

Compuestos fenólicos e inhibición del estrés oxidativo de un extracto metanólico de semilla de aguacate (*Persea americana* Mill).

Phenolic compounds and inhibition of oxidative stress of a methanolic extract of avocado seed (*Persea americana* Mill).

Franklin Pacheco-Coello^{1*}, Nancy Bermúdez-Fernández², María Blanco-Altuve²

1- Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos, Universidad de Carabobo, Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso” (BIOMED), Universidad de Carabobo, Venezuela.

2- Estudiante de la escuela de Bioanálisis, Asistente de Investigación. Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Palabras claves

palta
semilla
antioxidante
enoles totales
flavonoides

RESUMEN. *Persea americana* Mill, o simplemente aguacate es una de las frutas con mayor contenido en compuestos bioactivos, donde su semilla, considerada producto de desecho posee un alto potencial antioxidante que puede generar beneficios a la salud. El estudio tuvo como objetivo, determinar la concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides y evaluar la actividad antioxidante de un extracto metanólico de semillas de aguacate. Se preparo un extracto empleando metanol al 70 % y uno acuso que sirvió exclusivamente para comprar el contenido de fenoles totales y flavonoides. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, método colorimétrico propuesto por Marinova y el ensayo de estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae* (modelo biológico). El análisis arrojó una concentración de fenoles totales de $53,12 \pm 1,35$ y flavonoides $38,22 \pm 0,69$ con diferencia estadística con el extracto acuso usado como control. En relación a la actividad antioxidante se observó inhibición del estrés oxidativo inducido en *S. cerevisiae*, por parte del extracto. A pasar de ser un material considerado de desecho, estos resultados indican que la semilla de aguacate puede ser una alternativa para el consumo de compuestos bioactivos lo cual coincide con los reportado a nivel mundial.



Esta obra está bajo licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es_AR

Cómo citar este artículo: Pacheco-Coello, F., Bermúdez-Fernández, N., Blanco-Altuve, M. (2020) Compuestos fenólicos e inhibición del estrés oxidativo de un extracto metanólico de semilla de aguacate (*Persea americana* Mill).. Revista FAV-UNRC *Ab Intus* 6(3): 68-74

Artículo recibido: 26/12/2019. Artículo aceptado: 13/11/2020

***Autor para correspondencia:** Franklin Pacheco. Calle Ruiz Pineda, La Morita II, Sector Santa Rita, Maracay estado Aragua, Venezuela, CP 2103. *E-mail: fpacheco2@uc.edu.ve

Financiamiento: Este estudio fue financiando por las empresas: Hotel Bermúdez, Café “El Fuerte” y Laboratorio Biotecnológico “Saber Cell”.

Keywords	SUMMARY. <i>Persea americana</i> Mill, or simply avocado is one of the fruits with the highest content of bioactive compounds, where its seed, considered a waste product, has a high antioxidant potential that can generate health benefits. The objective of the study was to determine the concentration of total phenolic compounds, flavonoids and to evaluate the antioxidant activity of a methanolic extract of avocado seeds. An extract was prepared using 70% methanol and one claimed that it served exclusively to buy the content of total phenols and flavonoids. The Folin-Ciocalteu method, the colorimetric method proposed by Marinova, and the oxidative stress test in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (biological model) were used. The analysis showed a concentration of total phenols of 53.12 ± 1.35 and flavonoids 38.22 ± 0.69 with statistical difference with the extract used as control. In relation to the antioxidant activity, inhibition of the oxidative stress induced in <i>S. cerevisiae</i> was observed by the extract. From being a waste material, these results indicate that the avocado seed can be an alternative for the consumption of bioactive compounds, which coincides with those reported worldwide.
avocado	
seed	
antioxidant	
total phenols	
flavonoids	

INTRODUCCIÓN

Conocida en diversas partes de Suramérica como palta o aguacate, *Persea americana* Mill, es un tipo de fruta tropical que pertenece a la familia de las Lauraceae, caracterizada por ser una de las pocas frutas donde su pulpa se compone principal de lípidos, que desde el punto de vista nutricional es altamente calórica debido a su elevado contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), además de ser rica en tocoferoles, ácido ascórbico, piridoxina, β carotenos y potasio (Moreno *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2012; Geering, 2018). La semilla de esta fruta, se caracteriza por presentar una alta concentración en potasio y de compuestos fenólicos, los cuales están asociados a su efecto antioxidante que es incluso superior al observado en pulpa (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Este efecto antioxidante es atribuida principalmente al potencial quelante que les confiere su estructura química, de tal manera que dicha actividad puede deberse a sus capacidades reductoras *per se* o por influenciar el estado de oxidación/reducción (*redox*) intracelular (Prietsch *et al.*, 2014).

Considerando lo anteriormente expuesto y a los benéficos a la salud reportados a nivel mundial tales como anticancerígeno, antiparasitario, antiinflamatorio y antibacteriano y prevención de enfermedades cardiovasculares, atribuidos a la semilla de aguacate (Vivero *et al.*, 2019); el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de compuestos fenólicos totales y evaluar la actividad antioxidante por medio del ensayo de inhibición del estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal o biológico.

El material vegetal empleado correspondió a semillas de *Persea americana* Mill, variedad Hass, adquiridos de establecimientos comerciales ubicados en el sector La Morita del estado Aragua, Venezuela.

Preparación de los extractos.

Extracción asistida por microondas

Se emplearon 10 g de semillas trituradas previamente las cuales se transfirieron a un Beaker de 400 mL el cual contenía 200 mL de metanol al 70 %. Se utilizó un microondas de 900 W de potencia de salida y 2450 MHz de frecuencia por 5 min. Por

último, el extracto se filtró con papel Whatman No. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada (Kosińska *et al.*, 2012).

Por otra parte al extracto metanólico se realizó una extracción acuosa para tener una comparación de los compuestos fenólicos totales y flavonoides. Para esto se pesaron 10 g de semilla y transferidas a un Beaker de 400 mL con 200 mL de agua destilada. La mezcla hirvió 15 min, se separó el líquido de los cálices por decantación y la extracción se repitió en las mismas condiciones. La solución se filtró con papel Whatman No. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada (Reyes-Luengas *et al.*, 2015).

Determinación de fenoles o fenólicos totales.

La determinación de fenoles totales se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A 50 μL de muestra fueron adicionados a 125 μL del reactivo de Folin, y 400 μL de carbonato de sodio 7,1% (p/v), completándose con agua destilada hasta 1000 μL . Este procedimiento se realizó por triplicado. Seguidamente se prepararon 5 patrones de concentración de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a partir de una solución patrón madre de ácido gálico (fenol) de concentración 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por último realizó la lectura a 760 nm empleando el equipo de absorción molecular Génesis 20 (Thermo Scientific), y expresando los resultados como mg de GAE / g de material vegetal (MV) (Singleton y Rosi, 1965).

Determinación de flavonoides totales.

La determinación de flavonoides totales se realizó siguiendo un método colorimétrico (Marinova *et al.*, 2005): 100 μL de muestra fueron mezclados con 30 μL de NaNO_2 al 5% (p/v), 30 μL de AlCl_3 10% (p/v), 200 μL de NaOH a 1M y ajustados con agua destilada hasta un volumen final de 1000 μL , se realizó la lectura espectrofotométrica a 510 nm empleando el equipo de absorción molecular Génesis 20 (Thermo Scientific) y se comparó con la curva patrón usando como estándar (+)-catequina. Los resultados fueron expresados como mg de Catequina Equivalente (CE) / g MV.

Actividad Antioxidante (ensayo de estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*)

Este ensayo busca evaluar la capacidad de los compuestos bioactivos presentes en el extracto para promover el crecimiento de levadura cuando se somete a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Álvarez *et al.*, 2012): 1 mL solución de $4,5 \times 10^6$ células / mL de *S. cerevisiae* se incubó durante 24 h con agitación a 37 ° C con 8 mL de medio de cultivo YPD (peptona 2% p / v, glucosa 2% p / v). Después de este tiempo de incubación de la levadura bajo las condiciones mencionadas se midió la absorbancia a 600 nm, la cual fue de 0.210 correspondiendo este el tiempo cero del ensayo. Luego se agregaron 160 μL de 1 mM (H_2O_2) al pozo correspondiente al control positivo (100 μL de ácido ascórbico), negativo (100 μL YDP) y al pozo correspondiente al extracto metanólico a evaluar (100 μL puro y diluido). Se incubó a 37 ° C con agitación durante 6 h y se tomaron lecturas cada 30 min. Antes de en cada lectura agitó la placa por 10 s en vórtice para asegurar la homogeneidad de las células. Las lecturas de absorbancia se tomaron a 600 nm.

Análisis estadístico.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicados y se expresaron los valores como los promedios \pm la desviación estándar (DE). Para la comparación de la concentración tanto de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante se aplicó un análisis de varianza de dos vías con interacción (ANOVA) pruebas de comparación de medias (Tukey; $p \leq 0,05$) usando el programa Statistix 9.0 para Windows.

RESULTADOS

Compuestos fenólicos y flavonoides totales en los extractos

La concentración (media y desviaciones estándar) de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico y del acuoso empleado como extracto de comparación, se observa en la Tabla 1. Así mismo el análisis estadístico arrojó diferencia estadística significativa en cuanto al contenido de estos compuestos presentes en los extractos ($p=0, <0,05$).

Tabla 1. Compuestos fenólicos (mg GAE/g MV) y flavonoides totales (mg CE/g M/V)

	Metanólico	Acuoso	p
Fenólicos	53,12 ±1.35	28,15±1,02	0,023
Floavonides	38,22±0,69	19,13±0,32	0,011

Media y desviación estándar de los triplicados de cada extracto

Evaluación de la actividad antioxidante (ensayo de estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*)

Como se muestra en la Figura 1 el extracto metanólico puro fue capaz de inhibir el efecto oxidativo generado por la presencia de peróxido de hidrogeno (H₂O₂), observándose crecimiento exponencial *S. cerevisiae*, desde el tiempo 0 min de incubación hasta los 360 min. El extracto diluido ½ tuvo un comportamiento similar a control positivo, evidenciándose un crecimiento exponencial a partir de los 180 min.

DISCUSIÓN

A pesar de ser un material vegetal de desecho, diversos estudios fitoquímicos indican que la semilla de aguacate es rica en numerosos clases de metabolitos secundarios incluyendo polifenoles (Dabas *et al.*, 2013). En este sentido el estudio arrojó una alta concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides (53,12±1.35 y 38,22±0,69), comparable con lo hallado por Quiroz, 2019; la cual evaluó la composición proximal del contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos de semillas de palta variedad Fuerte y Hass, cultivadas en el distrito de Chao, Lima Perú. Por otra parte estos resultados son superiores a lo hallado por Romaní

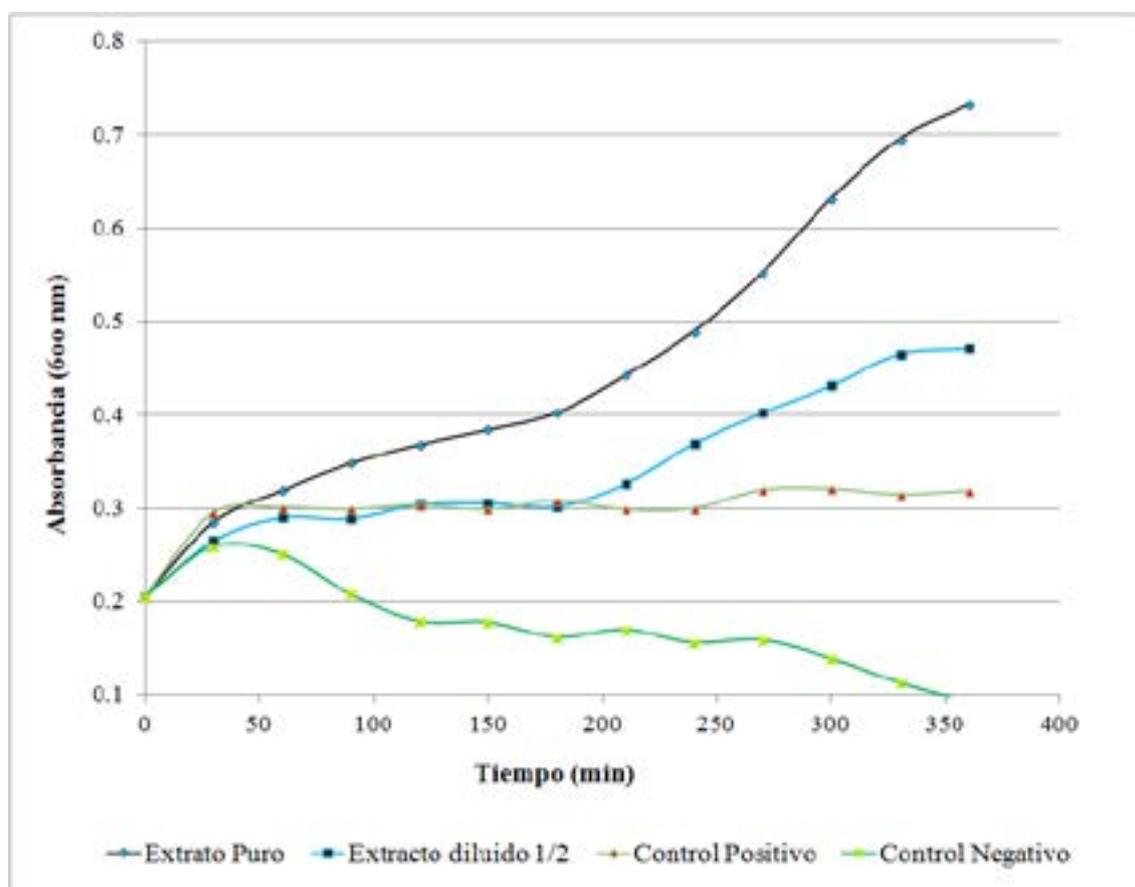


Figura 1. Actividad antioxidante del extracto metanólico por inhibición del estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*.

et al., 2017, los cuales identificaron la presencia de compuestos fenólicos, taninos y flavonoides en semillas, empleando un proceso de extracción con etanol.

En relación a la actividad antioxidante, se empleó el ensayo de la inhibición del estrés oxidativo en *S. cerevisiae* como modelo biológico. Esto es totalmente diferente a lo observado en la mayoría de los estudios orientados a evaluar la actividad anti-radical los cuales emplean métodos químicos que en muchas ocasiones dificultan la interpretación de sus resultados sino se dispone de dos o más métodos. (Fu *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2017). Este

ensayo evidenció la capacidad del extracto de inhibir el estrés oxidativo inducido en *S. cerevisiae* por la presencia de H_2O_2 utilizando extracto puro e incluso diluido, presentado un comportamiento superior al control positivo y estadísticamente significativo. Este resultado puede deberse a que los compuestos fenólicos presentes en el extracto son capaces de estimular a las células a seguir su ruta de crecimiento normal, relacionado con la capacidad para activar o desactivar mecanismos fisiológicos asociados a la protección de la levadura o con la simple disminución de H_2O_2 (Lin *et al.*, 2014; Valérico *et al.*, 2014, Pacheco *et al.*, 2020) (Figura 2).

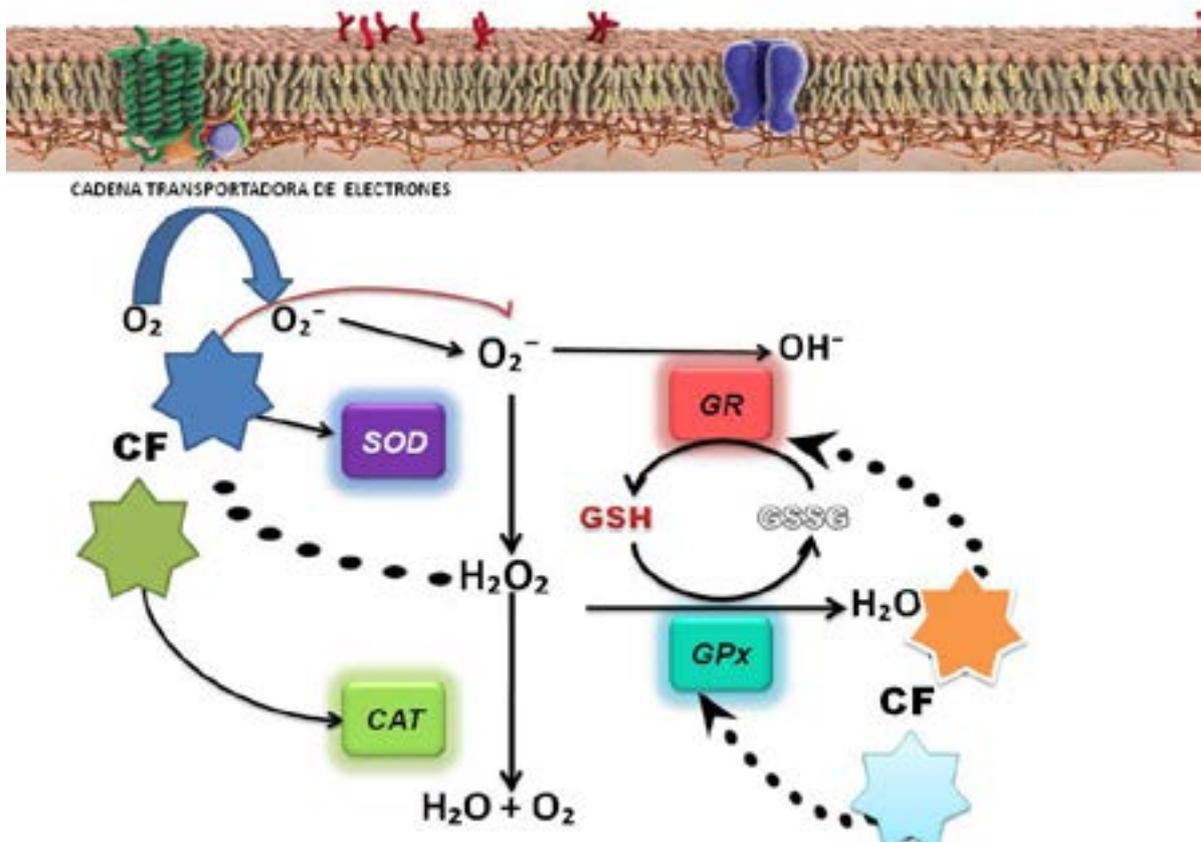


Figura 2. Mecanismo de acción del efecto antioxidante de los compuestos fenólicos propuesto por Pacheco *et al.*, 2020. Estrellas de colores representan los compuestos fenólicos (CF) presentes en el extracto, Catalasa (CAT), Superoxido dismutasa (SOD), Glutathion reductasa (GR).

En el estudio realizado por Albarrán *et al.*, 2014, cuyo objetivo fue evaluar la actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales, entre ellas *Persea americana*, hallaron que la inhibición del estrés oxidativo y el incremento del crecimiento celular estaba relacionada al afecto y contracción de los compuestos fenólicos presentes en el extracto evaluado. Por último el empleo de extractos a base de plantas medicinales y de material vegetal considerado desecho agroindustrial; han resultado poseer un elevado contenido de flavonoides, con capacidad antioxidante semejante al de la vitamina E y el ácido ascórbico; en relación al estrés oxidativo inducido en levaduras (Block, 2009; García *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Se evidencia que el extracto metanólico de semillas de *Persea americana*, a pesar de ser un subproducto puede proporcionar una fuente importante de compuestos químicos (fenólicos) con actividad antioxidante, lo que representa un aporte importante para futuras investigaciones que exploren y busquen promover el uso de esta semilla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarrán, G., Mendoza, E., Beltrán, J. M. (2014). Influence of concentration on the radiolytic decomposition of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in aqueous solution. *Revista Colombiana de Química*.43 (3): 41-48.

Álvarez, E., De la Rosa, L., Amarowicz, R., Shahidi, F. (2012). Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry*. 133: 827-834.

Block, G. (2009). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition*. 50: 207-213.

Dabas, D., Shegog, R., Ziegler, G., Lambert, J. (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*. 19(34): 6133-6140.

Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., Li, H.B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*. 129(1):345–350.

García, E., Fernández, I., Fuentes, A. (2016).

Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Revista Colombiana Ciencias Químico Farmaceuticas*.45 (1): 109-126.

Gan, R.Y, Li, H.B., Gunaratne, A., Sui, Z.Q., Corke, H. (2017). Effects of fermented edible seeds and their products on human health: Bioactive components and bioactivities. *Food Scientific*. 16:489–531.

Geering, A. (2018). A review of the status of Avocado sunblotch viroid in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 47: 555-559.

Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., Dykes, G. (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 60: 4613- 4619.

Lin, C., Chen, P., Hsieh, Y., Chu, S. (2014). Koelreuteria formosana extract impedes in vitro human LDL and prevents oxidised LDL-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chemistry*. 146: 299–307.

Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*.40 (3): 255-260.

Moreno, A., Dorantes, L., Galíndez, J., Guzmán, R.I. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea Americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2216-2221.

Pacheco Coello, F., Orosco-Vargas, C., Peraza-Marrero, M., Pinto-Catari, I., Ramirez-Azuaje, D. (2020). Effect of an extract of *Hibiscus sabdariffa* L., on oxidative stress induced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia, Ambiente y Clima*, 3(1), 41-46.

Prietsch, R.F., Monte, L.G., Da Silva, F.A., Beira, F.T., Del Pino, F.A., Campos, V.F., Collares, T., Pinto, L.S., Spanevello, R.M., Gamaro, G.D., Braganhol, E. (2014). Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Molecular Cell Biochemistry*. 390: 235-242.

Reddy, M., Moodley, R., Jonnalagadda, S.B. (2012). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana* Mill.) oil-effect of

extraction methods. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 47: 529-537.

Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M., Arteaga-Garibay, R., Martínez-Peña, M. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia* .49 (1): 277-290.

Rodríguez-Carpena, JG., Morcuende, D., Andrade, MJ., Kylli, P., Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5625-5635.

Romaní, L., Enciso, E., Cárdenas, V., Condorhuamán, YM. (2017). Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de semillas de *Persea americana* Mill. "palta Hass" frente a *Escherichia coli*. *Ciencia e Investigación*. 20(2):19-22.

Singleton, VL. and Rossi, JA.(1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16 (3): 144-158.

Valérico, E., Vilares, A., Campos, A., Pereira, P., Vasconcelos, V. (2014). Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon*. 90: 191-198

Vásquez, M. (2019). Composición proximal del contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos de semillas de palta variedad Fuerte y Hass. Lima: Universidad Nacional de Trujillo. Tesis de pregrado

Vivero, A., Valenzuela, R., Valenzuela, A., Morales, G.(2019). Palta: compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios en salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 46(4): 491-498.