ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN SUBPRODUCTOS DE MORA Y AGUACATE:
IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE SU POTENCIAL EN EL DESARROLLO DE
INGREDIENTES CON APLICACIONES INDUSTRIALES.

Antioxidant activity in blackberry and avocado byproducts: preliminary identification of its potential in the development of ingredients with industrial applications.

**SARA PAOLA ISAZA MISAS, MARIA ALEJANDRA JARAMILLO ROJAS,
CRISTINA LUCÍA MORA ARANGO.**

Resumen

La industria alimentaria genera una gran cantidad de desechos y subproductos a lo largo de la cadena de producción; estas fracciones son excelentes fuentes de compuestos bioactivos como: constituyentes fenólicos, carotenoides, vitaminas y aceites, con un alto potencial de valorización como nuevos ingredientes alimentarios. El objetivo de trabajo es evaluar la actividad antioxidante de los subproductos de mora y aguacate, por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo o más conocido como DPPH; metodología que permite determinar bioactividad de muestras de tipo polar. Se utilizaron los subproductos agroindustriales provenientes de aguacate y mora. El tratamiento preliminar del material vegetal consistió en secado y molienda en condiciones específicas, la extracción se realizó mediante ultrasonido utilizando agua como solvente. Los extractos obtenidos se fraccionaron por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético y agua en proporción 100:11:11:26. Por TLC se agruparon fracciones similares y por aspersion de DPPH al 0,05% se evidenciaron de manera preliminar las fracciones activas. Finalmente, con la medición cuantitativa por DPPH, se encontró un porcentaje de actividad

captadora de radicales libres correspondiente a 10.6 ± 0.2 % para cáscara de aguacate, 13.0 ± 0.1 % para semilla de aguacate y 18.5 ± 0.3 % en las semillas de mora, lo cual al compararse experimentalmente con la actividad captadora del flavonoide Rutina (34.4 ± 0.2 %) permite evidenciar el potencial antioxidante de las fracciones obtenidas. Los resultados de actividad biológica encontrados en los residuos de frutas no comestibles muestran ser una fuente importante para la extracción de compuestos de interés para la industria cosmética y farmacéutica.

Palabras clave: Aguacate, mora, compuestos fenólicos, actividad antioxidante.

Abstract

The food industry generates a large amount of waste and by-products throughout the production chain; These fractions are excellent sources of bioactive compounds such as: phenolic constituents, carotenoids, vitamins and oils, with a high potential for valorization as new food ingredients. The objective of the study is to evaluate the antioxidant activity of blackberry and avocado by-products, by the method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil or better known as DPPH; methodology that allows to determine bioactivity of polar type samples. Agroindustrial byproducts from avocado and blackberry were used. The preliminary treatment of the vegetal material consisted of drying and grinding under specific conditions, the extraction was done by ultrasound using water as a solvent. The obtained extracts were fractionated by column chromatography using as a stationary phase silica gel and mobile phase: ethyl acetate: formic acid: acetic acid and water in a ratio of 100: 11: 11: 26. By TLC, similar fractions were grouped and, by spray of DPPH at 0.05%, the active fractions were preliminarily evidenced. Finally, with the quantitative measurement by DPPH, a percentage of free radical scavenging activity was found corresponding to 10.6 ± 0.2 % for avocado peel, 13.0 ± 0.1 % for avocado seed and 18.5 ± 0.3 % for blackberry seeds, which, when compared experimentally with the activity of the Rutin flavonoid (34.4 ± 0.2 %), shows the antioxidant potential of the fractions obtained. The results of biological activity found in the residues of inedible fruits show to be an important

source for the extraction of compounds of interest for the cosmetic and pharmaceutical industry.

Keywords: Avocado, blackberry, phenolic compounds, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día el avance en el desarrollo de las industrias produce una alta cantidad de subproductos, a consecuencia de esto es necesario una implementación de técnicas o métodos que nos permitan aprovechar de una manera positiva estos productos; en la producción de los alimentos, además del producto deseado, se generan grandes cantidades de residuos catalogados como desechos por que no cumplen con la norma para ser comercializados [1].

En Colombia las empresas generan importantes cantidades de residuos no comestibles, debido a que reutilizar o disponer de la manera correcta los subproductos les generan un alto costo, por lo que implementar un plan que aporte una mejor utilización de estos subproductos, no lo consideran como la mejor opción, por esto se les hace más fácil descartarlos en la basura que finalmente van a rellenos sanitarios aportando al aumento de desperdicios.

En el país, alrededor del 70 % (en peso) de las frutas y verduras se convierten en subproductos o no comestibles, debido, entre otros aspectos, a las prácticas indebidas, retos asociados a la cadena de distribución de frío o un transporte inadecuado que daña los frutos [2].

La mora y el aguacate poseen una gran cantidad de metabolitos como son los polifenoles y dentro de estos los flavonoides que gracias a su estructura química se convierten en productos altamente beneficiosos y activos para el hombre. En las cáscaras, semillas del aguacate y bagazo de la mora se encuentran vitaminas, antioxidantes y minerales, que sugieren que los residuos orgánicos son una óptima materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos y cosméticos. Los compuestos fenólicos han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones vasodilatadoras, y prevención de

enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos [3]. Los flavonoides se utilizan como suplemento alimenticio para animales y humanos, ingredientes de bebidas refrescantes y confites, desodorización, desinfección, inhibidores de trombosis, antiinflamatorios, inhibidores de cáncer, antialérgicos, edulcorantes y antioxidantes. Al igual que los flavonoides, los carotenoides también poseen esta propiedad antioxidante [4].

A pesar de que los subproductos son una fuente importante de compuestos que pueden ser de interés por sus propiedades biológicas, todavía en muchas industrias se descartan como desechos y no se aprovechan de manera óptima. Una alternativa, frente a ésta problemática es el desarrollo de ingredientes, implementando inicialmente técnicas de caracterización que permitan conocer la composición química de los subproductos y más adelante poder incorporar dichos ingredientes en la elaboración de alimentos y productos farmacéuticos para uso humano o veterinario, lo cual se convierte en una oportunidad para aquellas empresas que realizan una separación adecuada de los residuos que generan, garantizando así

el aprovechamiento sostenible de los recursos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las frutas frescas de la mora y el aguacate son recolectadas del mercado local. Antes de las extracciones, se utiliza 1 lb de frutas de la mora las cuales se almacenan en el refrigerador a -18°C para mantener inactivas las reacciones enzimáticas que pueden ocurrir, hasta su uso posterior. Las frutas de mora congeladas se muelen en la licuadora para obtener un puré que posteriormente se usa para las extracciones. De igual manera para la otra preparación se usan 5 aguacates Hass los cuales previamente se separan en 3 fracciones (pulpa, cáscara y semilla) de las que se usan dos últimas únicamente.

Sustancias químicas y reactivos.

A continuación, se presentan los solventes utilizados en el proceso ácido fórmico 85%, ácido acético glacial, acetato de etilo, metanol, agua, Sílica gel y 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).

Lavado de las muestras

Se limpia con abundante agua el material recolectado del subproducto de aguacate con el fin de retirar los residuos de pulpa que puedan quedar adheridos a él. Del mismo modo se procede a lavar el bagazo de la mora recolectado.

El material vegetal se extiende en bandejas metálicas cubiertas con papel kraft, para posteriormente llevarlas a la estufa e iniciar con el procedimiento de secado.

Secado

Sobre una bandeja metálica cubierta con papel kraft se coloca el material vegetal, para ser introducido en la estufa (MERMER) a una temperatura de 40°C. El material vegetal se deja por un tiempo de 3 días, hasta observar que el material está totalmente seco y garantizar que no existan residuos de agua en él.

Molienda

Se utiliza un molinillo (JATA) para el proceso de molienda, aquí se procura dejar el tiempo suficiente hasta que se logre observar un tamaño de partícula adecuado (casi polvo). El material se retira del molinillo y se deposita en un

beaker; se almacena en un lugar seguro, seco y fuera de la luz, para luego en días posteriores proceder a la extracción.

Extracción de compuestos fenólicos

Se pesa 5,0 g del material previamente secado y molido en la balanza analítica (precisa); en tubos falcón se adicionan los 5.0 g de ambas muestras y se completa con etanol a 50 mL. En un agitador orbital se agita cada muestra por 2 minutos. La extracción se realiza por triplicado en un equipo de ultrasonido de 70 W de potencia y 40 kHz de frecuencia, se usa como solvente agua a una temperatura de 40°C, las muestras se sumergen en el baño de ultrasonido; se dejarán en el equipo por 5 minutos. Posteriormente el extracto se filtra a través de un papel filtro banda negra.

Los extractos se dejan en la estufa a 50°C para que el solvente se evapore en su totalidad.

Caracterización del extracto.

Antes de hacer la caracterización del extracto, las muestras de cáscara y semilla del aguacate y las muestras de mora se rotaevaporan en un

rotaevaporador (Heidolph) en las siguientes condiciones: 70 rpm, 40°C y 86 mbar. Este procedimiento garantiza que el solvente pueda eliminarse completamente.

Con el fin de separar e identificar los metabolitos presentes en los subproductos vegetales se utiliza cromatografía de columna; utilizando como fase estacionaria sílica gel y metanol y como fase móvil los siguientes solventes acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético y agua en las proporciones (100:11:11:26). De este proceso se obtiene un total de 3 fracciones de la mora y 4 de aguacate.

Estas fracciones que se obtienen se rotaevaporaron a 70 rpm y a una temperatura de 46.9°C.

Por otro lado, se realiza cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de mora y aguacate, se aplica el extracto de mora y aguacate en la placa utilizando el reactivo de rutina con una pureza de $\geq 94\%$ como patrón de referencia (estándar).

Luego de la aplicación se introduce la placa en la cámara cromatográfica que contiene como fase móvil Acetato de

etilo: Metanol: Ácido acético: Agua (100:11:11:26).

Se retira la placa cuando alcance el límite del solvente. En una luz ultravioleta a 365 nm se observa la muestra y se mide los Rf de cada componente.

Evaluación de la actividad captadora de radicales libres de extractos vegetales.

La actividad captadora de radicales libres de los extractos se evalúa mediante la metodología descrita por JaeMin Lee, et al. (2017) con ligeras modificaciones. La estabilización del radical DPPH se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Decoloración} = 1 - \left(\frac{A_m - A_{b,m}}{A_b} \right) \times 100$$

RESULTADOS

La actividad captadora de radicales libres de los extractos de mora y aguacate fue medida espectrofotométricamente utilizando el DPPH, un radical libre estable de coloración violeta en solución metanólica que absorbe radiación fuertemente a 517 nm y contiene un

electrón desapareado, el cual es estabilizado en presencia de antioxidantes primarios, resultando una decoloración estequiométrica con respecto al número de electrones donados, de tal manera que la interacción de un potencial antioxidante con el DPPH depende de su conformación estructural con requerimientos relacionados con la presencia de grupos hidroxilo y estructuras que soportan el radical libre recientemente formado [5].

Los resultados del porcentaje de decoloración en las muestras de mora y aguacate se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 1. Resultados de la evaluación de la actividad captadora de radicales libres de los extractos de los subproductos agroindustriales de mora y aguacate, mediante el método del DPPH.

% DECOLORACIÓN RUTINA	34.440
------------------------------	--------

	Aguacate Cáscara	Aguacate Semilla	Mora fracción 2
% Decoloración	10,6	13,0	18,5
SD	0,02	0,01	0,03

DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos cuantificados en los extractos de las frutas son de gran importancia debido a que constituyen un grupo de metabolitos secundarios que se consideran antioxidantes naturales con múltiples beneficios biológicos para el ser humano, tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas [6]. En las cáscaras de aguacate se ha encontrado que los principales compuestos presentes son en su mayoría procianidinas derivadas de epicatequina. En las semillas de aguacate se encuentran principalmente: dímeros de flavanoles, polifenoles y antocianinas [7].

En las frutas de mora se encuentra una gran variedad de polifenoles: antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos [8].

Los resultados de la medida de la actividad antioxidante por el método DPPH se pueden observar en la Tabla 1. Este ensayo determinó que el extracto de mora tuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor de $18.5 \pm 0.3 \%$, seguido de la semilla de aguacate con un

valor de $13.0 \pm 0.1 \%$ y la cáscara de aguacate con un valor de $10.6 \pm 0.2 \%$.

En un estudio reportado recientemente para un tipo de variedad de aguacate se encontró que presenta en peso seco fenoles en su mayoría con actividad antioxidante: 12.6 ± 0.3 mg/g en base seca en la cáscara y 51.6 ± 1.6 mg/g

en la semilla, los contenidos de éstos compuestos en el subproducto agroindustrial demuestran el potencial de aprovechamiento por sus propiedades antioxidantes [11].

Otro de los subproductos con gran potencial es el residuo agroindustrial de la mora, puesto que en sus frutos, antes del procesamiento se han reportado 1468.71 ± 94.53 mg/kg de antocianinas, 129.32 ± 7.88 mg/kg de flavanoles y 56.40 ± 4.23 mg/kg de elagitaninos, compuestos reconocidos por su actividad antioxidante [12].

Los resultados reportados según estudios previos realizados tienen una relación con los resultados encontrados experimentalmente, en los que se puede evidenciar que existe una relación directamente proporcional entre el contenido de polifenoles y la actividad

captadora de radicales libres en los extractos vegetales.

A partir de esta observación se puede inferir que los subproductos de mora contienen una gran cantidad de polifenoles en su composición química los cuales son los responsables de proporcionar una mayor actividad captadora de radicales a diferencia de los subproductos de aguacate, por lo tanto se puede confirmar que los subproductos de mora van a presentar un comportamiento más eficaz como antioxidante en comparación con los subproductos del aguacate.

Por otro lado la rutina como compuesto de referencia, es un flavonoide que en las condiciones experimentales se encontraba puro, por lo tanto presentó una mayor actividad captadora de radicales libres en los análisis que se realizaron a diferencia de los valores reportados de los extractos debido a que no hay presencia de interferencias.

Sin embargo con el análisis por el método DPPH no podemos asegurar que los subproductos de mora tengan una capacidad antioxidante mayor en comparación con los subproductos de aguacate ya que este ensayo presenta

una gran desventaja al interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; adicionalmente el DPPH es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH•, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad. Por otro lado la exposición de los subproductos al medio ambiente también pueden conducir a la pérdida de actividad antioxidante debido a la degradación del compuesto durante el proceso.

CONCLUSIONES

La actividad antioxidante de los extractos de los subproductos de mora y aguacate se logra evidenciar mediante

la evaluación de la actividad captadora de radicales libres utilizando el método del DPPH, donde los resultados demuestran que los componentes fenólicos presentes en los subproductos son fuertes agentes estabilizadores de radicales libres.

Se logró identificar que los extractos del subproducto de mora presentan una mayor actividad captadora de radicales libres en comparación a los extractos de aguacate, esto se explica con relación al mayor contenido de polifenoles, especialmente antocianinas que están presentes en esta fuente vegetal.

Este estudio representa un soporte inicial en la obtención de ingredientes de interés en la industria farmacéutica, cosmética o de alimentos y abre la posibilidad de realizar estudios y ensayos adicionales que permitan entender su potencial real como ingredientes funcionales y asegurar su calidad para la incorporación en productos para el consumo humano.

BIBLIOGRÁFICAS

[1] Méndez, R. 1995. Aprovechamiento de subproductos agropecuarios. Unisur, Santafé de Bogotá. 336 p.

- [2] (2016,06 de julio). La industria le pone el ojo a los residuos de mora y aguacate. Semana. Recuperado de <https://sostenibilidad.semana.com/impacto/articulo/residuos-de-mora-y-aguacatecon-potencial-para-la-industriafarmaceutica/35521>
- [3] HAVSTEEN BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. En: Pharmacology and Therapeutics. 2002. Vol. 96, No. 2-3. p.67-202.17. SKREDE G, WROLSTAD RE. Flavonoides from Berries and Grapes. In: Shi J, Mazza G, Le Maguer M, eds. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C: CRC Press; 2002:71-133.
- [4] Martinez, S. Gonzalez, J. et al. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.
- [5] Nanjo F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai & Y. Hara (1996) Free Rad. Biol. Med. 21: 895-902.
- [6] Tijburg, L.; Wiseman, S.; Meijer, G.; Weststrate, J. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. Atherosclerosis. 1997. 135(1): 33-47.
- [7] Bdigital.unal.edu.co. (2014). Actividad antioxidante de los residuos del aguacate Hass (Persea americana Mill. var Hass) sometidos a extracciones clásicas y a fluidos presurizados. [online] Available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49408/1/Tesis%20Maestria%20Wilson%20Polania.pdf> [Accessed 15 May 2019].
- [8] Collado, J. 2011. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES EN ZUMOS DE FRUTAS ROJAS. Disponible en: <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/2015/tfm86.pdf?sequence=1>
- [9] VALERIE, H.; GIMENO, F. N. 1953. Estudio fitoquímico toxicológico de los frutos de aguacate (Persea americana C. Bauhin, Pinax 441, 1623). Revista Médica de Veterinaria y Parasitología. XII(1-4): 130-165
- [11] ROSERO ROSERO, J. (2017). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS FENÓLICOS CON ACTIVIDAD

ANTIOXIDANTE A PARTIR DE RESIDUOS DE AGUACATE:

EPICARPIO Y SEMILLA (Persea americana). [online]

Sired.udenar.edu.co. Available

at:

<http://sired.udenar.edu.co/3884/1/TESIS%20FINAL%20I%20%20REVISI%C3%93N%20FACULTAD%20I.pdf> [Accessed 15 May 2019].

[12] Maya, M. 2017. Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites? *Food Chemistry* 215 (2017) 41–49.

[13] A. Fernández, 2010, productos ecológicos fabricados con residuos, eroski consumer

[14] Cury, K. Aguas, M. Martinez, A. 2017. Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. Universidad de Sucre, Facultad de Ingeniería. *Rev Colombiana Cienc Anim* ; 9(Supl):122-132.

[15] TIWARI A. Imbalance in antioxidant defence human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. . En: *Current Science*. 2001. Vol. 89, No. 9. pp.1179-1187.

[16] compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud

[17] Yespes, S. Montoya, L. Orozco, F. 2008. Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia.

[18] Cardona, J. 2002. 2500 toneladas diarias de basura buscan acomodarse. *Rev. Amb. El Reto*. 42:20-27.

[19] ¿Qué es la agroindustria? (3 de mayo de 2005). El campesino.

[20] W Polania, (2014). Actividad antioxidante de los residuos del aguacate Hass (Persea americana Mill. var Hass) sometidos a extracciones clásicas y a fluidos presurizados .

[21] Babazadeh, A. Taghvimi, A. et al. 2017. Development of new ultrasonic–solvent assisted method for determination of trans-resveratrol from red grapes: Optimization, characterization, and antioxidant activity (ORAC assay). Pag 36-42

[22] Pineda, J. Saldarriaga, D. 2005. Proceso para obtener colorantes a partir de la semilla del

aguacate. Rev universidad EAFIT.
Vol 41, pp 36-43.

[23]Arpapress.com. (2012). CHEMICAL
COMPOSITION OF PERSEA
AMERICANA LEAF, FRUIT AND SEED.

[online] Available at:
[https://www.arpapress.com/Volumes/Vol
11Issue2/IJRRAS_11_2_20.pdf](https://www.arpapress.com/Volumes/Vol11Issue2/IJRRAS_11_2_20.pdf)

[Accessed 15 May 2019].

[24]Bressani, R. (2019).
consejo nacional de ciencia y tecnología.

[online] Glifos.concyt.gob.gt.

Available at:

[http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/f
odecyt%202006.02.pdf](http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.02.pdf) [Accessed 15

May 2019].