



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

“EXTRACCIÓN OPTIMIZADA DE COMPUESTOS FENÓLICOS ASISTIDA POR ULTRASONIDO A PARTIR DEL EXOCARPIO DE PALTA HASS (*Persea americana* ‘Hass’).”

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA(O) EN ALIMENTOS

Francisca Yanina Castro Cuevas

PATROCINANTE

Dr. Roberto Lemus Moncada

Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile.

DIRECTOR DE MEMORIA

Dr. Jaime Ortiz Viedma

Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile.

CO-DIRECTOR DE MEMORIA

Dra. Cielo Char Aubry

Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile.

Dr. Roberto Lemus Moncada

Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile.

**Santiago de Chile
2024**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos con todo mi amor...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, cuyo amor, guía y apoyo incondicional han sido la base sobre la cual he construido mis sueños y aspiraciones. Su sabiduría y ejemplo de vida han sido la brújula que me ha guiado en cada decisión y desafío. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mí misma y por ser el refugio seguro al que siempre puedo volver.

A mi hermano Javier y mi hermana Constanza por estar ahí apoyándome, aconsejándome, amándome de forma incondicional. Por ser mi contención en los momentos más duros y por ser mis modelos a seguir y mi vida entera.

A Geraldine del Río por ser mi fiel amiga durante todos estos años de carrera, por todas las risas y conversaciones infinitas que nos han hecho crecer y desarrollarnos tanto como personas y profesionales.

A Valentina Duarte y María Ignacia Allendes por ser mis mejores amigas y hacerme ver que está bien no estar bien, estar conmigo en las buenas, en las malas y en las malísimas.

A mi familia y amigos por darme un espacio en su corazón y vida, por elegirme día a día, por haberme hecho mirar al espejo, y observar el potencial que tengo, que yo nunca fui capaz de observar. Les agradezco por creer en mí y brindarme las mil palabras de aliento que me hicieron salir adelante, más que como estudiante, como persona.

Al Dr. Jaime Ortiz por elegirme como su tesista, por ser mi guía a lo largo de este camino y brindarme todo su apoyo de forma incondicional.

A la Dra. Cielo Char por cada conversación, cada palabra de aliento, por su ayuda y motivación de sacar mi tesis adelante. Por ser mi faro en momentos de oscuridad en los que no hallaba soluciones a mis dudas en los análisis microbiológicos.

A Tamar por estar apoyándome a lo largo de todo mi proceso de memoria de título, por brindarme soporte y ayuda en todo lo que necesité, sin interés alguno.

A Juan Carlos y Helem por estar siempre con la disposición de ayudarme si es que algo me faltaba o necesitaba.

Y, por último, a la vida por enseñarme quién soy y lo capaz que soy.

Índice

1.	Introducción	1
2.	Marco Teórico.....	3
2.1.	Palta Hass	3
2.1.1.	Composición nutricional.....	4
2.1.2.	Madurez del fruto	6
2.2.	Cáscara de la Palta.....	7
2.3.	Oxidación lipídica	8
2.4.	Fenoles.....	10
2.4.1.	Antocianinas	12
2.4.2.	Mecanismo de acción de los fenoles	13
2.5.	Generalidades sobre actividad antimicrobiana	14
2.5.1.	<i>Escherichia coli</i>	15
2.5.2.	<i>Listeria innocua</i>	16
2.5.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.5.4.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.6.	Extracción ultrasónica	18
2.7.	Método de superficie de respuesta.....	19
3.	Hipótesis	21
4.	Objetivos.....	22
4.1.	Objetivo general	22
4.2.	Objetivos específicos.....	22
5.	Materiales y Métodos	23
5.1.	Materia prima	23
5.2.	Preparación de muestras	23
5.3.	Extracción asistida por ultrasonido.....	25
5.4.	Diseño experimental 3 ² y Análisis estadístico.....	25
5.5.	Determinación Fenoles totales (Método Folin Ciocalteau).....	26
5.5.1.	Reactivos	26
5.5.2.	Procedimiento.....	26

5.6.	Determinación de la Capacidad Antioxidante	27
5.6.1.	Análisis DPPH.....	27
5.6.2.	Análisis ORAC.....	28
5.7.	Cuantificación de Antocianinas (Método de pH-diferencial).....	30
5.8.	Determinación de la actividad antimicrobiana (Método de dilución en agar)	30
6.	Resultados y Discusión.....	34
6.1.	Diseño experimental.....	34
6.2.	Capacidad antioxidante.....	40
6.2.1.	Análisis DPPH.....	40
6.2.2.	Análisis ORAC.....	43
6.3.	Cuantificación de Antocianinas: pH-diferencial	46
6.4.	Determinación de la capacidad antimicrobiana: Método de dilución en agar.....	49
7.	Conclusiones.....	54
8.	Bibliografía.....	56
9.	Anexos.....	66
9.1.	Materiales y Métodos	66
9.2.	Método de superficie de respuesta.....	67
9.3.	Resultados capacidad antioxidante por método DPPH	68
9.4.	Resultados capacidad antioxidante por método ORAC	69
9.5.	Resultados del método de dilución en agar	70
9.6.	Recuento microbiológico.....	82

Índice de Tablas

Tabla 1. Información Nutricional de la palta Hass según la USDA (2020) y Dosis Diaria Recomendada.....	5
Tabla 2. Clase de compuestos de polifenoles y su estructura básica.....	11
Tabla 3. Contenido de fenoles totales medidos en μg GAE/ml de extracto de cáscara palta Hass en función de las variables independientes concentración de etanol y tiempo sometido a extracción.....	34
Tabla 4. Concentración de fenoles medidos en mg de ácido gálico equivalente/g de extracto en base seca de diferentes productos alimentarios.....	39
Tabla 5. Porcentaje de inhibición del radical DPPH para 0,1 ml de muestra optimizada.....	40
Tabla 6. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox para un gramo de muestra de cáscara de palta Hass.....	41
Tabla 7. Capacidad antioxidante de diferentes productos alimentarios cuantificados por el método DPPH.....	42
Tabla 8. Resultados de la capacidad antioxidante de la cáscara de palta Hass medida por el método ORAC.....	43
Tabla 9. Capacidad antioxidante de diferentes productos alimentarios cuantificados por el método de ORAC.....	44
Tabla 10. Comparación de los métodos de capacidad antioxidante y cuantificación de fenoles totales para la muestra de cáscara de palta Hass.....	44
Tabla 11. Determinación de antocianinas monoméricas totales medidas en término de cianidina-3-glucósido mediante el método de pH-diferencial de la muestra de cáscara de palta Hass.....	46
Tabla 12. Cantidad de antocianinas totales para diferentes tipos de productos alimentarios, medidos mediante el método de pH-diferencial.....	47
Tabla 13. Concentraciones de extracto de cáscara de palta Hass y correspondiente contenido de polifenoles que se aplicaron para el estudio de la capacidad antimicrobiana mediante el método de dilución en agar.....	49

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de distintas concentraciones del extracto de cáscara de paltas Hass sobre diferentes microorganismos.....	50
Tabla 15. Resultados método de dilución en agar frente a levadura <i>S. cerevisiae</i>	51

Índice de Figuras

Figura 1. Palta Hass (Pesea americana Mill. ‘Hass’).....	4
Figura 2. Visualización de la cáscara de palta Hass (Pesea americana Mill. ‘Hass’).....	8
Figura 3. Reacción en cadena de la auto-oxidación de lípidos.....	9
Figura 4. Estructura básica y sistema de numeración de flavonoides.....	10
Figura 5. Metodología utilizada en la investigación.....	24
Figura 6. Visualización de las diluciones seriadas que se aplicaron para la determinación de la actividad antimicrobiana de la cáscara de palta.....	33
Figura 7. Diagrama de Pareto para la concentración de polifenoles totales medidas en μg GAE/ml.....	36
Figura 8. Superficie de respuesta estimada para la concentración de polifenoles medidos en términos de ácido gálico equivalente.....	37

Resumen

El presente estudio tiene como objetivo extraer compuestos fenólicos a partir del exocarpio de la palta Hass mediante el uso de ultrasonido. La investigación se centra en optimizar los parámetros de extracción, como la concentración de solvente (etanol-agua) y el tiempo de inmersión en el equipo de ultrasonido, utilizando técnicas de diseño de experimentos para maximizar la concentración de compuestos fenólicos, los cuales se determinarán mediante el método de Folin-Ciocalteu.

A partir de la revisión bibliográfica, se identificaron los rangos óptimos de etanol-agua (0-25-50%) y tiempo de extracción (5-10-15 minutos) para la extracción asistida por ultrasonido del exocarpio de palta Hass. Estos rangos fueron utilizados en un diseño experimental Box-Behnken para determinar las combinaciones óptimas, y mediante la metodología de superficie de respuesta, se ajustó un modelo que permitió identificar los valores óptimos de extracción: 50% (v/v) de etanol y 15 minutos de ultrasonido.

En condiciones óptimas, se obtuvieron 42,0 mg GAE/g de muestra en base seca de compuestos fenólicos, de los cuales $2,82 \pm 0,65$ mg C3G/L de extracto corresponden a antocianinas que se determinaron por el método de pH-diferencial. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de la muestra optimizada; por método DPPH se encontraron $143,6 \pm 1,43$ μ mol TE/g de muestra en base seca, y, mediante el método ORAC $269,8 \pm 15,3$ μ mol TE/g de muestra en base seca. Finalmente, se evaluó la capacidad antimicrobiana del extracto optimizado identificando una CMI de 42,0 mg GAE/g en base seca para *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Saccharomyces cerevisiae* es de 25,3 mg GAE/g en base seca, y, para *Escherichia coli* no se logró determinar CMI.

Vale decir, el exocarpio de la cáscara de palta Hass posee alta concentración de compuestos fenólicos con capacidades antioxidantes y antimicrobianas, lo que se sugiere que este subproducto podría ser aprovechado por la industria para retardar la oxidación, prevenir enfermedades e inhibir la proliferación microbiana.

Abstract

The present study aims to extract phenolic compounds from the exocarp of Hass avocado using ultrasound. The research focuses on optimizing extraction parameters, such as solvent concentration (ethanol-water) and immersion time in the ultrasound equipment, by employing experimental design techniques to maximize the concentration of phenolic compounds, which will be determined using the Folin-Ciocalteu method.

Based on the literature review, optimal ranges for ethanol-water concentration (0-25-50%) and extraction time (5-10-15 minutes) were identified for ultrasound-assisted extraction of Hass avocado exocarp. These ranges were used in a Box-Behnken experimental design to determine the optimal combinations, and through response surface methodology, a model was adjusted that allowed for the identification of optimal extraction values: 50% (v/v) ethanol and 15 minutes of ultrasound.

Under optimal conditions, 42.0 mg GAE/g of dry sample of phenolic compounds were obtained, of which 2.82 ± 0.65 mg C3G/L of extract corresponded to anthocyanins, determined by the pH differential method. Additionally, the antioxidant capacity of the optimized sample was evaluated; the DPPH method showed 143.6 ± 1.43 $\mu\text{mol TE/g}$ of dry sample, and the ORAC method showed 269.8 ± 15.3 $\mu\text{mol TE/g}$ of dry sample.

Finally, the antimicrobial capacity of the optimized extract was evaluated, identifying a minimum inhibitory concentration (MIC) of 42.0 mg GAE/g of dry sample for *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*, while for *Saccharomyces cerevisiae* it was 25.3 mg GAE/g of dry sample; the MIC for *Escherichia coli* could not be determined.

In conclusion, the exocarp of Hass avocado peel contains a high concentration of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial properties, suggesting that this by-product could be utilized by the industry to delay oxidation, prevent diseases, and inhibit microbial proliferation.

1. Introducción

La industria Agroalimentaria ha experimentado un crecimiento considerable en las últimas décadas, impulsando significativamente la economía global. Sin embargo, este desarrollo ha traído consigo un impacto ambiental notable, especialmente en la generación de residuos tanto orgánicos como inorgánicos. Esta problemática ambiental ha motivado un enfoque renovado en la búsqueda de soluciones sostenibles y eficientes para el manejo de estos desechos (Caballero-valdez, 2011).

En Chile, el sector agroindustrial es un protagonista notable en este escenario. Se estima que el país produce más de 50 mil toneladas de residuos agroindustriales anualmente, derivados del procesamiento de actividades agrícolas y descartes del procesamiento de vegetales (Chávez et al., 2011). Esta realidad ha puesto en relieve la necesidad de desarrollar tecnologías avanzadas y métodos para el aprovechamiento eficiente de estos residuos, con el fin de mitigar su impacto ambiental y encontrar aplicaciones prácticas y sostenibles para ellos.

Un caso destacado en la industria agroalimentaria chilena es el de la palta (*Persae americana*), una fruta de origen centroamericano que ha ganado popularidad mundial por su sabor y valor nutricional. En Chile, el cultivo del árbol de palto es de gran importancia, con más de 29.289 hectáreas plantadas, siendo la variedad Hass la más cultivada (90%) (ODEPA, 2018). Como desecho de esta industria, se obtiene gran cantidad de cáscaras que actualmente no poseen aplicaciones tecnológicas económicamente viables. Sin embargo, las cáscaras de palta poseen un interesante y amplio perfil de fenoles. Las procianidinas son los principales componentes en los extractos de cáscaras de palta con una alta actividad antioxidante (Brune y van Lelyveld, 1982; Torres et al., 1987; De Almeida et al., 1998; Terasawa et al., 2006; Ding et al., 2007; Wang et al., 2010; Rodríguez-Carpena et al., 2011 a, b; Chávez et al., 2011) y, por tanto, podrían ser utilizados como antioxidantes naturales en diferentes matrices que contengan lípidos para retrasar la oxidación de éstas.

Además, recientes investigaciones han arrojado luz sobre sus potenciales efectos antimicrobianos, atribuidos a una variedad de compuestos fitoquímicos presentes tanto en la pulpa como en la cáscara y semilla de la palta Hass. Estos compuestos incluyen fenoles, terpenoides y ácidos grasos, los cuales han mostrado actividad inhibitoria contra varios patógenos, tanto bacterianos como fúngicos (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Escobar et al., 2019). Se ha identificado que tanto la cáscara como la semilla de la palta Hass poseen propiedades antibacterianas significativas, particularmente contra cepas resistentes a antibióticos (Jiménez et al., 2020).

El presente estudio se enfoca en la extracción de estos compuestos fenólicos de la cáscara de palta utilizando la tecnología de extracción asistida por ultrasonido, una técnica innovadora y sostenible que promete mejorar la eficiencia y reducir los impactos ambientales asociados con métodos de extracción tradicionales (Araújo et al., 2020; Hoover, 2000; Mason, 1990). Esta investigación busca contribuir al campo de la tecnología sostenible y la gestión eficiente de residuos agroindustriales, ofreciendo una alternativa viable para el aprovechamiento de subproductos de la industria alimentaria y potencialmente reduciendo el impacto ambiental de la producción de alimentos a gran escala.

2. Marco Teórico

2.1. Palta Hass

La palta, perteneciente al género *Persea* de la familia *Lauraceae*, es conocido globalmente como “aguacate”. Su nombre proviene del náhuatl "Ahuácatl", que curiosamente significa testículo, una referencia a su forma (Velásquez, 2005). Este fruto se caracteriza por su sabor único, una textura particularmente suave y cremosa, su distintivo color verde, cubierta por una piel rugosa de color verde oscuro, que se vuelve casi negra cuando la fruta está madura. Este fruto posee una versatilidad culinaria que lo hace excepcionalmente popular en diversas cocinas. Además de su valor alimenticio, el árbol del aguacate tiene un uso integral. En zonas rurales, especialmente en México, su madera de alta calidad se emplea en la fabricación de yugos y diversos artículos artesanales. En la industria, el aguacate es fuente de una variedad de productos como aceites, lociones, jabones, cremas y champús, aprovechando sus propiedades nutricionales y cosméticas (Velásquez, 2005).

La variedad Hass de la palta, o *Persea americana*, se destaca como un pilar de la economía que sustenta a Chile, mostrando un incremento constante en sus exportaciones año tras año. Originaria del sur de México, la palta Hass es una fruta tropical y subtropical conocida por su alto contenido de aceite. El palto se cultiva en muchos países, pero se da mejor en lugares con climas mediterráneos, con veranos cálidos y secos, e inviernos lluviosos y fríos, pero sin presencia de heladas. Chile y Estados Unidos son los únicos países que cuentan con este particular clima junto con algunos países del mar Mediterráneo, de los cuales provienen las paltas de mayor calidad organoléptica (Schaffer, 2013). Según Morton (1987), la palta se clasifica en tres grupos ecológicos principales: mexicano, guatemalteco y antillano, cada uno adaptado a distintas condiciones climáticas y geográficas.



Figura 1. Palta Hass (Pesea americana Mill. ‘Hass’).

2.1.1. Composición nutricional

El aguacate Hass se destaca como la variedad más cultivada y consumida globalmente, apreciado por su sabor y alto valor nutricional. Esta preferencia se debe a su rica composición en nutrientes liposolubles y fitoquímicos, como señalan Ávalos et al. (2014). En su pulpa, el aguacate Hass concentra una significativa cantidad de vitaminas, incluyendo β -caroteno, vitamina E, retinol, ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina y ácido fólico. Adicionalmente, se caracteriza por su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, especialmente ácido oleico, contribuyendo a la reducción de los niveles de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos en plasma, como indican Salgado et al. (2013).

La palta, conocida por su singular conjunto de propiedades, ha sido clasificada como un alimento funcional por la American Dietetic Association (ADA), en reconocimiento a sus significativos beneficios nutricionales y para la salud, según ADA (1999). Este fruto se caracteriza por su riqueza en ácidos grasos insaturados, fibra, vitaminas B y E, entre otros nutrientes esenciales. Investigaciones en torno a la palta han revelado la presencia de componentes lipofílicos con potencial anticancerígeno, incluyendo carotenoides. Estudios específicos, como los mencionados por Wang (2010), han encontrado que el extracto lipofílico de la palta inhibe el crecimiento de células cancerígenas prostáticas y promueve la apoptosis en células de cáncer de mama humano, además de suprimir lesiones hepáticas.

Tabla 1. Información Nutricional de la palta Hass según la USDA (2020) y Dosis Diaria Recomendada extraída de FDA (2020).

Información Nutricional			
Porción: 50g			
	100	Porción	DDR
Energía (kcal)	160	80	
Proteína (g)	2	1	
Grasa Total (g)	14,7	7,4	
Grasa saturada (g)	2,1	1,1	
Grasa monoinsat. (g)	9,8	4,9	
Grasa poliinsat. (g)	1,8	0,9	
Ác. grasos Trans (g)	0	0	
Colesterol (mg)	0	0	
Hidratos de carbono disp. (g)	8,5	4,3	
Azúcares Totales (g)	0,7	0,4	
Fibra Dietética (g)	6,7	3,4	
Sodio (mg)	7	3,5	
Vitaminas y Minerales			(*)
Potasio (mg)	485	243	5
Fósforo (mg)	52	26	2
Calcio (mg)	12	6	0
Hierro (mg)	0,6	0,3	2
Magnesio (mg)	29	15	3
Zinc (mg)	0,6	0,3	3
Vit A (ug)	7	3,5	0
Vit C (mg)	10	5	6
Vit E (mg)	2	1	7
Vit K (ug)	22	11	9
Vit B1 (mg)	0,07	0,04	3
Vit B2 (mg)	0,1	0,1	4
Vit B3 (mg)	1,7	0,9	5
Vit B6 (mg)	0,3	0,2	9
Vit E (Alfa-tocoferol) (mg)	2,1	1,1	7
Folato Total (ug)	81	41	10
Fenoles (mg GAE)	142	71	
Beta-Caroteno (ug)	62	31	
Alfa-Caroteno (ug)	24	12	
Beta-Criptoxantina (ug)	28	14	
Luteína + zeaxantina (ug)	271	136	
(*) % en relación de la Dosis Diaria de Referencia (DDR) para mayores de 4 años establecido para Chile.			

2.1.2. Madurez del fruto

La maduración de la palta es un proceso complejo que involucra cambios fisiológicos y bioquímicos significativos, reflejados en alteraciones estructurales a nivel celular. Este proceso conlleva un ablandamiento del mesocarpio de la fruta, como se evidencia en el incremento de la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared celular, según Awad y Young (1979). Durante la maduración, las paredes primarias de las células del parénquima se degradan debido a la acción de enzimas como la celulasa y la poligalacturonasa, facilitando la liberación del aceite de los cuerpos celulares y haciéndolo más accesible para su extracción, como describe Mostert E. (2007).

Además, la madurez de la palta se determina por características externas como el color y tamaño, y por el contenido de aceite en la pulpa. Inicialmente, el contenido de aceite en la palta comercial varía entre 8 y 15.5%, pero puede aumentar a valores entre 22 y 33% después de la maduración. Estos cambios bioquímicos internos y externos se extienden hasta que el fruto alcanza la madurez de consumo, indicada por una textura con un grado de firmeza entre 4,0 y 1,5 Kg-f/cm², como reporta Baudi (1997). Posteriormente, se observa una pérdida de contenido de grasa, cambio de color y debilitamiento en la textura de la pared celular.

En cuanto al proceso de extracción del aceite, Mostert E. (2007) enfatiza que el contenido de agua en el fruto es un factor crítico que afecta la eficacia de la extracción. Por lo tanto, el secado de la materia prima se convierte en una etapa preliminar necesaria. Sin embargo, la palta es susceptible a cambios organolépticos, como alteraciones en color, olor y sabor, al exponerse al aire o al molerse, y también a altas temperaturas y otros factores ambientales, según Osorio (2013). Estos factores deben considerarse cuidadosamente para garantizar una extracción eficiente y de calidad del aceite de palta.

2.2. Cáscara de la Palta

La cáscara de la palta, particularmente en la variedad Hass, pero también en otras, es una fuente rica en propiedades y compuestos bioactivos útiles para una variedad de aplicaciones. Según Cobo et al. (2016), la cáscara de aguacate Hass contiene una diversidad de compuestos fenólicos, incluyendo cianidinia-3-glucósido, pelargonidin-3-O-glucósido, quercetinadiglucósido, entre otros, que aportan a sus múltiples propiedades biológicas. Adicionalmente, se ha utilizado tradicionalmente en la medicina para tratar diversas enfermedades, como resaltan Araújo et al. (2018). Específicamente, la cáscara de palta Hass posee una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, y más, asociadas con extractos de residuos de la palta.

El extracto de cáscara de aguacate Hass es rico en proantocianidinas y ha demostrado mejorar la homeostasis del colon en dietas altas en proteínas, tal como señala Cires (2019). Investigaciones adicionales de Gúzman et al. (2016) han revelado que una defensina de la variedad de palta criolla es citotóxica para células cancerosas de tumor de mama, sugiriendo su potencial en tratamientos contra el cáncer.

Estos hallazgos complementan los estudios de Platt & Thomson (1992) y Rodríguez-Saona et al. (1998), que demostraron que los extractos del epicarpio de la palta inmadura tienen propiedades antifúngicas y antibacterianas, atribuidas a compuestos como alcaloides y terpenos. Además, compuestos como taninos y fenoles en el epicarpio contribuyen a su actividad antibacteriana, como describen Jacob et al. (1971). Sin embargo, Chia & Dykes (2010) sugieren que los compuestos antimicrobianos en frutos maduros pueden diferir, ya que en esta etapa no necesitan protección contra microorganismos patógenos.

La integración de desechos de la palta, como cáscara y semilla, en la producción de aceites o pulpa no solo agrega valor a estos productos, sino que también ayuda a reducir los problemas ambientales asociados con la eliminación de estos residuos. Las cáscaras son ricas en compuestos biológicamente activos, incluyendo fenoles, que actúan como antioxidantes y

pueden inhibir la ureasa, un factor en la colonización de *Helicobacter pylori*. Estos compuestos pueden ser empleados para el desarrollo de ingredientes funcionales, enriqueciendo matrices alimentarias de manera natural y abordando problemas de salud como la obesidad, diabetes e hipertensión, según Chávez, Aranda, García, & Pastene (2011).

En conjunto, el aprovechamiento de los desechos de la palta representa una estrategia viable para el desarrollo de productos alimentarios funcionales y una solución ambientalmente sostenible, alineada con el manejo eficiente de los recursos y la reducción del impacto ambiental de la industria alimentaria.



Figura 2. Visualización de la cáscara de palta Hass (Pesea americana Mill. 'Hass'). Creación propia.

2.3. Oxidación lipídica

La oxidación lipídica es un proceso crítico responsable de alteraciones significativas en las características químicas, sensoriales y nutricionales de los alimentos, contribuyendo de manera notable a su degradación. Además, se ha establecido una correlación entre los productos resultantes de este proceso oxidativo y la promoción de patologías degenerativas, incluyendo cáncer, aterosclerosis y trastornos inflamatorios crónicos, enmarcados dentro del contexto del estrés oxidativo a nivel celular (Marmot, 2011).

La oxidación lipídica en sustancias grasas se produce a través de una cadena de reacciones complejas, influenciadas por múltiples factores. Estos incluyen la temperatura, la composición

de ácidos grasos, la concentración de oxígeno, la exposición a la luz, la ausencia de compuestos antioxidantes, y la presencia de ácidos grasos libres, metales, pigmentos, enzimas, y compuestos oxidados térmicamente, entre otros. Todos estos elementos contribuyen significativamente al proceso de deterioro de las materias grasas (Álvarez, 2017).

La oxidación de lípidos insaturados se lleva a cabo predominantemente mediante un mecanismo de auto-oxidación, el cual se desarrolla a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, divididas en tres fases críticas: iniciación, propagación y terminación (Choe, E, Min, D., 2006). La fase de iniciación se inicia con la abstracción de un hidrógeno de la posición alílica del lípido insaturado (LH) debido a la influencia de agentes iniciadores como metales, luz o sensibilizadores, resultando en la formación de un radical alquil ($L\cdot$). Durante la fase de propagación, este radical alquil ($L\cdot$) reacciona con oxígeno, en un proceso controlado por la difusión, para formar el radical peroxil ($LOO\cdot$). Este radical, a su vez, interactúa con otro lípido insaturado (LH), generando un hidroperóxido ($LOOH$) como producto primario de la oxidación y un nuevo radical alquil ($L\cdot$) que perpetúa la cadena de reacciones. En la fase final, la descomposición de los hidroperóxidos conduce a la formación de una variedad de compuestos no radicalarios (productos secundarios de la oxidación), tales como aldehídos, cetonas, alcanos y alcoholes (Figura 3). Estos compuestos son los responsables de los cambios indeseables en los aromas y sabores de los alimentos (Cheftel, 1992). Este es un fenómeno que se va a producir fatalmente en el tiempo, pero se puede retrasar con el empleo de antioxidantes/fenoles.

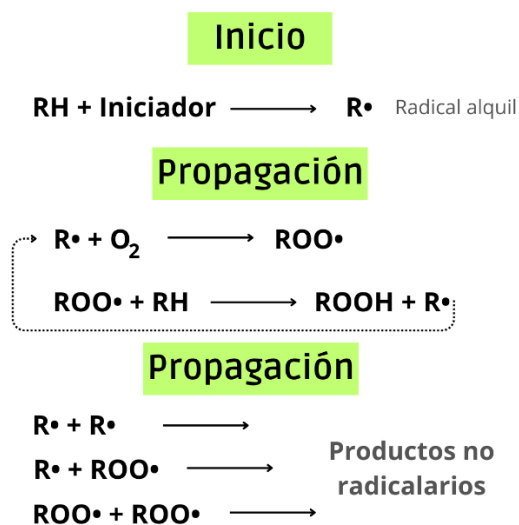


Figura 3. Reacción en cadena de la auto-oxidación de lípidos.

2.4. Fenoles

Los fenoles son un grupo de compuestos químicos naturales presentes en una variedad de plantas. Estas sustancias, a pesar de no ser nutrientes esenciales para el cuerpo humano, tienen propiedades que pueden ejercer funciones beneficiosas en la salud. Estos se encuentran en alimentos como las frutas, hortalizas, flores, tejidos y partes leñosas como el tallo o la corteza. Los fenoles son conocidos principalmente por sus propiedades antioxidantes y son objeto de numerosas investigaciones en relación con sus actividades biológicas (EUFIC, 2015).

Una clase importante de fenoles son los flavonoides, que constituyen la subclase más abundante dentro del reino vegetal. Los flavonoides tienen un esqueleto común difenilpirano, compuesto por dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de un anillo "C" de pirano heterocíclico (Figura 4).

Estos compuestos se encuentran mayoritariamente como glucósidos, aunque también pueden aparecer en forma libre o como sulfatos, dímeros y polímeros. La clasificación de los flavonoides se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico y de la posición del anillo B, y se diferencian por el número y la posición de los grupos hidroxilos y los distintos grupos funcionales que pueden presentar (Quiñones et al., 2012). Existen 13 subclases de flavonoides; flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, proantocianidinas, flavonoides polimetoxilados, chalconas, dihidroflavonoles, aurones, dihidrochalconas y flavonoides biflavonoides. Siendo las primeras 6 subclases más importantes debido a que proporcionan colores amarillos, naranjos y rojos a frutas, hortalizas y a otros alimentos como el té verde, en donde son responsables de su astringencia (Badui, 2006).

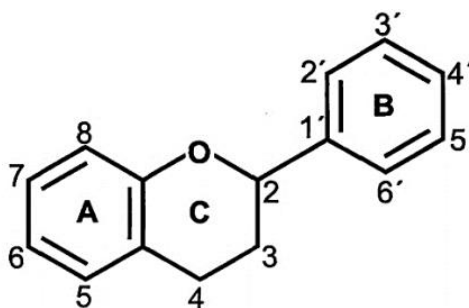


Figura 4. Estructura básica y sistema de numeración de flavonoides.

Los fenoles pueden clasificarse también según el tipo y número de subcomponentes fenólicos presentes (Tabla 2). La unidad fenólica puede ser esterificada o metilada y puede encontrarse dimerizada o polimerizada, creando nuevas clases de fenoles. Un ejemplo es el ácido elágico, un dímero del ácido gálico que forma la clase de elagitaninos (Arranz et al., 2009). Los fenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas, estos surgen biogénicamente a partir de dos rutas sintéticas principales: la ruta shikimato y la ruta de acetato (Bravo, 2009).

Tabla 2. Clase de compuestos de fenoles y su estructura básica extraído de Bravo (2009).

Clase	Esqueleto básico
Fenoles Simples	C ₆
Benzoquinonas	C ₆
Ácido fenólico	C ₆ -C ₁
Acetofenonas	C ₆ -C ₂
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃
Cumarinas, isocoumarinas	C ₆ -C ₃
Cromonas	C ₆ -C ₃
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆
Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanós, neolignanós	(C ₆ -C ₃) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n

Los estudios han demostrado diversos mecanismos a través de los cuales los fenoles pueden tener un efecto beneficioso en la salud. Tradicionalmente se han estudiado por su carácter antioxidante, siendo capaces de rebajar los niveles de radicales libres y de estimular los sistemas endógenos de defensa antioxidante. Además, los fenoles pueden modular a la microbiota colónica, influir en la reducción de la absorción de carbohidratos, y actuar sobre distintas vías

de señalización celular, afectando a factores de transcripción como la vía de señalización de la insulina y la función vascular. Estos mecanismos se han comprobado en ensayos preclínicos o clínicos, dando lugar a resultados acordes con los observados en estudios epidemiológicos. Actualmente existe evidencia científica acumulada sobre el papel de estos compuestos en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, y en menor medida, de ciertos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Pérez-Jiménez, 2019).

2.4.1. Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos vegetales hidrosolubles no nitrogenados responsables de los colores rojo, púrpura y azul en hojas, flores y frutos. Químicamente, son glucósidos de antocianidinas, compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides (Wagner, 1982). La estructura química de las antocianinas se ve afectada por diversos factores como pH, temperatura de almacenamiento, estructura química, concentración luz, oxígeno, solventes, presencia de enzimas, flavonoides, proteínas e iones metálicos, siendo altamente inestables y muy susceptibles a la degradación (Castañeda et al., 2009), debido a que el núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina es deficiente en electrones y por tanto muy reactivo (Mercedes et al., 2005). Generalmente se encuentran en la cáscara, pero también se pueden localizar en la pulpa, en pétalos, flores, frutas y raíces, en donde se acumulan en las vacuolas en organelos esféricos conocidos como antocionoplastos (Mercedes et al., 2005).

En cuanto a su solubilidad, las antocianinas son moléculas polares, por lo que los solventes más comunes utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona, generalmente son estables en condiciones ácidas, ya que son sensibles a los cambios de pH (Jiang et al., 2017), se debe tener cuidado para evitar medios ácidos fuertes porque las antocianinas asiladas pueden degradarse (reacción de hidrólisis) y en el caso de las antocianinas 3-monósido, los enlaces glucósidos pueden destruirse (Castañeda et al., 2009).

Estos compuestos tienen múltiples beneficios para la salud. Poseen propiedades antiinflamatorias que facilitan la recuperación de lesiones musculares y participan en el bloqueo de enfermedades inflamatorias, como se describe en Flavonoides.org. Además, previenen el

deterioro del ADN celular, contribuyendo a la prevención del cáncer y son útiles en el tratamiento de la diabetes, reduciendo la resistencia a la insulina y regulando la asimilación de glucosa en sangre (Xóchitl et al., 2022).

En el sistema cardiovascular, las antocianinas ayudan a proteger el corazón y las arterias del deterioro. Su efecto antioxidante es beneficioso para prevenir y tratar problemas cardiovasculares. Además, tienen un impacto positivo en la visión, protegiendo los capilares de la retina y siendo un ingrediente común en suplementos para mejorar la visión, especialmente útiles para personas con diabetes (Botánica, 2023).

2.4.2. Mecanismo de acción de los fenoles

Los fenoles, una clase de compuestos químicos prominentes en el reino vegetal, son reconocidos por sus propiedades antioxidantes, las cuales se manifiestan a través de varios mecanismos bioquímicos y moleculares. Primero, su habilidad para capturar radicales libres es quizás la más destacada. Esta capacidad se deriva de la estructura química de los fenoles, que les permite donar átomos de hidrógeno a los radicales libres, neutralizándolos y previniendo el daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los grupos hidroxilo (-OH) en sus anillos aromáticos son cruciales en esta actividad captadora de radicales (Rice-Evans et al., 1995).

Además, los fenoles tienen la capacidad de quelar iones metálicos como el hierro y el cobre. Estos metales pueden catalizar la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton, y su quelación por los fenoles reduce su concentración y, por lo tanto, disminuye la formación de radicales libres, contribuyendo así a sus propiedades antioxidantes (Perron y Brumaghim, 2009). Paralelamente, los fenoles influyen en la actividad de enzimas antioxidantes. Pueden inducir la expresión de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, o inhibir enzimas prooxidantes como la NADPH oxidasa, modulando de esta manera el estrés oxidativo en las células (Pandey y Rizvi, 2009).

Adicionalmente, los fenoles afectan las vías de señalización celular que controlan la respuesta antioxidante. Un ejemplo notable es la activación del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), un regulador clave en la expresión de genes antioxidantes y de fase II de desintoxicación, lo cual subraya la complejidad de su acción antioxidante (Kensler et al., 2007). También es importante considerar los efectos antiinflamatorios de los fenoles, que contribuyen indirectamente a su capacidad antioxidante al reducir la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante procesos inflamatorios (González-Gallego et al., 2010).

En conclusión, los fenoles ejercen su actividad antioxidante a través de una variedad de mecanismos que incluyen la captura directa de radicales libres, quelación de metales, modulación de enzimas antioxidantes y de vías de señalización celular, y efectos antiinflamatorios. Este abanico de acciones destaca la importancia de los fenoles en la protección contra el estrés oxidativo y subraya su potencial en la promoción de la salud humana.

2.5. Generalidades sobre actividad antimicrobiana

La cáscara de palta ha despertado un interés significativo en la comunidad científica debido a sus notables propiedades antimicrobianas. Esta actividad se atribuye a la presencia de una variedad de compuestos bioactivos en la cáscara, como los fenoles, terpenoides, ácidos grasos y compuestos fenólicos (compuesto orgánico que contenga un grupo fenol), que juntos contribuyen a su amplio espectro antimicrobiano, abarcando bacterias, hongos y posiblemente virus (Salazar-López et al., 2020).

En el ámbito de las propiedades antibacterianas, la cáscara de palta ha demostrado ser efectiva contra diversas bacterias patógenas. Los compuestos fenólicos y terpenoides presentes en la cáscara pueden dañar la membrana celular de las bacterias, provocando su lisis y muerte. Por ejemplo, se ha reportado su efectividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Kosińska et al., 2012; Melgar et al., 2018). Además, estos compuestos tienen la capacidad de interferir en procesos vitales de las bacterias, como la síntesis de proteínas, lo que potencia su efecto antibacteriano (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Además, estos compuestos tienen la

capacidad de interferir en procesos vitales de las bacterias, como la síntesis de proteínas, lo que potencia su efecto antibacteriano (Rosero et al., 2019).

Paralelamente, la cáscara de palta ha mostrado también propiedades antifúngicas significativas, efectivas contra una variedad de hongos patógenos, como *Candida* y *Aspergillus* (Melgar et al., 2018; Rosero et al., 2019). Los mecanismos implicados incluyen la alteración de la membrana celular fúngica y la inhibición de enzimas críticas para su metabolismo, lo que sugiere un posible uso de extractos de cáscara de palta en la conservación de alimentos y en la agricultura para el control de hongos (Oelrichs et al., 1995).

Además, aunque la investigación es menos extensa, algunos estudios sugieren que los compuestos presentes en la cáscara de palta podrían poseer propiedades antivirales. Estos podrían actuar inhibiendo la replicación viral o interfiriendo en la maquinaria celular que los virus utilizan para replicarse (Kumari et al., 2017).

2.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, es una bacteria Gram negativa que forma parte de la flora intestinal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente. Aunque ciertas cepas de *E. coli* son conocidas por causar enfermedades, la mayoría de las cepas son inofensivas y, de hecho, desempeñan roles importantes en el organismo. La *E. coli* no patógena cumple funciones esenciales en el tracto gastrointestinal y en diversos aspectos de la salud humana y animal.

Sin embargo, es importante destacar que, aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, algunas pueden adquirir factores de virulencia a través de procesos como la transferencia horizontal de genes, convirtiéndose en cepas patógenas. Por lo tanto, el monitoreo de las cepas de *E. coli* en ambientes como el suministro de agua y alimentos es crucial para la salud pública (Kaper et al., 2004).

2.5.2. *Listeria innocua*

Listeria innocua es una bacteria Gram positiva, se considera no patógena para los seres humanos, su estudio es crucial debido a su similitud fisiológica y genética con *L. monocytogenes*, lo que la hace un organismo modelo importante en investigaciones relacionadas con la inocuidad alimentaria y la patogénesis de *Listeria*.

L. innocua se encuentra comúnmente en el ambiente, incluyendo suelo, agua, vegetación y alimentos, y puede coexistir con *L. monocytogenes* en muchos hábitats, por lo que se considera un microorganismo ubicuo. Esto es relevante para la industria alimentaria, ya que la presencia de *L. innocua* en alimentos puede indicar la posible presencia de *L. monocytogenes* y, por lo tanto, es un indicador importante en los programas de monitoreo y control de *Listeria* en los alimentos (Rocourt et al., 2003).

En términos de características fisiológicas, *L. innocua* comparte muchas similitudes con *L. monocytogenes*, incluyendo su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración y en condiciones de alto contenido salino y pH bajo. Esta resistencia a condiciones adversas de crecimiento hace que *Listeria spp.* sea un desafío en el procesamiento de alimentos, especialmente en productos listos para el consumo donde el control de *Listeria* es crítico (Meloni, 2015).

Desde el punto de vista genético, aunque *L. innocua* es genéticamente similar a *L. monocytogenes*, carece de varios genes de virulencia presentes en el patógeno. Esto la convierte en un organismo modelo útil para estudiar la patogenicidad de *Listeria* y para desarrollar estrategias de detección y control en la industria alimentaria (Orsi et al., 2011).

Además, *L. innocua* se utiliza en estudios de biofilm, ya que tiene la capacidad de formar biofilms en superficies, un atributo compartido con *L. monocytogenes*. Los biofilms de *Listeria* son particularmente problemáticos en entornos de procesamiento de alimentos, donde pueden servir como reservorios persistentes de contaminación (Renier et al., 2011).

2.5.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que juega un papel dual en la salud humana, actuando tanto como un comensal y como un patógeno oportunista. Esta bacteria es parte de la flora normal de la piel y las membranas mucosas en aproximadamente un tercio de la población humana, pero también puede causar una amplia gama de infecciones, desde condiciones leves de la piel hasta enfermedades potencialmente mortales como neumonía, meningitis, endocarditis y sepsis.

Esta bacteria, *Staphylococcus aureus*, es conocida por producir una toxina termoestable que puede causar intoxicación alimentaria, especialmente vómitos. La toxina estafilocócica se asocia con alimentos contaminados, como carnes procesadas, ensaladas que contienen mayonesa, productos lácteos y pasteles. La contaminación de los alimentos a menudo ocurre a través de manipuladores de alimentos que portan la bacteria en su piel o en las vías respiratorias superiores, lo que facilita la transmisión al manipular alimentos sin una adecuada práctica de higiene. Dado que la toxina es resistente al calor, puede sobrevivir a la cocción y desencadenar síntomas en quienes consumen los alimentos contaminados (Argudín et al., 2010; Le Loir et al., 2003).

Otro aspecto importante de *S. aureus* es su habilidad para formar biofilms, estructuras complejas de comunidades bacterianas que se adhieren a superficies y están rodeadas de una matriz extracelular. La formación de biofilms en dispositivos médicos, como catéteres y prótesis, representa un desafío significativo, ya que estas estructuras protegen a las bacterias de los antibióticos y del sistema inmunológico del huésped, y son una fuente de infecciones persistentes (Otto, 2008).

2.5.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura unicelular eucariota que ha sido un organismo clave en la investigación científica, sirviendo como modelo para comprender procesos celulares fundamentales en células más complejas.

S. cerevisiae se caracteriza por su capacidad de fermentar azúcares para producir dióxido de carbono y etanol en condiciones anaeróbicas, un proceso fundamental en la elaboración de pan, cerveza y vino (Pretorius, 2000). Además de su uso en la fermentación, también juega un rol importante como microorganismo deteriorante de alimentos ácidos, como jugos de frutas y productos lácteos fermentados, debido a su capacidad para tolerar bajos niveles de pH (Fleet, 1992).

2.6. Extracción ultrasónica

La extracción ultrasónica por inmersión es una técnica de extracción que utiliza ondas ultrasónicas para mejorar la liberación de compuestos activos de un material, generalmente de origen biológico. Esta técnica se ha convertido en un método popular y eficiente para la extracción de sustancias bioactivas debido a su eficacia, eficiencia energética y capacidad para preservar la integridad de los compuestos extraídos.

El proceso de extracción ultrasónica implica la inmersión de un material en un solvente, en este caso se utilizó una mezcla de etanol-agua, y la aplicación de ondas ultrasónicas de alta frecuencia. Estas ondas generan fenómenos físicos conocidos como cavitación acústica, donde la formación y colapso de microburbujas en el líquido inducen una serie de efectos mecánicos y térmicos. La cavitación mejora la penetración del solvente en el material y facilita la liberación y disolución de los compuestos bioactivos en el solvente (Vilkhu et al., 2008). Este proceso es particularmente útil para extraer compuestos termolábiles, ya que puede realizarse a temperaturas más bajas que los métodos de extracción convencionales, minimizando así la degradación térmica (Chemat et al., 2017).

Una de las principales ventajas de la extracción ultrasónica es su eficiencia. Comparada con métodos convencionales como la extracción con solventes calientes o la maceración, la extracción ultrasónica puede lograr rendimientos más altos en menos tiempo y utilizando menos solvente. Esto se debe a la capacidad de las ondas ultrasónicas para aumentar la masa y la

transferencia de calor, lo que acelera la difusión de los solventes y la disolución de los compuestos deseados (Mason et al., 2011).

Además, la extracción ultrasónica es una técnica versátil que puede ser optimizada ajustando varios parámetros, como la intensidad de ultrasonido (amplitud de onda), ciclos de extracción, tiempo de extracción, la temperatura y la concentración de solvente. Esto permite adaptar el proceso a diferentes tipos de materiales y a los compuestos específicos que se desean extraer (Rostagno et al., 2003).

Vale decir, la extracción ultrasónica es un método moderno y eficiente para la extracción de compuestos bioactivos como los fenoles. Sus ventajas incluyen mayor rendimiento de extracción, menor tiempo y uso de solventes, y la capacidad de preservar la calidad de los compuestos sensibles al calor. Su versatilidad y eficiencia la hacen una opción atractiva en diversas aplicaciones en la industria de alimentos.

2.7. Método de superficie de respuesta

El método de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varias variables independientes. El objetivo principal del RSM es optimizar esta respuesta. Originalmente desarrollado por Box y Wilson en 1951, el método ha encontrado una amplia aplicación en diversos campos, como la ingeniería, la química, la fabricación y la investigación científica (Box & Wilson, 1951).

Una de las premisas fundamentales del RSM es que la relación entre las variables independientes y la respuesta puede ser aproximada por un polinomio. En la práctica, se suele utilizar un modelo cuadrático, ya que ofrece un buen equilibrio entre la precisión de la estimación y la complejidad computacional. Este modelo puede incluir términos lineales, cuadráticos y de interacción entre las variables independientes (Myers et al., 2016).

Una vez recogidos los datos, se ajusta un modelo de superficie de respuesta a estos datos utilizando métodos de regresión. El análisis de regresión proporciona estimaciones para los

coeficientes del modelo y permite evaluar la significancia de las variables y la calidad del ajuste del modelo. Herramientas como los gráficos de contorno y los gráficos de superficie 3D se utilizan a menudo para visualizar la relación entre las variables y la respuesta (Montgomery, 2017).

La optimización de la respuesta es el siguiente paso, donde se buscan las condiciones de las variables independientes que maximizan o minimizan la respuesta. Esto se logra mediante técnicas de programación matemática, como el método del gradiente o algoritmos de búsqueda directa (Cornell, 2002).

3. Hipótesis

La optimización del tiempo y la concentración de la mezcla de solvente etanol-agua en la extracción asistida por ultrasonido por inmersión, resulta en una mejora significativa en la obtención de extractos ricos en fenoles capaces de presentar una alta capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Valorizar de la cáscara residual de palta Hass mediante la demostración de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de sus compuestos fenólicos.

4.2. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de las variables independientes de la extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonido sobre el contenido polifenólico de la cáscara de palta Hass.
- Estudiar la capacidad antioxidante de los extractos de la cáscara de palta Hass para estudiar sus propiedades bioactivas, con el fin de evaluar sus aplicaciones nutricionales y su potencial uso como conservante natural en alimentos.
- Identificar la capacidad antimicrobiana de la cáscara de palta Hass para su uso como aditivo en alimentos, con el fin de prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y adulterantes, mejorando la inocuidad y prolongando la vida útil de los productos.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materia prima

Palta Hass (*Persea americana* Mill.) utilizadas en este estudio provienen de la comuna de Isla de Maipo, región Metropolitana de Chile, comercializadas por industria Subsole S.A. En el laboratorio de química y análisis de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se almacenaron a temperatura de refrigeración (5°C).

5.2. Preparación de muestras

La palta se lavó, despulpó y se extrajo la semilla. Posteriormente la cáscara de palta se lavó para limpiar el excedente de pulpa. Las muestras de cáscaras extraídas fueron molidas en un procesador de alimentos marca RAF modelo R. 7005A de 800 Watts. Posteriormente, se llevó a una estufa por convección de marca WTC binder modelo 1824030000202 #950305 de 2,20 kW durante 24 horas a una temperatura de 40°C. Luego, se almacenó en un frasco hermético con tapa, envuelto en papel aluminio y en refrigeración a 5°C, además se adicionaron bolsas de sílica gel para absorber la humedad proveniente del refrigerador que pudiese ingresar al frasco.

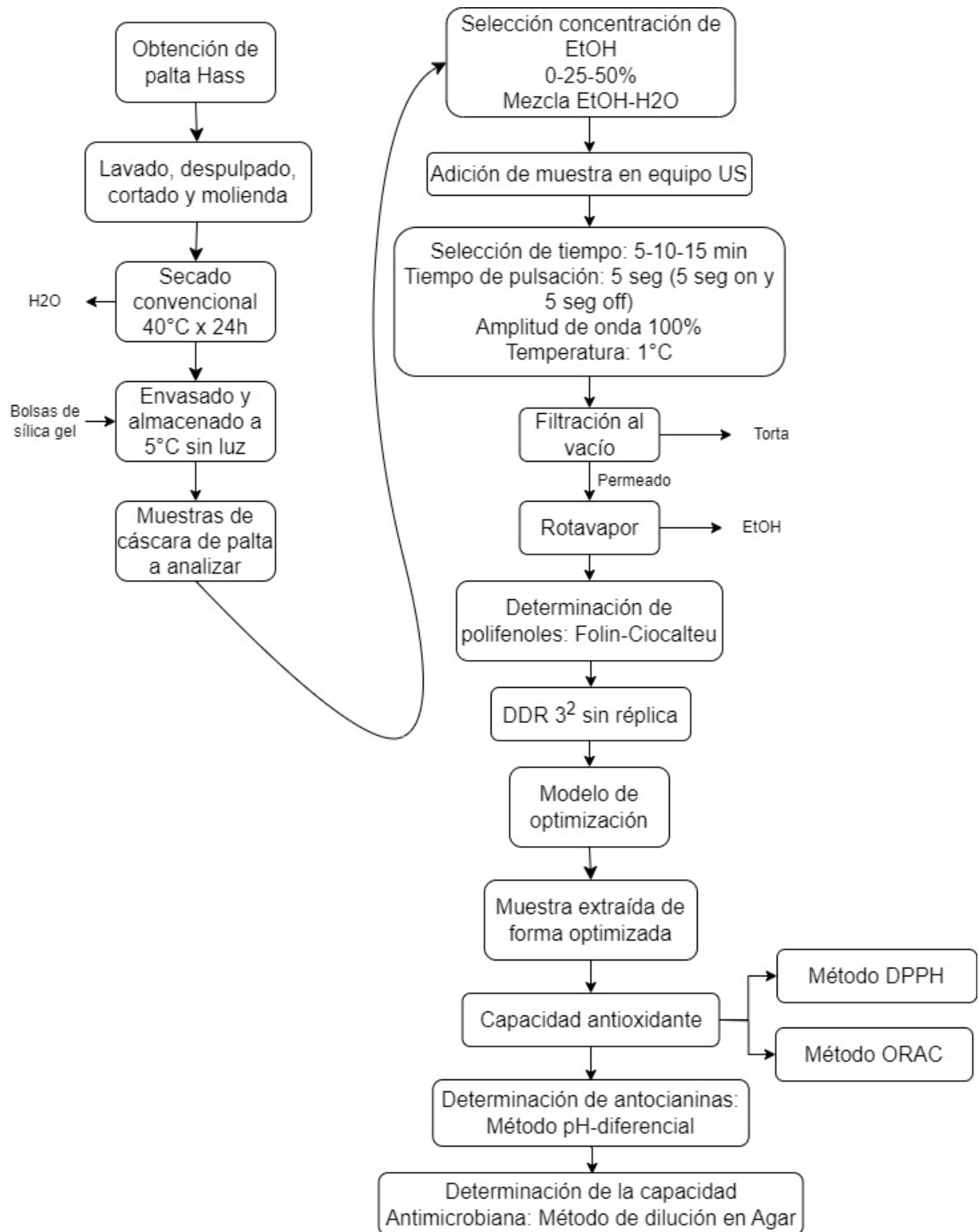


Figura 5. Metodología utilizada en la investigación.

5.3. Extracción asistida por ultrasonido

Se trabajó con 10g de cáscara de palta seca y molida, luego se adicionaron 100 mL de solvente etanol-agua y se procedió a los diferentes tratamientos de extracción en un generador ultrasónico. El equipo es de marca StaLab de modelo VCX500 que trabajó a 20 kHz y 500 W, y se puso sobre un baño maría de agua-hielo para controlar la liberación de calor. Esto se realizó a diferentes tiempos de sonicación (sonda en contacto con el extracto acuoso) 10, 20 y 30 minutos, con pulsaciones de 5 segundos; en los cuales 5 segundos se aplicaba sonicación y 5 segundos eran de descanso. Esto se aplicó en todos los tratamientos.

5.4. Diseño experimental 3^2 y Análisis estadístico

Durante la extracción se evaluó la influencia de las variables independientes: concentración de etanol (0, 25 y 50 % v/v) y tiempo (10, 20 y 30 min). Cada variable independiente fue evaluada a tres niveles. Se utilizó el diseño Box Behnken (DBB), el cual reportó un total de 9 tratamientos, con las mismas condiciones de temperatura (1°C), amplitud de onda (100%) y pulsaciones (5 segundos on y 5 segundos off) Las corridas fueron evaluadas de forma independiente para cada extracción, como se muestra en Anexo 1; Tabla 1. La respuesta medida fue la cantidad de componentes fenólicos totales (mg GAE/ ml muestra). Las corridas se hicieron de forma aleatoria.

Los datos experimentales fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, en ambos casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el software STATGRAPHICS CENTURION 16.103.

5.5. Determinación Fenoles totales (Método Folin Ciocalteau)

5.5.1. Reactivos

- Reactivo Folin-Ciocalteau BiosLabChile
- Solución estándar de ácido gálico
- Solución de carbonato de sodio anhídrico al 20% p/v: utiliza agua destilada caliente para disolver 20g de carbonato. Aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en oscuridad.

5.5.2. Procedimiento

Se adicionaron 0,1 ml de muestra del extracto en un matraz aforado de 10 ml, se añadieron 4,9 ml de agua destilada y 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteau. Se dejó reposar por 3 minutos. Luego, se agregaron 1,7 ml de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%. Se mezcló y se completó el aforo a 10 ml con agua destilada. Se dejó reposar 30 minutos. Simultáneamente se preparó un blanco, que es exactamente el mismo procedimiento, pero sin muestra.

Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis modelo SP-UV 1000 a 765 nm y se utilizó una curva de calibración de ácido gálico para transformar los datos a mg EAG/L.

5.5.2.1. Curva de calibración de estándar ácido gálico

La curva de calibración de ácido gálico se realizó pesando 25 mg de ácido gálico en matraz aforado ámbar de 25 ml, agregando 1 mL de etanol para disolver el ácido gálico y se afora con agua destilada. Se prepararon soluciones patrones entre 50 y 400 μg de ácido gálico/ml (observar Tabla 2; Anexo 1).

5.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante

5.6.1. Análisis DPPH

5.6.1.1. Reactivos

- Reactivo DPPH Merk S.A.
- Metanol Merk S.A.

5.6.1.2. Procedimiento

En un matraz aforado ámbar de 10 ml se adicionaron 10 mg de DPPH y se enrazó con metanol. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de la solución anterior que se deposita en un matraz aforado de 50 ml ámbar y se enrazó nuevamente con metanol.

La solución de DPPH preparada se leyó contra un blanco de metanol puro en un espectrofotómetro UV-Vis de marca MundoLab, modelo SP-UV 1000 a una longitud de onda de 517 nm para verificar que la absorbancia sea mayor a 0,5 y menor a 0,8.

Luego, se mezclaron 0,1 ml de muestra de extracto de cáscara de palta Hass y 3,9 ml de solución de DPPH que corresponde a la muestra a evaluar, seguidamente se preparó el blanco que contenía 0,1 ml de muestra de extracto y 3,9 ml de metanol y, finalmente, se preparó el control que contenía 3,9 ml de DPPH y 0,1 ml de metanol (Observar Tabla 3; Anexo 1). Esto se realizó en triplicado y se dejaron que las tres soluciones reaccionaran durante 30 minutos en oscuridad a 30°C para posteriormente medirlas en el espectrofotómetro a 517 nm.

5.6.2. Análisis ORAC

5.6.2.1. Reactivos

- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Disodio hidrógeno fosfato
- Hidróxido de sodio 10%
- Reactivo Fluoresceína Merk S.A.
- Reactivo Trolox Merk S.A.
- Radical AAPH

5.6.2.2. Procedimiento

Para preparar el buffer fosfato se pesaron 4,03 g de Cloruro de sodio, 0,11 g de cloruro de potasio, 0,575 g de Disodio hidrógeno fosfato y 0,1 g de fosfato dipotásico para 500 mL de agua miliq. Se ajustó pH de esta solución a 7.4 con hidróxido de sodio al 10%. Luego, se mantuvo en placa calefactora para disolver los reactivos.

Se preparó la solución stock de fluoresceína y para esto se pesaron 25 mg de fluoresceína en un matraz aforado ámbar de 50 ml y se enrazó con buffer fosfato. De esta solución se tomó una alícuota de 50 μ L y se enrazó con buffer fosfato en un matraz ámbar de 10 ml. De la última solución se tomaron 2 ml y se enrazó con buffer fosfato en matraz ámbar de 100 ml.

Luego, se preparó la solución estándar trolox y para esto se tomó 25 mg de trolox en un matraz aforado ámbar de 50 ml y se enrazó con buffer fosfato (concentración 2000 μ M). Y se realizó una curva de calibración de estándar trolox.

Para la lectura se utilizó una placa marca NUNC en la cual se llenó 300 μ L de agua destilada en los bordes de la placa, y en los primeros pocillos se llenaron con 25 μ L de los puntos de la curva expuestos en la Tabla 4; Anexo 1. Se repitieron cada punto cuatro veces hacia el

lado, empezando de la concentración de 100 μM , 50 μM , 25 μM y 12 μM . Luego, se continuó con 25 μL de muestra que se dispuso en la misma fila 6 veces hacia al lado. Se agregó 25 μL de buffer en las dos últimas líneas de la placa y se añadió a toda la placa, excepto a los pocillos que tienen agua, 150 μL de fluoresceína para muestras, curva y buffer. Seguidamente se agrega automáticamente 25 μL del radical AAPH al equipo y, finalmente, se coloca la placa en el equipo para proceder con la lectura.

5.7. Cuantificación de Antocianinas (Método de pH-diferencial)

5.7.1. Reactivos

- Cloruro de potasio
- Acetato de sodio
- Ácido clorhídrico

5.7.2. Procedimiento

Se preparó el buffer de cloruro de potasio con 1,864 g en 1 L de agua destilada y se ajustó a pH 1,0 con ácido clorhídrico mediante un pH-metro marca OAKLON modelo pH 2700, y se homogeneizó. Simultáneamente se preparó el buffer de acetato de sodio con 32,812 g acetato de sodio en 1 L de agua destilada y se ajustó a pH 4,5. Ambos buffers se sometieron en agitación mientras se midió el pH.

Luego, se tomó 1 ml de muestra y se agregó 9 ml de buffer de cloruro de potasio (pH=1,0), se agitó y se incubó durante 15 minutos y se midió contra el blanco que corresponde al buffer de cloruro de potasio sin muestra. Se repitió el procedimiento con el buffer de acetato de sodio a pH 4,5. Para finalmente medir la absorbancia de la muestra a 530 y 700 nm en espectrofotómetro.

5.8. Determinación de la actividad antimicrobiana (Método de dilución en agar)

5.8.1. Materiales

- Caldo agar dextrosa Sabouraud 2%
- Caldo CASO (Casein-peptone soymeal-peptone)
- Agar papa dextrosa
- Agar TSA (Trypto-Casein Soy Agar)
- Agar Mueller-Hinton

- Placas Petri
- Asa de siembra Drigalski
- Rastrillo bacteriológico en vidrio
- Tubos de ensayo
- Agua de peptona
- Alcohol etílico al 90%
- Algodón hidrofóbico apto para autoclave
- Mecheros
- Gradillas de tubos
- Micropipeta de 1000 μ L y de 100 μ L
- Puntas de micropipeta de 1000 μ L y de 100 μ L
- Parafilm

5.8.2. Reactivación de las cepas

Las cepas de *E. coli* ATCC 35218, *L. innocua* ATCC 33090 y *S. aureus* ATCC 25923 se reactivaron transfiriendo una asada de un cultivo stock congelado (Cepario) a una botella de 50 ml con caldo Tripteína Soya suplementado con Extracto de Levadura 0,6% (TSB-0,6YE), e incubando a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h bajo agitación constante. La levadura *S. cerevisiae* ATCC 9763 se reactivó en caldo Sabouraud 2% con incubación por 48 horas a 28°C bajo agitación constante. A partir del cultivo activo se sembraron estrías en tubos de agar (TSA-0,6YE y Agar Papa dextrosa para las bacterias y levadura, respectivamente), se incubaron en las condiciones mencionadas, y se guardaron en refrigeración (4°C) para utilizar en cada ensayo, por un tiempo máximo de 14 días.

5.8.3. Preparación de los inóculos

Previo a cada ensayo se sembró el inóculo en una botella de 50 ml con caldo (TSB-0,6YE o Sabouraud 2%) y se incubó en las condiciones correspondientes. Se realizó un recuento en placa para determinar la densidad final de los inóculos, los cuales fueron $\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL

para las bacterias y 1×10^7 UFC/mL para *S. cerevisiae*. Luego, se ajustó la concentración microbiana a la escala 0,5 McFarland que corresponde 1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL mediante diluciones seriadas de los inóculos, hasta alcanzar dichas concentraciones.

5.8.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó la metodología de dilución en agar. Para esto se realizaron diluciones seriadas del extracto fenólico de cáscara de palta en Agar Mueller-Hinton (15 mL). Estas diluciones abarcaron un rango de concentración desde los 2 mL hasta 0,1 mL de extracto de cáscara de palta por placa. Para ello, las diluciones del extracto se prepararon en tubos de ensayo con el agar fundido, luego se homogeneizaron y vertieron en las placas de Petri para asegurar una distribución homogénea del extracto en el medio de cultivo.

Después de preparadas las pacas, se dejaron solidificar y se inocularon con una suspensión estandarizada del microorganismo objetivo. Vale decir que para el caso de este estudio se inoculó 1×10^4 - 5×10^4 UFC/mL de cada microorganismo y se esparció en la superficie del agar con un rastrillo bacteriológico.

Una vez inoculado, las placas de Petri se incubaron 24 horas a 37°C para el caso de las bacterias y para la levadura 48 horas a 28°C .

La CMI se interpreta según los estándares establecidos por las organizaciones como el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020) o el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2003). Por lo general, se considera que los microorganismos son sensibles, intermedios o resistentes a un agente antimicrobiano, que en este caso sería los fenoles extraídos de la cáscara de palta, según sus concentraciones mínimas inhibitorias.

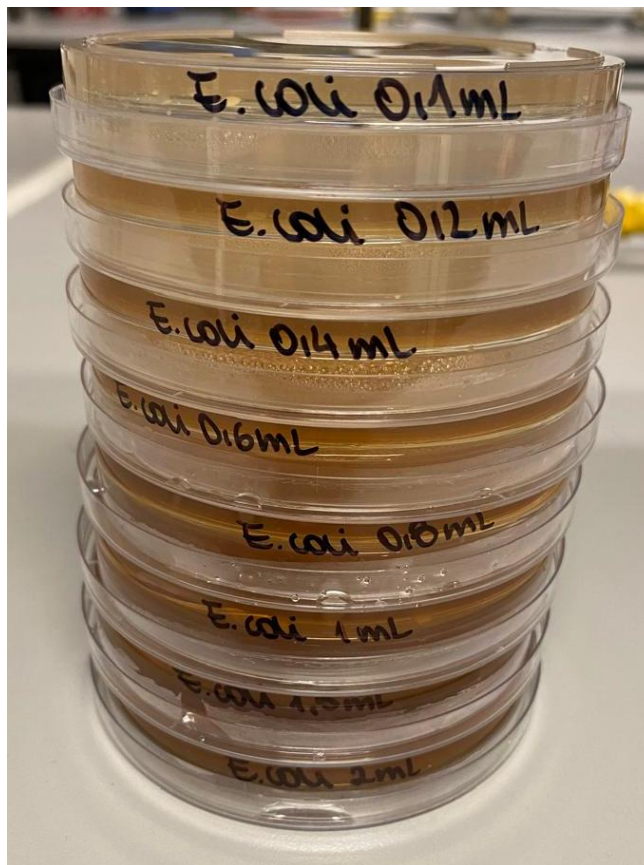


Figura 6. Visualización de las diluciones seriadas que se aplicaron para la determinación de la actividad antimicrobiana de la cáscara de palta.

6. Resultados y Discusión

6.1. Diseño experimental

En el curso de la investigación, se implementó un diseño experimental de tipo Box-Behnken. El propósito principal de este diseño fue la obtención de un extracto acuoso de cáscara de palta, enfocándose en maximizar su contenido de fenoles. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de optimización de las variables involucradas (concentración de etanol y tiempo de extracción), lo cual permitió identificar las condiciones óptimas de operación dentro del espectro del rango de trabajo establecido.

La tabla 3 muestra el contenido de fenoles obtenido en los nueve experimentos realizados, los cuales se obtuvieron de las combinaciones de las variables independientes concentración de etanol (%) y el tiempo (min) en el extracto asistido por ultrasonido. Las respuestas son el valor de fenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 3. Contenido de fenoles totales medidos en $\mu\text{g GAE/ml}$ de extracto de cáscara palta Hass en función de las variables independientes concentración de etanol y tiempo sometido a extracción.

N°	Concentración de EtOH (%v/v)	Tiempo (min)	Fenoles totales ($\mu\text{gGAE/ml}$)	Fenoles totales ($\mu\text{gGAE/gbs}$)	Fenoles totales (mgGAE/gbs)
1	25	15	1.776,7	17.766,7	17,8
2	25	10	1.670	16.700,0	16,7
3	0	5	776,7	7.766,7	7,8
4	50	5	1910,0	19.100,0	19,1
5	0	15	983,3	9.833,3	9,8
6	50	10	2.456,7	24.566,7	24,6
7	25	5	1.463,3	14.633,3	14,6
8	50	15	4.196,7	41.966,7	42,0
9	0	10	843,3	8.433,3	8,4

En la Tabla 3, se evidencia que el contenido de fenoles en el extracto acuoso de cáscara de palta varía dentro de un espectro que oscila entre 4.196,7 y 776,7 $\mu\text{g GAE/ml}$ de extracto. Se destaca que la concentración más elevada se logró bajo condiciones específicas: una concentración de etanol del 50% v/v y un tiempo de extracción de 15 minutos, correspondientes a los parámetros del experimento número 8. En contraste, el contenido más bajo de fenoles se registró en las condiciones del experimento 3, caracterizado por la ausencia de etanol, utilizando únicamente agua como solvente y un periodo de extracción de 5 minutos.

Del análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los datos experimentales relativos a los fenoles totales, se dedujo que estos se conforman adecuadamente a un modelo matemático de segundo orden. Este modelo se basa en las variables independientes de concentración de etanol y tiempo de extracción, indicando que la relación entre estas variables y el contenido de fenoles es cuadrática. Y la ecuación que representa la cantidades de fenoles en función a las variables:

$$\mu\text{g GAE/ml} = 9722,25 - 198,224*\text{Etanol} - 104,448*\text{Tiempo} + 3,59112*\text{Etanol}^2 + 41,6002*\text{Etanol}*\text{Tiempo}$$

La tabla 1 en Anexo 2 muestra que el modelo escogido es el adecuado, pues la falta de ajuste no es significativa. Además, el coeficiente de correlación R^2 es mayor a 0,9 lo que indica que el modelo explica de manera adecuada el comportamiento de la concentración de fenoles totales con respecto a las variables independientes estudiadas. La desviación estándar y el error absoluto en conjunto con el estadístico Durbin-Watson y el valor de la Autocorrelación residual, indican que los residuos no tienen una autocorrelación serial con un nivel de significancia del 5,0%.

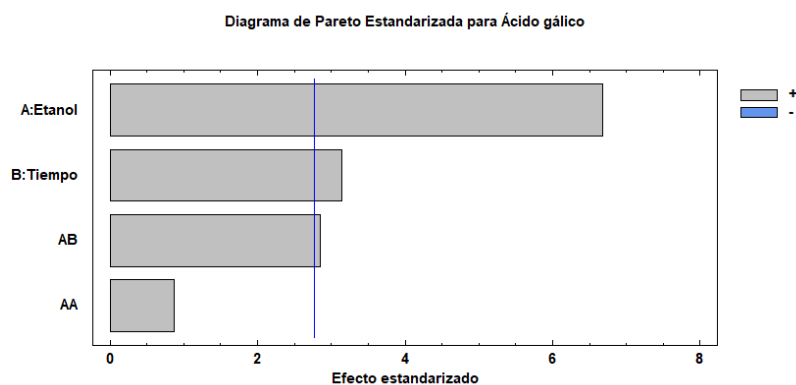


Figura 7. Diagrama de Pareto para la concentración de fenoles totales medidas en $\mu\text{g GAE/ml}$.

En la Figura 7, se evidencia claramente que ambas variables estudiadas - la concentración de etanol y el tiempo de extracción - ejercen un impacto significativo en la concentración de fenoles del extracto acuoso obtenido de la cáscara de palta Hass. De manera adicional, es notable la significancia del efecto de interacción entre estas dos variables. Es decir, la combinación específica de la concentración de etanol y el tiempo de extracción influye de manera conjunta en los resultados obtenidos.

Entre estas variables, la concentración de etanol se destaca por tener el mayor impacto en la extracción de fenoles, presentando un efecto positivo. Esto implica que a medida que se incrementa la concentración de etanol en el solvente, se observa un aumento proporcional en la cantidad de fenoles extraídos. Este hallazgo es fundamental para el diseño y optimización de procesos de extracción en este contexto específico.

El análisis del diagrama de Pareto (Figura 7) revela que el tiempo de extracción, al igual que la concentración de etanol, desempeña un papel significativo y positivo en la extracción de fenoles del extracto acuoso de cáscara de palta Hass. Esto significa que un incremento en el tiempo de extracción conlleva a una mayor extracción de fenoles, haciendo el proceso más efectivo.

Además, es importante destacar que la interacción entre la concentración de etanol y el tiempo de extracción no es meramente aditiva, sino significativamente sinérgica. Esto implica

que la combinación de un mayor tiempo de extracción con una mayor concentración de etanol no solo aumenta individualmente la eficacia de la extracción, sino que también produce un efecto combinado que es mayor que la suma de sus efectos individuales.

El gráfico de superficie de respuesta obtenido (Figura 8), el cual representa la concentración de fenoles en términos equivalentes de ácido gálico, constituye una herramienta analítica esencial para visualizar el impacto de las combinaciones de las variables independientes, es decir, la concentración de etanol y el tiempo de extracción, sobre la concentración de fenoles en el extracto acuoso de cáscara de palta Hass.

Este tipo de gráfico permite una interpretación gráfica de los datos donde las interacciones entre las variables y su efecto conjunto sobre la respuesta (en este caso, la concentración de fenoles) se pueden observar de manera más clara e intuitiva. Las superficies generadas en el gráfico muestran cómo cambia la respuesta (concentración de fenoles) con diferentes niveles de las variables independientes.

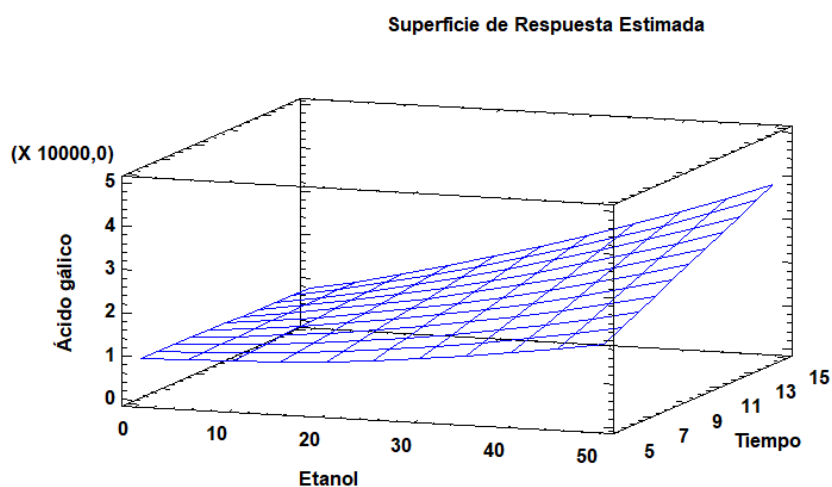


Figura 8. Superficie de respuesta estimada para la concentración de fenoles medidos en términos de ácido gálico equivalente.

La Figura 8 proporciona una representación gráfica que confirma y visualiza la interacción entre la concentración de etanol y el tiempo en la extracción de fenoles de la cáscara

de palta. Este gráfico subraya cómo la maximización tanto de la concentración de etanol como del tiempo de extracción resulta en un incremento en la concentración de fenoles en la muestra. De manera específica, la figura ilustra que, bajo condiciones de alta concentración de etanol y tiempos de extracción prolongados, se alcanza una eficacia máxima en la extracción de fenoles. Esto indica una sinergia positiva entre estas dos variables, donde su efecto combinado es más significativo que sus efectos individuales.

Por otro lado, la figura también muestra que cuando tanto el tiempo como la concentración de etanol son bajos, la eficacia en la extracción de fenoles disminuye notablemente. Este patrón demuestra la importancia de optimizar ambas variables para lograr una extracción eficiente de fenoles de la cáscara de palta.

La observación realizada en la Figura 7 y 8, junto con los resultados analíticos, lleva a la conclusión de que la muestra optimizada, aquella que maximiza la concentración de fenoles totales en la muestra medidos en términos de ácido gálico equivalente, corresponde efectivamente al experimento número 8 (observar Tabla 3). Este experimento se caracteriza por el uso de una concentración de etanol al 50% v/v y un tiempo de extracción de 15 minutos. Esta combinación específica de concentración de etanol y tiempo de extracción resulta ser la más eficaz para la extracción de fenoles de la cáscara de palta Hass, como se demuestra en los resultados experimentales. El alto porcentaje de etanol en combinación con un tiempo de extracción moderadamente largo parece facilitar la liberación y solubilización óptima de los fenoles de la matriz de la cáscara, resultando en una concentración máxima de estos compuestos bioactivos en el extracto.

Según el estudio realizado por Ayala-Zavala et al. (2013) la cáscara de palta hass obtuvo una concentración de fenoles de aproximadamente 25,4 mgGAE/g base seca mediante una extracción asistida por ultrasonido en etanol al 50%. Este proceso se llevó a cabo durante 20 minutos con una frecuencia de 30 kHz y un uso constante de ultrasonido, sin pulsaciones. No obstante, se ha demostrado que la utilización de pulsaciones en la extracción asistida por ultrasonido puede incrementar significativamente la eficiencia de la extracción de fenoles. En este estudio se obtuvo una concentración de 42,0 mg GAE/g de extracto en base seca al emplear etanol al 50% en un baño ultrasónico a 20 kHz durante 30 minutos, utilizado pulsaciones de 5

segundos encendido y 5 segundos apagado. Esto sugiere que la implementación de pulsaciones en la inmersión ultrasónica puede mejorar notablemente la liberación de compuestos fenólicos.

Tabla 4. Concentración de fenoles medidos en mg de ácido gálico equivalente/g de extracto en base seca de diferentes productos alimentarios.

Producto Alimentario	Concentración de Fenoles (mg GAE/g base seca)	Referencia bibliográfica
Fresas	16,4	Häkkinen et al., 1999
Frambuesas	23,1	Häkkinen et al., 1999
Arándanos	24,6	Häkkinen et al., 1999
Moras	29,5	Häkkinen et al., 1999
Té negro	92,0	Cabrera et al., 2006
Café	37,5	(Farah, A., & Donangelo, C. M., 2006)
Cacao	50,3	Miller et al., 2006

La Tabla 4 presenta las concentraciones aproximadas de fenoles en diversos productos alimentarios, determinados mediante diferentes métodos de extracción. Comparando estos datos, observamos que el extracto hidroalcohólico estudiado de cáscara de palta Hass, con 42,0 mg GAE/g base seca, contiene una mayor concentración de fenoles que las fresas, frambuesas, arándanos, moras y el café. Sin embargo, su concentración es inferior a la del cacao y el té negro.

Estos hallazgos subrayan el potencial del extracto de cáscara de palta Hass como una fuente rica en compuestos fenólicos, lo que podría tener implicaciones importantes para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica. La alta concentración de fenoles en la cáscara de palta abre la posibilidad de utilizar este subproducto, que a menudo se desperdicia, como un ingrediente funcional en el desarrollo de nuevos alimentos y suplementos nutricionales.

6.2. Capacidad antioxidante

6.2.1. Análisis DPPH

Se midió la capacidad antioxidante del extracto fenólico obtenido por el equipo de ultrasonido mediante el método de decoloración del radical DPPH que fue medido a una absorbancia de 517 nm en espectrofotómetro.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del radical DPPH para 0,1 ml de muestra optimizada.

N°	ml Extracto	ml Metanol	ppm (ug muestra/mL metanol)	Abs control	Abs muestra	%Inh	Promedio	DV
1	0,1	3,9	279,23	0,450	0,348	22,67	23,11%	0,402
2	0,1	3,9	279,23	0,448	0,344	23,21		
3	0,1	3,9	279,23	0,452	0,346	23,45		
23,11 ± 0,402 % Inhibición de radical DPPH								

La tabla 5 señala que la capacidad antioxidante de la muestra evaluada a través del método DPPH posee un porcentaje del 23,11% de inhibición, lo que revela una actividad antioxidante significativa. Según Brand-Williams, Cuvelier, y Berset (1995), esta medida indica que los componentes antioxidantes presentes en la muestra son efectivos en donar electrones o átomos de hidrógeno al radical libre DPPH, contribuyendo así a la reducción de su concentración. La disminución en la absorbancia medida refleja directamente esta actividad antioxidante.

En relación con el control, que es una solución de DPPH sin la muestra, un 23,11% de inhibición significa que la muestra logró reducir la actividad del radical libre DPPH en esa proporción, en 30 minutos, según se detalla en los trabajos de Shahidi y Zhong (2015). La desviación estándar de 0,402 en los resultados indica una variabilidad moderada en las mediciones realizadas en triplicado, lo cual es un factor crucial para evaluar la precisión y reproducibilidad del ensayo (Miller y Miller, 2010).

Por otro lado, se tiene obtuvo la concentración de equivalente, expresada en micromoles de Trolox equivalente por gramo, en su ensayo proporciona una medida cuantitativa de la capacidad antioxidante de la muestra.

Tabla 6. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox para un gramo de muestra de cáscara de palta Hass.

N°	Absorb. Muestra	Concentración ($\mu\text{mol TE/L}$)	Concentración ($\mu\text{mol TE/gBS}$)
1	11	142.142,9	142,1
2	0,344	145.000,0	145,0
3	0,349	143.571,4	143,6
Promedio			143,6
Desviación estándar			1,43
Coef. Variación			0,99
143,6 \pm 1,43 ($\mu\text{mol TE}_{\text{BS}}$ / g en base seca)			

En la tabla 6 se puede observar que la capacidad antioxidante equivalente de la muestra resultó un valor notablemente alto de 143,6 $\mu\text{mol TE/g}$ en base seca, acompañado de una desviación estándar de 1,43. Esta medida indica una potente actividad antioxidante en la muestra de cáscara de palta, como se refleja en su comparación con Trolox, un estándar reconocido por su alta capacidad antioxidante (Huang, Ou, & Prior, 2005). El valor obtenido sugiere que los compuestos presentes en la muestra son eficientes en neutralizar los radicales libres, una propiedad clave de los antioxidantes.

Una desviación estándar de 1,43 en la medición aporta una perspectiva adicional sobre la precisión y la consistencia del método utilizado. Según Miller y Miller (2010), una desviación estándar baja en un conjunto de mediciones indica una alta precisión y confiabilidad en los resultados experimentales.

Además, el coeficiente de determinación (R^2) de 0,9649 obtenido en la curva de calibración de Trolox (Figura 1; Anexo 2) refuerza la confianza en estos resultados. Un R^2 tan alto, cercano a 1, sugiere que la curva de calibración proporciona un excelente ajuste para los datos, explicando aproximadamente el 96,49% de la variabilidad en la capacidad antioxidante medida (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Esto indica que la curva de calibración es adecuada y fiable para el análisis, lo que es un aspecto crítico en la cuantificación de la capacidad antioxidante.

Tabla 7. Capacidad antioxidante de diferentes productos alimentarios cuantificados por el método DPPH.

Producto alimentario	Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ en base seca)	Referencia Bibliográfica
Fresas	39,1	Sun et al., 2002
Frambuesas	48,5	Sun et al., 2002
Arándanos	93,2	Sun et al., 2002
Moras	82,4	Sun et al., 2002
Té negro	89,7	Cabrera et al., 2006
Café	84,4	Farah & Donangelo, 2006
Cacao	98,2	Miller et al., 2006

Al comparar la capacidad antioxidante de la cáscara de palta hass (Tabla 6) con la de otros alimentos presentados en la Tabla 7, se observa que la cáscara de palta supera significativamente la capacidad antioxidante de las fresas, frambuesas, arándanos, moras té negro, café y cacao, acercándose más a la capacidad antioxidante del cacao, pero aun así superándola. Esta notable capacidad antioxidante, junto con su alta concentración de fenoles, destaca el potencial que posee el extracto de cáscara de palta Hass y la importancia que posee el tipo de extracción que se realice.

6.2.2. Análisis ORAC

Se midió la capacidad antioxidante de la muestra de cáscara de palta optimizada, utilizando el método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de Oxígeno). El resultado obtenido fue de 269,8 μmol Trolox equivalente/g en base seca (tabla 8). Este valor, elevado, indica una significativa capacidad antioxidante en la muestra, lo cual es un hallazgo alentador. Como se destaca en trabajos previos de Prior, Wu, y Schaich (2005), la relevancia biológica de la prueba ORAC reside en su habilidad para simular los procesos de oxidación en sistemas biológicos, especialmente en la neutralización de radicales peroxilos.

Tabla 8. Resultados de la capacidad antioxidante de la cáscara de palta Hass medida por el método ORAC.

	Concentración (μmol eq Trolox/L)	Concentración (μmol eq Trolox/g _{BS})	Concentración (mmol eq Trolox/g _{BS})
	125422,5	250,8	0,25
	129265,0	258,5	0,26
	138105,0	276,2	0,28
	142930,0	285,9	0,29
	130270,0	260,5	0,26
	143457,5	286,9	0,29
Promedio	134908,3	269,8	0,27
DV	7628,8	15,3	0,02
CV	5,7	5,7	5,7
269,8 \pm 15,3 (μmol TE/g en base seca)			

La desviación estándar de 15,3 mmol TE/g en base seca y el coeficiente de variación de 5,7% dan indicio de que este análisis posee una variabilidad relativamente baja, por lo que se puede considerar que hubo precisión y es reproducible en otros estudios científicos, debido a esto es posible indicar que hay confiabilidad en los resultados.

Tabla 9. Capacidad antioxidante de diferentes productos alimentarios cuantificados por el método de ORAC.

Producto alimentario	Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ en base seca)	Referencia Bibliográfica
Fresas	161,0	Zheng & Wang, 2003
Frambuesas	134,0	Wang & Lin, 2000
Arándanos	260,0	Prior et al., 1998
Moras	203,0	Wu et al., 2004
Té negro	170,0	Cao et al., 1997
Café	220,0	Miller et al., 2006
Cacao	340,0	Wollgast & Anklam, 2000

Se realizó una comparación de la capacidad antioxidante medida por el método ORAC (Tabla 9) en diferentes productos alimentarios; fresa, frambuesa, arándanos, moras, té negro, café y cacao. En los que se observó que todos estos productos, conocidos por su gran capacidad antioxidante, poseen un rango entre los 134 a los 340 $\mu\text{mol TE/g}$ en base seca. La cáscara de palta, como se observa en la Tabla 8, posee una capacidad antioxidante de 269,8 $\mu\text{mol TE/g}$ en base seca, lo cuál es considerablemente alto. Esta capacidad antioxidante es superior a la mayoría de los productos alimentarios revisados en la literatura, aunque menor que la del cacao.

La tabla 10 muestra la comparación de los resultados de la capacidad antioxidante y la cuantificación de fenoles totales de una muestra, obtenidos mediante tres métodos analíticos diferentes: Folin-Ciocalteu, DPPH y ORAC.

Tabla 10. Comparación de los métodos de capacidad antioxidante y cuantificación de fenoles totales para la muestra de cáscara de palta Hass.

Folin-Ciocalteu Fenoles totales (mg GAE/g _{BS})	DPPH Concentración ($\mu\text{mol TE/g}_{\text{BS}}$)	ORAC Concentración ($\mu\text{mol TE/g}_{\text{BS}}$)
42,0	143,6 \pm 1,43	269,8 \pm 15,3

Mediante el método de Folin-Ciocalteu, se determinó que la muestra contenía 42 mg de equivalente de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg GAE/g_{BS}), lo que indica una concentración sustancial de estos compuestos bioactivos. Los fenoles son conocidos por sus efectos antioxidantes, por lo que una concentración elevada es generalmente sinónimo de un alto potencial antioxidante. Este alto nivel es consistente con los valores obtenidos de los métodos DPPH y ORAC, que miden la capacidad antioxidante directamente.

La capacidad antioxidante medida por el método DPPH fue de $143,6 \pm 1,43 \mu\text{mol TE/g}_{\text{BS}}$, mientras que el método ORAC arrojó un resultado mayor de $269,8 \pm 15,3 \mu\text{mol TE/g}_{\text{BS}}$. A pesar de aquella diferencia numérica entre estos dos últimos métodos, ambos reflejan una alta capacidad antioxidante. La variación en los valores otorgados por ambos métodos refleja distintas condiciones experimentales y los tipos de radicales libres que cada método utiliza. Por lo tanto, los valores de capacidad antioxidante obtenidos por estos métodos no son directamente comparables.

El coeficiente de variación asociado a cada método muestra una consistencia en los resultados de las repeticiones experimentales, siendo relativamente baja en ambos casos. Esto indica una buena precisión en la medición de la capacidad antioxidante. Además, el hecho de que ambos métodos, DPPH y ORAC, proporcionen valores altos en la misma orden de magnitud refuerza la validez de los resultados obtenidos. Además, la congruencia entre la alta concentración de fenoles y los altos valores de actividad antioxidante confirma el potencial beneficioso de la muestra, subrayando su valor en posibles aplicaciones nutricionales o farmacológicas.

6.3. Cuantificación de Antocianinas: pH-diferencial

Se determinó la concentración de antocianinas monoméricas totales tal como se muestra en la Tabla 11 mediante un análisis espectrofotométrico. Este método implica medir la absorción de la muestra a dos longitudes de ondas diferentes (530 y 700 nm) a dos valores de pH (1.0 y 4.5), lo que permite la cuantificación de las antocianinas monoméricas ajustando por cambios en las estructura de las antocianinas que afectan su absorción a diferentes pH.

Tabla 11. Determinación de antocianinas monoméricas totales medidas en término de cianidina-3-glucósido mediante el método de pH-diferencial de la muestra de cáscara de palta Hass.

N°	pH= 1,0		pH=4,5		Abs	Antocianinas Monoméricas Totales (mg C3G/L)	Antocianinas Monoméricas Totales (mg C3G/g _{BS})
	Amplitud 530	Amplitud 700	Amplitud 530	Amplitud 700			
1	0,309	0,204	0,232	0,189	0,062	10353,31	2,07
2	0,338	0,204	0,234	0,194	0,094	15696,95	3,14
3	0,338	0,205	0,223	0,187	0,097	16197,92	3,24
Promedio	0,328	0,204	0,230	0,190	0,084	14082,73	2,82
DV						3239,47	0,65
CV						23,0%	0,23%
2,82 ± 0,65 (mg eq. Cianidina-3-glucósido /g en base seca)							

Los resultados obtenidos a pH 1.0 y 4.5 para las longitudes de onda de 530 y 700 nm parecen consistentes entre sí, con una ligera variabilidad entre las muestras de 0,23% (observar Tabla 11). El promedio de absorbancias para pH 1.0 a 530 nm (0,328) es mayor que a 700 nm (0,204), lo que es esperado debido a que las antocianinas tienen un pico de absorción en torno a los 520-540 nm. A pH 4.5, la absorbancia disminuye con respecto a las absorbancias a pH 1.0, lo cual también es esperado ya que las antocianinas presentan un cambio en su estructura que resulta en menor absorción en este pH.

Las concentraciones de antocianinas monoméricas totales se expresan en dos unidades: mg C3G/L y mg C3G/g_{Base Seca}. Los valores son significativamente altos en ambos casos; 14.082,73 mg C3G/L y 2,82 mg C3G/g_{Base Seca}, lo que sugiere que las muestras tienen una concentración considerable de antocianinas. El valor de Absorbancia (Abs) que se utiliza para

estos cálculos es el promedio de absorbancia a 530 nm menos la absorbancia a 700 nm para cada pH, lo cual es una práctica común para corregir la lectura por turbidez o coloración no específica.

El valor de desviación estándar (DV) y el coeficiente de variación (CV) son indicadores de la precisión y repetibilidad de las mediciones. Un CV de 0,23% muestra una precisión alta. Además, este valor de antocianinas monoméricas totales es consistente con los valores arrojados anteriormente de fenoles totales, debido a que las antocianinas son un tipo de fenol que de por sí posee propiedades antioxidantes. Aunque las antocianinas constituyen una parte del contenido total de fenoles, su contribución específica y su interacción con otros compuestos fenólicos pueden influir en la actividad antioxidante general y en las propiedades saludables del extracto de cáscara de palta.

Tabla 12. Cantidad de antocianinas totales para diferentes tipos de productos alimentarios, medidos mediante el método de pH-diferencial.

Producto alimentario	Cantidad de Antocianinas (mg C3G/g en base seca)	Referencia Bibliográfica
Fresas	0,65	Aaby et al., 2007
Frambuesas	1,20	Wu et al., 2006
Arándanos	3,58	Kalt et al., 1999
Moras	3,89	Siriwoharn et al., 2004
Té negro	0,05	Lee et al., 2008
Café	0,01	González & Ramirez, 2003
Cacao	0,12	Lee et al., 2008

Si se compara la cantidad de antocianinas que poseen los distintos productos alimentarios dentro de la Tabla 12, considerando que la cáscara de palta Hass posee 2,82 mg C3G/g en base seca esta muestra que posee una mayor concentración de antocianinas que las fresas (0,65 mg C3G/g en base seca), frambuesa (1,20 mg C3G/g en base seca), té negro (0,05 mg C3G/g en base seca), café (0,01 mg C3G/g en base seca) y cacao (0,12 mg C3G/g en base seca). Sin embargo, los arándanos (3,58 mg C3G/g en base seca) y las moras (3,89 mg C3G/g

en base seca) presentan una mayor cantidad de antocianinas en comparación con la cáscara de palta Hass. Esto destaca el potencial antioxidante de la cáscara de palta Hass, situándola por encima de varios alimentos conocidos por sus beneficios para la salud, aunque por debajo de los frutos con altos niveles de antocianinas como los arándanos y las moras. Esta comparación subraya la importancia de la cáscara de palta Hass como un recurso valioso y subutilizado en la industria alimentaria y nutracéutica.

6.4. Determinación de la capacidad antimicrobiana: Método de dilución en agar

La Tabla 13 muestra las diferentes concentraciones de extracto de cáscara de palta Hass que se aplicaron en placas de Petri para evaluar su capacidad antimicrobiana mediante el método de dilución en agar.

Tabla 13. Concentraciones de extracto de cáscara de palta Hass y correspondiente contenido de polifenoles que se aplicaron para el estudio de la capacidad antimicrobiana mediante el método de dilución en agar.

Volumen de extracto (mL)	Muestra seca (mg)	mg muestra/mL solución	Fenoles totales (mg GAE/gbs)
2	21,78	1,56	83,9
1,5	16,34	1,21	63,0
1	10,89	0,84	42,0
0,8	8,71	0,68	33,6
0,6	6,53	0,52	25,2
0,4	4,36	0,35	16,8
0,2	2,18	0,18	8,4
0,1	1,09	0,09	4,2

La cantidad de fenoles totales en la solución es proporcional a la cantidad de extracto aplicado, lo cual influye sobre el efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de palta Hass. Estos compuestos, entre los que se incluyen flavonoides y taninos, han sido ampliamente estudiados por su capacidad para alterar las membranas celulares de los microorganismos, lo que sugiere que el extracto podría ser una fuente prometedora de antimicrobianos naturales.

La Tabla 14 presenta la actividad antimicrobiana del extracto de cáscara de palta Hass para diferentes microorganismos, lo que permite analizar su efectividad antimicrobiana frente a

cepas específicas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de microorganismos en la placa de agar (Cowan, 1999). Esto se identifica visualmente como áreas donde no hay crecimiento bacteriano.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de distintas concentraciones del extracto de cáscara de paltas Hass sobre diferentes microorganismos.

Microorganismo	Tipo	Concentración de extracto (mg de extracto seco/mL solución)							
		1,56	1,21	0,84	0,68	0,52	0,35	0,18	0,09
<i>S. cerevisiae</i>	Levadura	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>L. innocua</i>	Bacilo Gram (+)	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	Coco Gram (+)	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	Cocobacilo Gram (-)	+	+	+	+	+	+	+	+



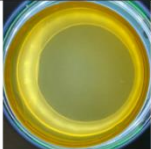
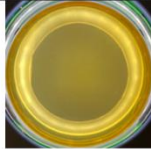
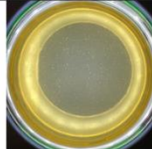
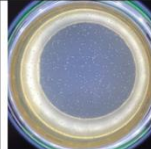
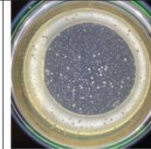
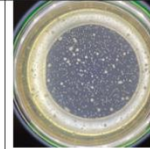



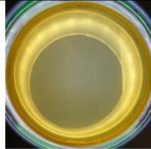
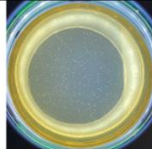
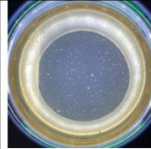
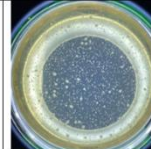
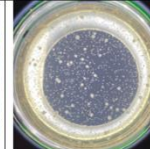
Se marcará con un “-” para los volúmenes de extracto en los cuales no hubo crecimiento microbiano, mientras que con un “+” para aquellos donde sí hubo crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 14, el extracto acuoso de cáscara de palta Hass presenta un efecto inhibitor cuando se encuentra en altas concentraciones en todos los microorganismos, exceptuando para el caso de la bacteria *Escherichia coli*, lo que sugiere que las bacterias Gram negativas presentan una mayor resistencia a los compuestos antimicrobianos de este extracto. Esto podría explicarse por la estructura más compleja de las bacterias Gram negativas, que poseen una membrana externa adicional que actúa como barrera protectora frente a compuestos hidrofóbicos, como los fenoles presentes en el extracto.

En contraste, *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura fermentadora de azúcares, mostró ser el microorganismo más sensible a los cuatro analizados, debido a que no hay crecimiento

microbiano hasta la concentración 0,52 (mg/mL) del extracto, en donde comienza a observarse colonias muy chicas, pero esparcidas por toda la superficie de agar. Vale decir, que la CMI para el caso de *S. cerevisiae* es 0.68 mg/mL de extracto de cáscara de palta Hass, equivalente a 25,2 mg GAE/g en base seca (Tabla 13). En anexo 4; Tabla 1 es posible observar que en la concentración 0,52 (mg/mL) del extracto las colonias son muy pequeñas y con 0,35 mg/mL se comienzan a observar colonias de mayor tamaño, por lo que, a mayor concentración de extracto de cáscara de palta las colonias de levadura crecen más lento hasta que dejan de crecer. Esto indica que este extracto es efectivo contra *S. cerevisiae* en concentraciones moderadas. Esto puede explicarse por la capacidad de los compuestos fenólicos para alterar la estructura de las membranas celulares de las levaduras, que son más simples en comparación con las bacterias. El crecimiento retardado de las colonias de levadura observado a concentraciones inferiores de extracto sugiere un efecto sobre las células eucariotas que de por sí crecen más lento en comparación con las bacterias, con disminución en el tamaño de las colonias a medida que aumenta la concentración del extracto, lo que confirma la eficacia del extracto en este tipo de microorganismo. Resultados similares se observaron en estudios realizados por Sepúlveda et al. (2024), donde el cinamaldehído, principio activo del extracto de canela, fue más efectivo sobre *S. cerevisiae* que sobre las bacterias *L. innocua* y *E. coli*.

Tabla 15. Resultados método de dilución en agar frente a levadura *S. cerevisiae*.

Vol. de extracto (mL)	2 mL	1,5 mL	1 mL	0,8 mL	0,6 mL	0,4 mL	0,2 mL	0,1 mL
Réplica 1								
Réplica 2								

Para *Listeria innocua*, un bacilo gram positivo, la inhibición del crecimiento ocurre a concentraciones iguales o mayores a 1,21 mg/mL, mientras que concentraciones menores

permiten el crecimiento bacteriano. Esto indica que la cáscara de palta tiene una capacidad antimicrobiana moderada contra esta bacteria, similar a la que se observa para *S. aureus*.

Staphylococcus aureus, otro coco gram positivo, sigue el mismo patrón que *Listeria innocua*, con inhibición del crecimiento bacteriano a concentraciones de 1,21 mg/mL o mayores. Esto sugiere que las bacterias gram positivas requieren concentraciones similares del extracto para ser inhibidas, mostrando una cierta consistencia en la respuesta de este tipo de bacterias al extracto de cáscara de palta.

Listeria innocua y *Staphylococcus aureus* son bacterias Gram positivas que se destacan por tener una única membrana celular rodeada por una capa de peptidoglicano y además una pared celular compuesta por una gruesa capa de esta misma. Se pudo observar en la Tabla 14 que ambas bacterias que son relativamente sensibles al extracto de cáscara de palta debido a que no hay crecimiento bacteriano para ambos casos hasta la concentración de 0,84 (mg extracto seco/mL de solución), es decir que corresponde a una CMI de 42,0 mg GAE/g en base seca (Tabla 9). Luego, como es posible de apreciar en Anexo 4; Tabla 2 y 3, hay un crecimiento gradual de las colonias de bacterias, es decir, que, a mayor concentración de extracto, menor proliferación de colonias y las colonias tienden a ser más pequeñas cuando se tiene una concentración más alta de este extracto. Esto refuerza la idea de que las bacterias Gram positivas, con su pared celular más gruesa de peptidoglicano, son más susceptibles a los compuestos fenólicos en comparación con las Gram negativas. Los estudios sugieren que los fenoles alteran la síntesis de la pared celular y la integridad de la membrana de estas bacterias, impidiendo su proliferación (Rita Cava-Roda et al, 2021).

Finalmente, *Escherichia coli* (cocobacilo gram negativo) es el microorganismo más resistente al extracto, ya que su crecimiento no se inhibe incluso a concentraciones de 1.56 mg/mL. Esto puede sugerir que las bacterias gram negativas, como *E. coli*, son menos sensibles a los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de palta, lo que podría deberse a la diferencia en la estructura de sus membranas celulares en comparación con las bacterias gram positivas. *E. coli* posee una membrana celular interna y externa separadas por una delgada capa de peptidoglicano, y en su membrana externa posee lipopolisacáridos que han demostrado que

generan esta resistencia a los compuestos antimicrobianos en otros estudios (Rita Cava-Roda et al, 2021; Francisco Sepúlveda et al., 2024).

Aunque previamente se mencionó que no se logró determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, los resultados presentados en el Anexo 4; Tabla 4 sugieren una sensibilidad de esta bacteria al extracto acuoso de cáscara de palta. A medida que se reduce la concentración del extracto, se observa un aumento en las unidades formadoras de colonia, junto con la aparición de colonias más pequeñas que no se observan en concentraciones más altas. A pesar de no haberse alcanzado una inhibición total en el rango de concentraciones estudiadas, los resultados indican que un aumento adicional en la concentración del extracto podría lograr la inhibición completa de la proliferación bacteriana de *E. coli*.

Dado lo anterior, los resultados obtenidos sugieren que el extracto de cáscara de palta corresponde a una buena fuente de agentes antimicrobianos naturales. Este hallazgo se respalda con la noción de que las plantas y sus frutos albergan una diversidad de compuestos bioactivos, derivados de sus sistemas de defensa contra patógenos y herbívoros. Se han documentado que los flavonoides, fenoles, taninos, alcaloides y saponinas presentes en las plantas poseen propiedades antimicrobianas significativas (Davicino R., Mattar M., 2007).

7. Conclusiones

La investigación sobre la extracción optimizada de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido a partir del exocarpio de palta Hass ha proporcionado valiosos conocimientos sobre la mejora de los procesos de extracción de fenoles y su potencial actividad antimicrobiana y antioxidante. A través de un diseño de experimentos que varió la concentración de etanol como solvente y el tiempo de extracción, se demostró que la extracción optimizada, utilizando una concentración de etanol al 50% v/v y un tiempo de extracción de 15 minutos, resultó en la mayor concentración de fenoles totales medida en ácido gálico, alcanzando 42 mg GAE/g en base seca.

Además, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto mediante los métodos ORAC y DPPH, con resultados significativos que respaldan su potencial como agente antioxidante. Se determinó que el extracto de cáscara de palta posee una cantidad considerable de antocianinas, como se cuantificó mediante el método de pH-diferencial, lo que amplía su perfil antioxidante y su potencial para aplicaciones nutricionales y de salud.

La evaluación de la capacidad antimicrobiana del extracto optimizado reveló resultados prometedores. Para *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*, se identificó una CMI de 42,0 mg GAE/g en base seca, mientras que para *Saccharomyces cerevisiae* fue de 25,2 mg GAE/g en base seca. Aunque no se logró determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Escherichia coli*, se observó una clara reducción en el crecimiento bacteriano con el aumento de la concentración del extracto, por lo que se sugiere para una próxima investigación aumentar aún más la concentración de cáscara de palta para así determinar esta CMI. Estos hallazgos sugieren un potencial significativo del extracto de cáscara de palta como agente antimicrobiano contra una variedad de microorganismos tanto patógenos como como no patógenos que son capaces de deteriorar las propiedades organoléptica de los alimentos.

En conjunto, los resultados de esta investigación respaldan que se acepta la hipótesis planteada anteriormente en este estudio. Vale decir, los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de palta variedad Hass que fueron obtenidos mediante una extracción asistida por ultrasonido en condiciones optimizadas poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

Estos hallazgos no solo contribuyen al conocimiento científico en el campo de la extracción de compuestos fenólicos, sino que también tienen implicaciones importantes para la industria alimentaria y de salud pública. Debido a que esta matriz alimentaria normalmente es un desperdicio, lo cual ahora se demostró que puede ser utilizada por la industria alimentaria y nutracéutica para prevenir enfermedades y además para retardar la oxidación e inhibir la proliferación microbiana de ciertos microorganismos deteriorantes y/o patógenos.

8. Bibliografía

- Aaby, K., Wrolstad, R. E., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5156-5166.
- ADA. (1999). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal American Dietetic Association*, 1278-1285.
- Álvarez, E. (2017). *Efecto de la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto en polvo sobre la termo-oxidación de aceite de girasol*. Memoria para optar al título de ingeniero en alimentos, Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Araújo, R. G., Rodríguez, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., Aguilar, C. N. (2018). Avocado by products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80(1), 51-60.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773.
- Arranz S., Saura-Calixto F., Shaha S., Kroon P. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298.
- Ávalos, C. O., Quijada J. L., Beltrán M. (2014). *Caracterización de los aguacates criollos (Persea americana Miller)*. Ciencias Agronómicas, Salvador.
- Awad, M. y Young R.E. (1979). Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectinmethyl-esterase in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol*, 306-308.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., & González-Aguilar, G. A. (2013). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 55, 217-225. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911001086?via%3Dihub#bb0320>
- Badui, S. (2006). *Pigmentos fenólicos*. México: Química de los alimentos, Person Educación.

- Baudi, S. (1997). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Peterson, D. A. (2009). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 106(44), 18933-18938.
- Botánica, S. (2023). *Propiedades de las antocianinas*. Obtenido de <https://www.botanical-online.com/dietas/antocianinas-propiedades-caracteristicas>
- Box, G. E. P., Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1-45.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie.*, 28(1), 25-30.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. Obtenido de <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/56/11/317/1901722>
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Castañeda, A., Pacheco, M. de L., Páez, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Chávez, F., Aranda, M., García, A., & Pastene, E. (2011). Los Polifenoles Antioxidantes Extraídos del Epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass)) Inhiben la Ureasa de *Helicobacter pylori*. B. . *Latinoamericano Caribe Plantas Medicinales y aromáticas*, 265-280.
- Cheftel, J. (1992). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. *Acribia*, 265-269.

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., 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.
- Chia, T., & Dykes, G. (2010). Antimicrobial Activity of Crude Epicarp and Seed Extracts From Mature Avocado Fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 753-756.
- Choe, E, Min, D. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food Science and Food Safety.*, 5, 169-186.
- Cires, M. J. (2019). *Efecto protector de un extracto polifenólico de palta (persea americana) rico en proantocianidinas frente a la alteración de la homeostasia colónica inducida por el consumo de dieta hiperproteica*. Univesidad de Nutrición y Alimentos, Chile.
- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cobo, A., Gómez-Caravaca, A., Pasini, F., Fiorenza, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by- products of avocado. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 505-513.
- Cornell, J. A. (2002). *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*. Wiley.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Davicino R., Mattar M. (2007). *Actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en argentina*.
- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., Chambers, H. F. (2010). Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 375(9725), 1557-1568.
- Escobar, B., Estevez, M., Fuentes, E., & Quezada, J. (2019). Antimicrobial activity of avocado (*Persea americana*) seed extracts against *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Science*.
- EUCAST. (2003). *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution*. EUCAST Discussion Document E.Dis. 7.1. .

- EUFIC. (2015). *Food fact for healthy choices*. Obtenido de <https://www.eufic.org/es/que-contienen-los-alimentos/articulo/polifenoles>
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23-36.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23-36.
- FDA. (2020). *Valor Diario y Porcentaje de Valor Diario en las etiquetas de información nutricional y complementaria*. Obtenido de <https://www.fda.gov/media/137914/download>
- Fleet, G. H. (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(1-2), 1-44.
- Francisco Sepúlveda, , Luis Puente-Díaz, Jaime Ortiz-Viedma, Alicia Rodríguez, Cielo Char. (2024). Encapsulation of Cinnamaldehyde and Vanillin as a Strategy to Increase Their Antimicrobial Activity. *Foods*, 13(2032).
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Johnston, M. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
- González de Mejía, E., & Ramirez-Mares, M. V. (2003). Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(9), 355-361.
- González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2010). Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of dietary flavonoids. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 435-452.
- Guzmán, J. J., López, R., Salgado, R., Ochoa, A., López, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* Var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82(1), 620-627.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2274-2279.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Jacob, B., et al. Biale, J., Young, R. (1971). The Avocado Pear. *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, 3-22.

- Jiménez, N., Van Kessel, J.S., Overbeek, L.S. (2020). Antibacterial activity of avocado (*Persea americana*) seed extract against antibiotic-resistant pathogens. *American Journal of Plant Sciences*, 11(2), 364-375.
- Kalt, W., Ryan, D. A., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K., & Vander Kloet, S. P. (1999). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4531-4537.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., Biswal, S. (Pharmacology and Toxicology). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of*, 47, 89-116.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., et al. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4613-4619. doi:<https://doi.org/10.1021/jf300090p>
- Kumari, A., Kakkar, P., Luqman, S. (2017). Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit and seed as natural sources of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design.*, 23(34), 5160-5170.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63-76.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2008). Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two blueberry species. *Journal of Food Science*, 67(5), 1660-1667.
- Marmot, M. (2011). Fruit and vegetable intake reduces risk of fatal coronary heart disease. *European Heart Journal.*, 32, 1182-1183.
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. (2011). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1523-1529.
- Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., et al. (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* mill. by-products: a rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 111, 212-218. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.024>

- Meloni, D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-style dry fermented sausages. *Food Control*, 47, 68-72.
- Mercedes, S., Barrera, P. (2005). *Concentración de antocianinas en jugo de cranberries (Vaccinium macrocarpon Ait.) mediante nanofiltración*. Ingeniería en Alimentos, Chile.
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (6th ed.)*. Pearson Education Limited.
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (6th ed.)*. Pearson Education Limited.
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A. & Hurst, W. J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4061-4068.
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A., & Hurst, W. J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4061-4068.
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A., Hurst, W. J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4061-4068.
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. Wiley.
- Morton, J. (1987). Avocado. In: Fruits of warm climates. *Miami FL*, 91-102.
- Mostert, E. (2007). Effect of fruit ripeness and method of fruit drying on the extractability of avocado oil with hexano and supercritical carbon dioxide. . *Journal of the science of Food and Agriculture*, 2880-2885.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley.
- Nielsen, J., Keasling, J. D. (2016). Engineering cellular metabolism. *Cell*, 164(6), 1185-1197.
- Oelrichs, P. B., Ng, J. C., Seawright, A. A., Ward, A., Schäffeler, L., MacLeod, J. K. (1995). Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves

- which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *Natural Toxins*, 3(5), 344-349.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.
- Osorio. (2013). *Evaluación del Efecto de dos Niveles de pH en la Capacidad Antioxidante de la Semilla de Aguacate Criollo (Persea americana Mill.)*. Memoria de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria., Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*., 322, 207-228.
- Otto, M. (2013). Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology*., 16(1), 32-37.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*., 2(5), 270-278.
- Pérez-Jiménez, J. (2019). Potential of dietary extractable and non-extractable polyphenols in the prevention of cardiometabolic diseases. *Real Academia Nacional de Medicina de España*, 136(03), págs. 298-307.
- Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100.
- Platt, K. &. (1992). Idioblast Oil Cells of Avocado Distribution, Isolation, Ultrastructure, Histochemistry and Biochemistry. *International Journal of Plant Sciences*, 301-310.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C. & Maines, M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686-2693.
- Quiñones M., Miguel M., Alexandre A. (2012). *The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease*. Madrir: Nutrición Hospitalaria.

- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology.*, 13(4), 835-850.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1995). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.*, 20(7), 933-956.
- Rita Cava-Roda, Amaury Taboada-Rodríguez, Antonio López-Gómez, Ginés Benito Martínez-Hernández y Fulgencio Marín-Iniesta. (2021). Synergistic Antimicrobial Activities of Combinations of Vanillin and Essential Oils of Cinnamon Bark, Cinnamon Leaves, and Cloves. *Foods*, 20(6), 1406. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1406>
- Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FAO/WHO*.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., 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(10), 5625-5635.
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant capacities, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 59(11), 5625-5635.
- Rodríguez-Saona, C., et al. Millar, J., Maynard, D., Trumble, J. (1998). Novel Antifeedant and Insecticidal Compounds From Avocado Idioblast Cell Oil. *Journal of Chemical Ecology*, 867-889.
- Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., et al. (2019). Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana* mill.) cultivated in Colombia. *Molecules*, 24(17), 234. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A.*, 1012(2), 119-128.
- Salazar-López, N. J., Skenderidis, P., & Domínguez-Avila, J. A. (2020). Phenolic compounds and antimicrobial properties of avocado peel. *Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 872-880. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04144-5>

- Salgado G. A., Patiño, J. H., Cano, J. A. (2013). Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate Hass (*Persea americana* Mill) usando tratamiento enzimático. *Lasalista de investigación*, 9, 138-150.
- Schaffer, B. (2013). The Avocado: Botany Production and Uses. *CABI Publishing*, 168-199.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449-7454.
- USDA. (2020). *Aguacate crudo*. Obtenido de <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1102652/nutrients>
- Velásquez, J. (2005). Identificación del aguacate como un rubro importante de grandes oportunidades comerciales, según los acuerdos de integración, los nuevos tratados comerciales y el comercio mundial globalizado. *Secretaría de Productividad y Competitividad*.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Wagner, G. (1982). *Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism*. Plenum Press. New York: Recent advances in Phytochemistry.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
- Wang, W. e. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 1193-1198.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33(6), 449-459.

- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2006). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7846-7856.
- Xóchitl F., García I., Hernández J. (2022). *Antocianinas, propiedades funcionales y potenciales aplicaciones terapéuticas*. México: UAEM. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4263/426374726001/>
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 502-509.

9. Anexos

9.1. Materiales y Métodos

Tabla 1. Diseño experimental de extracciones de cáscara de palta Hass otorgado por Statgraphics.

N°	Concentración de EtOH %	Tiempo (min)	Concentración de EtOH %	Tiempo (min)
1	1	1	50	15
2	-1	-1	0	5
3	0	0	25	10
4	-1	1	0	15
5	1	0	50	10
6	0	-1	25	5
7	1	-1	50	5
8	-1	0	0	10
9	0	1	25	15

Tabla 2. Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (disolución madre) para la determinación de fenoles totales en muestra de cáscara de palta Hass.

Reactivos								
N°	B	1	2	3	4	5	6	7
Disolución madre (mL)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4
Agua destilada (mL)	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6
Concentración de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	0	50	100	150	200	250	300	400

Tabla 3. Soluciones a preparar para la ejecución de cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH para la muestra de cáscara de palta Hass.

	Control	Blanco	Muestra
Extracto	0 ml	0,1 mL	0,1 μ L
DPPH	3,9 mL	0 mL	3,9 μ L
Metanol	0,1 mL	3,9 mL	0 μ L
Volumen total	4 mL	4 mL	4 mL

Tabla 4. Curva de calibración estándar trolox.

Solución	Alícuota (ml)	Volumen matraz (mL)	Concentración
1	0,5 mL de solución Stock	10	100
2	5 mL de solución 1	10	50
3	5 mL de solución 2	10	25
4	5 mL de solución 3	10	12

9.2. Método de superficie de respuesta

Tabla 1. Indicadores estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta de fenoles totales.

Indicadores estadísticos	
R-Cuadrada	94,07%
R-Cuadrada (ajustada por g.l.)	88,15%
Error estándar del est.	3640,97
Error absoluto medio	1985,18
Estadístico Durbin-Watson	1,58402 (P=0,7751)
Autocorrelación residual de Lag 1	-0,193876

Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) hecho por el programa Statgraphics.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Etanol	5,92029E8	1	5,92029E8	44,66	0,0026
B:Tiempo	1,3129E8	1	1,3129E8	9,90	0,0346
AA	1,00751E7	1	1,00751E7	0,76	0,4325
AB	1,08161E8	1	1,08161E8	8,16	0,0461
Error total	5,30268E7	4	1,32567E7		
Total (corr.)	8,94582E8	8			

9.3. Resultados capacidad antioxidante por método DPPH

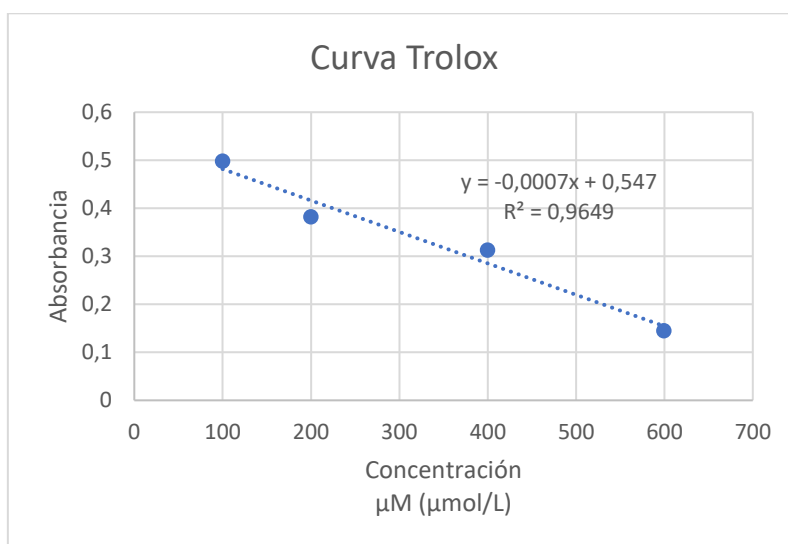


Figura 1. Curva de calibración lineal de Trolox

9.4. Resultados capacidad antioxidante por método ORAC

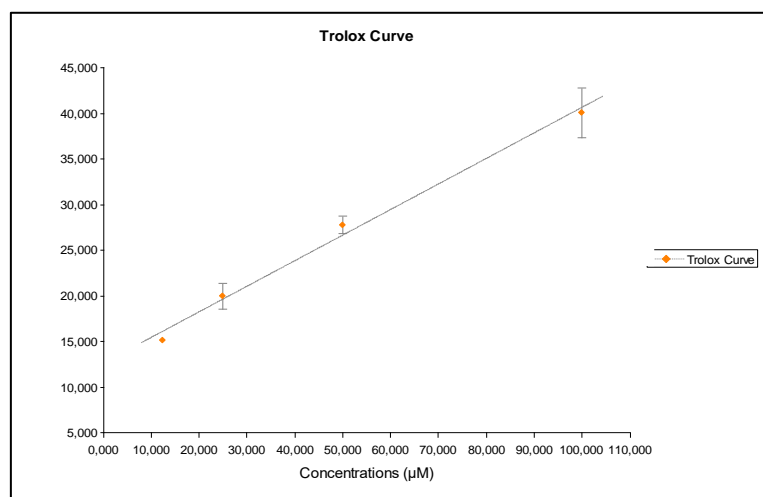






Figura 1. Curva de calibración lineal de Trolox

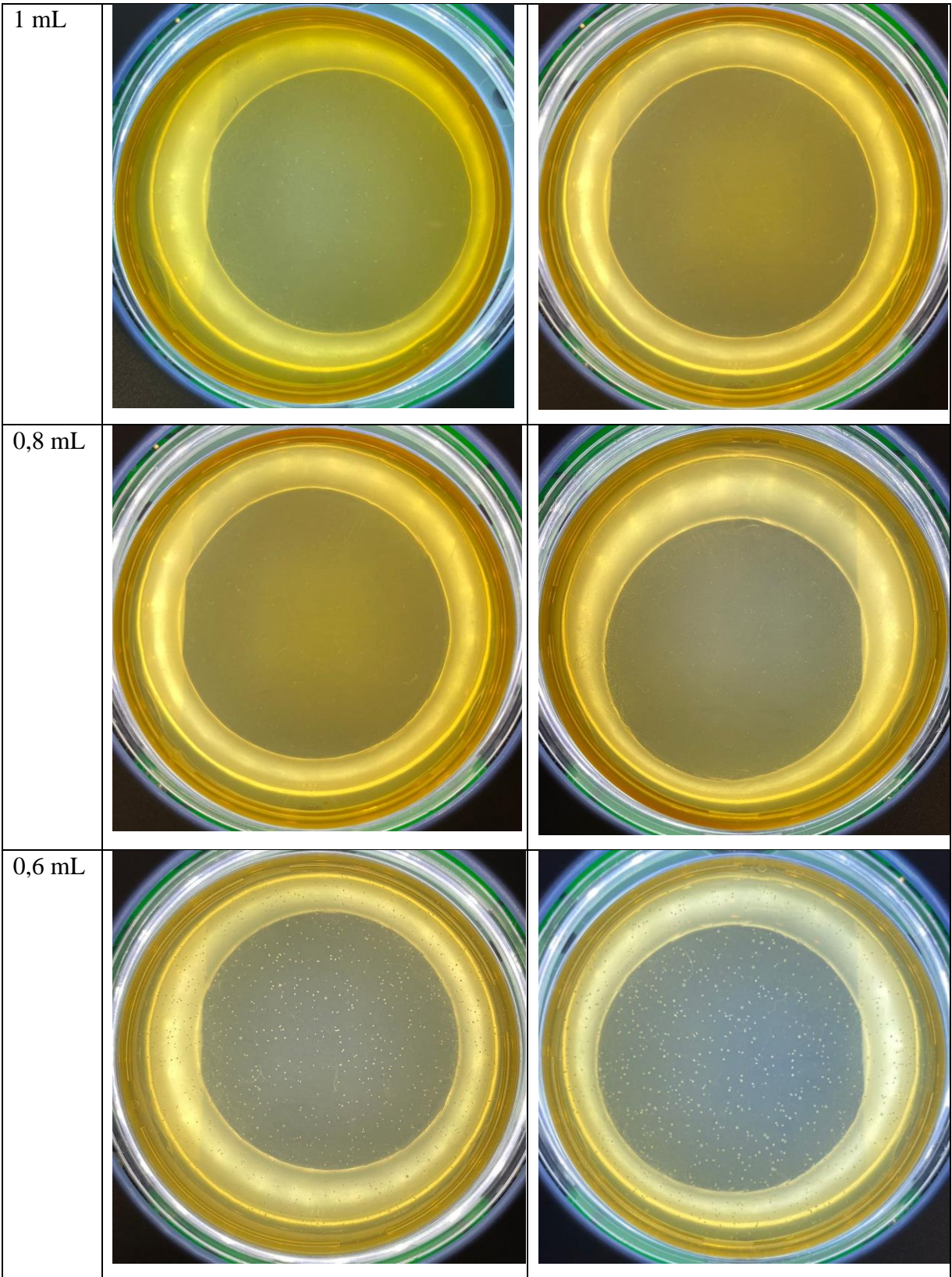
Tabla 1. Fórmula de la curva de calibración lineal de trolox otorgada por el equipo de ORAC.

Curve Name	Curve Formula	A	B	R2
Trolox Curve	$Y=A*X+B$	0,28	12,6	0,992

9.5. Resultados del método de dilución en agar

Tabla 1. Resultados frente a levadura *S. cerevisiae*.

Vol. de extracto (mL)	Réplica 1	Réplica 2
2 mL		
1,5 mL		



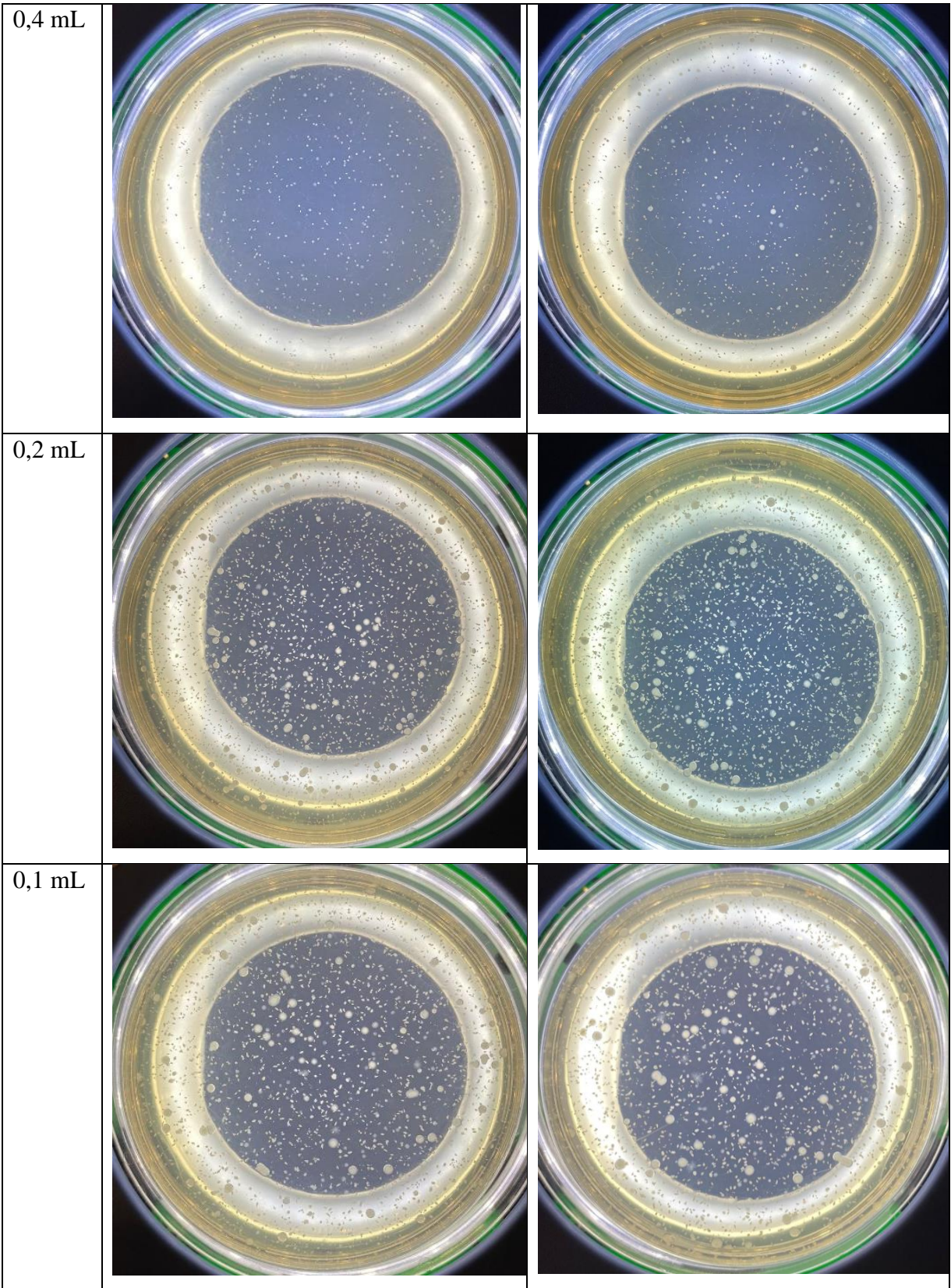
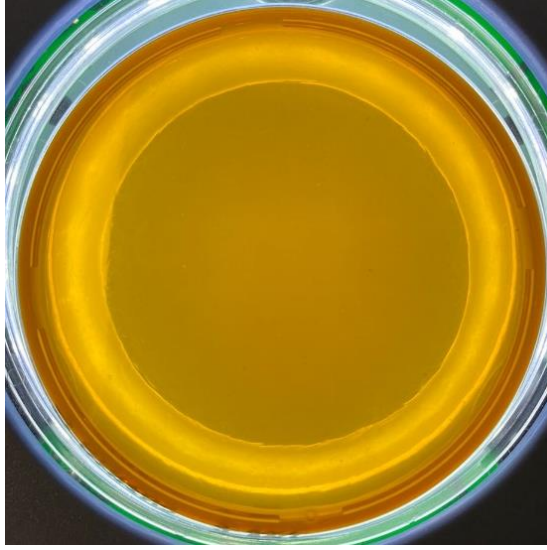



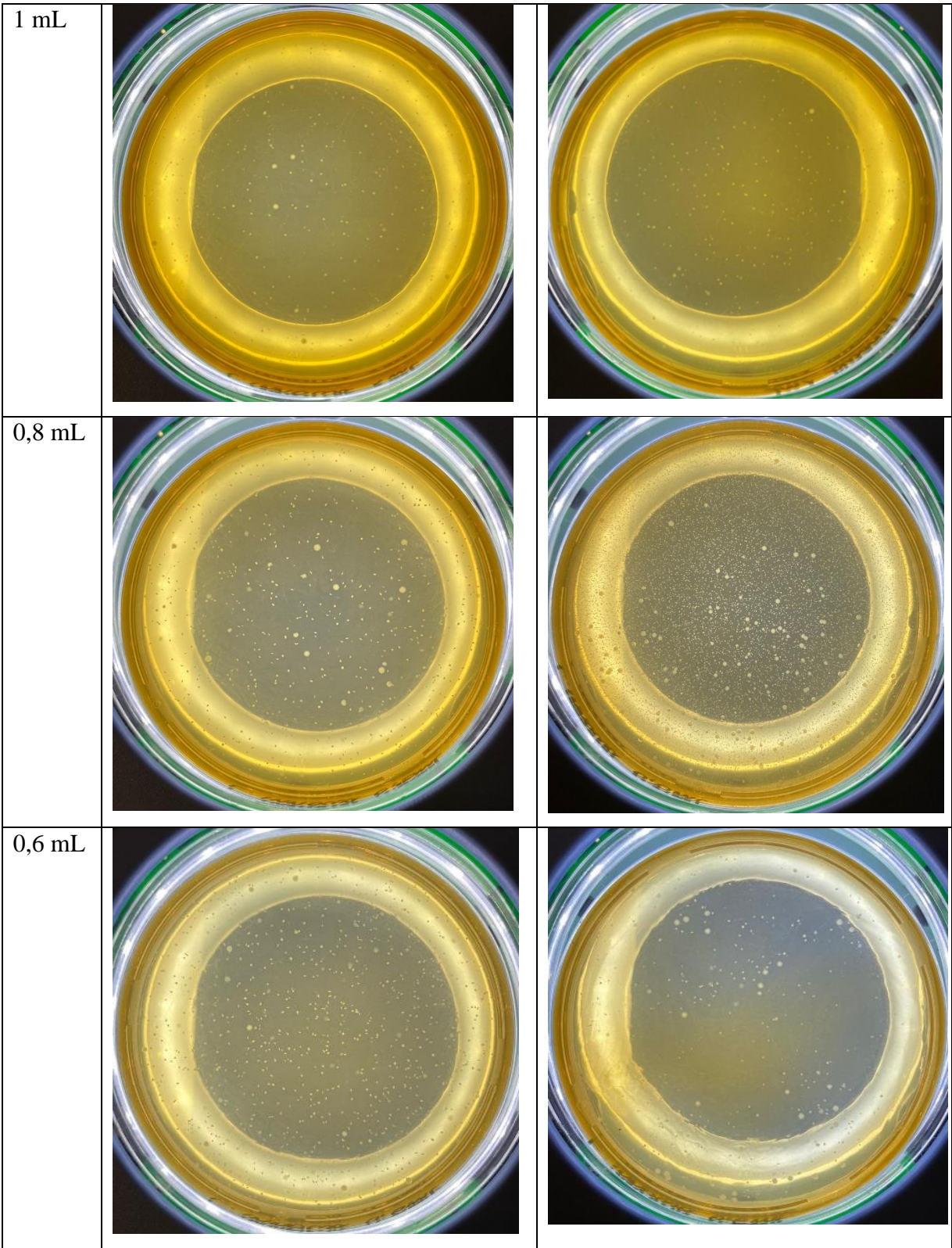


Tabla 2. Resultados frente a bacteria *L. innocua*.

Vol. de extracto (mL)	Réplica 1	Réplica 2
2 mL	 A petri dish containing a clear, yellowish liquid. The liquid is uniform in color and texture, with no visible bacterial growth or turbidity.	 A petri dish containing a clear, yellowish liquid. The liquid is uniform in color and texture, with no visible bacterial growth or turbidity.
1,5 mL	 A petri dish containing a clear, yellowish liquid. The liquid is uniform in color and texture, with no visible bacterial growth or turbidity.	 A petri dish containing a clear, yellowish liquid. The liquid is uniform in color and texture, with no visible bacterial growth or turbidity.



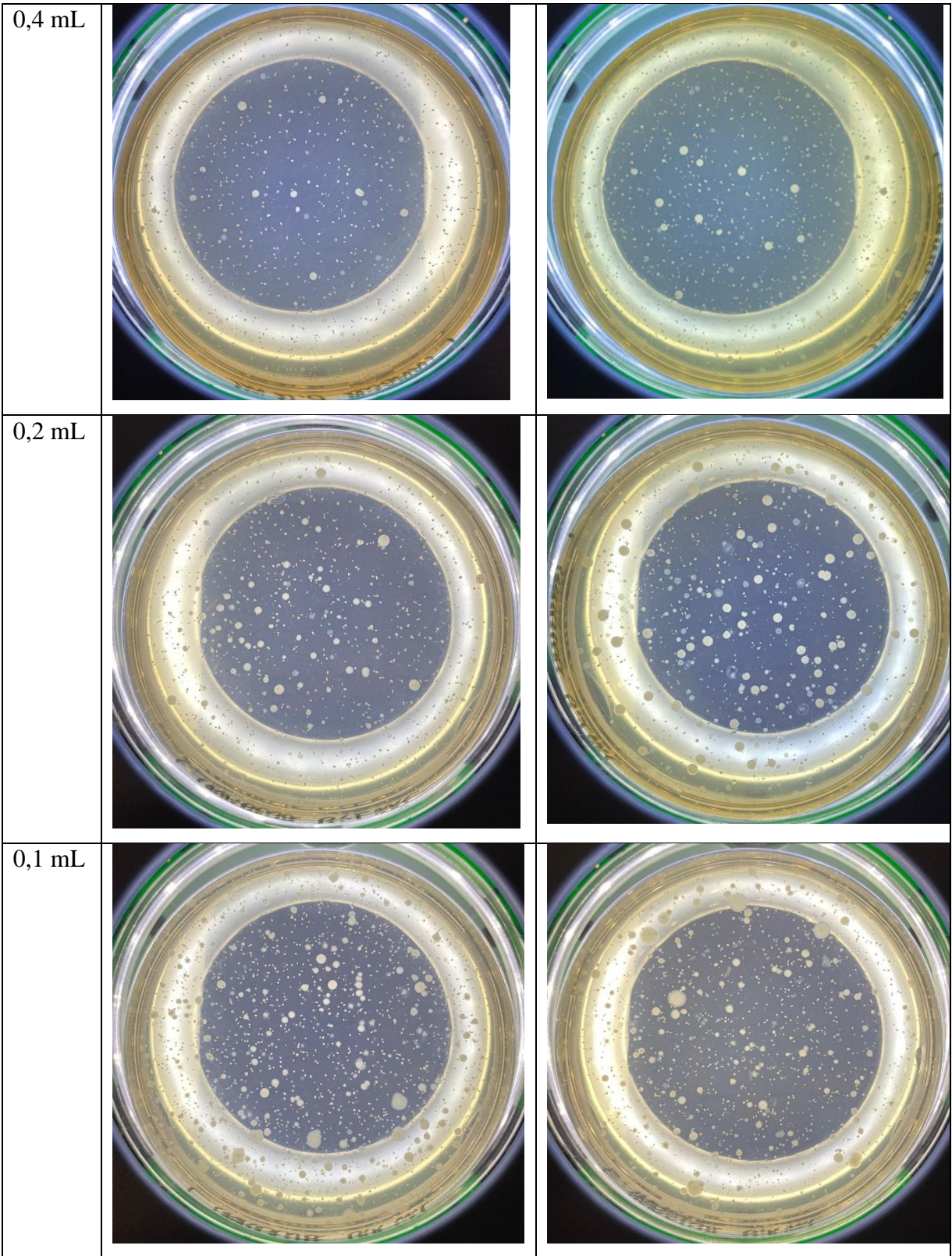




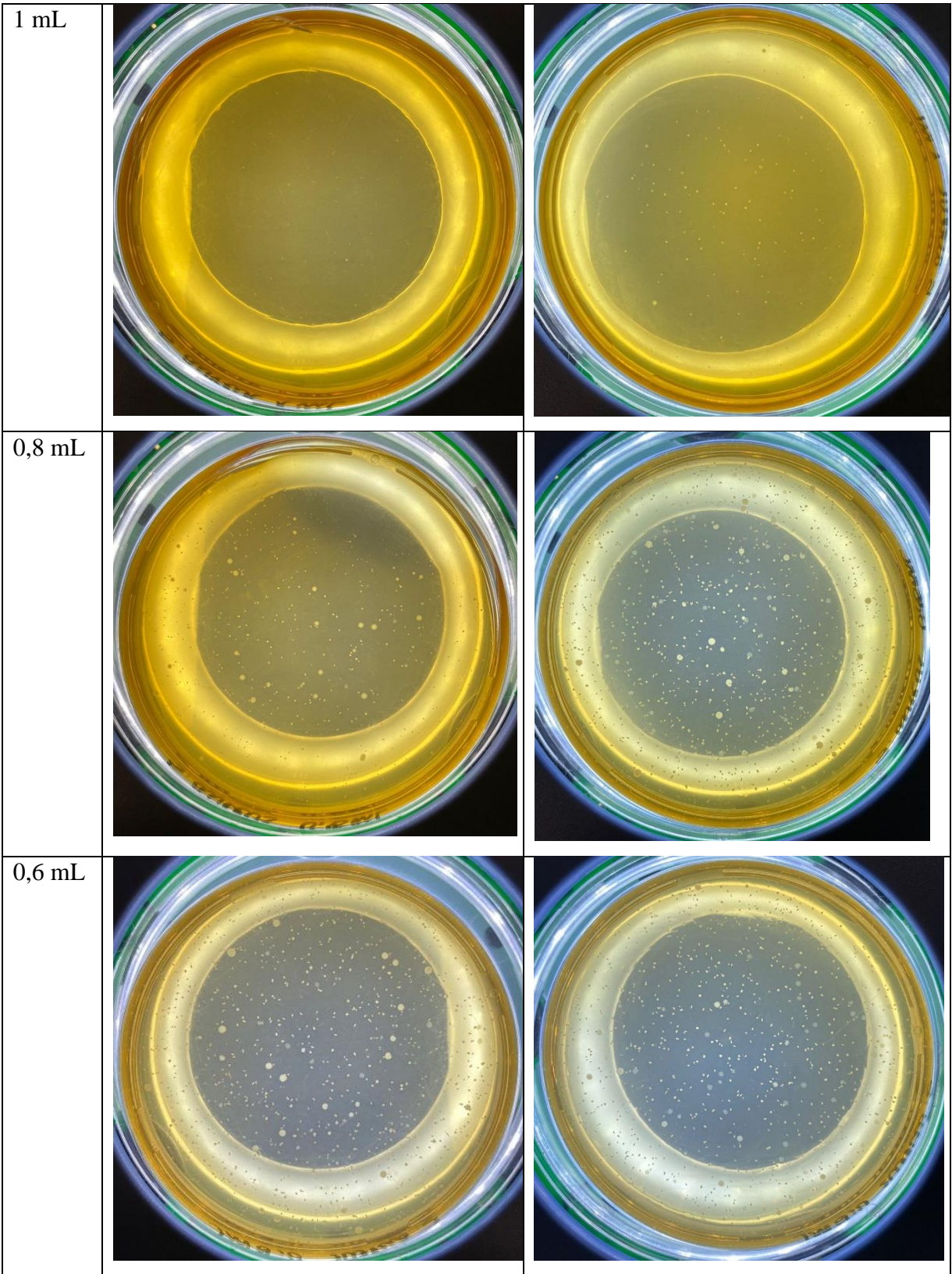


Tabla 3. Resultados frente a bacteria *S. aureus*.

Vol. de extracto (mL)	Réplica 1	Réplica 2
2 mL	 A petri dish containing a clear, yellowish-orange liquid. The liquid is uniform in color and has a slightly viscous appearance. The dish is viewed from a top-down perspective.	 A petri dish containing a clear, yellowish-orange liquid, identical to the first replica. The liquid is uniform in color and has a slightly viscous appearance. The dish is viewed from a top-down perspective.
1,5 mL	 A petri dish containing a clear, yellowish-orange liquid. The liquid is uniform in color and has a slightly viscous appearance. The dish is viewed from a top-down perspective.	 A petri dish containing a clear, yellowish-orange liquid, identical to the first replica. The liquid is uniform in color and has a slightly viscous appearance. The dish is viewed from a top-down perspective.



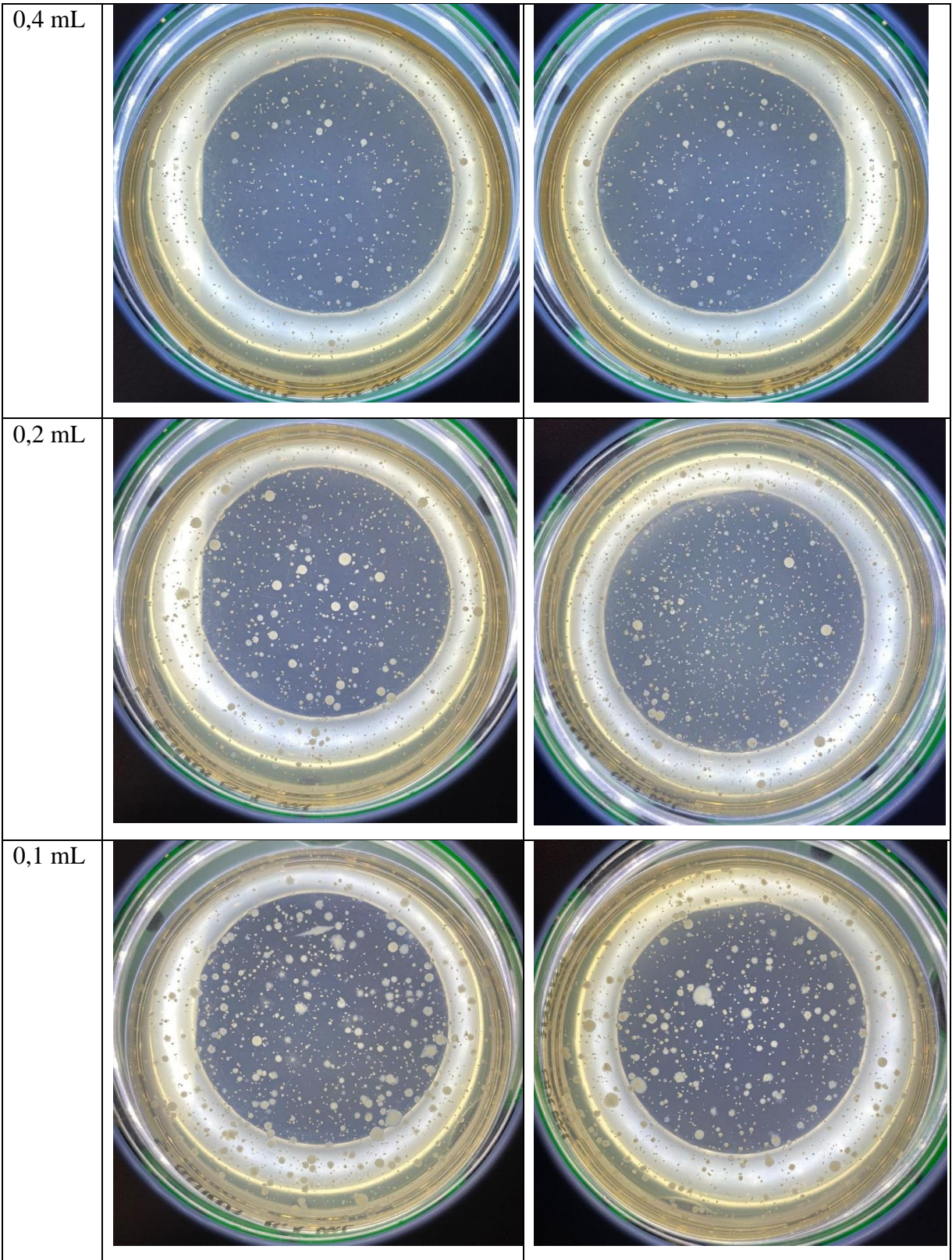


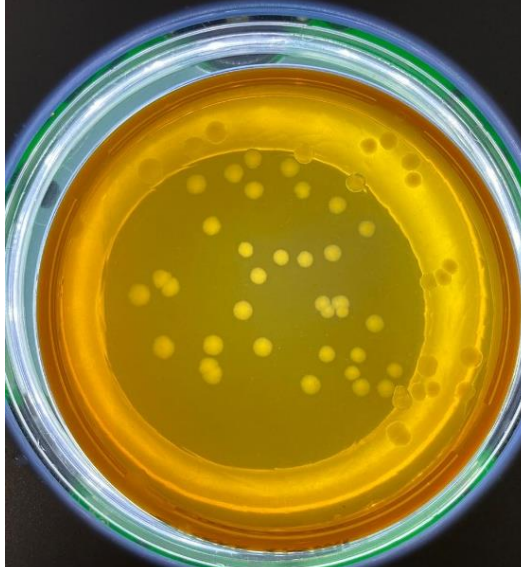
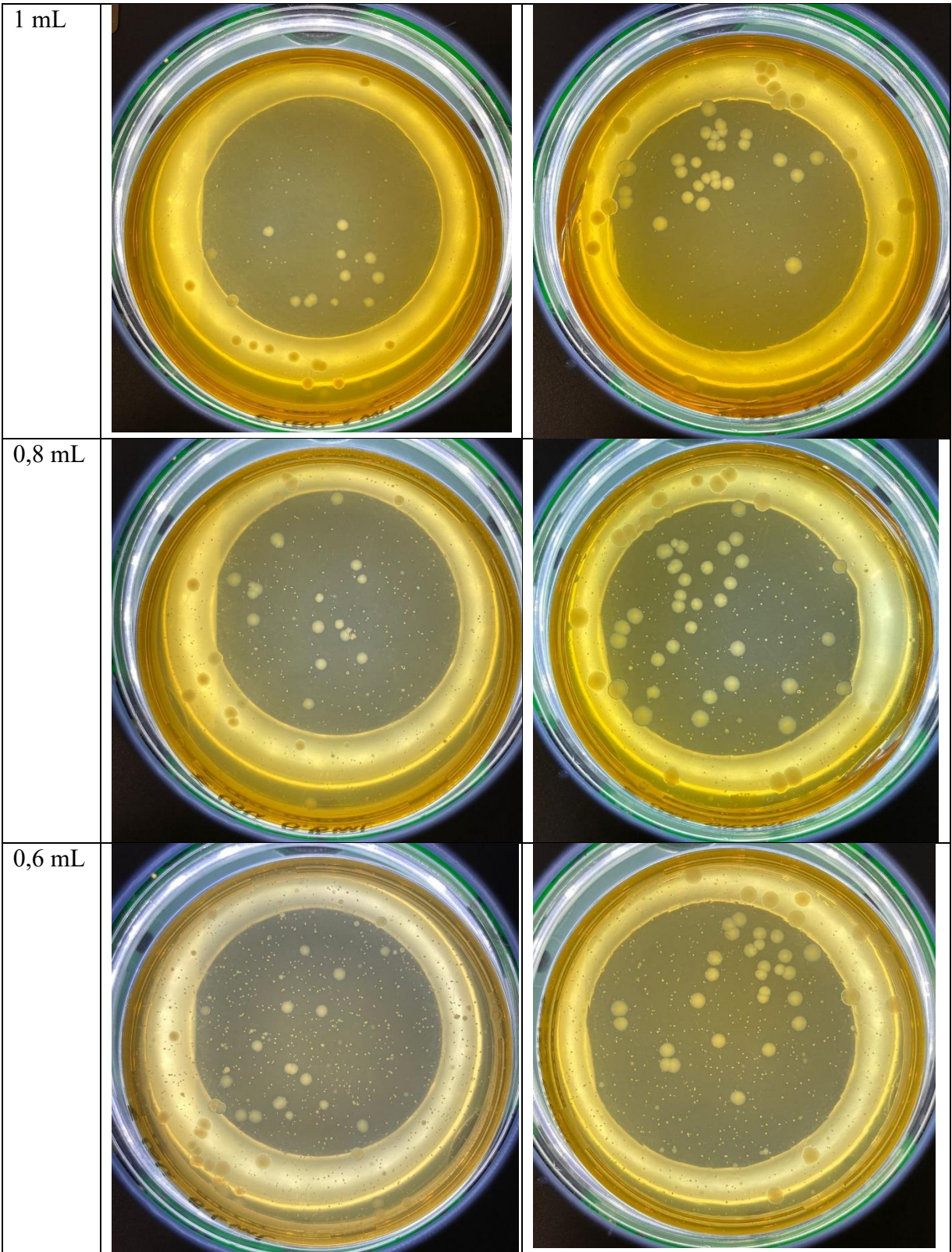
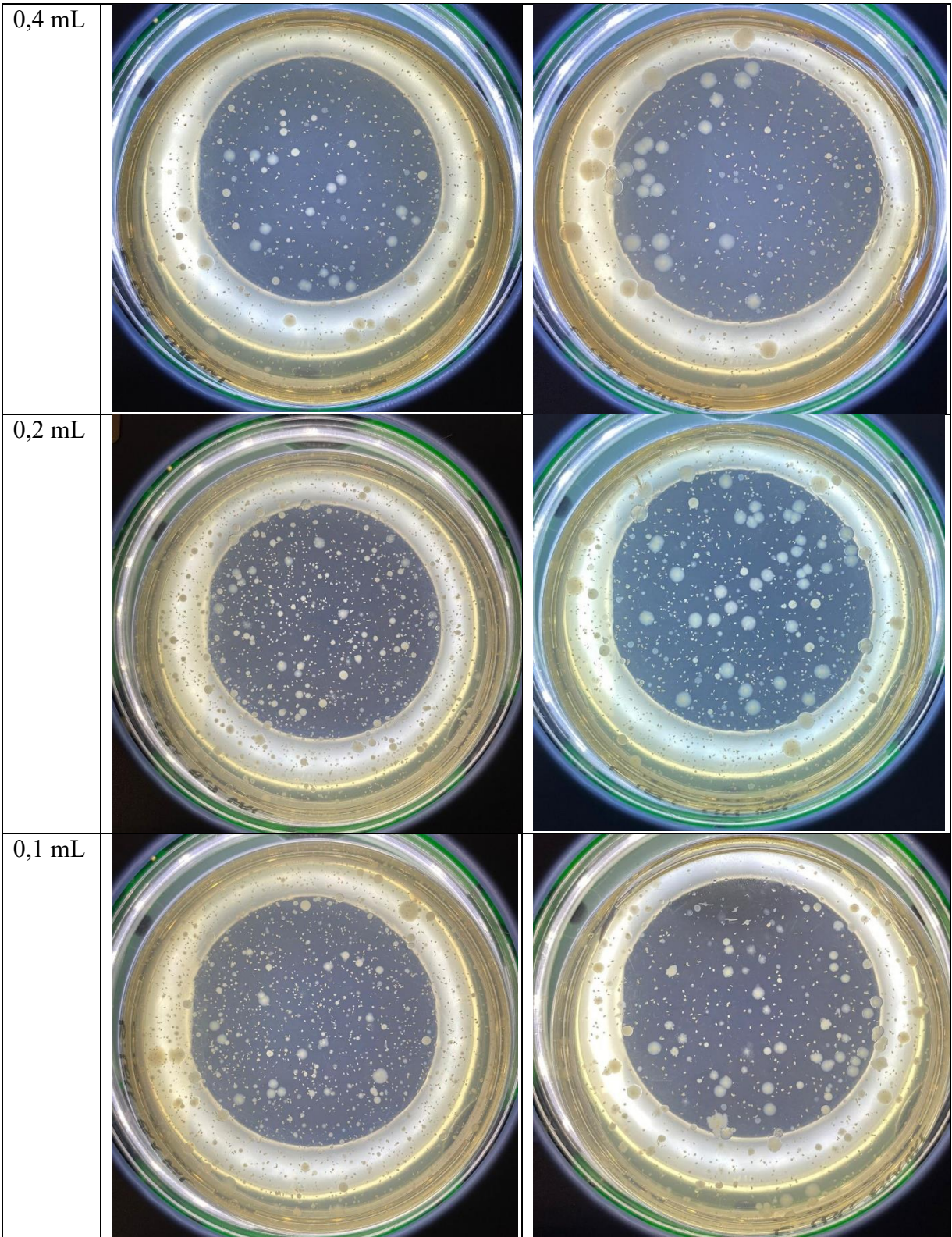


Tabla 4. Resultados frente a bacteria *E. coli*.

Vol. de extracto (mL)	Réplica 1	Réplica 2
2 mL	 A petri dish containing a yellowish liquid. Several small, white, circular colonies are visible, scattered across the surface of the liquid.	
1,5 mL	 A petri dish containing a yellowish liquid. Several small, white, circular colonies are visible, scattered across the surface of the liquid.	
	 A petri dish containing a yellowish liquid. Numerous small, white, circular colonies are visible, densely packed in the center and spreading towards the edges.	





9.6. Recuento microbiológico

Ecuación para la cuantificación de número de bacterias por mL medidas como unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL):

$$\bar{X} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{1}{V_{Siembra}}$$