaleza de manera libre. Se han encontrado en más de 70 especies de plantas, incluyendo uvas, bayas y maní.

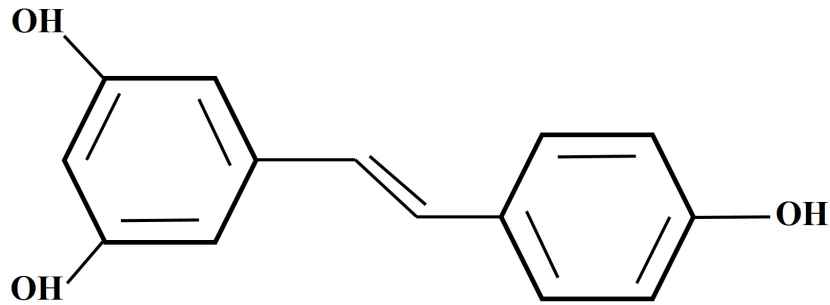


Figura 1.2. Estructura química del resveratrol (Ignat y cols., 2011).

### 1.4.2. Taninos

Muchos flavonoides de los alimentos se polimerizan en las propias plantas o como resultado del procesamiento de los alimentos. Estos polímeros se conocen como taninos. Son compuestos hidrosolubles de alto peso molecular, contienen un número importante de grupos hidroxilos entre otros grupos funcionales, siendo capaz de unirse a proteínas y otras macromoléculas. Son el tercer grupo más importante de fenoles, se pueden subdividir en taninos hidrolizados y condensados. Los taninos hidrolizados son derivados del ácido gálico. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico. Estos compuestos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente (Porrás Loaiza y López Malo, 2009). Estos compuestos los podemos encontrar en el vino tinto, uvas, café, espinacas y té.

### 1.4.3. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen acerca de una tercera parte de los fenoles, los cuales están presentes en las plantas de manera libre o ligada. Los ligados se encuentran unidos a varios componentes de las plantas como lo son el éster, éter o cadenas de acetal. Las diferentes formas de dichos ácidos resultan de las diferentes condiciones de extracción y su susceptibilidad a la degradación. Estos compuestos se dividen en dos subgrupos, los hidroxybenzoicos y los hidroxycinámicos (Figura 1.3). Los primeros incluyen el ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protoca-

téuico, ácido vanílico y ácido siríngico. Los segundos son compuestos aromáticos con cadenas de tres carbonos, los más comunes son el ácido cafeico, ácido felúrico, ácido  $\rho$ -cumárico y ácido sinápico. Algunos de estos ácidos fenólicos son encontrados en diversos frutos secos (Ignat y cols., 2011).

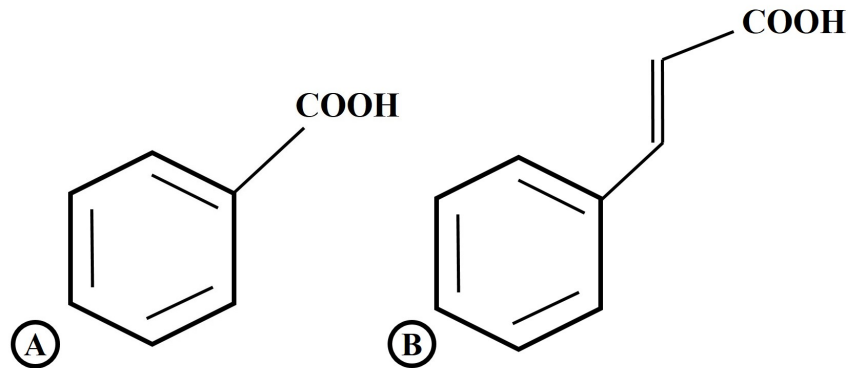


Figura 1.3. Estructura química de los ácidos fenólicos. A) Ácido hidroxybenzoico y B) Ácido hidroxycinámico (Khoddami y cols., 2013).

#### 1.4.4. Flavonoides

Los flavonoides se pueden clasificar en antiocianinas, flavonoles, flavones, flavanoles, flavanonas y isoflavonoides. Dichos compuestos polifenólicos se caracterizan por tener una estructura benzo- $\gamma$ -pirano, los cuales son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que intervienen en las infecciones por organismos fitopatógenos; también están relacionados con la salud humana por su actividad antioxidante. Contienen dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6' los cuales pueden formar o no un tercer anillo (Figura 1.4). Los anillos son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Ignat y cols., 2011).

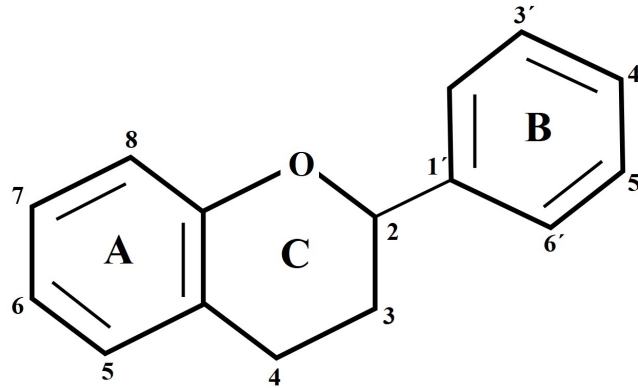


Figura 1.4. Estructura química de un flavonoide (Ignat y cols., 2011).

Los subgrupos de los flavonoides se identifican por la sustitución del anillo C. En general, los flavonoides son importantes antioxidantes por su alto potencial reductor, que hacen que actúen como agentes reductores, donantes de hidrógenos y extintores de oxígeno. Estos compuestos los podemos encontrar en diversas frutas y verduras como los arándanos, las manzanas, naranjas y fresas.

- **Antiocianinas:** Son pigmentos (rojo, morado o azul, dependiendo del pH) de la vacuola los cuales son solubles en agua. Las podemos encontrar en todos los tejidos celulares incluyendo hojas, raíces, flores y frutos. En la fresa, el clavel, las manzanas y la uva constituyen hasta aproximadamente el 30 % de su masa seca.
- **Flavonas y flavonoles:** Son unos de los flavonoides más comunes, están ampliamente distribuidos en todos los pigmentos amarillos de las plantas.
- **Flavononas y flavanoles:** Estos compuestos existen en muy pequeñas cantidades, son incoloros o ligeramente amarillos. Por su baja concentración y su característica incolora han sido poco estudiados. En cambio, sus glicósidos son bien conocidos, como la hesperidina y narangina de la corteza de los frutos cítricos.
- **Isoflavonoides:** Estos compuestos tiene un anillo heterocíclico, a diferencia de los demás. Se les atribuyen algunos beneficios a la salud como la prevención de la arteroesclerosis y el cáncer.

## 1.5. Proceso de lixiviación

La lixiviación es una operación de transferencia de masa en la que se produce el desplazamiento de sustancias solubles o de alta dispersión, es un proceso en el cual se extraen uno o varios solutos de un sólido mediante el uso de un disolvente líquido. En donde, ambas fases entran en contacto y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo cual produce una separación de los componentes originales del sólido (Ignat y cols., 2011). Este proceso ha sido ampliamente utilizado para la extracción de antioxidantes naturales (Segovia y cols., 2016), particularmente los compuestos fenólicos, debido a su gran aplicación en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética por sus grandes beneficios a la salud (poder anti-inflamatorio, anti-bacteriano, anti-viral y antioxidante) (Cyboran y cols., 2014; Khoddami y cols., 2013; Talhaoui y cols., 2015), disminuyendo la probabilidad para contraer enfermedades crónico-degenerativas como las cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y otras (Dahmoune y cols., 2015).

La fuente de extracción de compuestos fenólicos es principalmente a partir de material vegetal (frutos, granos, legumbres, vegetales, hojas, semillas, etc) y bebidas (té, café, jugos de frutas, etc). La preparación y la extracción de los compuestos fenólicos de la matriz depende mayormente de la naturaleza de la muestra y de las propiedades químicas de los fenoles, incluyendo la estructura, polaridad, concentración, número de anillos aromáticos y de sus grupos hidroxilo (Khoddami y cols., 2013), como también de la técnica de extracción, tipo de disolvente (orgánico e inorgánico), tiempo y temperatura. La relación y combinación de estas variables van a ser cruciales para la eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos.

### 1.5.1. Métodos de extracción de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos es una etapa importante para el aislamiento, la identificación y el uso de los mismos (Ignat y cols., 2011). Como se ha mencionado, el sistema más utilizado es una extracción sólido-líquido (lixiviación) por medio de maceración, agitación o soxhlet (extracciones convencionales), utilizando disolventes como el metanol, etanol, acetona, entre otros. Éste tipo de extracción ha comenzado a desaparecer debido a la necesidad de reducir costos por medio del uso de una menor cantidad de disolvente y aceleración del proceso (Da Porto,

Porretto, y Decorti, 2013; Talhaoui y cols., 2015).

Por lo tanto, en las últimas décadas nuevas técnicas de extracción han sido introducidas y estudiadas. Dichas tecnologías se han caracterizado por mejorar la eficiencia y la calidad de la extracción, disminuyendo el tiempo de extracción y el consumo de disolvente (Dahmoune y cols., 2014).

Las tecnologías emergentes son la extracción asistida con microondas (EAM), extracción con fluidos supercríticos (EFS), extracción con disolventes presurizados (EDP) y la extracción asistida con ultrasonido (EAU) (Ahmad Qasem y cols., 2013). A continuación se enlistan las técnicas de extracción de compuestos fenólicos siendo divididas en dos grupos; las técnicas convencionales y las no convencionales o tecnologías emergentes.

#### 1.5.1.1. Técnicas de extracción convencionales

- **Maceración:** La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, dónde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción (disolvente) los cuales se pretenden extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del disolvente.
- **Agitación:** La agitación se basa principalmente en la selección de disolvente, temperatura y tiempo de agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa por un medio mecánico (movimientos circulatorios) en el interior de algún recipiente.
- **Soxhlet:** El método soxhlet está compuesto por un material de vidrio con el que se pueden extraer compuestos de naturaleza lipídica contenidos en un sólido por medio de un disolvente afín a los mismos. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial tipo bulbo y un matraz. Funciona cíclicamente, cuando se evapora el disolvente sube hasta el área donde es condensado; aquí, al caer y regresar a la cámara de disolvente los compuestos son separados hasta llegar a una concentración deseada (Azuola y Vargas, 2007).

### 1.5.1.2. Técnicas de extracción no convencionales (tecnologías emergentes)

- **Extracción asistida con microondas (EAM):** Las microondas se han aplicado ampliamente en la investigación de metabolitos secundarios de las plantas durante décadas. Las microondas son radiaciones con longitudes de onda que van desde un milímetro hasta un metro (frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz). Éstas inducen un movimiento molecular en materiales y disolventes, por lo que se produce un calentamiento de la muestra. El calor genera que el material vegetal pierda humedad por evaporación, el vapor generado se hincha y, finalmente, rompe las células liberando los compuestos activos (Khoddami y cols., 2013). La eficiencia de la EAM depende del tiempo de irradiación, densidad de potencia, temperatura, tipo de disolvente y la interacción entre los mismos (Dahmoune y cols., 2014).
- **Extracción con fluidos supercríticos (EFS):** Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tienen la habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y disolver materiales como un líquido, generalmente se utilizan dióxido de carbono y agua (Azuola y Vargas, 2007). La extracción con fluidos supercríticos es una técnica amigable con el medio ambiente, evitando la utilización de grandes cantidades de disolventes tóxicos, además de ser rápida y automatizada. La baja viscosidad y alta difusividad del CO<sub>2</sub> supercrítico permite una separación más rápida y eficiente, y relativamente genera extractos limpios. Otro aspecto, es que la ausencia de luz durante el proceso de extracción reduce la posible degradación de los analitos (Talhaoui y cols., 2015).
- **Extracción con disolventes presurizados (EDP):** La extracción con disolventes presurizados es una técnica que utiliza disolventes convencionales, se realiza de manera automatizada bajo presión constante y varios parámetros pueden ser controlados como la temperatura, tiempo de extracción estática, ciclos de extracción, entre otros. El uso de disolventes orgánicos en altas presiones y temperaturas por encima de su punto de ebullición permite lograr una extracción rápida y eficiente de los analitos de la matriz sólida (Talhaoui y cols., 2015).
- **Extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad (EAU):** La extracción

asistida con ultrasonido para compuestos fenólicos se ha caracterizado por ser una tecnología más rápida, eficiente y económica debido al menor consumo de disolvente (Bo y cols., 2016). La eficiencia de la EAU es atribuida al fenómeno de cavitación acústica, que consiste en la formación, crecimiento y colapso implosivo de microburbujas dentro de la fase líquida (González Centeno y cols., 2014). Existen tres mecanismos dentro de la aplicación de ultrasonido que hacen una mejor transferencia de masa: (1) el rompimiento celular inducido por la cavitación incrementa la permeabilidad del tejido vegetal y libera el material intracelular; (2) el aumento de la temperatura y presión en la zona de la implosión de burbuja mejora la solubilidad de los analitos y la penetración del disolvente y por último; (3) existe mayor difusión como consecuencia de las microcorrientes generadas por el ultrasonido (Mason, Chemat, y Vinatoru, 2011). La EAU es la técnica más rápida en comparación a las mencionadas anteriormente.

### **1.5.2. Variables de extracción**

La eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos se puede ver afectada por diversas variables, es por ello que se deben establecer las óptimas condiciones de operación para obtener mayor rendimiento. La extracción de los compuestos fenólicos depende de la fuente de donde serán extraídos, de su naturaleza, la técnica de extracción y las variables que intervienen en la misma. Las variables de extracción por las cuales se ve afectada la extracción son la temperatura, la concentración del disolvente, el tamaño de partícula, la porosidad y otras. Las propiedades que cada variable añade al proceso de extracción son diversas, es por ello que su estudio es importante para así poder determinar un proceso óptimo. Al aumentar la temperatura se aumenta la velocidad de extracción debido a que la solubilidad se incrementa; la temperatura máxima para cada sistema está limitada por el punto de ebullición del disolvente y por el punto de degradación del producto. La concentración del disolvente es importante debido a la saturación y a la presencia de reacciones químicas que se pueden llevar a cabo. La reducción de tamaño de partícula es de gran importancia, ya que, aumenta el área de contacto y disminuye el tiempo de extracción principalmente para sólidos de baja porosidad; por otra parte la porosidad permite que el líquido penetre a través de los canales formados por los

poros dentro del sólido, aumentando así el área activa para la extracción (Azuola y Vargas, 2007).

### 1.5.3. Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos ha incrementado su demanda, ya que es la siguiente etapa al proceso de extracción. La extracción y cuantificación de fenoles ha sido estudiada por mucho tiempo y a pesar de ello la cuantificación de los compuestos sigue siendo difícil, especialmente la determinación simultánea de los polifenoles de diferentes grupos. Numerosos **métodos espectrofotométricos** han sido desarrollados para la cuantificación de los compuestos fenólicos del material vegetal. Dichos ensayos se basan en diferentes principios y son utilizados para determinar diferentes grupos estructurales de fenoles. Uno de ellos es el método de Folin-Ciocalteu, el cual ha sido extensamente utilizado para determinar el contenido total de fenoles.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Avella Gutiérrez, García Ortiz, y Mendoza-Cisneros, 2008). El compuesto formado absorbe luz con una longitud de onda máxima de 765nm. Una desventaja de este método es que puede verse afectado por otras moléculas reductoras no fenólicas. Algunas de estas pueden ser aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, entre otras (Paixao y cols., 2007).

Otros métodos espectrofotométricos han sido desarrollados para poder determinar alguna clase específica de fenol, uno de ellos es el de cuantificación de antocianinas utilizando un método diferencial de pH. El método se basa en la disminución del pH de los extractos de 0.5 y 0.8, lo que causa que todas las antocianinas se transformen en el catión coloreado (rojo) flavilio (Ignat y cols., 2011).

Los métodos espectrofotométricos proporcionan información cualitativa y cuantitativa, actualmente, la espectrofotometría es la técnica principal para la cuantificación de diferentes clases de polifenoles debido a su simplicidad y bajo costo. No

obstante, la mayor desventaja de estos métodos es que solo dan una estimación del contenido fenólico total. Éstos no dan una medición cuantitativa de compuestos individuales, por lo que, la cromatografía ha sido utilizada.

Los **métodos cromatográficos** se utilizan tanto para la separación como la cuantificación de compuestos fenólicos. La cromatografía líquida de gases (HPLC) se ha convertido en una herramienta analítica para los compuestos fenólicos con diferentes sistemas de detección. Sin embargo, debido a que se presentan desventajas en los límites de detección y de sensibilidad, los métodos de HPLC presentan limitaciones principalmente en matrices complejas, como extractos crudos de plantas y muestras naturales. Previamente la muestra debe ser concentrada y purificada, además del alto costo de los instrumentos utilizados (Ignat y cols., 2011).

## **1.6. Ultrasonido**

### **1.6.1. Generalidades**

El sonido es una onda mecánica longitudinal que se puede propagar por medios elásticos. Las ondas sonoras se clasifican según los intervalos de frecuencia, así: infrasonidos, que se emiten con frecuencias por debajo del umbral perceptible por el hombre, menor a 16Hz; sonidos, que son audibles por el oído humano de 16Hz-20kHz; y por último los ultrasonidos, que se emiten con una frecuencia superior al umbral audible por el hombre, mayor a 20kHz (Martínez Rubio y Usaquén Castro, 2005). El ultrasonido se encuentra en la región de frecuencias entre 18 kHz y 10 MHz; puede dividirse en ultrasonido de alta intensidad, con frecuencias bajas, entre 20 y 100 KHz y ultrasonido de señal entre 1 y 10 MHz (Azuola y Vargas, 2007).

Existen equipos generadores de energía acústica (ultrasonido), los cuales están conformados por un transductor y un generador de señal, la cual puede ser eléctrica o magnética. El transductor transforma la señal en energía mecánica que hace vibrar el medio circundante y provoca la onda de presión a alta intensidad.

### **1.6.2. Clasificación del ultrasonido**

La clasificación del ultrasonido en función a la frecuencia se puede observar en la Figura 1.5, en donde es clasificado en ultrasonido de alta intensidad y el ultrasonido

de señal.

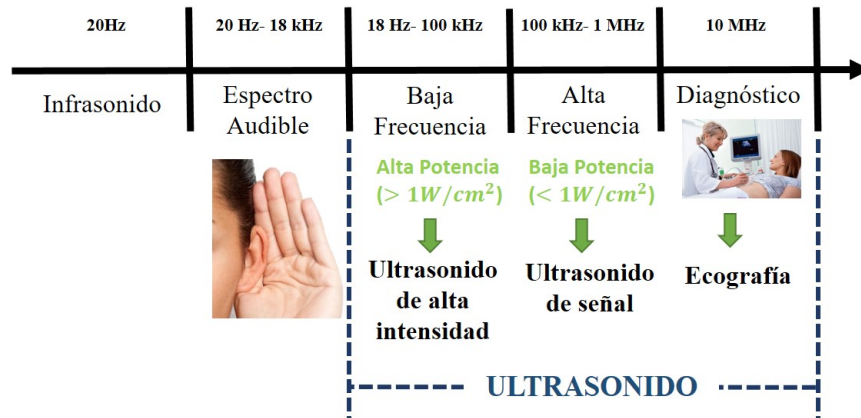


Figura 1.5. Clasificación del ultrasonido en función a su frecuencia.

#### 1.6.2.1. Ultrasonido de señal (100kHz-10MHz)

El ultrasonido de señal produce ondas que no son destructivas, debido a que la energía generada es tan pequeña que parte de ella se disipa por fenómenos de conducción, convección y radiación, el resto de la energía se refleja y es captada por un receptor siendo capaz de generar imágenes. Debido a esto, estas ondas se han utilizado para la ecografía (exploración interna del cuerpo humano), monitoreo (observación de procesos o productos) y medición (propiedades físicas) (Martínez Rubio y Usaquén Castro, 2005), como también la cristalización de la grasa de cerdo (Corona, García Pérez, Santacatalina, Ventanas, y Benedito, 2014).

En la industria de alimentos, el ultrasonido de señal ha sido utilizado para la determinación de características de calidad como el grosor de materiales (cáscaras de frutas, cáscaras de huevo, recubiertas de confitería) y la determinación de la presencia de materiales extraños, de tamaño de partícula y otros.

#### 1.6.2.2. Ultrasonido de alta intensidad (20-100 KHz)

El ultrasonido de alta intensidad se considera una prometedora tecnología para la industria de procesamiento de alimentos (Azuola y Vargas, 2007). Éstos generan ondas sonoras de alta intensidad que son capaces de modificar un proceso o un producto. La aplicación de ultrasonido ha sido ampliamente utilizada para la ex-

tracción de compuestos orgánicos e inorgánicos (antibióticos, compuestos fenólicos y algunos polisacáridos) (Sharmila y cols., 2016). En donde un disolvente apropiado es mezclado con la muestra y es sonificado a ciertas condiciones de temperatura y tiempo, para ello se deben establecer los parámetros ultrasónicos como la frecuencia y la amplitud (%), obteniendo así, un buen rendimiento en el extracto (Khoddami y cols., 2013).

El ultrasonido de alta intensidad puede ser aplicado por medio de dos tipos de dispositivos; los baños ultrasónicos y el sistema de sonda. Ambos sistemas se basan en un transductor como fuente de poder de energía acústica.

El baño ultrasónico es el más conocido, consiste en un tanque de acero inoxidable con uno o mas transductores y generalmente funcionan a una frecuencia de 40 kHz. Las ventajas del baño es que es un equipo más económico, accesible y se pueden colocar muestras simultáneas. Sin embargo, en comparación a los sistemas de sonda son menos reproducibles debido a que la intensidad del ultrasonido es atenuada por el agua contenida en el baño.

Los sistemas ultrasónicos de sonda operan a una frecuencia cercana a los 20kHz, en donde existe una menor pérdida de energía que los de baño porque la sonda contiene el transductor y ésta entra en contacto directo con la muestra, realizando una entrega directa de la energía acústica en el medio de extracción (Chemat y cols., 2017).

## **1.7. Ultrasonido de alta intensidad**

El ultrasonido de alta intensidad es una tecnología emergente utilizada en la industria de alimentos como técnica de extracción (Khemakhem y cols., 2017). Como se ha mencionado, ha sido utilizada para la extracción de compuestos fenólicos en materiales vegetales. Diversas investigaciones han comprobado las ventajas de las extracciones asistidas con ultrasonido, debido a la ruptura celular que generan por el fenómeno de cavitación acústica producido por la compresión y expansión de las ondas sonoras (Sharmila y cols., 2016).

### 1.7.1. Fenómeno de cavitación acústica

El ultrasonido de alta intensidad es capaz de producir una serie de cambios en el material o procesos en donde es aplicado, debido a que, cuando la onda sonora atraviesa el medio se involucran fenómenos de transporte (masa y calor), provocando así, un cambio en el medio de extracción. Estos efectos pueden explicarse mediante varios mecanismos asociados, que varían en función al medio donde se propaga la onda sonora (Martínez Ramos, 2015). La mayoría de los efectos atribuidos al ultrasonido en un medio líquido son producidos por el fenómeno de la cavitación acústica.

La propagación de la onda sonora en un medio elástico induce a una sucesión de fases de compresión y expansión, que causan el desplazamiento longitudinal de las moléculas del líquido unidas por fuerzas de atracción. Es así como las moléculas que conforman la fase líquida son desalojadas de su posición original y durante los ciclos de compresión éstas pueden colapsar con las moléculas circundantes. Durante la fase de expansión se ejercen presiones negativas generando el movimiento de las moléculas del líquido. El grado de presión negativa va a depender de la naturaleza y la pureza del líquido. A una suficiente intensidad de la onda sonora, durante la fase de expansión, se pueden vencer las fuerzas de atracción de las moléculas generando la cavidad en el líquido (burbujas de cavitación). Dicho fenómeno lo podemos observar en la Figura 1.6.

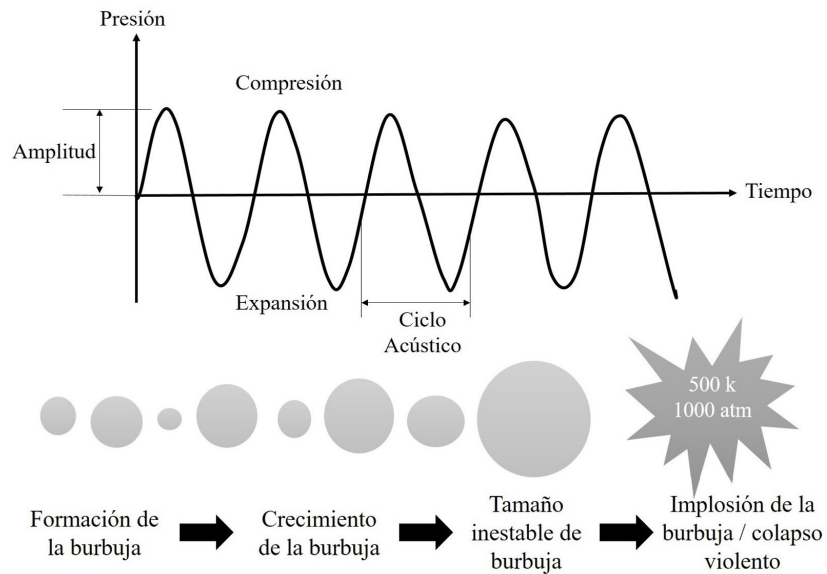


Figura 1.6. Crecimiento y colapso de las burbujas de cavitación en la fase líquida.

Las burbujas de cavitación son capaces de crecer por coalescencia o por difusión rectificada, debido a que los vapores o el gas disuelto en el medio entrarán a la burbuja durante la fase expansión, y éstos no serán expulsados totalmente durante el ciclo de compresión.

Las burbujas de cavitación son clasificadas en dos tipos: estables y transitorias. Las burbujas de cavitación estables sufren muchos ciclos de compresión y expansión, por lo que su tamaño llega a oscilar lo suficiente. Las burbujas de cavitación transitorias permanecen durante uno o pocos ciclos acústicos, durante los cuales ellas se amplían muy rápidamente para incrementar su tamaño al doble antes de que implosionen de manera violenta, convirtiéndose en micro-burbujas.

Cuando el tamaño de las burbujas alcanza un tamaño de equilibrio, éstas implosionan durante el ciclo de compresión. La implosión de las burbujas genera condiciones extremas: temperaturas hasta aproximadamente 5000 K y presiones alrededor de 50-1000 atm. Éstas condiciones son capaces de acelerar drásticamente la reactividad química del medio, como también efectos físicos sobre el material sólido (Chemat y cols., 2017).

Los efectos físicos pueden conducir a la fragmentación del material sólido y la erosión localizada (daños en la piel del material vegetal), con lo que se logra una

disminución del tamaño de partícula. La erosión mejora la accesibilidad del disolvente a la fase sólida, mejorando la extracción y solubilización del analito.

En otras palabras, la cavitación acústica consiste en la formación, crecimiento y colapso implosivo de microburbujas inmersas en la fase líquida (González Centeno y cols., 2014). La implosión de la burbuja en el medio líquido (disolvente) genera micro-jets y macro-turbulencias (Chemat y cols., 2017), por lo que existe un rompimiento celular con el que se incrementa la permeabilidad del tejido vegetal y es así como el material intracelular (analito) es extraído (Cárcel, Benedito, Bon, y Mulet, 2007).

### **1.7.2. Parámetros ultrasónicos**

El ultrasonido es una onda mecánica, por lo que, sus características como la frecuencia, la longitud de onda y la amplitud pueden influir en el fenómeno de cavitación acústica y en el proceso de extracción. En este sentido, aquellos parámetros deben ser estudiados.

#### **1.7.2.1. Amplitud (%)**

La amplitud ( $A$ ) representa el desplazamiento máximo de la onda sonora y tiene un efecto sobre la formación e implosión de las burbujas de cavitación. Las ondas sonoras van debilitando su amplitud conforme van alejándose de su punto de origen, lo cual se conoce como atenuación.

#### **1.7.2.2. Longitud de onda ( $cm$ )**

La longitud de onda ( $\lambda$ ) es la distancia real que recorre una perturbación (onda) en un determinado intervalo de tiempo.

#### **1.7.2.3. Frecuencia (Hz)**

La frecuencia ( $f$ ) es el tiempo requerido para que se complete un ciclo acústico (Hz), las frecuencias más utilizadas son 20 kHz y 500 kHz. Cuando la frecuencia se incrementa, la intensidad de la cavitación en el líquido se disminuye porque los ciclos acústicos son demasiados cortos para poder incrementar el tamaño de las burbujas en cambio, cuando la frecuencia es baja las burbujas de cavitación transitorias

son menores pero con un diámetro mucho mayor con lo que se favorecen los efectos físicos (Chemat y cols., 2017).

#### **1.7.2.4. Potencia (W)**

La potencia acústica (P) es la energía total irradiada por una fuente por unidad de tiempo.

#### **1.7.2.5. Intensidad ( $W/cm^2$ )**

La intensidad ultrasónica (IU) esta expresada como la energía transmitida por segundo y por área de la superficie emitida. Éste parámetro esta directamente relacionado con la amplitud del transductor y por consecuencia con la presión de la onda sonora. Cuando se incrementa la amplitud, las burbujas colapsan de manera más violenta. Por lo que, el incremento de la intensidad incrementa los efectos sonoquímicos.

### **1.7.3. Extracción de compuestos fenólicos asistida con ultrasonido**

En general, la extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad (EAU), es reconocida como una técnica de extracción eficiente que reduce los tiempos de extracción, aumenta el rendimiento y calidad del extracto. Se han reportado varios estudios del uso de esta técnica de extracción para compuestos bioactivos en materiales vegetales (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Estudios de la extracción de compuestos fenólicos con ultrasonido de alta intensidad en materiales vegetales.

Matriz vegetal	Analito	Disolvente	Dispositivo	Condiciones experimentales	Referencia
Semillas de uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	Fenoles, antioxidantes y antiocianinas	Etanol 33-67 %	Baño	T=33 °C, t=16-34 min, 1:50 (p/v), f=40 kHz	(Ghafoor, Choi, Jeon, y Jo, 2009)
Corteza de <i>Picea abies</i>	Fenoles	Etanol 70 %	Baño	T=43, 48, 58 °C, t=5-75 min, 1:5 (p/v), f=35 kHz	(Lazar, Talmaciu, Volf, y Popa, 2016)
Orujo de uva	Fenoles	Etanol 50 %	Baño	T=20-50 °C, t=2.5-80 min, 1:60 (p/v), f=25 kHz, P=300 W	(Tao, Zhang, y Sun, 2014)
Hojas de olivo	Fenoles	Agua	Sonda	T=10-70 °C, t=10 min, 1:40 (p/v), P=400 W, A=100 %	(Khemakhem y cols., 2017)
Hojas de <i>Cassia auriculata</i>	Fenoles	Etanol y metanol (40, 50 y 60 %)	Sonda	t=5-15 min, 1:25 (p/v), P=30-50 W	(Sharmila y cols., 2016)
Hojas de <i>Plentiscus L</i>	Fenoles	Etanol (21.8-78.8 %)	Sonda	T=25 °C, t= 2.5-17.5 min, 1:40 (p/v) f=24 kHz P=200 WA=21.8-78.2 %	(Dahmoune y cols., 2015)
Semillas de chía	Fenoles	Metanol y n-hexano	Sonda	T=25 °C, t= 5-15 min, 1:20 (p/v) f=24 kHz P=400 WA=50-100 %	(Corona, Martínez, Ruíz, y Carranza, 2016)

# II.OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general

Estudiar el contenido fenólico y su capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Persea americana* var. *drymifolia* obtenidos mediante la extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad.

## 2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la cinética de extracción convencional de extractos de hojas de *Persea americana* var. *drymifolia* mediante la cuantificación de su contenido fenólico y su capacidad antioxidante.
- Evaluar el proceso de extracción asistido con ultrasonido de alta intensidad mediante la cuantificación del contenido fenólico y su capacidad antioxidante.
- Comparar las técnicas de extracción de los contenidos fenólicos y su capacidad antioxidante, para establecer las variables óptimas del proceso.
- Modelar y optimizar las variables que intervienen en el proceso de extracción de compuestos fenólicos.

### III.MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo fue necesario determinar las condiciones óptimas de operación como el tipo de disolvente, tiempo de extracción y las condiciones de la aplicación de ultrasonido buscando así, una eficiencia para la máxima extracción de los compuestos fenólicos. En la Tabla 3.1 se muestran las variables que intervinieron durante el proceso y cuales fueron los parámetros establecidos, una vez propuestas dichas variables se prosiguió a seguir el plan de trabajo el cual se explica a continuación.

El plan de trabajo se puede observar en la Figura 3.1, éste fue dividido en 4 secciones. En la primer sección se realizaron las pruebas preliminares, en la que se estableció la metodología a utilizar para las diferentes técnicas (CFT y CA), como también se pusieron en marcha los equipos y se estableció el montaje de los experimentos. En seguida, se realizaron las extracciones con el método convencional (ECV) y el asistido con ultrasonido de alta intensidad (EAU). En esta parte del trabajo fue donde se establecieron las mejores condiciones para ambos métodos de extracción con el fin de optimizar el proceso. Una vez obtenidos los extractos, se realizaron las cinéticas en donde se cuantificó CFT con el método de Folin-Ciocalteu, como también CA con el método de FRAP y ABTS. Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos realizando una modelación y optimización del proceso realizado por medio de una regresión escalonada.

Tabla 3.1. Variables del proceso de extracción.

<b>Variable</b>	<b>Denotación</b>
Disolvente	Etanol 80 %
Relación Disolvente-Muestra	1:20
Amplitud	60 y 100 %
Frecuencia	37kHz
Tiempo de extracción (min)	3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60

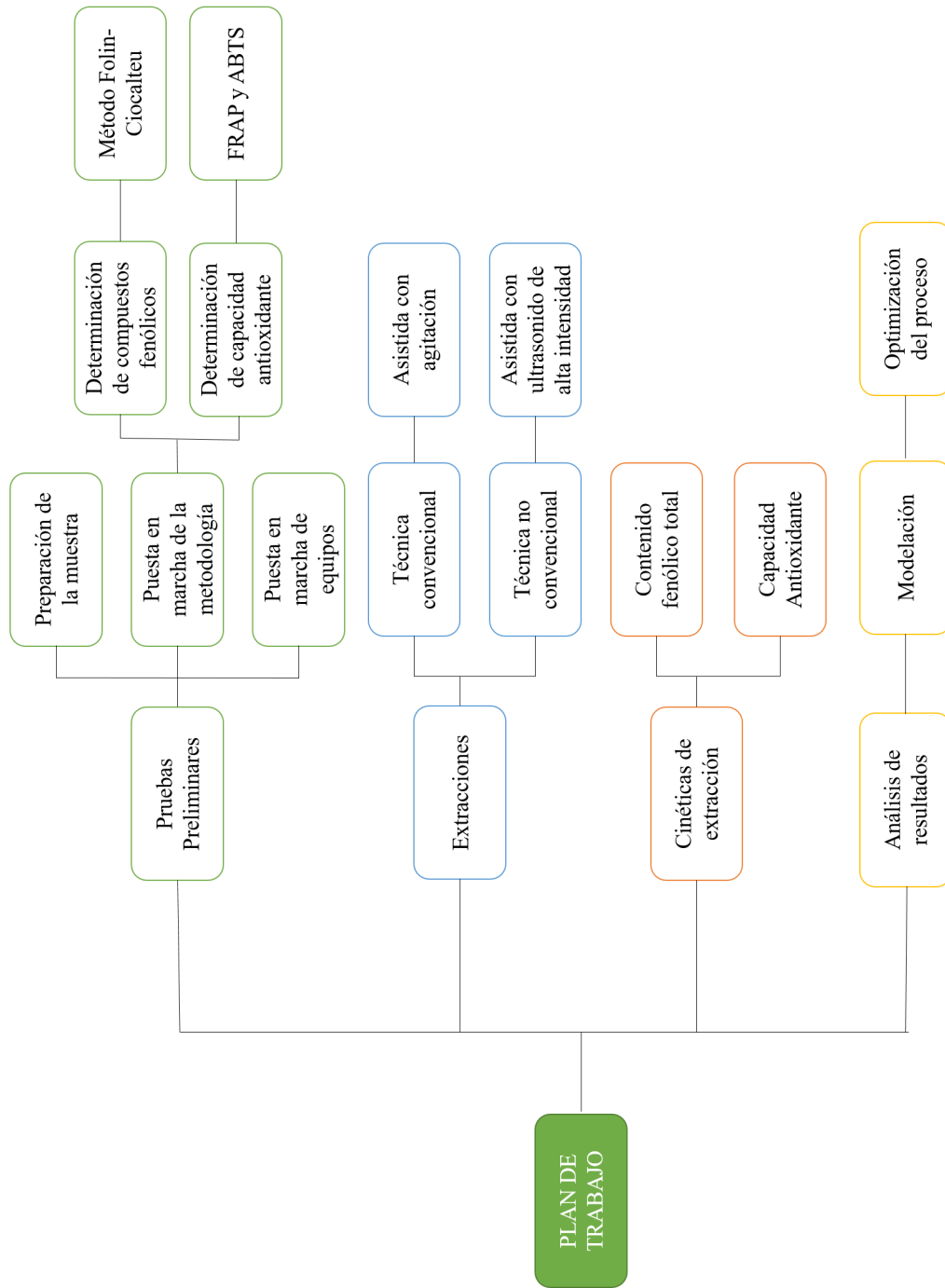


Figura 3.1. Plan de trabajo.

### 3.1. Materia prima

Se adquirió la materia prima de un árbol de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) ubicado en la ciudad de Puebla, Puebla. El lote de hojas se tomó aleatoriamente, considerando que las hojas fueran aproximadamente del mismo tamaño y del mismo color según la percepción del ojo humano. Las hojas fueron almacenadas en bolsas herméticas y transportadas al laboratorio para su respectivo análisis.

#### 3.1.1. Caracterización de la materia prima

La materia prima fue caracterizada con el fin de estandarizar la muestra por cualquier cambio físico que esta pudiera presentar. Los análisis que se llevaron a cabo fueron la acidez titulable, sólidos solubles totales e índice de madurez. Los tres análisis son explicados a continuación, dichos experimentos se realizaron por triplicado.

- Acidez Titulable (%A):** La acidez titulable se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el método oficial AOAC 942.15 (AOAC, 2005), para ello se diluyó 1 g de muestra en 10 mL de agua desionizada, a la cual se le adicionaron 4 gotas del indicador Fenofaleína; la mezcla se tituló con (NaOH) hidróxido de sodio 0.1 N hasta conseguir el vire del indicador. El porcentaje de acidez se obtuvo a partir de la Ecuación 3.1.

$$\%Acidez = \frac{(V_{NaOH})(N_{NaOH})(mqAT)}{V} \times 100 \quad (3.1)$$

Donde:

$V_{NaOH}$  = Volumen de NaOH utilizado en la titulación.

$N_{NaOH}$  = Normalidad del NaOH.

$mqAT$  = miliequivalentes del ácido cítrico (Buelvas Salgado, Patiño Gómez, y Cano Salazar, 2012)

$V$  = Volumen de la muestra.

- Sólidos Solubles Totales (SST):** Se determinaron de acuerdo a la norma mexicana NMXF-103-NORMEX-2009, para ello se utilizó un refractómetro digital portátil (PAL-1, Atago, China) y los resultados fueron expresados en grados brix (°Bx).

- **Índice de madurez (IM):** El índice de madurez de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) se determinó según la Ecuación 3.2.

$$IM = \frac{SST}{\%A} \quad (3.2)$$

### 3.1.2. Preparación de la materia prima

Una vez obtenidas las hojas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), éstas fueron lavadas con agua destilada para posteriormente ser sometidas a un proceso de secado a 35°C durante 24 horas con el fin de conseguir un peso constante, el secado se realizó en un horno de flujo convectivo (RF 53-UL, *Redline by Binder*, Alemania). Una vez deshidratada la muestra, se procedió al pulverizado por medio de un molino de cuchillas y con el fin de reducir el tamaño de partícula la muestra se pasó por un tamiz de 500 micras. Finalmente, la materia prima preparada se almacenó en condiciones de obscuridad y a temperatura ambiente (25±2 °C) hasta su respectivo análisis.

## 3.2. Procesos de extracción

### 3.2.1. Método de extracción convencional por agitación (ECV)

En la extracción convencional por agitación se colocó la muestra junto con etanol como disolvente al 80 % (v/v) en una relación de 1:20 (p/v), los extractos fueron mantenidos en agitación (1000 rpm) y temperatura constante (25±2 °C). Se utilizaron diferentes tiempos de extracción (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 y 60 min) y se centrifugaron a 1350xg a 4°C durante 15 min en una centrífuga (UNIVERSAL 320 R, *Hettich Lab*, Alemania). Los extractos obtenidos fueron el sobrenadante de la centrifugación, éstos fueron guardados en condiciones de obscuridad y refrigeración (5±2 °C). Todos los extractos fueron realizados por triplicado.

### 3.2.2. Método de extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad (EAU)

En la extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad se utilizó un baño ultrasónico (P70H, *Elmasonic. Singen*, Alemania), la temperatura del baño tuvo que

ser controlada por medio de un sistema de enfriamiento (AD07R-20-AA1B, *PolyScience*, Estados Unidos) el cual recirculaba el agua hacia el baño con una temperatura de  $12\pm 2$  °C con el fin de mantener la temperatura del medio a  $21\pm 2$  °C. Las extracciones en el baño ultrasónico se realizaron según la metodología descrita por Kulkarni y Rathod (2014), dichos autores reportaron que la eficacia de la extracción depende de la posición de los transductores, frecuencia, amplitud, posición de los tubos y por último la distancia entre el baño y el tubo. Se colocó el polvo de la muestra con el disolvente (EOH 80 %) en tubos de ensaye con una relación de 1:20 (p/v) es decir,  $0.5\pm 0.04$  g de muestra en 10 mL del disolvente. Se utilizaron diferentes tiempos de extracción (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 y 60 min) y dos amplitudes 60 y 100 % con una frecuencia de 37kHz, una vez que se terminó la aplicación del ultrasonido las muestras fueron centrifugadas a  $1350\times g$  a 4°C durante 15 min en una centrífuga (UNIVERSAL 320 R, *Hettich Lab*, Alemania). Los extractos fueron el sobrenadante de la centrifugación y posteriormente, éstos fueron almacenados en condiciones de obscuridad y refrigeración ( $5\pm 2$  °C). El montaje de los experimentos realizados se observa en la Figura 3.2, el cual consta del baño ultrasónico, el sistema recirculador y los tubos en donde se colocó la muestra.

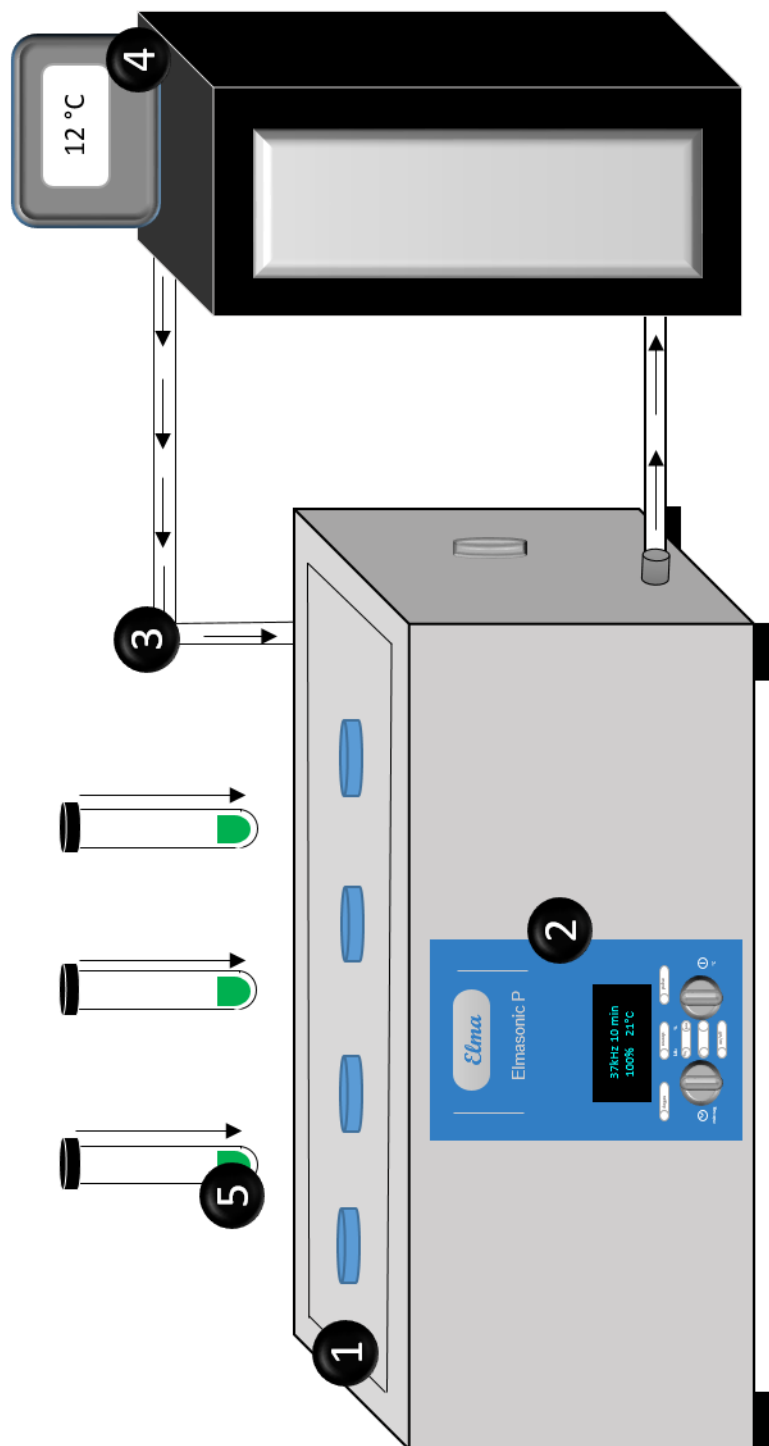


Figura 3.2. Equipo-baño ultrasónico  
1. Transductores. 2. Procesador de ultrasonido. 3. Sistema recirculador de agua. 4. Sistema de enfriamiento 5. Tubos de ensaye con muestra.

El equipo utilizado consta de cuatro transductores, los tubos fueron colocados en medio de cada transductor con una distancia entre el tubo y el baño de  $2.4 \pm 0.5$  cm, como se muestra en la Figura 3.3, con el fin de obtener mejores resultados entre cada extracción (Rao y Rathod, 2015). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado con el fin de tener mayor repetibilidad en los datos obtenidos.

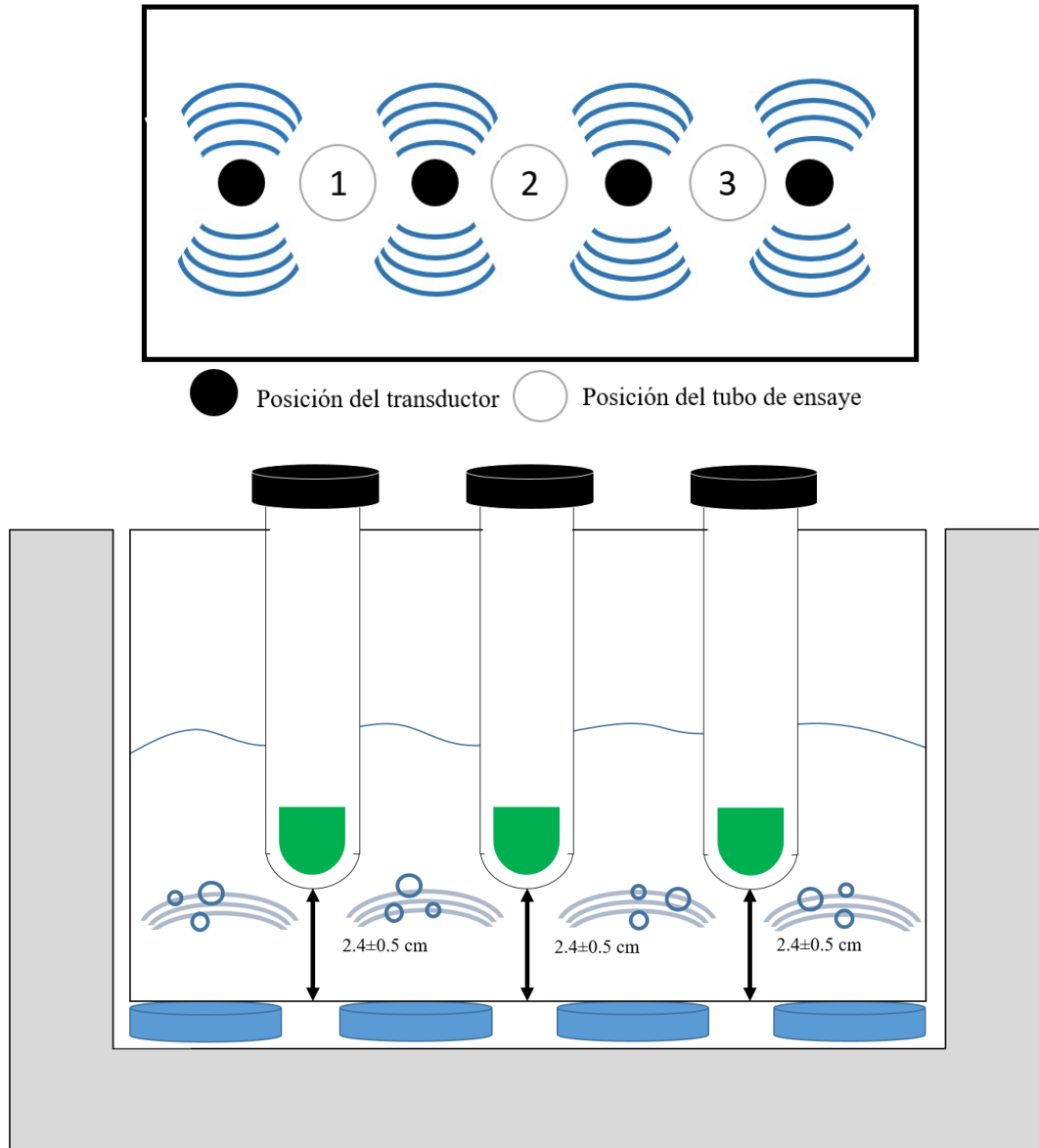


Figura 3.3. Representación esquemática de la posición de los tubos de ensayo en el baño ultrasónico.

### 3.3. Cuantificación total de compuestos fenólicos (CFT)

El contenido fenólico total (CFT) de los extractos de hoja de aguacate criollo fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Gao, Ohlander, Jeppsson, Björk, y Trajkovski (2000). Para ello, 100  $\mu$ l de muestra fueron mezclados con 200  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu 2M (Sigma-Aldrich, México), adicionando posteriormente 2 mL de agua destilada. Después de 3 min se agregó 1 mL de una solución de carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) con una relación 1:5 (p/v). El análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C) y la reacción se dejó incubar durante 1 hora. Finalmente, la absorbancia fue leída a 765 nm usando un espectrofotómetro (6405 UV/Vis, Jenway, Inglaterra). La curva de calibración fue preparada con ácido gálico (Sigma-Aldrich, México) a partir de concentraciones conocidas en un rango de 50 a 250 mg/L. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de muestra seca. Dicha metodología se realizó tanto para las extracciones convencionales como para las no convencionales y cada medición se realizó por triplicado.

### 3.4. Determinación de la capacidad antioxidante (CA)

La determinación de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) fue evaluada por medio de dos técnicas, la primera fue con la capacidad de reducir iones férricos (FRAP, por sus siglas en ingles) y la segunda, con el método de ABTS (Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). Ambas técnicas se explican en los siguientes apartados.

#### 3.4.1. FRAP (Ferric-Reducing Ability Power)

La metodología de FRAP se realizó como lo describen Do Nascimento, Mulet, Ramírez Ascheri, Piler De Carvalho, y Carcel (2016) con ciertas modificaciones, el reactivo fue preparado por medio de tres soluciones diferentes. La primera consistió en acetato de sodio anhidro ( $CH_3COONa$ ) 0.3M y agua destilada, dicha solución re-

quiere un pH cercano a  $3.6 \pm 0.1$  por lo que se ajustó con ácido acético ( $CH_3COOH$ ). Para la segunda solución se preparó el reactivo TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazina) con ácido clorhídrico ( $HCl$ ) al 40mM. Finalmente, para la última solución se utilizó cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) y agua destilada. El reactivo FRAP es generado por medio de la mezcla de las soluciones mencionadas anteriormente en el orden correspondiente, se adicionó el mismo volumen de cada solución generando un color café claro. Para el análisis de cada extracto de hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) por cada 30  $\mu$ l de cada muestra se adicionaron 30  $\mu$ l de agua destilada y 900  $\mu$ l del reactivo FRAP, posteriormente fueron mantenidos a  $37 \pm 2$  °C durante 30 minutos. La absorbancia fue medida a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (6405 UV/Vis, Jenway, Inglaterra). La capacidad antioxidante fue evaluada por medio de una curva de calibración con concentraciones conocidas del reactivo TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-ácido carboxílico) en un rango de 40 a 200 mg/L y los resultados fueron expresados en mg de TROLOX por cada 100 g de muestra seca.

### 3.4.2. ABTS

#### (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)

La CA determinada por ABTS se realizó según el método descrito por Villa Rodríguez, Molina Corral, Ayala Zavala, Olivas, y González Aguilar (2011), Jorjong, Butkhup, y Samappito (2015) y Fu y cols. (2011), con ciertas modificaciones. Para preparar el radical  $ABTS^{\bullet+}$ , se agregó persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 2.45 mM a una solución acuosa de ABTS previamente preparada. Una vez preparado el radical, se incubó durante 18 horas a temperatura de refrigeración ( $5 \pm 2$  °C) y en condiciones de obscuridad para dejar llevar a cabo la reacción. Para el uso del radical  $ABTS^{\bullet+}$ , éste fue diluido con etanol puro hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.1$  en un pico de 734 nm. Finalmente las muestras fueron leídas en el mismo pico de absorción, añadiendo 100  $\mu$ l de extracto a 900  $\mu$ l del radical  $ABTS^{\bullet+}$  dejando reaccionar por aproximadamente 30 segundos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, para expresar los resultados se realizó una curva de calibración de concentraciones conocidas del reactivo TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-ácido carboxílico) en un rango de 30 a 70 mg/L. Los resultados fueron expresados en mg de TROLOX por cada 100 g de muestra seca.

### 3.5. Modelación y optimización

Se utilizó el programa MatLab® 7.1 SP3 (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) para realizar la modelación y optimización de las variables del proceso de extracción, éstas fueron evaluadas por medio de una regresión escalonada (RE) y una superficie de respuesta (SR). La RE es utilizada para verificar la mejor combinación de variables independientes (predictor) con variables dependientes (predecidas), dichas variables son introducidas una a la vez determinando estadísticamente cual de ellas contribuye favorablemente a la ecuación predecida, es decir, incrementa el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). En este caso se utilizaron como factores el tiempo de extracción y la potencia eléctrica suministrada (amplitud %), verificando así el efecto que estas variables podrían tener sobre el CFT y la CA. Se determinó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), el coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) y el error de estimación relativa media ( $MRE$ ) para evaluar la significancia estadística del modelo matemático establecido.

### 3.6. Análisis estadístico

En el presente trabajo cada experimento fue realizado por triplicado ( $n=3$ ) y cada dato fue reportado con su valor promedio  $\pm$  desviación estándar (D.E).

El análisis de la varianza multifactorial con intervalos LSD (Least Significant Difference) fue realizada con el fin de evaluar estadísticamente la influencia de la amplitud en el CTF y la CA. El análisis estadístico se realizó utilizando como herramienta estadística el software Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corp., Herdon, USA).

# IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1. Caracterización de la materia prima

Los resultados de la caracterización físico-química de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) se muestran en la Tabla 4.1. En la literatura no se encontró alguna referencia sobre el estado de madurez de la hoja de aguacate criollo, sin embargo, Rincón Hernández y cols. (2011) estudiaron hojas de aguacate criollo jóvenes y para su clasificación únicamente se tomó en cuenta el color verde brillante claro, y un menor grosor y mayor flexibilidad que el de las hojas maduras. En este sentido, para este trabajo, se tomaron en cuenta dichos criterios para poder clasificar así a una hoja joven de una madura.

Tabla 4.1. Caracterización físico-química de la hoja de aguacate criollo. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

<b>Análisis</b>	<b>Valor obtenido</b>
Acidez Titulable (%A)	0.035 $\pm$ 0.001
Sólidos Solubles Totales (SST)	3.033 $\pm$ 0.473
Índice de Madurez (IM)	85.343 $\pm$ 7.796

En la Tabla 4.1 se puede observar que el IM de la muestra es de 85.343 $\pm$ 7.796. El IM del material vegetal esta determinado por su porcentaje de acidez según el ácido predominante en la misma y por su concentración de sólidos solubles disueltos. La proporción entre azúcar y ácido provee a muchas frutas su sabor característico, al inicio del proceso de maduración esta proporción es baja debido al contenido bajo de azúcar y contenido ácido en la fruta (Angón Galván, Sánchez, y Hernández, 2006), en este caso al ser una hoja no existen estudios relacionados con el estado de madurez mediante esta determinación, no obstante se sabe que el estado de madurez influye directamente en el contenido de compuestos fenólicos. Según Mier y Cáez (2011) la maduración implica cambios en los compuestos antioxidantes y su capacidad antioxidante, dichos autores encontraron mayor presencia de compuestos bioactivos en el fruto de uchua maduro, por lo cual produce mayor capacidad antioxidante. De la misma forma Repo De Carrasco y Encina Zelada (2008), estu-

diaron frutas nativas peruanas con diferentes grados de madurez y determinaron su CA de sus compuestos bioactivos, encontrando mayor cantidad de compuestos fenólicos en frutas maduras.

## 4.2. Procesos de extracción

### 4.2.1. Cuantificación total de compuestos fenólicos (CFT)

En la Figura 4.1 se puede observar la evolución de los compuestos fenólicos en las dos diferentes técnicas de extracción aplicadas a diferentes tiempos de extracción (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 y 60 minutos) con etanol (EOH 80 % v/v) como disolvente. El ultrasonido fue aplicado por medio de dos diferentes amplitudes (60 y 100 %) con el fin de poder observar como la cantidad de energía suministrada tiene influencia sobre la extracción de los mismos. Se encontró que el CFT aumentó a medida que transcurría el tiempo de extracción de 3 a 30 minutos en la EAU y de 3 a 60 minutos en la ECV. Así se obtuvieron valores de  $8068.99 \pm 100.09$  a  $9905.52 \pm 411.46$  mg GAE/100g m.s en la EAU al 100 % de energía suministrada,  $8028.39 \pm 70.35$  a  $9629.36 \pm 724.43$  mg GAE/100g m.s en la EAU al 60 %, respectivamente, y finalmente  $5941.40 \pm 283.63$  a  $9531.41 \pm 771.30$  mg GAE/100g m.s para la ECV.

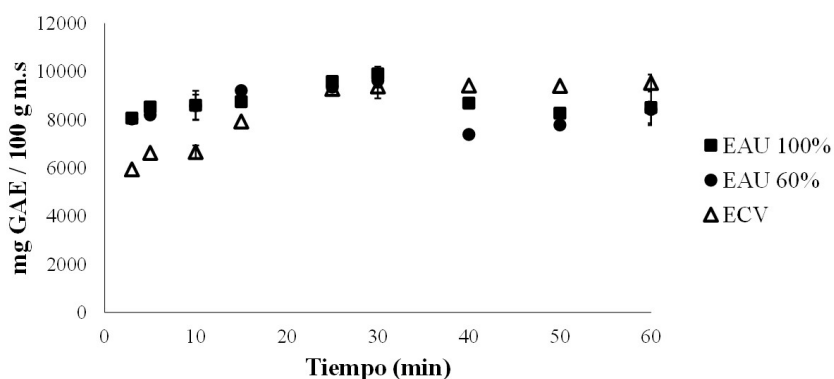


Figura 4.1. Evolución del contenido fenólico total de los extractos de hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*). Valor promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Así como también se pudo observar que las diferentes técnicas de extracción mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en la EAU se pudo extraer mayor can-

tividad de CFT en menor tiempo de extracción que en la ECV. En la ECV el CFT máximo ( $9531.41 \pm 771.30$  mg GAE/100g m.s) se obtuvo a los 60 minutos, mientras que para la EAU ( $9905.52 \pm 411.46$  y  $9629.36 \pm 724.43$  mg GAE/100g m.s para 100 y 60 % de energía suministrada, respectivamente) se obtuvo a los 30 minutos, esto se le puede atribuir al fenómeno de cavitación acústica el cual produce un violento colapso de las burbujas las cuales producen erosión, dispersión y ruptura mecánica del material vegetal (De Sarabia, Gallego Juárez, y Montoya Vitini, 2002), acelerando así la transferencia de masa entre el material vegetal y el disolvente utilizado (Martínez Rubio y Usaquén Castro, 2005). Se han encontrado diversos estudios con resultados similares, tal es el caso de Rodrigues, Pinto, y Fernandes (2008) quienes estudiaron la cascará de coco, obteniendo un incremento en los compuestos fenólicos con la aplicación de ultrasonido debido a la aceleración de la transferencia de masa que éstos llegan a generar. La sonicación incrementa la difusividad en el proceso de transferencia de masa y es más efectiva a tiempos cortos de aplicación. Carrera, Ruiz-Rodríguez, Palma, y Barroso (2012) realizaron un proceso de extracción de los compuestos fenólicos de la uva (EOH 50 %, 0-75°C, 100, 50 y 20 % de energía suministrada) obteniendo mayor eficiencia con la aplicación de ultrasonido en comparación a una técnica convencional, sin encontrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la amplitud del 100 y 50 %, como también concluyeron que no es necesario aplicar largos tiempos de extracción. Ya Qin, Jian Chu, Dong Hong, y Xing Qian (2009) estudiaron extractos de la cascará de una variedad de naranja (*Citrus unshiu* Marc) comparando así, una extracción asistida con ultrasonido (10-60 minutos de extracción, metanol al 80 %, 15, 30 y 40°C) y una técnica convencional (maceración). La aplicación de ultrasonido resultó favorable debido a la ruptura celular y penetración del disolvente a temperaturas menores de 40°C, ya que, temperaturas superiores llegan a generar otro tipo de reacciones. Resultados similares se reportaron para hojas de olivo, en los cuales se le atribuye al ultrasonido la generación de micro-jets que rompen la superficie celular permitiendo la extracción de su contenido (Ahmad Qasem y cols., 2013).

Por otro lado, otro efecto de la sonoquímica además de la cavitación es la sonólisis, la cual puede inducir la degradación de compuestos fenólicos, esto es debido a la reacción del sustrato con los radicales libres que son generados por la disociación de las moléculas del agua y del disolvente, como resultado de la alta temperatura y presión del colapso de las burbujas de gas (Ulloa y cols., 2013). Dicho fenómeno

se hace notar en la EAU en ambas amplitudes (Figura 4.1), en donde el CFT se ve disminuido a partir del minuto 40. En la EAU al 100 % el CFT disminuye un 5 % del minuto 40 al 50, de  $8690.94 \pm 444.60$  a  $8269.83 \pm 1471.03$  mg GAE/100g m.s, respectivamente, y en el minuto 60 éste vuelve a aumentar un 2 % con  $8508.74 \pm 555.35$  mg GAE/100g m.s. En la EAU al 60 %, el CFT disminuye un 24 % únicamente en el minuto 40 con  $7388.83 \pm 295.95$  mg GAE/100g m.s y aumenta una vez más un 8 % del minuto 50 al 60 de  $7783.61 \pm 389.29$  a  $8427.42 \pm 1618.62$  mg GAE/100g m.s. Dichos resultados coinciden con lo reportado por Prieto, González, y Abella (2011) quienes estudiaron los compuestos fenólicos en la cáscara de uva por medio de una extracción convencional y una asistida con ultrasonido, reportando una disminución del CFT con la aplicación de ultrasonido lo cual fue atribuido a la frecuencia y la potencia, ya que podrían favorecer el desarrollo de reacciones redox entre el medio de extracción y los analitos. Da Porto y cols. (2013) compararon la extracción de aceite y de polifenoles de la semilla de la uva por medio de una técnica soxhlet, maceración y una asistida con ultrasonido, dichos autores encontraron resultados similares en cuanto a la cinética de los polifenoles, éstos disminuyeron al minuto 40 y fue atribuido a que los polifenoles que se encontraron en la parte exterior de la semilla fueron más fáciles de extraer que los que se encontraran en la parte interna de la semilla. Por otra parte, reportan que durante los primeros minutos de extracción la transferencia de masa ocurre por convección y corresponde a la solubilidad del soluto, posterior a ello el fenómeno de difusión involucra la parte inerte de las partículas de la semilla.

Otro aspecto a considerar es que el colapso de las burbujas durante las EAU generara puntos localizados de altas temperaturas y presiones, afectando la estabilidad de los compuestos fenólicos. Por lo tanto, la tendencia de ambas cinéticas de la EAU se debió a cambios estructurales y reacciones en los compuestos fenólicos que fueron generados por la aplicación de ultrasonido.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dos amplitudes seleccionadas para la EAU, obteniendo un máximo de extracción de CFT de  $9629.36 \pm 724.43$  y  $9905.52 \pm 411.46$  mg GAE/100g m.s en amplitudes de 60 y 100 %, respectivamente. Ésto se puede deber a que al aplicar mayor cantidad de energía las burbujas de cavitación crecieron demasiado grandes para colapsar, o colapsaron débilmente reduciendo así el efecto de la cavitación (Martínez Ramos, 2015).

#### 4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante (CA)

En la Figura 4.2 se pueden observar los resultados obtenidos para la CA, así por el método FRAP (A) se hace notar que las tres cinéticas muestran un comportamiento diferente. Para la ECV, se observa que, la curva se mantiene constante debido a que los compuestos fenólicos no presentan algún cambio estructural y la CA incrementa conforme transcurre el tiempo, obteniendo así un mínimo de  $15346.12 \pm 427.72$  mg TROLOX/100g m.s a los 3 minutos y un máximo de  $21272.22 \pm 1020.81$  mg TROLOX/100g m.s a los 60 minutos de extracción.

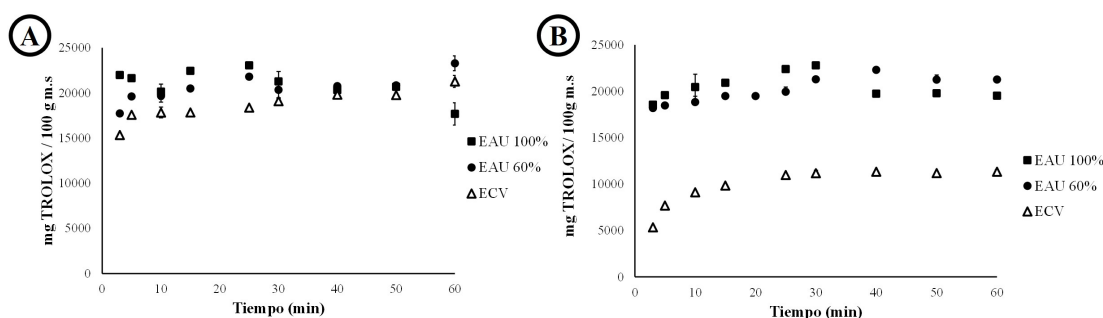


Figura 4.2. Evolución de la capacidad antioxidante de los extractos de hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) mediante la técnica de FRAP (A) y ABTS (B). Valor promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

En cambio, para las EAU las cinéticas tienden a incrementar y disminuir conforme el tiempo transcurre de la misma forma que en las cinéticas de CFT, para la EAU al 100 % la CA se incrementa en el minuto 3 y comienza a disminuir un 10 % hasta el minuto 10, con  $21982.84 \pm 1861.19$  y  $20137.03 \pm 1108.59$  mg TROLOX/100g m.s, respectivamente. Posteriormente, ésta aumenta un 15 % hasta el minuto 25 con  $23054.91 \pm 1805.10$  mg TROLOX/100g m.s. y llega a su mínimo a los 60 minutos disminuyendo un 24 % con  $17676.65 \pm 1761.28$  mg TROLOX/100g m.s. De la misma manera ocurre para la EAU al 60 %, en donde se tiene un incremento del 22 % de los 3 hasta los 25 minutos de extracción con  $17731.255 \pm 1521.697$  a  $21789.241 \pm 1348.285$  mg TROLOX/100g m.s, respectivamente. Durante el minuto 30, 40 y 50 la CA se llega a mantener casi constante (entre  $20345.057 \pm 2130.311$  y  $20835.019 \pm 1101.481$  mg TROLOX/100g m.s) y una vez más en el minuto 60 ésta llega a su máximo ( $23277.747 \pm 682.160$  mg TROLOX/100g m.s).

Se infiere que los incrementos y disminuciones en la EAU pudieron ser debidos a

que la aplicación del ultrasonido de manera constante no llega a ser muy favorable para los compuestos bioactivos a pesar de la amplitud aplicada. Por lo tanto, si se relaciona la disminución de la cantidad de CFT, ésta disminuye de igual manera su CA debido a las reacciones provocadas con el ultrasonido.

Los resultados de esta investigación concuerdan con lo que reportaron Ahmad Qasem y cols. (2013), quienes estudiaron la capacidad antioxidante por medio de la técnica de FRAP de extractos de las hojas de olivo obtenidos con ultrasonido, utilizando diferentes temperaturas (25-50°C) y amplitudes (40-100 %). Dichos autores obtuvieron que la aplicación de ultrasonido de manera continua no tiene mayor efecto en la CA de los compuestos fenólicos, ya que ésta permaneció constante. Además de que el ultrasonido puede promover la formación de nuevos compuestos fenólicos o la degradación de los mismos, lo cual pudo ocurrir en los resultados de este trabajo debido al aumento de CA de los compuestos fenólicos en el tiempo más largo de extracción. Otros autores, que de la misma manera estudiaron la hoja de olivo, obtuvieron resultados similares. Khemakhem y cols. (2017) aplicaron diferentes temperaturas (10, 20, 30, 50 y 70°C) y concluyeron dicho parámetro tiene mayor influencia sobre la CA de los compuestos fenólicos que el tiempo de aplicación de ultrasonido, en los primeros minutos de extracción éste favorece la CA pero llega a disminuir por lo que se ve mayormente favorecida por la temperatura.

Por otra parte, independientemente de la aplicación de ultrasonido muchos autores reportan que la CA de los compuestos fenólicos no sólo dependen de la cantidad de CFT presentes en los extractos, si no también del tipo de compuestos que se encuentren en ellos. Tal es el caso de Cyboran y cols. (2014), quienes estudiaron la composición de polifenoles y su actividad biológica de extractos de la hoja y el fruto de la grosella negra, encontrando que la capacidad antioxidante no depende de la cantidad de compuestos fenólicos en el extracto, involucra también el método por el cual es medida como también la inducción de radicales libres, la naturaleza y la cantidad de las sustancias contenidas en el extracto. Pu Jun, Li Xin, Cai hong, y Yao lei (2015) estudiaron la composición de extractos de hojas y fruto de olivo, dichos autores utilizaron el método de DPPH y FRAP para corroborar la relación de la capacidad antioxidante con la estructura de los compuestos fenólicos. Mencionan que la posición y el número de grupos hidroxilos presentes en los compuestos fenólicos tienen influencia en la CA de los extractos, no obstante la mezcla de diferentes compuestos fenólicos tienen mayor CA que individualmente, ya que actúan

sinérgicamente y exhiben mayor CA.

Sin embargo, independientemente de lo que pueda depender o no la CA el método utilizado tiene influencia sobre ello, el método FRAP (Ferric Reducing Ability Power) se basa en la capacidad de reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  que con la disminución del pH genera un complejo coloreado de  $Fe^{2+} - TPTZ$ , el cambio de color se genera de manera lineal conforme la concentración de antioxidantes puros en el extracto. Sin embargo, la reacción no es específica, ya que cualquier semi-reacción que contenga menor potencial redox puede generar la reducción del complejo  $Fe^{3+} - TPTZ$ . No obstante, los resultados pueden expresar las interacciones que existen entre los antioxidantes presentes en el extracto como lo es el ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, TROLOX,  $\alpha$ -tocoferol, albumina y los antioxidantes del plasma, los cuales son afines al método utilizado (Benzie y Strain, 1996). Por lo mencionado anteriormente, se puede decir que las cinéticas observadas en la EAU en ambas amplitudes (60 y 100 %) para el método de FRAP llegan a tener ese comportamiento por los diversos antioxidantes presentes en los extractos y sus interacciones entre ellos.

En la Figura 4.2 (B), se pueden observar los resultados obtenidos para la CA por el método de la captación del radical  $ABTS^{\bullet+}$ , los cuales muestran que para la ECV la CA se incrementa un 54 % desde los 3 a los 15 minutos de  $5346.56 \pm 521.78$  a  $9850.32 \pm 215.81$  mg TROLOX/100g m.s y posteriormente, ésta se mantiene constante hasta los 60 minutos llegando a un máximo de  $11206.53 \pm 402.41$  mg TROLOX/100g m.s, con lo que se entiende que la agitación mantiene constante la CA hasta llegar a su máximo en el mayor tiempo de extracción (60 minutos). En la EAU, en las dos amplitudes aplicadas, se puede observar que ambas cinéticas se comportan de manera similar por lo que no existen cambios significativos ( $p < 0.05$ ), en la EAU al 100 % la CA se incrementa un 22 % del minuto 3 al 30 de  $18555.64 \pm 517.80$  a  $22796.80 \pm 781.01$  mg TROLOX/100g m.s, obteniendo así un máximo de CA a los 30 minutos posteriormente, la CA se ve disminuida un 15 % hasta llegar a su mínimo en el minuto 60 con  $19522.15 \pm 1226.64$  mg TROLOX/100g m.s. En la EAU al 60 % se puede observar casi el mismo comportamiento, no obstante, la CA incrementa un 22 % del minuto 3 al 40 desde  $18199.66 \pm 1203.62$  a  $22312.45 \pm 456.78$  mg TROLOX/100g m.s comenzando a disminuir un 5 % hasta el minuto 60 llegando a  $21268.56 \pm 548.16$  mg TROLOX/100g m.s. Los resultados obtenidos en ambas EAU se pueden deber a que la aplicación de ultrasonido fue causa de un cambio de estructura o reacción en los compuestos fenólicos por lo que la CA tiende a disminuir.

El método de ABTS es aplicable para compuestos fenólicos de carácter lipídico e hidrofílico, incluyendo a los flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y los antioxidantes del plasma (Re y cols., 1999), en cambio el método de FRAP únicamente es para los antioxidantes del plasma. Independientemente de lo mencionado anteriormente, el método de ABTS depende también de la concentración de compuestos bioactivos como del tiempo en que se deje llevar a cabo la reacción, Miller y Rice Evans (1996) estudiaron el método de ABTS con diversos antioxidantes puros utilizando diferentes tiempos en los que la reacción se llevo a cabo y encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), por lo tanto, concluyeron que el tiempo en que se deje reaccionar al radical  $ABTS^{\bullet+}$  es un factor muy importante a considerar.

En este sentido, se puede decir que, ambos métodos mencionados presentaron cinéticas totalmente diferentes debido a que cuantifican de manera diferente la CA, es por ello que, se debe tomar en cuenta la naturaleza de los compuestos fenólicos del material vegetal estudiado. La hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) es rica en metabolitos secundarios antagónicos contra herbívoros y patógenos, particularmente terpenoides y fenilpropanoides (Rincón Hernández y cols., 2011; Torres Gurrola y cols., 2009). Se ha encontrado en la literatura estudios sobre la hoja de aguacate criollo. Torres Gurrola y cols. (2009) realizó la caracterización química foliar de las mismas por medio de una cromatografía de gases (HPLC) en donde los compuestos encontrados fueron terpenoides (monoterpenoides y sesquiterpenoides), fenilpropanoides (derivados del ácido cinámico) y acetatos. Los compuestos predominantes en la composición de la hoja fueron el estragol y el cariofinelo con 38 % y 11 % por gramo de hoja seca, respectivamente. El estragol y el cariofinelo son componentes típicos de aceites esenciales de especies vegetales (Muñoz Acevedo y cols., 2009).

En base a lo anterior, se puede decir que, la naturaleza de los compuestos presentes en la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) son de carácter lipídico por lo cual presentan mayor afinidad por el método ABTS y es probable que, las disminuciones en las cinéticas de este método a partir del minuto 40 se atribuyan a que el tiempo empleado para que la reacción se llevará a cabo no fue suficiente debido al cambio de estructura que pudo generar el ultrasonido, trayendo como consecuencia diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de CA.

En resumen, estos dos métodos se complementan el uno al otro y dan información completa de la capacidad antioxidante de fenoles. El método ABTS es favorable

para investigar ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos, de donde pertenecen mayoritariamente los de carácter lipídico, ya que toman ventaja por que probablemente eliminan radicales debido a su capacidad donadora de electrones y su capacidad para estabilizar los radicales dentro de su estructura, mientras que el método de FRAP se basa en la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  por la sustancia examinada (Biskup y cols., 2013).

Debido a los resultados obtenidos, se propuso la evaluación de la correlación que pudiera existir en ambas metodologías utilizadas para la determinación de CA, es por ello que se realizó una correlación de Pearson. Se encontró que existe correlación ( $p < 0.05$ ) entre ABTS y FRAP, obteniendo una  $r=0.734$ , lo cual se puede observar en la Figura 4.3.

Dichos resultados concuerdan con lo que han reportado Dudonné y cols. (2009), los cuales estudiaron el CFT y la CA de extractos de 30 plantas (hojas, semillas, flores y raíces) utilizando DPPH, ABTS, FRAP, SOD y ORAC como métodos de determinación, en los que encontraron una fuerte correlación ( $r=0.946$ ,  $p < 0.05$ ) entre FRAP y ABTS con lo que sustentaron que la CA de los extractos de las plantas no sólo dependen de la composición de los extractos, también del método utilizado y sus condiciones de operación. Biskup y cols. (2013) estudiaron la CA de 10 compuestos fenólicos solubles en agua, encontrando similares resultados con una correlación de  $r=0.997$  ( $p < 0.05$ ). La correlación encontrada en la literatura es un tanto mayor en comparación a la del presente trabajo sin embargo, la correlación existe, dichas diferencias se pueden atribuir a las condiciones de operación de ambos métodos, como también la manera en la que los extractos fueron obtenidos y finalmente a que las muestras examinadas son totalmente diferentes.

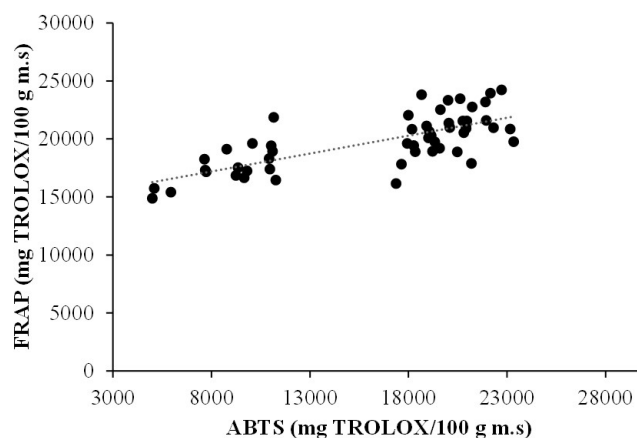


Figura 4.3. Correlación de Pearson entre FRAP y ABTS.  $r=0.734$  ( $p < 0.05$ ). Valor promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

#### 4.2.3. Correlación de Pearson entre el CFT y la CA (FRAP y ABTS)

En la Figura 4.4, se puede observar, la correlación que existe entre las variables de respuesta de esta investigación. Ambas correlaciones existen, únicamente una es más fuerte que la otra, la correlación ( $p < 0.05$ ) entre CFT y FRAP es de  $r=0.533$  y la correlación de CFT y ABTS es de  $r=0.690$ . Se puede observar que la correlación entre CFT y ABTS es mucho mayor, como se ha dicho anteriormente la CA de los compuestos fenólicos dependerá de la cantidad de compuestos fenólicos y su naturaleza. En este caso, la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) presenta compuestos de carácter lipídico.

En la literatura se ha reportado la determinación de CA en algunos compuestos presentes en la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), como lo es el estragol y el cariofileno, en el cual el método utilizado es la captación del radical  $ABTS^{\bullet+}$ , ya que se han encontrado mejores resultados. Muñoz y cols. (2007) estudiaron la composición química de aceites esenciales y extractos de seis especies aromáticas con alto contenido de *trans*-anetol y estragol, evaluando su CA por medio del atrapamiento del catión  $ABTS^{\bullet+}$ . Muñoz Acevedo y cols. (2009) estudiaron la composición química de diferentes especies aromáticas (*Artemisia dracuncululus*, *Foeniculum vulgare*, *Illicium verum*, *Lippia micromera*, *Lippia origanoides*, *Ocimum spp.*, *Plectranthus amboinicus*, *Tagetes filifolia*, *Tagetes lucida* y *Thymus vulgaris*) y su CA por

medio de ABTS y la oxidación del ácido linoleico, inducida por  $O_2$  y  $Fe^{+2}$  y el potencial inhibitorio de  $ABTS^{\bullet+}$  fue el método más favorable.

Por otro lado, se han encontrado otras investigaciones en las que se reporta una fuerte correlación entre el CFT y su CA, sin embargo otros reportan totalmente lo contrario. Todo depende de las condiciones de operación, la naturaleza de los compuestos y, en este caso, la aplicación de ultrasonido que pudo causar algún cambio de estructura en los compuestos fenólicos. Autores como Paixao y cols. (2007) ( $r=0.996$ ,  $p < 0.05$ ) estudiaron la correlación entre CFT y CA de variedades de vino, y Dudonné y cols. (2009) ( $r=0.946$ ,  $p < 0.05$ ) realizaron el mismo estudio para extractos de plantas, ambos autores encontraron una alta correlación entre las dos variables, en cambio, Kähkönen y cols. (1999); Seabra, Braga, Batista, y De Sousa (2010) reportaron lo contrario. Los estudios mencionados anteriormente se realizaron a diferentes condiciones de operación, además de utilizar diferentes métodos para la determinación de CA. En el presente trabajo se encontró correlación entre ambas variables, éstas no llegan a ser tan altas y se infiere que es por las metodologías utilizadas y la composición de la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), además de las condiciones en las que se realizaron los extractos.

Por otro lado, como se ha mencionado, cada método utilizado cuantifica la CA de manera diferente y en cuanto al método de Folin-Ciocalteu, a pesar de que es específico para los compuestos fenólicos puede ser reducido por compuestos no-fenólicos por lo que se pudieron presentar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el CFT. Sin embargo, es un método utilizado mundialmente al ser simple y altamente reproducible (Paixao y cols., 2007).

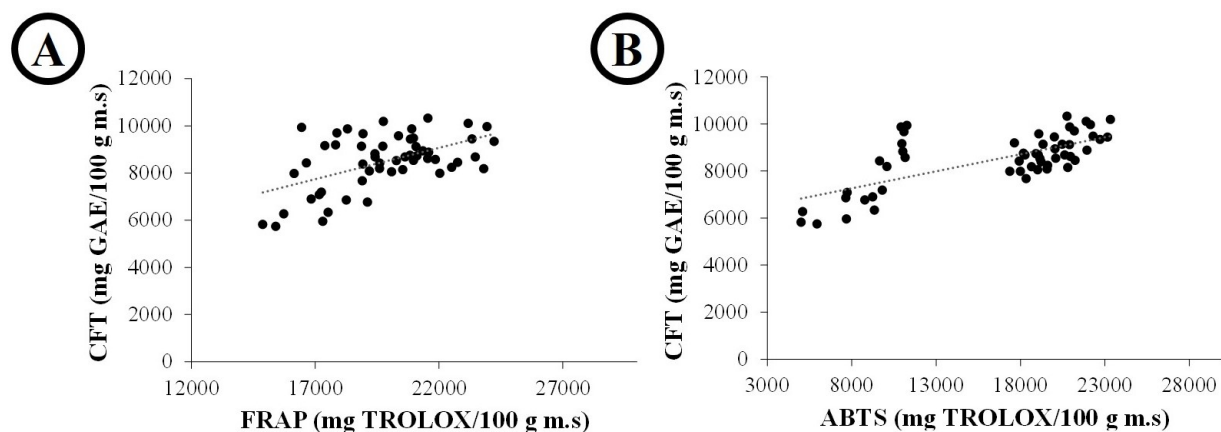


Figura 4.4. Correlación entre las variables de respuesta ( $p < 0.05$ ): capacidad anti-oxidante (A; FRAP y B; ABTS) y contenido fenólico total. Valor promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

### 4.3. Modelación y optimización

Los experimentos realizados en el presente trabajo fueron modelados y optimizados con el fin de encontrar la mejor combinación de condiciones de operación en función al CFT y a la CA. En la Figura 4.5 se puede observar la superficie de respuesta (SR) en función al CFT, como variable dependiente (eje  $z$ ), donde se pueden presenciar las variables independientes en los ejes  $x$ - $y$  (amplitud y tiempo de extracción). Se hacen notar las cinéticas de los tres tratamientos (ECV, EAU 100 y 60%) realizados en este trabajo, en el que se puede observar que el CFT depende del tiempo de extracción y de la energía suministrada, a mayor tiempo de aplicación de ultrasonido y mayor energía suministrada (amplitud) el CFT tiende a incrementar.

Como ya se mencionó anteriormente, se le atribuye al fenómeno de cavitación acústica que es proporcionado por la aplicación de ultrasonido. Es claro la interacción entre las variables estudiadas con una significancia estadística de  $p < 0.05$ , tanto la superficie de respuesta (SR) (Figura 4.5) y el gráfico de contorno (Figura 4.6) son utilizados para poder juzgar la relación entre las variables. Las diferentes formas del gráfico de contorno indican la significancia que las variables pudieran tener. Gráficos de contorno circular puede significar que las variables pueden ser despreciadas y un gráfico de contorno elíptico sugiere que la interacción entre las variables es altamente significativo ( $p < 0.05$ ) (Dahmoune y cols., 2014). La forma

de la SR (Figura 4.5) y del gráfico de contorno (Figura 4.6) indican que la eficacia de extracción de compuestos fenólicos depende de las variables estudiadas, obteniendo mejores resultados con una aplicación de ultrasonido de 30 minutos y 100 % de energía suministrada.

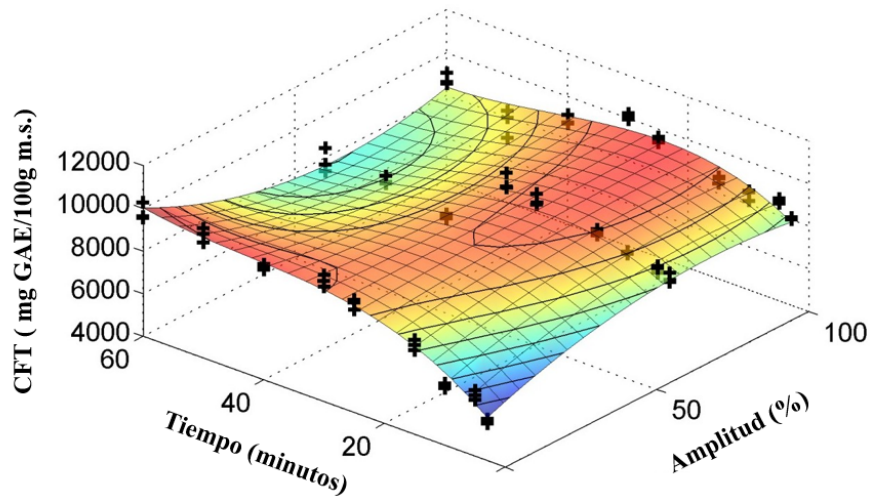


Figura 4.5. Superficie de respuesta del CFT sobre los efectos de la amplitud y el tiempo de aplicación de ultrasonido.

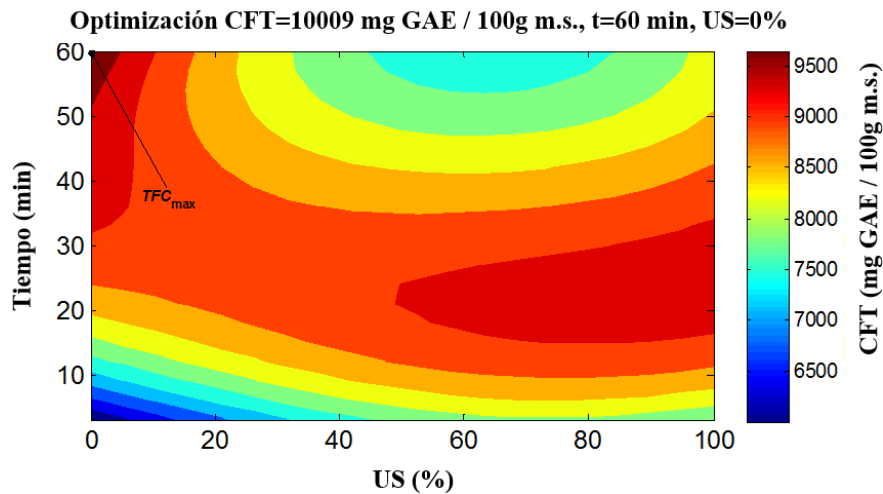


Figura 4.6. Gráfico de contorno equivalente a la SR de la Figura 4.5.

El modelo establecido para el CFT en función a la energía suministrada (amplitud %)

y el tiempo de extracción es el que se muestra en la Ecuación 4.1.

$$CFT = b1 + b2US + b3t + b4US^2 + b5US^2 + b6t^2 + b7US^2t + b8t^3 \quad (4.1)$$

En donde:

$b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7$  y  $b8$  son los coeficientes del modelo matemático

$US$  es la amplitud aplicada (%)

$t$  es el tiempo de extracción (minutos)

Los valores obtenidos para los coeficientes del modelo son lo que se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Coeficientes del modelo matemático del CFT.

Coeficiente	Valor
$b1$	5249.5
$b2$	64.782
$b3$	269.87
$b4$	-2.3344
$b5$	-0.44384
$b6$	-5.9861
$b7$	0.017172
$b8$	0.046841

Para determinar si el modelo matemático aplicado es significativo, se utilizó una significancia estadística de  $p < 0.05$ , la cual indica que aproximadamente el 5% de las variaciones no son explicadas por el modelo. Para un modelo estadísticamente aceptable, el coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) debe estar cercano al estimado ( $R^2$ ). En nuestro modelo el  $R^2$  fue igual a 0.77619 y el  $R^2_{aj}$  fue de 0.75473.

En este sentido, el  $R^2$  estimado es cercano al  $R^2_{aj}$  por lo tanto confirma que el modelo es significativo. El ajuste entre los datos estimados y los datos experimentales se puede observar en la Figura 4.7, los valores obtenidos de los coeficientes de correlación significan que existe una correlación aceptable con el modelo predicho, como también que existe un alto grado de precisión y confiabilidad en los datos experimentales. El MRE (error de estimación relativa media) fue de 4.5568 lo cual es menor que el que el error establecido para el modelo aplicado (MRE=5), esto significa que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales.

Finalmente, las condiciones óptimas del proceso de extracción del contenido fenólico son  $t=60\text{min}$ ,  $US=0\%$  y un  $CFT= 10009 \text{ mg GAE}/100\text{g m.s.}$

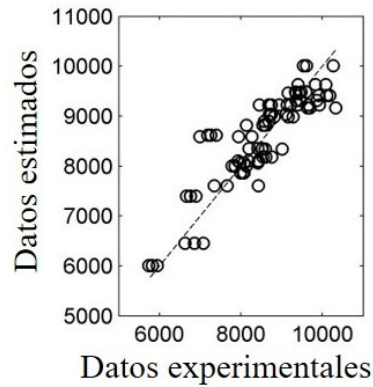


Figura 4.7. Ajuste del modelo matemático sobre los datos del CFT (experimentales y estimados).

De la misma manera, se realizó una SR para la CA con el método de ABTS debido a que se encontró mayor correlación entre el CFT con este método (Figura 4.4 (B)), además de que la hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) presenta mayor afinidad por el mismo. Se estudió la relación entre la variable dependiente (CA) con las dos variables independientes (tiempo de extracción y amplitud), en la SR (Figura 4.8) se puede observar que la CA aumenta con el tiempo de extracción y la energía suministrada, tal como se ha mencionado anteriormente. La forma del gráfico de contorno (Figura 4.9) hace entender que existe una interacción entre las tres variables estudiadas, obteniendo una mayor CA a los 30 minutos con una amplitud del 100 %.

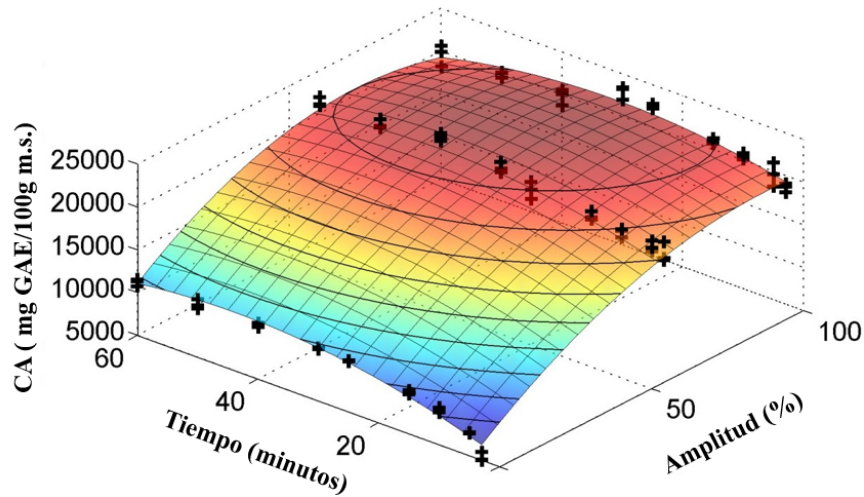


Figura 4.8. Superficie de respuesta de la CA (ABTS) sobre los efectos de la amplitud y el tiempo de aplicación de ultrasonido.

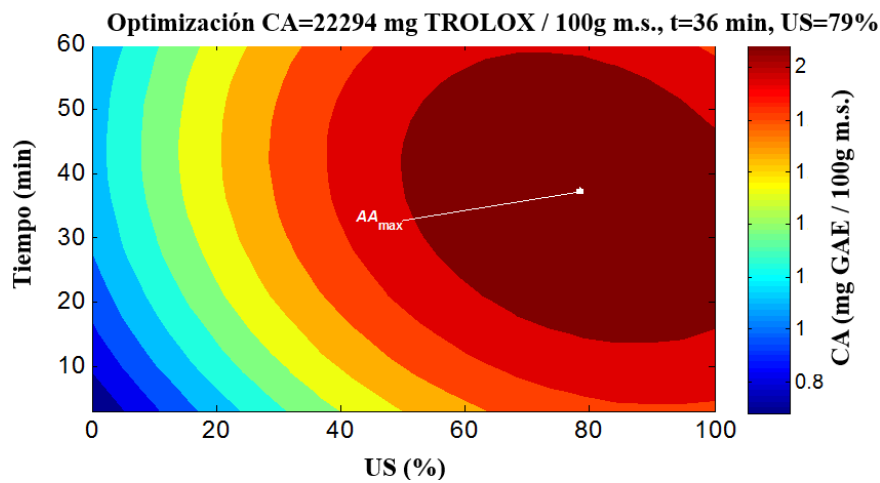


Figura 4.9. Gráfico de contorno equivalente a la SR de la Figura 4.8.

El modelo establecido para la CA por el método de ABTS es el que se muestra en la Ecuación 4.2.

$$CA = b_1 + b_2US + b_3t + b_4US^2 + b_5t^2 + b_6US^2t \quad (4.2)$$

En donde:

$b_1, b_2, b_3, b_4, b_5$  y  $b_6$  son los coeficientes del modelo matemático

$US$  es la amplitud aplicada (%)

$t$  es el tiempo de extracción (minutos)

Los valores obtenidos para los coeficientes del modelo son lo que se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Coeficientes del modelo matemático de la CA.

Coeficiente	Valor
$b_1$	6056.1
$b_2$	269.98
$b_3$	260.31
$b_4$	-1.4337
$b_5$	-2.9378
$b_6$	-0.0075967

Se utilizó la misma significancia estadística que para el modelo del CFT, con una  $p < 0.05$ . El  $R^2$  fue igual a 0.97275 y el  $R^2_{aj}$  fue de 0.97093, por lo tanto quiere decir que el modelo es altamente significativo, ya que aproximadamente el 3% de las variaciones no son explicadas por el modelo. El MRE fue de 4.7418, el cual de la misma manera que para el CFT es menor que el establecido. Por lo tanto los datos experimentales se ajustan con el modelo, tal como se observa en la Figura 4.10.

Finalmente, las condiciones óptimas del proceso de extracción para la capacidad antioxidante son  $t=36\text{min}$ ,  $US=79\%$  con una  $CA= 22294\text{ mg TROLOX}/100\text{g m.s.}$

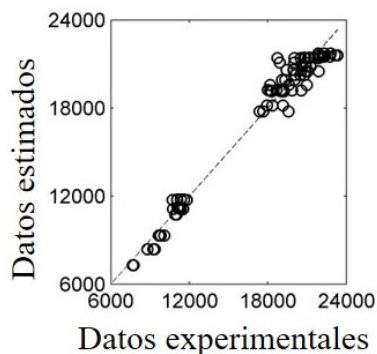


Figura 4.10. Ajuste del modelo matemático sobre los datos de la CA (experimentales y estimados).

La modelación y la optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos ha sido estudiado por diversos autores los cuales reportaron resultados similares. Dahmoune y cols. (2014) estudiaron hojas de *P. lentiscus* L. optimizando su

proceso de extracción asistido con microondas por medio de una SR, encontrando que una concentración de etanol mayor al 40 % tiene mayor eficacia. Sharmila y cols. (2016) estudiaron hojas de *Cassia Auriculata* optimizando su proceso de extracción asistido con ultrasonido con una SR utilizando cuatro variables (pH, tiempo, concentración del disolvente y potencia eléctrica de ultrasonido), encontrando que el CFT con mayor CA se presentó con menor tiempo de extracción. Dahmoune y cols. (2015) estudiaron hojas de *P. lentiscus* L. y encontraron sus condiciones óptimas para su proceso de extracción asistido con ultrasonido, hallaron una alta validación de sus SR realizadas y concluyeron que son una favorable herramienta para predecir el comportamiento del CFT con la aplicación de ultrasonido.

# V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones y recomendaciones del presente trabajo fueron establecidas en función a los resultados obtenidos de la investigación, ambos se presentan en los siguientes apartados.

## 5.1. Conclusiones

- La extracción de compuestos fenólicos asistida con ultrasonido de alta intensidad puede ser considerada una técnica más eficaz en comparación a una técnica convencional, debido a que se logró obtener la misma cantidad de compuestos fenólicos en menor tiempo de extracción (máximo rendimiento CFT: ECV a los 60 min y EAU en ambas amplitudes a los 30 minutos). No obstante, la aplicación de ultrasonido resultó ser favorable en tiempos cortos de extracción, ya que, con el paso del tiempo se generan reacciones secundarias que provocan una disminución en el rendimiento de CFT.
- Las amplitudes aplicadas (100 y 60 %) no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Al aplicar 100 % de energía las burbujas de gas pueden crecer demasiado grandes para colapsar, o colapsar débilmente reduciendo el efecto de la cavitación, por lo que no es necesario suministrar el 100 % de energía, lo que podría implicar un ahorro energético y por lo tanto económico en el proceso de extracción.
- La capacidad antioxidante (CA) de los extractos presentaron mejores resultados con el método de ABTS. La hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) es de carácter lipofílico y el método de ABTS es favorable para compuestos fenólicos de dicha naturaleza.
- Los modelos matemáticos establecidos mostraron una alta validación estadística ( $p < 0.05$ ), los datos predecidos se ajustaron favorablemente con los datos

experimentales. Cierta porcentaje de las variaciones del proceso no son explicadas por los modelos, siendo el 22 % para el CFT y del 3 % para la CA.

- Se establecieron las condiciones óptimas para el mayor rendimiento de CFT y CA en función al modelo matemático. Las condiciones para el máximo rendimiento de CFT (10009 mg GAE/100g m.s.) fue para un tiempo de 60 minutos y una amplitud del 0 %, mientras que para la CA (22294 mg TROLOX/100g m.s.) las condiciones óptimas fueron de 36 minutos con un 79 % de amplitud. No obstante, a pesar de esas condiciones óptimas los tiempos de extracción fueron mayores que con la técnica del ultrasonido, por lo tanto se concluye que la mejor opción sigue siendo el ultrasonido con un tiempo de extracción de 30 minutos.
- La hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) es, por lo tanto, un subproducto que tiene gran potencial para ser valorizada a través de la extracción de compuestos fenólicos.

## 5.2. Recomendaciones

Con el fin de poder ampliar la investigación del presente trabajo se plantearon algunas recomendaciones que pueden ser estudiadas en un futuro.

- Determinar la influencia de otras variables involucradas en el proceso de extracción de compuestos fenólicos asistido con ultrasonido de alta intensidad, como la temperatura, el tipo de disolvente y sus concentraciones.
- Realizar la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos predominantes individualmente mediante una técnica cromatográfica.
- Estudiar la viabilidad de aislar y purificar los compuestos fenólicos de los extractos de hoja de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*), para poder incorporarlos en algún producto de la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética.

# Bibliografía

- Acosta Díaz, E., Hernández Torres, I., León, A., y Humberto, I. (2012). Evaluación de aguacates criollos en nuevo león, méxico: región sur. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3, 245-257.
- Ahmad Qasem, M., Cánovas, J., Barraón Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J., y García Pérez, J. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 120-129.
- Alcaraz, M., Thorp, T., y Hormaza, J. (2013). Phenological growth stages of avocado (persea americana) according to the bbch scale. *Scientia Horticulturae*, 164, 434-439.
- Angón Galván, P., Sánchez, N., y Hernández, C. (2006). Índices para la determinación de las condiciones óptimas de maduración de un fruto. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 10, 3-8.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis of aoac international. *AOAC International*.
- Avella Gutiérrez, D., García Ortiz, C., y Mendoza-Cisneros, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. En *Memorias del simposio de metrología. universidad autónoma de querétaro. centro nacional de querétaro*.
- Azuola, R., y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (eua). *Tecnología en marcha*, 20(4), 30-40.
- Benzie, I., y Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of antioxidant power: The frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., y Sroka, Z. (2013). Antioxidant activity of selected phenols estimated by abts and frap methods. *Postepy Hig Med Dosw*, 67, 958-963.
- Bo, H., Ling-Li, Z., Xue-Yang, Y., Jin, L., Jun, J., Xue-Ling, G., y Peng-Xiang, Y. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (vaccinium ashei) wine pomace. *Food chemistry*, 204, 70-76.
- Bressani, R., Rodas, B., y Ruiz, A. (2009). La composición química, capacidad anti-

- oxidativa 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.*
- Buelvas Salgado, G., Patiño Gómez, J., y Cano Salazar, J. (2012). Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass (persea americana mill) utilizando tratamiento enzimático. *Revista lasallista de investigación*, 9(2-201), 138-150.
- Cárcel, J., Benedito, J., Bon, J., y Mulet, A. (2007). High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, 76, 611-619.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., y Barroso, C. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano Tixier, A., y Abert Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. a review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Corona, E., García Pérez, J., Santacatalina, J., Ventanas, S., y Benedito, J. (2014). Ultrasonic characterization of pork fat crystallization during cold storage. *Food Engineering & Physical Properties*, 79, 829-838.
- Corona, E., Martínez, N., Ruíz, H., y Carranza, J. (2016). Ultrasound assisted extraction of phenolics compounds from chia (*salvia hispanica* l.) seeds and their antioxidant activity. *Agrociencia*, 50, 403-412.
- Cyboran, S., Bonarska Kujawa, D., Pruchnik, H., Zylka, R., Oszmiaski, J., y Kleszczynska, H. (2014). Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International*, 65, 47-58.
- Dahmoune, F., Reminia, H., Dairia, S., Aouna, O., Moussia, K., Bouaoudia-Madia, N., ... Madania, K. (2015). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *p.lentiscus* l. leaves: Comparative study of artificial neural network(ann) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops and Products*, 77, 251-261.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussia, K., Reminia, H., Cherbalc, A., y Madania, K. (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds:microwave-assisted extraction optimized and compared withultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 61, 31-40.

- Da Porto, C., Porretto, E., y Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*vitis vinifera* l.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076-1080.
- De Sarabia, R., Gallego Juárez, E., y Montoya Vitini, J. (2002). *Procedimiento de separación o extracción con fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de alta intensidad*. (n.º 2199683).
- Do Nascimento, E., Mulet, A., Ramírez Ascheri, J., Piler De Carvalho, C., y Carcel, J. A. (2016). Effects of high-intensity ultrasound on drying kinetics and antioxidant properties of passion fruit peel. *Journal of Food Engineering*, 170, 108-118.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., y Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using dpph, abts, frap, sod, and orac assays. *J. Agricultural and food chemistry*, 57, 1768-1774.
- Fu, L., Bo Tao, X., Xiang Rong, X., Ren You, G., Yuan, Z., En Qin, X., y Hua Bin, L. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., y Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*hippophae rhamnoides* l.) during maturation. *J. Agric. Food Chem*, 1485-1490.
- Ghafoor, K., Choi, Y., Jeon, J., y Jo, I. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4994.
- González Centeno, M., Comas Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., y Simal, S. (2014). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*vitis vinifera* l.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Gramshaw, J., y Sinyinda, S. (1998). Volatiles of avocado fruit. *Food Chemistry*, 62, 483-487.
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Jorjong, S., Butkhup, L., y Samappito, S. (2015). Phytochemicals and antioxidant ca-

- pacities of mao-luang (*antidesma bunius* l.) cultivars from northeastern thailand. *Food Chemistry*, 181, 248-255.
- Khemakhem, I., Ahmad Qasem, M., Barrajo Catalán, E., Micol, V., García Pérez, J., Ayadi, M., y Bouaziz, M. (2017). Kinetic improvement of olive leaves bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 466-473.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., y Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 3954-3952.
- Khoddami, A., Wilkes, M., y Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- Kulkarni, V., y Rathod, V. (2014). Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from mangifera indica leaves. *Ultrasonic Sonochemistry*, 21, 606-611.
- Kuskoski, E., Asuero, A., García Parilla, M., Troncoso, A., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24, 691-693.
- Lazar, L., Talmaciu, A., Volf, I., y Popa, V. (2016). Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from picea abies bark. *Ultrasonics sonochemistry*, 32, 191-197.
- Martínez Ramos, T. (2015). *Evaluación de la viabilidad del uso de ultrasonidos de potencia para la extracción de compuestos fenólicos a partir de la cáscara de mango manila (mangifera indica l.)* (Tesis Doctoral no publicada). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez Rubio, M., y Usaquén Castro, X. (2005). *Evaluación del efecto de pre-tratamientos con ultrasonido sobre el nivel de extracción y la actividad de sustancias antioxidantes contenidas en el bagazo de la uva (vitis vinifera)*. (Tesis Doctoral no publicada). Universidad de La Sabana.
- Mason, T., Chemat, F., y Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15, 237-247.
- Mier, H., y Cáez, G. (2011). Contenido de polifenoles, carotenos y capacidad antioxidante en frutos de uchuva (*physalis peruviana*) en relación a su estado de maduración. *Revista ReCiTeIA Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 1.

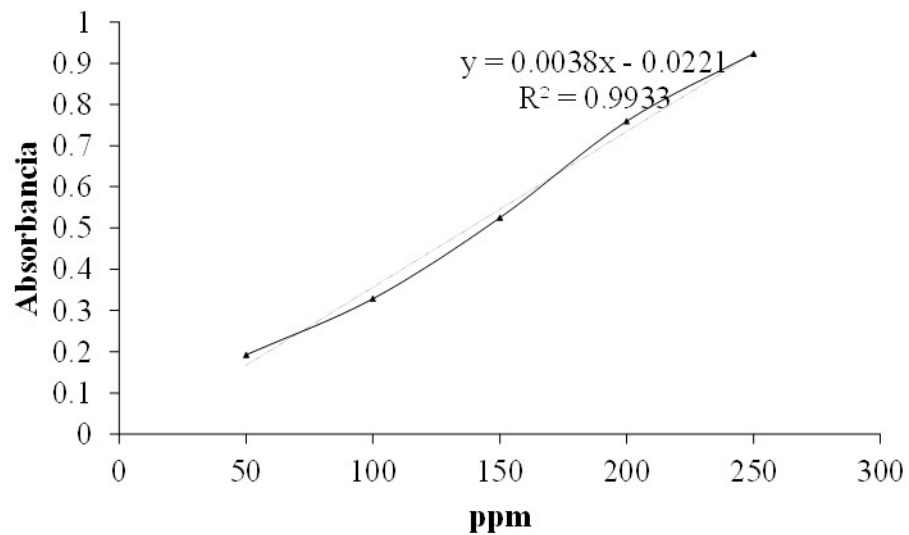
- Miller, N., y Rice Evans, C. (1996). Factors influencing the antioxidant activity determined by the abty radical cation assay. *Free Radic Res*, 26, 195-199.
- Muñoz, A., Bottia, E., Cardenas, C., Patiño, J., Diaz, O., Martínez, J., ... Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo sobre la capacidad de atrapamiento del cationradical abts+. por los aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de trans-anetol y estragol. *Scientia et Technica*, 1, 117-120.
- Muñoz Acevedo, A., Kouznetsov, V., y Stashenko, E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41, 287-294.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, A., y Åkesson, B. (2005). Comparison of the 2, 2-azinobis-3-ethylbenzotiazol-6-sulfonic acid (abts) and ferric reducing anti-oxidant power (frap) methods to asses the total anti-oxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular nutrition & food research*, 49, 239-246.
- Noura, V., Trandafir, I., y Cosmulescu, S. (2014). Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*ribes nigrum* l.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. *Industrial Crops and Products*, 53, 133-139.
- Ojito Ramos, K., Herrera Sánchez, Y., Vega Pérez, N., y Portal Villafaña, O. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos y de hidroalcohólicos de hoja de citrus spp. (rutaceae). *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 17, 368-379.
- Ordoñez Gómez, E., León Areválo, A., Reátegui Días, D., y Sandoval Chacón, S. (2012). Cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante en hojas, corteza, flores y fruto de los variedades de guayaba (*psidium guajava* l.). *Revista Investigación y Amazonía*, 1, 48-52.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J., y Camara, J. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.
- Porras Loaiza, A., y López Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 121-134.
- Prieto, R., González, G., y Abella, J. (2011). Extracción con ultrasonido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de uva variedad isabella (*vitis labrusca*).

- ReCiTeIA*, 11.
- Pu Jun, X., Li Xin, H., Cai hong, Z., y Yao lei, Z. (2015). Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*olea europaea* l.) extracts and their structure activity relationships. *Journal of Functional Foods*, 16, 460-471.
- Quintanar Escorza, M., y Calderón Salinas, J. (2009). La capacidad antioxidante total. bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28, 89-101.
- Rao, P., y Rathod, V. (2015). Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of andrographolide from *andrographis paniculata* using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 66, 312-318.
- 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 & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Repo De Carrasco, R., y Encina Zelada, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev Soc Quím Perú*, 74, 108-124.
- Rincón Hernández, C., Sánchez Pérez, J., y Espinosa García, F. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 395-412.
- Rodrigues, S., Pinto, G., y Fernandes, F. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 95-100.
- Seabra, I., Braga, M., Batista, M., y De Sousa, H. (2010). Effect of solvent ( $\text{CO}_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$ ) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54, 145-152.
- Segovia, F., Corral-Pérez, J., y Almajano, M. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 85, 213-220.
- Shahidi, F., Janitha, P., y Wanasundara, P. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32, 67-103.
- Sharmila, G., Nikithaa, V., Ilaiyarasia, S., Dhivyaa, K., Rajasekara, V., Kumarb, N., ... Muthukumarana, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84, 13-21.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez Caravaca, A., Fernández Gutiérrez, A., y Segu-

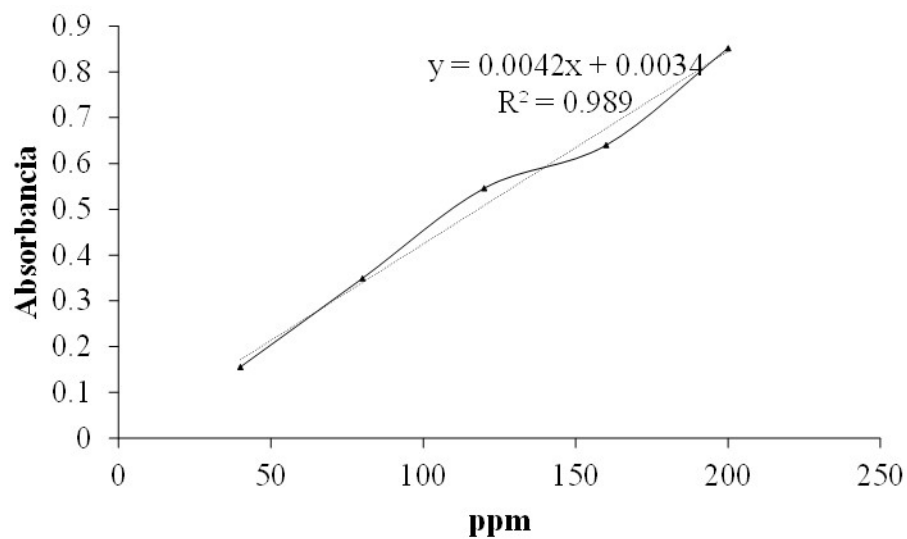
- ra Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92–108.
- Tao, Y., Zhang, Z., y Sun, D. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics sonochemistry*, 21, 1461-1469.
- Torres Gurrola, G., Montes Hernández, S., y Espinosa García, F. (2009). Patrones de variación y distribución geográfica en fenotipos químicos foliares de persea americana var. drymifolia. *Rev. Fitotec. Mex.*, 32, 19-30.
- Ulloa, J., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J., y Ulloa Rangel, B. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista Fuente nueva época*.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84.
- Villa Rodríguez, J., Molina Corral, F. J., Ayala Zavala, J., Olivas, G., y González Aguilar, G. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of hass avocado. *Food Research International*, 44, 1231-1237.
- Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T., y Lovatt, C. (2016). Developmental differences in antioxidant compounds and systems in normal and small-phenotype fruit of ŠhassŠ avocado (persea americana mill.). *Scientia Horticulturae*, 206, 15–23.
- Ya Qin, M., Jian Chu, C., Dong Hong, L., y Xing Qian, Y. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 57-62.

# ANEXO I: Curvas de calibración

Curva de calibración del método Folin-Ciocalteu



Curva de calibración del método FRAP



**Curva de calibración del método ABTS**