

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Estudio preliminar para el análisis de metabolitos
secundarios en cáscaras de agujajes peruanos**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
DE BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA**

AUTOR

Guillermo Enrique Guerrero Pinedo

ASESOR

Dr. Gabriel Franco dos Santos

Lima, 2019

Dedicatoria



Para mi papá, por ser el ejemplo académico y moral en mi vida,

para mi mamá, por transmitirme todo su amor y placidez, y

para ambos, por ser el sostén incondicional en mi andar.

Resumen

El presente trabajo de investigación explora las posibilidades de análisis de los principales metabolitos secundarios presentes en la cáscara de aguajes peruanos. Como tal, esta parte del fruto constituye una fuente de contaminación, ya que actualmente no posee valor agregado como subproducto. En este sentido, se plantea que el estudio de la composición química, en relación a estos compuestos bioactivos, podría implicar una oportunidad para el aprovechamiento potencial de las cáscaras de estos frutos amazónicos.

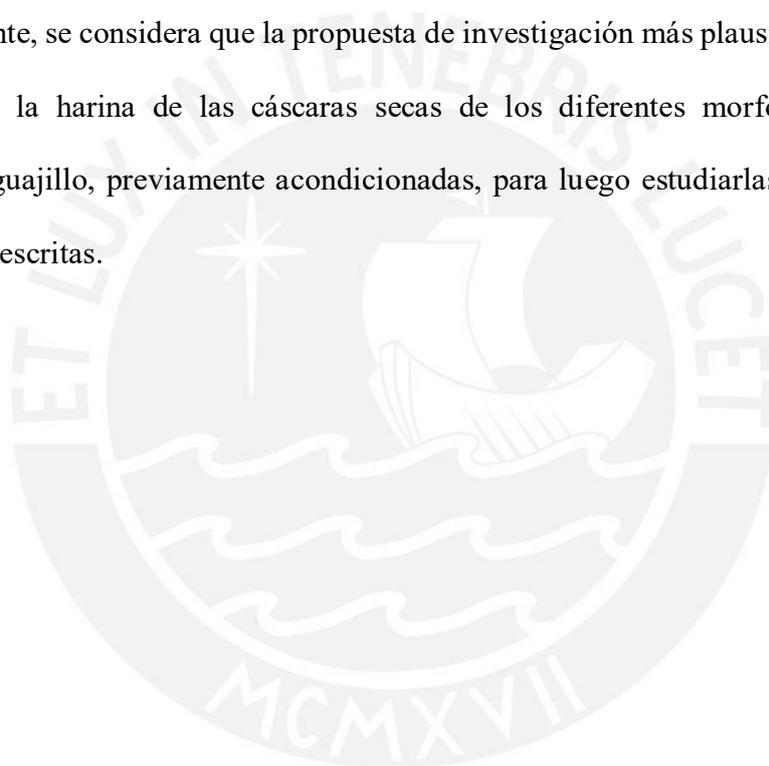
Para cumplir los objetivos de esta investigación, se realizó una amplia revisión bibliográfica partiendo de la importancia del fruto del aguaje en la Amazonía, en correlación con la valiosa composición química y nutricional de su pulpa. El conocimiento del alto contenido de ácidos grasos y ciertos compuestos antioxidantes importantes, ha permitido comprender su alta demanda, tanto para la población local como la industria alimentaria y cosmética; mientras que la cáscara ha sido por mucho tiempo considerada como un residuo acumulable.

Seguidamente, se estudiaron los principales metabolitos secundarios que suelen encontrarse comúnmente en las cáscaras de diversos frutos tropicales. Se realizó una descripción de la naturaleza, ocurrencia en las plantas, propiedades químicas y aplicaciones de estos compuestos. Dentro de estos, se destacan los carotenoides, tocoferoles y compuestos polifenólicos, constituidos principalmente por taninos, tanto hidrolizables como condensados, y flavonoides.

La revisión de diferentes investigaciones en la cáscara de variados frutos tropicales permitió identificar ciertos métodos pertinentes para el análisis de esta parte de los aguajes. En tal caso, el contenido total de los metabolitos secundarios mencionados puede cuantificarse, por ejemplo, mediante metodologías basadas en espectrofotometría UV-Vis. Además, en gran parte de estos trabajos suele evaluarse la capacidad antioxidante de los extractos de las cáscaras a través de ensayos con radicales o reacciones redox. No obstante, la información provista por

estas metodologías solo permite caracterizar la materia prima a grandes rasgos; por lo que los métodos cromatográficos más sofisticados serían necesarios para determinar la identidad y cantidad de los compuestos bioactivos más importantes presentes. Finalmente, mediante experimentos de resonancia magnética nuclear sería posible la elucidación definitiva de la estructura química de dichos analitos.

En base a esta información, se concluye que existe una interesante oportunidad de investigación para analizar los metabolitos secundarios de las cáscaras de aguajes peruanos. Consecuentemente, se considera que la propuesta de investigación más plausible debe partir de la obtención de la harina de las cáscaras secas de los diferentes morfotipos de aguaje, incluyendo el aguajillo, previamente acondicionadas, para luego estudiarlas con las técnicas instrumentales descritas.



Agradecimientos

A mi papá, por brindarme día a día la motivación académica y humana necesaria para emprender, con voluntad y compromiso, mi arduo camino en la ciencia, y por apoyarme incondicionalmente frente a cualquier necesidad. A mi mamá, por su paciencia, cariño y aliento inagotable en cada proyecto que realizo. Y a ambos, por su constante sacrificio, plasmado en las comodidades que me brindan, para enfocarme en mis estudios.

A mis hermanos, por estar siempre pendientes de mis logros y alentarme a conseguir mis metas, con el anhelo de que sea mejor cada día.

Al Dr. Gabriel Franco dos Santos, por permitirme ser parte de su labor investigadora, guiarme plenamente en la realización de este trabajo y por transmitirme sus valores, conocimientos y pasión en el campo de la Química.

A todos y cada uno de mis profesores, por brindarme la sabiduría necesaria para poder encaminar mi vida profesional con prudencia y eficacia.

Finalmente, a la Universidad Nacional de San Martín que, desde el primer momento, me abrió sus puertas para la obtención de información útil e indispensable para el desarrollo de esta investigación.

Tabla de contenidos

Dedicatoria	i
Resumen	ii
Agradecimientos	iv
Tabla de contenidos	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introducción	1
2. Generalidades del aguaje	4
2.1. Descripción taxonómica y botánica	4
2.2. Descripción de su variabilidad y morfotipos	7
3. Importancia del aguaje como fruto	9
3.1. Producción y consumo directo en la Amazonía Peruana	9
3.3. Aprovechamiento industrial	12
3.4. Residuos del fruto	13
4. Metabolitos secundarios en cáscaras de frutos y sus métodos de análisis	16
4.1. Metabolitos secundarios comunes en las cáscaras	16
4.1.1. Compuestos fenólicos	17
4.1.1.1. Taninos.....	17
4.1.1.1.1. <i>Taninos hidrolizables</i>	18
4.1.1.1.2. <i>Taninos condensados</i>	20
4.1.1.2. Flavonoides.....	22
4.1.2. Carotenoides	24
4.1.3. Tocoferoles	27
4.2. Métodos de análisis de metabolitos secundarios	28
4.2.1. Contenido de polifenoles totales	28
4.2.2. Contenido de taninos hidrolizables	31
4.2.3. Contenido de taninos condensados extraíbles	32
4.2.4. Contenido de taninos condensados no extraíbles	34
4.2.5. Flavonoides totales	35
4.2.6. Carotenoides totales	36
4.2.7. Capacidad antioxidante de extractos	37
4.2.8. Cromatografía líquida	39

5. Conclusiones.....43
Referencias bibliográficas45



Lista de figuras

Figura 1. Aguajal: conjunto de palmeras de aguaje (<i>M. flexuosa</i> L. f.) en Moyobamba, San Martín, Perú.	4
Figura 2. Partes del fruto del aguaje (<i>M. flexuosa</i> L. f., morfotipo amarillo)	6
Figura 3. Frutos de aguajillo (<i>M. armata</i> (Mart.) Burret) (al lado, más grandes y de color rojo oscuro, frutos de aguaje (<i>M. flexuosa</i> L. f.)) en el mercado Belén, Iquitos, Loreto, Perú.	7
Figura 4. Estructura del ácido gálico y del prototipo de galotanino (pentagalol glucosa).....	19
Figura 5. Derivatización de elagilotaninos por acoplamiento oxidativo.....	19
Figura 6. Degradación catalizada por ácido de proantocianidinas	21
Figura 7. Flavonoides	23
Figura 8. Conversión de fitoeno a licopeno (estructura común de los carotenoides).....	25
Figura 9. Carotenoides	26
Figura 10. Estructuras químicas de tocoferoles y plastoquinona.....	27
Figura 11. Reacción entre tanino hidrolizable y KIO_3 para su cuantificación.....	32
Figura 12. Hidrolisis de tanino condensado no extraíble por HCl/butanol.....	34

Lista de tablas

Tabla 1. Producción, superficie de cosecha y precio en chacra de los frutos del aguaje en el Perú entre los años 2015, 2016 y 2017.....	10
Tabla 2. Compuestos bioactivos de la pulpa de aguaje	40



Lista de abreviaturas

A _{661, 644, 470}	Absorbancia a 661, 644, 470 nm
Ca, b	Contenido de clorofila A, B.
¹³ C–RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DPPH	2,2-difenil-picilhidracil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAT	Equivalentes de ácido tánico
EC	Equivalentes de catequina
EQ	Equivalentes de quercetina
FRAP	Poder antioxidante del reductor férrico
GC – MS	Cromatografía de gases – espectrómetro de masas
GGPP	Geranilgeranil difosfato
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiple enlace
¹ H–RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
HPLC–APCI–MS	Cromatografía líquida de alta performance– Ionización química a presión atmosférica– Espectrómetro de masas
HPLC–DAD	Cromatografía líquida de alta performance– detector de arreglo de diodos
HPLC–fluorescencia	Cromatografía líquida de alta performance– detector de fluorescencia
HPLC–PAD	Cromatografía líquida de alta performance– detector de arreglo de fotodiodos
HPLC–ESI–MS	Cromatografía líquida de alta performance– Ionización eselectrospray– Espectrómetro de masas
HSQC	Coherencia cuántica única heteronuclear
IC ₅₀	Cantidad de muestra seca requerida para disminuir el 50% de concentración inicial
LC	Cromatografía líquida

MALDI-TOF	Ionización por desorción láser asistida por matriz- Espectrometría de tiempo de vuelo
<i>M. aculeata</i>	<i>Mauritiella aculeata</i>
<i>M. armata</i> (Mart.) Burret	<i>Mauritiella armata</i> (Mart.) Burret
<i>M. flexuosa</i> L.f.	<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
m/v	Relación masa/volumen
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear Overhauser
PA	Proantocinidina
PS	Peso seco
RFC	Ractivo Folin-Ciocalteu
TPTZ	Tripiridiltriazina
UPLC-ESI-MS	Cromatografía líquida de ultra performance- Ionización por electrospray-Espectrómetro de masas
UPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra performance- Ionización por electrospray-Espectrómetro de masas tándem
UV-Vis	Ultravioleta-visible
v/v	Relación volumen/volumen

1. Introducción

El aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) es, probablemente, la palmera más representativa de la Amazonía. Se distribuye en gran parte de la selva, cerca de ríos, humedales, arroyos y cualquier zona inundada. Su importancia radica en la posibilidad de aprovechar, prácticamente, todas sus partes. Por ejemplo, las comunidades amazónicas emplean la raíz, la savia del tronco y las inflorescencias para preparar infusiones curativas y otras bebidas culturales. Además, el tronco de aguaje, al descomponerse, alberga una importante cantidad de larvas de la especie *Rhynchophorus palmarum*, las cuales se conocen como “suris” y constituyen un agradable alimento para la población. Así mismo, las hojas, ramas y tronco pueden emplearse en la construcción de viviendas, mientras que el fruto es uno de los principales sustentos alimenticios y económicos de la región.¹ No resulta extraño, entonces, que Alexander Von Humbolt, en 1852, denominara al aguaje como “árbol de la vida”.²

El fruto del aguaje, también llamado así, es la parte que constituye el mayor aprovechamiento de la planta. Éste puede presentarse en diferentes morfotipos; es decir, existen aguajes con variada apariencia, sobre todo, en la coloración de la pulpa. Dentro del Perú, los morfotipos reconocidos corresponden al aguaje *shambo*, *amarillo*, *posheco* y *color*; de los cuales, el primero posee una mayor demanda industrial. En adición, existe un “aguaje más pequeño” llamado aguajillo, que pertenece, principalmente, a la especie *Mauritiella armata* (Mart.) Burret. Aunque su consumo suele ser menor que el del aguaje, el aguajillo es bastante similar en sabor y apariencia, aunque con una menor cantidad de pulpa.³

En los últimos años, el aguaje ha sido aprovechado en grandes cantidades para el consumo directo, a escala urbano – regional, y como fuente de aceite natural para la fabricación de cosméticos, a escala industrial. En ambos casos, se han generado también inmensos volúmenes de residuos, en relación a la cáscara y semilla. A pesar de que los pobladores de la selva suelen

dar un uso artístico a la semilla para producir artesanías, la cáscara es principalmente desechada sin ningún valor agregado importante.⁴

Dicha situación ha sido común para muchas otras frutas tropicales como, por ejemplo, el maracuyá, la papaya, el aguacate, la piña, la granada, etc.^{5,6}; por lo que diversas líneas de investigación se han enfocado en el análisis de los compuestos bioactivos o metabolitos secundarios en las cáscaras y semillas, con el propósito de encontrar algún posible aprovechamiento. Esto podría implicar una minimización de las pérdidas en las empresas procesadoras de frutos y la mitigación de la contaminación ambiental.

Diferentes investigaciones han revelado que estos metabolitos secundarios en los subproductos de los frutos están asociados a propiedades antioxidantes bastante atractivas para la industria alimentaria, sobre todo para la producción de alimentos con alto contenido en fibra dietética. Particularmente en las cáscaras, es posible encontrar una amplia variedad de taninos, flavonoides, carotenoides y tocoferoles que se correlacionan con propiedades como el barrido de radicales libres en el organismo, a fin de protegerlo del daño oxidativo.^{5,7}

Muchas de las metodologías que se emplean en el análisis de los extractos de las cáscaras se basan en la espectrofotometría UV-Vis. De esta forma, es posible cuantificar la cantidad total de cada subclase de los metabolitos secundarios presentes. A su vez, se pueden realizar ensayos para determinar la capacidad antioxidante de dichos compuestos bioactivos. No obstante, la cromatografía líquida y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear constituyen opciones necesarias mucho más precisas y avanzadas para la identificación y cuantificación de los analitos, con la intención de determinar si las cáscaras de ciertos frutos podrían convertirse en fuentes de compuestos útiles en aplicaciones importantes dentro de la industria. En todo caso, conocer la composición química de las cáscaras permitiría tener una comprensión valiosa del potencial valor agregado que podría darse a este tipo de subproducto.

Este trabajo sienta las bases para demostrar las posibilidades de investigación en torno al análisis de los principales metabolitos secundarios en las cáscaras de aguaje peruanos. Es así que se hace una amplia revisión bibliográfica empezando por la importancia del aguaje en la Amazonía y los problemas relacionados a su cáscara como residuo, los compuestos bioactivos que podrían encontrarse en ésta, las metodologías empleadas en sus análisis y una discusión acerca de su aplicabilidad en este tipo de muestras. Se espera que esta investigación constituya una oportunidad para continuar explorando las potencialidades de los subproductos de los aguajes, así como otros frutos pertenecientes a la riqueza biodiversa del Perú.



2. Generalidades del aguaje

2.1. Descripción taxonómica y botánica

El aguaje, también conocido como buriti (en Brasil) y moriche (en Venezuela y Colombia), es considerado como la primera palmera descrita científicamente en 1781, por Carl Linneo.⁸ Corresponde a la especie *Mauritia flexuosa* L. f., de la familia Arecaceae, orden Arecales, subclase Arecidae, clase Liliopsida y de la división Magnoliophyta.⁹ Esta palmera es, probablemente, la planta de mayor importancia ecológica, económica y social de la Amazonía, debido a los múltiples usos de casi todas sus partes, como hojas, inflorescencia, tallos, raíces, semillas y frutos¹; estos últimos constituyen la parte más consumida y valorada industrialmente.

M. flexuosa L. f. se distribuye de forma endémica en América del Sur, incluyendo los territorios de Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Guyana y Brasil.³ Es una palmera arborescente que generalmente ocupa áreas abiertas e inundables, próximas a los bosques densos de la Amazonía, con una altura que alcanza los 25 a 30 m.¹⁰ La Figura 1 muestra un conjunto de aguajes en la selva sanmartinense, popularmente llamado aguajal.



Figura 1. Aguajal: conjunto de palmeras de aguaje (*M. flexuosa* L. f.) en Moyobamba, San Martín, Perú. (Fotografía propia).

Tal como se señaló, el aprovechamiento principal se centra en su fruto, también llamado aguaje. Éste es una drupa, de forma elíptica con una longitud entre 5 – 7 cm y diámetro de 4.5 cm en promedio. El exocarpio (cáscara) es escamoso y duro, con un color que suele ser rojo vino u oscuro. El mesocarpio (pulpa) es la única parte comestible, posee un espesor de 4 – 5 mm, es suave, de sabor agridulce y de color entre amarillo y rojo. El endocarpio (cobertura de la semilla) es también suave y posee un alto contenido de celulosa.¹⁰ Las semillas son esféricas y están cubiertas por una testa marrón. En la Figura 2 pueden apreciarse todas estas partes, correspondientes al morfotipo *amarillo*.

Dentro de la denominación popular, existe un “aguaje más pequeño” que se conoce con el nombre de aguajillo. La palmera de este fruto no es una variedad de la especie *M. flexuosa* L. f., pero sí pertenece a dos especies de la misma familia que *M. flexuosa* L. f.: *Mauritiella aculeata* y *Mauritiella armata* (Mart.) Burret. Estas especies también están muy extendidas en la Amazonía y son similares a *M. flexuosa* L. f., con la diferencia de que son más pequeñas y poseen troncos con bastantes espinas. Asimismo, se distribuyen y prosperan en humedales, arroyos, sabanas inundadas y cuencas de ríos de la selva. Los frutos son comestibles y contienen las mismas partes que el aguaje, aunque son mucho más pequeños y poseen una cáscara anaranjada tenue que recubre una pulpa de color amarillo.³ En la Figura 3 se muestran ejemplares de este fruto durante su venta urbana.



Figura 2. Partes del fruto del aguaje (*M. flexuosa* L. f., morfotipo *amarillo*): (a) Frutos maduros con cáscara (exocarpio). (b) Frutos con la pulpa (mesocarpio) expuesta tras su pelado. (c) Cáscara sola con residuos de pulpa. (d) Semillas del aguaje (oscuro) con y sin las partes fibrosas (blanquecinas). (Fotografías propias).



Figura 3. Frutos de aguajillo (*M. armata* (Mart.) Burret) (al lado, más grandes y de color rojo oscuro, frutos de aguaje (*M. flexuosa* L. f.) en el mercado Belén, Iquitos, Loreto, Perú.³

2.2. Descripción de su variabilidad y morfotipos

Los estudios de variación individual de las palmeras de aguaje sobre un amplio rango de territorios de la Amazonía muestran especies sumamente variables. Ello se expresa en diferencias de la forma del fruto, altura del árbol, rendimiento, susceptibilidad a la depredación, edad de la primera cosecha y otros factores que son de vital importancia para futuros cultivos.¹¹

En relación al fruto, el aguaje puede presentarse en diferentes tamaños y con un color de pulpa variado, desde rojo hasta amarillo; estos “tipos” de aguajes son denominados, por lo general, morfotipos. Los morfotipos más conocidos y diferenciados corresponden al aguaje *shambo*, el cual posee toda la pulpa de color rojo – anaranjado, *color*, cuando solo la superficie es roja y el resto de la pulpa amarilla (Figura 2), *amarillo*, cuando la pulpa es solo amarilla, y *posheco*, cuando esta parte es amarillo pálido.⁴ Sin embargo, estudios genéticos en aguajes de la Amazonía peruana, específicamente de Parinari, Aucayo y Jenaro Herrera, han demostrado que tales morfotipos no muestran una diferenciación genética clara entre ellos. Dicho de otro modo, los morfotipos son únicamente variaciones fenotípicas que no están marcadas en el genotipo

de la planta. Más bien, tales diferencias físicas pueden estar determinadas por varias condiciones edáficas, topológicas o bióticas (plasticidad fenotípica).^{12,13}

No obstante, la coloración de la pulpa es un indicativo de la presencia, en mayor o menor proporción, de ciertos nutrientes característicos. Una mayor concentración de vitamina A, entre otros carotenoides, por ejemplo, implica una pulpa más rojiza, correspondiente al morfotipo *shambo*. Ello constituye una de las razones por las que esta variedad suele ser la más cotizada industrialmente. En contraste, el aguaje *posheco* tiene una menor cantidad de tales compuestos.¹⁴ Esto conlleva a la consideración de que el contenido metabólico podría variar en las demás partes del fruto, como la cáscara y la semilla, según el morfotipo que corresponda. Finalmente, en relación al fruto de *M. armata* (Mart.) Burret y *M. aculeata*, no se ha encontrado literatura que indique la existencia de morfotipos del fruto aguajillo, similarmente a los de *M. flexuosa* L. f., ni estudios genéticos en relación a su variabilidad.¹⁵

3. Importancia del aguaje como fruto

3.1. Producción y consumo directo en la Amazonía Peruana

A mediados del siglo XIX, Alfred Wallace, impresionado por la gran distribución de las poblaciones naturales de aguaje, escribió: “es una palmera social que cubre grandes extensiones de tierras inundadas de mareas en el Bajo Amazonas. [...], un vasto templo natural que no cede en grandeza ni sublimidad a los de Palmira o Atenas”.¹⁶ Esta apreciación no resulta ajena en la actualidad, debido a las más de 5000 hectáreas de aguajales que se registran en el Perú hasta la fecha.¹⁷ Si bien se pueden aprovechar prácticamente todas sus partes, el consumo del fruto del aguaje cubre, en definitiva, la mayor importancia alimenticia y económica en las regiones de la selva.

El aguaje se come principalmente fresco después de remojarlo en agua tibia para ablandar la pulpa y facilitar el retiro de la cáscara.¹⁸ Asimismo, la población suele preparar una pasta a partir de la pulpa amasada, lo cual permite elaborar una bebida denominada aguajina y helados alargados y anchos llamados “chupetes” y “curichis”, respectivamente. Para estas tres formas de consumo, la venta es generalmente ambulatória.¹⁹ De este modo, el aguaje constituye un producto alimenticio urbano-regional importante a nivel de la Amazonía, siendo los principales focos comerciales peruanos la región Loreto, en la ciudad de Iquitos¹⁹, y las provincias de Pucallpa, Yurimaguas, Moyobamba y San Martín.²⁰ Además, en la última década, los productos a base de este fruto han comenzado a incidir en la capital, Lima, debido a la afluencia de personas de la selva y el conocimiento de sus beneficios nutricionales.³

El aguaje es un factor esencial en la economía local.¹ El fruto aporta como sustento monetario a numerosas familias amazónicas que se dedican a su cosecha y comercialización.⁴ Se estima que en la ciudad de Iquitos se venden diariamente cerca de 20 toneladas de frutos, para una población poco más de 400 mil habitantes, en la época de mayor producción.¹⁶ Según los datos del Ministerio de Agricultura y Riego, la producción de los frutos de aguaje a nivel nacional,

durante el 2017, fue de 65559 toneladas a 0.46 soles el kg en chacra, siendo San Martín el mayor productor con 27943 toneladas, seguido por Loreto con 23238 y Ucayali con 13312.¹⁷ En comparación con otros años, esta producción ha continuado aumentando tanto en las áreas de cosecha como en el valor monetario de los frutos, de acuerdo a su alta demanda. Dicho crecimiento, entre los años 2015 – 2017 a nivel nacional, se expone en la Tabla 1. Por su parte, el aguajillo también suele comercializarse en los mercados locales, aunque su consumo es meramente directo.³

Tabla 1. Producción, superficie de cosecha y precio en chacra de los frutos del aguaje en el Perú entre los años 2015²¹, 2016²¹ y 2017¹⁷.

Año	Producción (t)	Superficie (ha)	Precio en chacra (S/. /kg)
2015	61804	5090	0.385
2016	63243	5094	0.421
2017	65559	5213	0.460

3.2. Composición química y nutricional

Existen diversos estudios en relación a la composición química y nutricional del aguaje. Prácticamente todos se centran en el análisis del mesocarpio, ya que es la parte comestible. Se conoce que, en general, la pulpa posee un alto contenido de β -caroteno y α -tocoferol²², seguido de α -caroteno y luteína, así como otros carotenoides. También se ha identificado β -, δ - y γ -tocoferol²³ en significativa proporción. Es importante resaltar que los aguajes poseen una alta concentración de vitamina A, equivalente a tres veces el valor promedio encontrado en las zanahorias, y de vitamina C, cuyo contenido es comparable al de las naranjas.³ Adicionalmente, se han detectado diversos compuestos fenólicos como ácido quínico, *p*-coumárico, clorogénico, protocatechuico, cafeico y ácido ferúlico, principalmente. Asimismo, se registra

la presencia de (+)-catequina, (-)-epicatequina y luteolina, como los flavonoides más abundantes.²³

La pulpa del aguaje también es muy valorada por su aceite, puesto que se han detectado diversos ácidos grasos importantes. En promedio, el 75.7% del aceite corresponde al ácido oleico (omega 9), 18.9% al ácido palmítico y otros ácidos grasos esenciales como el linoleico y araquidónico (omega 6).²³ Muchos de estos ácidos grasos y los demás compuestos mencionados son bioactivos, ya que participan en la prevención del estrés oxidativo del organismo y enfermedades crónicas asociadas a la desnutrición como la hipovitaminosis A²³, mediante su función antioxidante, antiinflamatoria y antiagregante plaquetario.²⁴

Los distintos nutrientes de la pulpa de este fruto han sido bastante estudiados en los últimos años, en perspectiva a sus potenciales usos en la industria cosmética y la farmacéutica. Pereira-Freire et. al resume las propiedades farmacológicas de gran parte de los metabolitos secundarios encontrados en la pulpa del aguaje de diversas investigaciones actuales de estudios *in vivo* e *in vitro*. Dentro de estas, se destacan, aparte de las ya mencionadas, las propiedades quimiopreventivas, la fotoprotección contra la radiación UVA y UVB, acciones antitrombóticas, actividad antimicrobiana, efectos antitumorales, propiedades hipolipemiantes, acción hipoglicemiante, efectos sobre el estado de retinol y tocoferol y usos como probióticos potenciales.²³

En relación a su composición nutricional, los tres morfotipos de *M. flexuosa* L. f. poseen cantidades similares de humedad, cenizas, aceites y proteínas, siendo el primer y tercer parámetro los de mayor porcentaje, cerca de 63 y 23%, respectivamente. También se han detectado minerales como zinc, calcio, cobre, sodio, magnesio y manganeso, de los cuales predominan en concentración el calcio y magnesio con 120 y 60 mg por g de pulpa fresca, respectivamente.²⁵

Por otro lado, el aguajillo, fruto de la especie *M. armata* (Mart.) Burret posee un mayor contenido de humedad y aceite, alrededor de 55% y 21%, respectivamente.⁸ Más allá de estos valores, no se ha encontrado literatura sobre la determinación de metabolitos o estudios sobre la composición química del aceite como en el caso del aguaje, lo cual indica una necesidad para ampliar la escasa información que existe en esta especie.¹⁵

3.3. Aprovechamiento industrial

El gran contenido de ácido oleico (resistente a la oxidación) y otros ácidos grasos, ha permitido que el aguaje sea explotado como una fuente beneficiosa de aceite a escala local e industrial, en productos nutracéuticos.²² El aceite es extraído para usarse en la cocina y para hacer jabones artesanales.³ Esta práctica ha sido mejorada en la industria por algunas empresas brasileñas, tales como Natura®, Nutriphitos Cosméticos® y Pharmakos da Amazônia®¹⁶, las cuales aprovechan las propiedades químicas de estos ácidos grasos para la producción de cosméticos.²⁴

En el Perú, también existen variados productos comercializados a base de aguaje procesado. Dentro de los más importantes se conoce el aceite nutracéutico elaborado por la empresa D'Souza®, aguaje en polvo y cápsulas de los grupos comerciales Inkanatura World Perú Export SAC, Madre Nature® y Reinforest Pharmacy®, y jabón y aceite de masaje de aguaje del Grupo Cuenca Yanaycu Pucate. En adición, otras empresas que aprovechan los frutos generados del aguaje son Booty Magic® y Aguaje α ® para la producción de suplementos dietéticos en Estados Unidos.²⁴

En los últimos años, se vienen realizando más estudios para el alcanzar el máximo aprovechamiento industrial de lo que el aceite de la pulpa de aguaje puede ofrecer. Dentro de este contexto, la producción de biocombustibles es uno de ellos.²⁶ La búsqueda de nuevas

fuentes alternativas de energía ha llevado a considerar al aceite de aguaje como una potencial materia prima para obtener biodiesel, mediante el proceso de transesterificación alcalina. Un estudio realizado en el 2017 demostró que el biodiesel obtenido a partir de este aceite posee bajas temperaturas de descomposición, lo cual es una importante característica asociada con propiedades de combustión mejoradas, que permiten su aplicación en motores de diesel²⁶. En este sentido, una mayor investigación alrededor de la composición química del aguaje podría llevar a futuras aplicaciones más completas del fruto.

3.4. Residuos del fruto

A nivel industrial, es importante y necesario que la materia prima sea aprovechada al máximo y óptimamente. En el caso de los frutos, esto involucra tanto la parte principal de interés, (la pulpa), como las cáscaras y semillas, a fin de evitar la generación y acumulación de grandes volúmenes de residuos. Una forma de lograrlo es otorgar un valor agregado a tales partes consideradas como desechos en el proceso principal, para convertirlas en subproductos a través de tratamientos secundarios en base a su contenido potencialmente útil.

Tal como se describió en la sección anterior, las propiedades químicas y nutricionales de los metabolitos presentes en la pulpa han permitido que el aguaje sea aprovechado en la industria con gran proyección. Sin embargo, la pulpa solo representa, en promedio, el 13 – 17% del peso total del aguaje.²⁰ Esto implica que tanto la cáscara como la semilla, es decir, el 83 – 87% del fruto, sean en principio residuos desechables. A nivel urbano-regional, estas partes suelen acumularse en las calles y alrededores. En el Perú no se tiene registrado cuánto exactamente de estos residuos se generan anualmente, pero se puede estimar que, de las 65559 toneladas de aguajes producidos en el 2017, cerca del 80%, es decir, más de 50000 toneladas serían residuos. Tampoco se tienen datos acerca de que estos residuos sean aprovechados como subproductos

a gran escala. Comparativamente, estos números sí son conocidos para la industria de Brasil, ya que, en el 2018, de las 10000 toneladas que se produjeron, tras la extracción del aceite, se generaron como residuos alrededor de 2500 toneladas de cáscaras y, entre semillas y salvado de pulpa, aproximadamente 6000 toneladas.²⁷

A escala local, con la intención de tener un ingreso extra, los pobladores peruanos suelen emplear la semilla seca para elaborar una serie de artesanías como pipas, botones, figuras, dados, perinolas, trompos¹⁴, esculturas pequeñas de animales de la región y nacimientos amazónicos.¹ Se sabe también que cuando el fruto está aún inmaduro, las semillas pueden consumirse, aunque esto resulta una práctica muy poco común.¹⁴

El análisis en peso fresco de la semilla de aguaje muestra valores superiores de humedad, proteínas y carbohidratos, correspondientes a 51, 10 y 30%, respectivamente, y una cantidad menor (8%) de aceites.²² También se indica la presencia predominante de minerales como potasio, sodio y magnesio, alrededor de 900, 150 y 60 mg por g de semilla seca, respectivamente.²² En adición, según un estudio sobre el potencial uso de la semilla de aguaje para la fabricación de carbón activado, se resalta que su alto valor de lignina y holocelulosa permite una capacidad significativa de adsorbancia en pruebas con azul de metileno.²⁸ Asimismo, la tesis elaborada por Ruiz y Orbegoso, demuestra que es posible obtener carbón activado a partir de esta misma materia prima, pero esta vez para la remoción con alta eficiencia de contaminantes orgánicos de aguas residuales domésticas.²⁹ Además, recientemente en San Martín, se ha comenzado a comercializar carbón hecho a base de las semillas de aguaje, junto con otros residuos ecológicos, bajo el nombre de “Ecocarbón”, mostrando una gran aceptación dentro del comercio urbano.³⁰ No obstante, según la revisión bibliográfica realizada, se desconocen investigaciones en las que se hayan analizado e identificado metabolitos en esta parte del fruto, contrariamente al caso de la pulpa.

Por otro lado, la cáscara del aguaje no suele usarse por los pobladores, ni para la fabricación de artesanías ni para su consumo alimenticio de alguna forma. De esta parte del fruto se conoce que posee un gran contenido de fibra (21.6 g) y de grasas totales (26.7 g) por cada 100 g de materia fresca.³¹ En relación al parámetro de grasas totales, se han identificado ácidos grasos insaturados (84.7 mg/g) como el ácido oleico, linoleico y linolénico, siendo el primero el más abundante (75.8 mg/g) y ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (15.3 mg/g).²⁴ También se ha logrado producir y caracterizar la harina de la cáscara de aguaje, la cual contiene 74.97% de fibra dietética total, de la cual el 74.01% es insoluble y soluble solo el 0.96% del total de la harina.³²

De acuerdo a los alcances de esta investigación, hasta la fecha no se ha otorgado a la cáscara de aguaje un valor agregado definitivo y esta misma situación se replica para la semilla. Tampoco se ha encontrado literatura en el Perú acerca de estudios que respalden algún potencial aprovechamiento de la cáscara en relación a la determinación de metabolitos secundarios presentes, según los variados morfotipos de aguaje que se disponen y, mucho menos del aguajillo; por lo que este estudio apunta a indagar sobre las posibilidades de dichos estudios.

4. Metabolitos secundarios en cáscaras de frutos y sus métodos de análisis

4.1. Metabolitos secundarios comunes en las cáscaras

Las grandes cantidades de subproductos de las diferentes industrias de procesamiento de frutas tradicionalmente son descartadas. Estas suelen aproximarse o incluso exceder a la masa correspondiente del producto de valor, lo que genera efectos negativos tanto a nivel ambiental como económico dentro de la empresa.³³ Este hecho ha impulsado el estudio de la composición química de las partes típicamente descartadas de los frutos, con especial énfasis en los metabolitos secundarios. Muchos de estos compuestos son bioactivos y permitirían generar usos potenciales de las cáscaras, semillas y fibras como una fuente de productos nutracéuticos o de fibras dietéticas.⁵

Particularmente en las cáscaras se han localizado compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferoles.³⁴ La función de estos metabolitos secundarios varía dependiendo de los frutos, aunque comparten algunas como la capacidad antioxidante para el barrido de radicales libres perjudiciales para el fruto, lo cual permite retrasar o inhibir la oxidación del ADN, proteínas y lípidos. Estas propiedades juegan un rol importante en las funciones antimicrobianas para la protección de la semilla contra agentes patogénicos, ya que penetran la membrana celular de los microorganismos, causando lisis.⁵ En otras palabras, se considera que estos metabolitos secundarios permiten aumentar la capacidad general de las plantas para sobrevivir, permitiéndoles interactuar con su alrededor para superar desafíos locales.³³ En base a ello, se ha reportado que muchas de estas sustancias podrían ser beneficiosas para la salud como antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticos, por lo que podrían emplearse como aditivos naturales alimentarios.⁵ Inclusive, constituyen una fuente de saborizantes, colorantes y aditivos texturizantes en la industria de alimentos.³⁴ De esta forma, la identificación y cuantificación de estos metabolitos secundarios naturales permitiría conocer las potencialidades adicionales de los frutos según la composición química de sus subproductos.

4.1.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son usualmente referidos a un grupo diverso de moléculas naturales que contienen múltiples grupos fenoles.³⁵ Estos son comunes en plantas superiores y poseen un valor industrial y medicinal. Una de sus principales propiedades químicas que suele aprovecharse en estos dos campos constituye su capacidad de reacción con oxidantes de un electrón, lo cual previene la formación de radicales libres en los sistemas biológicos.³⁶ Además, estos compuestos son responsables de la coloración en diferentes partes de las plantas, que suele ser muy variada gracias al efecto de los acoplamientos de los núcleos aromáticos, el tautomerismo ceto – enol y el pH del medio; de ahí que también se emplean ciertos polifenoles como potentes colorantes y tintas.³⁶

En base a sus estructuras, estos compuestos pueden ser divididos en diferentes subgrupos: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanos, estilbenos y curcuminoides.³⁵ No obstante, según los alcances de esta investigación, se ha determinado que los compuestos fenólicos presentes en mayor concentración en las cáscaras de variados frutos corresponden principalmente a los taninos y flavonoides. El gran contenido de estos metabolitos secundarios en tales subproductos demuestra ser el responsable de la alta actividad de inhibición de radicales libres en pruebas de laboratorio.⁵

4.1.1.1. Taninos

Los taninos constituyen un grupo de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en casi todas las familias del reino vegetal. Cuando se presentan en cantidades considerables, suelen localizarse en determinadas partes como hojas, frutos y corteza.³⁷ Frecuentemente, una mayor producción de taninos puede estar asociada con algunas enfermedades de la planta; por lo que se asume que el rol biológico de estos compuestos está relacionado a la protección contra

infecciones, insectos o animales herbívoros. Los taninos aparecen como polvos amorfos de color amarillo o blanco, o como masas sueltas brillantes, casi incoloras y con un olor característico.³⁸ En general, se distinguen por ser compuestos químicos no cristalizables, cuyas soluciones acuosas son coloidales y de reacción ácida. Además, precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución; mientras que con las sales férricas forma soluciones oscuras azuladas o verdosas. Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco, precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas; ésta última propiedad es denominada astringencia.³⁷

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos de plantas superiores, comúnmente con tamaños entre los 300 – 3000 Da, aunque se han aislado compuestos de 20000 Da. Estrictamente, son ésteres de galoilo, catequina y triterpenoides que pueden conformar oligómeros y hasta polímeros con diferentes patrones de acoplamiento y sustitución de interflavonilos.³⁸ La clasificación de Frudenberg, establecida en 1920, es la más empleada, pues tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino.³⁷ En esta, los taninos se agrupan en dos grandes clases: taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) y taninos condensados (proantocianidinas).³⁸

4.1.1.1.1. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables están basados sobre la unidad estructural fundamental del ácido gálico y son casi invariablemente encontrados como ésteres múltiples con D-glucosa (galotaninos).³⁷ Los galotaninos son los taninos hidrolizables más simples, cuyo prototipo estructural corresponde a la pentagaloil glucosa (β -1,2,3,4,6-pentagaloil-O-D-glucopiranososa); su estructura, junto con la del ácido gálico, se muestran en la Figura 4. La

pentagaloil glucosa tiene 5 enlaces éster que involucran grupos alifáticos hidroxilos del núcleo de azúcar.³⁹

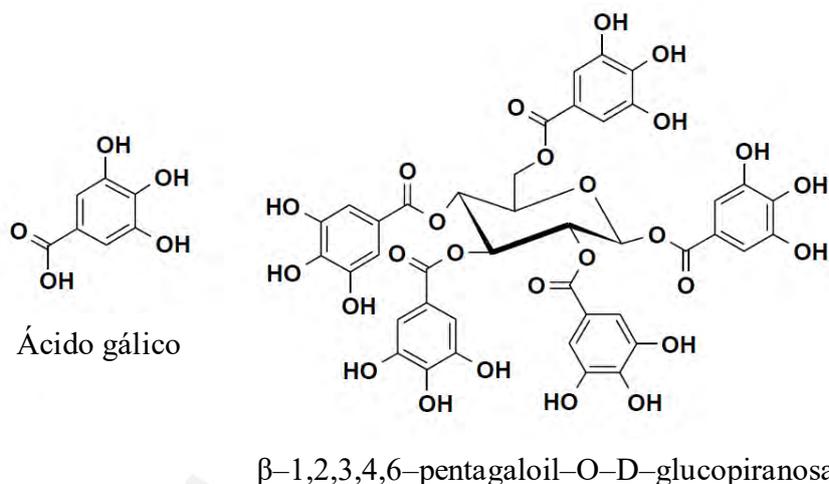


Figura 4. Estructura del ácido gálico y del prototipo de galotanino (pentagaloil glucosa).³⁹

Por su parte, se considera que los derivados del ácido hexahidroxidifénico, llamados elagitaninos, se derivan por acoplamiento oxidativo de grupos de éster galoil adyacentes en un éster de poligaloil-D-glucosa⁴⁰, tal como se puede apreciar en la Figura 5. La diversidad estructural de estos taninos es invariablemente complicada por diferentes arreglos químicos específicos, usualmente debido a procesos de deshidrogenación u oxigenación.⁴⁰

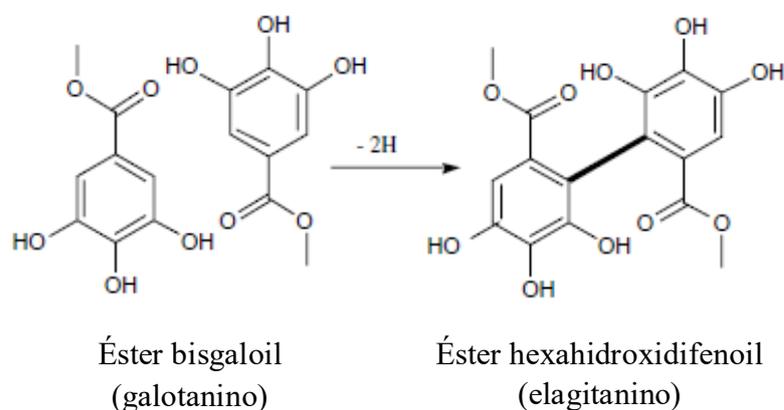


Figura 5. Derivatización de elagilotaninos por acoplamiento oxidativo.⁴⁰

Como características químicas principales, estos taninos se hidrolizan con facilidad por la acción de ácidos, bases o enzimas (por ejemplo, tanasas) en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico.⁴¹ El tipo de ácido que produzcan dependerá de qué ácido constituye su unidad estructural, es decir, ácido gálico (galiotaninos) o ácido elágico o dilactona (elagitaninos). Además, estos compuestos tienden a unir sus anillos bencénicos mediante átomos de oxígeno, reaccionan con el FeCl_3 , para dar soluciones azuladas y no precipitan con soluciones de bromo.³⁷

Los taninos hidrolizables encuentran amplia aplicación debido a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para formar complejos solubles e insolubles con las proteínas.³⁸ En efecto, estos compuestos se usan como estabilizadores de la cerveza, específicamente en el producto que no ha sido recientemente preparado, donde las proteínas se combinan con estos polifenoles presentes para formar complejos que son responsables de la turbidez de la bebida. Al agregar los taninos, el nivel de proteínas es disminuido a un valor apropiado y se aumenta así el tiempo de almacenamiento de la cerveza. En la industria farmacéutica, se emplean para contraatacar el efecto de los alcaloides y el envenenamiento por sales de metales, inactivándolos por precipitación. Mientras que en la industria de alimentos permiten remover impurezas proteínicas por precipitación y se usan también en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando sus propiedades antisépticas y antioxidantes, y en la clarificación del vino blanco.³⁷

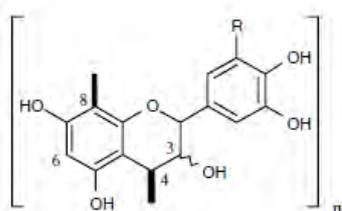
4.1.1.1.2. *Taninos condensados*

La estructura fundamental en este grupo es el núcleo de flavan-3-ol ((-)-epicatequina y (+)-catequina) fenólico. También conocidos como proantocianidinas, los taninos condensados existen como oligómeros (solubles en agua), conteniendo generalmente entre 2 a 10 unidades

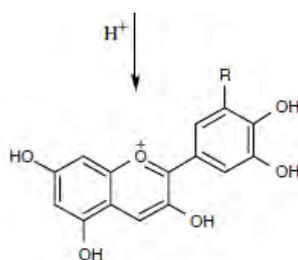
de ‘catequinas’, y como polímeros (insolubles en agua).⁴⁰ Estas unidades de flavan-3-ol están unidas por las posiciones C-4 y C-8 del anillo bencénico.³⁹ El patrón de acoplamiento de las unidades de catequina en taninos condensados puede variar considerablemente. El nombre de proantocianidinas deriva precisamente de la propiedad que tienen estos taninos para degradarse en un medio fuertemente ácido para dar la correspondiente antocianidina, principalmente cianidina y/o delphinidina (Figura 6).⁴⁰

Otras de sus propiedades químicas corresponden a la polimerización progresiva cuando estos taninos son tratados con ácidos calientes hasta dar taninos amorfos denominados flobafenos o “taninos rojos”. Al reaccionar con FeCl_3 , sus soluciones adquieren una coloración verdosa. Además, estos compuestos sí precipitan con soluciones de bromo.³⁷

En tanto a sus utilidades, los taninos condensados se emplean principalmente para la síntesis de resinas y adhesivos. Por ejemplo, algunos taninos aislados de plantas del género *Acacia* han sido empleados para desarrollar adhesivos en frío y termogradaudados por tratamiento con úrea–formaldehído. Estos últimos fueron usados para la fabricación de enchapes de madera a prueba de agua. También suelen utilizarse como precipitantes para suspensiones de arcilla.³⁷



Tanino condensado (proantocianidinas)



Antocianidinas

Figura 6. Degradación catalizada por ácido de proantocianidinas.⁴⁰

4.1.1.2.Flavonoides

Son un grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular cuya estructura básica lo conforma un núcleo flavan. Este consiste en 15 carbonos arreglados en 3 anillos etiquetados por A, B y C (pirano)⁴², y se enumeran tal como se expresa en la Figura 7(a). Las actividades bioquímicas de los flavonoides y sus metabolitos dependen de sus estructuras químicas y la orientación relativa de las variadas sustituciones en los anillos. En este sentido, las diferentes clases de flavonoides difieren en su nivel de oxidación y los patrones de sustituciones específicamente en el anillo C; mientras que los compuestos individuales dentro de una clase se distinguen por sus patrones de sustitución de los anillos A y B.⁴³ La Figura 7(b) resume las clases mayoritarias de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavononas, catequinas (o flavanoles), antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas. Otras clases como las cumarinas, los taninos, cafeatos y lignanos son usualmente clasificados por separado, tal como se apreció para el caso de los taninos en el apartado anterior. Dentro de la mayoría de estas clasificaciones, las sustituciones involucran reacciones de hidrogenación, hidroxilación, metilación, sulfatación y glicosilación.⁴²

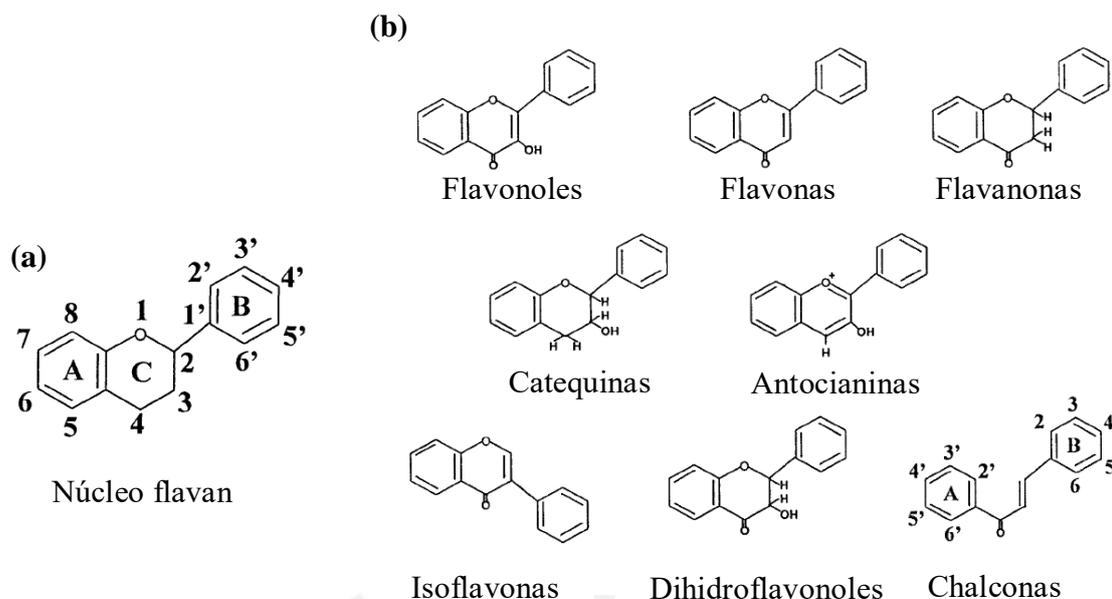


Figura 7. Flavonoides: (a) Estructura genérica de flavonoides (núcleo flavan). (b) Estructuras básicas de las clases mayoritarias de los flavonoides.⁴³

Los flavonoides pueden ser monoméricos, diméricos u oligoméricos. Los monómeros varían ampliamente de tamaño. Por ejemplo, la flavona tiene un peso molecular de 222 Da, mientras que la antocianina azul posee uno de 1759 Da. Los compuestos más grandes, incluyendo los poliméricos, corresponden a muchos de los taninos que, como ya se indicó, se clasifican por separado.⁴²

Muchos de los flavonoides ocurren de manera natural en plantas como derivados glicosilados o sustituidos por carbohidratos como D-glucosa, L-ramnosa, glucoramnosa, galactosa, lignina y arabinosa.⁴² Estos contribuyen a los tonos brillantes y coloridos de las hojas, flores y frutos. Los flavonoides suelen encontrarse también en semillas y cáscaras. Particularmente, en esta última parte, los flavonoles quercetina y kaempferol son predominantes.⁴³ En estos casos, las plantas producen flavonoides para protegerse en contra de parásitos fúngicos, herbívoros, patógenos y daños oxidativos celulares, donde su naturaleza polifenólica les permite eliminar radicales libres dañinos como los radicales superóxido e hidroxilo en el organismo de la planta.

Esta propiedad es de gran importancia a nivel de la salud, puesto que la capacidad antioxidante de una gran parte de flavonoides tiene efectos cardioprotectores.⁴⁴

4.1.2. Carotenoides

Son moléculas isoprenoides que están distribuidas en la naturaleza, típicamente, como pigmentos en todos los organismos fotosintéticos. Son uno de los tipos de compuestos responsables de los colores rojo y amarillo en los tejidos de frutos y flores.⁴⁵ Además, juegan un rol de protección en plantas contra ciertos procesos fotooxidativos.⁴⁶

Los carotenoides son tetraterpenos (C_{40})⁴⁴, de modo que la unión sucesiva de unidades isoprenoides produce una larga cadena polieno, que puede extenderse desde 3 a 15 dobles enlaces conjugados; esta estructura constituye el esqueleto molecular de este tipo de compuestos.⁴⁵ La formación de la cadena C_{40} , por ejemplo, fitoeno, involucra el acoplamiento del tipo “tail-tail” entre dos moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGPP) en una secuencia esencialmente análoga a la del escualeno y triterpenos. Luego de una serie de reacciones consecutivas de desaturación, en las que se remueven átomos de hidrógeno alternadamente, a partir de cada sitio del sistema trieno, la conjugación se extiende, dando como resultado licopeno, que posee la estructura común de la mayoría de carotenoides, es decir, con configuración *trans*.⁴⁴ Esta conversión puede apreciarse en la Figura 8.

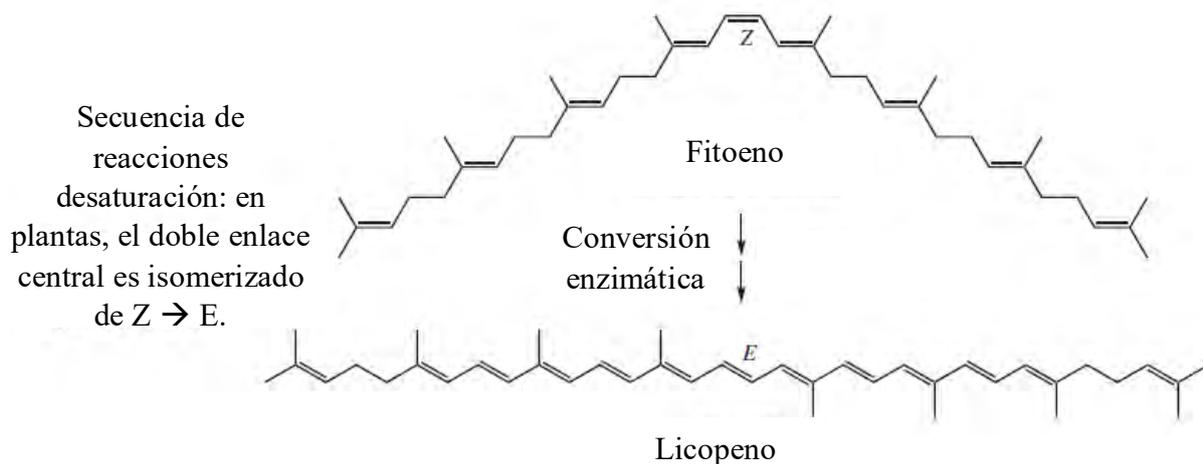


Figura 8. Conversión de fitoeno a licopeno (estructura común de los carotenoides).⁴⁴

La longitud de estas cadenas conjugadas determina en gran medida el espectro de absorción de la molécula; de ahí que posean colores característicos. La ciclación del esqueleto de carbono ocurre al inicio y/o al final de la molécula. Los grupos finales cíclicos pueden ser sustituidos por grupos funcionales, incluyendo oxígeno. Además, pueden ocurrir otras modificaciones que involucran elongaciones de la cadena o degradación.⁴⁵ En este sentido, basados en su composición, los carotenoides pueden ser divididos en dos clases: carotenos, los cuales contienen solo átomos de carbono e hidrógeno, y xantofilas (oxocarotenoides), con al menos un átomo de oxígeno.⁴⁶

El β -caroteno y otros carotenoides naturales se emplean ampliamente como agentes colorantes para alimentos, bebidas, confitería y medicamentos. Este caroteno muestra una ciclación adicional en los extremos de la cadena. En los diferentes procesos de conversión de los carotenoides pueden surgir tres sistemas alquenos cíclicos distintos al final de la cadena, descritos como sistemas de anillo β , γ o ϵ . El sistema de anillo γ es el menos común. El α -caroteno tiene un anillo β en un extremo de la cadena y un tipo ϵ en el otro, y es representativo de carotenoides que carecen de simetría. El γ -caroteno, precursor del β -caroteno, y el δ -

caroteno, precursor del α -caroteno, ilustran los carotenoides en los que solo un extremo de la cadena se ha ciclado (Figura 9). Los carotenoides oxigenados (xantofilas) también se distribuyen ampliamente y presentan justamente anillos oxigenados. Algunas de las principales xantofilas incluyen a la zeaxantina, luteína, violaxantina, capsantina, fucoxantina y astaxantina (Figura 9).⁴⁴

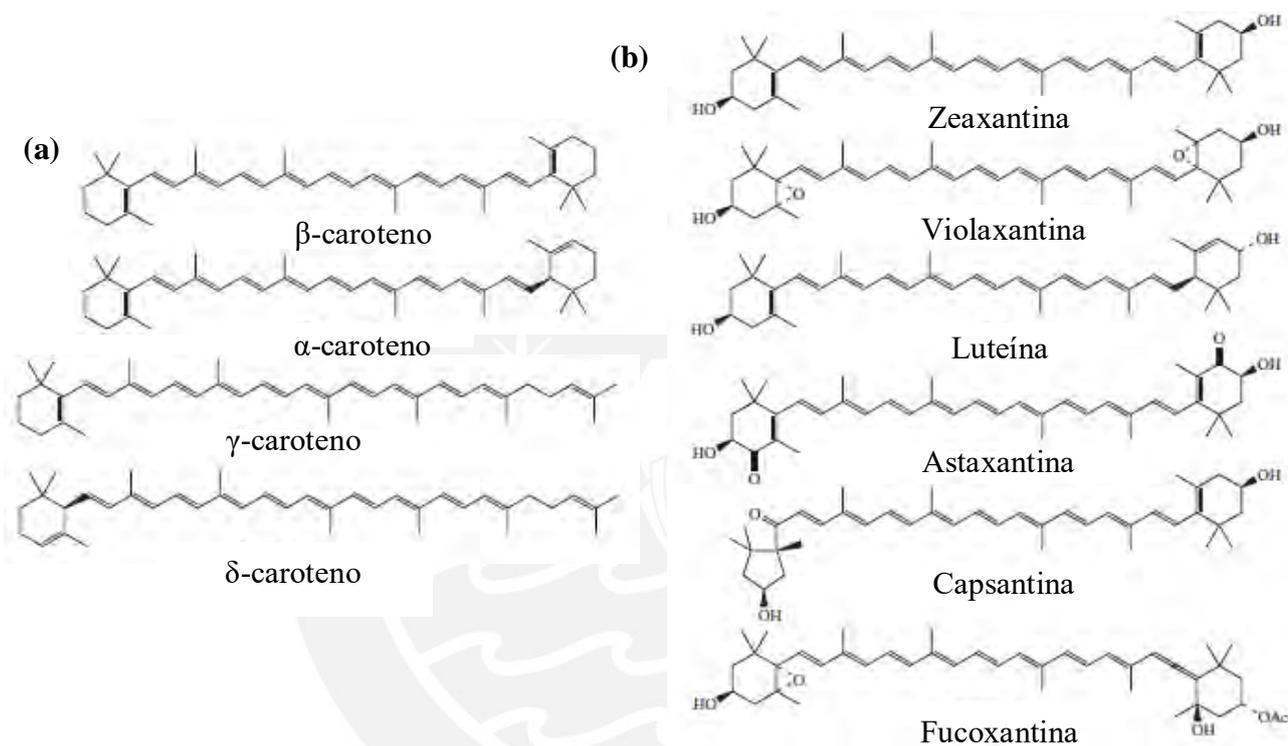


Figura 9. Carotenoides: (a) Estructuras químicas de algunos carotenos. (b) Estructuras químicas de algunas xantofilas.⁴⁴

Los carotenoides son moléculas lipofílicas que suelen acumularse en los compartimentos lipofílicos, tales como membranas o lipoproteínas. Esta característica influye en su absorción, transporte y excreción en los organismos.⁴⁶ Existe un considerable interés en la dieta de los carotenoides en los humanos con respecto a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para aliviar enfermedades crónicas.⁴⁵ Ciertos carotenoides son fuentes para la bioconversión a vitamina A, por lo que son considerados como compuestos provitamina A. Estudios

epidemiológicos han revelado que un mayor consumo de estos compuestos está relacionado a la disminución del riesgo de muchos desordenes degenerativos, incluyendo varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y oftalmológicas.⁴⁷ Sus efectos preventivos han sido asociados con su actividad antioxidante y protectora en células y tejidos con daños oxidativo, probablemente, debido a su capacidad de degradación del oxígeno molecular singulete y radicales peróxido.⁴⁶

4.1.3. Tocoferoles

Son compuestos orgánicos presentes en cloroplastos y constituyen el grupo correspondiente a la vitamina E. Su biosíntesis comparte muchas las características de las plastoquinonas, con la diferencia de que la formación de estos compuestos involucra la ciclación adicional del *p*-quinol y la presencia de una cadena lateral terpenoide, dando como resultado un anillo cromano. Este grupo de compuestos liposolubles lo conforman el α -, β -, γ - y δ -tocoferol, los cuales están ampliamente distribuidos en las semillas y frutos de la planta.⁴⁴ La estructura de estos compuestos se muestra en la Figura 10.

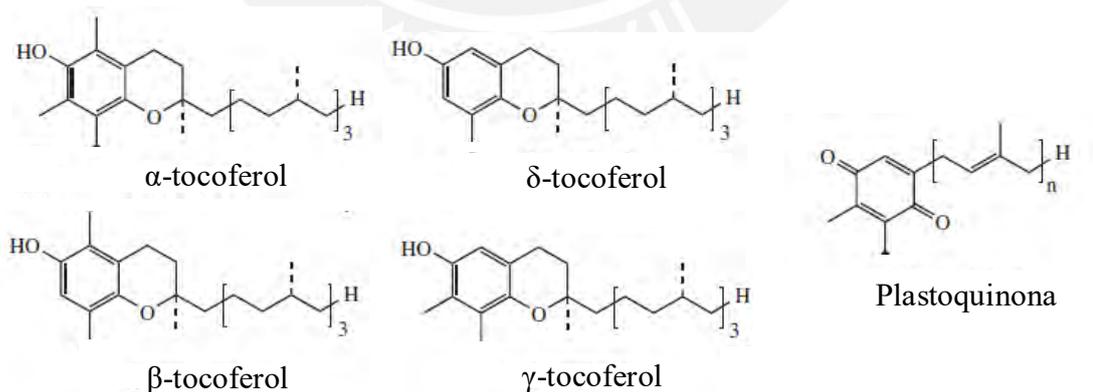


Figura 10. Estructuras químicas de tocoferoles y plastoquinona.⁴⁴

Los tocoferoles también son conocidos por poseer propiedades antioxidantes valiosas. Están asociados a los procesos de prevención de la destrucción de la vitamina A, por reacciones contra radicales libres, y de ácidos grasos insaturados de las membranas biológicas. Además, se usan comercialmente para retardar la rancidez de los materiales grasos empleados en la industria alimentaria.⁴⁴ Existen estudios adicionales que indican que los tocoferoles podrían reducir los efectos de envejecimiento y ayudar en la prevención de enfermedades del corazón.⁴⁸

4.2. Métodos de análisis de metabolitos secundarios

4.2.1. Contenido de polifenoles totales

Diversos estudios de extractos con metanol, acetona y agua, a partir de productos comestibles y no comestibles de origen vegetal, han sido analizados empleando el reactivo propuesto por Otto Folin y Vintila Ciocalteu para la determinación del contenido de polifenoles totales.^{5,6,49,50} Este reactivo, denominado reactivo Folin – Ciocalteu, RFC, se prepara disolviendo tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada, junto con ácido clorhídrico y ácido fosfórico. En tal caso, las especies reactivas corresponden a los fosfotungstatos y fosfomolibdatos formados. Comercialmente, el RFC se encuentra disponible ya preparado.⁵¹

El método de análisis espectrofotométrico con este reactivo involucra una serie de mecanismos de reacción bastante complejos. No obstante, se resumen que, en medio alcalino, los fosfotungstatos y fosfomolibdatos pueden reducirse fácil y rápidamente en presencia de los polifenoles de la muestra, formando especies azules bastantes estables, principalmente $[\text{PMoW}_{11}\text{O}_4]^{4-}$.⁵² Los picos de absorción son suficientemente amplios para las especies azules más puras producidas a partir de la reducción del RFC. Debido a la amplitud de estos picos y al hecho de que otros componentes en muestras biológicas no absorben en esta región, el

análisis puede llevarse a cabo en un amplio rango de longitudes de onda; por lo general se elige a 760 nm.⁵¹

El procedimiento para muestras sólidas inicia con la elaboración de una harina seca lo suficientemente fina como para preparar los extractos correspondientes. Una vez obtenida, se procede a la extracción secuencial de los compuestos polifenólicos usando soluciones acuosas de metanol y acetona. Después de la extracción, la mezcla se centrifuga y los sobrenadantes se combinan.⁴⁹ El método requiere que los extractos se encuentren a pH alcalino, por lo que se suele agregar alícuotas de una solución de carbonato de sodio. Logrado esto, se mide la absorbancia a 760 nm después de 2 horas de agregar el reactivo, a 25°C.⁵¹ Como blanco se emplea una solución libre de fenoles. En éste, el color de amarillo pasa a incoloro, a menos que el RFC se haya reducido parcialmente. El hecho de que el RFC no se mantenga estable en condiciones alcalinas, enfatiza la importancia de disponer un exceso suficiente para que el reactivo reaccione con todos los fenoles antes de que se degrade.⁵¹

Los compuestos utilizados para los estándares incluyen el ácido tánico, ácido gálico, catequina, entre otros. Comúnmente, se ha empleado el ácido gálico para la construcción de las curvas de calibración, en un rango de concentración de 2 – 7 µg/mL; de tal forma que los resultados sean expresados como mg equivalentes de ácido gálico, EAG, por g de peso seco, PS. El ácido gálico es estable en su forma seca, es soluble en agua, se recrystaliza y seca fácilmente⁴⁹

Cabe resaltar que se pueden permitir variaciones en las condiciones siempre que se empleen estándares y blancos apropiados, pero también es necesario considerar ciertos cuidados importantes. En estas consideraciones, se debe garantizar que el RFC reaccione completa y rápidamente con las sustancias polifenólicas extraíbles de la muestra, disponer de suficiente tiempo y mezclar correctamente la muestra con el reactivo antes de añadir la solución alcalina

y mantener condiciones similares de tiempo y temperatura para el desarrollo del color en cada medición.

Este método ha sido validado usando muestras estándares con diferentes compuestos fenólicos de concentración conocida. Dentro de estos, se destacan: fenol, florogucinol, 1-naftol, L-tirosina, vainillina, ácido salicílico, cumarinas, catecol, pirogalol, ácido gálico, ácido tánico, catequina, quercetina⁵³, ácido sinápico, *p*-hidroquinona, ácido cumárico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, resocinol, (+)-catequina, quercitrin, kaempferol, flavonas, flavanonas e hidroxiflavonas.⁵¹

Como se indicó inicialmente, este análisis del contenido de compuestos polifenólicos extraíbles totales ha sido usado en variados estudios para las diferentes partes de los frutos. Se ha realizado con extractos de cáscaras de mango⁵⁴ y granada⁶, cáscaras y semillas de pequi (*Cariocar brasiliense* Camb.)⁴⁹, sandía, limón, pomelo, manzana, ciruela, kiwi, naranja, uva y grosella⁷, de pulpa, cáscara y semillas de banana, papaya, maracuyá, melón³³ y de la fruta *Uapaca kirkiana*⁵⁵, por citar algunos ejemplos. En cada caso existen leves variaciones del método referidas a las cantidades empleadas, la preparación de la muestra para la extracción y el uso de otros estándares, principalmente.

Aunque el método colorimétrico con el RFC es el ensayo más usado para estimar el contenido total de polifenólicos en comidas, bebidas, hierbas y otros extractos de plantas, ciertos estudios han demostrado que pueden existir interferentes. Esto sucede porque algunos compuestos como tioles, azúcares, aminoácidos, proteínas y ciertas vitaminas e iones inorgánicos podrían actuar también como reductores. Frente a esto, un método alternativo que presenta límites de detección y cuantificación similares al método con el RFC, (0.5 y 1 mg/L, respectivamente), altamente reproducibles, pero que es más rápido (15 min de reacción, aproximadamente) y sobretodo más selectivo, corresponde al ensayo con azul de Prusia.⁵²

Este método se basa en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por la formación del $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, también conocido como azul de Prusia, en presencia de los compuestos fenólicos y en medio ácido.⁵⁶ Para ello se hace reaccionar $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con los compuestos de interés y luego se agrega $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ para monitorear la absorbancia a 725 nm a 25°C en oscuridad. Al igual que en el método anterior, se emplea el ácido gálico como estándar.⁵²

Ambos métodos son simples, de bajo costo y reproducibles analíticamente. Y aunque el segundo ensayo permite evitar algunos interferentes que cuando se usa el RFC, solo se puede estimar el contenido total de polifenólicos en la muestra de forma general. Una determinación más específica se logra mediante técnicas de cromatografía líquida de alto performance (HPLC) o ultra performance (UPLC), acoplado a un espectrómetro de masas simple (MS) o tándem (MS/MS). Las metodologías que involucran estas técnicas son más precisas, por lo que se emplean para validar los ensayos del RFC y azul de Prusia, aunque exigen más tiempo, grandes volúmenes de solventes e instrumentos más costosos.^{51,52}

4.2.2. Contenido de taninos hidrolizables

El contenido de taninos hidrolizables en extractos metanólicos de muestras de origen vegetal, como plantas y frutas, puede llevarse a cabo con gran sensibilidad y precisión con el método descrito por Bossu et. al. en 2006.⁵⁷ Este análisis colorimétrico se basa en la generación de un producto de color rojo por la reacción entre los taninos hidrolizables y el KIO_3 . Esta especie generada mantiene su color por un tiempo suficiente para la medición de su absorbancia, antes de que se convierta en otra especie de color amarillo, (se desconoce la identidad específica de estos compuestos), (Figura 11). Mediante esta metodología es posible determinar los taninos hidrolizables incluyendo los elagitaninos y galotaninos, enfocado en estudios medicinales, nutricionales y ecológicos.

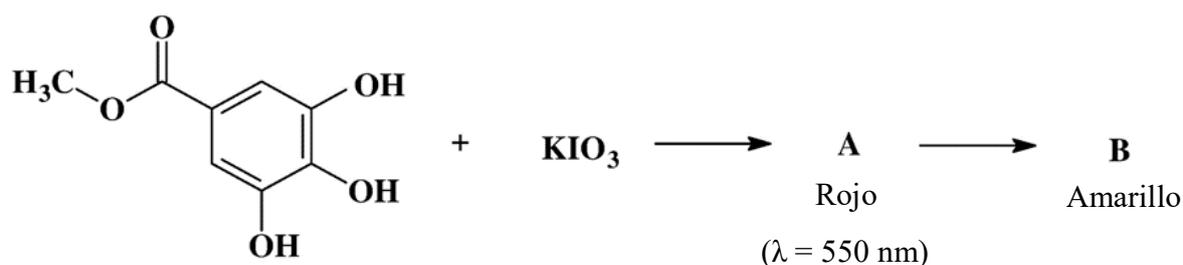


Figura 11. Reacción entre tanino hidrolizable y KIO₃ para su cuantificación.⁵⁷

El estudio de referencia en el que se aplica este método, como en muchos otros, analiza el contenido de taninos hidrolizables en cáscaras de granada de distintas variedades.⁶ Para ello, se parte de la obtención de la harina de esta parte del fruto, para luego extraer con metanol durante 6 horas, a temperatura ambiente. Se tratan los extractos con una solución de yodato y se espera que reaccione. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a 550 nm.⁵⁷ La curva de calibración se construye a partir de diluciones de una solución de ácido tánico. En tal caso, los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido tánico, EAT, por g de peso seco (PS).⁶ Este método ha sido validado, anteriormente, de forma comparativa con la presencia de ciertos ellagitaninos y galotaninos conocidos presentes en muestras vegetales de *Stryphnodendron barbatimão*, *Eucalyptus citriodora* y *Phyllanthus niruri*, mediante cromatografía líquida (LC).⁵⁸

4.2.3. Contenido de taninos condensados extraíbles

El método espectrofotométrico que puede emplearse para la determinación del contenido de taninos condensados extraíbles corresponde al desarrollado por Broadhurst et al.⁵⁹ Se basa en la reacción de vainillina acidificada con los taninos condensados presentes en extractos de metanólicos de muestras de origen vegetal, principalmente frutos, hojas y madera. El producto, denominado complejo vainillina/tanino puede ser monitoreado mediante la medición de su

absorbancia a 500 nm. Este método, a diferencia de otros que emplean ácido sulfúrico, es 3.3 veces más sensible, debido a que no sufre interferencias de posibles precipitados presentes⁵⁹, y es más selectivo que otros análisis, como por ejemplo el propuesto por Scalbert et. al.⁶⁰

En este análisis, la muestra sólida debe ser lavada, secada y molida a fin de obtener una harina, de la cual se pueda extraer los analitos. En tal caso, se realiza la extracción metanólica a temperatura ambiente por 2 horas. El metanol es evaporado y se acidifica con HCl. La solución acuosa resultante es extraída con éter dietílico. En este paso, los metabolitos de bajo peso molecular como la (+)-catequina (que podría interferir con las proantocianidinas en su determinación por reacción con vainillina) y el ácido elágico (aproximadamente insoluble en soluciones acuosas) son separados de los taninos de interés. Del extracto acuoso, se toma una alícuota y se mezcla con una solución de vainillina y metanol, para luego acidificarla con HCl. La mezcla se deja reposar en la oscuridad y se procede a la medición de la absorbancia de la mezcla a 500 nm.⁶

Para la construcción de la curva de calibración se emplea como estándar una solución de catequina. En este sentido, los resultados del contenido total de taninos condensados extraíbles se expresan como mg equivalentes de catequina, CE, por g de peso seco, PS. Este método ha sido validado por LC, usando estándares de cierto tipos de taninos condensados previamente aislados de muestras vegetales de las especies *Lotus pedunculatus*, *Lotus tenuis*, *Coronilla variu* y *Onobrychus viciifolia*.⁵⁹

Un ejemplo de la aplicación de este método corresponde al análisis de estos metabolitos en cáscaras de granada.⁶ En este estudio, el ensayo se corrobora con la separación de los taninos condensados importantes mediante análisis de ionización por desorción láser asistida por matriz acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF), con lo que se pudo identificar 4 tipos de taninos oligoméricos.

4.2.4. Contenido de taninos condensados no extraíbles

Diversos estudios sobre la determinación de taninos condensados son el resultado de análisis por HPLC-fluorescencia, a partir de extractos orgánicos-acuosos de alimentos de origen vegetal (taninos condensados extraíbles). No obstante, recientemente se ha demostrado que una significativa cantidad de taninos condensados poliméricos se mantienen como complejos con proteínas y carbohidratos remanentes en los residuos de la extracción.⁶¹ En tal caso, conocer el contenido de estos es necesario para lograr una caracterización química y nutricional más completa de la muestra.

La determinación de estos taninos condensados o proantocianidinas no extraíbles (PANE) requiere de un tratamiento por hidrólisis para liberar los taninos de bajo peso molecular a partir del polimérico y los complejos. En este sentido, el método de análisis propuesto por Zurita et al.⁶¹ emplea el proceso de hidrólisis con butanol y HCl, también denominado, butanólisis, seguido de una reacción con FeCl₃ para estabilizar los compuestos coloreados de xantilio y antocianidinas producidos (Figura 12). La absorbancia de estos compuestos es medida para poder determinar el contenido de PANE en la muestra.

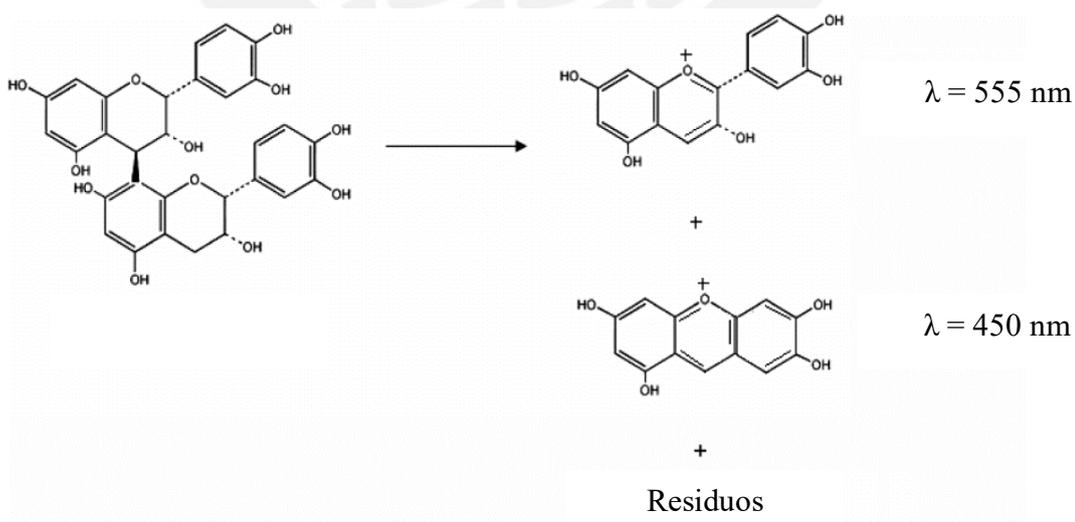


Figura 12. Hidrólisis de tanino condensado no extraíble por HCl/butanol.⁶¹

Este análisis fue realizado a partir de muestras de manzana cruda, banana y frejoles, incluyendo su cáscara. Las muestras son acondicionadas para liofilizarlas y luego molerlas. Se realiza una extracción metanólica acidificada para analizar los taninos condensados extraíbles por HPLC.⁶¹

Los residuos de estas extracciones se secan al vacío en un horno y se tratan con una mezcla de HCl/butanol, conteniendo FeCl_3 a 100°C por una hora. A partir de esta solución se preparan diluciones hasta concentraciones inferiores a 100 mg/L. Estas diluciones son analizadas a 450 y 555 nm.⁶¹

La curva estándar es obtenida a partir de proantocianidina polimérica, PA, concentrada (10 mg) empleando el mismo tratamiento que la muestra inicial. En tal caso, las concentraciones de PANE de las muestras en mg equivalentes de PA/L se deducen de la suma de las absorbancias a 555 y 450 nm graficadas contra la concentración de PA en un rango de 0 a 100 mg de PA/L. Los resultados se expresan como mg de PA por 100 g de muestra original fresca en promedio. Según el estudio, este ensayo fue validado usando taninos condensados aislados de las muestras vegetales, y analizadas mediante HPLC-fluorescencia, previamente derivatizadas ⁶¹

4.2.5. Flavonoides totales

El método descrito por Buriol et. al.⁶² en el 2009, para la determinación del contenido de flavonoides totales en extractos metanólicos de propóleo ha podido ser adecuado al análisis de estos analitos en cáscaras de frutas como aguacate, plátano, papaya, maracuyá, sandía, piña y melón, con resultados bastante satisfactorios.³³ Este método consiste en la utilización de AlCl_3 para la generación de soluciones, debido a la reacción entre el Al(III) con los grupos hidroxilos y carboxilos de los flavonoides, cuya absorbancia puede ser monitoreada a 425 nm.

Este procedimiento requiere de extractos metanólicos de las muestras secas molidas. Estas fueron obtenidas por secado por horno o liofilizadas. Después de la filtración, los extractos son

concentrados en un evaporador al vacío. Se emplea un blanco (metanol) y una solución estándar de quercetina. A estas soluciones se adiciona una alícuota de una solución de AlCl_3 en metanol. Luego de 30 min se midió la absorbancia a 425 nm a temperatura ambiente. La curva de calibración se construye con diluciones de la solución de quercetina y los resultados se expresan como mg de equivalentes de quercetina, EQ, por 100 g de muestra en peso seco, PS.³³

Este estudio se corrobora mediante la determinación de los compuestos antioxidantes por ESI-UPLC-MS/MS, empleando estándares de ácido ferúlico, ácido clorogénico, hidrato de (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, quercetina, (-)-epicatequinagalato, (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina galato, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, entre otros.³³

4.2.6. Carotenoides totales

Uno de los métodos comúnmente empleados para la determinación del contenido total de carotenoides en una muestra de alimentos proveniente de una fuente vegetal corresponde al propuesto por Lichtenthaler y Buschmann en 2001.⁶³ En este método se tratan a las harinas obtenidas de las muestras con acetona, a fin de extraer los analitos.⁴⁹ La mezcla con acetona se centrifuga y el sobrenadante se filtra. A continuación, se realizan las mediciones de absorbancia a 661 nm (A_{661}), 644 nm (A_{644}) y 470 nm (A_{470}). Estas lecturas se usan para evaluar la concentración de clorofila A (Ca), clorofila B (Cb), y los carotenoides totales (CT), de acuerdo a las ecuaciones 1, 2 y 3, (Ca, Cb y CT en $\mu\text{g/mL}$).⁶³ Un ejemplo de aplicación de este método corresponde al análisis de estos metabolitos en los subproductos de la fruta pequi.⁴⁹

$$Ca = 11.24A_{661} - 2.04A_{644} \quad (1)$$

$$Cb = 20.13A_{664} - 4.19A_{661} \quad (2)$$

$$CT = \frac{1000A_{470} - 190Ca - 63.14Cb}{214} \quad (3)$$

Este ensayo ha sido corroborado mediante análisis por HPLC usando un arreglo de fotodiodos como detector. En esta investigación se usaron como muestras 28 diferentes frutas y vegetales como manzana, uva, frijoles verdes, brócoli, lechuga, banana, espinaca, naranjas, tomates, zanahorias, melón, etc. Se emplearon estándares de β – caroteno, β – criptoxantina, luteína, licopeno y zeaxantina para la cuantificación por LC. El ensayo descrito no debe ser sobreestimado, ya que en aquellas muestras con alto contenido en clorofila se presentan ligeros aumentos con respecto a la cuantificación por HPLC, debido a posibles solapamientos en las curvas de absorbancias monitoreadas.⁶⁴

4.2.7. Capacidad antioxidante de extractos

Existen dos técnicas que comúnmente se emplean para la evaluación de la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios, principalmente polifenoles, de muestras alimentarias de origen vegetal, las cuales corresponde al análisis del poder antioxidante del reductor férrico (FRAP) y del radical 2,21dinifenil–picilhidracil (DPPH). En ambos casos se estudia cómo varía la concentración de un compuesto específico cuando está en contacto con los antioxidantes de la materia analizada.

Por un lado, en el método DPPH, se hace un seguimiento de la disminución de absorbancia del radical estable 2,2-difenil-picrilhidracilo, en una solución metanólica, cuando reacciona con los antioxidantes. En su forma radical, el DPPH absorbe a 515 nm, pero al reducirse con un

antioxidante, la absorción desaparece. Este análisis espectrofotométrico fue propuesto por Brand-Williams, Cuvelier y Berset.⁶⁵

Para este método, se emplean los extractos metanólicos descritos para polifenoles totales en secciones anteriores. En este caso, se agrega un volumen determinado de una solución DPPH a las diluciones a partir del extracto de metanol, a fin de obtener diferentes fracciones con concentraciones conocidas.⁶⁵ También se prepara una muestra control con agua, metanol y acetona. En este estudio, se determina el parámetro IC_{50} , que es la cantidad de muestra seca requerida para disminuir el 50% de concentración inicial de DPPH, mediante regresión lineal. Los resultados se expresan en g de muestra por g de DPPH.⁴⁹

Por otra parte, en el método FRAP se evalúa la capacidad oxidante mediante una reacción redox entre un complejo de Fe(III) con los antioxidantes. Específicamente, se determina la reducción de un complejo férrico-tripiridiltriazina (TPTZ) a su forma coloreada ferrosa, en presencia del antioxidante. Este estudio, también espectrofotométrico, fue propuesto por Benzie y Strain.⁶⁶

Asimismo, se usan los extractos metanólicos de los polifenoles totales. A partir de estos, se obtienen 4 diluciones de variada concentración. El reactivo FRAP se prepara con una solución de TPTZ en HCl, más una solución de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y un buffer de acetato de sodio. De esta forma, se mezclan una alícuota del reactivo FRAP con un volumen fijo de las diluciones, para dar lugar a la reacción durante 30 min a $37^\circ C$.⁴⁹ Los valores de absorbancia se miden a 595 nm. Para la curva de calibración se emplea sulfato ferroso. En este sentido, los resultados se expresan como μmol de Fe_2SO_4 por g de harina.⁶⁷

El uso de uno u otro ensayo depende de la matriz de análisis y la disponibilidad de cada reactivo. Sin embargo, ambos ensayos se han empleado para analizar extractos de subproductos como cáscaras y semillas de frutos tropicales de forma satisfactoria, correlacionándolos con

los metabolitos secundarios individuales determinados por cromatografía, principalmente.^{7,33,49,50,66}

4.2.8. Cromatografía líquida

Tal como se ha descrito en los apartados anteriores, los ensayos espectrofotométricos para estimar el contenido total de ciertos tipos de metabolitos a partir de extractos de las muestras vegetales (convertidas en harinas), a menudo son sencillos, reproducibles, no requieren grandes cantidades de reactivos y, en su mayoría, son significativamente rápidos. No obstante, a menudo son estudios semi-cuantitativos que resumen datos que suelen ser más complejos y que solo pueden obtenerse por técnicas más sofisticadas como las cromatográficas. En estas, los metabolitos secundarios individuales son separados con mayor selectividad y precisión, por lo que es posible construir un perfil metabólico más definido y, en el mejor de los casos, bastante completo.

Consecuentemente, de acuerdo con el alcance de este trabajo de investigación, la cromatografía líquida constituiría una técnica importante para analizar los principales metabolitos secundarios presentes en las cáscaras de los aguajes peruanos, y que puede ser complementada con los ensayos espectrofotométricos descritos. En este sentido, los ensayos colorimétricos suelen ser validados por este tipo de análisis instrumental.

Anteriormente, se señaló que la pulpa de aguaje, en general, posee diferentes compuestos bioactivos que incluso se habían estudiado según sus actividades farmacológicas. Esta determinación constituye el punto de partida esencial para tener una idea de lo que puede encontrarse también en las cáscaras, probablemente, con mayor contenido de compuestos antioxidantes, como los que ya se describieron. Freite et al. realizó este recuento de los más importantes, que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos bioactivos de la pulpa de aguaje.²³

Compuesto	Constituyentes
Carotenoides	β -caroteno, α -caroteno, luteína, <i>cis</i> - γ -caroteno, <i>trans</i> - γ -caroteno, <i>cis</i> - α -caroteno, <i>cis</i> - δ -caroteno, <i>all trans</i> - β -caroteno y 9- <i>cis</i> - β -caroteno.
Vitamina E	Vitamina E
Tocoferoles	α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol.
Vitamina C	Ácido ascórbico
Compuestos fenólicos	Ácido quínico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido <i>p</i> -cumárico y ácido protocatecuico.
Flavonoides	(+)-catequina, (-)-ecatequina, luteolina, apigenina, miricetina, kaempferol y quercetina.
Ácidos grasos	Ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido linolénico, ácido margárico y ácido eláidico.
Fitoesteroles	Stigmasterol, β -sitosterol, campesterol y stigmastan-3,5-dieno.

Según la literatura citada en la revisión de Freire et al. para la elaboración de dicha tabla, las investigaciones que pudieron determinar los compuestos bioactivos han empleado distintos métodos de cromatografía líquida. En el caso de ácidos fenólicos, flavonoides y catequinas de la pulpa, la investigación correspondiente empleó la metodología UPLC-MS/MS con ionización por electrospray (UPLC-ESI-MS/MS), con experimentos de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Se destaca que el análisis fue rápido (10 min) y con límites de detección y cuantificación bastante adecuados para la determinación de estos metabolitos (8.39 – 109.80 y 25.42 – 332.90 pg/mL, respectivamente).⁶⁸ Por su parte, otra investigación ha determinado otros flavonoides presentes en las hojas de la palmera *M. flexuosa* L.f., como son tricina-7-O-rutinosida, isocafetosida, nicotiflorina, rutina, orientina e isorientina. En este caso, se empleó HPLC con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y HPLC-ESI-MS con una columna en

fase reversa y los analitos fueron corroborados con estándares aislados, mientras que sus estructuras fueron elucidadas mediante experimentos variados de resonancia magnética nuclear de protón (^1H – RMN) y de ^{13}C (^{13}C – RMN).⁶⁹ Además, el análisis de carotenoides fue realizado mediante HPLC con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC–PAD), usando también estándares para la identificación y cuantificación.⁷⁰ En adición, Koolen et al. también estudio los compuestos fenólicos en el aguaje en Brasil, pero no sino en la pulpa, sino en el tronco y las hojas. Este análisis fue llevado a cabo mediante UPLC – ESI – MS/MS, pudiéndose identificar mediante estándares, trece compuestos fenólicos como (+)–catequina, ácido cafeico hexosido, ácido clorogénico, quercetina, narigenina, miricetina, vitexina, scoparina, rutina, cianidin-3-rutinosida, cianidina-3-glucosida, (-)–epicatequina y kaempferol.⁷¹

Adicionalmente, estudios mediante UPLC-ESI-MS han permitido analizar el contenido de compuestos fenólicos en cáscaras procesadas de frutas tropicales como la palta, piña, banana, maracuyá, melón y sandía. Esta investigación que ya fue citada, puesto que también describían el uso de los análisis colorimétricos, destaca la identificación de ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, hidrato de catequina, epicatequina galato, epicatequina, epicatequina galato y epigallocatequina, mediante sus respectivos estándares.³³ Además, Azevedo – Merleiro et al. ha identificado carotenoides en frutos como acerola (*Malpighia glabra* L.), camu-camu (*Myrciaria dubia*) y pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), mediante HPLC–DAD y HPLC–MS, donde se pudieron detectar neoxantina, violxantina, luteína, zeaxantina, rubixantina, *cis*-rubixantina, β -criptoxantina, β -caroteno-5,6-epóxido, licopeno, *cis*-licopeno, α -caroteno, β -caroteno y *cis*- β -caroteno.⁷² Otros estudios de flavonoides y carotenoides en frutos tropicales mediante LC fueron mencionados con anterioridad, sobre todo para la validación de los ensayos colorimétricos correspondientes.^{62,64}

Por su parte, los taninos tanto hidrolizables como condensados han podido ser analizados también mediante LC. Extractos de uvas con alcohol y mezclas supercríticas de CO_2 , se

estudiaron usando HPLC–MS con ionización química a presión atmosférica (HPLC–APCI–MS) y HPLC–ESI–MS, y para la elucidación estructural se llevaron a cabo experimentos de RMN. Consecuentemente, se pudo determinar proantocianidinas diméricas, proantocianidinas galoil diméricas, catequinas, epicatequinas, monogaloil glucosa entre otros compuestos fenólicos.⁷³ Además, ciertos taninos hidrolizables, específicamente once galotaninos individuales, fueron identificados por medio de HPLC–DAD en extractos de hojas de la especie *Betula pubescens*. Sus estructuras fueron elucidadas mediante análisis por RMN de protón y carbono 13.⁴¹ Así como estos estudios, diversas investigaciones han demostrado que es posible la determinación estructural de los compuestos fenólicos de diferentes matrices vegetal, sobre todo si se emplean experimentos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN como coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC), espectroscopía de mejoramiento nuclear Overhauser (NOESY), correlación heteronuclear de múltiple alcance (HMBC), entre otros, siempre que la extracción y aislamiento pueda optimizarse.^{74,75}

5. Conclusiones

- El aguaje como fruto posee una gran importancia alimenticia e industrial para la Amazonía, debido al alto contenido de aceites y compuestos antioxidante, entre otros nutrientes importantes en su pulpa, tanto para su consumo directo como para la fabricación de productos cosméticos o alimentarios procesados.
- El gran consumo de aguaje involucra también grandes cantidades de residuos. A diferencia de la semilla, la cual se emplea en la elaboración de artesanías, carbón ecológico o como potencial fuente de carbón activado, la cáscara no posee ningún valor agregado como subproducto; por lo que suele acumularse como basura.
- Los diferentes morfotipos podrían exhibir variaciones en la composición química de los metabolitos presentes en las distintas partes que constituyen al fruto del aguaje. Estas variaciones también podrían apreciarse en el aguajillo; por ejemplo, en las cáscaras.
- Actualmente, no se ha encontrado literatura en la que se haya discutido la composición química de las cáscaras de los aguajes peruanos según sus morfotipos, ni que se hayan determinado algunos metabolitos secundarios individualmente.
- Lo principales metabolitos secundarios que se han encontrado en cáscaras de diversos frutos tropicales y que podrían encontrarse también en las de los aguajes a analizar (incluyendo el aguajillo), corresponden a taninos hidrolizables, taninos condensados, flavonoides, carotenoides y tocoferoles. La mayoría de estos presentan actividad antioxidante, entre otras propiedades beneficiosas para la salud y prevención de enfermedades.
- Diferentes métodos basados en mediciones espectrofotométricas en el rango UV-Vis permiten estimar el contenido total de polifenoles, taninos hidrolizables, taninos condensados extraíbles y no extraíbles, carotenoides y flavonoides mediante la reacción

de ciertos reactivos con los metabolitos secundarios en extractos de la materia prima. Estos métodos se adaptan satisfactoriamente a extractos obtenidos a partir de la harina de las cáscaras de diferentes frutas tropicales.

- Los métodos FRAP y DPPH permiten conocer la capacidad antioxidante de estos extractos, a fin de tener una idea de un potencial uso de las cáscaras en alimentos basados en fibra dietética.
- Los diferentes metabolitos secundarios comunes en cáscaras de frutas tropicales pueden determinarse mediante metodologías de cromatografía líquida y sus estructuras pueden ser elucidadas con variados experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, entre otros.
- En base al estudio presentado, se considera factible la estimación del contenido de los principales metabolitos secundarios presentes en las cáscaras de aguajes peruanos mediante los ensayos espectrofotométricos descritos para polifenólicos, taninos hidrolizables y condensados (extraíbles y no extraíbles), flavonoides y carotenoides. Para ello se debe preparar las harinas correspondientes para los extractos. Asimismo, sería interesante evaluar la capacidad antioxidante mediante FRAP o DPPH para los extractos de las harinas de las cáscaras de los aguajes.
- Las metodologías cromatográficas y por RMN permitirían estudiar de forma más precisa la composición química de las cáscaras de aguajes peruanos y facilitar la comparación entre los distintos morfotipos y aguajillo. En tal caso, la investigación de las cáscaras en aguajes podría apuntar a optimizar las extracciones para cada tipo de metabolitos secundarios. Esto facilitaría la obtención de fracciones ricas en algunos metabolitos y podría permitir el aislamiento de algunos compuestos importantes que ya se usan o podrían usarse en la industria (sujeto a pruebas adicionales, e.g. taninos como agentes precipitantes de proteínas o adhesivos).

Referencias bibliográficas

- (1) Del Castillo, D.; Otárola, E.; Freitas, L. *La Maravillosa Palmera de La Amazonía*; IIAP: Iquitos, 2006.
- (2) Rojas, R.; Ruiz, G.; Ramírez, P.; Salazar, C.; Rengifo, C.; Llerena, C.; Marín, C.; Torres, D.; Ojana, J.; Silvano, W. (IIAP). Comercialización de Masa y Fruto Verde de Aguaje (*Mauritia Flexuosa* L. f.) En Iquitos (Perú). *Folia Amaz.* **2001**, *12*, 15–38.
- (3) Smith, N. *Palms and People in the Amazon*; 2015; pp 341–381.
- (4) CIMA (Centro de Conservación Investigación y Manejo de Áreas Naturales). *Revaloración e Importancia Del Aguaje En La Zona de Amortiguamiento Del Parque Nacional Cordillera Azul*, Alpigraf.; Lima, 2012.
- (5) Ayala-Zavala, J. F.; Vega-Vega, V.; Rosas-Domínguez, C.; Palafox-Carlos, H.; Villarodriguez, J. A.; Siddiqui, M. W.; Dávila-Aviña, J. E.; González-Aguilar, G. A. Agro-Industrial Potential of Exotic Fruit Byproducts as a Source of Food Additives. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (7), 1866–1874.
- (6) Saad, H.; Charrier-El Bouhtoury, F.; Pizzi, A.; Rode, K.; Charrier, B.; Ayed, N. Characterization of Pomegranate Peels Tannin Extractives. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *40* (1), 239–246.
- (7) Duda-Chodak, A.; Tarko, T. Antioxidant Properties of Different Fruit Seeds and Peels. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2007**, *6* (3), 29–36.
- (8) Ruiz, G. B.; Villena, D. V. Análisis Físico-Químico de 2 Especies de Frutos Comestibles de Palmas: *Mauritia Carana* Wallace Ex Arche, “aguaje Del Varillal” y *Mauritiella Armata* (Mart) Burret, ‘Aguajillo’ En Iquitos, Provincia de Maynas, Región Loreto.,” Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2011.

- (9) Cronquist, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*; New York Botanical Garden: New York, 1998.
- (10) Villachica, H. *Frutales y Hortalizas Promisorios de La Amazonía*; Secretaría Pro-Tempore, 1996.
- (11) Vásquez, I. Efecto de 4 Medios de Cultivo y 3 Dosis de Thidiazuron En La Inducción de Embriogénesis Somática En *Mauritia Flexiosa*, En Iquitos Perú., Universidad Nacional de San Martín, 2009.
- (12) Aspajo, F.; Ridríguez, Á.; Corazón, M.; Freita, L.; Del Castillo, D.; Castro, D.; García, M.; Renno, J.; García, C. Caracterización Genética de Los Morfotipos de Aguaje *Mauritia Flexuosa* L. F. (Arecacea) y Análisis de La Variabilidad de Tres Poblaciones Naturales de La Amazonía Peruana. *Folia Amaz.* **2017**, 4 (2), 75.
- (13) Freitas, L.; Ochoa, M.; Del Castillo, D. Variabilidad Morfométrica de Las Estructuras Reproductivas Del Aguaje *Mauritia Flexuosa* L.f. En Tres Poblaciones Naturales de La Amazonía Peruana. *Folia Amaz.* **2017**, 20 (1–2), 101.
- (14) Navarro, F. *Cadenas Productivas de Aguaje y Tagua*; ProNaturaleza: Lima, 2006.
- (15) Gonçalves, T. Ecology and Importance of the Conservation from Specie *Buritizinho* (*Mauritiella Armata* (Mart) Burret - Arecaceae). *Ann. Geogr. Stud.* **2019**, 2 (1), 17–19.
- (16) Smith, N. *Palms and People in the Amazon*; Springer: New York, 2015.
- (17) Albuja, E. *Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2017*; MINAGRI: Lima, 2018.
- (18) ¿Qué Pone En Riesgo La Abundancia Del Aguaje En La Amazonía? *El Comercio*. Lima September 12, 2015.

- (19) Díaz, J.; Paredes, M.; Martínez, J. *Evaluación Participativa de La Fenología de Las Palmeras Aguaje (Mauritia Flexuosa) y Ungurahui (Oenacarpus Bataua) En La Comunidad Nativa Tres Islas, Madre de Dios*; NEGRAPATA: Lima, 2015.
- (20) Gonzales, A.; Torres, G. *Manual de Cultivo de Aguaje (Mauritia Flexuosa L. F.)*; IIAP: Iquitos, 2010.
- (21) Sifuentes, E.; Albuja, E.; Contreras, S.; León, C.; Moreyra, J. C.; María, J. S. *Anuario Estadístico de La Producción Agrícola y Ganadera 2016*; MINAGRI: Lima, 2017.
- (22) Vásquez-Ocmín, P.; Alvarado, F.; Solís, S.; Paván, R. Chemical Characterization and Oxidative Stability of the Oils from Three Morphotypes of *Mauritia Flexuosa* L. f., from the Peruvian Amazon. *Grasas y Aceites* **2010**, *61* (4), 390–397.
- (23) Pereira-Freire, J.; Barros, K.; Lima, L.; Martins, J.; Araújo, Y.; da Silva Oliveira, G.; de Souza Aquino, J.; Ferreira, P. Phytochemistry Profile, Nutritional Properties and Pharmacological Activities of *Mauritia Flexuosa*. *J. Food Sci.* **2016**, *81* (11), 2611–2622.
- (24) ITP (Instituto Tecnológico de la Producción). *Aprovechamiento de Residuos de Mauritia Flexuosa*; VTiC: Lima, 2018.
- (25) Vásquez-Ocmín, P. Caracterización de Ácidos Grasos, Beta-Caroteno, Alfa-Tocoferol y Estabilidad Oxidativa de Los Aceites de Tres Morfotipos de *Mauritia Flexuosa* L.f., Mediante Cromatografía de Gases, HPLC y Rancimat., Universidad Nacional de la Amazonía, 2006.
- (26) Pereira, R.; Souza, P.; Braga, M.; dos Santos, P.; Ferreira, C.; Zamian, J.; Santos, L.; da Rocha, G. Murumuru (*Astrocaryum Murumuru* Mart.) Butter and Oils of Buriti (*Mauritia Flexuosa* Mart.) and Pracaxi (*Pentaclethra Macroloba* (Willd.) Kuntze) Can

- Be Used for Biodiesel Production: Physico-Chemical Properties and Thermal and Kinetic Studies. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *97*, 536–544.
- (27) IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Agropecuário (Agricultural Census) <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2233#re-sultado>.
- (28) Zamora, G. Obtención de Carbón Activada a Partir de Semillas de Dos Palmeras de La Amazonía Peruana, Shapaja (*Attalea Phalerta*) y Aguaje (*Mauritia Flexuosa*), Universidad Nacional Agraria La Molina, 2010.
- (29) Ruiz, L.; Orbegoso, K. Eficiencia de Carbón Activado Obtenido a Partir Del Endocarpo de “Coco” (*Cocos Nucifera*) y Semilla de “Aguaje” (*Mauritia Flexuosa*), En La Remoción de DBO5 de Las Aguas Residuales Domésticas En El Distrito de Habana-Moyobamba, 2018., Universidad Nacional de San Martín, 2019.
- (30) Ecocarbón: Conoce Las Bondades Del Carbón Ecológico Hecho a Base de Biomasa. *Capital*. Lima November 25, 2018.
- (31) Escriche, I.; Restrepo, J.; Serra, J.; Herrera, L. Composition and Nutritive Value of Amazonian Palm Fruits. *Food Nutr. Bull.* **1999**, *20* (3), 361–364.
- (32) Melo, W.; Pena, R.; Rodrigues, A.; da Silva, L. Hygroscopic Behavior of Buriti (*Mauritia Flexuosa*) Fruit. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2011**, *31* (4), 935–940.
- (33) Morais, D. R.; Rotta, E. M.; Sargi, S. C.; Schmidt, E. M.; Bonafe, E. G.; Eberlin, M. N.; Sawaya, A. C. H. F.; Visentainer, J. V. Antioxidant Activity, Phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of Extracts from Different Tropical Fruits Parts and Processed Peels. *Food Res. Int.* **2015**, *77*, 392–399.
- (34) Nurdalilah, O.; Teoh, Y. P.; Ooi, Z. X.; Sam, S. T. Comparative Study on the Extraction of Bioactive Secondary Metabolites from Pomelo and Pineapple Peels

- Extract. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, 429 (1).
- (35) Gan, R.-Y.; Chan, C.-L.; Yang, Q.-Q.; Li, H.-B.; Zhang, D.; Ge, Y.-Y.; Gunaratne, A.; Ge, J.; Corke, H. *Bioactive Compounds and Beneficial Functions of Sprouted Grains*; Elsevier Inc., 2019.
- (36) Handique, J. G.; Baruah, J. B. Polyphenolic Compounds: An Overview. *React. Funct. Polym.* **2002**, 52 (3), 163–188.
- (37) Álvarez, C.; Lock, O. Taninos. *Rev. Química PUCP* **1992**, 6 (1), 47–63.
- (38) Khanbabaee, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18 (6), 641–649.
- (39) Hagerman, A. *Tannin Chemistry*. Miami University: Oxford 2002.
- (40) Haslam, E. Vegetable Tannins - Lessons of a Phytochemical Lifetime. *Phytochemistry* **2007**, 68 (22–24), 2713–2721.
- (41) Ossipov, V.; Loponen, J.; Ossipova, S.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Gallotannins of Birch *Betula Pubescens* Leaves: HPLC Separation and Quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, 25 (6), 493–504.
- (42) Cook, N.; Samman, S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *Nutr. Biochem.* **1996**, 7 (66), 67–76.
- (43) Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63 (7), 1035–1042.
- (44) Dewick, P. *Medicinal Natural Products*, 3rd ed.; Wiley, 2009.
- (45) Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **2004**, 43 (3), 228–265.
- (46) Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant Activity of Carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **2003**, 24

- (6), 345–351.
- (47) Edge, R.; McGarvey, D.; Truscott, T. The Carotenoids as Antioxidantes-a Review. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *41*, 189–200.
- (48) Dietrich, M.; Jacques, P. F.; Traber, M. G.; Cross, C. E.; Hu, Y.; Block, G. Does γ -Tocopherol Play a Role in the Primary Prevention of Heart Disease and Cancer? A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **2006**, *25* (4), 292–299.
- (49) Leão, D. P.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S.; Bastos, R.; Coimbra, M. A. Physicochemical Characterization, Antioxidant Capacity, Total Phenolic and Proanthocyanidin Content of Flours Prepared from Pequi (*Caryocar Brasilense* Camb.) Fruit by-Products. *Food Chem.* **2017**, *225*, 146–153.
- (50) Li, Y.; Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Xu, J.; Cheng, S. Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chem.* **2006**, *96* (2), 254–260.
- (51) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **1998**, *299* (1974), 152–178.
- (52) Margraf, T.; Karnopp, A.; Rosso, N.; Granato, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **2015**, *80* (11), 2397–2403.
- (53) Singleton, V.; Rossi, J. Colorimetry of Total Phenolics with Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16* (1), 144–158.
- (54) Larrauri, J. A.; Rupérez, P.; Borroto, B.; Saura-Calixto, F. Mango Peels as a New Tropical Fibre: Preparation and Characterization. *LWT - Food Sci. Technol.* **1996**, *29*

- (8), 729–733.
- (55) Muchuweti, M.; Ndhlala, A. R.; Kasiamhuru, A. Analysis of Phenolic Compounds Including Tannins, Gallotannins and Flavanols of Uapaca Kirkiana Fruit. *Food Chem.* **2006**, *94* (3), 415–419.
- (56) Price, M.; Butler, L. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25* (6), 1266–1273.
- (57) Bossu, C. M.; Ferreira, E. C.; Chaves, F. S.; Menezes, E. A.; Nogueira, A. R. A. Flow Injection System for Hydrolysable Tannin Determination. *Microchem. J.* **2006**, *84* (1–2), 88–92.
- (58) Willis, R. B.; Allen, P. R.; Road, M. P. Improved Method for Measuring Hydrolyzable Tannins Using Potassium Iodate. *Analyst* **1998**, *123*, 435–439.
- (59) Broadhurst, R. B.; Jones, W. T. Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29* (9), 788–794.
- (60) Scalbert, A.; Monties, B.; Janin, G. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37* (5), 1324–1329.
- (61) Zurita, J.; Díaz-Rubio, M. E.; Saura-Calixto, F. Improved Procedure to Determine Non-Extractable Polymeric Proanthocyanidins in Plant Foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**, *63* (8), 936–939.
- (62) Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Dos Santos, J. M. T.; Da Rosa, M. R.; Quinária, S. P.; Torres, Y. R.; Santa, H. S. D.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; et al. Composição Química e Atividade Biológica de Extrato Oleoso de Própolis: Uma Alternativa Ao Extrato Etanólico. *Quim. Nova* **2009**, *32* (2), 296–302.
- (63) Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C.; Harkins, E. W. Chlorophylls and Carotenoids:

- Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**, F4.3.1-F4.3.8.
- (64) Biehler, E.; Mayer, F.; Hoffman, L.; Krause, E.; Bohn, T. Comparison of 3 Spectrophotometric Methods Fo Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. *J. Food Chem.* **2010**, 75 (1), 55–61.
- (65) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidante Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30.
- (66) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.* **1998**, 299 (1995), 15–27.
- (67) Pulido Raquel , Bravo Laura, and S.-C. v. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural And. Food Chem.* **2000**, 48, 3396–3402.
- (68) Bataglion, G. A.; Felipe, M. A.; Eberlin, M. N.; Koolen, H. H. F. Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in Buriti Fruit (*Mauritia Flexuosa* L.f.) by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *FRIN* **2014**, 66, 396–400.
- (69) Oliveira, D. M. De; Siqueira, E. P.; Nunes, Y. R. F. Flavonoids from Leaves of *Mauritia Flexuosa*. *Rev. Bras. Farm.* **2013**, 23 (4), 614–620.
- (70) Candido, T. L. N.; Silva, M. R. Bioactive Compounds and Antioxidante Capacity of Buriti (*Mauritia Flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon Biomes. *FOOD Chem.* **2015**, 177, 313–319.

- (71) Koolen, H. H. F.; Felipe, M. A.; Gozzo, F. C.; Souza, A. Q. L. De; Souza, A. D. L. De. Antioxidant , Antimicrobial Activities and Characterization of Phenolic Compounds from Buriti (*Mauritia Flexuosa* L. f.) by UPLC – ESI-MS/MS. *FRIN* **2013**, *51* (2), 467–473.
- (72) Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-amaya, D. B. Confirmation of the Identity of the Carotenoids of Tropical Fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food Comp. Anal.* **2004**, *17*, 385–396.
- (73) Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *J. Agri. Food Chem.* **2000**, *48* (8), 3408–3412.
- (74) Hemingway, R.; Laks, P. *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance.*; Springer-Science: Michigan, 1992.
- (75) Cannell, R. *Natural Products Isolation*; Humana Press: New Jersey, 1998.