

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



**ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS E  
INSOLUBLES EN CÁSCARA DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa* L. f.)  
COMO POTENCIAL FUENTE DE FIBRA DIETÉTICA FUNCIONAL**

**Tesis para obtener el título profesional de Licenciado en Química**

**AUTOR**

Guillermo Enrique Guerrero Pinedo

**ASESOR**

Eric Gabriel Cosio Caravasi

Lima, noviembre, 2024

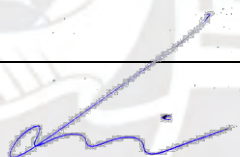
## Informe de Similitud

Yo, **Eric Gabriel Cosio Caravasi**, docente de la **Facultad de Ciencias e Ingeniería** de la Pontificia Universidad Católica del Perú, y asesor de la tesis titulada **"ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS E INSOLUBLES EN CÁSCARA DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa* L. f.) COMO POTENCIAL FUENTE DE FIBRA DIETÉTICA FUNCIONAL"**, del autor **Guillermo Enrique Guerrero Pinedo**, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 19%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 17/12/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

San Miguel, Lima, 18 de diciembre de 2024

Apellidos y nombres del asesor: Cosio Caravasi, Eric Gabriel	
DNI: 70321216	Firma 
ORCID: 0000-0001-6993-5654	

## Resumen

El aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) es una de las palmeras más reconocibles en la Amazonía. Es una especie ampliamente extendida en los bosques de las turberas tropicales del noreste de Perú, y constituye un recurso muy importante para las comunidades locales debido a la comercialización de su fruto. La pulpa es la parte principal que se consume; en consecuencia, otras partes como la cáscara no se utilizan y se consideran, esencialmente, residuos. Muchas investigaciones actuales han mostrado que los compuestos fenólicos conjugados solubles e insolubles en la fibra dietética de las frutas tienen propiedades prebióticas y otros beneficios para la salud humana. En este contexto, esta tesis presenta un análisis del perfil de fenólicos libres (FL) y liberados de sus formas esterificadas (FE), glicosiladas (FG) e insolubles ligadas a la pared celular (FI) en las cáscaras de tres morfotipos de frutos de aguajes provenientes de la Amazonía peruana: “Color”, “Posheco” y “Amarillo”.

Las cáscaras desengrasadas, blanqueadas y liofilizadas fueron extraídas mediante sonicación (UAE), seguido de una limpieza por extracción en fase sólida (SPE RP-18) para la remoción final de contaminantes liposolubles. El extracto crudo limpio se particionó por medio de extracción líquido-líquido con acetato de etilo para la obtención de la fracción FL. A partir de la fase acuosa, se realizó una hidrólisis secuencial, primero ácida y luego básica, para conseguir las fracciones FE y FG, respectivamente. La fracción FI se obtuvo tras una hidrólisis básica del residuo sólido del extracto. Se llevó a cabo una primera inspección del perfil de los analitos entre las fracciones usando TLC. Luego, los fenólicos se analizaron mediante HPLC-DAD y GC-MS con 16 estándares de ácidos fenólicos y flavonoides. También, se estimó la capacidad antioxidante (ORAC-PGR) y el contenido total de fenólicos (TPC por Folin-Ciocalteu) en cada fracción. Además, se midió la fibra dietética total por un método enzimático-gravimétrico.

Se observó que las cáscaras del fruto del aguaje tienen un contenido importante de fenólicos conjugados solubles e insolubles (*ca.* 86% del TPC de las cuatro fracciones), con una alta capacidad antioxidante. Se identificaron y cuantificaron nueve fenólicos mediante HPLC-DAD. El análisis por GC-MS permitió corroborar estos resultados y sugerir la presencia de (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina, implicando un alto contenido de proantocianidinas, y ácido *p*-hidroxibenzoico, probablemente ligado a lignina. Además, se encontró que las cáscaras están constituidas principalmente por fibra dietética insoluble. Estos hallazgos ayudan a proporcionar una mejor comprensión de la funcionalidad de la cáscara del fruto del aguaje como una posible fuente de fibra dietética antioxidante para la suplementación alimentaria.

## Agradecimientos

Al Dr. Eric Cosio por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Bioanalítica (PUCP), su mentoría incondicional, su profesionalismo y su paciencia.

A mis padres, Jaime Guerrero y Neiry Pinedo, y mis hermanos, Jaime y Gissella, por su amor interminable, su motivación constante y su apoyo sin peros.

A la Mag. Eliana Esparza, por ser una excelente guía y maestra en el desarrollo de este trabajo, por saber cuándo pedirme que apriete el acelerador y cuándo vale la pena serenarme, y, definitivamente, por su inmensa amistad.

Al Dr. Santiago Casas, por abrirme las puertas de su despacho en la Universidad Nacional de San Martín, permitirme conocer sobre su ardua y admirable labor en la conservación y manejo sostenible del aguaje, y su apoyo en el envío de los frutos desde Moyobamba.

Al señor Pablo Vera, por su amabilidad y voluntad por colaborar en la provisión de la materia prima para esta investigación, directamente de los majestuosos aguajales que día a día cuida y defiende en nuestra selva sanmartinense.

A Esteban Ramos, Rudi Cruz y Gustavo Mormontoy, por ayudarme en mis primeros pasos por el laboratorio, por sus incansables ánimos, y por demostrarme que todo lo bueno es mejor si es en equipo.

A Pamela Elorreaga, porque su amor y luz apaciguaron esta mente, aceleraron este corazón, y dulcificaron esta alma, permitiendo que hoy todo esto sea real.

A Se-ri, porque en las jornadas más amargas y desafiantes, sus orejas puntiagudas, su cola inquieta y su pelaje algodónoso fueron mi paz.

A Juan, Diana, Elina y Sylvia, por su eterna amistad, cariño sincero y aliento eficaz para seguir adelante, siempre adelante.

A Camila Garvich y Alex Nina, por su apoyo en el desarrollo de algunos ensayos, sus buenos deseos y su agradable compañía a lo largo del proceso.

A Nico, David y Gilmer, por tenderme la mano con la urgencia de los reactivos y equipos necesarios para lograr esta hazaña.

Y, finalmente, a mí, por comprender que el éxito es solo un nuevo punto de partida.

**Dedicatoria**

*Para mi papá, por ser el soporte moral y académico en mis pininos,  
para mi mamá, por cobijarme siempre con su amor y confianza,  
y para mí, por saber abrazar al caos y convertirlo en poesía.*

## Tabla de contenidos

Resumen.....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Tabla de contenidos .....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Lista de abreviaturas .....	ix
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El aguaje y su aprovechamiento .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Descripción taxonómica y ecológica .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Composición nutricional del fruto.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3. Aprovechamiento del fruto .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Caracterización química de cáscaras de frutos .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1. Compuestos fenólicos.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1.1. Ácidos fenólicos .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.2. Flavonoides .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. Fibra dietética, compuestos fenólicos y microbiota intestinal .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3. Antecedentes de estudios en la cáscara de aguaje.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. General.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Parte experimental .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1. Material vegetal.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2. Solventes.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3. Reactivos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.4. Gases.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.5. Materiales e instrumentos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.5.1. Materiales.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.5.2. Instrumentos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.6. Equipos de análisis.....</b>	<b>23</b>

3.1.7. Programas.....	24
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Acondicionamiento y pretratamiento de muestras.....	25
3.2.1.1. Selección y pelado.....	25
3.2.1.2. Blanqueo y liofilización.....	25
3.2.1.3. Molienda y desengrasado.....	25
3.2.2. Extracción e hidrólisis secuencial.....	26
3.2.2.1. Extracción cruda y limpieza final.....	26
3.2.2.2. Hidrolisis secuencial y partición.....	26
3.2.2.2.1. Fenólicos libres.....	26
3.2.2.2.2. Fenólicos esterificados.....	27
3.2.2.2.3. Fenólicos glicosilados.....	27
3.2.2.2.4. Fenólicos ligados insolubles.....	27
3.2.3. Análisis espectrofotométricos.....	28
3.2.3.1. Contenido total de fenólicos.....	28
3.2.3.2. Capacidad antioxidante.....	29
3.2.4. Análisis enzimático-gravimétrico.....	30
3.2.5. Análisis cromatográficos.....	32
3.2.5.1. Análisis por TLC.....	32
3.2.5.2. Análisis por HPLC-DAD.....	32
3.2.5.3. Análisis por GC-MS.....	34
4. Resultados.....	36
4.1. Descripción morfológica de los frutos.....	36
4.2. Evaluación de parámetros analíticos.....	38
4.2.1. Técnicas analíticas.....	38
4.2.1.1. Calibración para contenido total de fenólicos.....	38
4.2.1.2. Calibración para capacidad antioxidante.....	38
4.2.1.3. Optimización para TLC.....	39
4.2.1.4. Optimización para HPLC-DAD.....	43
4.2.1.5. Optimización para GC-MS.....	48
4.3. Procesamiento de muestras.....	49
4.3.1. Optimización de la extracción cruda.....	49
4.3.2. Optimización del desengrasado.....	51

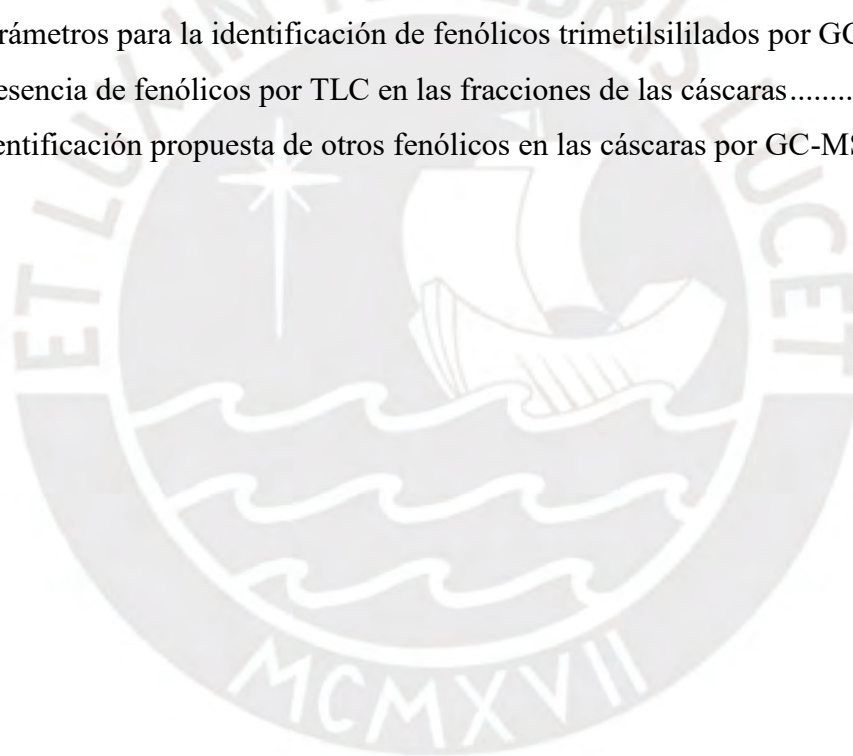
4.3.3.	Optimización de la obtención de fracciones .....	52
4.3.3.1.	<i>Evaluación de SPE para la obtención de FL</i> .....	52
4.3.3.2.	<i>Optimización de la LLE</i> .....	52
4.3.3.3.	<i>Comparación entre SPE y LLE para el fraccionamiento</i> .....	53
4.3.4.	Limpieza final de contaminantes liposolubles por SPE .....	54
4.4.	Comparación de fracciones hidrolizadas .....	56
4.4.1.	Contenido total de fenólicos .....	56
4.4.2.	Capacidad antioxidante.....	57
4.4.3.	Fibra dietética.....	58
4.4.4.	Análisis por TLC.....	59
4.4.5.	Análisis por HPLC-DAD.....	62
3.1.1.	Análisis por GC-MS.....	64
5.	Discusión.....	70
5.1.	Consideraciones metodológicas sobre la extracción y la hidrólisis secuencial ..	70
5.1.1.	Discriminación entre morfotipos .....	70
5.1.2.	Blanqueamiento, desengrasado y extracción cruda.....	70
5.1.3.	Fraccionamiento e hidrólisis de fenólicos conjugados .....	72
5.2.	Contenido total de fenólicos y capacidad antioxidante.....	74
5.2.1.	Correlación .....	74
5.2.2.	Efecto de la hidrólisis.....	75
5.2.3.	Comparación con otros estudios.....	76
5.3.	Cuantificación de fenólicos libres y conjugados .....	77
5.3.1.	Comparación con otros estudios.....	77
5.3.2.	Propuestas biosintéticas sobre el contenido de fenólicos.....	79
5.4.	Otros posibles fenólicos.....	82
5.5.	Fibra dietética funcional.....	84
6.	Conclusiones.....	86
	Referencias bibliográficas .....	88
	Anexos .....	101
	Figuras complementarias .....	101
	Tablas complementarias .....	112

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Partes del fruto del aguaje, <i>Mauritia flexuosa</i> L. f., morfotipo “Amarillo” .....	2
<b>Figura 2.</b> Ruta del siquimato de los compuestos fenólicos en plantas.....	9
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los principales ácidos fenólicos en plantas.....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los principales flavonoides en plantas. ....	12
<b>Figura 5.</b> Ruta de conversión del eridictiol en sus flavonoides derivados.....	12
<b>Figura 6.</b> Proceso digestivo de los fenólicos conjugados en el organismo humano .....	15
<b>Figura 7.</b> Imágenes del lugar de recolección de los frutos del aguaje .....	19
<b>Figura 8.</b> Flujograma para la obtención de fracciones de fenólicos de cáscaras de aguajes ..	28
<b>Figura 9.</b> Ejemplares de morfotipos de los aguajes analizados .....	37
<b>Figura 10.</b> Muestras de cáscaras analizadas según el morfotipo de aguaje .....	37
<b>Figura 11.</b> Curva de calibración de ácido gálico mediante el método Folin-Ciocalteu.....	38
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración de trolox mediante el ensayo ORAC-PGR. ....	39
<b>Figura 13.</b> TLC de una mezcla de 16 estándares fenólicos. ....	42
<b>Figura 14.</b> TLC para la evaluación del desengrasado de las cáscaras con <i>n</i> -hexano.....	42
<b>Figura 15.</b> Espectros UV-Visible de 16 estándares fenólicos.....	44
<b>Figura 16.</b> Separación de 16 estándares fenólicos por HPLC-DAD (RP) a 280 nm .....	45
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración de quercetina por HPLC-DAD (RP) a 254 nm. ....	46
<b>Figura 18.</b> Recuperación de los estándares fenólicos en la fracción de fenólicos libres .....	46
<b>Figura 19.</b> Separación por GC-MS (TIC) de 16 estándares fenólicos trimetilsililados.....	48
<b>Figura 20.</b> Perfiles de interacción del tiempo y temperatura de extracción de fenólicos .....	50
<b>Figura 21.</b> TLC de la remoción de contaminantes liposolubles del extracto.....	56
<b>Figura 22.</b> Contenido total de fenólicos (TPC) de las fracciones de las cáscaras.....	57
<b>Figura 23.</b> Capacidad antioxidante (ORAC-PGR) de las fracciones de las cáscaras .....	58
<b>Figura 24.</b> Contenido de fibra dietética de las cáscaras de aguajes .....	59
<b>Figura 25.</b> TLC de las fracciones de fenólicos de las cáscaras de aguajes. ....	61
<b>Figura 26.</b> Separación por HPLC-DAD (RP) a 280 nm de las fracciones de fenólicos .....	65
<b>Figura 27.</b> Concentración de fenólicos en las fracciones de las cáscaras de aguajes .....	66
<b>Figura 28.</b> Separación por GC-MS (TIC) de las fracciones de fenólicos trimetilsililados.....	68

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Publicaciones internacionales sobre el fruto del aguaje .....	3
<b>Tabla 2.</b> Composición nutricional del fruto del aguaje .....	3
<b>Tabla 3.</b> Principales compuestos bioactivos de la pulpa de aguaje.....	4
<b>Tabla 4.</b> Producción, superficie de cosecha y precio en chacra del aguaje en Perú .....	5
<b>Tabla 5.</b> Antecedentes en el análisis de metabolitos secundarios en cáscaras de aguaje.....	17
<b>Tabla 6.</b> Parámetros para la separación de fenólicos por HPLC-DAD (RP) .....	33
<b>Tabla 7.</b> Parámetros para la separación de fenólicos trimetilsililados por GC-MS .....	35
<b>Tabla 8.</b> Masa y dimensiones de los frutos del aguaje según morfotipo .....	36
<b>Tabla 9.</b> Parámetros para la elección de la fase móvil para la TLC de fenólicos. ....	41
<b>Tabla 10.</b> Parámetros de cuantificación de los fenólicos por HPLC-DAD (RP).....	47
<b>Tabla 11.</b> Parámetros para la identificación de fenólicos trimetilsililados por GC-MS .....	49
<b>Tabla 12.</b> Presencia de fenólicos por TLC en las fracciones de las cáscaras.....	62
<b>Tabla 13.</b> Identificación propuesta de otros fenólicos en las cáscaras por GC-MS.....	69



### Lista de abreviaturas

AC	Capacidad antioxidante
DW	Masa seca
FE	Fracción de fenólicos esterificados
FG	Fracción de fenólicos glicosilados
FI	Fracción de fenólicos ligados insolubles
FL	Fracción de fenólicos libres
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta performance con detección por arreglo de diodos
LLE	Extracción líquido – líquido
m/v	Relación masa/volumen en g/mL
m/z	Relación masa/carga
NP	Fase normal
ORAC-PGR	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno empleando rojo de pirogalol
Ph	Grupo fenilo
RP	Fase reversa
SPE RP-18	Extracción en fase sólida con sílica octadecil
TLC	Cromatografía de capa fina
TLS	Contenido total de sustancias liposolubles
TPC	Contenido total de fenólicos
UAE	Extracción asistida por ultrasonido
v/v	Relación volumen/volumen en mL/mL

## 1. Introducción

### 1.1. El aguaje y su aprovechamiento

#### 1.1.1. Descripción taxonómica y ecológica

En Perú, “aguaje” es la denominación común de la especie *Mauritia flexuosa* L.f. También es llamada “buriti” en Brasil, y “moriche” en Venezuela y Colombia (Rojas et al., 2001). *M. flexuosa* L. f. fue una de las primeras palmeras descritas por Linneo en 1781 (Smith, 2015), y pertenece a la familia Arecaceae, del orden Arecales, subclase Arecidae, clase Liliopsida y a la división Magnoliophyta (Cronquist, 1998). El aguaje habita en territorios con climas tropicales húmedos, con una amplia distribución en el centro y norte de Sudamérica (Smith, 2015). Esta palmera forma extensas asociaciones vegetales, denominadas “aguajales”, las cuales ocupan áreas inundables próximas a ríos, lagos, lagunas y pantanos (Rojas et al., 2001). Otros países con presencia de aguajales son Ecuador, Bolivia y Guyana (Instituto Tecnológico de la Producción, 2018). Se ha destacado la importancia ecológica de *M. flexuosa* al ser la especie nativa más abundante en los ecosistemas de turberas amazónicas del Perú, almacenando al menos 3.14 billones de toneladas de carbono (PgC), el equivalente a más de 60 años de emisiones nacionales de combustibles fósiles (Hidalgo Pizango et al., 2022).

El aguaje posee una mayúscula importancia socioeconómica y cultural para la Amazonía, debido a los diversos usos que se pueden dar a todas sus partes (Del Castillo et al., 2006). Particularmente, el fruto, también llamado “aguaje”, es ampliamente consumido como alimento. Se ha reportado que la cosecha insostenible de este recurso impacta negativamente en su producción futura, así como en el rol ecosistémico que cumplen los aguajales en las turberas amazónicas (Hidalgo Pizango et al., 2022). El fruto es una drupa elíptica cuya cáscara (exocarpio) está compuesta por escamas yuxtapuestas con forma de diamante. Estas son diminutas, duras y de una coloración rojiza oscura (Niranjana, 2020). Debajo de la cáscara se encuentra la pulpa (mesocarpio), caracterizada por una consistencia suave, y un sabor agrio y ligeramente dulce (Villachica, 1996). Según sea su coloración, se pueden reconocer hasta cuatro morfotipos de aguajes: “Shambo”, con una pulpa rojiza; “Color”, con la superficie roja y el resto amarilla; “Amarillo”, cuando la pulpa es únicamente amarillo brillante; y “Posheco”, cuando el color es amarillo pálido (Centro de Conservación Investigación y Manejo de Áreas Naturales, 2012). El endocarpio, es un tejido fibroso, esponjoso y pálido que recubre a una semilla marrón (Del Castillo et al., 2006). La pulpa representa solo un 10-20% de la masa del

fruto, la cáscara un 20%, el endocarpio, 15-30%, y la semilla, 40-45% (Niranjana, 2020). En la Figura 1 se muestran las partes descritas de un fruto del aguaje.



**Figura 1.** Partes del fruto del aguaje, *Mauritia flexuosa* L. f., morfotipo “Amarillo”. **A.** Frutos maduros con cáscara. **B.** Frutos con la pulpa expuesta tras el pelado. **C.** Cáscara extraída sin lavar. **D.** Semillas con y sin el endocarpio (recubrimiento fibroso pálido). (Fotografías propias).

### 1.1.2. Composición nutricional del fruto

La pulpa del aguaje es la parte del fruto que se consume usualmente; por lo que gran parte de la literatura científica acerca del aguaje se ha enfocado en esta. Prueba de ello, la Tabla 1 resume la cantidad de publicaciones referentes a cada parte del aguaje dentro de las principales bases de datos y motores de búsquedas internacionales. Estos resultados se obtienen al incluir descriptores del fruto (“buriti”, “aguaje”, “moriche” o “*mauritia flexuosa*”), junto con el nombre de las partes en inglés (“peel”, “shell” o “exocarp”) en los títulos de las publicaciones. La estructura lógica de las búsquedas fue, en el caso de la cáscara: (buriti OR mauritia OR aguaje OR moriche) AND (peel OR exocarp OR shell). En algunos títulos es posible encontrar el nombre de “by-products” para referirse a estudios nutricionales y metabolómicos sobre las partes que no incluyen a la pulpa *per se*. De esta manera, es evidente que, en todas estas plataformas, la cantidad de investigaciones que incluyen a la cáscara, endocarpio y semilla son menores que en el caso de la pulpa solamente. En su mayoría, las publicaciones referentes a los subproductos son recientes (de 2014 en adelante). Esto demostraría que existe un interés emergente por estudiar los residuos del aguaje, a fin de entender qué potenciales usos se les podría adjudicar.

Según la Tabla 2, la pulpa aporta una importante cantidad de calorías. Además, concentra la mayor cantidad de agua del fruto y es rica en lípidos. La cáscara, el endocarpio y la semilla se

destacan por un gran contenido de carbohidratos, distribuidos parcialmente en forma de fibra dietética. En promedio, la cáscara tendría un mayor aporte de este nutriente, seguido del endocarpio y la semilla. Es menester precisar que estos valores varían debido a los diferentes cultivares y morfotipos, los cuales no suelen ser detallados en los estudios correspondientes (Niranjana, 2020). Se sabe que esta variabilidad de los frutos es consecuencia de los diferentes grados de estrés abiótico de los biomas en los que se desarrollan los aguajes (Cândido et al., 2015; Pereira-Freire et al., 2016)

**Tabla 1.** Publicaciones internacionales sobre el fruto del aguaje.

Base de datos/ motor de búsqueda	Número de resultados*				
	Pulpa	Cáscara	Endocarpio	Semilla	Subproductos
Scopus	20	7	3	17	7
Web of Science	15	6	2	15	5
EBSCO Host	12	4	2	11	8
Science Direct	5	2	0	3	2
Google Académico	49	12	5	20	8

\*: La búsqueda avanzada se realizó en febrero de 2024. El criterio para la contabilización fue la aparición del nombre de la parte del fruto en el título de los trabajos en las principales bases de datos y motores de búsqueda.

**Tabla 2.** Composición nutricional del fruto del aguaje.

Parámetro*	Pulpa <sup>a</sup>	Cáscara <sup>b</sup>	Endocarpio <sup>b</sup>	Semilla <sup>c</sup>
Energía (kcal)	592.0-1006.0	377.8-435.8	418.3-437.0	400.1
Humedad (g)	64.5-74.5	3.3-3.4	5.2-5.6	8.3
Fibra dietética (g)	5.89-22.8	50.5-71.8	28.1-64.2	13.4
Proteínas (g)	1.8-3.7	2.16-4.13	2.7-4.8	13.4
Carbohidratos (g)	7.28-36.3	77.5-84.8	73.8-74.2	72.5
Lípidos (g)	10.5-45.7	3.3-12.1	11.5-14.0	0.6
Cenizas (g)	2.1-3.0	6.3	3.6	1.4

\* Los valores corresponden a los promedios (por 100 g en base fresca). Se omiten las desviaciones estándares.

a. (Niranjana, 2020)

b. (Cardoso et al., 2020; Pereira-Freire et al., 2022)

c. (Escriche et al., 1999)

El atractivo alimentario de la pulpa, en relación con su amplio consumo en la Amazonía, podría explicarse por el perfil de su contenido lipídico. Es sabido que la palatabilidad de los alimentos es influenciada por el contenido de ciertos ácidos grasos, los cuales pueden estimular el sistema hormonal que regula el apetito (Anguah et al., 2017; Erlanson-Albertsson, 2010). El aceite de

la pulpa del aguaje contiene un 75.7% de ácido oleico (omega 9), 18.9% de ácido palmítico y el resto de ácidos grasos esenciales como el linolénico y araquidónico (omega 6) (Pereira-Freire et al., 2016). El alto contenido de grasas mono- y poliinsaturadas (*ca.* 79% versus 21% saturadas de los lípidos totales, (Cândido & Silva, 2017)) hacen que el aceite de aguaje sea apreciado por la industria nutracéutica, puesto que estos tipos de ácidos grasos están asociados con la prevención de enfermedades cardiovasculares (Niranjana, 2020; Pereira-Freire et al., 2016). La presencia de tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides en el aceite de aguaje contribuye a sus potenciales beneficios en la salud, debido a que son metabolitos secundarios conocidos por sus propiedades bioactivas antioxidantes y antiinflamatorias (Instituto Tecnológico de la Producción, 2018; Niranjana, 2020). La Tabla 3 resume los principales compuestos bioactivos encontrados en la pulpa, según la revisión de Pereira-Freire et al. (2016) acerca de las propiedades nutricionales y actividades farmacológicas reportadas para esta parte del fruto. Se destaca el contenido de carotenoides y tocoferoles ya que son metabolitos provitamina A (Rodrigues et al., 2018).

**Tabla 3.** Principales compuestos bioactivos de la pulpa de aguaje.

Compuestos	Constituyentes
Carotenoides	$\beta$ -caroteno, $\alpha$ -caroteno, luteína, <i>cis</i> - $\gamma$ -caroteno, <i>trans</i> - $\gamma$ -caroteno, <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno, <i>cis</i> - $\delta$ -caroteno, <i>all trans</i> - $\beta$ -caroteno y 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno.
Tocoferoles	$\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -tocoferol, $\delta$ -tocoferol y $\gamma$ -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, (-)-epicatequina, 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, $\beta$ -sitosterol, campesterol y stigmastan-3,5-dieno.

### 1.1.3. Aprovechamiento del fruto

El aguaje es aprovechado tanto a escala urbano-local, como industrialmente. En la Amazonía peruana, la pulpa del aguaje es ingerida de forma directa, junto con sal o azúcar, como un aperitivo. También, es consumido en bebidas o postres como mermeladas y helados (Del Castillo et al., 2006; Díaz et al., 2015; Navarro, 2006). A escala industrial, se formulan productos alimenticios y cosméticos con potenciales beneficios a la salud humana a partir de

la pulpa. Por ejemplo, se seca o liofiliza para preparar harinas, o se prensa para la extracción del aceite para cocinar o formular lociones, jabones y cremas para el cuidado de la piel (Rodrigues et al., 2018; Smith, 2015). Diversas empresas peruanas como Inkanatura World Perú Export SAC, Madre Nature® y Rainforest Pharmacy® (Instituto Tecnológico de la Producción, 2018), y otras internacionales como Natura®, Nutriphitos Cosméticos® y Pharmakos da Amazônia® (Smith, 2015) elaboran y comercializan estos productos.

Como resultado de la demanda en el mercado, el aguaje es un cultivo permanente en el Perú. Se han registrado más de 5000 hectáreas de aguajales en el territorio peruano y la venta de sus frutos representa el 15-22% de los ingresos familiares (Albujar, 2018; Hidalgo Pizango et al., 2022). Según el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), en los años 2015, 2016, 2017 y 2018 (Albujar, 2018, 2019; Sifuentes et al., 2017), (no se encontró información en adelante), la producción y precio de los frutos de *M. flexuosa* L. f. tuvieron un aumento importante (Tabla 4). Las principales regiones productoras son San Martín y Loreto, donde se estima que diariamente se consumen alrededor de 20 toneladas de frutos, abasteciendo a una población de más de 400 000 habitantes en Loreto (Smith, 2015).

**Tabla 4.** Producción, superficie de cosecha y precio en chacra del aguaje en Perú.

<b>Año</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Superficie (ha)</b>	<b>Precio en chacra (S/. /kg)</b>
2015	61804	5090	0.385
2016	63243	5094	0.421
2017	65559	5213	0.460
2018	64543	5025	0.520

Los datos fueron obtenidos del Sistema Integral de Estadísticas Agrarias del MINAGRI (Perú).

Al aprovechamiento en los sectores alimentario y cosmético se suman otras potenciales aplicaciones del aceite de la pulpa de aguaje. Por ejemplo, se ha usado para sintetizar nanopartículas metálicas con aplicaciones metalúrgicas (De Souza et al., 2020), así como para la elaboración de biodiesel (Pereira et al., 2017). Frente a este panorama, existen esfuerzos del Estado peruano para continuar mejorando el cultivo y comercialización del aguaje. En efecto, actualmente, el Gobierno Regional de Loreto viene ejecutando el proyecto N°. 2459816 “Aguaje-Loreto”(Gobierno Regional de Loreto, 2020), en el que se busca mejorar el uso sostenible de los aguajales y formalizar la cadena productiva de los frutos.

Como consecuencia de este patrón de aprovechamiento, la cáscara, el endocarpio y la semilla suelen ser desechados. La acumulación de estos residuos representa un factor negativo tanto a

nivel ambiental como económico para las empresas. Por ejemplo, en Brasil, durante el 2018, se produjeron 2500 toneladas de cáscaras, mientras que, entre semillas y salvado de pulpa, *ca.* 6000 toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018). En contraste, el Perú no dispone de registros sobre la generación de dichos residuos, pero se puede sugerir que las cáscaras, junto con los endocarpios y semillas, también corresponderían a un importante porcentaje de los residuos generados por el aprovechamiento de los frutos.

En comparación con la cáscara, se conocen diferentes maneras de aprovechar la semilla. Los lugareños la usan para la fabricación de artesanías (Centro de Conservación Investigación y Manejo de Áreas Naturales, 2012; Del Castillo et al., 2006). Además, se emplean en la industria farmacéutica para la elaboración de productos a base de crema a partir del aceite extraído, pero en menor proporción que la pulpa (Rodrigues et al., 2018). También se ha reportado la obtención de carbón activado para la limpieza de aguas contaminadas (Ruiz & Orbegoso, 2019; Zamora, 2010) y la fabricación de “carbón ecológico” mediante la mezcla de semillas con fibra de coco y otros residuos de biomasa. La marca “Ecocarbón®” comercializa este producto como una alternativa sostenible frente al carbón vegetal en la región San Martín, Perú (Capital, 2018). Tal aprovechamiento se justifica porque la semilla tiene un alto contenido de materia volátil, permitiendo así una temperatura baja de ignición, muy conveniente para la combustión y procesos de pirólisis de biomasa (Araujo et al., 2022). Esta capacidad para la generación de energía también ha sido estudiada con el endocarpio, debido a su alto contenido de holocelulosa y lignina (Guimarães et al., 2021).

## **1.2. Caracterización química de cáscaras de frutos**

Al igual que el aguaje, típicamente, muchos frutos exóticos pasan por un proceso de separación de la pulpa del resto de sus partes para ser aprovechados. La masa de las cáscaras y semillas, como principales subproductos, suelen aproximarse o exceder a lo que corresponde al producto de valor del fruto (Ayala-Zavala et al., 2011). En tal caso, existe el consenso de que el desarrollo de una mayor valoración en el uso de estos residuos podría mejorar la economía del procesamiento de los frutos. Por ejemplo, varias investigaciones y patentes demuestran que estas matrices vegetales podrían ser empleadas como fuentes de compuestos nutraceuticos, ya sean como aditivos funcionales y suplementos alimentarios, o en la formulación de cosméticos (Ayala-Zavala et al., 2011). Estos compuestos son precisamente metabolitos secundarios que emplea la planta para sobrevivir, protegerse e interactuar con el ambiente (Nurdalilah et al., 2018). Así, muchas de estas sustancias han mostrado propiedades bioactivas beneficiosas para

la salud como actividad antioxidante, efectos antimicrobianos, capacidad antiinflamatoria y propiedades antiplaquetarias, útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Ayala-Zavala et al., 2011; Morais et al., 2015; Pan et al., 2007). Se destacan los compuestos fenólicos, vitamina C, tocoferoles y carotenoides, además del gran contenido de fibra dietética en los subproductos agroindustriales.

### **1.2.1. Compuestos fenólicos**

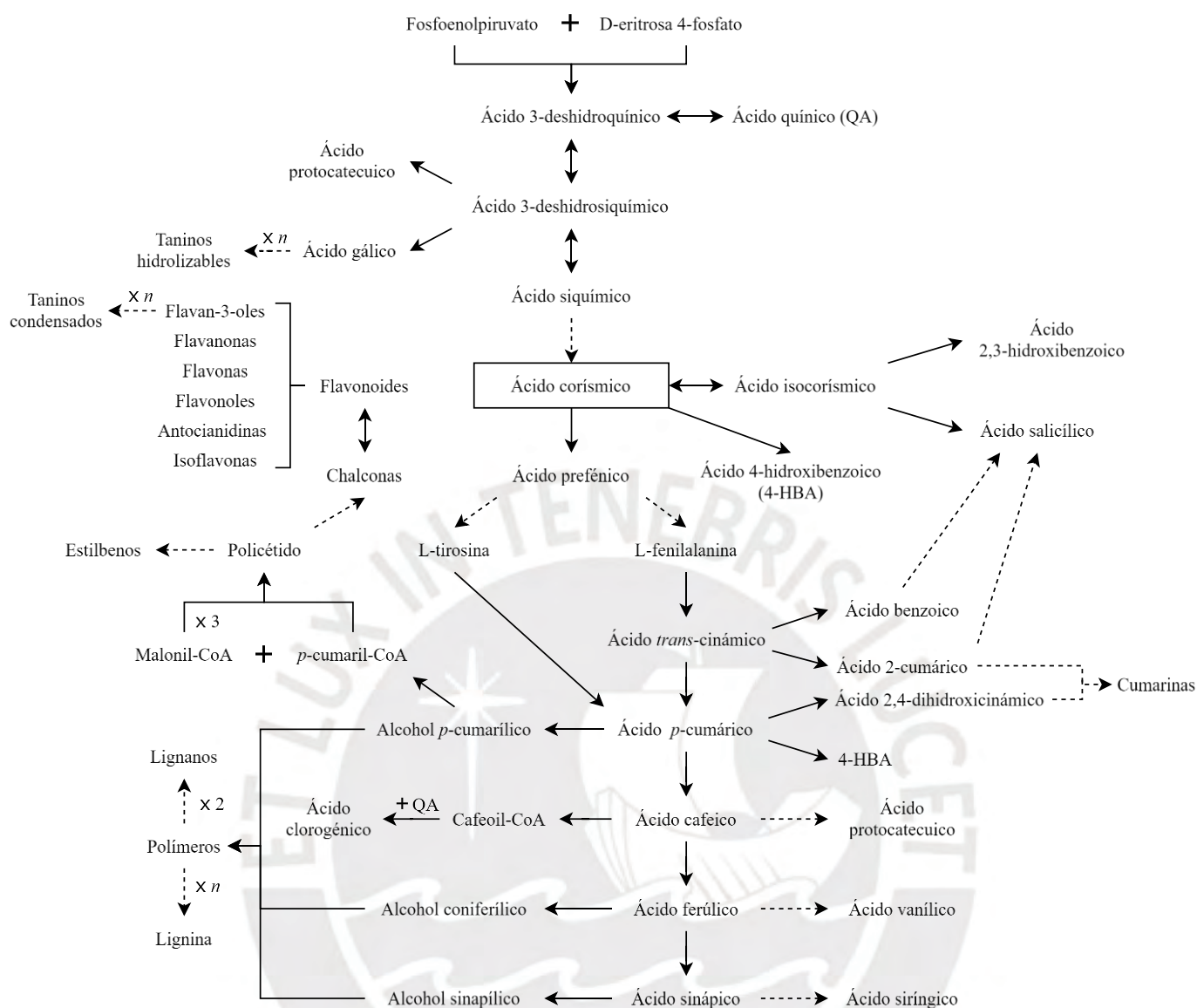
Los compuestos fenólicos forman un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios sintetizados por plantas superiores. Reciben la denominación “fénolicos” por la presencia de grupos fenol en su estructura química (Handique & Baruah, 2002). En los sistemas vegetales, cumplen funciones suplementarias para el ciclo de vida de las plantas, con roles protectores, alelopáticos y estructurales (Allaith, 2019). Por ejemplo, la presencia de anillos aromáticos acoplados permite la absorción de la radiación UV peligrosa, evitando así la fotodegradación en los cloroplastos (Sanches et al., 2020). Además, son potentes antioxidantes, por lo que pueden evitar la proliferación de radicales libres; esto es importante ya que previenen el daño oxidativo en biomoléculas del metabolismo primario (Ayala-Zavala et al., 2011) También participan en la coloración de las plantas gracias a los sistemas conjugados de sus esqueletos bencénicos, permitiendo atraer polinizadores o ahuyentar a especies depredadoras (Dewick, 2009). En adición, algunos fenólicos son constituyentes monoméricos de la lignina, un biopolímero que otorga firmeza a los tejidos de soporte (Dewick, 2009). Se sabe también que pueden unirse a la pared celular, facilitando su conexión, mediante interacciones intermoleculares, mejorando la rigidez, y funcionalizando estas matrices con propiedades antibacteriales, antifúngicas y antioxidantes (B. Zhang et al., 2020).

Los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiados ya que forman parte integral de una dieta humana saludable. Se conoce que algunas clases de fenólicos presentan acción anticancerígena, antidiabética, neuroprotectora, antimicrobiana y preventiva contra enfermedades cardiovasculares (CVD) (Ayala-Zavala et al., 2011; Handique & Baruah, 2002; Robbins, 2003; Sanches et al., 2020). Estas se sustentan principal pero no únicamente en su fuerte capacidad antioxidante. Por ejemplo, la actividad reductora para CVD podría estar relacionada a la reducción de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, ya que previenen la disfunción endotelial, la agregación y adhesión plaquetaria y la proliferación u migración de las células musculares lisas (Sanches et al., 2020).

Los compuestos fenólicos se clasifican esencialmente en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, cumarinas y taninos (Dewick, 2009; Nicolás-García et al., 2021). Biosintéticamente, los compuestos fenólicos son producidos en la ruta del siquimato, donde el intermediario principal es el ácido siquímico, sintetizado a partir de la condensación aldólica entre el fosfoenolpiruvato (proveniente de la glucólisis) y la D-eritrosa 4-fostafo (proveniente del ciclo de la pentosa fosfato o la fotosíntesis) (Dewick, 2009; Robbins, 2003). El ácido siquímico se convierte luego en ácido corísmico, precursor de L-fenilalanina y L-tirosina. Los esqueletos de carbono de ambos aminoácidos forman las unidades fenilpropilos ( $C_6C_3$ ) que dan origen a la vasta variedad estructural de los fenólicos (Dewick, 2009) (Figura 2).

#### 1.2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un grupo funcional carboxilo en el esqueleto fenol. Dentro de estos, se pueden diferenciar ácidos hidroxicinámicos, con una columna vertebral fenilpropilo ( $C_6C_3$ ), y ácidos hidroxibenzoicos, con una estructura base fenilmetilo ( $C_6C_1$ ) (Robbins, 2003). La Figura 3 muestra las estructuras químicas de los principales ácidos fenólicos en plantas. Los más simples como el ácido protocatecuico y gálico se obtienen por reacciones *branchpoint* a partir del ácido 3-desihidrosiquímico (Figura 3). Particularmente, el ácido gálico es susceptible de formar ésteres con polialcoholes, típicamente glucosa, dando lugar a los galotaninos (Álvarez & Lock, 1992). Los sustituyentes galoilos de estos compuestos pueden sufrir oxidaciones, generando radicales que, posteriormente, pueden acoplarse y producir elagitaninos. Tanto los elagitaninos como los galotaninos son denominados taninos hidrolizables (Arapitsas, 2012). Otros ácidos hidroxibenzoicos como el ácido 2,3-hidroxibenzoico y el ácido salicílico pueden formarse a partir del ácido isocorísmico. Asimismo, el ácido 4-hidroxibenzoico puede formarse fácilmente del ácido corísmico. (Dewick, 2009; Mustafa & Verpoorte, 2007).




**Figura 2.** Ruta del siquimato de los compuestos fenólicos en plantas. Las líneas punteadas indican múltiples reacciones. (Adaptado de Mustafa et al. (2007) y Dewick (2009)).

Por otra parte, la eliminación del amoníaco de L-fenilalanina y L-tirosina por acción de liasas genera ácido *trans*-cinámico y *p*-cumárico, respectivamente; sin embargo, este último también es posible de obtenerse a través de la hidroxilación del primero. Posteriores metilaciones e hidroxilaciones mediadas por metiltransferasas e hidroxilasas dan origen al resto de ácidos hidroxicinámicos como ácido cafeico, ferúlico y sinápico. Los ácidos hidroxicinámicos también son puntos de partida para generar ácidos hidroxibenzoicos, mediante la escisión de la cadena lateral por el doble enlace. De esta manera, el ácido *trans*-cinámico es un precursor del ácido benzoico, el *p*-cumárico del 4-hidroxibenzoico, el cafeico del protocatecuico, el ferúlico del vanílico, y el sinápico del siríngico. El ácido salicílico también puede formarse usando

como precursor al ácido 2-cumárico o al ácido benzoico. El ácido 2-cumárico y 2,4-dihidroxicinámico pueden continuar reaccionando y dar origen a cumarinas (Dewick, 2009; Mustafa & Verpoorte, 2007).

Los ácidos hidroxicinámicos pueden reducirse a alcoholes mediante reductasas dependientes de Coenzima A (CoA). El alcohol *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico se obtienen a partir del ácido *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, respectivamente. Los acoplamientos oxidativos de estos dan origen a dímeros denominados lignanos, y múltiples reacciones de este tipo permiten formar lignina, un biopolímero de refuerzo para la pared celular de las plantas (Dewick, 2009).

Los ácidos fenólicos pueden formar conjugados con otras moléculas orgánicas en las plantas. La esterificación del ácido cafeico con el ácido quínico, vía formación del cafeoil-CoA, da origen al ácido clorogénico (Robbins, 2003). Así mismo, el *p*-cumaril-CoA puede reaccionar con el ácido 4-hidroxifenil-láctico para generar ácido rosmarínico, mientras que la posterior combinación del glucósido del ácido sinápico (1-*O*-sinapoilglucosa) da lugar a la sinapina, otro éster (Dewick, 2009). La migración de los fenólicos hacia la matriz de la pared celular permite su unión a proteínas estructurales, celulosa y pectinas, mediante enlaces éster, éter, e incluso carbono-carbono, formando parte de los denominados fenólicos ligados insolubles (*insoluble-bound phenolics*) (B. Zhang et al., 2020).



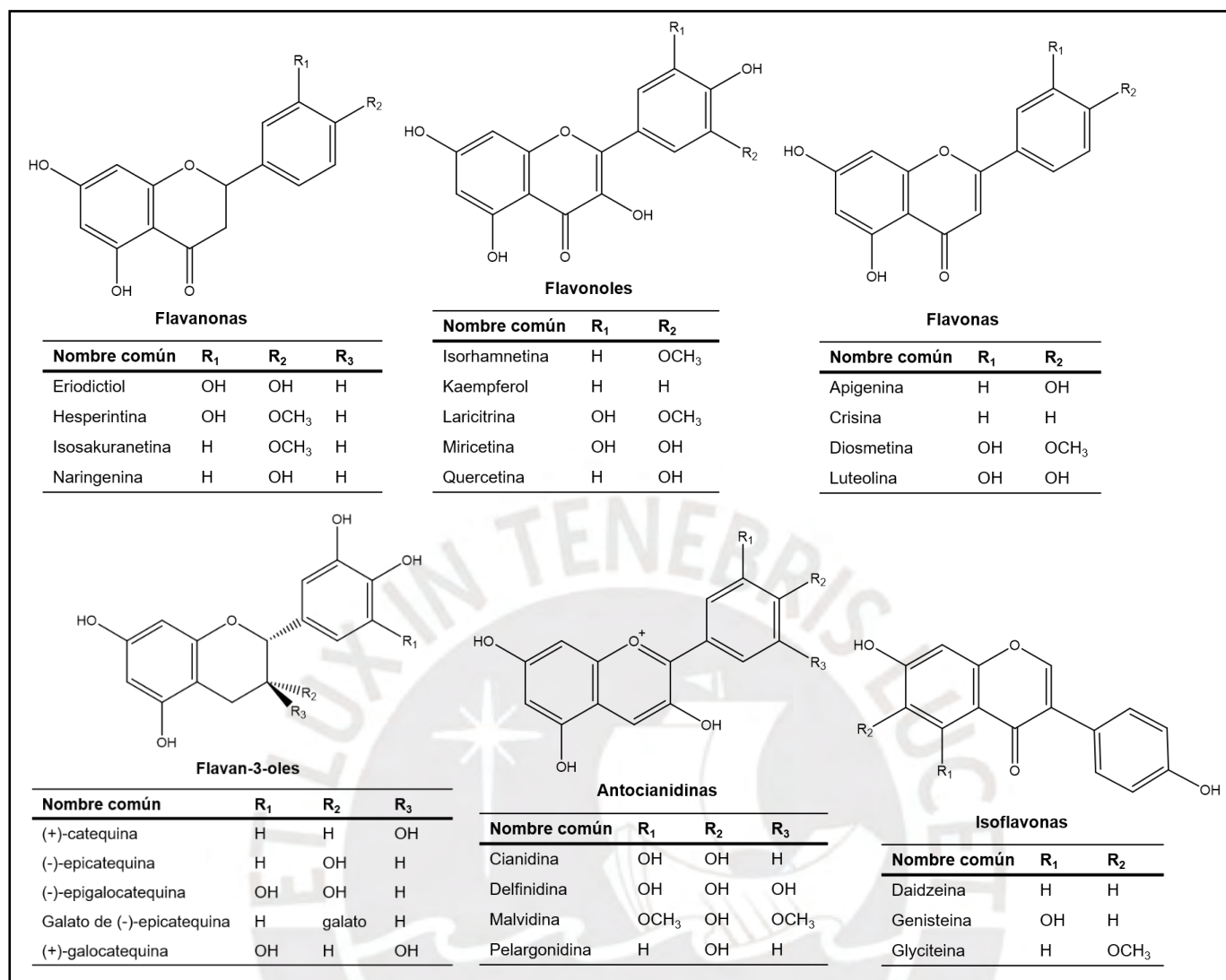
Ácidos hidroxibenzoicos					Ácido hidroxicinámicos					
Nombre común	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Nombre común	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	OH	OH	H	H	Ácido cafeico	H	H	OH	OH	H
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	OH	H	OH	H	Ácido 2-cumárico	OH	H	H	H	H
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	H	OH	OH	H	Ácido 2,4-dihidroxicinámico	OH	H	OH	H	H
Ácido 4-hidroxibenzoico	H	H	OH	H	Ácido clorogénico	H	quinato	H	OH	OH
Ácido benzoico	H	H	H	H	Ácido <i>trans</i> -cinnámico	H	H	H	H	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH	Ácido ferúlico	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ácido protocatecuico	H	H	OH	OH	Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	H	OH	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H	Ácido sinápico	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido siríngico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>						
Ácido vanílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H						

**Figura 3.** Estructura química de los principales ácidos fenólicos en plantas.

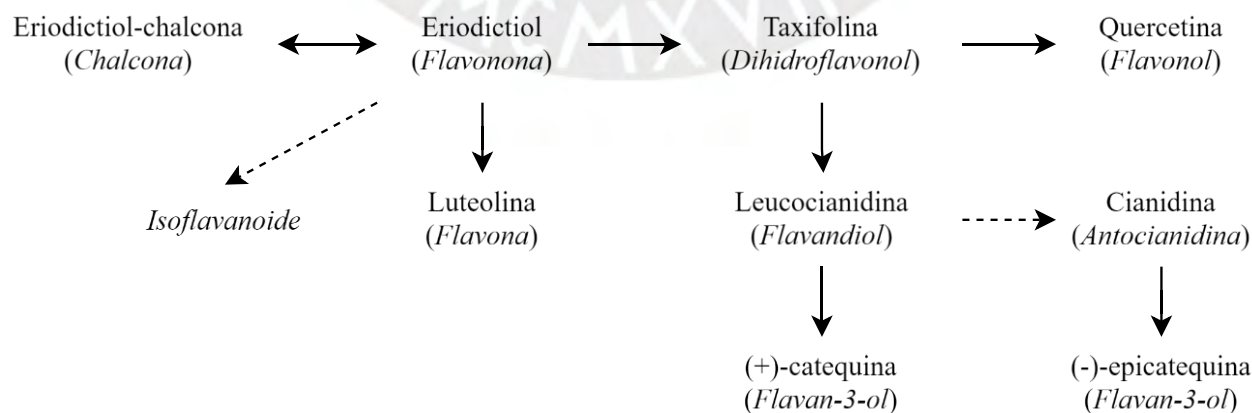
### 1.2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por tener un núcleo flavan, el cual está compuesto por tres anillos: dos bencénicos (A y B) y un pirano (C) en el medio de los dos. Su gran variedad se debe a las sustituciones con hidroxilos, así como la posición del anillo B (Cook & Samman, 1996; Pietta, 2000). Al igual que los estilbenos, tienen su origen biosintético en la unidad iniciadora *p*-cumaril-CoA con una extensión de cadena integrando tres moléculas de malonil-CoA (Figura 3). Las reacciones tipo Claisen generan anillos aromáticos a partir de la cadena lateral del policétido formado, dando lugar a chalconas, precursores de los flavonoides. Las flavanonas son producidas inicialmente y pueden experimentar reacciones oxidativas para dar origen a flavonas o dihidroflavonoles. De estos últimos se pueden obtener flavonoles, flavan-3-oles y antocianinas, en una secuencia de reacciones redox (Dewick, 2009). En la isoflavonas, el anillo bencénico, unido por un enlace C-C, ha migrado al carbono adyacente del pirano (Cook & Samman, 1996; Dewick, 2009). La Figura 4 muestra algunas estructuras químicas de los principales flavonoides presentes en sistemas vegetales, mientras que la Figura 5 muestra la ruta de conversión del eridictiol en las diferentes variantes de los flavonoides derivados.

Una alta proporción de flavonoides están presentes naturalmente como glucósidos solubles (Sanches et al., 2020). Los conjugados de este tipo contienen carbohidratos como D-glucosa, L-ramnosa, glucoramnosa, galactosa y arabinosa (Cook & Samman, 1996). No obstante, los flavonoides también pueden formar ésteres con otros compuestos; por ejemplo, la (-)-epicatequina galato se produce a partir de la condensación entre (-)-epicatequina (flavonoide) y ácido gálico (ácido fenólico). Estos conjugados fenólicos se acumulan en las plantas en respuestas de ciertos estresores abióticos (Sanches et al., 2020).



**Figura 4.** Estructura química de los principales flavonoides en plantas.



**Figura 5.** Ruta de conversión del eriodictiol en sus flavonoides derivados. Las líneas punteadas indican múltiples reacciones. (Adaptado de Dewick, 2009).

### 1.2.2. Fibra dietética, compuestos fenólicos y microbiota intestinal

Los subproductos agroindustriales tales como las cáscaras y las semillas suelen ser ricos en fibra dietética. Estos, mediante un adecuado procesamiento, pueden convertirse en aditivos que impliquen beneficios económicos a la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a las propiedades funcionales de la fibra dietética en relación a la salud humana y a la modificación de las características fisicoquímicas de los productos (Ayala-Zavala et al., 2011).

La definición más reciente y aceptada es la elaborada a través del Comité del CODEX sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales (CCNFSDU de la FAO), desde el 2009. CODEX define a la fibra dietética como un conjunto de polímeros de carbohidratos con diez o más unidades monoméricas, los cuales no son hidrolizados por las enzimas endógenas del intestino delgado humano. Estos compuestos pueden corresponder a polímeros de carbohidratos obtenidos del material alimentario crudo, mediante medios físicos, enzimáticos o químicos, y que han mostrado efectos fisiológicos en beneficio de la salud, y a polímeros de carbohidratos sintéticos (*e. g.*, añadidos a los alimentos) que también hayan demostrado efectos positivos a la salud (AOAC, 2012). La fibra dietética total (TDF) de un alimento puede dividirse en fibra dietética insoluble (IDF), fracción que no puede disolverse o precipita en agua, y soluble (SDF), fracción que puede mantenerse soluble en ésta, pero que puede precipitar en alcohol. Los componentes principales de la IDF son la celulosa, incluyendo la celulosa microcristalina y en polvo agregada, la lignina, la hemicelulosa insoluble, la hemicelulosa soluble atrapada en matrices lignocelulósicas, y el almidón resistente. Por otra parte, la SDF integra a las hemicelulosas solubles no atrapadas en matrices lignocelulósicas, las pectinas nativas, los hidrocoloides y los oligosacáridos no digeribles, como derivados de la inulina (fructooligosacáridos) (Nielsen, 2017; Vaclavik & Christian, 2008).

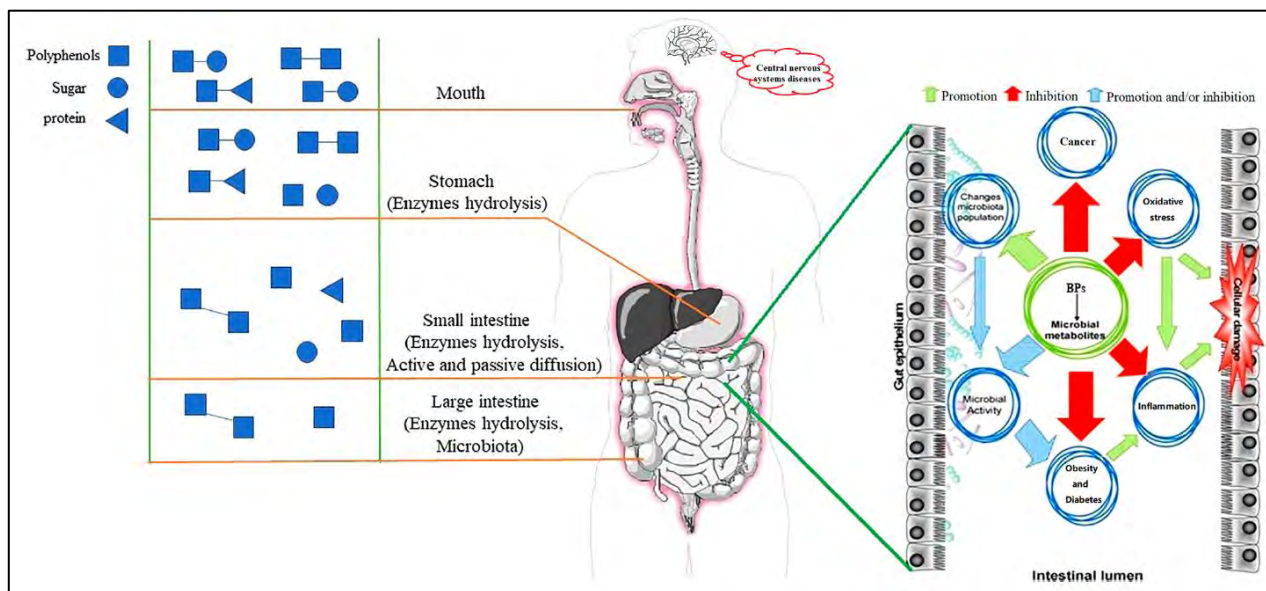
El consumo de fibra dietética está inexorablemente asociado a la microbiota intestinal humana y genera efectos positivos en la salud con relación a la reducción de la inflamación (Fu et al., 2022). Se sabe que un régimen nutricional alto en fibra modula la composición y funcionamiento de las comunidades microbianas del colon, dando lugar a cambios fisiopatológicos en el hospedero (F. Zhang et al., 2022). Las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) son uno de los taxones que aumentan consistentemente en el organismo tras el consumo de alimentos ricos en fibra dietética (F. Zhang et al., 2022). Así, la reducción en el consumo de fibra dietética ha contribuido a la epidemia global de obesidad, diabetes tipo 2 y otros desordenes metabólicos y enfermedades crónicas (Fu et al., 2022).

Recientemente, se ha encontrado que gran parte de los fenólicos en frutos, vegetales y cereales están unidos covalentemente a la pared celular en los materiales vegetales ricos en fibra dietética. Estos conjugados no pueden ser hidrolizados fácilmente en el intestino delgado, por lo que los fenólicos son liberados por las enzimas hidrolíticas de la microbiota intestinal. Los fenólicos no absorbidos y sus derivados en el colon han mostrado propiedades “prebióticas” sinérgicas a las actividades modulatorias conocidas de la fibra dietética. La ingesta de estos conjugados podría influir selectivamente en el perfil microbiano del colon y regular la salud del hospedero gracias a sus efectos preventivos contra el daño oxidativo y la inflamación (Loo et al., 2020; Martínez et al., 2017; Mithul Aravind et al., 2021; Rodríguez-Daza et al., 2021).

Por ejemplo, un estudio en células Caco-2 ha revelado que los fenólicos insolubles ligados de las cáscaras de *Citrus maxima*, ricas en (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido clorogénico, cafeico y elágico, rutina, quercitrina y quercetina, pueden inhibir la actividad de la hidroximetilglutarilo-CoA (HMG-CoA), mientras se incrementan las actividades de glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Esto sugiere que tales fenólicos podrían apoyar en la protección del colon contra la degeneración oxidativa, pues se ha visto que la inhibición de la HMG-CoA es clave para el control de la hipercolesterolemia, una condición asociada al estrés oxidativo en tejidos de ratas (Ademosun et al., 2017). También se ha reportado que los oligosacáridos feruloilados del salvado de maíz fueron más efectivos en la protección contra el estrés oxidativo que lo visto para el ácido ferúlico libre, al mostrar una mayor capacidad de barrido de radicales libres para mitigar el daño por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC 12, una línea celular de feocromocitoma de ratas muy usada para evaluar fármacos neuroprotectores (Yao et al., 2014).

Así mismo, se ha reportado una importante cantidad de taninos condensados, proantocianidinas oligoméricas y flavan-3-oles en la cáscara y la pepa de nueces, los cuales mostraron efectos prebióticos y actividades antimicrobianas contra bacterias patogénicas en el intestino (Mithul Aravind et al., 2021). Se encontró también que las proantocianidinas de las uvas están asociadas al crecimiento de la especie *Akkermansia muciniphila* y a la regulación de sus actividades metabólicas. Esta especie ha demostrado apoyar a la salud del colon contraviniendo la inflamación intestinal y la diabetes tipo 2 en estudios *in vivo* (Tomás-Barberán & Espín, 2019). Adicionalmente, se ha visto que las bacterias probióticas como *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus* pueden expresar enzimas capaces de metabolizar taninos (e. g., tanasas y galato descarboxilasas) para la obtención de fenólicos involucrados en el metabolismo de la glucosa y, por ende, con efectos en el desarrollo y tratamiento de la obesidad (Sugizaki & Naves, 2018; Ueda et al., 2014). Se han reportado otros efectos de los

fenólicos libres y conjugados en relación a la quimioprotección, hepatoprotección, antidiabetes, antiobesidad y antiinflamación (Manach et al., 2004; Mithul Aravind et al., 2021; Shahidi & Yeo, 2016; Z. Wang et al., 2020; B. Zhang et al., 2020). Finalmente, la Figura 6 resume la ruta digestiva de los fenólicos conjugados hasta su llegada al colon, desde donde despliegan sus propiedades beneficiosas reportadas.



**Figura 6.** Proceso digestivo de los fenólicos conjugados en el organismo humano. Se destacan sus propiedades beneficiosas para salud. (Tomado de Wang et al. (2020)).

### 1.2.3. Antecedentes de estudios en la cáscara de aguaje

En la última década, se han publicado contados artículos en relación a la cáscara de aguaje, principalmente de frutos provenientes de Brasil. Uno de los primeros corresponde al de Tauchen et al. (2016), en el que los extractos metanólicos de la pulpa y cáscara de aguaje, obtenidos mediante Soxhlet, se analizaron por UHPLC-MS/MS y se evaluaron sus actividades antioxidantes y antiproliferativas (Tauchen et al., 2016) Pereira-Freire et al. (2018) obtuvieron extractos metanólicos de la cáscara, semilla y pulpa, por maceración y llevaron a cabo los análisis de los compuestos por HPLC-DAD, corroborando la presencia de algunos flavonoides.

En el 2019, el equipo de Resende et al. evaluó las harinas de los subproductos del aguaje, referidos al salvado de la pulpa, cáscaras y semillas. En este estudio, se realizaron ensayos espectrofotométricos para la determinación del contenido total de fenólicos, proantocianidinas no extraíbles y carotenoides, y se analizó la capacidad antioxidante mediante ensayos FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y DPPH (capacidad de eliminación de radicales 2,2-

difenil-1-picrilhidrazilo) (Resende et al., 2019). Se concluyó que las harinas de la cáscara y el salvado de pulpa presentan un alto contenido de fenólicos extraíbles y no extraíbles con una importante capacidad antioxidante. Rudke et al. (2019) optimizaron un método de extracción verde para la cáscara de aguaje y lo compararon con el método Soxhlet llevado a cabo por Tauchen et al. (2016). Este procedimiento consistió en una extracción líquida presurizada (PLE) usando etanol en vez de metanol. Dichos extractos se analizaron por HPLC-ESI-MS/MS y se lograron identificar, además de algunos flavonoides mayoritarios ya reportados, siete nuevos compuestos fenólicos con relación al aguaje. Aunque la extracción empleada en este estudio fue más rápida y ecoamigable, no se obtuvo un alto rendimiento de extracción.

En 2021, Rudke et al. compararon la extracción por UAE, Soxhlet y PLE y reportaron que la UAE con etanol acuoso permitió una mayor extracción de fenólicos totales y una mayor capacidad antioxidante (ABTS, capacidad de eliminación de radicales del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). En la Tabla 5 se hace un resumen de estos trabajos, destacando los compuestos fenólicos identificados.

De acuerdo a lo anterior, según los alcances de esta investigación, escasos estudios han analizado el contenido de fenólicos en las cáscaras de aguajes peruanos. Dentro de los trabajos recientes, se ha visto que el enfoque común es la extracción directa de los fenólicos; sin embargo, tal como se describió, muchos de estos estarían más bien en formas conjugadas, tanto solubles como insolubles, requiriendo así tratamientos hidrolíticos para su liberación. Asimismo, no se han encontrado estudios en los que se contraste el contenido de los metabolitos secundarios de esta parte del fruto entre sus diferentes morfotipos. En este sentido, el presente trabajo apunta a complementar el perfil metabolómico de este subproducto y producir un primer análisis comparativo entre morfotipos, integrando un abordaje de hidrólisis secuencial que permita obtener una imagen más completa de los compuestos fenólicos presentes en el exocarpio de este fruto amazónico. Así, se buscará responder a la pregunta de investigación: ¿cómo es el contenido de compuestos fenólicos libres, conjugados e insolubles que podría contribuir al uso de la cáscara de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) como potencial fuente de fibra dietética funcional? Esto constituiría una justificación útil para plantear nuevas interrogantes en relación al probable beneficio que supondrían las cáscaras como fuente de fibra dietética con propiedades antioxidantes, además de la actividad prebiótica ya reportada, para la suplementación humana.

**Tabla 5.** Antecedentes en el análisis de metabolitos secundarios en cáscaras de aguaje.

Autores (año de publicación)	Método de extracción	Técnicas de separación y/o detección	Metabolitos secundarios identificados	Otros estudios
(Tauchen et al., 2016)	Metanol- Soxhlet	UHPLC-ESI- MS/MS	<b>Ácido cafeico, clorogénico, p-cumárico, gálico, salicílico, sinápico, siríngico y vanílicico; apigenina, (-)-epicatequina, hesperetina, kaempferol, luteolina, morina, miricetina, naringenina, quercetina, apigenina-7-glucósido, luteolinia-7-glucósido, naringenina-7-glucósido, quercetina-3-arabinosa, naringina, isoquercetina, rutina, pterostilbeno, resveratrol y ácido anísico.</b>	Actividad antioxidante y antiproliferativa.
(Pereira- Freire et al., 2018)	Metanol- maceración	HPLC-DAD	<b>Ácido protocateuico, quercetina, apigenina y catequina y epicatequina.</b>	Actividad antioxidante.
(Resende et al., 2019)	Metanol y acetona- maceración	Espectrofotometría UV-Visible	-	Actividad antioxidante y contenido total de fenólicos extraíbles, proantocianidinas no extraíbles y carotenoides.
(Rudke et al., 2019)	Etanol- PLE	HPLC-ESI- MS/MS	<b>Ácido cafeico, clorogénico, gálico, protocateuico, salicílico, sinápico, siríngico, vanílicico y p-cumárico; apigenina, catequina, epicatequina, isoquercetina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina, vitexina, resveratrol, elágico*, aromadentrina*, chisina*, hispidulina*, taxifolina*, vanillina* y umbeliferona*.</b>	Actividad antioxidante y contenido total de fenólicos y carotenoides.
(Rudke et al., 2021)	Etanol y metanol- Extracción presurizada líquida (PLE), Soxhlet y UAE		Compuestos identificados en Rudke et al. (2019) + fustina, galangina, isoorientina, pinocembrina; ácido <i>p</i> -aminobenzoico, 4-hidroximetilbenzoico y mandélico.	Actividad antioxidante y contenido total de fenólicos.

Los fenólicos que se identificaron en más de uno de los estudios de cáscaras de los frutos del aguaje se muestran en negrita.

\* Compuestos fenólicos que fueron por primera vez en relación al aguaje.

PLE: extracción presurizada líquida. UAE: extracción asistida por ultrasonido. HPLC o UHPLC-ESI-MS/MS: cromatografía líquida de alta performance o ultra alta performance acoplada a un espectrómetro de masas en tándem con ionización por electrospray.

## 2. Objetivos

### 2.1. General

Analizar el contenido de compuestos fenólicos en la cáscara de tres morfotipos de aguaje (*Mauritia fluexosa* L.f.) provenientes de la región San Martín – Perú como potencial fuente de fibra dietética funcional.

### 2.2. Específicos

- Establecer un protocolo optimizado de extracción total de compuestos fenólicos mediante extracción asistida por ultrasonido a partir de la cáscara blanqueada, liofilizada y desengrasada de aguaje.
- Establecer un protocolo de hidrólisis secuencial para la obtención de fracciones correspondientes a compuestos fenólicos libres y liberados de sus formas esterificados, glicosilados y ligadas insolubles de la cáscara de aguaje.
- Diseñar un método analítico para el estudio cualitativo y cuantitativo de las fracciones hidrolizadas de compuestos fenólicos mediante GC-MS y HPLC-DAD.
- Comparar el contenido total de fenólicos, la capacidad antioxidante y el contenido de fibra dietética soluble e insoluble de la cáscara de los morfotipos de aguaje “Color”, “Amarillo” y “Posheco”.
- Comparar los perfiles de las fracciones hidrolizadas de los compuestos fenólicos en la cáscara de tres morfotipos de aguaje.

### 3. Parte experimental

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material vegetal

Los frutos analizados fueron de los morfotipos “Color”, “Amarillo” y “Posheco” y se obtuvieron gracias al señor Pablo Vera, integrante de la Asociación de palmicultores de Pasamayo – Yantaló, ubicado en el Centro Poblado Pasamayo, del distrito Yantaló, en la provincia Moyobamba, del departamento San Martín, Perú. El acceso a las más de seis hectáreas de aguajales fue posible por medio del ingeniero Santiago Casas Luna, decano de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de San Martín - Moyobamba, y líder del Proyecto de Conservación y Manejo Sostenible del Aguaje (Figura 7).



**Figura 7.** Imágenes del lugar de recolección de los frutos del aguaje. **A.** Señor Pablo Vera, productor de aguajes (izquierda) y el Dr. Santiago Casas Luna (derecha). **B.** Vista de una parte de los aguajales en el Centro Poblado Pasamayo, Yantaló, Moyobamba – San Martín, Perú. (Fotografías propias).

Los ejemplares sanos, inmaduros y con dimensiones similares fueron dispuestos en bolsas de rafia. Cada bolsa contenía *ca.* 30-50 ejemplares por morfotipo. El material fue enviado de Moyobamba a Lima por vía terrestre. Al llegar, los frutos fueron limpiados manualmente para retirar suelo y otros residuos, y se seleccionaron en base a la integridad del exocarpio, *i. e.*, sin la presencia de partes desprendidas. Estos se dejaron madurar a temperatura ambiente (20°C), protegidos de la luz solar, tal como se suele hacer en los poblados donde se comercializan. Los frutos maduros se caracterizan por el desprendimiento de la cáscara al presionar su superficie.

### 3.1.2. Solventes

#### Millipore (Massachusetts, EE. UU.)

- Agua purificada (Milli-Q®, Tipo 1)

#### J. T. Baker (New Jersey, EE. UU.)

- Etanol (grado HPLC)
- Metanol (grado HPLC)
- Acetonitrilo (grado HPLC)
- *n*-hexano (grado PA)
- Acetato de etilo (grado PA)
- Acetona (grado PA)
- Diclorometano (grado HPLC)
- Éter de petróleo 40-60 °C (grado PA)

#### Merck (Darmstadt, Alemania)

- Éter dietílico (grado PA)

### 3.1.3. Reactivos

#### J. T. Baker (New Jersey, EE. UU.)

- Ácido clorhídrico (36.5-38 %)
- Hidróxido de sodio (98.2 %)
- Ácido acético (99.9 %)
- Sulfato de sodio (99 %)

#### Sigma-Aldrich (Missouri, EE. UU.)

- Benzaldehído (99.0%)
- Kit de ensayo de fibra dietética TDF-100A ( $\alpha$ -amilasa termostable de *Bacillus licheniformis*, proteasa de *Bacillus licheniformis*, amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, y Celatom™ lavada con ácido)
- Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (99.5 %)
- Ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- carboxílico (trolox, 97.5 %)
- Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metil-propionamidina (97 %)

- Rojo de pirogalol
- Ácido gálico (> 97.5 %)
- Ácido vanílico (97 %)
- Ácido siríngico ( $\geq$  95 %)
- Ácido sinápico ( $\geq$  98 %)
- Ácido ferúlico (99 %)
- Ácido cafeico ( $\geq$  98 %)
- Ácido *p*-cumárico ( $\geq$  98 %)
- Ácido clorogénico ( $\geq$  95 %)
- Miricetina ( $\geq$  96 %)
- Hidrato de (+)-catequina ( $\geq$  98 %)
- (-)-epicatequina ( $\geq$  90 %)
- Galato de (-)-epicatequina ( $\geq$  95 %)
- Cloruro férrico hexahidratado (98 %)
- N-trimetilsilil-N- metil trifluoroacetamida ( $\geq$  98.5 %)
- Estándar de calibración de alcanos C8-C40

#### Acros Organics (Geel, Bélgica)

- Ácido protocatecuico (97 %)

#### Merck (Darmstadt, Alemania)

- Ácido dietilendiaminotetraacético (> 99 %)
- Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio (> 99.9 %)
- Fosfato monobásico de sodio (> 99 %)
- Extran® MA 01
- Tris(hidroximetil)-aminometano (99.9 %)
- Ácido *trans*-cinámico ( $\geq$  99 %)
- Quercetina ( $\geq$  95 %)

#### Scharlau (Barcelona, España)

- Ácido trifluoroacético (99.5 %)
- Ácido fórmico (> 98 %)

Riedel-deHaën (Seelze, Alemania)

- L(+)-ácido ascórbico (99.9 %)
- Ácido benzoico (99.9 %)

Mallinckrodt (Dublin, Irlanda)

- Fosfato dibásico de sodio (99.5 %)

Alpha Resources (Michigan, EE. UU.)

- Ácido dietilendiaminotetraacético (EDTA, *Certified Reference Material*)
- Ayuda de combustión COM-AID solid (*Combustion Aid*)

**3.1.4. Gases**Linde (Callao, Perú)

- Nitrógeno (grado UHP)
- Helio (grado UHP 5)

**3.1.5. Materiales e instrumentos****3.1.5.1. Materiales**Merck (Darmstadt, Alemania)

- Cartuchos SPE LiChrolut® RP-18 (40-60  $\mu\text{m}$ , 500 mg, 3 mL, polipropileno)
- Cromatofolios de aluminio con sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Kimble Chase (New Jersey, EE. UU.)

- Crisoles Gooch con frita (30 mL, tipo C, 40-60  $\mu\text{m}$ )

Agilent Technologies (California, EE. UU.)

- Columna de HPLC RP-18e LichroCart® (250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
- Columna de GC HP-5 (30 m x 0.320 mm, 0.45  $\mu\text{m}$ )

**3.1.5.2. Instrumentos**Ohaus (Ciudad de México, México)

- Balanza analítica AX224

Labconco (Kansas, EE. UU.)

- Liofilizador Lyph Lock 4.5

IKA-Works Inc. (North Carolina, EE. UU.)

- Agitador vórtex MS1
- Molino analítico Basic A11
- Agitador orbital Basic KS-130

Branson (Wisconsin, EE. UU.)

- Baño de ultrasonido 5800

Bachofer GmbH & Co. KG (Reutlingen, Alemania)

- Centrífuga D-7410

Waters-Millipore (Massachusetts, EE. UU.)

- Sistema de distribución de vacío para SPE “Manifold” Sep Pak Vaccum

Büchi (Flawil, Suiza)

- Evaporador rotatorio Rotavapor® R-110 con baño de calentamiento

Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE. UU.)

- Calentador de bloque seco DryBath Stdrd 4blk 200-240V

Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlín, Alemania)

- Medidor de pH Calimatic 766

**3.1.6. Equipos de análisis**Thermo Electron Corporation (New York, EE. UU.)

- Espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 6

Bio-Tek Instruments, Inc. (Vermont, EE. UU.)

- Lector de microplacas ELx800

LECO Corporation (Michigan, EE. UU.)

- Analizador elemental de C y N CN TruMac Series

Agilent Technologies (California, EE. UU.)

- Cromatógrafo HPLC 1260 Infinity II Vial Sampler con bomba cuaternaria acoplado a un detector DAD (equipado con una lámpara de deuterio y otra de tungsteno).
- Cromatógrafo GC 7890B acoplado con espectrómetro de masas con cuadrupolo Agilent Technologies® 5977B

### 3.1.7. Programas

El registro, visualización y preprocesamiento de los datos se realizó mediante los programas:

- VISIONlite v. 2.1. (Thermo Electron Corporation): para las mediciones espectrofotométricas en el rango UV-Visible con cubetas.
- KC Junior (Bio-Tek Instruments, Inc.): para mediciones espectrofotométricas en el rango visible con microplacas.
- OpenLab CDS ChemStation LC (Agilent Technologies): para el control y revisión de las separaciones cromatográficas por HPLC-DAD.
- MSD ChemStation F.01.00.1903 (Agilent Technologies): para el control y revisión de las separaciones por GC-MS.
- AMDIS v. 2.70: para la visualización y preprocesamiento de las separaciones por GC-MS. Integra la biblioteca NIST 2011 v. 2.0g.
- ChemDraw (PerkinElmer) v. 20.1.1.125: para la representación gráfica de estructuras moleculares.

El procesamiento estadístico de los datos se efectuó mediante el lenguaje de programación R-4.3.1 en el entorno de desarrollo RStudio 1.4.1717. En particular, para las comparaciones de promedios se usó ANOVA y la prueba *post-hoc* de Tukey, usando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Adicionalmente, se usó el software estadístico JMP® Pro 14.0.0 (SAS Institute Inc.) para el análisis del diseño experimental elaborado para el estudio de las condiciones de extracción cruda de las cáscaras.

## 3.2.Métodos

### 3.2.1. Acondicionamiento y pretratamiento de muestras

#### 3.2.1.1. Selección y pelado

Los frutos maduros seleccionados fueron lavados con agua de caño y detergente líquido neutro con ayuda de una esponja suave. Esto se realizó a fin de retirar la mayor cantidad de restos de suciedad adheridos. Luego se enjuagaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente y se eligieron aleatoriamente algunos ejemplares para el registro de sus dimensiones y su masa. El pelado de los frutos consistió en la extracción manual de las cáscaras diminutas con ayuda de una espátula. Durante este proceso se minimizó el arrastre de pulpa.

#### 3.2.1.2. Blanqueo y liofilización

Inmediatamente después, las cáscaras recién separadas fueron blanqueadas mediante un *blanching* del tipo HTST (*High Temperature – Short Time*) (Abu-Ghannam & Jaiswal, 2015). Para ello, se sumergieron en agua Milli-Q® a 75°C y se incubaron por 3 min. Rápidamente, al término de este tiempo, las cáscaras se colocaron en agua Milli-Q® a 1 °C dentro de un baño de hielo por 2 min. Luego, se dispusieron en un colador y se lavaron con agua de caño a presión, con el fin de retirar la mayor cantidad de pulpa adherida. Luego, se lavaron tres veces con agua destilada y, después, con agua Milli-Q® otras tres veces a temperatura ambiente. Se prosiguió con un secado rápido con papel absorbente. En seguida, las cáscaras blanqueadas se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron por 4 días a -44 °C y < 33 mbar. Estas se conservaron recubiertas con papel aluminio en bolsas de polietileno a -20°C hasta su uso.

#### 3.2.1.3. Molienda y desengrasado

La molienda de las cáscaras blanqueadas y liofilizadas se realizó inmediatamente antes de cada extracción cruda. Para ello, se usó un molino analítico por 1 min. La harina resultante continuó por un pretratamiento de “desengrasado”, el cual consistió en eliminar la mayor cantidad de compuestos liposolubles usando *n*-hexano. Se usó una relación igual a 1: 20 (m/v) en tubos de centrífuga de vidrio de 15 mL. Seguidamente, la extracción por sonicación a máxima potencia (40 kHz) se realizó por 30 min a temperatura ambiente. Luego de eliminar el sobrenadante amarillo por centrifugación (2500 rpm por 5 min), se efectuó un segundo desengrasado bajo las mismas condiciones (desengrasado sucesivo). Tras eliminar el segundo sobrenadante, las cáscaras se dispusieron sobre papel filtro grueso y se dejaron secar bajo campana a temperatura ambiente. Inmediatamente, las cáscaras se usaron para la extracción cruda.

### 3.2.2. Extracción e hidrólisis secuencial

#### 3.2.2.1. Extracción cruda y limpieza final

La extracción cruda se realizó por triplicado para cada uno de los morfotipos de los frutos. Se pesó 0.5 g de harina de cáscaras liofilizadas, blanqueadas y desengrasadas en un tubo de centrífuga de vidrio de 15 mL. Esta masa se mezcló con 5 mL de metanol acuoso al 80 % (v/v), dando una relación muestra/solvente de 1: 10 (m/v). La mezcla se purgó con un flujo de N<sub>2</sub> y se agitó con vórtex. Luego se extrajo mediante UAE a 60°C a 40 kHz por 60 min. Al término, el tubo se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se colectó el sobrenadante. Se procedió a una segunda extracción bajo las mismas condiciones y se combinaron los dos sobrenadantes (extracción cruda sucesiva). El extracto resultante rojizo (8 mL) se filtró al vacío con GF/A.

A continuación, se realizó un paso final de limpieza por extracción en fase sólida (SPE RP-18), a fin de eliminar las sustancias liposolubles que podrían haber quedado en el extracto anterior. En un sistema de distribución de vacío o *manifold*, se acondicionó un cartucho RP-18 (40-60 µm, 500 mg, 3 mL) con 5 mL de metanol y 5 mL de agua Milli-Q®, y se secó con un flujo de N<sub>2</sub>. Luego se hizo pasar el extracto y se colectó la fracción no retenida. En seguida, se lavó el cartucho con 2 mL de metanol al 80 %, de tal manera que la fracción de lavado se combine con la fracción anterior. Así, se obtuvo el extracto crudo limpio, el cual se purgó con un flujo de N<sub>2</sub> y se almacenó a -20°C. El residuo sólido se conservó bajo las mismas condiciones.

#### 3.2.2.2. Hidrólisis secuencial y partición

Dado que los fenólicos pueden estar en forma soluble, ya sea como fenólicos libres o conjugados (ésteres o glucósidos), e insoluble, como ligados a la pared celular, se realizó un fraccionamiento del extracto crudo limpio y del residuo sólido mediante una hidrólisis secuencial. Este abordaje fue adaptado de los procedimientos descritos en la literatura (Ambigaipalan et al., 2016; Krygier et al., 1982; Lou et al., 2020; B. Wang et al., 2016).

##### 3.2.2.2.1. Fenólicos libres

El extracto crudo limpio (10 mL) se concentró por rotaevaporación hasta los 2 mL, de tal manera que se haya eliminado el metanol (baño a 45°C, refrigerante a 4°C, 200 mbar). Para la obtención de la fracción de fenólicos libres (FL), se acidificó 1 mL del extracto crudo acuoso concentrado, hasta un pH 2 con HCl 6 M, y se particionó con acetato de etilo por tres veces, usando una relación de 1: 1 (v/v) cada vez (extracción líquido-líquido, LLE). Los sobrenadantes se combinaron y se secaron a través de una columna de sulfato de sodio anhidro

con GF/A. El acetato de etilo se evaporó con flujo de nitrógeno a temperatura ambiente y el extracto seco se redisolvió en 1 mL de metanol (con benzaldehído 80 µg/mL como estándar interno (IS)). Esta fracción se filtró con PTFE 0.45 µm, se colectó en viales ámbar de 1.5 mL de HPLC-DAD, se purgó con N<sub>2</sub> y se guardaron a -20°C hasta su análisis posterior.

#### 3.2.2.2.2. *Fenólicos esterificados*

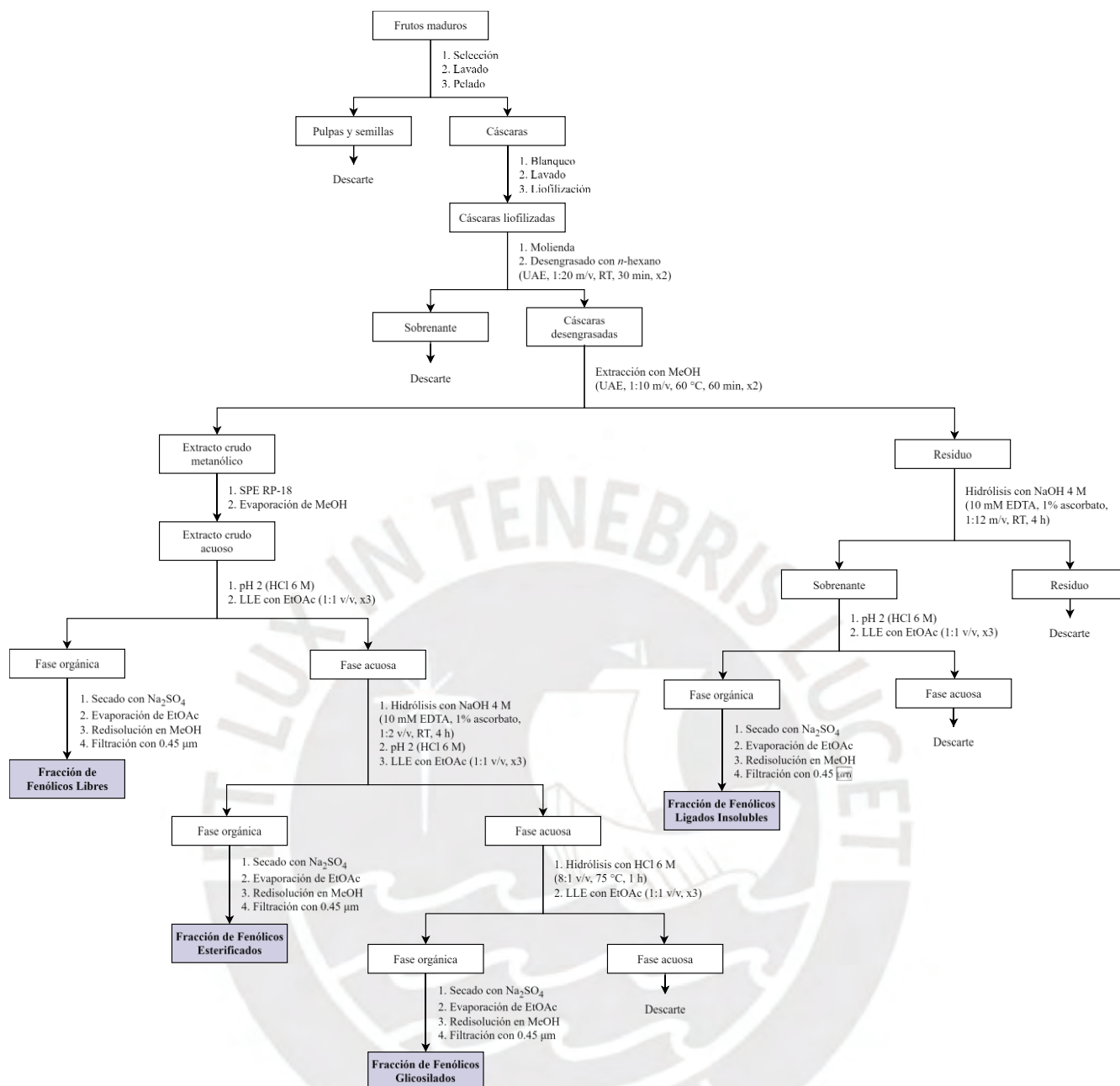
La fase acuosa de la partición para la obtención de FL (1 mL) se purgó con N<sub>2</sub> para eliminar el volumen remanente de acetato de etilo. Se agregó 2 mL de NaOH 4 M (10 mM de EDTA y 1% de ascorbato (m/v)). Esto dio una relación de fase acuosa/solución hidrolítica de 1: 2 (v/v)). La mezcla se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar sin luz y con agitación por 4 h a temperatura ambiente. Seguidamente, el hidrolizado alcalino se acidificó a pH 2 con HCl 6 M y se obtuvo una mezcla anaranjada. Se extrajeron los fenólicos liberados mediante partición con acetato de etilo por tres veces, usando una relación de 1: 1 (v/v) en cada extracción. Los sobrenadantes combinados se secaron, evaporaron, redisolvieron, filtraron y almacenaron de manera similar a lo descrito para FL; de esta manera se obtuvo la fracción de fenólicos esterificados (FE).

#### 3.2.2.2.3. *Fenólicos glicosilados*

La fracción de fenólicos glicosilados (FG) se obtuvo tras la hidrólisis ácida de la fase acuosa resultante de la partición para la obtención de FE (4 mL). Ésta se purgó con un flujo de N<sub>2</sub> para eliminar el acetato de etilo remanente y se combinó con 0.5 mL de HCl 6 M, (relación de fase acuosa/solución hidrolítica igual a 8: 1 (v/v)). La mezcla se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar sin luz a 75 °C por 1 h. A continuación, se particionó con acetato de etilo y los sobrenadantes se procesaron similarmente a lo descrito para las fracciones anteriores.

#### 3.2.2.2.4. *Fenólicos ligados insolubles*

Finalmente, la fracción de fenólicos ligados insolubles se obtuvo mediante la hidrólisis alcalina del residuo sólido de la extracción cruda (0.5 g). Para ello, se agregó 6 mL de NaOH 4 M (10 mM de EDTA y 1% de ascorbato (m/v)). Esto dio una relación de residuo sólido/solución hidrolítica de 1: 12 (m/v)), se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar sin luz y con agitación orbital por 4 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se acidificó con HCl 6 M hasta un pH 2 y se tomó una alícuota de 1 mL. Con este volumen, se procedió a extraer los fenólicos liberados mediante partición con acetato de etilo por tres veces, empleando proporciones iguales en cada partición (1:1 (v/v)). La fase acuosa se descartó, mientras que los sobrenadantes se procesaron de forma similar al del resto de fracciones. Todos los pasos descritos hasta aquí se resumen en el diagrama de flujo de la Figura 8.



**Figura 8.** Flujograma para la obtención de fracciones de fenólicos de cáscaras de agujajes. UAE = extracción asistida por ultrasonido; RT = temperatura ambiente; SPE-RP18 = extracción en fase sólida con cartuchos RP-18; LLE = extracción líquido-líquido.

### 3.2.3. Análisis espectrofotométricos

#### 3.2.3.1. Contenido total de fenólicos

El contenido total de fenólicos (TPC) de los extractos y fracciones se determinó mediante el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1998; Waterhouse, 2005). Este método colorimétrico se basa en la reducción de óxidos de tungsteno (VI) y manganeso (VI) en presencia de compuestos fenólicos en medio alcalino, con lo que se forma un complejo azulado

$[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , cuya absorbancia a 760 nm está linealmente correlacionada con la concentración total de los analitos reductores (Margraf et al., 2015; Waterhouse, 2005).

El ensayo se realizó en microtubos de centrifuga de 2 mL. En cada uno se agregó 20  $\mu\text{L}$  del blanco (metanol), estándar, extracto o fracción (con diluciones convenientes) y se combinó con 1580  $\mu\text{L}$  de agua y 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de agitar por vórtex por un par de segundos, se dejó reposar a temperatura ambiente por al menos 1 min y, sin pasar de los 8 min, se agregó 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (m/v). Tras agitar en vórtex, el microtubo se dejó incubando por 2 h en un bloque de calentamiento a 25°C sin presencia de luz. Posteriormente, el contenido se vertió en una cubeta de polipropileno de 1 cm y se registró la absorbancia a 760 nm. Para la curva de calibración se usaron soluciones metanólicas de ácido gálico (100-1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El TPC se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE/g DW), mediante la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración.

### 3.2.3.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (AC) de los fenólicos puede determinarse mediante el ensayo ORAC. En este se mide la habilidad de un extracto, el cual contiene a los analitos antioxidantes, para transferir átomos de hidrógeno a radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), generados a partir del AAPH (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metil-propionamida)) por termólisis en medio acuoso. Particularmente, se usó la variante del método ORAC-PGR, en el que se emplea PGR (rojo de pirrogaloilo) como sonda colorimétrica. El procedimiento fue adaptado del método 2012.03 de la AOAC (Ortiz et al., 2012), y de otros estudios (Pozo-Martínez et al., 2022; Y. Wang et al., 2017). Este ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, donde el volumen final de la mezcla fue de 250  $\mu\text{L}$ . Para las diluciones y el blanco (control negativo) se usó buffer de fosfato (75 mM, pH 7.4). Se utilizó trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman2-carboxílico) como estándar (40-200  $\mu\text{M}$  en cada pocillo) para la construcción de la curva de calibración.

La mezcla de reacción se preparó combinando primero 150  $\mu\text{L}$  de PGR 8.3  $\mu\text{M}$  con 50  $\mu\text{L}$  de muestra, estándar o blanco. Inmediatamente antes de realizar las lecturas, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de AAPH 50 mM (preincubado a 37°C por 30 min). De esta manera, las concentraciones finales de PGR y AAPH en cada pocillo fueron 5  $\mu\text{M}$  y 10 mM, respectivamente. Para el control positivo no se agregó AAPH, mientras que para las muestras fue necesario realizar diluciones. Se monitoreó la disminución de la absorbancia a 570 nm (A) cada 60 s durante 180 min.

Para la cuantificación, primero se calcularon las absorbancias relativas en cada minuto ( $A/A_0$ ), *i. e.*, con respecto al valor de la absorbancia inicial ( $A_0$ ). Luego se estimaron las áreas debajo

de las curvas de  $A/A_0$  versus el tiempo ( $AUC_{bruta}$ ) sumando todos los valores de  $A/A_0$  (0-180 min). Los valores  $AUC_{bruta}$  se corrigieron restando la AUC del blanco:  $AUC_{neta} = AUC_{bruta} - AUC_{blanco}$ . Los valores de la AC de los extractos se interpolaron empleando las  $AUC_{neta}$  en la curva de calibración ( $AUC_{neta}$  versus concentración). En este sentido, los resultados se expresaron como  $\mu$ moles equivalentes de trolox por g de masa seca ( $\mu$ mol TE/g DW).

### 3.2.4. Análisis enzimático-gravimétrico

El procedimiento para la determinación de fibra dietética soluble (SDF) e insoluble (IDF) fue elaborado a partir del método 991.43 (AOAC, 1995) y 985.29 de la AOAC (AOAC, 1990). Adicionalmente, se tuvo como referencia una comparativa entre el método de 1995 versus la más reciente actualización de la AOAC (2011.25) (AOAC, 2012) (García-Amezquita et al., 2018). En general, el método se basa en la digestión enzimática de muestras por duplicado de alimentos secos y desengrasados con  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa para la remoción de almidones y proteínas. Primero, el digestato enzimático es filtrado y el residuo sólido es lavado con agua caliente, secado y pesado; así se consigue IDF. Segundo, SDF se obtiene al precipitar el combinado del filtrado y los lavados con alcohol; luego se filtra, seca y pesa. Los valores de IDF y SDF se corrigen con el contenido de proteínas, cenizas y blanco.

Inicialmente, los crisoles de filtración (30 mL, tipo C, 40-60  $\mu$ m) se acondicionaron dejándolos en un horno de mufla a 525°C por 5 h. Tras enfriarse, se sumergieron por 1 h en Extran® al 2% a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron con agua de caño, agua destilada y acetona, y posteriormente se dejaron secando en una estufa a 70°C por 30 min. Seguidamente, tras enfriarse en un desecador, se agregó 0.5 g de celita en cada uno y se dejaron a 130°C por 1 h. Luego de enfriarse, se colocaron en un desecador para posteriormente registrar su masa. Por su parte, las cáscaras de los frutos del aguaje blanqueadas, liofilizadas y desengrasadas se dejaron secar por 1 h a 50°C, y se almacenaron en papel aluminio dentro de una bolsa de polietileno. Para la digestión enzimática, se usó el kit TDF-100A (Supelco®). La determinación de IDF y SDF se realizó usando el promedio de 3 réplicas del ensayo con cada morfotipo de aguaje.

Se pesaron por duplicado 0.5 g de muestra en tubos de ensayo de 50 mL y se agregaron 20 mL de buffer MES/TRIS (MES 0.05 M, TRIS 0.05 M, pH 8.3). Se prepararon también dos blancos (solo buffer). Luego de agitar, se adicionaron 25  $\mu$ L de la solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable y se agitó con vórtex. Los tubos recubiertos con papel aluminio se dejaron incubando a 95°C por 15 min bajo agitación periódica. Al término, los tubos se dejaron a 60°C dentro de un baño de agua. Se agregaron 5 mL de agua Milli-Q® para lavar las paredes internas y se adicionaron

50  $\mu$ L de proteasa recientemente preparada (50 mg/mL en buffer MES/TRIS). Luego, se dejó incubar por 30 min a 60°C con agitación continua. Al término, se agregó 2.5 mL de HCl 0.56 M y se ajustó el pH a 4-4.7 con NaOH 1 M. Finalmente, se adicionó directamente 150  $\mu$ L de amiloglucosidasa y se dejó incubando a 60°C por 30 min con agitación continua.

En primer lugar, se determinó IDF. Se humedeció y redistribuyó la cama de celita en su crisol respectivo previamente tarado, usando 5 mL de agua Milli-Q®. Se empleó vacío para generar una estera uniforme del material. Se filtró el digestato enzimático con un kitasato, se enjuagó cada tubo y se lavó el residuo dos veces con 5 mL de agua Milli-Q® a 60 °C. El filtrado y los lavados se combinaron y se transfirieron a un vaso de precipitados de 600 mL y se reservó para la determinación de SDF. Rápidamente, se lavó el residuo con 5 mL de etanol al 78% (v/v), etanol al 95% (v/v) y acetona usando vacío. El crisol con el residuo de fibra y celita se secaron toda la noche a 105°C. Luego de enfriar, el crisol se conservó en un desecador por 1 h y se calculó la masa del residuo por sustracción con la masa del crisol con la celita seca.

En segundo lugar, para SDF, se adicionaron cuatro volúmenes de etanol al 95% a 60°C (ca. 150 mL) a la mezcla del filtrado y los lavados de IDF. Se usaron algunas porciones del alcohol para enjuagar el kitasato. Seguidamente, se dejó precipitar a temperatura ambiente por 1 h y se procedió con la filtración y secado en el crisol similarmente a lo descrito para IDF, empezando por humedecer y redistribuir la celita con 5 mL de etanol 78% a temperatura ambiente.

La corrección del contenido de cenizas se realizó con los duplicados de IDF y SDF una vez secos y pesados. Se incineró el residuo por 5 h a 525 °C, se enfrió en un desecador, se pesó y se sustrajo la masa del crisol y celita seca para determinar las cenizas. La corrección de proteínas se realizó con el otro residuo, mediante combustión en un analizador de N y C (LECO®). Para ello, se pesaron por duplicado 0.2 g del residuo (mezcla de fibra dietética con celita), y se combinó con una cantidad suficiente de óxido de aluminio (*Combustión aid*). Se usó EDTA como estándar para la determinación de N. Las proteínas totales se calcularon como  $N \times 6.25$ . Finalmente, se usaron las siguientes ecuaciones para estimar SDF e IDF:

- Determinación del blanco (B) en mg:

$$B = \frac{BR_1 + BR_2}{2} - P_B - A_B$$

$BR_1$  y  $BR_2$  (mg) corresponden a los residuos para las determinaciones del blanco duplicado; y  $P_B$  y  $A_B$  (mg) de la proteína y cenizas, respectivamente, de los duplicados.

- Determinación de fibra dietética (DF = IDF o SDF) en g/100 g:

$$DF = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - P - A - B}{\frac{M_1 + M_2}{2}} \times 100$$

$R_1$  y  $R_2$  (mg) corresponden a los residuos de las muestras duplicadas;  $P$  y  $A$  (mg) a la proteína y cenizas, respectivamente, de los residuos;  $B$  (mg) es el blanco; y  $M_1$  y  $M_2$  (mg) son las muestras iniciales. La fibra dietética total (TDF) es igual a IDF + SDF.

### 3.2.5. Análisis cromatográficos

#### 3.2.5.1. Análisis por TLC

El análisis por TLC se realizó en placas de aluminio con sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Estas fueron recordadas con un largo de 10 cm y un ancho conveniente. Se lavaron con metanol y activaron a 110 °C por 1 h. Para la separación de los compuestos fenólicos, se usó una mezcla de diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico: metanol (65: 20: 10: 5 v/v) como fase móvil. Además, se usó una mezcla o *pool* de 16 estándares (ácido *trans*-cinámico, benzoico, ferúlico, vanílico, sinápico, *p*-cumárico, siríngico, cafeico, protocatecuico, gálico y clorogénico, y quercetina, miricetina, (+)-catequina, (-)-epicatequina y galato de (-)-epicatequina, 50 µg/mL de cada uno), para la identificación preliminar de los analitos, y se calcularon los factores de retención (Rf) de cada banda. El volumen de aplicación del *pool* y las muestras fue 20 y 50 µL, respectivamente. La visualización de las placas se realizó bajo luz UV (254 y 366 nm) y con una solución metanólica FeCl<sub>3</sub> al 5% (m/v) en spray calentándolas a 110 °C sobre una plancha.

#### 3.2.5.2. Análisis por HPLC-DAD

La separación de los fenólicos se realizó en un cromatógrafo HPLC Agilent Technologies® 1260 Infinity II Vial Sampler, acoplado a un detector DAD. La Tabla 6 resume los parámetros para la obtención de los cromatogramas y espectros UV-Visible de cada señal. Todos los estándares y muestras se filtraron con PTFE 0.45 µm antes de cada inyección (*autosampler*). Para el análisis de los fenólicos se emplearon soluciones estándar de 16 analitos (once ácidos fenólicos y cinco flavonoides) en metanol, (los mismos indicados en la sección 3.2.5.1.) Estos se mezclaron y se obtuvieron diferentes diluciones (*pools*) para elaborar una curva de calibración de cada estándar en siete concentraciones convenientes (0.2-125 µg/mL). Se agregó en cada *pool* una alícuota de benzaldehído (IS, concentración final de 80 µg/mL). La visualización general de los cromatogramas se realizó a 280 nm.

**Tabla 6.** Parámetros para la separación de fenólicos por HPLC-DAD (RP).

Parámetro	Descripción
Columna	RP-18e LichroCart® (250 mm x 4 mm, 5 µm)
Temperatura	35°C
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	A: Agua con TFA 0.1% B: ACN con TFA 0.1%
Flujo de fase móvil	1 mL/min
Gradiente de elución	B: 5 a 20% en 35 min → 20% a 25% por 15 min → 25% a 30% por 5 min → 30% a 70% por 4 min → 70% por 5 min → 70% a 5% por 1 min → 5% por 10 min.  Tiempo de elución: 59 min Tiempo total (incluido lavado): 75 min
Longitudes de onda de detección	230, 254 y 280 nm (sin referencia)
Espectros UV-Visible	190 – 400 nm

La identificación de los fenólicos se realizó mediante comparación de los tiempos de retención y los espectros UV-Visible de los picos en las fracciones y los *pools*. Asimismo, se analizó la selectividad de la separación mediante la pureza de pico (*peak purity*) en los cromatogramas. Para ello, se eligió como espectro objetivo al espectro promedio, ya que permite obtener información más completa sobre las posibles impurezas (Stahl, 2003). Los espectros de los picos se analizaron entre 210 y 400 nm para evitar aportes del ruido en longitudes de onda cercanas al *cut off* de los solventes (< 200 nm) y en las que no hay absorción (> 400 nm). Particularmente, se eligió un umbral de pureza de pico de 950, *i. e.* aquellos picos que tuvieron un valor de pureza superior a 950, se consideraron puros (espectralmente), de manera similar a otros estudios (Flores et al., 2017; Kuppusamy et al., 2018; Pérez-Jiménez et al., 2008).

Para la cuantificación, las curvas de calibración se construyeron a partir de las áreas de los picos de los estándares con respecto al área del pico del IS, versus los µg inyectados del fenólico. Mediante análisis de regresión lineal simple, se evaluó la linealidad de las curvas con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y su semejanza al  $R^2$  ajustado, y se inspeccionó el valor *p* de cada modelo para conocer su significancia estadística. La concentración de los fenólicos en las muestras se estimó con la interpolación de los valores de la relación del área de pico del fenólico con respecto al área del pico de benzaldehído en las curvas de calibración. Se

promediaron los resultados de tres réplicas y se calculó la desviación estándar. La exactitud del método se estimó en base al porcentaje de recuperación con tres niveles de enriquecimiento o *spiking* (7, 12 y 15 µg de cada estándar por g DW) en una muestra de cáscaras del morfotipo “Color”. Esta muestra se procesó para obtener la fracción de FL. Se estimó el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) en tres réplicas del análisis de recuperación para conocer la precisión del método. Finalmente, se determinaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) considerando la relación señal/ruido (S/N) del pico del analito (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human - European Medicines Agency, 2006). Así, LOD y LOQ se definieron como la concentración mínima cuando S/N es igual a 3: 1 y 10: 1, respectivamente.

### 3.2.5.3. Análisis por GC-MS

El análisis por GC-MS se realizó utilizando los productos de la derivatización de los fenólicos con N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA). El protocolo se elaboró tomando como referencia trabajos similares (Ahmad et al., 2016; D’Acunha-Sandoval, 2015; Proestos et al., 2006). En esta derivatización, los hidrógenos lábiles de los hidroxilos se reemplazan por grupos trimetilsililo (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); de tal manera que los derivados posean menores polaridades que los fenólicos *per se*, y puedan ser separados en un columna de sílice por GC-MS.

Se agregaron 100 µL de muestra, (*pool* de estándares o fracciones) en un inserto de vidrio de 250 µL dentro de un vial de cromatografía de 1.5 mL. Luego se evaporó a sequedad con un flujo de N<sub>2</sub> y se agregó 10 µL de MSTFA. Se mezcló en vórtex y se incubó a 60°C por 30 min en un bloque de calentamiento seco. Tras enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 90 µL de diclorometano para conseguir un volumen final de 100 µL. Las muestras derivatizadas se inyectaron (*autosampler*) en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies® 7890B acoplado con un espectrómetro de masas con un cuadrupolo Agilent Technologies® 5977B. Las condiciones de análisis de los fenólicos trimetilsililados se resumen en la Tabla 7.

Para la identificación, se compararon los tiempos de retención ( $t_R$ ), los índices de retención (RI), y los patrones de fragmentación de los picos en los cromatogramas (*Total Ion Chromatogram*, TIC) de las muestras con respecto a la separación de 16 estándares fenólicos (descritos en 3.2.5.2), cuyas concentraciones en el *pool* estuvieron entre 10-120 µ/mL. Además, usando la biblioteca NIST (2011, versión 2.0g) y la literatura, se propusieron otros fenólicos en las muestras. Durante el análisis, se usaron los valores de S/N, la pureza de los picos y las

áreas de las señales en los TIC. Para el cálculo de los RI se usó una mezcla de *n*-alcanos C8-C40 estándares y se empleó la siguiente fórmula:

$$RI = 100 \times \left( \frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z \right)$$

$t_{Ri}$  es el tiempo de retención del pico de la muestra,  $t_{Rz}$  del pico del *n*-alcano anterior al pico de la muestra,  $t_{R(z+1)}$  del pico del *n*-alcano posterior al pico de la muestra, y  $z$  es el número de carbonos del *n*-alcano cuyo pico es eluido antes del pico de la muestra.

**Tabla 7.** Parámetros para la separación de fenólicos trimetilsililados por GC-MS.

Parámetro	Descripción
Columna	HP-5 (30 m x 0.320 mm, 0.45 $\mu$ m)
Temperatura de inyección	250 °C
Volumen de inyección	1 $\mu$ L
Split Ratio	10:1
Flujo	1 mL/min
Gradiente de temperaturas	80 °C por 4 min $\rightarrow$ 80 a 220°C a 10°C/min $\rightarrow$ 220 a 310°C a 20°C/min $\rightarrow$ 310 °C por 10 min. Tiempo total: 32.5 min
Espectrómetro de masas	<i>Solvent delay</i> : 4 min Energía de ionización: 70 eV Interfase: 280°C 35 - 1000 m/z

## 4. Resultados

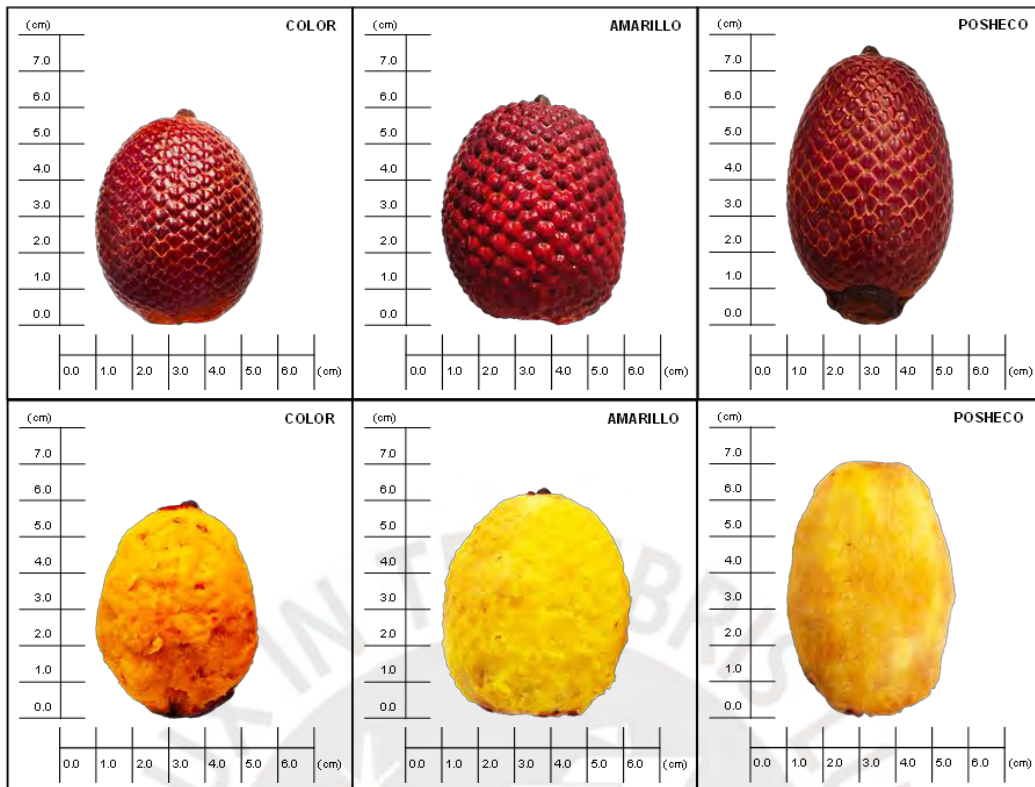
### 4.1. Descripción morfológica de los frutos

Los morfotipos seleccionados para este estudio presentan variaciones morfológicas evidentes. Según la Tabla 8, la masa de los morfotipos “Amarillo” y “Posheco” es significativamente mayor que de “Color”. Los agujajes “Posheco” son más alargados, con un diámetro similar a “Color”, siendo los frutos “Amarillo” los más anchos (Figura 9). En general, los tres morfotipos poseen exocarpios rojizos oscuros; no obstante, las “escamas” de los agujajes “Amarillo” son más protuberantes, a diferencia de “Posheco”, cuya superficie es más lisa. El morfotipo “Color” presenta una pulpa anaranjada, mientras que “Posheco”, de un color amarillo pálido con ciertas regiones oscurecidas (Figura 9). La Figura 10 muestra las cáscaras blanqueadas y liofilizadas antes y después de molerlas. Se aprecia que el color de la harina de las cáscaras del morfotipo “Color” es ligeramente más intenso que la del “Posheco”, siendo ambas anaranjadas; mientras que la del “Amarillo” es más amarillenta. En general, se obtuvo un rendimiento promedio de cáscaras blanqueadas y liofilizadas de *ca.* 5% con respecto a la masa húmeda de los frutos.

**Tabla 8.** Masa y dimensiones de los frutos del agujaje según morfotipo.

Morfotipo	Masa ( $\pm$ SD g)	Longitud ( $\pm$ SD cm)	Diámetro ( $\pm$ SD cm)
Amarillo	64.04 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>	51.51 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	44.32 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>
Color	45.82 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	48.98 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	38.96 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
Posheco	60.20 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	64.46 $\pm$ 0.98 <sup>c</sup>	40.40 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>

Los superíndices con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ), mediante la prueba de Tukey entre los promedios para 5 ejemplares de los morfotipos.



**Figura 9.** Ejemplares de morfotipos de los aguajes analizados. Arriba: con cáscara. Abajo: sin cáscara.



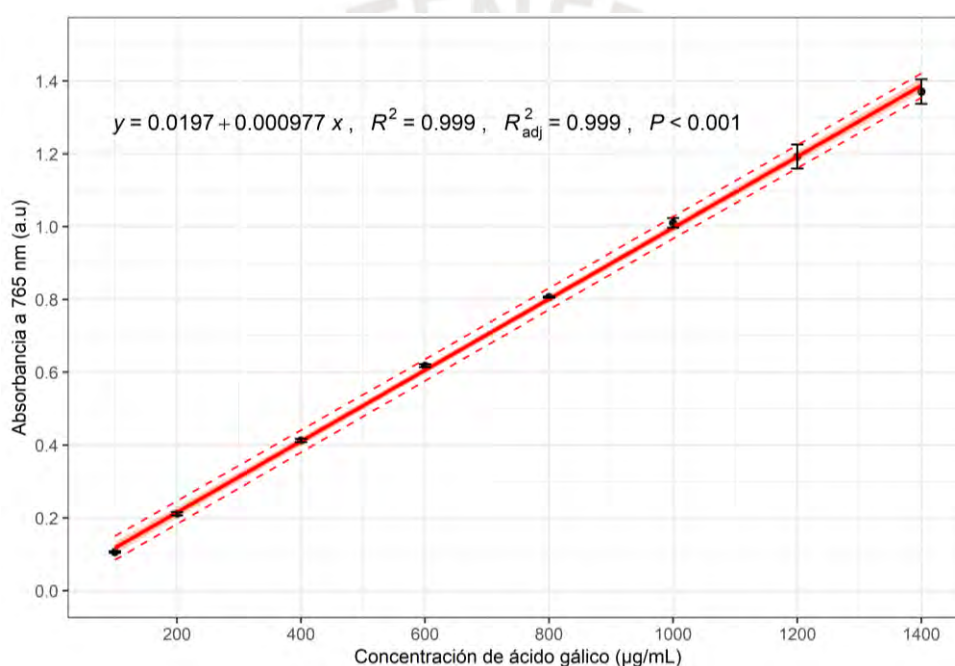
**Figura 10.** Muestras de cáscaras analizadas según el morfotipo de aguaje. Arriba: antes de la molienda. Abajo: después de la molienda.

## 4.2. Evaluación de parámetros analíticos

### 4.2.1. Técnicas analíticas

#### 4.2.1.1. Calibración para contenido total de fenólicos

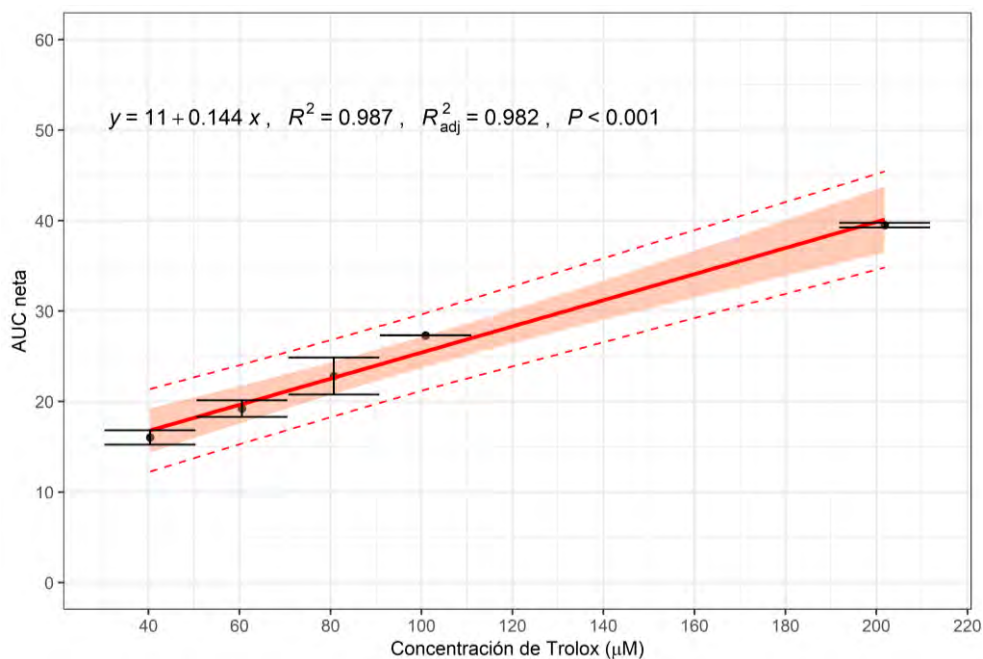
La curva de calibración de ácido gálico usada para la estimación del contenido total de fenólicos (TPC) en las muestras se presenta en la Figura 11. El modelo de regresión lineal simple ajustado muestra un alto grado de ajuste a los datos, con un alto coeficiente de determinación ( $R^2$ ), muy similar al  $R^2$  ajustado ( $R^2_{adj}$ ). Además, el valor  $p$  es mucho menor al nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ); por ende, el modelo es significativo.



**Figura 11.** Curva de calibración de ácido gálico mediante el método Folin-Ciocalteu. Se muestran los intervalos de confianza (sombreado) y de predicción (líneas punteadas) al 95% de confianza. Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de los promedios ( $n=3$ ).

#### 4.2.1.2. Calibración para capacidad antioxidante

La curva de calibración de trolox para el ensayo ORAC-PGR se muestra en la Figura 12. Las curvas de disminución de la absorbancia relativa  $A/A_0$  caen adecuadamente dentro de la región delimitada por las curvas de control positivo y negativo Figura A1 (ver Anexos). Además, la curva del control positivo se mantiene constante. Así, se realizó un análisis de regresión similar a lo explicado 4.2.1.1. y se obtuvieron valores de  $R^2$ ,  $R^2_{adj}$  y  $p$  adecuados.



**Figura 12.** Curva de calibración de trolox mediante el ensayo ORAC-PGR. Se muestran los intervalos de confianza (sombreado) y de predicción (líneas punteadas) al 95% de confianza. Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de los promedios (n=3).

#### 4.2.1.3. Optimización para TLC

Para la realización del análisis por TLC definitivo de los fenólicos se probaron diferentes fases móviles, volúmenes de aplicación y agentes de visualización. En las pruebas se usó una mezcla de los 14 estándares (70 µg/mL de cada fenólico), ya que el ácido benzoico y galato de (-)-epicatequina se consiguieron posteriormente. Los solventes probados fueron acetato de etilo (A), ácido acético (AA), cloroformo (C), diclorometano (D), éter dietílico (E), ácido fórmico (F), metanol (M), acetona (N), tolueno (T) y agua (W). Los volúmenes de aplicación evaluados fueron de 10, 30, 50 y 100 µL. También se comparó la revelación de las placas con soluciones metanólicas al 5% (m/v) de FeCl<sub>3</sub> y AlCl<sub>3</sub>, y la solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5 % (m/v), (con un calentamiento posterior a *ca.* 110 °C sobre una plancha), según la literatura (Agatonovic-Kustrin et al., 2021; Somaroo et al., 1973; K. Wang et al., 2009).

La Tabla 9 resume las mezclas empleadas para la elección de la fase móvil. Se calculó el índice de polaridad (PI) y la fuerza de solvente (SS), a partir de los valores individuales de cada sustancia, para lograr un mejor ajuste de la composición de la fase móvil. Se buscó que los valores de PI y SS sean lo más cercanos a 3.70 y 0.40, respectivamente, según las buenas separaciones conseguidas por Domínguez-Rodríguez et al. (2021). Además, se contabilizó el total de bandas obtenidas, además de la diferencia máxima y mínima de los valores de R<sub>f</sub>

registrados en los análisis con cada mezcla de solventes, de manera que puedan servir como parámetros para evaluar la resolución de las separaciones.

Las bandas obtenidas en las pruebas se apreciaron suficientemente definidas con 20  $\mu\text{L}$  de mezcla de los estándares, mientras que para las fracciones de fenólicos fue necesario aplicar 50  $\mu\text{L}$ . Tal como se aprecia en la Tabla 9, si bien los ajustes de PI y SS permitieron mejores separaciones, la elección de los solventes y las proporciones influyen de manera crítica en la resolución. Así, se decidió optar por la mezcla DAFM, la cual permitió obtener nueve bandas de los 14 fenólicos usados, siendo una fase móvil ligeramente más polar que la sugerida por Domínguez-Rodríguez et al. (2021) y con mayor selectividad en la separación.

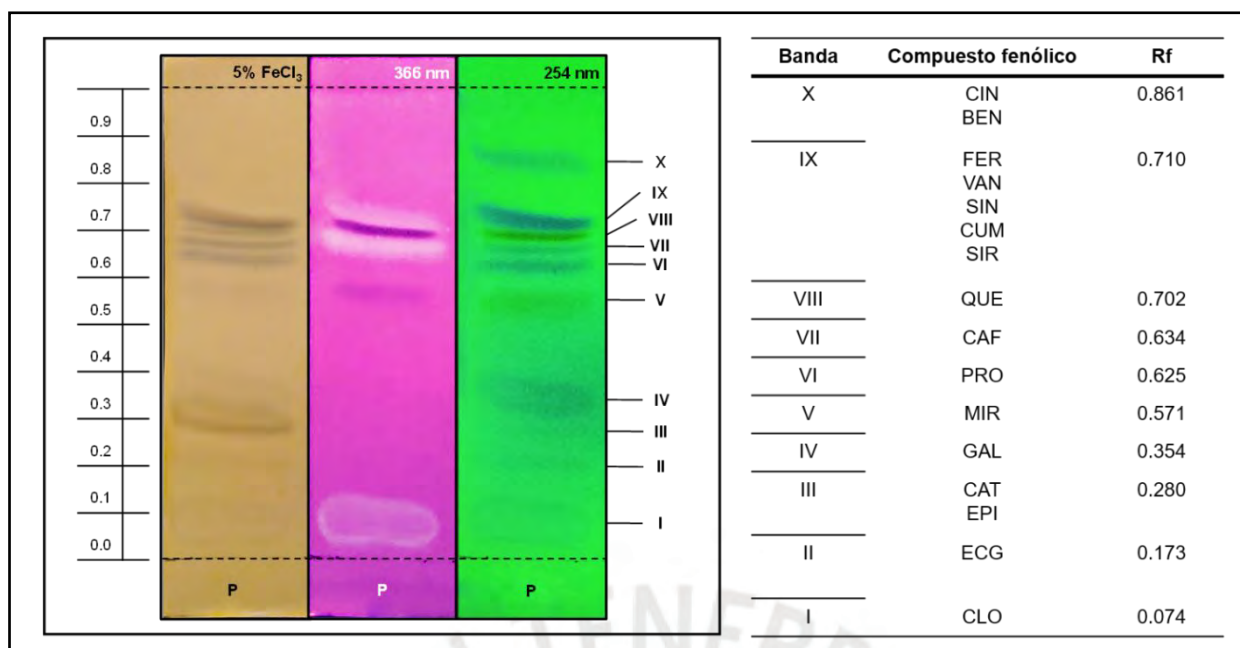
De las tres propuestas para el agente de visualización,  $\text{FeCl}_3$  al 5% fue la mejor ya que permitió observar hasta diez bandas con tonalidades verdosas, azuladas y violetas, mientras que  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% solo mostró siete bandas, con colores amarillentos, rojizos y violetas, y  $\text{AlCl}_3$  solamente 2 bandas amarillentas. El fondo con  $\text{FeCl}_3$  al 5% se pinta de mostaza, lo cual podría también dificultar la visualización de algunos colores; aun así, se decidió elegir esta solución para los análisis definitivos por TLC. La Figura 13 muestra la separación de los 16 estándares de fenólicos (P) tras aplicar el agente de visualización  $\text{FeCl}_3$  al 5% en metanol, y bajo luz UV a 254 y 366 nm. También se muestran los  $R_f$  de las bandas obtenidas. La identificación se realizó con cada uno de los estándares individuales. El ácido benzoico coeluye con el ácido cinámico, mientras que el galato de (-)-epicatequina puede discriminarse como una banda única adicional.

**Tabla 9.** Parámetros para la elección de la fase móvil para la TLC de fenólicos.

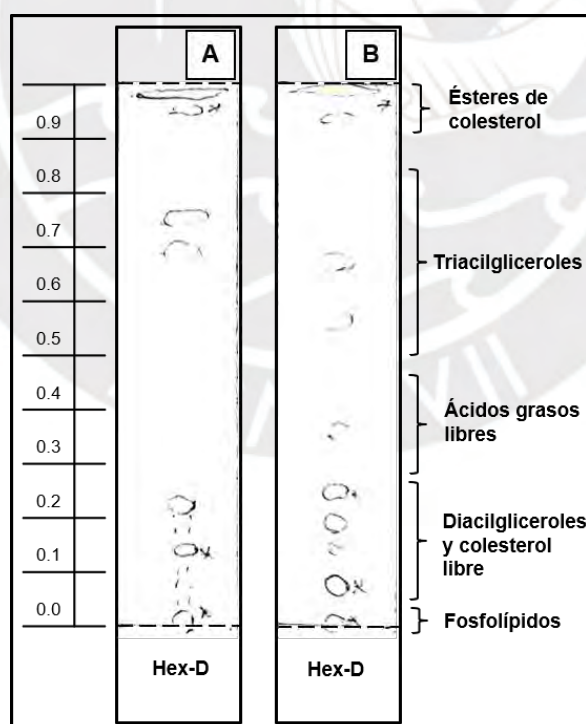
Fase móvil	Proporciones (v/v)	Referencia	IP	FS	N.º de bandas separadas	$\Delta Rf_{\text{máx}}$	$\Delta Rf_{\text{mín}}$
CMF	85:15:1	Propuesto	4.49	0.47	4	0.232	0.029
CAF	6:3:1	Propuesto	4.38	0.37	4	0.471	0.114
AWF(AA)	100:27:11:11	Propuesto			0	-	-
CANF	4:3:2:1	Jesionek et al. (2015)(Jesionek et al., 2015)	4.58	0.40	6	0.210	0.020
TAFM	45:40:10:5	Domínguez-Rodríguez et al. (2021)(Domínguez-Rodríguez et al., 2021)	3.70	0.40	8	0.738	0.012
EANF	5:3:1:1	Propuesto	3.83	0.41	3	0.05	0.030
DANF	6:3:1:1	Propuesto	3.90	0.41	5	0.277	0.064
DAFM	65:20:10:5	Propuesto	3.75	0.41	9	0.810	0.023

$\Delta Rf_{\text{máx}}$  se calcula a partir de los factores de retención (Rf) de la banda más alejada y la más cercana a la zona de aplicación de la mezcla de estándares en la placa TLC, respectivamente.  $\Delta Rf_{\text{mín}}$  refiere a la diferencia mínima encontrada entre los valores de Rf de la separación a 254 nm.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de TLC para evaluar la remoción de sustancias de baja polaridad y liposolubles de las cáscaras. Se probaron tres mezclas para la fase móvil: HEF (*n*-hexano: éter dietílico: ácido fórmico = 80:20:2 (v/v)) (William & Xialin, 2012), PE(AA) (éter de petróleo (40-60°C): éter dietílico: ácido acético = 84:15:1 (v/v)) (The Rockefeller University, 2022), y HE(AA) (*n*-hexano: éter dietílico: ácido acético = 75: 25: 1 (v/v)) (Freeman & West, 1966). La muestra de prueba fue un extracto concentrado del desengrasado de las cáscaras de aguajes “Color”. De las tres mezclas, PE(AA) y HE(AA) mostraron una buena separación de los constituyentes liposolubles, siendo la primera la que resolvió una mayor cantidad de bandas (Figura 14). Estos componentes podrían ser ésteres de colesterol, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, diacilgliceroles, colesterol libres y fosfolípidos, pero también, dado el color amarillo de la última banda cercana al frente de la fase móvil, habría un contenido importante de carotenoides en las cáscaras. En consecuencia, se decidió usar la mezcla PE(AA) como fase móvil en las evaluaciones del desengrasado de las muestras.



**Figura 13.** TLC de una mezcla de 16 estándares fenólicos. Se usó la mezcla DAFM (diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico: metanol = 65: 20: 10: 5 (v/v)) como fase móvil. P = *pool* de estándares. Se reportan los valores de Rf de los estándares fenólicos: CIN = ácido *trans*-cinámico; BEN = ácido benzoico; FER = ácido ferúlico; VAN = ácido vanílico; SIN = ácido sinápico; CUM = ácido *p*-cumárico; SIR = ácido sirínico; QUE = quercetina; CAF = ácido cafeico; PRO = ácido protocatecuico; MIR = miricetina; GAL = ácido gálico; CAT = (+)-catequina; EPI = (-)-epicatequina; ECG = galato de (-)-epicatequina; CLO = ácido clorogénico.



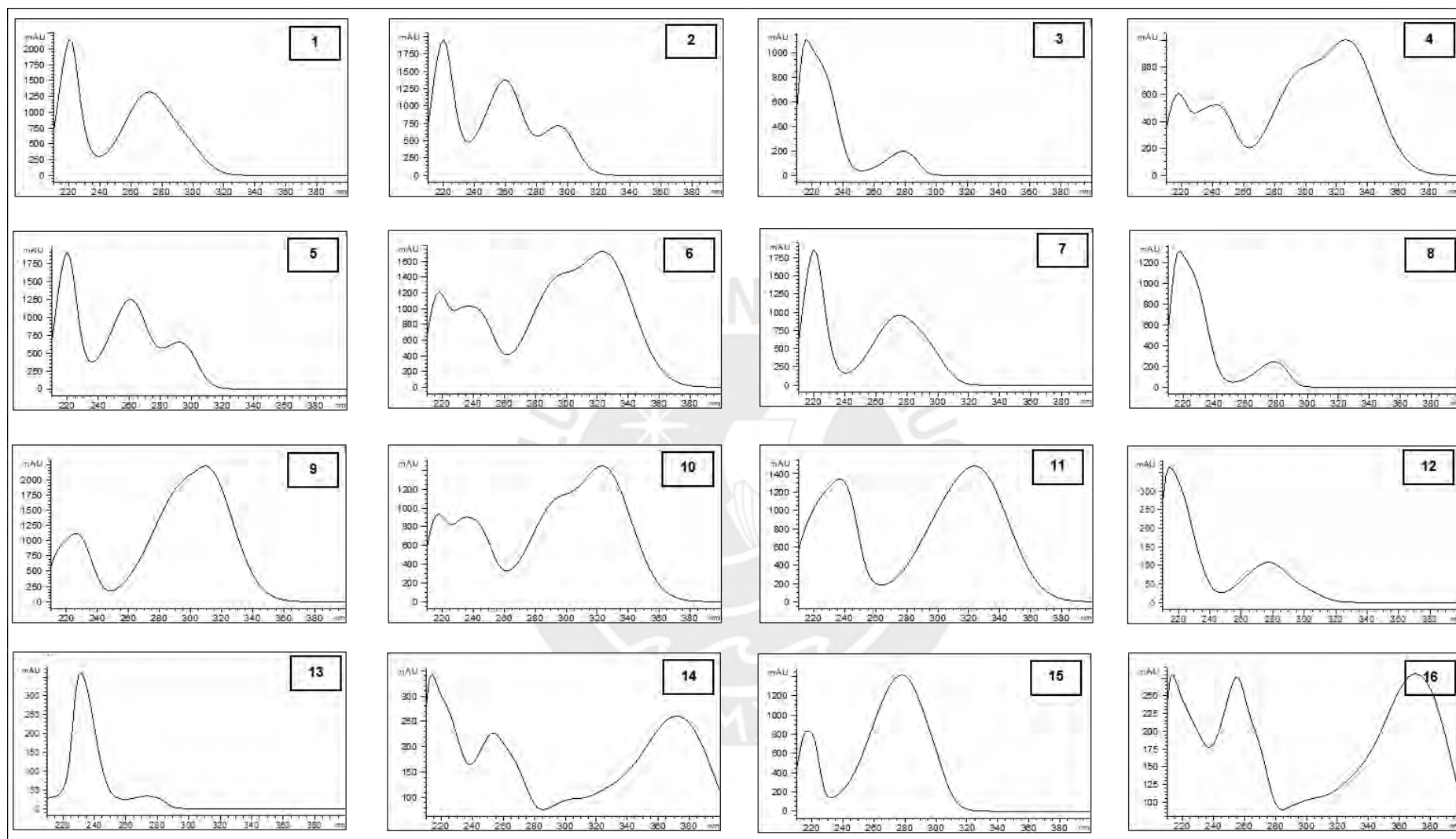
**Figura 14.** TLC para la evaluación del desengrasado de las cáscaras con *n*-hexano. Las marcas se realizaron durante la visualización a 254 nm. Las bandas marcadas con asteriscos se observaron también a 366 nm. **A.** HE(AA) (*n*-hexano: éter dietílico: ácido acético = 75:25:1 (v/v)). **B.** PE(AA) (éter de petróleo (40-60°C): éter dietílico: ácido acético = 84:15:1 (v/v)).

#### 4.2.1.4. Optimización para HPLC-DAD

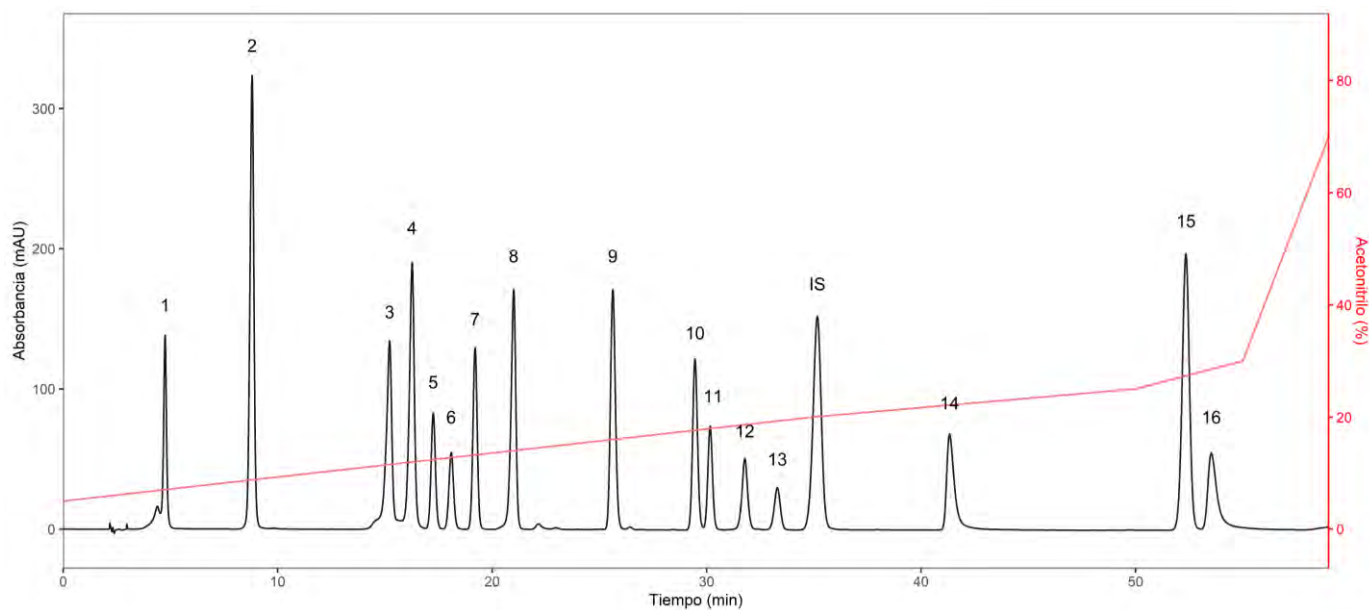
Se empleó agua y acetonitrilo (ACN) como solventes para la separación por HPLC-DAD (Schieber et al., 2001), con un gradiente que fue ajustándose para un *pool* de 14 fenólicos. Se evaluó la influencia de los aditivos ácidos sobre la resolución, agregándolos en cada solvente: ácido acético al 2% (v/v), ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v), y ácido fórmico al 0.1% (v/v) (Ambigaipalan et al., 2016; Arruda et al., 2018; Y. C. Wang et al., 2008). Los resultados de las corridas (no se muestran) con los tres aditivos ácidos, bajo las condiciones descritas en la Tabla A1 (ver Anexos), se registraron a 280 nm. Con ácido acético, se observaron picos solapados correspondientes al ácido vanílico y cafeico, además de que la selectividad entre las señales del ácido siríngico y (-)-epicatequina no era adecuada al aparecer muy cercanas. En el caso del ácido fórmico, los picos de (+)-catequina y ácido clorogénico aparecieron muy cercanos entre sí; mientras que, cuando se usó TFA, las 14 señales estuvieron mejor resueltas. Si bien un ajuste en el gradiente ayudó a mejorar la selectividad en el caso del ácido fórmico, esta modificación exigió extender la separación por *ca.* 5 min. Se observó también que el ácido fórmico, al igual que el ácido acético, alteran la línea base del cromatograma a 230 nm, lo cual podría dificultar la cuantificación. En consecuencia, la elección final del aditivo ácido fue TFA al 0.1% (v/v) en ambos solventes.

La elección de las longitudes de onda para la cuantificación se realizó a partir de la inspección de los espectros UV-Visible de los 16 estándares (Figura 15). Dado que la elección a 210 nm no era conveniente debido a que el TFA absorbe a dicha longitud, se disolvió por emplear tres longitudes de onda para los análisis: 230, 280 y 254 nm; siendo 280 nm, la que permite observar mejor todos los estándares (Figura A2, ver Anexos). De esta manera, la Figura 16 muestra la separación definitiva de los 16 estándares fenólicos (resoluciones > 1.5).

La Figura 17 muestra la curva de calibración de quercetina como ejemplo de las curvas usadas para la cuantificación de los fenólicos. El análisis de regresión lineal simple mostró que todas las curvas elaboradas poseen un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) *ca.* 0.999, similares a los  $R_{adj}^2$  (Tabla 10). Esto implica que los modelos están correctamente ajustados a los puntos. Todos los valores  $p$  obtenidos son mucho menores que  $\alpha = 0.05$ ; por ende, se puede afirmar que los modelos construidos son estadísticamente significativos y adecuados para la cuantificación.



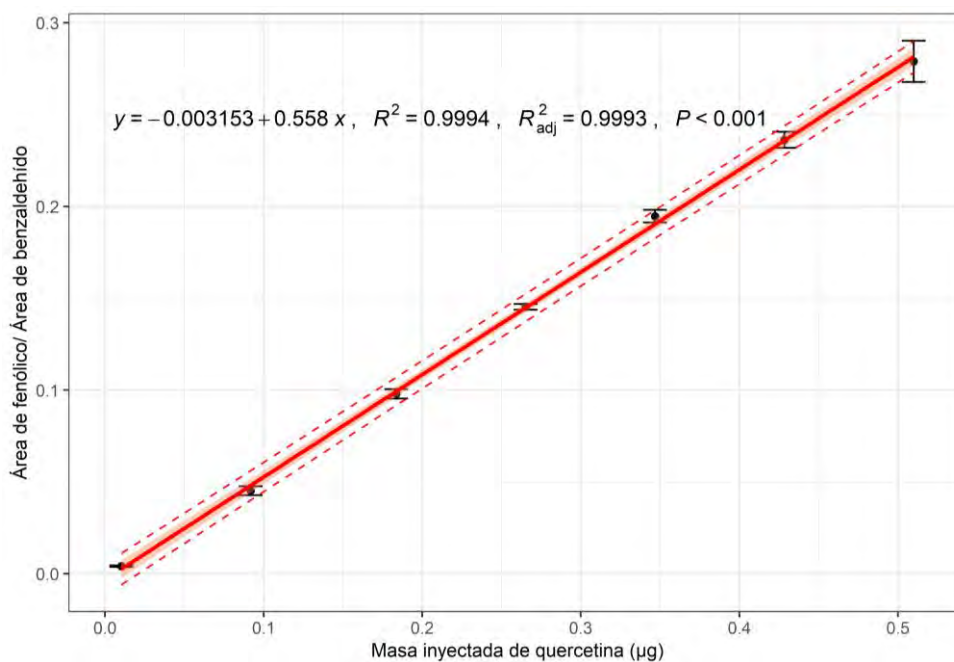
**Figura 15.** Espectros UV-Visible de 16 estándares fenólicos. 1 = ácido gálico, 2 = ácido protocatecuico, 3 = (+)-catequina, 4 = ácido clorogénico, 5 = ácido vanílico, 6 = ácido cafeico, 7 = ácido sirínico, 8 = (-)-epicatequina, 9 = ácido *p*-cumárico, 10 = ácido ferúlico, 11 = ácido sinápico, 12 = galato de (-)-epicatequina, 13 = ácido benzoico, 14 = miricetina, 15 = ácido *trans*-cinámico, 16 = quercetina.



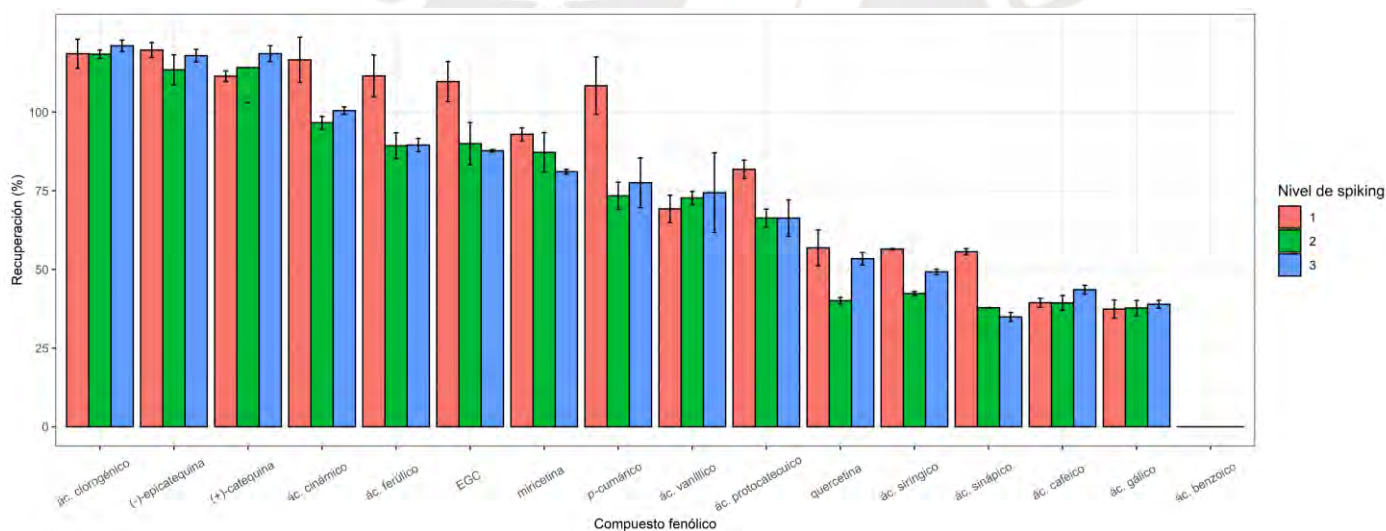
**Figura 16.** Separación de 16 estándares fenólicos por HPLC-DAD (RP) a 280 nm. 1 = ácido gálico, 2 = ácido protocatecuico, 3 = (+)-catequina, 4 = ácido clorogénico, 5 = ácido vanílico, 6 = ácido cafeico, 7 = ácido sirínico, 8 = (-)-epicatequina, 9 = ácido *p*-cumárico, 10 = ácido ferúlico, 11 = ácido sinápico, 12 = galato de (-)-epicatequina, 13 = ácido benzoico, 14 = miricetina, 15 = ácido *trans*-cinámico, 16 = quercetina, IS = benzaldehído (estándar interno). La línea roja muestra la variación del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil.

En la Tabla 10 se indican los tiempos de retención ( $t_R$ ), las longitudes de onda de cuantificación, la pendiente (a) y el intercepto de la recta (b), el rango de masas inyectadas de los estándares, los LOD y LOQ, y el porcentaje de recuperación como promedio de los tres niveles de *spiking*, junto con el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), como parte de la validación del método. Las %RSD en general son menores al 10%. Así mismo, los valores de LOD y LOQ son bastante pequeños, y la separación de los 16 estándares se logra en menos de 55 min.

La Figura 18 muestra las recuperaciones de los fenólicos. Con excepción del ácido benzoico, los estándares han sido recuperados por el protocolo desarrollado, siendo los ácidos sinápico, gálico, cafeico y sirínico los de menores porcentajes (< 50%), mientras que el ácido clorogénico, (-)-epicatequina, (+)-catequina y el ácido *trans*-cinámico son los de recuperación completa. Finalmente, como parte de la evaluación de la selectividad del método, se analizó la pureza espectral de los picos (*peak purity*) mediante la inspección de las curvas de similaridad de los espectros registrados entre 210 a 400 nm. Los picos identificados tuvieron curvas de similaridad por encima del valor umbral (950). Esto también se apreció con el parámetro “*purity ratio*”, el cual debe aparecer mayoritariamente como una banda verde debajo del pico, conteniendo a la curva de similaridad, para indicar una pureza espectral adecuada. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura A3 (ver Anexos).



**Figura 17.** Curva de calibración de quercetina por HPLC-DAD (RP) a 254 nm. Se muestran los intervalos de confianza (sombreado) y de predicción (líneas punteadas) al 95% de confianza. Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de los promedios (n=3).



**Figura 18.** Recuperación de los estándares fenólicos en la fracción de fenólicos libres. Niveles de *spiking*: 1 = 7 µg/g; 2 = 12 µg/g; 3 = 15 µg/g (µg de cada estándar por g de muestra seca, en promedio). Las barras de error muestran la desviación estándar de los promedios.

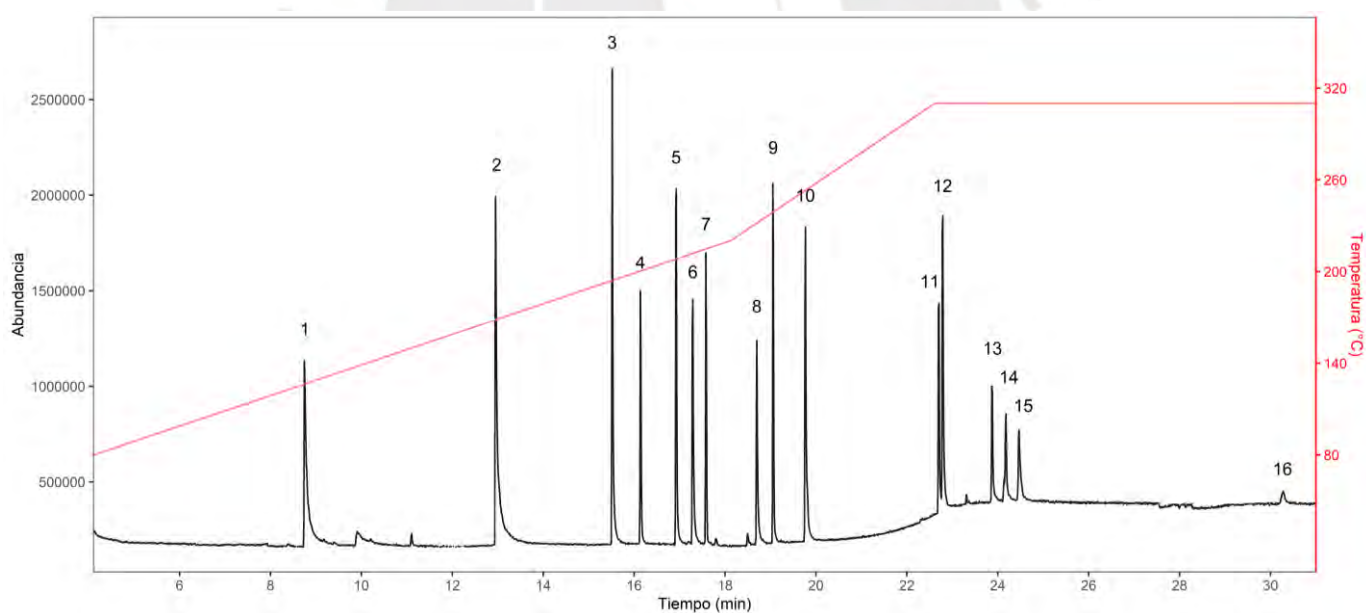
**Tabla 10.** Parámetros de cuantificación de los fenólicos por HPLC-DAD (RP).

Compuesto fenólico	t <sub>R</sub> (min)	λ (nm)	a (1/μg)	b	R <sup>2</sup>	Rango (μg)	LOD (μg)	LOQ (μg)	Recuperación (%)	RSD (%)
Ác. gálico	4.77	280	3.0113	0.0015	0.9954	0.005-0.200	0.0001	0.0004	38.0	5.7
Ác. protocatecuico	8.84	254	0.5473	0.0019	0.9987	0.005-1.000	0.0003	0.0011	71.5	5.5
(+)-catequina	15.29	230	1.4914	0.0038	0.9997	0.005-1.250	0.0134	0.0447	114.7	4.5
Ác. clorogénico	16.32	230	0.7512	0.001	0.9958	0.050-0.700	0.0238	0.0795	119.3	2.2
Ác. vanílico	17.31	254	0.6012	0.0014	0.9973	0.050-0.200	0.0004	0.0012	72.1	8.7
Ác. cafeico	18.17	280	3.8515	0.0093	0.9953	0.002-0.100	0.0002	0.0006	40.8	4.2
Ác. siríngico	19.26	280	4.3542	0.0026	0.9989	0.002-0.200	0.0002	0.0005	49.2	1.3
(-)-epicatequina	21.07	230	1.4029	0.026	0.9993	0.030-1.250	0.0083	0.0277	117	2.6
Ác. <i>p</i> -cumárico	25.71	280	5.5777	0.0155	0.9936	0.030-0.200	0.0002	0.0006	86.4	8.2
Ác. ferúlico	29.52	230	1.569	0	0.9964	0.050-0.200	0.0077	0.0256	96.8	4.3
Ác. sinápico	30.22	230	2.1738	0.0019	0.9992	0.002-0.300	0.0051	0.0169	42.8	2
Galato de (-)-epicatequina	31.85	230	0.9613	0.0001	0.9969	0.002-0.300	0.0144	0.0481	95.8	4.6
Ác. benzoico	33.37	230	2.5402	0.0556	0.999	0.010-0.500	0.0034	0.0113	0	-
Miricetina	41.37	230	0.4945	0.0013	0.997	0.010-0.500	0.0008	0.0027	87.1	3.5
Ác. <i>trans</i> -cinámico	52.39	254	11.9226	-0.0546	0.9978	0.005-0.200	0.0003	0.0011	104.6	3.1
Quercetina	53.60	280	0.558	-0.0032	0.9994	0.010-0.500	0.0019	0.0062	50.1	5.4
IS (benzaldehído)	35.21	230, 254, 280	-	-	-	-	-	-	-	-

IS: estándar interno. Los valores de las recuperaciones y RSD se obtuvieron a partir de los promedios de los 3 niveles de “spiking”. Los valores en μg se refieren a μg inyectados

#### 4.2.1.5. Optimización para GC-MS

La Figura 19 muestra el cromatograma de los analitos los cuales pudieron ser separados en menos de 35 min. Se aprecia un ligero aumento en la línea base a partir del minuto 20, probablemente debido al sangrado de la columna a causa del aumento de la temperatura del horno; sin embargo, los picos posteriores son resueltos adecuadamente. La Tabla 11 incluye los parámetros para la identificación de los fenólicos trimetilsililados. Se muestran los tiempos de retención ( $t_R$ ), los índices de retención de (RI), los picos de los iones característicos, la masa y número de sustituciones de TMS en los derivados. En general, las señales tuvieron valores de “Match” entre los 950 – 800 y de “%Prob.” entre 80-90, por lo que los compuestos se identificaron correctamente con una probabilidad alta de que sus patrones de fragmentación coincidan con los disponibles en la biblioteca NIST (2011, v. 2.0g). La resolución entre cada pico fue superior a 0.5, por lo que los 16 fenólicos derivatizados estuvieron adecuadamente resueltos en la separación. Además, los RI calculados fueron muy similares a los reportados por la biblioteca NIST (*ca.*  $\pm 20$ ). Particularmente, el ácido clorogénico y galato de (-)-epicatequina se identificaron según la literatura (Moldoveanu, 2014).



**Figura 19.** Separación por GC-MS (TIC) de 16 estándares fenólicos trimetilsililados. 1 = ácido benzoico, 2 = ácido *trans*-cinámico, 3 = ácido vanílico, 4 = ácido protocateuico, 5 = ácido siríngico, 6 = ácido *p*-cumárico, 7 = ácido gálico, 8 = ácido ferúlico, 9 = ácido cafeico, 10 = ácido sinápico, 11 = (-)-epicatequina, 12 = (+)-catequina, 13 = ácido clorogénico, 14 = quercetina, 15 = miricetina, 16 = galato de (-)-epicatequina. La línea roja muestra la variación de la temperatura del horno.

**Tabla 11.** Parámetros para la identificación de fenólicos trimetilsililados por GC-MS.

Compuesto fenólico	t <sub>R</sub> (min)	RI	Iones característicos (m/z)*	nTMS	MW <sub>deriv</sub>
Ác. benzoico	8.75	1251	179, 105, 77, 135, 180, 51, 194	1	194
Ác. <i>trans</i> -cinámico	12.96	1547	131, 205, 103, 161, 77, 75, 220	1	220
Ác. vanílico	15.52	1775	297, 73, 312, 267, 223, 253, 312	2	312
Ác. protocatecuico	16.14	1835	73, 193, 370, 45, 355, 194	3	370
Ác. siríngico	16.92	1912	327, 312, 297, 73, 253, 342	2	342
Ác. <i>p</i> -cumárico	17.29	1949	73, 308, 293, 219, 75, 309	2	308
Ác. gálico	17.58	1979	281, 458, 73, 443, 459, 282	4	458
Ác. ferúlico	18.70	2105	338, 323, 308, 73, 249, 293	2	338
Ác. cafeico	19.06	2154	396, 219, 73, 397, 381, 398	3	396
Ác. sinápico	19.77	2259	368, 338, 73, 353, 369, 339	2	368
(-)-epicatequina	22.70	2896	73, 368, 369, 355, 370, 649	5	650
(+)-catequina	22.79	2918	73, 368, 369, 355, 370, 649	5	650
Ác. clorogénico	23.88	3170	73, 345, 255, 307, 147, 207, 191	6	786
Quercetina	24.18	3228	575, 576, 73, 577, 647, 487	5	662
Miricetina	24.46	3280	73, 735, 736, 737, 647, 75	6	750
Galato de (-)-epicatequina	30.28	3887	207, 281, 73, 44, 560	7	946

\*La intensidad de los picos disminuye de izquierda a derecha. Los iones en negrita se usaron para en análisis por SIM.

nTMS: número de grupos trimetilsilil esterificados en los OH del compuesto fenólico.

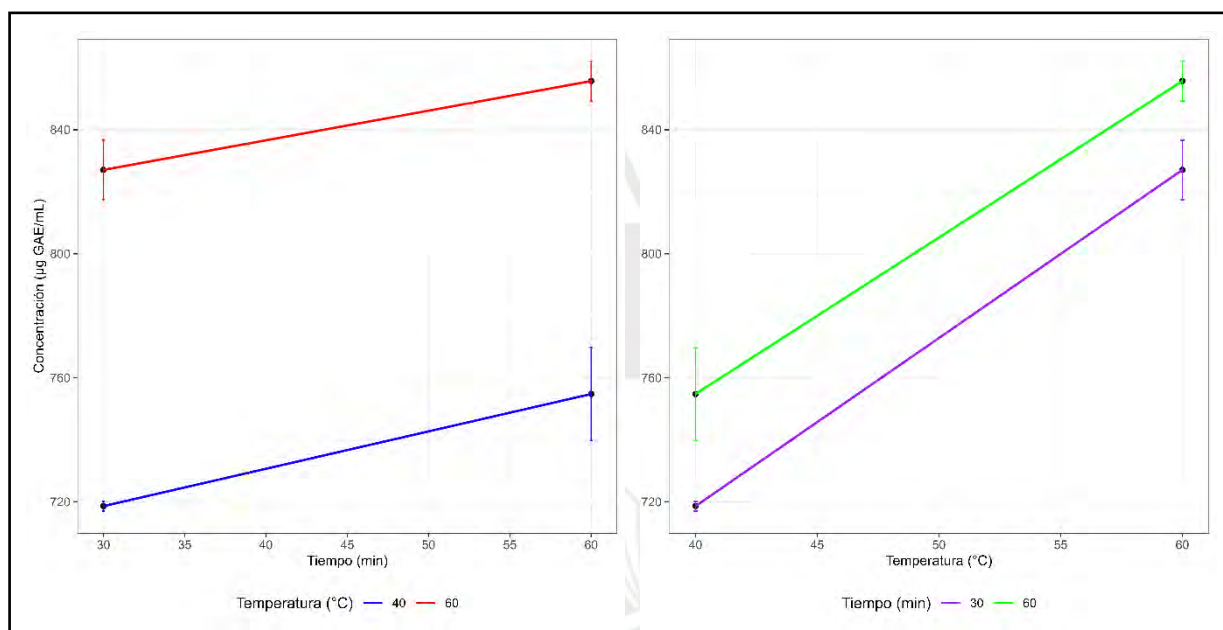
MW<sub>deriv</sub>: masa molecular estimada de los ésteres trimetilsilílicos de los compuestos fenólicos.

### 4.3. Procesamiento de muestras

#### 4.3.1. Optimización de la extracción cruda

Las condiciones de extracción cruda fueron evaluadas variando el tiempo y la temperatura, usando cáscaras del morfotipo “Color”. Se elaboró un diseño factorial 2<sup>2</sup> con los niveles 30 - 60 min y 40 - 60°C. La variable respuesta fue el TPC, manteniendo constante la relación de extracción de 1 g de cáscaras liofilizadas y blanqueadas con 10 mL de metanol al 80%, por duplicado. Se usó el método de mínimos cuadrados estándar para el cribado de los efectos del modelo ajustado con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Se obtuvo un R<sup>2</sup> de 0.985 coincidente con el R<sup>2</sup><sub>adj</sub> (0.974), demostrando un correcto grado de ajuste del modelo. Según los resultados del ANOVA, el tiempo y la temperatura fueron estadísticamente significativos, siendo la temperatura el factor de mayor efecto sobre la variabilidad de TPC. No obstante, la interacción de ambos no fue significativa en los rangos elegidos (Tabla A2, ver Anexos).

La Figura 20 muestra los perfiles de interacción de los factores. Es evidente que a 60 °C y a 60 min se obtiene un mayor TPC. No obstante, dada la advertencia de que un incremento de la temperatura podría implicar la degradación y conversión de algunos fenólicos (Wrolstad, 2001), se inspeccionaron los cromatogramas de dos extractos a 60°C y a temperatura ambiente por 60 min. No se observaron variaciones en el perfil de los compuestos extraídos en relación a los tiempos de retención. La única diferencia se percibió en la intensidad de los picos, ya que aquellos pertenecientes al extracto a 60°C tuvieron una mayor altura; *i. e.*, un mayor contenido.



**Figura 20.** Perfiles de interacción del tiempo y temperatura de extracción de fenólicos. GAE = equivalentes de ácido gálico. Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de los promedios (n=3).

Adicionalmente, se determinó el TPC de tres extracciones crudas sucesivas. Se obtuvo que una primera extracción a 60°C por 60 min permite un TPC de  $16.4 \pm 0.3$  mg GAE/g DW, una segunda,  $5.1 \pm 0.3$  mg GAE/g DW, mientras que la tercera extracción da un TPC solo de  $2.5 \pm 0.2$  mg GAE/g DW, (los promedios (n=3) fueron estadísticamente diferentes mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )). Asimismo, se evaluó si la extracción adicional altera el perfil cromatográfico del extracto por HPLC-DAD. La Figura A4 (ver Anexos) muestra que la única variación entre los tres extractos sucesivos se da en la altura de los picos, lo cual estaría correlacionado con la concentración de estos. En consecuencia, se decidió realizar la extracción cruda de las cáscaras por duplicado a 60°C por 60 min para los análisis posteriores.

#### 4.3.2. Optimización del desengrasado

Tras el pelado, algunos remanentes de la pulpa quedan fijos en las cáscaras. Estos, junto al propio contenido lipídico de las cáscaras, podrían aportar al contenido total de sustancias liposolubles, ya sea en forma de ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos como tocoferoles y carotenoides (Escriche et al., 1999; Koolen et al., 2013; Pereira-Freire et al., 2016, 2018). La sonicación con metanol al 80 % a 60 °C podría desorganizar algunas estructuras complejas que contengan a estos componentes liposolubles, y disolverlas parcialmente (Krygier et al., 1982). Estos metabolitos podrían, por una parte, contaminar los extractos y, consecuentemente, sobreestimar los valores de TPC y ORAC, ya que se sabe que los tocoferoles y carotenoides también son antioxidantes. Además, los lípidos podrían ensuciar la columna cromatográfica e ir acumulándose en perjuicio de la resolución de las separaciones analíticas.

Se propuso realizar la extracción de las sustancias liposolubles totales (TLS) como pretratamiento de las cáscaras, considerando algunos trabajos previos (Cândido et al., 2015; Rudke et al., 2019, 2021). Se evaluaron tres extracciones sucesivas por sonicación a temperatura ambiente, usando *n*-hexano por 30 min, y manteniendo la relación de 1 g de cáscaras liofilizadas y blanqueadas con 20 mL de solvente. Los extractos se evaporaron a sequedad para poder obtener la masa total de las sustancias liposolubles extraídas. El color amarillento intenso de estos sería indicativo de la presencia de carotenoides. Con una primera extracción se obtuvo  $4.8 \pm 1.1$ , con una segunda,  $2.8 \pm 0.7$ , y con una tercera,  $1.4 \pm 0.3$  mg TLS/g DW (los promedios ( $n=3$ ) fueron estadísticamente diferentes mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )). La primera extracción y la segunda presentaron mayores absorbancias a 200 y 450 nm. En la región UV, es posible que los compuestos liposolubles con enlaces conjugados (*e. g.*, tocoferoles, carotenoides y ácidos grasos insaturados) presenten absortividad; mientras que a 400-500 nm los carotenoides sí absorben (Figura A5, ver Anexos).

Se realizó una inspección por TLC de un extracto crudo con y sin desengrasado. Se observó que las bandas separadas a lo largo de la placa son visualmente disminuidas (Figura A6 de Anexos). No obstante, se vieron ciertas manchas tenues remanentes que podrían corresponder a otras sustancias de baja polaridad arrastradas durante la obtención de FL, por lo que se planteó realizar una limpieza final más fina por extracción en fase sólida (ver 1.2.2.4.) También se corroboró por HPLC-DAD que el perfil de los cromatogramas del extracto crudo con y sin desengrasado no varían (no se muestran). Con esto, se decidió que dos extracciones sucesivas con *n*-hexano serían suficientes para desengrasar las cáscaras antes de la extracción cruda.

### 4.3.3. Optimización de la obtención de fracciones

#### 4.3.3.1. Evaluación de SPE para la obtención de FL

La primera propuesta para la separación de los fenólicos libres fue la extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos RP-18 en vez de la extracción líquido-líquido (LLE). Para ese caso, los solventes acuosos estuvieron acidificados a pH 2 con HCl 6 M y se usó el extracto crudo sin desengrasar diluido hasta una concentración de metanol del 10 % (de cáscaras del morfortipo “Color”). Luego de acondicionar el cartucho con metanol, agua Milli-Q® y metanol al 10 %, se cargó la muestra y se lavó con metanol al 10 %, para luego obtener tres eluatos: el primero con metanol al 40%, el segundo al 70 % y el tercero con metanol absoluto. El TPC se distribuyó aproximadamente con un 29 % para la fracción no retenida, el 17 % para la fracción de lavado, el 31 % para el eluato con metanol al 40 %, y el 23 % para el eluato con metanol al 70%, dado que el eluato con metanol absoluto no mostró un TPC diferente al blanco. Cabe precisar que, tras estas extracciones, los cartuchos quedaron amarillentos antes de obtener el tercer eluato.

Como no se pudo observar con claridad la presencia de manchas indicativas de fenólicos por TLC, debido a su poca concentración en las fracciones eluidas, se realizó un análisis por HPLC-DAD (Tabla A1, ver Anexos). Al comparar con el cromatograma del extracto crudo sin desengrasar (Figura A7, ver Anexos), se apreció que el eluato con metanol al 40% contenía la mayor cantidad de fenólicos que salen de la columna a la mitad de la corrida en el extracto crudo. Estos corresponderían a fenólicos con una polaridad media, mientras que los más polares se van en la fracción no retenida. Así, los analitos con mayor polaridad salen a los primeros minutos. Además, en la fracción no retenida, no se apreciaron picos entre 20-44 min, pero sí una elevación de la línea base al final de la corrida, durante el lavado de la columna, lo que podría implicar la presencia de compuestos liposolubles contaminantes. Se visualizó también que la fracción de lavado arrastró algunos compuestos fenólicos que salieron en la fracción no retenida y el primer eluato. Dada la pobre selectividad de la matriz RP-18 para los fenólicos de diferentes polaridades, se decidió por la LLE con acetato de etilo para obtener FL.

#### 4.3.3.2. Optimización de la LLE

Algunos parámetros para la obtención de la FL mediante LLE fueron optimizados. Para ello se usó un extracto crudo de cáscaras sin desengrasar del morfortipo “Color”. Se probó si el uso de una partición con una mezcla de acetato de etilo/éter dietílico 1:1 (v/v) era mejor que solo con acetato de etilo, y si era necesario desengrasar la fracción FL antes de la partición, tal como se

propone en la literatura (Krygier et al., 1982). Con respecto a lo primero, se apreció mediante TLC que la cantidad de manchas presentes en la separación de fenólicos no diverge entre ambos tratamientos; es decir que el acetato de etilo estaría extrayendo los mismos compuestos que cuando se usa combinándolo con éter dietílico. Lo que sí fue evidente es que, en todos los casos, el frente del solvente tuvo una coloración amarillenta, muy probablemente debido a la presencia de contaminantes liposolubles. Al inspeccionar las fracciones FL por HPLC-DAD (Tabla A1, ver anexos) se observó que, si bien el perfil cromatográfico no se ve alterado al usar acetato de etilo/éter dietílico, algunos picos poseen una menor altura que cuando se usa solamente acetato de etilo. Esto implicaría que, con acetato de etilo, la fracción FL tiene una mayor concentración de ciertos fenólicos (Figura A8, ver en Anexos).

En segundo lugar, el desengrasado para la obtención de FL se llevó a cabo luego de acidificar el extracto crudo acuoso concentrado. Se realizaron tres particiones con *n*-hexano usando una relación extractiva de 1:1 (v/v) por vez. El sobrenadante apolar se concentró a sequedad y se redisolvió en diclorometano. El análisis por TLC muestra que el desengrasado previo a la partición de los fenólicos libres permite disminuir ciertas manchas que podrían corresponder a contaminantes liposolubles (Figura A9, ver Anexos). Esto es más evidente en la TLC para la separación de fenólicos, donde casi no está presente la mancha amarilla en el frente del solvente. Además, el análisis por HPLC-DAD mostró que el perfil cromatográfico de los FL no se altera durante el desengrasado; no obstante, la principal diferencia se aprecia en los minutos de lavado de la columna, donde una mayor cantidad de picos aparecen para la fracción de fenólicos sin desengrasar, *i. e.* un posible indicativo de contaminantes liposolubles. Se hicieron pruebas similares para FI, en donde se evaluó si la hidrólisis afecta a la presencia de compuestos de muy baja polaridad; no obstante, la fracción de *n*-hexano no presentó manchas en la TLC (Figura A9, ver Anexos), y tampoco se vieron diferencias entre FI sin y con desengrasado por HPLC-DAD. En consecuencia, se decidió que la partición para la obtención de FL se realice con acetato de etilo y que convendría una etapa final de desengrasado para eliminar la mayor cantidad de contaminantes liposolubles.

#### ***4.3.3.3. Comparación entre SPE y LLE para el fraccionamiento***

Por otra parte, en la literatura no se encontraron comparaciones de la eficacia de la purificación por RP-18 y LLE en el análisis de las fracciones de fenólicos libres y post hidrólisis. Por ende, se propuso evaluar una nueva secuencia de SPE RP-18 versus LLE para la obtención de FL, partiendo del extracto crudo sin desengrasar de las cáscaras del morfolito "Color". También

se comparó el efecto de la SPE RP-18 en la retención de los fenólicos liberados tras la hidrólisis secuencial. En tal caso, la SPE RP-18 consistió en un acondicionamiento de los cartuchos con metanol y agua Milli-Q® a pH 2 con HCl 6 M, una carga de 2 mL del extracto acuoso concentrado y acidificado a pH 2 con HCl 6 M, un lavado con agua a pH 2 y una elución con metanol. La LLE se realizó únicamente con acetato de etilo y sin desengrasar. Ambas fracciones se evaporaron a sequedad y se redisolviéron en metanol.

Los resultados de TLC muestran que hay pocas manchas en FL por SPE, a diferencia de LLE donde son más intensas (Figura A10, ver Anexos). En los resultados por HPLC-DAD, parece replicarse lo visto en las primeras pruebas con SPE. La SPE no es muy selectiva para fenólicos polares; por lo que la mayoría de estos se van en la fracción no retenida. Al comparar los eluatos con metanol al 40% versus con solo metanol, la principal diferencia radica en la presencia de más picos durante el lavado de la columna cuando el solvente no es acuoso. Esto podría deberse a que el metanol estaría disolviendo contaminantes liposolubles (Figura A11, ver Anexos). También se aprecia que la LLE concentra más fenólicos. Incluso se observan algunos picos que salen en la fracción no retenida de la SPE y que, en el tiempo de lavado de la columna, existe una mayor suciedad en la fracción obtenida por LLE (Figura A12, ver Anexos).

Finalmente, se obtuvieron las fracciones FE tanto de la fracción no retenida de la SPE como de la fase acuosa de la LLE usada para obtener FL. Los resultados más importantes se muestran en la Figura A13 (ver Anexos). En esencia, la FE de LLE tuvo una mayor cantidad de picos que de SPE, ya que la fase acuosa de la LLE tuvo una mayor cantidad de picos correspondientes a fenólicos que fueron hidrolizados. En resumen, los dos métodos de fraccionamiento ofrecen diferentes resultados que podrían ser coincidentes para la obtención de algunos compuestos fenólicos objetivo. Sin embargo, se observó que la matriz RP-18 de los cartuchos no retiene bien fenólicos polares. Consecuentemente, un número reducido de analitos serán hidrolizados. En tal caso, se decidió continuar con el método LLE durante el abordaje de hidrólisis secuencial para la obtención de las fracciones FL, FE, FG y FI.

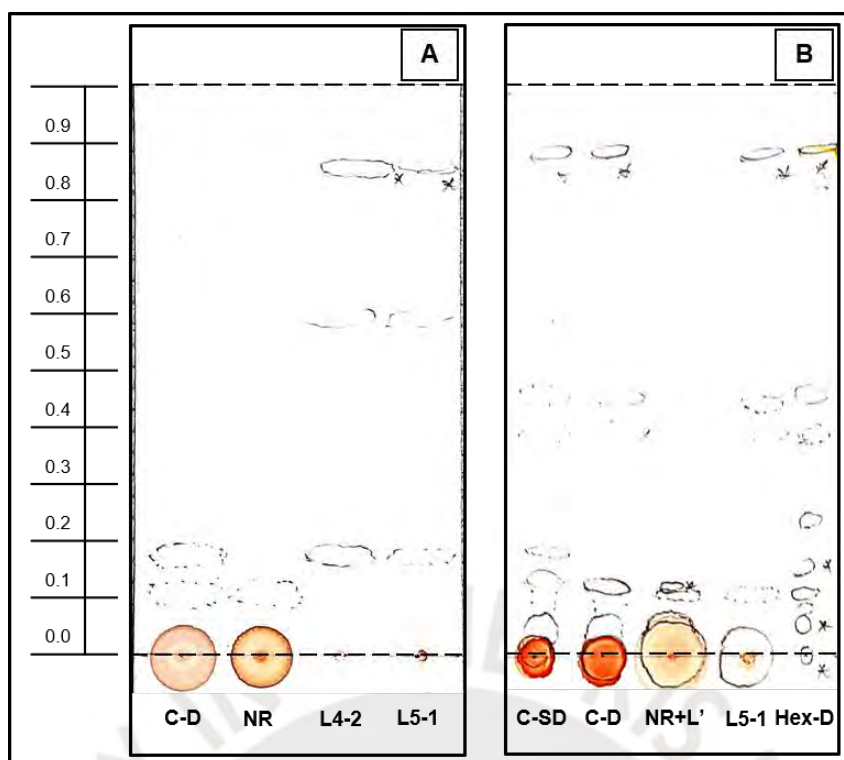
#### **4.3.4. Limpieza final de contaminantes liposolubles por SPE**

Se propuso la limpieza final del extracto crudo desengrasado mediante SPE RP-18 según lo descrito en la literatura (Xia et al., 2011). Inicialmente, se probó que el volumen de carga del extracto (8 mL) no saturaba la matriz RP-18 con los compuestos liposolubles remanentes, mediante TLC usando la fase móvil PE(AA) (no se muestra). No se observaron manchas en la corrida que pudieran significar el arrastre de sustancias de baja polaridad. Sí se visualizó que

la matriz, luego del lavado, quedó con una coloración amarillenta, lo que implica la presencia de tales contaminantes remanentes.

Al comparar por TLC las fracciones de lavado secadas y redisueltas en metanol (Figura 21A), el extracto crudo desengrasado tuvo aún una mancha que coincide con una de las manchas que aparece en los lavados, tras hacer pasar las alícuotas del extracto por el cartucho SPE. También se observaron otras manchas superiores ( $R_f$  ca. 0.5-0.9) en la fracción de lavado pero que no aparecieron en la del extracto crudo, posiblemente por estar más diluidas. En cambio, estas manchas no se apreciaron en la fracción no retenida, la cual sería la fracción de fenólicos totales sin presencia de los contaminantes liposolubles. Cabe precisar que dichas manchas se observaron más intensas en el extracto crudo sin desengrasar, indicativo de que habría más de estas sustancias contaminantes de baja polaridad.

En la Figura 21B se muestra cómo, tras concentrar los extractos crudos desengrasado y sin desengrasar, aparecen más manchas que coinciden con algunas de la fracción de lavado. Algunas de estas también coincidirían con la fracción de *n*-hexano obtenido tras el desengrasado inicial de las cáscaras. Por otra parte, la mezcla de la fracción no retenida junto con un lavado adicional con metanol al 80%, antes del lavado con metanol absoluto, solo muestra una banda a 366 nm, lo cual podría corresponder a uno o varios fenólicos concentrados en la fracción. Al comparar por HPLC-DAD el extracto crudo desengrasado antes y después de la limpieza por SPE, no se encontraron diferencias. Así se pudo concluir que el paso por SPE RP-18 sí permitió limpiar los remanentes liposolubles del extracto crudo desengrasado.

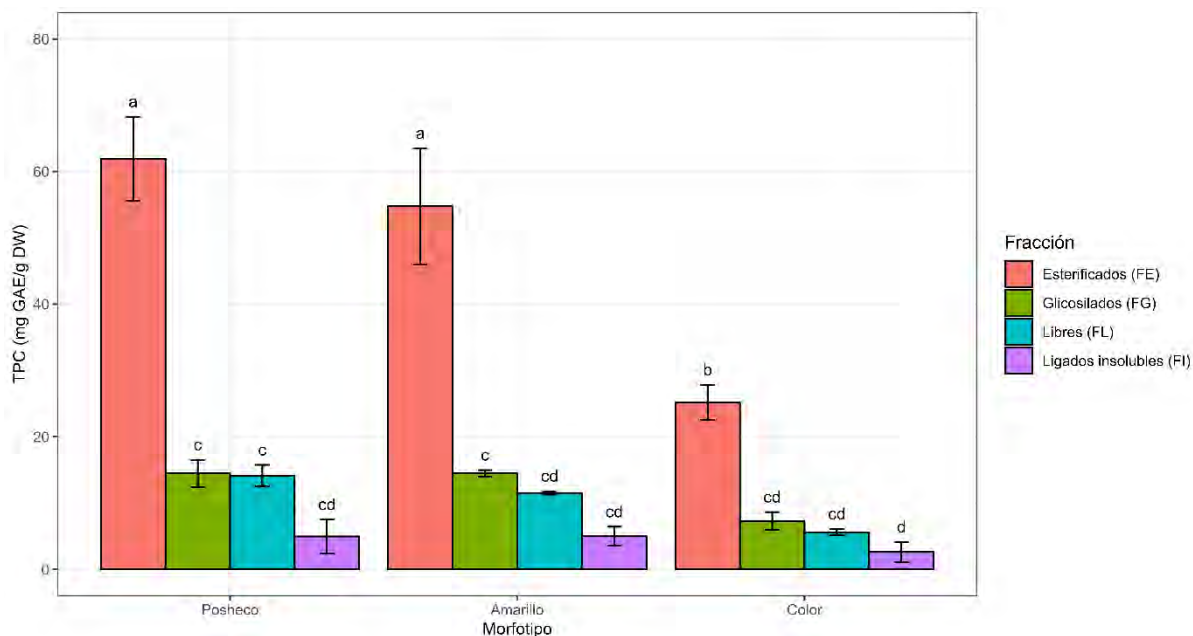


**Figura 21.** TLC de la remoción de contaminantes liposolubles del extracto. Se usó la fase móvil PE(AA) (éter de petróleo (40-60°C): éter dietílico: ácido acético = 84:15:1 (v/v)). Las marcas se realizaron a 254 nm. Las bandas con asterisco se observaron también a 366 nm. **A.** Las fracciones de lavado (L4-2, cuando se cargó 8 mL de extracto crudo en alícuotas de 2 mL, y L5-1, cuando se cargó 5 mL en alícuotas de 1 mL) en la SPE muestran manchas que podrían ser contaminantes liposolubles. El extracto crudo desengrasado (C-D) también podría contenerlas, mientras que la fracción no retenida (NR), no (20  $\mu$ L aplicados) **B.** La fracción L5-1 contiene algunas manchas del extracto del desengrasado (Hex-D), también presentes en los extractos crudos desengrasado (C-D) y sin desengrasar (C-SD). No se apreciaron en la mezcla del no retenido (NR) + un lavado adicional (L') con metanol al 80% (30  $\mu$ L aplicados).

#### 4.4. Comparación de fracciones hidrolizadas

##### 4.4.1. Contenido total de fenólicos

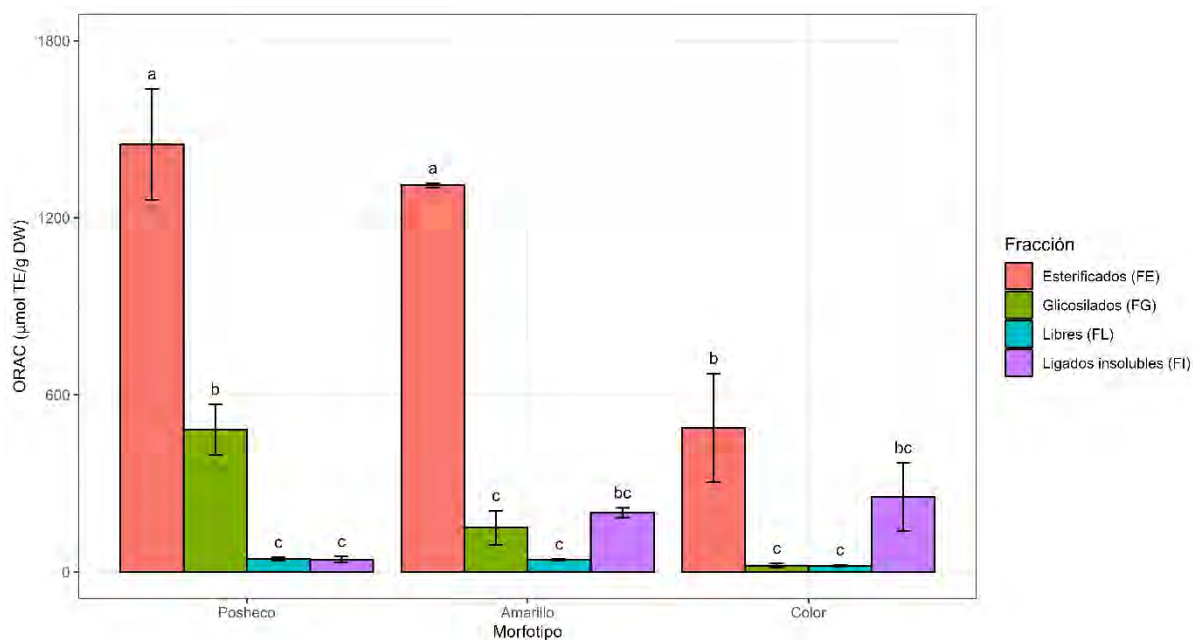
La Figura 22 muestra la distribución del TPC de las fracciones según el morfotipo. La mayor cantidad de fenólicos de las cáscaras se encuentra en forma de ésteres en todos los morfotipos. No se aprecia diferencia significativa entre FG y FL. Los ligados insolubles tendrían un menor TPC promedio. El mayor TPC se visualiza para el morfotipo “Posheco” y “Amarillo”, sin diferencias significativas para cada fracción. En general, “Color” tendría el menor TPC de los morfotipos. En adición, se obtuvieron TPC promedios ( $n=3$ ) de los extractos crudos de  $56.2 \pm 1.9$ ,  $52.6 \pm 0.5$  y  $21.1 \pm 2.3$  mg GAE/g DW para los morfotipos “Posheco”, “Amarillo” y “Color”, respectivamente. Los valores de TPC de “Posheco” y “Amarillo” fueron similares, pero estadísticamente diferentes con respecto al TPC de “Color”.



**Figura 22.** Contenido total de fenólicos (TPC) de las fracciones de las cáscaras. Los valores son promedios ( $n=3$ ) y las barras de error reflejan la desviación estándar. Las letras distintas implican diferencias significativas entre los TPC de las fracciones mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.4.2. Capacidad antioxidante

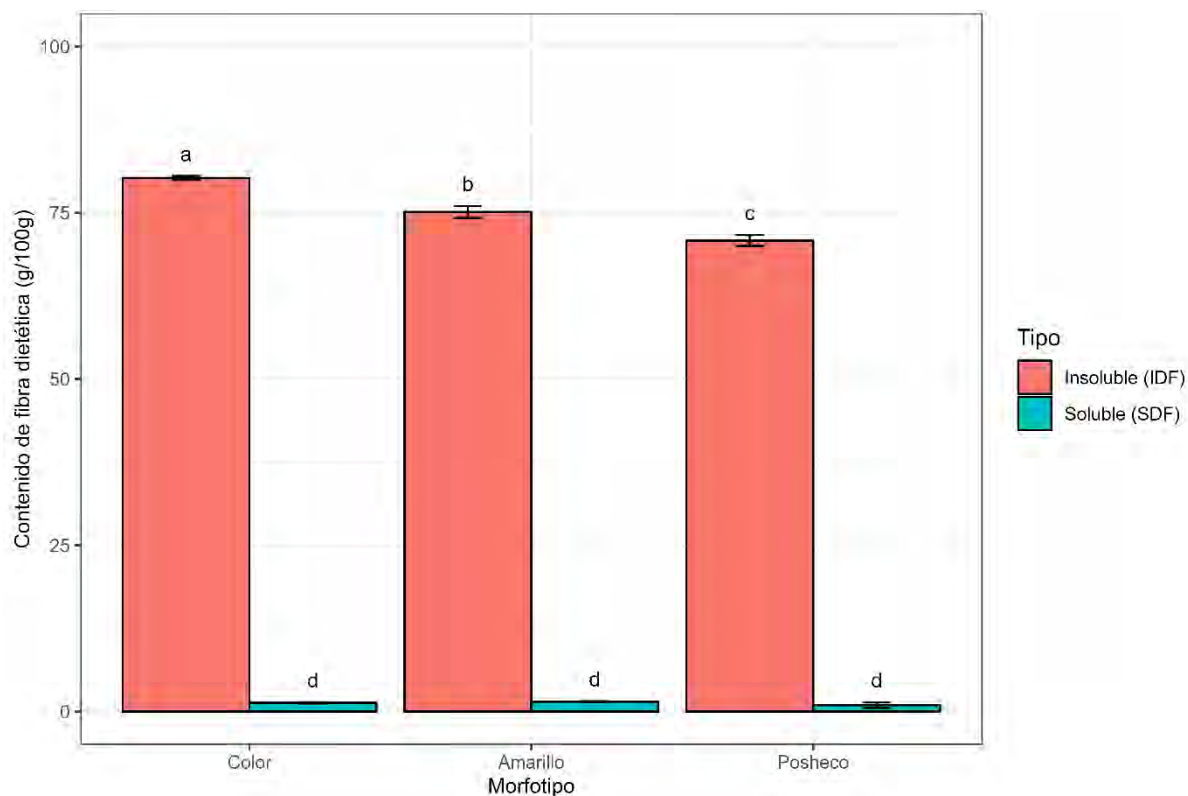
La Figura 23 muestra los valores ORAC-PGR de las fracciones. En los morfotipos “Posheco” y “Amarillo”, la fracción FE posee la mayor capacidad antioxidante (CA), sin diferencia significativa entre ambos; no obstante, el valor CA de esta fracción no es significativamente distinta con respecto a la de la fracción FI del morfotipo “Color”. Los menores valores se registran en las fracciones FG y FL para “Amarillo” y “Color”, mientras que en “Posheco”, FG y FI poseen las menores CA. En general, se observa que “Posheco” y “Amarillo” tendrían mayores capacidades antioxidantes que “Color”. Finalmente, al realizar el análisis de correlación de Pearson entre los promedios de TPC y ORAC-PGR, se obtiene un coeficiente  $R = 0.954$  ( $p < 0.05$ ), lo cual indica que ambos parámetros poseen una correlación positiva estadísticamente significativa.



**Figura 23.** Capacidad antioxidante (ORAC-PGR) de las fracciones de las cáscaras. Los valores son promedios ( $n=3$ ) y las barras de error reflejan la desviación estándar. Las letras distintas implican diferencias significativas entre los TPC de las fracciones mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.4.3. Fibra dietética

El contenido de fibra dietética soluble (IDF) e insoluble (IDF) de las cáscaras se muestra en la Figura 24. Las cáscaras de los frutos del aguaje poseen un contenido de fibra dietética insoluble muy superior a la soluble en todos los morfotipos. Particularmente, las cáscaras del aguaje “Color” ( $85.3 \pm 0.2$  g/100g DW) poseen un mayor contenido de fibra dietética insoluble, seguido del “Amarillo” ( $79.9 \pm 0.9$  g/100g DW) y el “Posheco” ( $76 \pm 2$  g/100g DW). Entre los tres, la cantidad de SDF no es significativamente diferente (*ca.* 1.6 g/100g DW).



**Figura 24.** Contenido de fibra dietética de las cáscaras de aguajes. Los valores son promedios ( $n=3$ ) y las barras de error reflejan la desviación estándar. Las letras distintas implican diferencias significativas entre los TPC de las fracciones mediante la prueba post-hoc de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.4.4. Análisis por TLC

La Figura 25 muestra los resultados del análisis por TLC de las fracciones. En general, los perfiles cromatográficos de los morfotipos son similares entre sí, y muestran la misma cantidad de bandas. En general, algunas de estas estuvieron retrasadas con respecto a la corrida del *pool* de estándares. Aun así, las coloraciones en las diferentes visualizaciones y sus posiciones relativas permitieron sugerir la presencia de algunos fenólicos (Tabla 12). Ciertas bandas se apreciaron difusas, por lo que la asignación fue tentativa. Así mismo, se observaron manchas que no corresponden a los estándares, lo cual podría implicar la presencia de otros fenólicos.

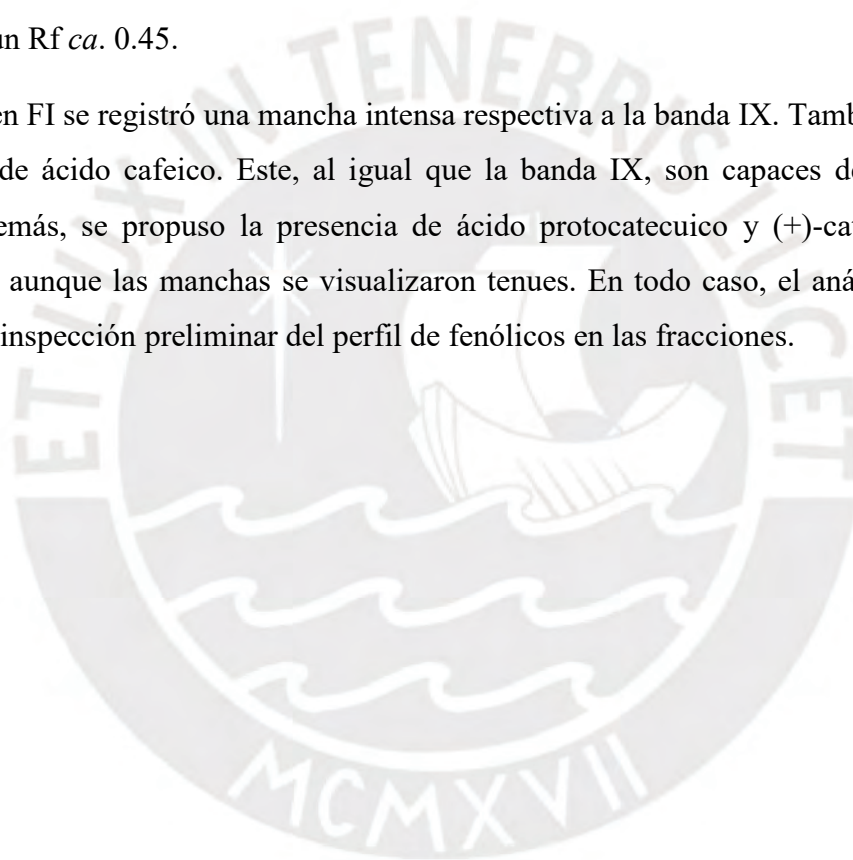
En FL se pudo proponer la presencia de ácido *trans*-cinámico o benzoico, ya que hubo una mancha bastante tenue con  $R_f$  ca. 0.9. Con respecto a la mancha con  $R_f$  ca. 0.8, se sugirió que podría tratarse de alguno de los fenólicos de la banda IX, visible a 366 nm, como ácido ferúlico, vanílico, sinápico, *p*-cumárico o sirínico. También se pudo observar ácido cafeico y protocatecuico en forma libre. Con  $FeCl_3$ , se apreciaron bien los flavan-3-oles como (+)-catequina y (-)-epicatequina. Así mismo, se observó la presencia de ácido clorogénico entre las

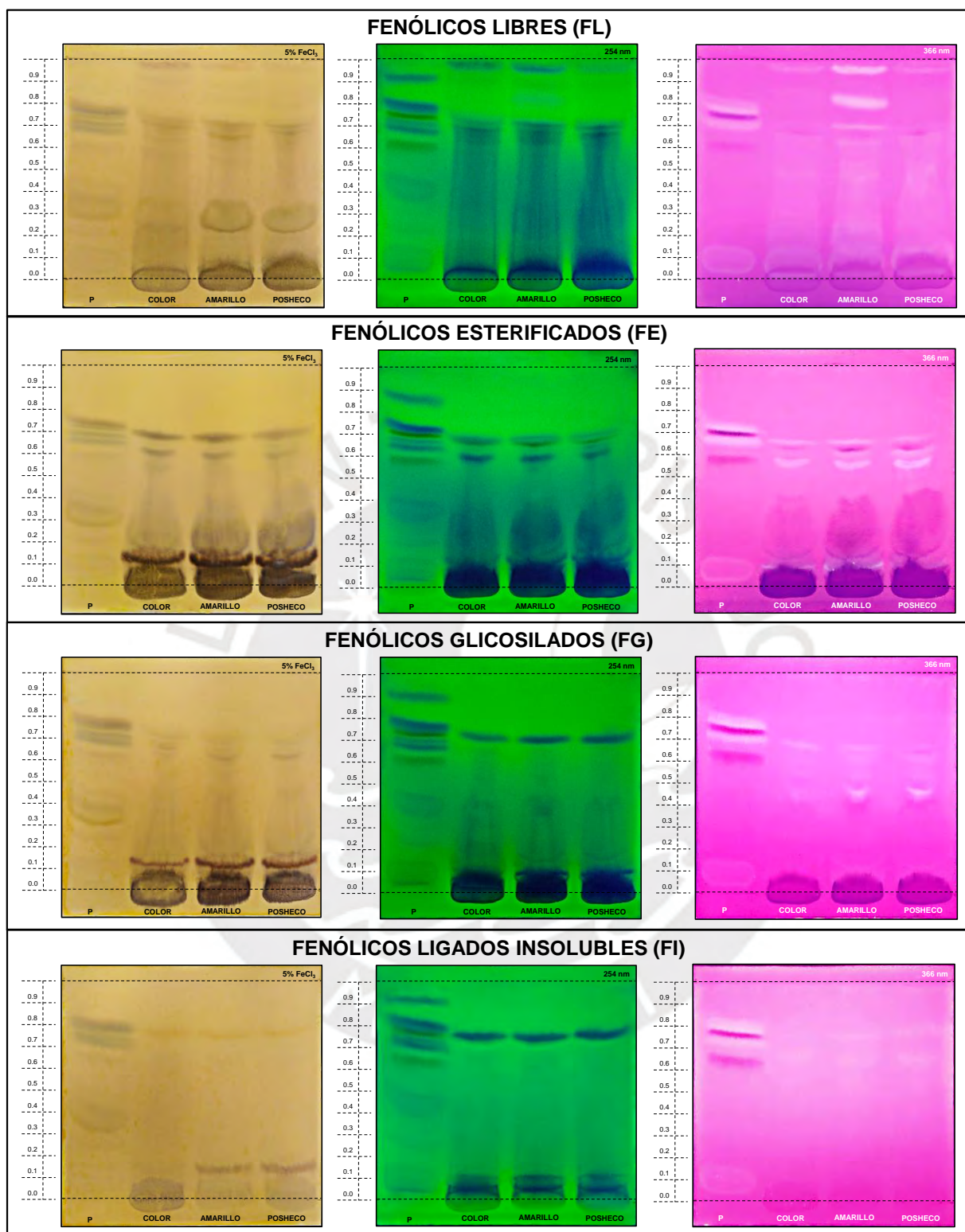
muestras, sobre todo a 366 nm. Finalmente, se registró una banda muy intensa cerca al frente del solvente en las tres muestras, además de otras líneas tenues de otros posibles fenólicos.

En FE fue evidente la banda IX en los tres morfotipos. También se apreció una importante cantidad de quercetina, así como de cafeico y ácido protocateuico. No queda clara la presencia de (+)-catequina o (-)-epicatequina, ya que las manchas son difusas. Adicionalmente, se registró una mancha capaz de fluorescer a 366 nm con un  $R_f$  *ca.* 0.1.

Por otra parte, en FG hubo una importante presencia de la banda IX. Se vieron manchas que podrían corresponder a quercetina, ácido cafeico, ácido protocateuico y (+)-catequina o (-)-epicatequina, en todos los morfotipos. Adicionalmente, se observó una banda fluorescente a 366 nm con un  $R_f$  *ca.* 0.45.

Finalmente, en FI se registró una mancha intensa respectiva a la banda IX. También se sugirió la presencia de ácido cafeico. Este, al igual que la banda IX, son capaces de fluorescer a 366 nm. Además, se propuso la presencia de ácido protocateuico y (+)-catequina o (-)-epicatequina, aunque las manchas se visualizaron tenues. En todo caso, el análisis por TLC permitió una inspección preliminar del perfil de fenólicos en las fracciones.





**Figura 25.** TLC de las fracciones de fenólicos de las cáscaras de aguajes. Las placas de la izquierda se obtuvieron con FeCl<sub>3</sub> al 5% como agente de visualización, las del medio a 254 nm y las de la derecha a 366 nm. P = mezcla de estándares (10 µL). Muestras (50 µL).

**Tabla 12.** Presencia de fenólicos por TLC en las fracciones de las cáscaras.

Banda	Fenólico	Fracción de fenólicos												
		Libres (FL)			Esterificados (FE)			Glicosilados (FG)			Ligados Insolubles (FI)			
		C	A	P	C	A	P	C	A	P	C	A	P	
X	CIN	+	+	+										
	BEN													
IX	FER	+	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	VAN													
	SIN													
	CUM													
	SIR													
VIII	QUE				++	+++	++	+	+	+				
VII	CAF	+	+++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
VI	PRO	++	+++	++	++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+
V	MIR													
IV	GAL													
III	CAT	++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EPI													
II	ECG													
I	CLO	+++	+++	+++										

**Fenólicos:** CIN = ác. *trans*-cinámico; BEN = ác. benzoico; FER = ác. ferúlico; VAN = ác. vanílico; SIN = ác. sinápico; CUM = ác. *p*-cumárico; SIR = ác. siríngico; QUE = quercetina; CAF = ác. cafeico; PRO = ác. protocatecuico; MIR = miricetina; GAL = ác. gálico; CAT = (+)-catequina; EPI = (-)-epicatequina; ECG = galato de (-)-epicatequina; CLO = ác. clorogénico.

**Morfotipos:** C = “Color”; A = “Amarillo”; P = “Posheco”.

**Presencia:** +++ = alta; ++ = media; + = baja o posible

#### 4.4.5. Análisis por HPLC-DAD

La Figura 26 muestra los cromatogramas de las fracciones de fenólicos a partir de las cáscaras del morfotipo “Amarillo”. Se obtuvieron resultados similares para los otros dos morfotipos (Figura A14, ver Anexos). En base a los estándares disponibles, la mayoría de las señales principales con mayor altura pudieron ser identificadas. Así, se cuantificaron siete fenólicos en las fracciones FL, 8 en FE, 8 en FG y 9 en FI.

La Figura 16 muestra los resultados de la cuantificación con los valores corregidos de concentración a partir de las recuperaciones de los fenólicos (los valores sin corregir se

muestran en la Figura 15A en Anexos). Con respecto a las fracciones FL, el morfotipo “Posheco” es el que tuvo una mayor concentración de fenólicos, siendo el ácido clorogénico el de mayor presencia ( $371 \pm 35 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de (+)-catequina ( $130 \pm 11 \mu\text{g/g DW}$ ) y (-)-epicatequina ( $85 \pm 11 \mu\text{g/g DW}$ ). Le sigue el morfotipo “Amarillo” con una concentración alta de ácido clorogénico ( $145 \pm 16 \mu\text{g/g DW}$ ) y (+)-catequina ( $180 \pm 33 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de (-)-epicatequina ( $111 \pm 20 \mu\text{g/g DW}$ ). En el morfotipo “Color”, la concentración de estos tres varió, reportándose primero un mayor valor de (-)-epicatequina ( $55 \pm 17 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de ácido clorogénico ( $43 \pm 6 \mu\text{g/g DW}$ ) y (+)-catequina ( $19 \pm 4 \mu\text{g/g DW}$ ). En los tres morfotipos, el ácido cafeico tuvo muy poca concentración. Para el caso de los ácidos vanílico, siríngico y protocatecuico, sus contenidos estuvieron por debajo de los LOQ.

En las fracciones FE, la concentración de los analitos sigue una tendencia similar entre los morfotipos. El de mayor concentración fue la (+)-catequina en “Posheco” ( $308 \pm 19 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de “Amarillo” ( $273 \pm 18 \mu\text{g/g DW}$ ) y “Color” ( $71 \pm 2 \mu\text{g/g DW}$ ). Continúan el ácido sinápico y protocatecuico, cuyos contenidos fueron similares en “Posheco” ( $111 \pm 34$  y  $86 \pm 18 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente) y “Amarillo” ( $107 \pm 46$  y  $93 \pm 7 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente), pero inferiores para “Color” ( $47 \pm 8$  y  $49 \pm 11 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente). Este mismo caso se apreció para quercetina y (-)-epicatequina. La cantidad de ácido siríngico no fue diferente entre los morfotipos, mientras que el ácido cafeico y el vanílico estuvieron por debajo del LOQ.

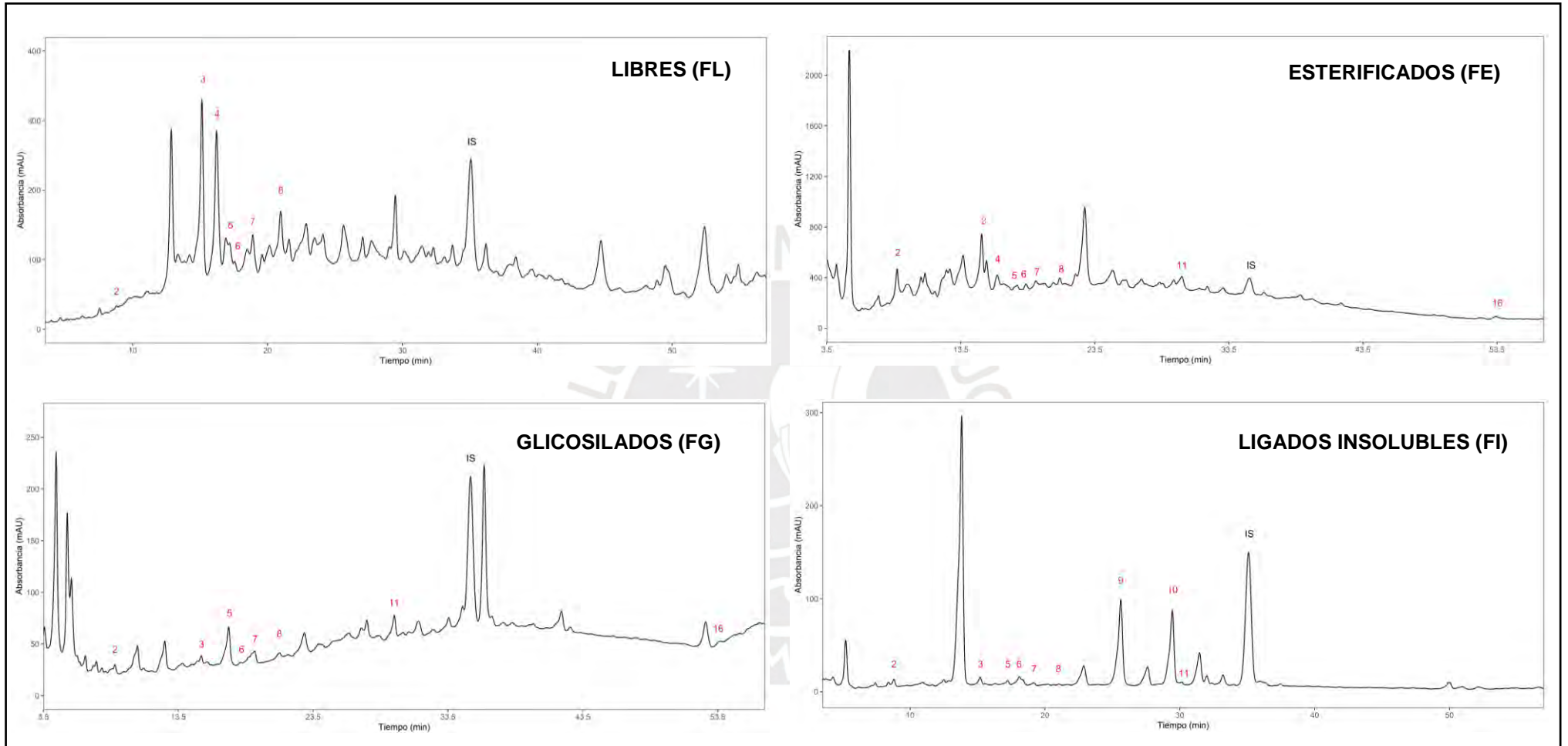
Con respecto a las fracciones FG, el ácido vanílico es el fenólico con mayor concentración entre los compuestos identificados para los tres morfotipos, siendo “Color” ( $19 \pm 5 \mu\text{g/g DW}$ ) y “Amarillo” ( $18 \pm 3 \mu\text{g/g DW}$ ) los de mayores contenidos, seguido de “Posheco” ( $12 \pm 1 \mu\text{g/g DW}$ ). Las cantidades de (+)-catequina, (+)-epicatequina estuvieron por debajo de los LOQ, al igual que el ácido siríngico, sinápico y cafeico, y quercetina entre los morfotipos. No se observaron diferencias significativas en el contenido del ácido protocatecuico.

En las fracciones FI, el mayor contenido de ácido ferúlico se observó en “Amarillo” ( $90 \pm 13 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de “Posheco” ( $75 \pm 6 \mu\text{g/g DW}$ ) y “Color” ( $67 \pm 10 \mu\text{g/g DW}$ ). Con un contenido similar se encontró al ácido *p*-cumárico con promedios sin diferencia significativa en “Amarillo” ( $82 \pm 10 \mu\text{g/g DW}$ ) y “Posheco” ( $76 \pm 6 \mu\text{g/g DW}$ ), pero con un valor menor en “Color” ( $53 \pm 10 \mu\text{g/g DW}$ ). El ácido cafeico y (+)-catequina fueron los siguientes fenólicos identificados con mayores concentraciones, sin diferencias importantes entre “Posheco” ( $33 \pm 3$  y  $40 \pm 2 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente), “Amarillo” ( $32 \pm 4$  y  $26 \pm 6 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente) y “Color” ( $26 \pm 5$  y  $19 \pm 5 \mu\text{g/g DW}$ , respectivamente). Entre los tres

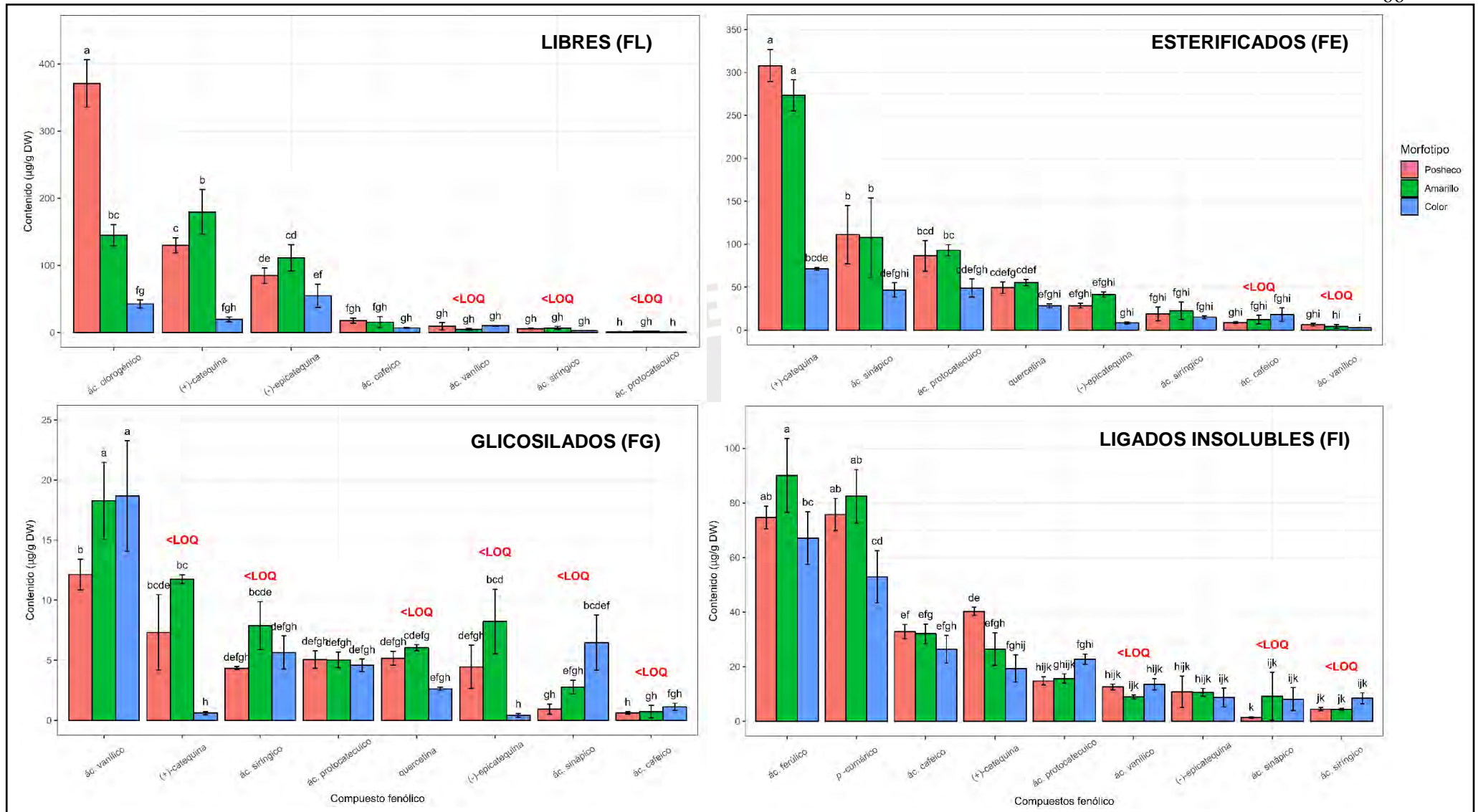
morfotipos, los contenidos de ácido protocateúico y cafeico no mostraron diferencias. Tampoco se apreciaron diferencias entre los ácidos vanílico, siríngico y sinápico, cuyas estimaciones estuvieron por debajo de los LOQ. Finalmente, cabe precisar que para FL, FE, FG y FI los rangos de concentraciones estimados fueron 371-1, 308-3, 19.0-0.4 y 90-1  $\mu\text{g/g DW}$ , respectivamente; por lo que el mayor contenido de los fenólicos identificados correspondió a las dos primeras fracciones.

### 3.1.1. Análisis por GC-MS

El análisis por GC-MS tuvo dos objetivos, primero, corroborar la presencia de los fenólicos cuantificados por HPLC-DAD y, segundo, proponer la existencia de otros compuestos en las fracciones. Así, se observó la misma distribución de los fenólicos en cada una de las muestras para los diferentes morfotipos, lo cual coincidió con lo obtenido en la cuantificación, tal como se puede ver en la Figura 28. Si bien la cantidad de ácido clorogénico en las fracciones FL fue superior o similar a la de (+)-catequina (Figura 27), la señal del flavonoide es menor que la del ácido fenólico en los cromatogramas de los fenólicos trimetilsililados. No obstante, las señales con tiempos de retención mayores que 22.5 min, se vieron disminuidos, probablemente por la alta temperatura (310 °C). Las señales tuvieron valores de  $S/N > 3$ , purezas de los picos  $> 80\%$ , “Match” entre 950-800, y “%Prob.” entre 70-90, por lo que los compuestos se identificaron correctamente con una probabilidad alta de que sus patrones de fragmentación coincidan con los disponibles en la biblioteca NIST. En general, los índices de retención calculados tuvieron alta similaridad con los de los estándares (*ca.*  $\pm 5$ ).



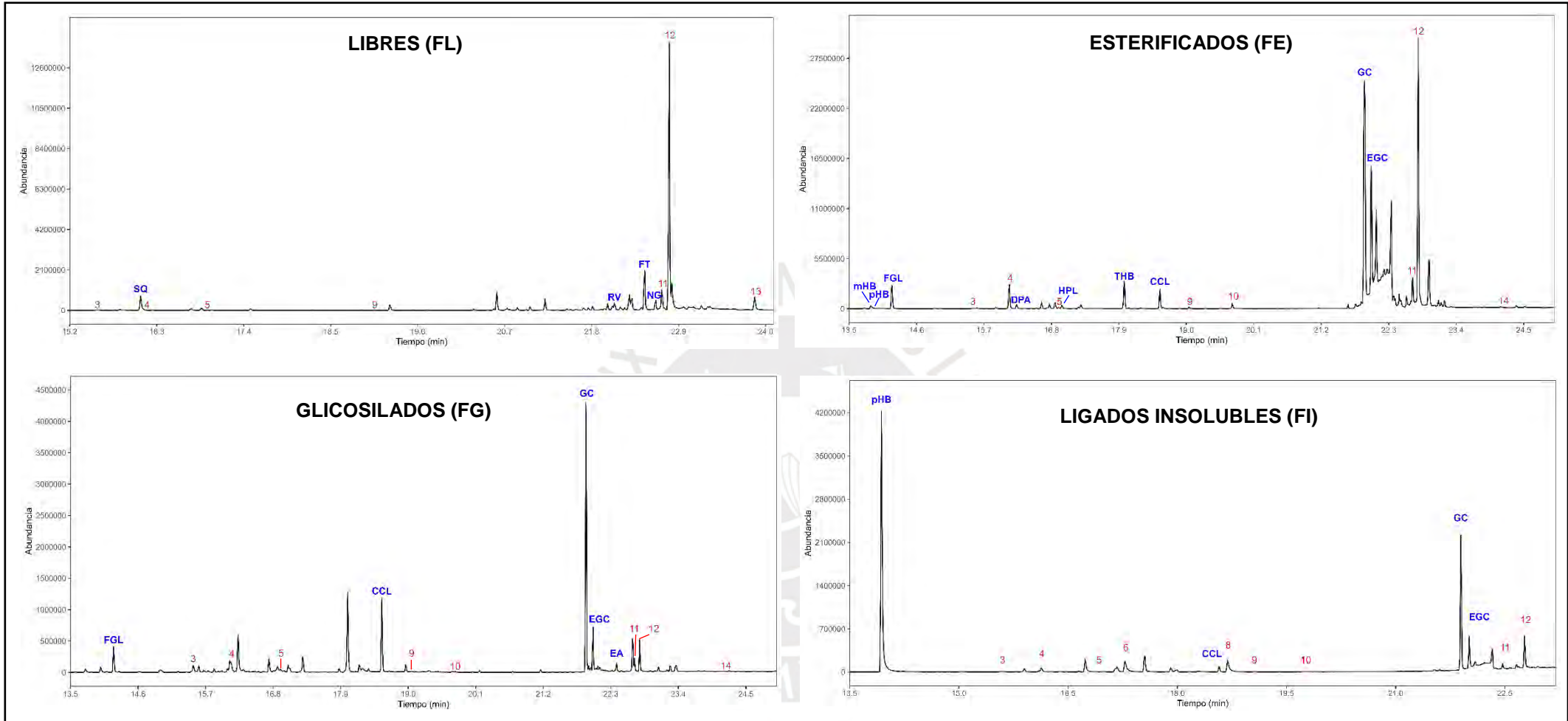
**Figura 26.** Separación por HPLC-DAD (RP) a 280 nm de las fracciones de fenólicos. Se usaron las cáscaras de agujas “Amarillo”. 2 = ácido protocatecuico, 3 = (+)-catequina, 4 = ácido clorogénico, 5 = ácido vanílico, 6 = ácido cafeico, 7 = ácido siríngico, 8 = (-)-epicatequina, 9 = ácido *p*-cumárico, 10 = ácido ferúlico, 11 = ácido sinápico, 16 = quercetina, IS = benzaldehído (estándar interno).



**Figura 27.** Concentración de fenólicos en las fracciones de las cáscaras de agujes. Las barras de error reflejan la desviación estándar de los promedios ( $n=3$ ) corregidos con las recuperaciones. Letras distintas implican diferencias significativas entre los valores mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Se identificaron como posibles compuestos únicamente aquellas señales que cumplieron las condiciones descritas ( $S/N > 3$ , pureza de pico  $> 80\%$ , %Match 950-800, %Prob 70-90) para la mayoría de las señales en los TIC de las fracciones con la biblioteca NIST. Los RI estimados coincidieron con aquellos reportados en dicha base de datos (*ca.*  $\pm 20$ ). Particularmente, para los flavonoles (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina, se tomó como referencia algunos trabajos similares (Kurata & Kajurai, 2011; Moldoveanu, 2014), donde los iones característicos podrían corresponder a los fragmentos ( $m/z$ ):  $738 = [M]^+$ ,  $73 = [Si(CH_3)_3]^+ = [TMS]^+$ ,  $355 = [M - Ph(OTMS)_2CO(C_2H_5)OTMS + H]^+$ ,  $445 = [M - Ph(OTMS)_2(C_2H_5)OTMS + TMS + 2H]^+$ ,  $533 = [M - Ph(OTMS)_2(CH_2) + TMS - CH_3 + 3H]^+$ . Para resveratrol, la literatura permitió proponer los iones derivados (Koyani & Vazquez-duhalt, 2018; K. Zhang & Zuo, 2004):  $562 = [M]^+$ ,  $73 = [TMS]^+$ ,  $355 = [M - Ph(OTMS)(CH_2)_2 - CH_3 + H]^+$ ,  $280 = [M - Ph(OTMS)_3 + TMS - CH_3 + H]^+$ . Para fletina se plantearon los posibles fragmentos en concordancia con algunas publicaciones (Isidorov, 2020; Marsol-Vall et al., 2016):  $444 = [M]^+$ ,  $73 = [TMS]^+$ ,  $429 = [M - CH_3]^+$ ,  $207 = [M - Ph(OTMS) - TMS + H]^+$ . En el caso del ácido eláxico, el patrón de fragmentación coincide con el de otros trabajos (John Wiley & Sons Inc., 2024; Kyriakoudi et al., 2024) y fue:  $590 = [M]^+$ ,  $73 = [TMS]^+$ ,  $575 = [M - CH_3]^+$ . De esta manera, se pudo proponer la identidad de 14 compuestos adicionales en las fracciones, los cuales se resumen en la Tabla 13.

En las fracciones FL, se pudo indicar la posible presencia de ácido siquímico, resveratrol, fletina y naringenina. Particularmente, la presencia del ácido siquímico fue importante en las cáscaras del morfotipo “Color”, a diferencia de los otros dos morfotipos, donde fue baja. Una situación similar ocurrió con la fletina. En las otras tres fracciones de los tres morfotipos, la presencia de los flavonoles (+)-galocatequina y (-)-epicatequina fue muy alta, donde el primero destacó por encima del segundo. La mayor cantidad estimada de (+)-galocatequina correspondería a las fracciones FE, seguido de FG y, finalmente, FI. Tal como se aprecia en la Figura 28, el pico más alto entre las fracciones se identificó en FE, seguido de FL y FG, y con una menor altura, el de FI. En la fracción FE, también se propuso la presencia de los ácidos *m*- y *p*-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilacético, 4-hidroxifeniláctico, y 2,4,6-trihidroxibenzoico, además de floroglucinol y catecolactato. En FG, se pudo proponer la existencia de catecolactato, floroglucinol y ácido eláxico; mientras que, en FI, catecolactato y, sobre todo, ácido *p*-hidroxibenzoico, cuya presencia podría ser abundante, incluso superior a (+)-galocatequina.



**Figura 28.** Separación por GC-MS (TIC) de las fracciones de fenólicos trimetilsililados. Se usó MSTFA para la derivatización de los fenólicos de cáscaras de aguajes “Amarillo”. 3 = ác. vanílico, 4 = ác. protocateúico, 5 = ác. siríngico, 6 = ác. *p*-cumárico, 8 = ác. ferúlico, 9 = ác. cafeico, 10 = ác. sinápico, 11 = (-)-epicatequina, 12 = (+)-catequina, 13 = ác. clorogénico, 14 = quercetina. Identificación propuesta: SQ = ác. siquímico, RV = resveratrol, FT = floretina, NG = naringenina, mHB = ác. *m*-hidroxibenzoico, pHB = ácido *p*-hidroxibenzoico, FGL = floroglucinol, DPA = ác. dihidroxifenilacético, HPL = ác. 4-hidroxifeniláctico, THB = ác. 2,4,6-trihidroxibenzoico, CCL = catecolactato, GC = (+)-galocatequina, EGC = (-)-epigalocatequina, EA = ác. elágico.

**Tabla 13.** Identificación propuesta de otros fenólicos en las cáscaras por GC-MS.

Fracción	Compuesto	MW <sub>deriv</sub>	tr (min)	RI	Iones característicos (m/z)*	Morfortipo**		
						C	A	P
Libres	Ác. siquímico (SQ)	462	16.10	1830	204, 73, 147, 255, 462	++++	+	+
	Resveratrol (RV)	444	22.09	2736	444, 73, 429, 207	+	+	+
	Floretina (FT)	562	22.47	2835	562, 355, 280, 73	+++	++	++
	Naringenina (NG)	488	22.61	2872	296, 488, 73, 179	+	+	+
Esterificados	Ác. <i>m</i> -hidroxibenzoico (mHB)	282	13.86	1620	73, 267, 282, 193	+	+	+
	Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico (pHB)	282	13.99	1632	267, 223, 193, 73, 282	+	+	+
	Floroglucinol (FGL)	342	14.20	1652	342, 327, 73, 147	++	++	++
	Ác. 3,4-dihidroxifenilacético (DPA)	384	16.23	1844	384, 73, 179, 267	+	+	+
	Ác. 4-hidroxifeniláctico (HPL)	398	16.97	1917	308, 179, 73, 147	+	+	+
	Ác. 2,4,6-trihidroxibenzoico (THB)	458	17.99	2023	443, 355, 73, 554, 469	++	++	++
	Catecolactato (CCL)	486	18.57	2089	267, 73, 396, 179, 486	+	+	+
	(+)-galocatequina (GC)	738	21.91	2691	445, 73, 533, 355, 738	++++	++++	++++
	(-)-epigalocatequina (EGC)	738	22.01	2718	445, 73, 533, 355, 738	++	+++	+++
Glicosilados	Floroglucinol (FGL)	342	14.20	1652	342, 327, 73, 147	++	++	++
	Catecolactato (CCL)	486	18.57	2089	267, 73, 396, 179, 486	++	++	++
	(+)-galocatequina (GC)	738	21.90	2688	445, 73, 533, 355, 738	++++	++++	++++
	(-)-epigalocatequina (EGC)	738	22.01	2717	445, 73, 533, 355, 738	++	++	++
	Ác. elágico (EA)	590	22.40	2815	590, 73, 575	+	+	+
Ligados	Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico (pHB)	282	13.94	1627	267, 223, 193, 73, 282	++++	++++	++++
Insolubles	Catecolactato (CCL)	486	18.58	2090	267, 73, 396, 179, 486	+	+	+
	(+)-galocatequina (GC)	738	21.89	2688	445, 73, 533, 355, 738	++++	+++	+++
	(-)-epigalocatequina (EGC)	738	22.01	2717	445, 73, 533, 355, 738	+	++	++

MW<sub>deriv</sub> = masa molecular estimada de los ésteres trimetilsilílicos de los fenólicos.

\*La intensidad de los picos disminuye de izquierda a derecha.

\*\*La presencia de los posibles compuestos identificados fue estimada a partir de las áreas de los picos con respecto al del total de las señales en los cromatogramas.

Presencia: ++++ = Muy abundante; +++ = alta; ++ = regular; + = baja o muy baja.

## 5. Discusión

### 5.1. Consideraciones metodológicas sobre la extracción y la hidrólisis secuencial

#### 5.1.1. Discriminación entre morfotipos

Existen pocos estudios publicados sobre la caracterización fitoquímica de los morfotipos de los frutos del aguaje peruano. Algunas investigaciones han revelado que los mesocarpios de tres morfotipos de aguajes peruanos poseen diferencias en la composición de minerales, contenido total de fenólicos, ácido ascórbico y  $\beta$ -caroteno, así como en la capacidad antioxidante que muestran. (Sotero et al., 2013; Vásquez-Ocmín et al., 2009, 2010). Estas variaciones podrían también evidenciarse en otras partes del fruto, como la cáscara.

Si bien los morfotipos elegidos en este estudio poseen exocarpios con colores diferenciables, en algunos casos dicha clasificación podría no ser exacta. Esto se advirtió cuando algunos frutos clasificados inicialmente por el palmicultor, al pelarlos parecían corresponder más bien a otros morfotipos. Las elecciones definitivas fueron llevadas a cabo en base al tamaño del ejemplar y la forma del exocarpio. Por ejemplo, los “Posheco” fueron más alargados, mientras que los “Amarillo” tuvieron “escamas” más protuberantes (Figura 8). En todo caso, este estudio constituye una investigación pionera en la evaluación de las diferencias fitoquímicas en los morfotipos de las cáscaras de aguajes.

#### 5.1.2. Blanqueamiento, desengrasado y extracción cruda

Uno de los procedimientos clave para el preprocesamiento de las cáscaras fue el blanqueamiento. La presencia de las enzimas polifenoloxidasas, ampliamente distribuidas en las plantas debido a sus funciones de defensa contra patógenos y cicatrización de tejidos (Mayer, 2006; Yoruk & Marshall, 2003), podría desencadenar la degradación de los compuestos fenólicos en las cáscaras durante la extracción, por lo que también se afectarían las propiedades antioxidantes asociadas. En tal caso, la estrategia del *blanching* es importante para el procesamiento de frutas y vegetales. Particularmente, se optó por usar el blanqueamiento *HTST*, ya que el gran contraste de temperaturas por pequeños periodos en un medio húmedo ayuda no solo a desactivar las polifenoloxidasas, sino también a eliminar el microbiota de la superficie del alimento (Abu-Ghannam & Jaiswal, 2015). Se ha reportado que las cáscaras de aguajes conservan mejor el contenido total de fenólicos extraíbles al ser blanqueadas (Resende et al., 2019), así que se optó por blanquear y liofilizar las cáscaras en el presente estudio.

Con respecto a la elección del solvente de extracción, la presencia de múltiples grupos hidroxilo en los esqueletos aromáticos de los fenólicos hace que la polaridad de estos sea media-alta. Un solvente con un índice de polaridad promedio (6.12 en el caso de metanol al 80%) es una alternativa adecuada para solubilizar la mayor cantidad de estos compuestos. Rudke et al. (2021) compararon la extracción de fenólicos asistida por ultrasonido versus Soxhlet en cáscaras de aguajes brasileros, secadas en horno y sin desengrasar. Determinaron el TPC y la capacidad antioxidante (ABTS) de los extractos empleando dos solventes: etanol absoluto y etanol al 50% (v/v). Ellos demostraron que la inclusión de agua en el solvente alcohólico permite obtener un extracto con un mayor TPC (similar a Soxhlet) y capacidad antioxidante (significativamente mayor que con Soxhlet) que solo con etanol. Según el análisis por HPLC-ESI-MS, el etanol acuoso facilitaría la extracción de una mayor cantidad de flavonoides, como la quercetina y la (+)-catequina, y ácidos fenólicos como ácido protocatecuico.

Así mismo, se ha demostrado que el uso de metanol al 80% permite una mayor extracción de compuestos fenólicos que usando solo metanol, etanol al 80% y solo etanol mediante Soxhlet en hojas de abedul (Keinänen, 1993). No obstante, las técnicas convencionales como Soxhlet exigen un importante gasto de solvente, además de una gran cantidad de tiempo y altas temperaturas, lo cual podría degradar el contenido de algunos metabolitos termosensibles (Ismail et al., 2019). En tal caso, el uso de UAE puede garantizar una extracción más rápida, sin un alto gasto de solventes y con buenos rendimientos extractivos. Esto se justifica en que el fenómeno de cavitación acelera la transferencia de masa y calor, permitiendo la disrupción efectiva de las estructuras celulares de las matrices vegetales para la liberación de los compuestos de interés (Soquetta et al., 2018). Consecuentemente, el diseño experimental para la extracción cruda de los fenólicos con metanol al 80% por UAE de las cáscaras permitió conocer que las condiciones adecuadas para un mayor TPC son 60°C por 60 min con un ratio de extracción de 1: 10 m/v.

Las pruebas para la optimización de la etapa de desengrasado y limpieza final con SPE RP-18 mostraron el importante contenido liposoluble de las cáscaras que podría ser un inconveniente durante la separación analítica de los fenólicos, así como en la estimación de AC. Tal como se precisa en la Tabla 2, la presencia de lípidos en las cáscaras podría contaminar o bloquear la columna cromatográfica ya que los solventes usados para la separación de fenólicos poseen una polaridad media-alta (ACN y agua), lo que impide la elución de compuestos liposolubles que podrían ser arrastrados en la extracción con un solvente con un alto contenido alcohólico a 60°C (Krygier et al., 1982; Mencin et al., 2021). Pereira-Freire et al. (2018) mostraron que

las cáscaras poseen un contenido significativo de carotenoides, los cuales también son compuestos antioxidantes que podría sobreestimar los valores de TPC y ORAC reportados. Los resultados de TLC (Figura 14) y espectrofotometría UV-Visible (Figura A5, ver Anexos) dan indicios de la posible presencia de lípidos y de compuestos con enlaces conjugados como tocoferoles, carotenoides y ácidos grasos insaturados.

### 5.1.3. Fraccionamiento e hidrólisis de fenólicos conjugados

Es importante destacar los resultados de la comparación entre LLE y SPE RP-18 para la obtención de fenólicos libres antes de la hidrólisis secuencial. Se pudo apreciar, por TLC y HPLC-DAD, que la técnica SPE RP-18 no es tan selectiva para fenólicos con polaridades altas, ya que estos no se retienen en la matriz de silica octadecil. Una comparación de las recuperaciones de 15 fenólicos por SPE RP-18 y LLE con acetato de etilo demostró que la matriz C18 permite recuperar menos del 10% de los ácidos gálico, protocatecuico y *p*-hidroxibenzoico, y menos del 50% de los ácidos vanílico, cafeico, siríngico y *p*-cumárico, mientras que las recuperaciones de algunos glucósidos de quercetina fueron adecuadas (Y. Wang et al., 2014). En este sentido, si bien la LLE exige un mayor uso de solventes y tiempo, la polaridad del acetato de etilo durante la partición permite recuperar selectivamente a los principales compuestos fenólicos libres, haciendo que los conjugados, con mayor hidrofiliidad que los primeros, no se retengan y pasen a la etapa de hidrólisis (Y. Wang et al., 2014). En contraste, la baja selectividad de la matriz C18 por los compuestos de mayor polaridad se explica por el mecanismo subyacente de la retención: fuerzas Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, las cuales no son tan específicas para sistemas aromáticos hidroxilados (Michalkiewicz et al., 2008). Cabe mencionar que otras matrices alternativas poliméricas son más adecuadas para cubrir un mayor rango de polaridades para los fenólicos, *e. g.*, HLB o ENV+ (Michalkiewicz et al., 2008; Pérez-Magariño et al., 2008).

No existen reportes en la literatura sobre el uso del fraccionamiento en la caracterización del contenido de fenólicos en la cáscara de aguajes. El presente trabajo desarrolla el primer análisis de este tipo aplicado a esta matriz vegetal. El abordaje de hidrólisis secuencial para la obtención de fenólicos libres y liberados de sus formas conjugadas solubles (esterificados y glucosilados) e insolubles ligados a la pared celular fue rastreado en la literatura. Uno de los primeros trabajos fue el de Krygier et al. (1982), en el que el fraccionamiento solo se hizo para fenólicos esterificados mediante una hidrólisis básica con NaOH. Los autores resaltan que un tratamiento alcalino a temperatura ambiente genera pérdidas menores de ácidos hidroxicinámicos

(< 10 %), en contraste cuando la hidrólisis es ácida, (con HCl a altas temperaturas), puesto que el rango de pérdidas llega a estar entre 15-92 % a causa de la degradación de los analitos. Trabajos posteriores incluyeron la hidrólisis ácida consecutiva a la básica para poder liberar los fenólicos de sus formas glicosiladas (Kozłowska et al., 1983). Luego, se demostró que el uso de ácido ascórbico y EDTA en el medio de incubación durante la hidrólisis alcalina evita la pérdida de los fenólicos liberados (Nardini et al., 2002).

La combinación de hidrólisis básica y ácida se justifica, primero, en que los enlaces tipo éster, característicos en conjugados entre compuestos fenólicos, y entre fenólicos con ácidos orgánicos, alcoholes o ácidos grasos, son más susceptibles a la escisión en condiciones alcalinas. Esto podría deberse a que el ion hidroxilo del NaOH se comporta como un nucleófilo capaz de atacar al carbono del carbonilo en el enlace. Luego de este paso, es necesario neutralizar el medio con ácido (*e. g.* HCl), ya que los grupos hidroxilos en condiciones alcalinas son propensos a desprotonarse, por lo que un pH menor previene la formación de quinonas (Z. Wang et al., 2020). Por otra parte, en los glucósidos, el enlace formado es del tipo éter, el cual suele ser más susceptible a hidrolizarse en condiciones altamente ácidas y a temperaturas cercanas al reflujo del solvente. El mecanismo de reacción involucraría la protonación del oxígeno del enlace, lo que permite elevar la electrofilicidad del carbono del grupo glucosídico, haciendo que sea un mejor grupo saliente. En tal caso, el enlace éster para los conjugados fenólicos sería una unión lábil en condiciones alcalinas, mientras que el enlace *O*-glucosídico (éter) lo sería en ambientes ácidos (Schendel, 2018; Z. Wang et al., 2020). Además, el orden en el que se da la hidrólisis secuencial se justifica en que los glucósidos poseen una mayor solubilidad en el agua que los ésteres.

Se ha mostrado que la hidrólisis básica en el residuo del fraccionamiento de un extracto metanólico de salvado de trigo permitió obtener una mayor cantidad de fenólicos liberados de sus formas conjugadas insolubles que con una hidrólisis ácida (K. H. Kim et al., 2006). Esto puede explicarse porque muchos ácidos fenólicos pueden encontrarse como conjugados esterificados en la pared celular de la matriz vegetal (Saadi et al., 1998). En definitiva, el abordaje de una hidrólisis secuencial constituye una estrategia conveniente para obtener una imagen más completa de los fenólicos de una matriz (Robbins, 2003), sobre todo cuando los patrones de conjugación son muy variados y la adquisición de estándares es un gran desafío.

## 5.2. Contenido total de fenólicos y capacidad antioxidante

### 5.2.1. Correlación

El TPC y AC son parámetros que se correlacionan en las investigaciones sobre los fenólicos. En este trabajo, dicha correlación ( $R = 0.954$ ) también fue vista para las fracciones, donde serían los fenólicos esterificados aquellos que tendrían el mayor aporte de la AC total de las cáscaras de aguajes en sus diferentes morfotipos. Aunque no se encontró una clara diferencia entre los morfotipos “Amarillo” y “Posheco”, estos tendrían un mayor contenido de fenólicos que se correspondería con una mayor AC que las cáscaras de aguajes “Color”.

La mayor parte de los estudios revisados reportan el TPC únicamente para fenólicos extraídos en sus formas libres y solubles, ignorando a aquellas formas conjugadas solubles e insolubles. Tauchen et al. (2016) reportó un TPC de  $462 \pm 33 \mu\text{g GAE/mg}$  de extracto (o  $\text{mg GAE/g DW}$ ) y ORAC-FL (ensayo con fluoresceína) de  $646 \pm 51 \mu\text{g TE/mg}$  de extracto (o  $2581 \pm 204 \mu\text{mol TE/g DW}$ ) para cáscaras de aguajes provenientes de Pucallpa, Perú (extracción por Soxhlet a  $130^\circ\text{C}$  con etanol al 70%); ambos valores superiores que en el mesocarpio. Pereira-Freire et al. (2018) también registraron un valor superior de TPC para las cáscaras con respecto a la pulpa y al endocarpio de aguajes brasileiros, el cual fue de  $12.9 \pm 0.5 \text{ mg GAE/g DW}$  (extracción por maceración a temperatura ambiente con metanol), más del doble que en ambas partes del fruto. En este estudio, la AC fue determinada mediante los ensayos DPPH y ABTS, por lo que la comparación con el presente trabajo no es posible. No obstante, se observó que, en ambos ensayos, el extracto de las cáscaras posee una AC superior con respecto al mesocarpio y endocarpio, que se correlacionan positivamente con el TPC. Rudke et al. (2019) encontró un TPC de  $167 \pm 6 \text{ mg GAE/g}$  de un extracto (o  $32 \pm 1 \text{ mg GAE/g DW}$ ) de cáscaras secadas en horno (PLE por 90 min a  $71.2^\circ\text{C}$  con etanol al 91.6 %). En un estudio posterior, corroboraron este hallazgo y lo compararon con el TPC de la semilla, demostrando que el valor en la cáscara es más del doble (Rudke et al., 2021). Sus resultados de AC (DPPH y ABTS) no son comparables con lo obtenido en este estudio, pero también mostraron ser superiores en las cáscaras con respecto a las semillas. Resende et al. (2019) obtuvieron un TPC de  $9.3 \pm 3 \text{ mg GAE/g}$  de masa seca de cáscaras liofilizadas y blanqueadas, siendo casi nueve veces el valor reportado para el endocarpio. En este caso, la AC se evaluó con los ensayos DPPH y FRAP, y se mostró que las cáscaras poseen un menor valor que el endocarpio.

### 5.2.2. Efecto de la hidrólisis

Ninguno de los trabajos revisados reporta el TPC ni AC en fracciones post hidrólisis de los compuestos. Todos estos evalúan tales parámetros en función a los extractos crudos. En la presente investigación, al sumar los TPC de las fracciones para cada morfotipo se obtienen valores aproximados de 95.5, 85.8 y 40.7 mg GAE/g DW que son mayores que los TPC de los extractos crudos 56.2, 52.6 y 21.1 mg GAE/g DW para los morfotipos “Posheco”, “Amarillo” y “Color”, respectivamente. Este incremento podría explicarse en las diferencias del poder reductor que tendrían los fenólicos en el extracto crudo con respecto a los liberados en las fracciones post hidrólisis. Se debe subrayar que el ensayo de Folin-Ciocalteu es en sí una reacción redox, en la que la formación del complejo coloreado depende de la reducción de los óxidos de tungsteno (VI) y manganeso (VI) debido a la presencia de los fenólicos, los cuales se oxidan. Consecuentemente, la reacción de Folin-Ciocalteu es también una manera de medir la AC, mediante una reacción de transferencia de un electrón, principio en el cual también se basan los ensayos *in vitro* de DPPH y FRAP (Huang et al., 2005). En tal caso, y tal como ocurre con otros métodos para estimar la AC, como ORAC, cuyo principio es más bien una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno, la estructura química determinará la facilidad con la que los fenólicos se oxidan. Se ha estudiado cómo la estructuras de los flavonoides, por ejemplo con respecto a la posición de los dobles enlaces en el esqueleto aromático, y la acidez de los grupos hidroxilos influyen significativamente en el proceso de transferencia secuencial de electrones por pérdida de protones, mecanismo que determina la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (D. Zhang et al., 2013).

Las determinaciones y posteriores comparaciones de TPC y ORAC dependen del estándar que se use para expresar los contenidos equivalentes, (e. g., ácido gálico para TPC y trolox para ORAC). Esto se complica cuando se comparan los valores de ORAC al usar diferentes sondas colorimétricas, ya que se ha visto que los resultados con fluoresceína son mayores que con rojo de pirogalol en arándanos, frambuesas y moras. En pruebas preliminares de la presente investigación, el ensayo Folin-Ciocalteu registró valores de absorbancia distintos para los fenólicos individuales a concentraciones iguales. Consecuentemente, los fenólicos liberados podrían tener capacidades antioxidantes diferenciadas, por lo que al sumar los aportes de cada fracción no dan exactamente los valores de TPC ni ORAC de los extractos crudos. Como sugerencia, futuros trabajos podrían incluir la evaluación de la AC con otros ensayos cuyos mecanismos de reducción varíen, tal que la comparación con la literatura sea posible y se disponga de una descripción más amplia de la AC de las cáscaras, (e. g., DPPH, FRAP, ABTS).

Lo discutido se complementa con el hecho de que los fenólicos conjugados son finalmente hidrolizados por la microbiota intestinal (Robbins, 2003), por lo que sus capacidades antioxidantes en el organismo no serían necesariamente las mismas que se estudian a nivel *in vitro*. Esto se refleja en los parámetros de bioaccesibilidad y biodisponibilidad que deben también ser estudiados; *e. g.*, entre el 11-15% de ácido ferúlico ingerido es excretado en la orina como ácido ferúlico libre o como conjugado glucurónido (Robbins, 2003). Con respecto a esto, se ha reportado que el tipo de proceso de secado y el contenido de fibra en los subproductos de arándanos y caqui determinan la liberación de polifenoles durante la digestión *in vitro*. Además, los estudios de fermentación con microbiota intestinal demostraron que las características de las harinas digeridas tienen un efecto sobre la composición de las comunidades microbianas en crecimiento (Bas-Bellver et al., 2020). Así mismo, Pereira-Freire et al. (2018) mostraron que la bioaccesibilidad del contenido total de compuestos fenólicos de las cáscaras de aguajes disminuyó en un 38.7 % después de una digestión *in vitro*.

### 5.2.3. Comparación con otros estudios

Los resultados obtenidos aquí reflejan que el proceso de hidrólisis secuencial incrementa los valores de TPC y, a su vez, los de ORAC en los extractos de las cáscaras de aguajes. Así, en todos los morfotipos, los fenólicos liberados de su forma esterificada aportarían con *ca.* 63 % de la suma de TPC de las fracciones, seguido de los glicosilados (*ca.* 17 %), libres (*ca.* 14 %) y, finalmente, los insolubles ligados (*ca.* 6 %). Los TPC sumados fueron menores que los obtenidos por Tauchen et al. (2016), pero mayores que lo reportado por Pereira-Freire et al. (2018), Resende et al. (2019) y Rudke et al. (2019). Además, los valores ORAC de las fracciones sumadas corresponden a *ca.* 787, 1703 y 2018  $\mu\text{mol TE/g DW}$  para “Color”, “Amarillo” y “Posheco”, respectivamente, que serían inferiores a lo reportado por Tauchen et al. (2016). Las diferencias de estos valores pueden deberse a factores como el tipo de extracción, las condiciones empleadas y al origen de los frutos, además de que en ninguno de estos estudios llevan a cabo procedimientos hidrolíticos.

Se resalta que, en las extracciones de los estudios anteriores, las cáscaras no fueron desengrasadas, por lo que los valores de TPC y AC podrían estar sobreestimados en cada caso. Esto es debido al arrastre de posibles antioxidantes de baja polaridad, afines a los solventes alcohólicos, más aún si es que las condiciones de temperatura son altas, *e. g.*, en Soxhlet. Así mismo, se sabe que los interferentes típicos en el ensayo Folin-Ciocalteu son los azúcares y el ácido ascórbico. Por ende, una extracción cruda con presencia de agua en el solvente también

podría arrastrar a tales compuestos, lo que afectaría el valor de TPC. En este punto, la LLE con acetato de etilo podría evitar la presencia de dichos interferentes en las fracciones.

Con todo esto, se puede decir que la cáscara de aguaje podría considerarse una fuente interesante de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, con un contenido incluso mayor que el de otras partes del fruto como la pulpa, endocarpio y semilla. Al comparar con otros frutos exóticos amazónicos, los mayores valores de TPC reportados para las cáscaras de los morfotipos son superiores a la pulpa de açai ( $33 \pm 5$  mg GAE/g DW), y de la fruta completa de caju (*cashew apple*) ( $8.3 \pm 0.3$  mg GAE/g DW). No obstante, son menores que el TPC del camu-camu ( $116 \pm 4$  mg GAE/g DW) (todos los extractos fueron obtenidos por maceración a temperatura ambiente con metanol al 50% por 60 min) (Rufino et al., 2010). El mayor TPC para las cáscaras de “Posheco” se acerca a los valores de las cáscaras de granada con diferentes orígenes, cuyos valores van desde 100.4-181.0 mg GAE/g DW (extracción por maceración de 120 min por triplicado a temperatura ambiente con metanol al 80%) (Saad et al., 2012). Este mismo TPC es superior a los reportados para las harinas de subproductos liofilizados de arándanos y caqui:  $51.3 \pm 0.8$  y  $2.7 \pm 0.1$  mg GAE/g DW, respectivamente (extracción por maceración con metanol al 80% por 1 h a temperatura ambiente) (Bas-Bellver et al., 2020). Finalmente, las cáscaras de agujajes analizadas muestran TPC superiores a las cáscaras liofilizadas de palta, piña, plátano, papaya, maracuyá, sandía y melón ( $0.21 \pm 0.07$ ,  $2.2 \pm 0.2$ ,  $2.2 \pm 0.3$ ,  $3.4 \pm 0.6$ ,  $2.7 \pm 0.2$ ,  $1.10 \pm 0.09$  y  $2.2 \pm 0.4$  mg GAE/g, respectivamente (extracción por maceración con metanol por 4 h a temperatura ambiente) (Morais et al., 2015).

### **5.3. Cuantificación de fenólicos libres y conjugados**

#### **5.3.1. Comparación con otros estudios**

La separación por TLC permitió una visualización preliminar de los perfiles de los fenólicos en cada fracción, lo que confirma la utilidad de esta técnica para la inspección e identificación de algunos analitos mayoritarios en las muestras. No se observó diferencia en la presencia de las bandas, más sí en la intensidad de algunas, lo cual se ve reflejado en los resultados de las cuantificaciones por TPC, ORAC y, desde luego, por HPLC-DAD. El uso de  $\text{FeCl}_3$  como agente de visualización de fenólicos ha sido reportado exitosamente en otros trabajos (Agatonovic-Kustrin et al., 2021; Móricz et al., 2018) ya que permite generar complejos azulados, verdosos o violáceos, lo que facilita la identificación de las bandas. Por ejemplo, en la Figura 13, los ácidos cafeico y protocateuico se visualizaron como bandas violetas, mientras que la quercetina apareció más verdosa. La (+)-catequina y (-)-epicatequina aparecieron como

una banda amarillenta verdosa, mientras que en la banda IX, algunos ácidos fenólicos presentaron una coloración rojiza. Estos colores son debidos a la facilidad que tienen los grupos galoil o catecol para coordinar con  $\text{Fe}^{3+}$  (Zhong et al., 2018), propiedad que se ha aprovechado en materiales emergentes como *Metal-Phenolic Networks* (MPN) para generar tintas a base de fenólicos que son posteriormente reveladas con soluciones de hierro (III) (Dai et al., 2019).

Rudke et al. (2019, 2021) realizaron la cuantificación por HPLC-ESI-MS/MS de fenólicos luego de desengrasar a las cáscaras de los aguajes, someterlas a un proceso de hidrólisis ácida con HCl 6 M a 85 °C por 30 min y, posteriormente, realizar una partición con éter dietílico. Sin embargo, tal como se describió en 5.1.3., las condiciones ácidas a altas temperaturas pueden degradar algunos fenólicos y no ser convenientes para la escisión efectiva de los enlaces tipo éster. Estos autores mostraron que, entre los fenólicos cuantificados en el extracto obtenido mediante PLE (Tabla 5), la quercetina ( $885 \pm 119 \mu\text{g/g DW}$ ), (+)-catequina ( $324 \pm 9 \mu\text{g/g DW}$ ) y los ácidos protocatecuico ( $286 \pm 116 \mu\text{g/g DW}$ ) y elágico ( $128 \pm 16 \mu\text{g/g DW}$ ) son los mayoritarios. La presencia de ácido elágico podría deberse a la ruptura de ellagitaninos (taninos hidrolizables) de las cáscaras bajo las condiciones ácidas. Por su parte, Tauchen et al. (2016) encontró como mayoritarios al ácido clorogénico ( $11.8 \pm 0.8 \mu\text{g/g DW}$ ), seguido de los conjugados rutina (o quercetin-3-rutinósido,  $7.42 \pm 0.02 \mu\text{g/g DW}$ ) e isoquercitrina (o quercetina-3-glucósido,  $7.44 \pm 0.07 \mu\text{g/g DW}$ ), el estilbeno resveratrol ( $0.59 \pm 0.01 \mu\text{g/g DW}$ ), y el flavonoide apigenina ( $0.5286 \pm 0.0004 \mu\text{g/g DW}$ ).

Se obtuvo también al ácido clorogénico como uno de los fenólicos más abundantes en la fracción FL. Particularmente, en el morfotipo “Posheco” ( $371 \pm 35 \mu\text{g/g DW}$ ), se encontró más que en los dos estudios anteriores ( $15.9 \pm 0.6 \mu\text{g/g DW}$  (Rudke et al., 2021)). La catequina fue menor en FL de “Amarillo” ( $180 \pm 33 \mu\text{g/g DW}$ ); pero si se suma con lo hallado en FE ( $273 \pm 18 \mu\text{g/g DW}$ ), resulta más que lo reportado por Rudke et al. (2021). El ácido protocatecuico no tuvo una alta concentración en ninguna de las fracciones, por lo que es menor a lo reportado en la literatura, siendo la fracción FE de “Amarillo”, la que tuvo el mayor contenido ( $93 \pm 7 \mu\text{g/g DW}$ ). Una situación similar se vio con quercetina, cuyo máximo valor estuvo en la fracción FE de “Amarillo” ( $55 \pm 4 \mu\text{g/g DW}$ ). El resto de fenólicos identificados presentaron contenidos superiores a los registrados en los estudios citados.

Un aspecto importante es que ninguno de los trabajos referenciados hizo un cálculo de los porcentajes de recuperación de cada fenólico. La LLE con acetato de etilo no permitió una recuperación adecuada (38-50%) de los fenólicos con mayores polaridades como son el ácido

sinápico, gálico, cafeico y siríngico (Tabla 10 y Figura 18). Particularmente, el contenido de ácido gálico en los trabajos de Tauchen et al. (2016) ( $0.1590 \pm 0.0009 \mu\text{g/g DW}$ ) y Rudke et al. (2021) ( $4.5 \pm 0.8 \mu\text{g/g DW}$ .) es muy bajo, y no fue identificado en las fracciones de la presente investigación. Debido a la posible presencia de ácido elágico en las fracciones FI (Figura 28), se especula que el ácido gálico formaría galotaninos en las cáscaras, pero que posteriormente los grupos galoilo se unirían oxidativamente para formar uno o más grupos derivados del ácido hexahidroxidifénico (HHDP), originando elagitaninos. Las unidades de HHDP podrían liberarse gracias a la hidrólisis de estos taninos hidrolizables, para luego experimentar una lactonización espontánea y generar al ácido elágico (Dewick, 2009).

### 5.3.2. Propuestas biosintéticas sobre el contenido de fenólicos

Al inspeccionar los resultados de las fracciones FL, la baja concentración del ácido cafeico podría deberse a que gran parte de éste estaría conjugándose con ácido quínico para formar justamente ácido clorogénico, cuya cantidad es mucho mayor. Si bien el ácido clorogénico parece estar presente en cantidades altas, los resultados de GC-MS (Figura 28) muestran que la (+)-catequina sería el compuesto mayoritario en las fracciones FL. No obstante, el pequeño pico de este flavan-3-ol podría deberse también a la posible dificultad para derivatizarse por completo (requiere 6 grupos TMS) o porque a partir del minuto 22.5 la temperatura del horno es muy alta ( $310 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y daría paso a procesos degradativos. Es importante precisar que la (-)-epicatequina aparece junto con la (+)-catequina, debido a que son estereoisómeros, y se muestran en menores cantidades en todas las fracciones.

Los ácidos vanílico y siríngico aparecen con bajas concentraciones en FL, pero también en el resto de fracciones (no mayores a  $25 \mu\text{g/g DW}$ ). Según la Figura 3, el primero se forma a partir del ácido ferúlico, mientras que el segundo, del sinápico. En tal caso, tiene sentido que tales precursores no aparezcan como fenólicos libres, pero sí en otras fracciones; por ejemplo, el ácido sinápico aparece en FE con una concentración importante ( $111 \pm 33 \mu\text{g/g DW}$ , el mayor valor en “Amarillo”), mientras que el ácido ferúlico presenta también una concentración mayor que la de los otros fenólicos en FI ( $90 \pm 13 \mu\text{g/g DW}$ , el mayor valor en “Amarillo”), junto con el *p*-cumárico ( $82 \pm 10 \mu\text{g/g DW}$ , el mayor valor en “Amarillo”). No obstante, al visualizar los resultados de GC-MS, ambos ácidos fenólicos parecen no ser los mayoritarios. Este hecho podría explicarse porque, aparte de ser precursores de los ácidos vanílico y siríngico, pueden formar alcoholes como el coniferílico y sinapílico (Figura 3), los cuales funcionan como unidades monoméricas para la formación de lignina, junto con el alcohol *p*-cumarílico

proveniente del ácido *p*-cumárico. No se encontraron trabajos que hayan analizado la presencia de lignina en la cáscara de aguaje. Sin embargo, existe la fuerte sospecha que su constitución tenga un importante componente lignocelulósico, debido a su dureza y rigidez. En tal caso, la poca presencia de ácido sinápico, ferúlico y *p*-cumárico en la fracción FI se podría justificar porque provienen de la despolimerización parcial de la lignina, ya que esencialmente estarían en forma de uniones insolubles, o bien siendo parte de la lignina en sí, o bien como grupos laterales que ayuden a rigidizar la pared celular. Esta hipótesis tiene sentido ya que se sabe que las condiciones alcalinas medias, similares a las de la hidrólisis secuencial, sí tienen efectos disruptivos en la estructura de la lignina, sin llegar a las condiciones extremas del proceso Kraft para la separación de lignina de la celulosa (Lawther et al., 1996; Oriez et al., 2020). Diversos estudios de compuestos fenólicos insolubles ligados en cereales demuestran la presencia de estos tres analitos (Shahidi & Yeo, 2016; B. Zhang et al., 2020). Con respecto a la presencia del ácido sinápico en la FE, es sabido que puede conjugarse con colina, formando sinapina; sin embargo, este compuesto no se ha identificado en las cáscaras de agujajes. Cabe precisar también que la ausencia del ácido *trans*-cinámico en las fracciones, al igual que del *p*-cumárico en FL, FE y FG, puede explicarse porque el primero es precursor del segundo, y porque el segundo es precursor del resto de ácidos fenólicos (Figura 3).

Aparte de la unión de los fenólicos en componentes de la pared celular como apoyo estructural y funcional, la conjugación de estos compuestos tiene diversos objetivos. Algunos conjugados poseen capacidades antioxidantes diferentes a las formas libres. También se caracterizan por tener sabores amargos o astringencia, las cuales son cualidades útiles para la defensa contra la herbivoría. La conjugación representa una estrategia conveniente para almacenar fenólicos en la planta, ya que permite alterar su solubilidad (Crozier et al., 2007; Manach et al., 2004).

Dado que los flavonoides están presentes como glucósidos en las plantas, es razonable la presencia de quercetina en la fracción de fenólicos glicosilados; no obstante, las cantidades están por debajo del LOQ. Más bien, se ha calculado una mayor cantidad de este flavonol en FE. La posible explicación radica en que la hidrólisis alcalina, por tiempo prolongado (*e. g.* 4 h), también podría estar escindiendo el enlace *O*-glucosídico de los diferentes conjugados que puede formar la quercetina con los azúcares, como glucosa, arabinosa, xilosa o ácido glucurónico (Manach et al., 2004; Vollmannová et al., 2024). Precisamente, la quercetina-3-arabinosa, isoquercitrina (quercetina-3-glucosido) y rutina (quercetin-3-rutinósido) se han identificado previamente en Tauchen et al. (2016). Si bien los enlaces *O*-glucosídicos son naturalmente más lábiles a la hidrólisis ácida, se ha visto que los glucósidos fenólicos podrían

también escindir en condiciones alcalinas (Brito-Arias, 2022). Por ejemplo, se ha reportado quercetina tanto en la fracción de fenólicos esterificados como en la de glicosilados en la cáscara, pulpa y semilla del fruto de *Annona crassiflora* Mart (Arruda et al., 2018).

Así mismo, la presencia de ácido protocatecuico en la fracción FE se explica porque podría estar presente en forma de esteres producidos por metilaciones. Por ejemplo, el metil éster respectivo ha sido aislado de la *Machilus thunbergii* Sieb. et Zucc (Kakkar & Bais, 2014). Así mismo, se ha podido obtener este ácido fenólico en fracciones hidrolizadas de cereales, legumbres y semillas proveniente de formas ligadas insolubles (Shahidi & Yeo, 2016). Las cantidades en forma de glucósidos en FG son pequeñas, al igual que el resto de ácidos fenólicos identificados en esta fracción con respecto a las demás, siendo en su mayoría por debajo del LOQ. No obstante, sí existen estudios donde se han identificado algunos glucósidos de ácido vanílico (el cual aparece como mayoritario en FG), por ejemplo, en extractos de *Gardenia jasminoides* (H. J. Kim et al., 2006) y de *Boreava orientalis* (Sakushima et al., 1995).

Por otra parte, resulta interesante la presencia de (+)-catequina en las fracciones. La cantidad de este analito en las cáscaras proviene principalmente de FE, seguido de FL, luego de FI y, finalmente, de FG. Los flavan-3-oles, a diferencia de otros flavonoides, no suelen formar glucósidos, sino que más bien aparecen en forma de oligómeros o polímeros denominados proantocianidinas (o taninos condensados si están en forma polimérica) (Manach et al., 2004; Rocchetti et al., 2022) Estos son algunos de los últimos productos biosintéticos tras las múltiples reacciones que pueden experimentar las flavononas (Figura 5). Las proantocianidinas se caracterizan por la unión de dos o más unidades de estos flavonoides mediante enlaces del tipo C-C interflavan, principalmente entre los carbonos C4 del anillo pirano y el C8 del anillo aromático A del compuesto (Hagerman, 2002). Los oligómeros (dímeros o trímeros) suelen ser más solubles en algunos solventes orgánicos como acetona acuosa o metanol, mientras que las proantocianidinas poliméricas pueden estar ligadas a componentes de la pared celular como la fibra, por lo que son insolubles (Schofield et al., 2001; B. Zhang et al., 2020). Normalmente, las proantocianidinas suelen analizarse en matrices vegetales tras un proceso hidrolítico con HCl y butanol a 100 °C (Hagerman, 2002). Sin embargo, también es posible obtener los oligómeros y monómeros constituyentes mediante una hidrólisis alcalina, incluso similar a las condiciones de esta investigación, con una posterior partición con acetato de etilo (White et al., 2010). Esto podría explicar la presencia importante de (+)-catequina en las cáscaras.

A parte de la (+)-catequina, se ha podido proponer la existencia de otros flavan-3-oles como (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina en cantidades destacables en las tres fracciones hidrolizadas (Figura 28), los cuales también son unidades monoméricas de las proantocianidinas (Dewick, 2009). Entonces, por una parte, se sugiere que estos flavan-3-oles en altas cantidades en la fracción de fenólicos esterificados sean productos de la hidrólisis parcial de proantocianidinas oligoméricas extraídas de las cáscaras. Mientras que su presencia en FI podría deberse a la hidrólisis parcial de los taninos condensados unidos a la fibra del residuo sólido post extracción. En tal caso, es razonable pensar que la alta cantidad de (+)-catequina en forma libre sea deba a que la planta podría estar sintetizándola para luego formar taninos condensados. Además, la presencia de los flavan-3-oles en FG es mucho menor que lo que se obtiene en FE, probablemente porque la mayor parte de estos compuestos estarían siendo recuperados en dicha fracción; aun así, la hidrólisis ácida podría continuar hidrolizando a las proantocianidinas en esta última etapa hidrolítica. No se ha reportado la presencia de estos flavonoides en otros trabajos; no obstante, la propuesta descrita toma relevancia al ver los resultados de Resende et al. (2019), quienes encontraron una gran cantidad de proantocianidinas no extraíbles (insolubles) en las cáscaras de aguajes.

#### **5.4.Otros posibles fenólicos**

La presencia de resveratrol en forma libre en las cáscaras de aguajes también ha sido observado en otros estudios (Rudke et al., 2019; Tauchen et al., 2016). Así mismo, la flavonona naringenina ha sido reportado por Rudke et al. (2021) y por Tauchen et al. (2016), quienes también la encontraron en forma de glucósido (naringenina-7-glucósido). Llama la atención la posible presencia de florentina, la cual parece estar en una mayor concentración que los fenólicos anteriores en FL (Figura 28). No se han encontrado reportes previos de esta chalcona en las cáscaras de aguajes, por lo que se requiere una corroboración con el estándar. El contenido de estos fenólicos se puede explicar debido a que la formación del policético, tras la condensación de las unidades de malonil-CoA con *p*-cumaril CoA, constituye un punto de bifurcación que puede derivar en la formación de una chalcona, la cual origina al resto de flavonoides, o un estilbeno, según la ruta biosintética del siquimato (Figura 3).

Se han visto también los ácidos fenólicos *m*- y *p*-hidroxibenzoico, los cuales podrían formarse a partir del ácido corísmico (Figura 3). El ácido elágico podría provenir de la formación de elagitaninos, cuya propuesta biosintética ya fue discutida en 5.3.1. La presencia de otros compuestos tentativamente propuestos podría deberse a reacciones de metilación o

hidroxilación comunes durante la formación de los ácidos fenólicos, como por ejemplo el ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico. El catecolactato (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico, ácido salviánico A o Danshensu) está relacionado estructuralmente al ácido cafeico, siendo ambos los principales fenólicos de las especies chinas *Salvia*. El ácido 4-hidroxifeniláctico es el precursor del catecolactato (J. Wang et al., 2019) y además puede formar ácido rosmarínico tras su conjugación con ácido *p*-cumárico (Dewick, 2009). El ácido 3,4-dihidroxifenilacético podría estar involucrado en el metabolismo de L-DOPA en la planta, el cual es un agente aleloquímico (Soares et al., 2014). El floroglucinol podría ser un producto de la hidrólisis de flavonoides pues compone parte de su estructura. Estos fenólicos provendrían de formas conjugados, ya que se obtuvieron en las fracciones hidrolizadas (Figura 28).

Si bien la mayoría de los compuestos anteriores estarían en pequeñas concentraciones en las cáscaras, con excepción de la (+)-galocatequina y de la (-)-epigalocatequina, cuya presencia ya fue discutida, llama la atención la importante cantidad del ácido *p*-hidroxibenzoico en FI, incluso mayor que los dos flavan-3-oles anteriores. Según la revisión, este trabajo reporta por primera vez a este compuesto en las cáscaras de agujajes, cuya presencia ha sido observada, tras su liberación de su forma ligada insoluble mediante hidrólisis alcalina, en legumbres, granos y semillas (Shahidi & Yeo, 2016). Tal como se ha descrito, este tipo de fenólicos ayudan a conectar las sustancias de la pared celular, mejorando la rigidez de su estructura, además de dar protección ante patógenos y la radiación UV (Shahidi & Yeo, 2016; Z. Wang et al., 2020).

Uno de los componentes a los que se suele ligar el ácido *p*-hidroxibenzoico es la lignina. Retomando la consideración de que las cáscaras contendrían importantes cantidades de este biopolímero, su presencia estaría ciertamente justificada. Según la literatura, el ácido *p*-hidroxibenzoico no forma parte de la lignina como unidad monomérica, sino más bien está presente como grupos “pendientes” unidos mediante enlaces tipo éster (*p*-hidroxibenzoatos), los cuales pueden ser hidrolizados en condiciones básicas (Mottiar et al., 2023). En particular, los álamos y los sauces son especies que poseen un gran contenido de este fenólico, constituyendo más 10 % de la lignina presente; no obstante, también se le ha encontrado ligado a la pared celular en palmeras (Arecaceae) (Mottiar et al., 2023; Pearl et al., 1959). El ácido *p*-hidroxibenzoico, una vez liberado, puede usarse como una plataforma de productos químicos, desde materiales hasta fármacos (Mottiar et al., 2023). Así, su alta concentración podría implicar que las cáscaras de agujajes sean una fuente rica de este ácido fenólico.

### 5.5.Fibra dietética funcional

La FAO ha resaltado la necesidad de adoptar “dietas sostenibles”, un concepto que refiere a aquellas dietas que tienen un bajo impacto ambiental y que contribuyan a la seguridad alimentaria y nutricional de las personas. Las recomendaciones incluyen tener una dieta basada principalmente en plantas, centrarse en alimentos locales y de temporada, y, sobre todo, reducir los desperdicios alimentarios (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2024). En este panorama, las cáscaras de los frutos constituyen una importante fuente de compuestos fenólicos cuyas propiedades antioxidantes podrían ser aprovechadas. El contenido de diversos ácidos fenólicos y flavonoides, tanto en sus formas libres como conjugadas, presentes en el exocarpio del fruto del aguaje, son una prueba de ello. No obstante, no todos estos son fácilmente extraíbles, ya que se encuentran en formas insolubles, ligados a los componentes de la pared celular de la matriz vegetal. Basado en los resultados de este trabajo, las cáscaras podrían tener una gran cantidad de proantocianidinas asociadas a la fibra. Además, se ha podido tener un acercamiento de la posible constitución de tales taninos, así como destacar la potencial abundancia del ácido *p*-hidroxibenzoico, como grupo ligado a la lignina.

Los subproductos de los frutos exóticos como las cáscaras podrían funcionar como fuentes de fibra dietética, las cuales junto a los compuestos bioactivos que integran, podrían proveer beneficios nutritivos para los consumidores al integrarse en la formulación de productos alimentarios (Ayala-Zavala et al., 2011). Saura-Calixto (2011) emplea el término de “fibra dietética antioxidante” para referencia a la funcionalidad nutricional que puede tener la fibra dietética como transportadora de los antioxidantes asociados a ésta, los cuales tendrían efectos sinérgicos en la salud tras su metabolismo en el tracto gastrointestinal. Se destaca que una apreciable cantidad de fenólicos atraviesan intactos el intestino delgado, por lo que son finalmente liberados de la matriz de fibra en el colon por acción del microbiota intestinal (Saura-Calixto, 2011). El 90-95 % de fenólicos ingeridos, incluyendo los insolubles ligados, pasarían a ser catabolizados por las comunidades microbianas comensales (B. Zhang et al., 2020). Actualmente, los mecanismos específicos de cómo la microbiota y los fenólicos provenientes de la fibra dietética interactúan han abierto una amplia área de investigación; no obstante, se sabe que ciertas especies bacterianas participan de la hidrólisis de los conjugados así como de la generación de nuevos metabolitos a partir de estos (Manach et al., 2004). En todo caso, la ingesta frecuente de antioxidantes, como los fenólicos, tendrían efectos “prebióticos” junto a los ya conocidos de la fibra dietética, modulando conjuntamente la presencia de las especies beneficiosas para la homeostasis (Mithul Aravind et al., 2021).

En los tres morfotipos analizados, se han visto ciertas diferencias en el contenido de fibra dietética total, cuyos valores están entre 87-77 g/100 g de las cáscaras secas. En promedio, del TDF de las cáscaras de los frutos, *ca.* 98% (IDF/TDF %) correspondería a fibra insoluble, siendo *ca.* 2% (SDF/TDF %) fibra soluble. Estos hallazgos son coincidentes con los de Resende et al. (2019), en cuyo trabajo se hace la comparación con cáscaras de pequi (39.8–43.3 g/100 g), mango (38.9–40.51 g/100 g) y naranja (49.0–50.8 g/100 g), y se demuestra que las cáscaras de los agujajes podrían considerarse una fuente de fibra dietética antioxidante (> 50 % en peso de base seca, con propiedades antioxidantes reportadas debido a la presencia natural de compuestos que lo justifiquen) (Saura-calixto, 1998). No obstante, hay que advertir que el contenido de fibra dietética estimado podría variar según el pretratamiento de la muestra, tal como lo destacan Bas-Bellver et al. (2020), quienes obtuvieron un menor TDF del bagazo de arándanos y caqui con liofilización versus secado en horno.

Otro aspecto a resaltar es la determinación del perfil de monosacáridos neutrales no celulósicos en las cáscaras, cuyo principal componente fue la xilosa (75.56 % mol), seguido de manosa, arabinosa, galactosa y glucosa en pequeñas proporciones (Resende et al., 2019). Esto sugiere que la fibra de las cáscaras podría tener polisacáridos pécticos como arabinanos y galactanos pécticos, así como arabinoxilanos, constituyentes principales de la hemicelulosa, y también glucomananos o galactoglucomananos. Por ello, es posible inferir que los fenólicos estarían conjugados justamente con estos glucósidos. Particularmente, la alta cantidad de IDF de las cáscaras podría asociarse a varios efectos fisiológicos positivos para el organismo. Por ejemplo, la fibra insoluble ejerce una acción mecánica al incrementa el volumen de las heces en el tracto gastrointestinal, lo cual mejora el tiempo de tránsito y laxación, por lo que se reduce la absorción de lípidos dietéticos (Hosseinian et al., 2017). Además, se han visto beneficios en el control de hiperlipidemia por la reducción de la grasa y la regulación de la saciedad y apetito (Darzi et al., 2011; Tapsell, 2004).

La liberación de los fenólicos ocurre durante la fermentación de la fibra dietética gracias a las enzimas bacterianas del colon, las cuales facilitan la escisión de los enlaces que los unen a la matriz vegetal (Mithul Aravind et al., 2021). Esto es importante de destacar, ya que la mayor parte del contenido de fenólicos encontrados en las cáscaras de agujajes son conjugados solubles e insolubles, algunos posiblemente en forma de taninos, por lo que serían catabolizados en el colon para desplegar sus potenciales efectos antioxidante. Además, es posible sugerir que estos podría incluso mostrar efectos prebióticos tal como se reporta en la literatura con otras matrices ((Mithul Aravind et al., 2021; Sugizaki & Naves, 2018; Tomás-Barberán et al., 2016)).

## 6. Conclusiones

Se logró establecer un protocolo de extracción e hidrólisis secuencial para el análisis de compuestos fenólicos en la cáscara de tres morfotipos del fruto del aguaje (*M. flexuosa* L.f.), provenientes de la región San Martín, Perú. Este es el primer trabajo que integra un abordaje de fraccionamiento de estos analitos en el aguaje, tanto de fenólicos libres como liberados de sus formas conjugadas solubles (glicosilados y esterificados) e insolubles (ligados a la pared celular), y el primero también en comparar estos metabolitos del exocarpio entre morfotipos. Se usaron cáscaras blanqueadas y liofilizadas de las cuales se extrajo la mayoría de sustancias liposolubles con *n*-hexano antes de extraer los fenólicos. Se estableció que la extracción asistida por ultrasonido con metanol al 80% a 60°C por 60 min permite un alto contenido de fenólicos totales (TPC), incluso mayor que algunos reportes previos en la literatura. El morfotipo “Posheco” tuvo el mayor TPC, seguido del “Amarillo” y “Color”. Se demostró que era necesaria una etapa adicional de SPE RP-18 en el extracto crudo para terminar de remover las sustancias de baja polaridad que podrían interferir en los análisis posteriores.

La fracción de fenólicos libres (FL) se obtuvo directamente del extracto crudo limpio por LLE con acetato de etilo, mientras que las fracciones de fenólicos esterificados (FE) y glicosilados (FG) se consiguieron tras hidrólisis sucesivas de la fase acuosa de FL, primero con NaOH 4 M y después con HCl 6 M, respectivamente. La fracción de fenólicos ligados insolubles (FI) fue obtenida tras la hidrólisis con NaOH 4 M del residuo de la extracción cruda. Este enfoque se justificó en la labilidad que tienen los enlaces tipo éster de los conjugados en condiciones alcalinas, y del tipo éter (*O*-glucosídicos) frente a ácidos a temperaturas altas. Se demostró que la LLE permite recuperar fenólicos con un mayor rango de polaridades, mientras que la SPE RP-18 no es suficientemente selectiva para aquellos analitos con una mayor polaridad. La hidrólisis secuencial tuvo un efecto importante sobre el TPC, ya que estos valores fueron superiores para las fracciones en conjunto versus el extracto crudo de cada morfotipo. Asimismo, TPC y AC tuvieron una correlación positiva, corroborando la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de las cáscaras.

Se evaluó preliminarmente el perfil de fenólicos de las fracciones por TLC empleando FeCl<sub>3</sub>. El análisis cuantitativo por HPLC-DAD (RP) fue capaz de separar 16 fenólicos estándares en menos de 55 min. Con ello, se validó el método obteniéndose LOD y LOQ bajos, %RSD < 10%, rangos lineales amplios ( $R^2$  ca. 1), resoluciones  $\geq 1.5$ , purezas espectrales suficientes, y recuperaciones adecuadas para la mayoría de analitos. Se identificaron hasta nueve fenólicos

entre las fracciones, siendo la (+)-catequina y el ácido clorogénico los fenólicos mayoritarios en FL, (+)-catequina en FE, ácido vanílico en FG, y ácido ferúlico y *p*-cumárico, y (+)-catequina en FI. La diferencia entre los morfotipos únicamente se vio en las concentraciones, acorde a los TPC reportados.

El método de separación por GC-MS desarrollado permitió separar 16 fenólicos derivatizados con MSTFA en menos de 35 min. Con ello se corroboraron los resultados vistos por HPLC y se pudo proponer la presencia de resveratrol, naringenina y ácido elágico, previamente reportados, y, por primera vez, posiblemente floretina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina y *p*-hidroxibenzoico en las cáscaras de aguajes. Se destaca la alta presencia de (+)-galocatequina y (+)-catequina en FE y FI, lo que sugiere importantes concentraciones de proantocianidinas oligoméricas y taninos condensados. Además, el gran contenido de ácido *p*-hidroxibenzoico en FI podría indicar su conjugación con lignina, posible componente de la fibra de las cáscaras.

Este trabajo demostró que la cáscara de aguaje constituye una fuente potencial de fibra dietética funcional, ya que sus fenólicos, principalmente conjugados, tienen un aporte significativo en el despliegue de la actividad antioxidante de este subproducto. El abordaje de hidrólisis secuencial permitió, por primera vez, tener una imagen más completa de los analitos en esta matriz vegetal entre sus morfotipos. Además, se observó que esta posee un alto contenido de fibra dietética total (77-89 g/100g DW), principalmente insoluble (98% IDF/TDF). Finalmente, se proponen nuevas preguntas de investigación con respecto a la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los fenólicos de la cáscara de aguaje, así como sus efectos toxicológicos para su integración definitiva en productos para la suplementación humana.

## Referencias bibliográficas

- Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2015). Blanching as a Treatment Process: Effect on Polyphenol and Antioxidant Capacity of Cabbage. En *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00005-6>
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Passamonti, S., Tramer, F., Ziberna, L., & Boligon, A. A. (2017). Modulation of HMG-CoA reductase and glutathione-linked enzymes and protection against pro-oxidant induced oxidative damage in colon (Caco-2) cells and rat colon homogenates by phenolic extracts from Shaddock (*Citrus maxima*) peels. *Journal of Applied Biomedicine*, *15*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.09.001>
- Agatonovic-Kustrin, S., Gegechkori, V., Petrovich, D. S., Ilinichna, K. T., & Morton, D. W. (2021). ATR-FTIR characterisation of major flavonoids and polyphenolics. *Molecules*, *26*(6892), 1-15.
- Ahmad, N., Zuo, Y., Lu, X., Anwar, F., & Hameed, S. (2016). Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. *Food Chemistry*, *190*, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.077>
- Albujar, E. (2018). *Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2017*. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú.
- Albujar, E. (2019). *Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2018*. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú.
- Allaith, A. (2019). Antioxidants in Date Fruits and the Extent of the Variability of the Total Phenolic Content : Review and Analysis. *IntechOpen*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.83851>
- Álvarez, C., & Lock, O. (1992). Taninos. *Revista de Química PUCP*, *6*(1), 47-63.
- Ambigaipalan, P., De Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6584-6604. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>
- Anguah, K. O. B., Lovejoy, J. C., Craig, B. A., Gehrke, M. M., Palmer, P. A., Eichelsdoerfer, P. E., & McCrory, M. A. (2017). Can the palatability of healthy, satiety-promoting foods increase with repeated exposure during weight loss? *Foods*, *6*(2), 1-12. <https://doi.org/10.3390/foods6020016>
- AOAC. (1990). 985.29: *Total Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method*.
- AOAC. (1995). 991.43: *Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method*.
- AOAC. (2012). 2011.25: *Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatography*.
- Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, *135*(3), 1708-1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
- Araujo, R. O., Ribeiro, F. C. P., Santos, V. O., Lima, V. M. R., Santos, J. L., Vilaça, J. E. S., Char, J. S., Falcão, N. P. S., Pohlit, A. M., & de Souza, L. K. C. (2022). Renewable

- Energy from Biomass: an Overview of the Amazon Region. *Bioenergy Research*, 15(2), 834-849. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10308-x>
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., & Pastore, G. M. (2018). Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 245(November 2017), 738-749. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.120>
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E., & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Bas-Bellver, C., Andrés, C., Seguí, L., Barrera, C., Jiménez-Hernández, N., Artacho, A., Betoret, N., & Gosalbes, M. J. (2020). Valorization of Persimmon and Blueberry Byproducts to Obtain Functional Powders: In Vitro Digestion and Fermentation by Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(30), 8080-8090. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02088>
- Brito-Arias, M. (2022). *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-97854-9>
- Cândido, T. L. N., Silva, M., & Agostini-Costa, T. (2015). Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. *Food Chemistry*, 177, 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.041>
- Cândido, T. L. N., & Silva, M. R. (2017). Comparison of the physicochemical profiles of buriti from the Brazilian Cerrado and the Amazon region. *Food Science and Technology (Brazil)*, 37, 78-82. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.32516>
- Capital. (2018, noviembre 25). *Ecocarbón: conoce las bondades del carbón ecológico hecho a base de biomasa*. Capital. <https://capital.pe/actualidad/eco-carbon-conoce-las-bondades-del-carbon-ecologico-hecho-a-base-de-biomasas-noticia-1165458>
- Cardoso, F. C., Costa, A. P. D. S., Crispino, A. C. S., Silva, A. P. R. e, & Oliveira, J. A. R. de. (2020). Physicochemical characterization, bioactive compounds and antioxidant activity of pulp, peel, endocarp and food paste developed with buriti pulp and waste (*Mauritia flexuosa* L.). *Scientia Plena*, 16(11), 1-10. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.111501>
- Centro de Conservación Investigación y Manejo de Áreas Naturales. (2012). *Revaloración e Importancia del Aguaje en la zona de amortiguamiento del Parque Nacional Cordillera Azul* (Alpigraf). <https://www.cima.org.pe/files/images/publicaciones/pdf/CIMA-2012-cartilla-revalorizacion-del-aguaje.pdf>
- Cook, N., & Samman, S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7(66), 67-76.
- Cronquist, A. (1998). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Garden.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human*

- Diet*, 1, 1-24. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- D'Acunha-Sandoval, M. (2015). *Estudio de la dinámica de la degradación de hojarasca en bosque tropical amazónico utilizando marcadores químicos de descomposición*.
- Dai, Q., Yu, Q., Tian, Y., Xie, X., Song, A., Caruso, F., Hao, J., & Cui, J. (2019). Advancing Metal-Phenolic Networks for Visual Information Storage. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(32), 29305-29311. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09830>
- Darzi, J., Frost, G. S., & Robertson, M. D. (2011). Do SCFA have a role in appetite regulation? *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(1), 119-128. <https://doi.org/10.1017/S0029665110004039>
- De Souza, F. G., De Araújo, F. F., De Paulo Farias, D., Zanotto, A. W., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2020). Brazilian fruits of Areaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. *Food Research International*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109690>
- Del Castillo, D., Otárola, E., & Freitas, L. (2006). *La maravillosa palmera de la Amazonía*. IIAP. [http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/76/2/aguaje\\_libro\\_2006.pdf](http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/76/2/aguaje_libro_2006.pdf)
- Dewick, P. (2009). Medicinal Natural Products. En *Wiley* (3rd ed.). Wiley.
- Díaz, J., Paredes, M., & Martínez, J. (2015). *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.
- Domínguez-Rodríguez, G., Plaza, M., & Marina, M. L. (2021). High-performance thin-layer chromatography and direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry of non-extractable polyphenols from tropical fruit peels. *Food Research International*, 147, 110455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110455>
- Erlanson-Albertsson, C. (2010). Fat-Rich Food Palatability and Appetite Regulation. En J. Montmayeur & J. le Coutre (Eds.), *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. CRC Press/Taylor & Francis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53552/>
- Escriche, I., Restrepo, J., Serra, J., & Herrera, L. (1999). Composition and nutritive value of Amazonian palm fruits. *Food and Nutrition Bulletin*, 20(3), 361-364.
- Flores, L., Crivellaro, C., Klein, D., & Maria, A. (2017). Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. 227, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.087>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *Dietary guidelines and sustainability*. <https://www.fao.org/nutrition/education/food-dietary-guidelines/background/sustainable-dietary-guidelines/en/>
- Freeman, C., & West, D. (1966). Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. *Journal Lipid Research*, 7(2), 324-327. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39297-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39297-X)
- Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., & Xu, W. (2022). Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. *Microorganisms*, 10(12), 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122507>
- García-Amezquita, L. E., Tejada-Ortigoza, V., Heredia-Olea, E., Serna-Saldívar, S. O., &

- Welti-Chanes, J. (2018). Differences in the dietary fiber content of fruits and their by-products quantified by conventional and integrated AOAC official methodologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.004>
- Gobierno Regional de Loreto. (2020). *Se llevó a cabo el lanzamiento del Proyecto Aguaje*. <https://www.regionloreto.gob.pe/noticias/2020/09/01/se-llevo-a-cabo-el-lanzamiento-del-proyecto-aguaje> (Accedido el 15 de marzo de 2024)
- Guimarães, M. G., Evaristo, R. B. W., de Mendonça Brasil, A. C., & Ghesti, G. F. (2021). Green energy technology from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) for Brazilian agro-extractive communities. *SN Applied Sciences*, 3(3), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04278-0>
- Hagerman, A. (2002). *Tannin Chemistry*. Miami University.
- Handique, J. G., & Baruah, J. B. (2002). Polyphenolic compounds: An overview. *Reactive and Functional Polymers*, 52(3), 163-188.
- Hidalgo Pizango, C. G., Honorio Coronado, E. N., del Águila-Pasquel, J., Flores Llampazo, G., de Jong, J., Córdova Oroche, C. J., Reyna Huaymacari, J. M., Carver, S. J., del Castillo Torres, D., Draper, F. C., Phillips, O. L., Roucoux, K. H., de Bruin, S., Peña-Claros, M., van der Zon, M., Mitchell, G., Lovett, J., García Mendoza, G., Gatica Saboya, L., ... Baker, T. R. (2022). Sustainable palm fruit harvesting as a pathway to conserve Amazon peatland forests. *Nature Sustainability*, 5(6), 479-487. <https://doi.org/10.1038/s41893-022-00858-z>
- Hosseinian, B., Oomah, D., & Campos-Vega, R. (2017). Dietary Fibre Functionality in Food And Nutraceuticals. En F. Shahidi (Ed.), *Sustainability* (First, Vol. 11, Número 1). Wiley.
- Huang, D., Ou, B., & Prio, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidante Capacity Assays. *J. Agri. Food Chem.*, 53(6), 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). *Censo Agropecuário (Agricultural Census)*. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2233#re-sultado> (Accedido el 11 de octubre de 2024)
- Instituto Tecnológico de la Producción. (2018). *Aprovechamiento de residuos de Mauritia flexuosa*. VTiC.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human - European Medicines Agency. (2006). *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>
- Isidorov, V. (2020). *GC-MS of Biologically and Environmentally Significant Organic Compounds: TMS Derivatives* (First). Wiley.
- Ismail, B. B., Guo, M., Pu, Y., Wang, W., Ye, X., & Liu, D. (2019). Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52(November 2018), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.023>
- Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2015). Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS,

- and TLC-DPPH•. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38(11), 1147-1153. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1028295>
- John Wiley & Sons Inc. (2024). *Ellagic acid, tetra-TMS*. SpectraBase. <https://spectrabase.com/spectrum/3xqG5nQzttW> (Accedido el 11 de octubre de 2024)
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 2014, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/952943>
- Keinänen, M. (1993). Comparison of Methods for the Extraction of Flavonoids from Birch Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 41(1), 1986-1990.
- Kim, H. J., Kim, E. J., Seo, S. H., Shin, C. G., Jin, C., & Lee, Y. S. (2006). Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from Gardeniae Fructus. *Journal of Natural Products*, 69(4), 600-603. <https://doi.org/10.1021/np050447r>
- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>
- Koolen, H. H. F., da Silva, F. M. A., Gozzo, F. C., de Souza, A. Q. L., & de Souza, A. D. L. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2), 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.039>
- Koyani, R. D., & Vazquez-duhalt, R. (2018). *Enzymatic Activation of the Emerging Drug Resveratrol Content courtesy of Springer Nature , terms of use apply . Rights reserved . Content courtesy of Springer Nature , terms of use apply . Rights reserved . June 2017, 248-256.*
- Kozłowska, H., Rotkiewicz, R., & Zadernowski, R. (1983). Phenolic Acids in Rapeseed and Mustard. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(6), 1119-1123.
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330-334. <https://doi.org/10.1021/jf00110a028>
- Kuppusamy, P., Lee, K. D., Song, C. E., Ilavenil, S., Srigopalram, S., Arasu, M. V., & Choi, K. C. (2018). Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(3), 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>
- Kurata, S., & Kajurai, T. (2011). Simultaneous Analysis of Eight Catechins in Tea Drinks by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Bunseki Kagaku*, 61(1), 63-68.
- Kyriakoudi, A., Kalfa, E., Zymvrakaki, E., Kalogiouri, N., & Mourtzinis, I. (2024). Recovery of Ellagic Acid from Pomegranate Peels with the Aid of Ultrasound-Assisted Alkaline Hydrolysis. *Molecules*, 29(2424), 1-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules29112424>
- Lawther, J. M., Sun, R., & Banks, W. B. (1996). Fractional characterization of alkali-labile lignin and alkali-insoluble lignin from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 5(4), 291-300. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(96)00028-3)
- Loo, Y. T., Howell, K., Chan, M., Zhang, P., & Ng, K. (2020). Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. En *Comprehensive Reviews in*

- Food Science and Food Safety* (Vol. 19, Número 4, pp. 1268-1298).  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12563>
- Lou, X., Xu, H., Hanna, M., & Yuan, L. (2020). Identification and quantification of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolic compounds in hawthorn berry fruit (*Crataegus pinnatifida*) and antioxidant activity evaluation. *Lwt*, *130*, 109643. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109643>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Margraf, T., Karnopp, A., Rosso, N., & Granato, D. (2015). *Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates*. *80*(11), 2397-2403.
- Marsol-Vall, A., Balcells, M., Eras, J., & Canela-Garayoa, R. (2016). Injection-port derivatization coupled to GC-MS/MS for the analysis of glycosylated and non-glycosylated polyphenols in fruit samples. *Food Chemistry*, *204*, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.089>
- Martinez, K. B., Mackert, J. D., & McIntosh, M. K. (2017). Polyphenols and Intestinal Health. En *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging* (Número 2014). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805376-8.00018-6>
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, *67*(21), 2318-2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
- Mencin, M., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., & Terpinic, P. (2021). Development and Optimisation of Solid-Phase Extraction of Extractable and Bound Phenolic Acids in Spelt (*Triticum spelta* L.) Seeds. *antioxidants*, *10*(1085).
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzyńska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, *1187*(1-2), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.001>
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, *142*, 110189. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Moldoveanu, S. (2014). The Utilization of Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Profiling of Several Antioxidants in Botanicals. En *Advances in Gas Chromatography* (pp. 103-133). IntechOpen. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57292>
- 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. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, *77*, 392-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036>
- Móricz, Á. M., Szeremeta, D., Knaś, M., Długosz, E., Ott, P. G., Kowalska, T., & Sajewicz, M. (2018). Antibacterial potential of the *Cistus incanus* L. phenolics as studied with use of thin-layer chromatography combined with direct bioautography and in situ hydrolysis. En *Journal of Chromatography A* (Vol. 1534).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.056>

- Mottiar, Y., Karlen, S. D., Goacher, R. E., Ralph, J., & Mansfield, S. D. (2023). Metabolic engineering of p-hydroxybenzoate in poplar lignin. *Plant Biotechnology Journal*, 21(1), 176-188. <https://doi.org/10.1111/pbi.13935>
- Mustafa, N., & Verpoorte, R. (2007). Phenolic compounds in *Catharantus roseus*. En N. Mustafa (Ed.), *Retrobiosynthetic study of salicylic acid in Catharantus roseus cell suspension cultures* (pp. 13-34). PrintPartners Ipskamp B. V. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1554-0>
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., & Scaccini, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79(1), 119-124. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00213-3)
- Navarro, F. (2006). *Cadenas productivas de aguaje y tagua*. ProNaturaleza.
- Nicolás-García, M., Perucini-Avenidaño, M., & Jiménez-Martínez, C. (2021). Bean phenolic compound changes during processing : Chemical interactions and identification. *J. Food Science*, 86(3), 643-655. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15632>
- Nielsen, S. S. (2017). *Food analysis* (5th ed., Vol. 21, Número 2). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1039/AP9842100064>
- Niranjana, H. (2020). Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts. En *Reference Series in Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30182-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30182-8_17)
- Nurdalilah, O., Teoh, Y. P., Ooi, Z. X., & Sam, S. T. (2018). Comparative Study on the Extraction of Bioactive Secondary Metabolites from Pomelo and Pineapple Peels Extract. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 429(1).
- Oriez, V., Peydecastaing, J., & Pontalier, P. Y. (2020). Lignocellulosic Biomass Mild Alkaline Fractionation and Resulting Extract Purification Processes: Conditions, Yields, and Purities. *Clean Technologies*, 2(1), 91-115. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol2010007>
- Ortiz, R., Antilén, M., Speisky, H., Aliaga, M. E., López-Alarcón, C., & Baugh, S. (2012). Application of a microplate-based orac-pyrogallol red assay for the estimation of antioxidant capacity: First action 2012.03. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1558-1561. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2012\\_03](https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2012_03)
- Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2007). Antioxidant activity of phytopolyphenols: Assessment in cell culture systems. *ACS Symposium Series*, 956, 92-105. <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0956.ch007>
- Pearl, I., Beyer, D., & Laskowski, D. (1959). Alkaline hydrolysis of representative Palms. *TAPPI*, 42(9), 779-782. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19596602333>
- Pereira-Freire, J. A., Aquino, J. de S., Campos, A. R. N., Viana, V. G. F., Júnior, J. S. da C., Silva, J. D. N., Moura, A. K. S., Citó, A. M. D. G. L., Moreira-Araújo, R. S. D. R., Frota, K. de M. G., Medeiros, S. R. A., & Ferreira, P. M. P. (2022). Nutritional, Physicochemical and Structural Parameters of *Mauritia flexuosa* Fruits and By-Products for Biotechnological Exploration of Sustainable Goods. *Food Technology and*

*Biotechnology*, 60(2), 155-165. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7106>

- Pereira-Freire, J. A., Barros, K., Lima, L., Martins, J., Araújo, Y., da Silva Oliveira, G., de Souza Aquino, J., & Ferreira, P. (2016). Phytochemistry Profile, Nutritional Properties and Pharmacological Activities of *Mauritia flexuosa*. *Journal of Food Science*, 81(11), 2611-2622.
- Pereira-Freire, J. A., Oliveira, G. L. D. S., Lima, L. K. F., Ramos, C. L. S., Arcanjo-Medeiros, S. R., Lima, A. C. S. De, Teixeira, S. A., Oliveira, G. A. L. De, Nunes, N. M. F., Amorim, V. R., Lopes, L. D. S., Rolim, L. A., Costa-Júnior, J. S. Da, & Ferreira, P. M. P. (2018). In Vitro and Ex Vivo Chemopreventive Action of *Mauritia flexuosa* Products. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-12.
- Pereira, R., Souza, P., Braga, M., dos Santos, P., Ferreira, C., Zamian, J., Santos, L., & da Rocha, G. (2017). 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. *Industrial Crops and Products*, 97, 536-544.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
- Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., & Cano-Mozo, E. (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11560-11570. <https://doi.org/10.1021/jf802100j>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
- Pozo-Martínez, J., Vázquez-Rodríguez, S., Olea-Azar, C., & Moncada-Basualto, M. (2022). Evaluation of ORAC methodologies in determination of antioxidant capacity of binary combinations of quercetin and 3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl) coumarin derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(11). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104298>
- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), 664-671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.049>
- Resende, L. M., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2019). Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) fruit by-products flours: Evaluation as source of dietary fibers and natural antioxidants. *Food Chemistry*, 270, 53-60.
- Robbins, R. (2003). Phenolic Acids in Foods : An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866-2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M. J., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811-842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>

- Rodrigues, S., de Oliveira Silva, E., & Sousa de Brito, E. (2018). Exotic Fruits Reference Guide. En *Exotic Fruits*. Academic Press.
- Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., & Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.689456>
- Rojas, R., Ruiz, G., Ramírez, P., Salazar, C., Rengifo, C., Llerena, C., Marín, C., Torres, D., Ojana, J., & Silvano, W. (IIAP). (2001). Comercialización de masa y fruto verde de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) en Iquitos (Perú). *Folia Amazónica*, 12, 15-38.
- Rudke, A. R., Andrade, K. S., Mazzutti, S., Zielinski, A. A. F., Alves, V. R., Vitali, L., & Ferreira, S. R. S. (2021). A comparative study of phenolic compounds profile and in vitro antioxidant activity from buriti (*Mauritia flexuosa*) by-products extracts. *Lwt*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111941>
- Rudke, A. R., Mazzutti, S., Suzana, K., Vitali, L., Regina, S., & Ferreira, S. (2019). Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidant compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell. *Food Chemistry*, 298, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125061>
- Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
- Ruiz, L., & Orbegoso, K. (2019). *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.
- Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, 40(1), 239-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.038>
- Saadi, A., Lempereur, I., Sharonov, S., Autran, J. C., & Manfait, M. (1998). Spatial distribution of phenolic materials in durum wheat grain as probed by confocal fluorescence spectral imaging. *Journal of Cereal Science*, 28(2), 107-114. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0195>
- Sakushima, A., Coşkun, M., & Maoka, T. (1995). Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry*, 40(1), 257-261. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00059-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00059-G)
- Sanches, A., Nabavi, S. F., Saeedi, M., & Nabavi, S. M. (Eds.). (2020). *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier.
- Saura-calixto, F. (1998). Antioxidant Dietary Fiber Product : A New Concept and a Potential. *Journal für Ernährungsmedizin*, 46, 4303-4306.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49. <https://doi.org/10.1021/jf1036596>
- Schendel, R. R. (2018). Phenol content in sprouted grains. En *Sprouted Grains: Nutritional*

- Value, Production, and Applications* (Número 2010). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00010-5>
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *910*(2), 265-273. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01217-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01217-6)
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology*, *91*(1-2), 21-40.  
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Shahidi, F., & Yeo, J. D. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, *21*(9).  
<https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Sifuentes, E., Albuja, E., Contreras, S., León, C., Moreyra, J. C., & María, J. S. (2017). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola y Ganadera 2016*. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*(1974), 152-178.
- Smith, N. (2015). *Palms and People in the Amazon*. Springer.
- Soares, A. R., Marchiosi, R., de Cássia Siqueira-Soares, R., de Lima, R. B., dos Santos, W. D., & Ferrarese-Filho, O. (2014). The role of L-DOPA in plants. *Plant Signaling and Behavior*, *9*(4). <https://doi.org/10.4161/psb.28275>
- Somaroo, B. H., Thakur, M. L., & Grant, W. F. (1973). A useful spray reagent to differentiate common phenolic compounds on thin-layer plates and paper chromatograms. *Journal of Chromatography A*, *87*(1), 290-293. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91554-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91554-7)
- Soquetta, M. B., Terra, L. de M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CYTA - Journal of Food*, *16*(1), 400-412. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>
- Sotero, V., Luján, M., Freitas, L., Merino, C., & Dávila, É. (2013). Estabilidad y actividad antioxidante de la pulpa liofilizada de tres morfotipos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *79*(2), 136-143.
- Stahl, M. (2003). Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. Available online: *Agilent technologies*, *8*, 5988-8647.  
<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5988-8647EN.pdf>
- Sugizaki, C. S. A., & Naves, M. M. V. (2018). Potential prebiotic properties of nuts and edible seeds and their relationship to obesity. *Nutrients*, *10*(11).  
<https://doi.org/10.3390/nu10111645>
- Tapsell, L. (2004). Diet and metabolic syndrome: where does resistant starch fit in? *Journal AOAC*, *87*, 756-760.
- Tauchen, J., Bortl, L., Huml, L., Miksatkova, P., Duskocil, I., Marsik, P., Villegas, P. P. P., Flores, Y. B., Van Damme, P., Lojka, B., Havlik, J., Lapcik, O., & Kokoska, L. (2016). Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the peruvian amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(6), 728-737. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.016>

- The Rockefeller University. (2022). *Thin Layer Chromatography (TLC) for the Separation of Lipids*. <https://rockedu.rockefeller.edu/component/tlc-hs/> (Accedido el 12 de mayo de 2024)
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2019). Effect of Food Structure and Processing on (Poly)phenol– Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health Francisco. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, *10*, 1-18. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818->
- Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2016). Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *19*(6), 471-476. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000314>
- Ueda, S., Nomoto, R., Yoshida, K. I., & Osawa, R. (2014). Comparison of three tannases cloned from closely related lactobacillus species: *L. Plantarum*, *L. Paraplantarum*, and *L. Pentosus*. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-87>
- Vaclavik, V. A., & Christian, E. W. (2008). Essentials of food science. En *Choice Reviews Online* (Vol. 45, Número 11). <https://doi.org/10.5860/choice.45-6154>
- Vásquez-Ocmín, P., Alvarado, F., Solís, S., & Paván, R. (2010). Chemical characterization and oxidative stability of the oils from three morphotypes of *Mauritia flexuosa* L. f., from the Peruvian Amazon. *Grasas y Aceites*, *61*(4), 390-397.
- Vásquez-Ocmín, P., Sotero, E., Dennis, S., Castillo, D., Luis, T., Alvarado, F., Milagros, M., & Luján, M. (2009). DIFERENCIACIÓN QUÍMICA DE TRES MORFOTIPOS DE *L. f. DE LA AMAZONÍA PERUANA*. *Rev Soc Quím Perú*, *75*(3), 320-328. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n3/a07v75n3.pdf>
- Villachica, H. (1996). *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía*. Secretaría Pro-Tempore.
- Vollmannová, A., Bojňanská, T., Musilová, J., Lidiková, J., & Cifrová, M. (2024). Quercetin as one of the most abundant represented biological valuable plant components with remarkable chemoprotective effects - A review. *Heliyon*, *10*(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33342>
- Wang, B., Huang, Q., Venkitasamy, C., Chai, H., Gao, H., Cheng, N., Cao, W., Lv, X., & Pan, Z. (2016). Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages. *Lwt*, *66*, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.005>
- Wang, J., Xu, J., Gong, X., Yang, M., Zhang, C., & Li, M. (2019). Biosynthesis, chemistry, and pharmacology of polyphenols from Chinese *Salvia* species: A review. *Molecules*, *24*(1), 1-23. <https://doi.org/10.3390/molecules24010155>
- Wang, K., Liu, Z., Huang, J. A., Fu, D., Liu, F., Gong, Y., & Wu, X. (2009). TLC separation of catechins and theaflavins on polyamide plates. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, *22*(2), 97-100. <https://doi.org/10.1556/JPC.22.2009.2.4>
- Wang, Y. C., Chuang, Y. C., & Hsu, H. W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, *106*(1), 277-284.
- Wang, Y., Liu, Y., Xiao, C., Liu, L., Hao, M., Wang, J., & Liu, X. (2014). Simultaneous Determination of 15 Phenolic Constituents of Chinese Black Rice Wine by HPLC-MS/MS with SPE. *J. Food Science*, *79*(6), 1100-1105.

- Wang, Y., Qian, J., Cao, J., Wang, D., Liu, C., Yang, R., Li, X., & Sun, C. (2017). Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) varieties. *Molecules*, 22(7), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules22071114>
- Wang, Z., Li, S., Ge, S., & Lin, S. (2020). Review of Distribution, Extraction Methods, and Health Benefits of Bound Phenolics in Food Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3330-3343. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06574>
- Waterhouse, A. L. (2005). Determination Of Total Phenolics. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2-2(1), 463-470. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch28>
- White, B. L., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7572-7579. <https://doi.org/10.1021/jf100700p>
- William, C., & Xialin, H. (2012). *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and lipodomic analysis* (Fourth). Woodhead Publishing.
- Wrolstad, R. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142913>
- Xia, Z., Wei, L. I. U., Yong, X. U., Liu, Y., Wei-song, K., & Xiao-dong, R. U. I. (2011). Comparison of Different Cartridges of Solid Phase Extraction for Determination of Polyphenols in Tobacco by UPLC / MS / MS and Multivariate Analysis. 27(110200902008), 550-556.
- Yao, S. W., Wen, X. X., Huang, R. Q., He, R. R., Ou, S. Y., Shen, W. Z., Huang, C. H., & Peng, X. C. (2014). Protection of feruloylated oligosaccharides from corn bran against oxidative stress in PC 12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 668-674. <https://doi.org/10.1021/jf404841c>
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>
- Zamora, G. (2010). *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.
- Zhang, B., Zhang, Y., Li, H., Deng, Z., & Tsao, R. (2020). A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 105(March), 347-362. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.029>
- Zhang, D., Liu, Y., Chu, L., Wei, Y., Wang, D., Cai, S., Zhou, F., & Ji, B. (2013). Relationship between the structures of flavonoids and oxygen radical absorbance capacity values: A quantum chemical analysis. *Journal of Physical Chemistry A*, 117(8), 1784-1794. <https://doi.org/10.1021/jp307746c>
- Zhang, F., Fan, D., Huang, J. lin, & Zuo, T. (2022). The gut microbiome: linking dietary fiber to inflammatory diseases. *Medicine in Microecology*, 14(November). <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2022.100070>
- Zhang, K., & Zuo, Y. (2004). GC-MS Determination of Flavonoids and Phenolic and Benzoic Acids in Human Plasma after Consumption of Cranberry Juice. *Journal of*

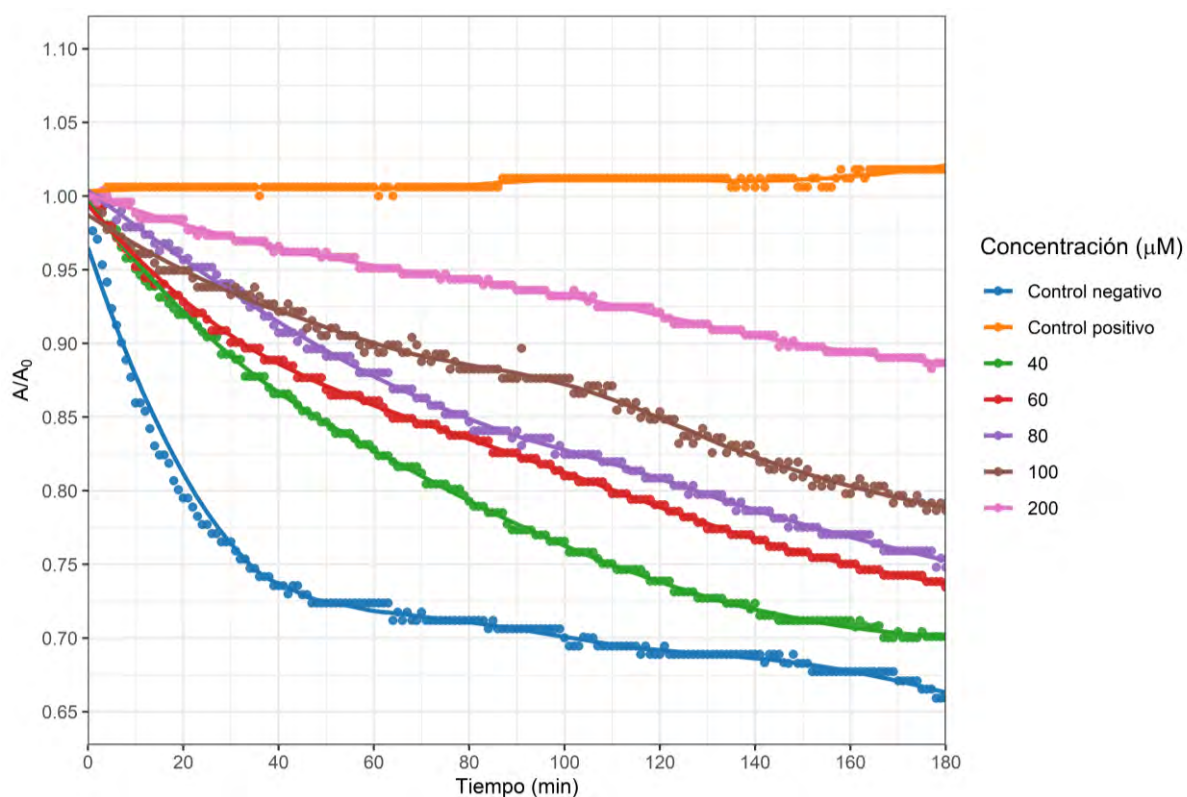
*Agricultural and Food Chemistry*, 52, 222-227.

Zhong, Q. Z., Pan, S., Rahim, M. A., Yun, G., Li, J., Ju, Y., Lin, Z., Han, Y., Ma, Y., Richardson, J. J., & Caruso, F. (2018). Spray Assembly of Metal-Phenolic Networks: Formation, Growth, and Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(39), 33721-33729. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b13589>

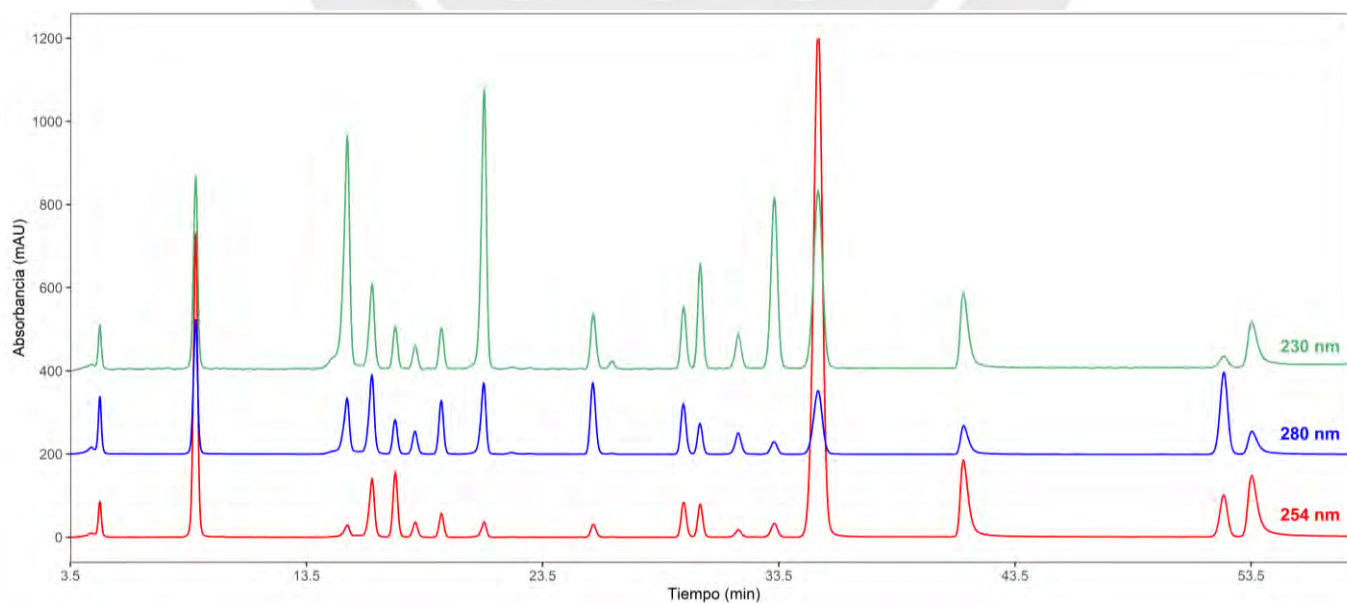


## Anexos

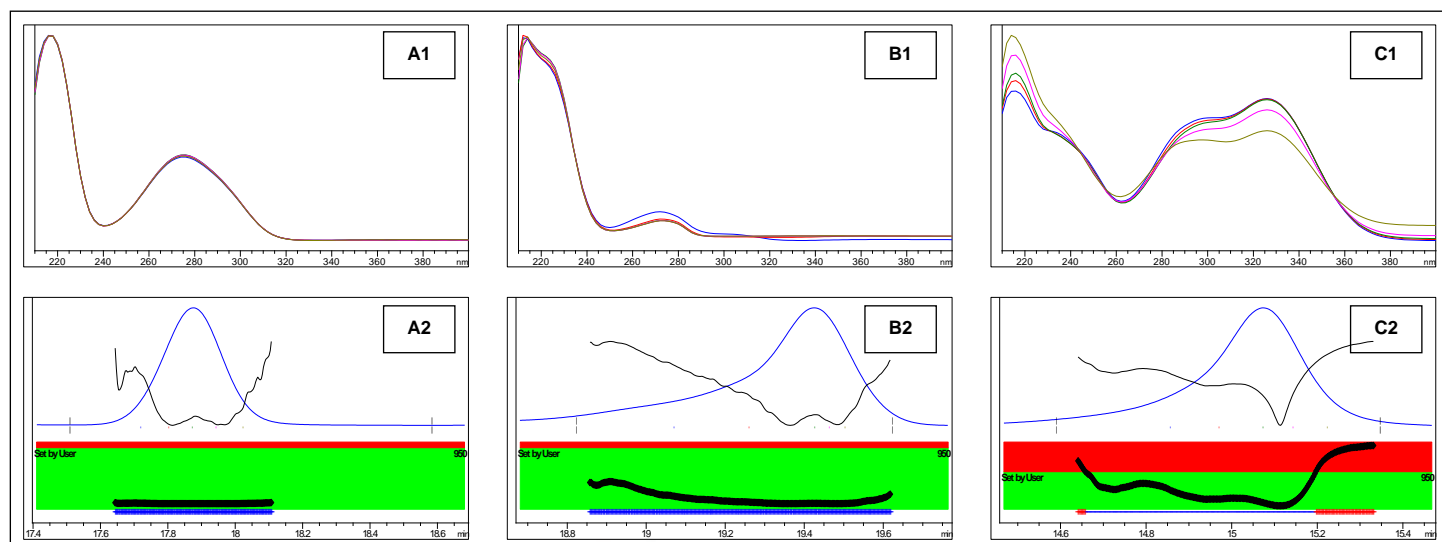
## Figuras complementarias



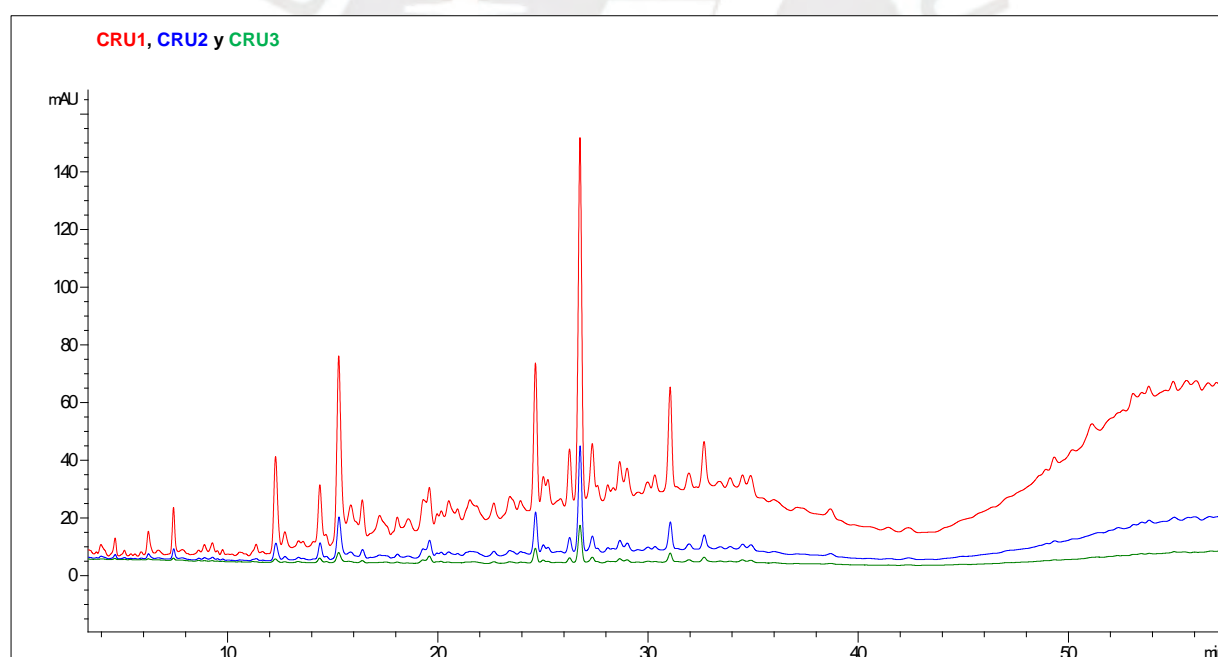
**Figura A1.** Consumo de PGR inducido por AAPH en presencia de trolox.



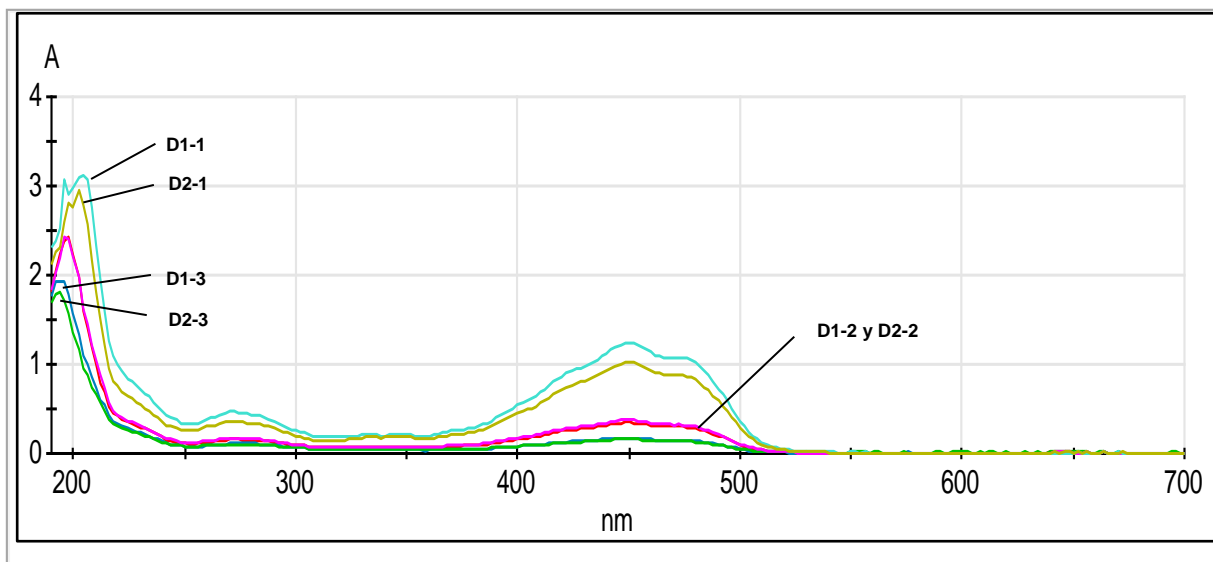
**Figura A2.** Separación de 16 fenólicos por HPLC-DAD (RP) a diferentes longitudes de onda.



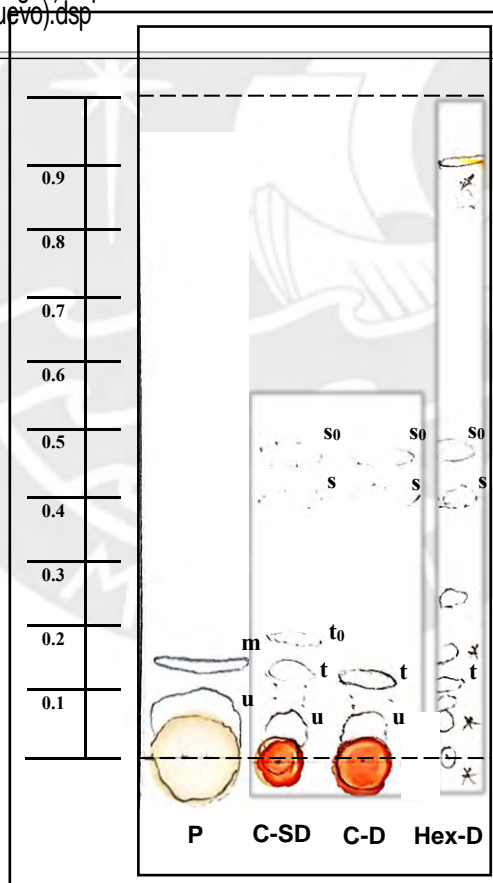
**Figura A3.** Resultados del análisis de pureza espectral en algunos picos de los cromatogramas. Las imágenes superiores (1) corresponden a la superposición de los espectros registrados ( $n=5$ ) para la evaluación de picos correspondientes a A = ácido sirínico, B = (-)-epicatequina y C = ácido clorogénico. Las imágenes inferiores (2) corresponden al resultado de la determinación de la razón de pureza (*purity ratio*) para el pico de A, B y C.



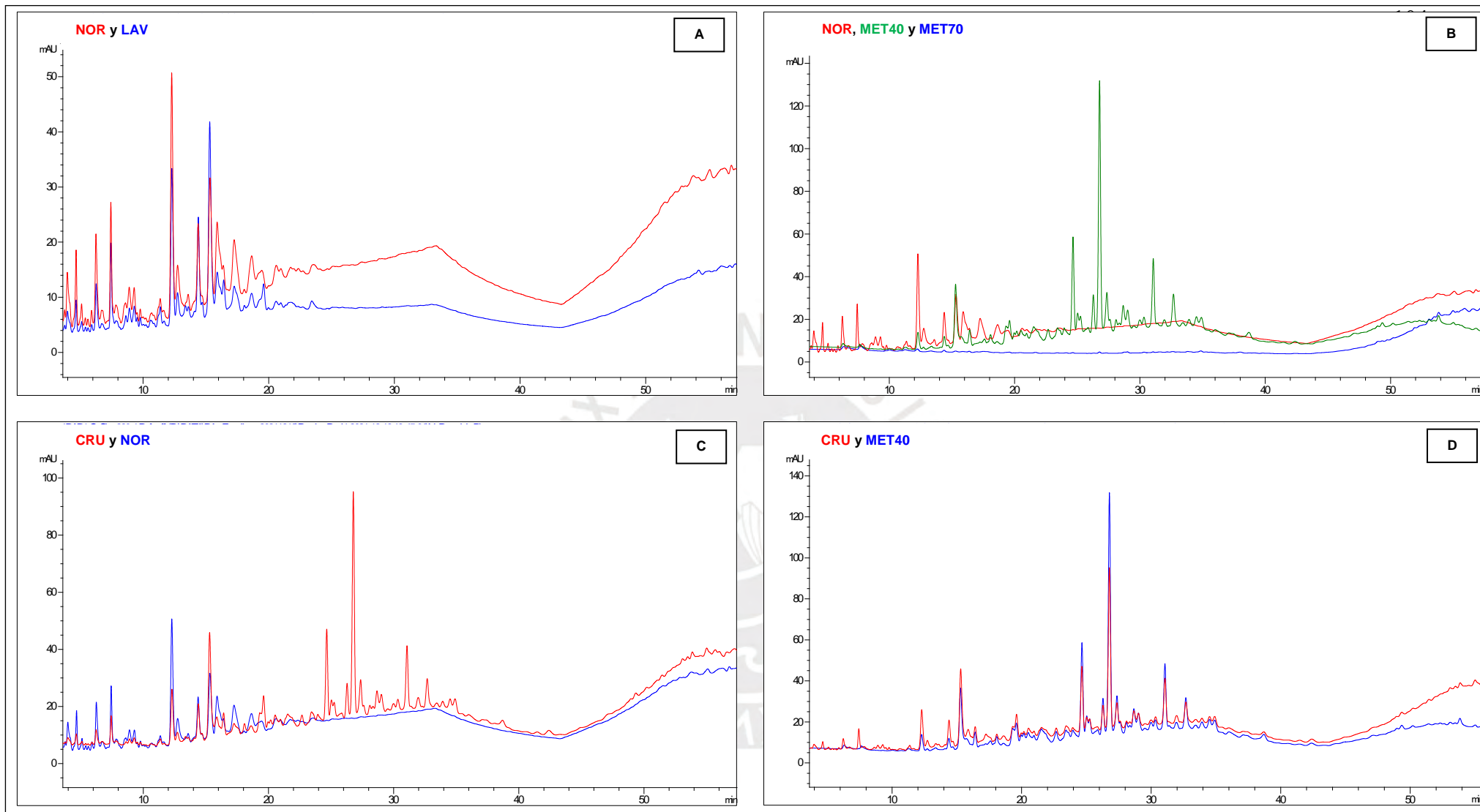
**Figura A4.** Separación por HPLC-DAD (RP) a 280 nm de los extractos crudos correspondientes a las 3 extracciones sucesivas asistidas por ultrasonido a 60°C. CRU1 = 60 min; CRU2 = +30 min; CRU3 = +30 min. Se usaron cáscaras de aguajes “Color”.



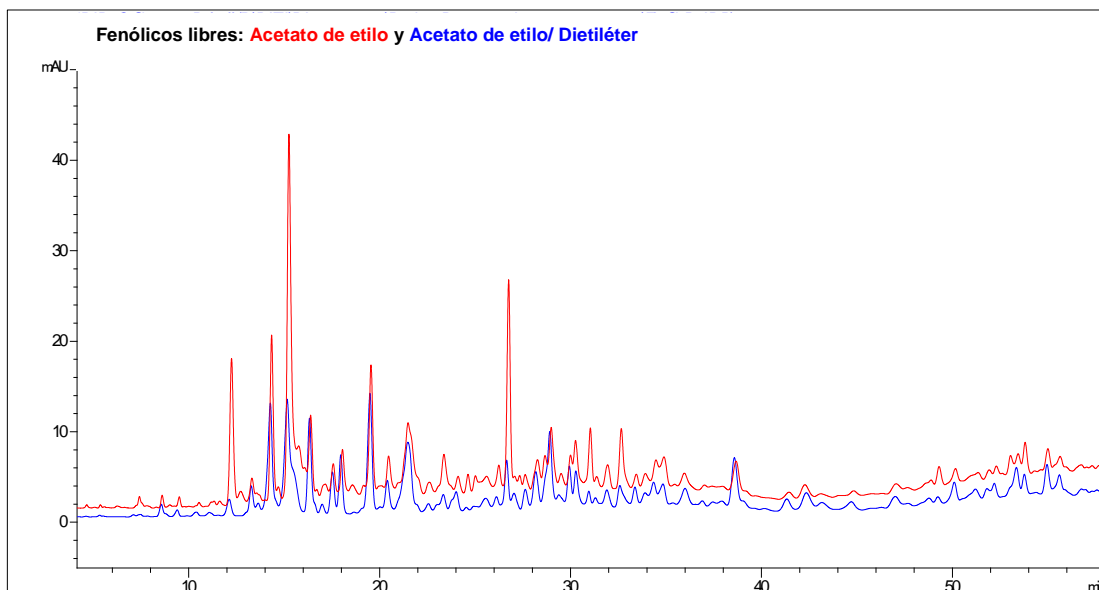
2do\_ext\_hex\_2.dsp  
3er\_ext\_hex\_2.dsp  
3er\_ext\_hex\_(N).dsp  
2da\_ext\_hex\_(N).dsp  
1er\_ext\_hex\_(Antiguo).dsp  
1er\_ext\_hex\_(Nuevo).dsp



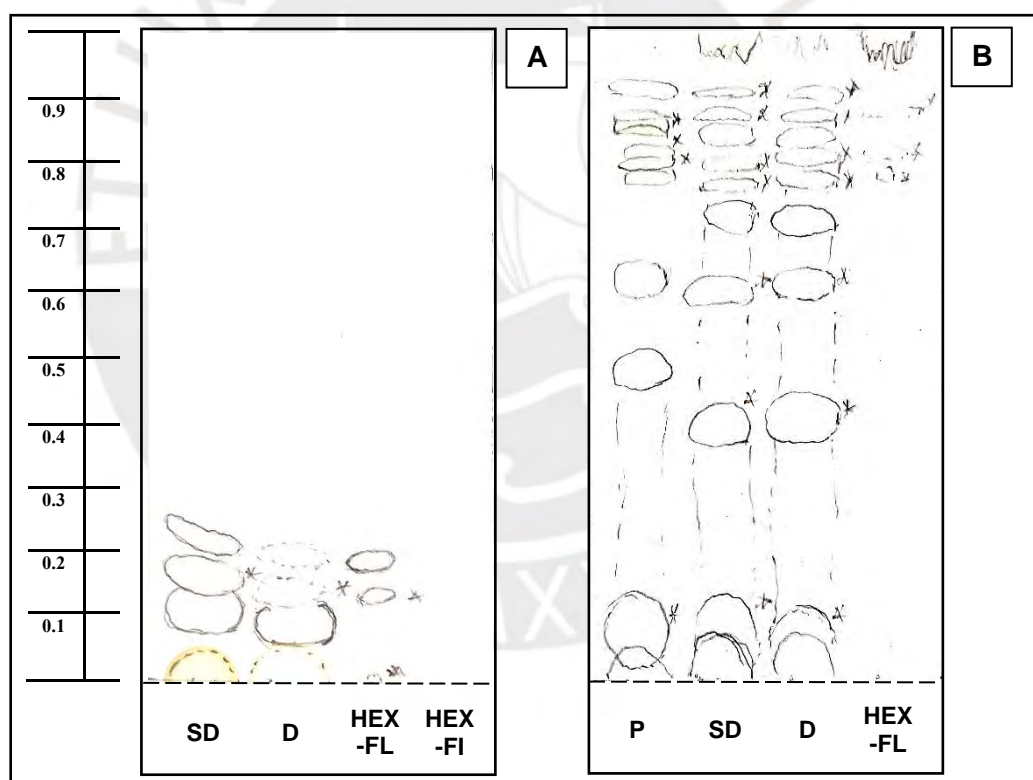
**Figura A6.** TLC de los extractos crudos con cáscaras. C-SD = sin desengrasar; C-D = desengrasadas, P = *pool* de estándares fenólicos (70 µg/mL); Hex-D = fracción de desengrasado con hexano. Las marcas se realizaron durante la visualización a 254 nm. Las manchas marcadas con asterisco se observaron a 366 nm. Se empleó el sistema de elución PE(AA) = éter de petróleo (40-60°C): dietiléter: ácido acético = 84:15:1 (v/v).



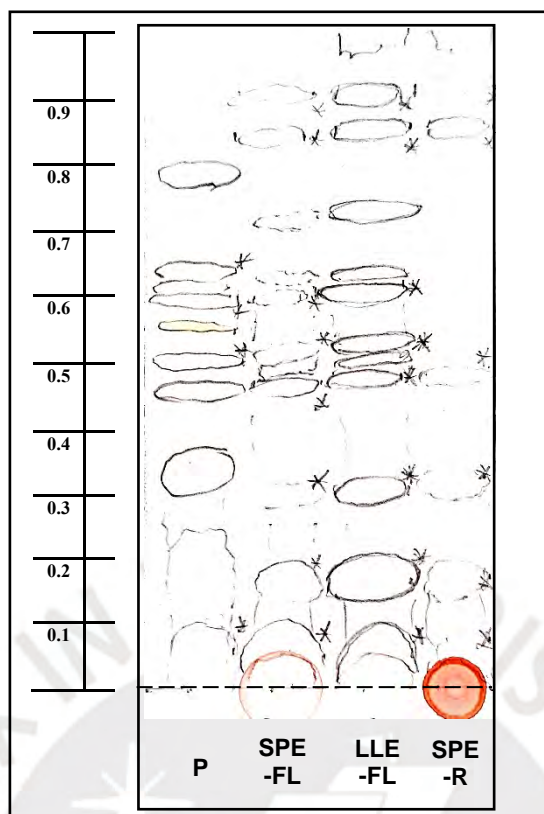
**Figura A7.** Separaciones de fracciones purificadas por SPE por HPLC-DAD (RP) a 280 nm. **A.** Los cromatogramas de la fracción no retenida NOR y de lavado LAV poseen perfiles idénticos. **B.** Los cromatogramas de NOR y del primer eluato MET40 (metanol al 40%) poseen picos notorios, mientras el del segundo eluato MET70 (metanol al 70%) no. **C.** El cromatograma de NOR posee un perfil que calza con los picos de los primeros 20 min del cromatograma de extracto crudo CRU. **D.** El cromatograma de MET40 posee un perfil que calza con los picos de CRU notoriamente a partir del minuto 10.



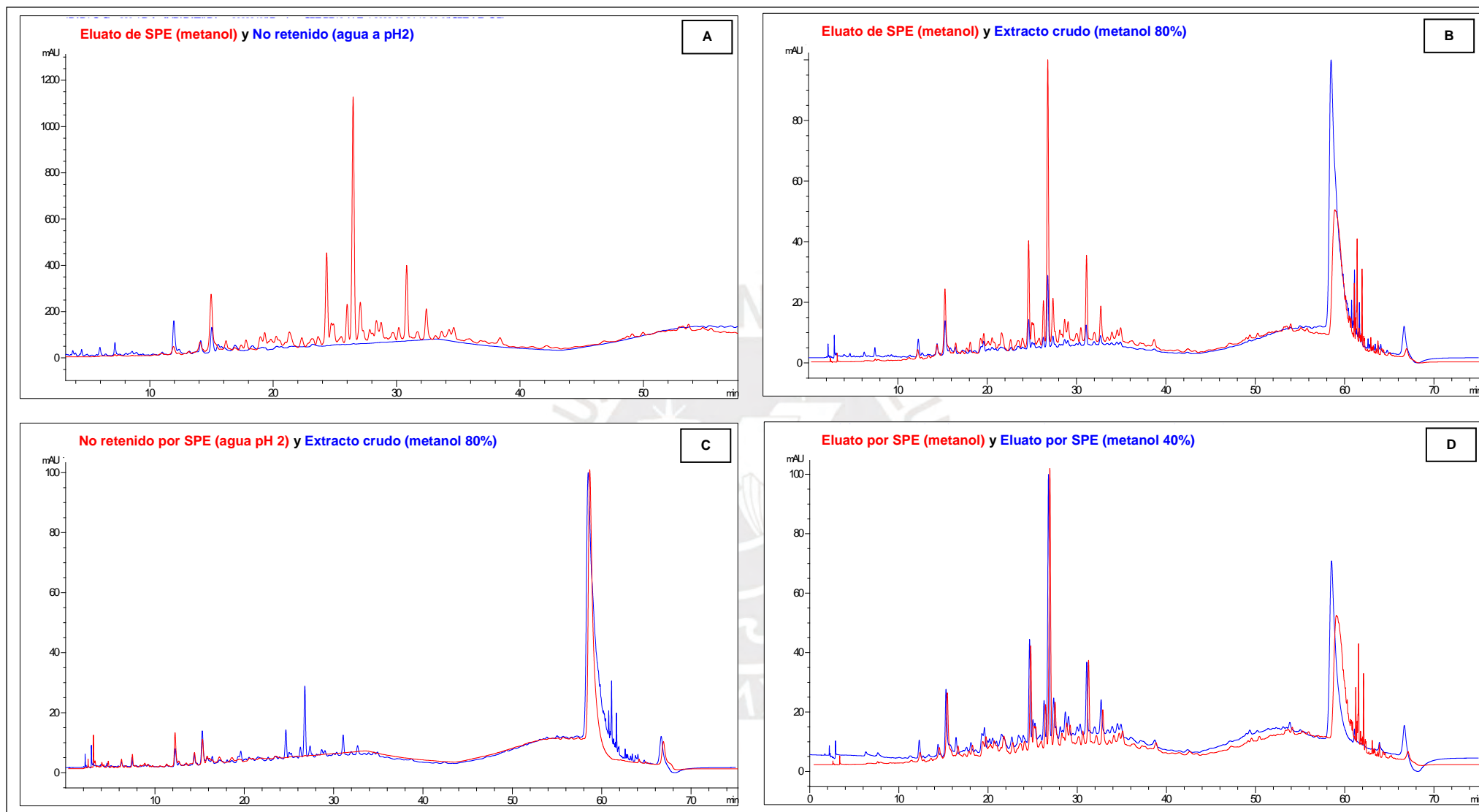
**Figura A8.** Separaciones de fracciones libres e insolubles ligados con diferentes tratamientos por HPLC-DAD (RP) a 280 nm.



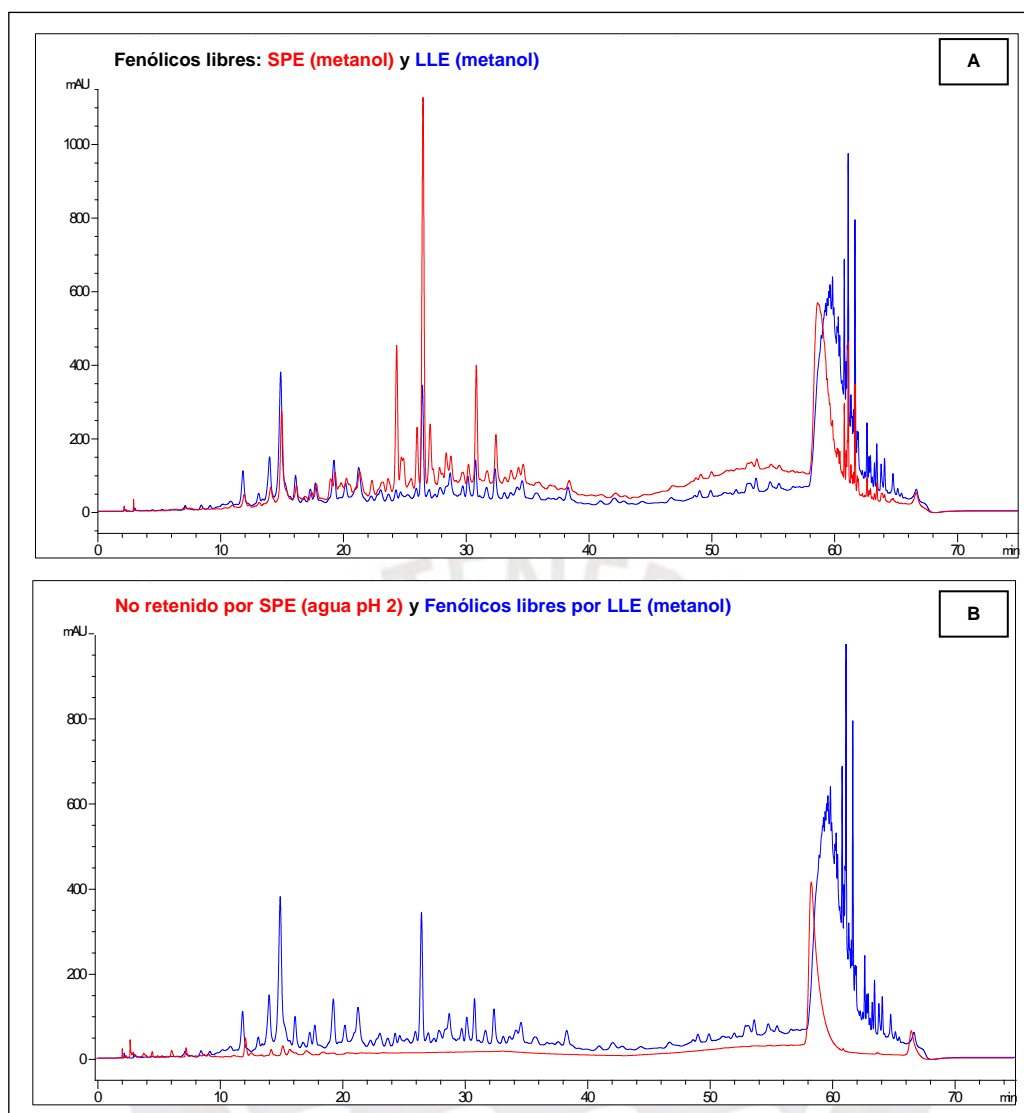
**Figura A9.** TLC de las fracciones de fenólicos libres para evaluación del efecto del desengrasado. Las marcas se realizaron durante la visualización a 254 nm. Las bandas marcadas con asterisco se observaron también a 366 nm. SD = sin desengrasar, D = con desengrasado, P = pool de fenólicos estándares, HEX = fracción extraída con *n*-hexano, FL = fenólicos libres, FI = fenólicos insolubles ligados. **A.** Separación de FL y de las fracciones HEX de FL y de FI (*n*-hexano: éter dietílico: ácido fórmico = 80: 20: 2 (v/v)). **B.** Separación P y las fracciones FL y HEX de FL (diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico: metanol = 65: 20: 10: 5 (v/v)).



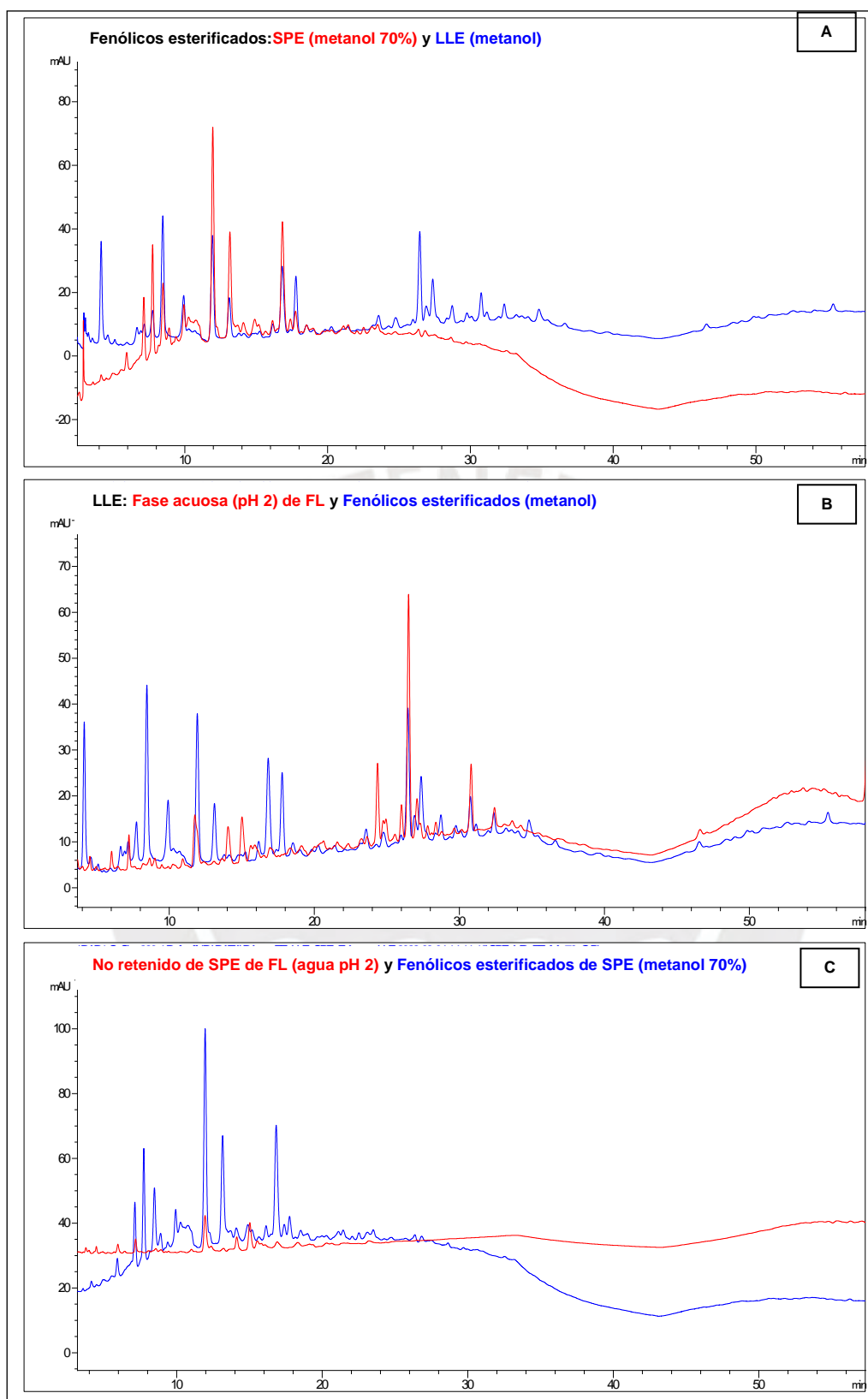
**Figura A10.** TLC de las fracciones de fenólicos libres según las pruebas por SPE. P = *pool* de fenólicos; SPE-FL = prueba de purificación por SPE; LLE-FL = LLE del extracto crudo. Se usó la fase móvil DAFM (diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico: metanol = 65: 20: 10: 5 (v/v)). También se incluyó una muestra redisuelta en metanol del residuo sólido de la suspensión acuosa del extracto crudo (SPE-R). Las marcas se realizaron durante la visualización a 254 nm y a 366 nm (\*).



**Figura A11.** Separaciones de las fracciones de elución y no retenido por SPE, y del extracto crudo de las cáscaras por HPLC-DAD (RP) a 280 nm. **A.** Eluato de SPE versus la fracción no retenida. **B.** Eluato de SPE versus el extracto crudo (picos a la misma escala). **C.** Fracción no retenida por SPE versus el extracto crudo. **D.** Eluato de SPE versus el eluato de una anterior SPE, el cual fue obtenido con metanol al 40% (v/v), en vez de solo metanol. En B., C. y D. también se muestran los picos de la región de lavado de la columna (a partir del minuto 55).



**Figura A12.** Separaciones de las fracciones obtenidas por LLE y SPE por HPLC-DAD (RP) a 280 nm. **A.** Fenólicos libres obtenidos por SPE y LLE. **B.** Fracción no retenida por SPE versus los fenólicos libres por LLE.



**Figura A13.** Separaciones de las fracciones acuosas e hidrolizadas obtenidas por LLE y SPE por HPLC-DAD (RP) a 280 nm. **A.** FE obtenidos por LLE y SPE. **B.** Fase acuosa de LLE para FL y FE obtenidos por LLE. **C.** Fracción no retenida de la SPE de FL y FE por SPE. FL = Fenólicos libres, FE = Fenólicos esterificados

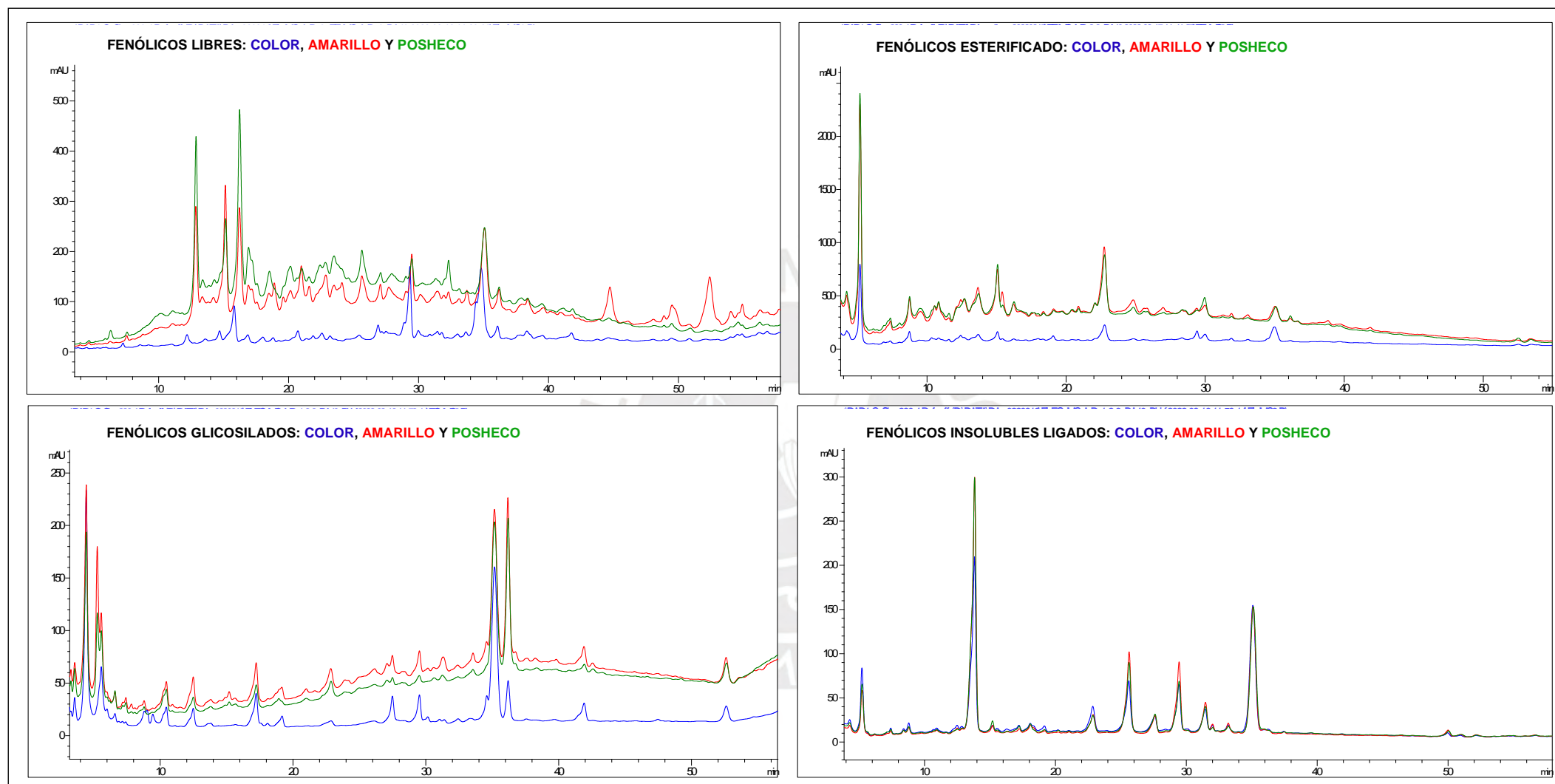
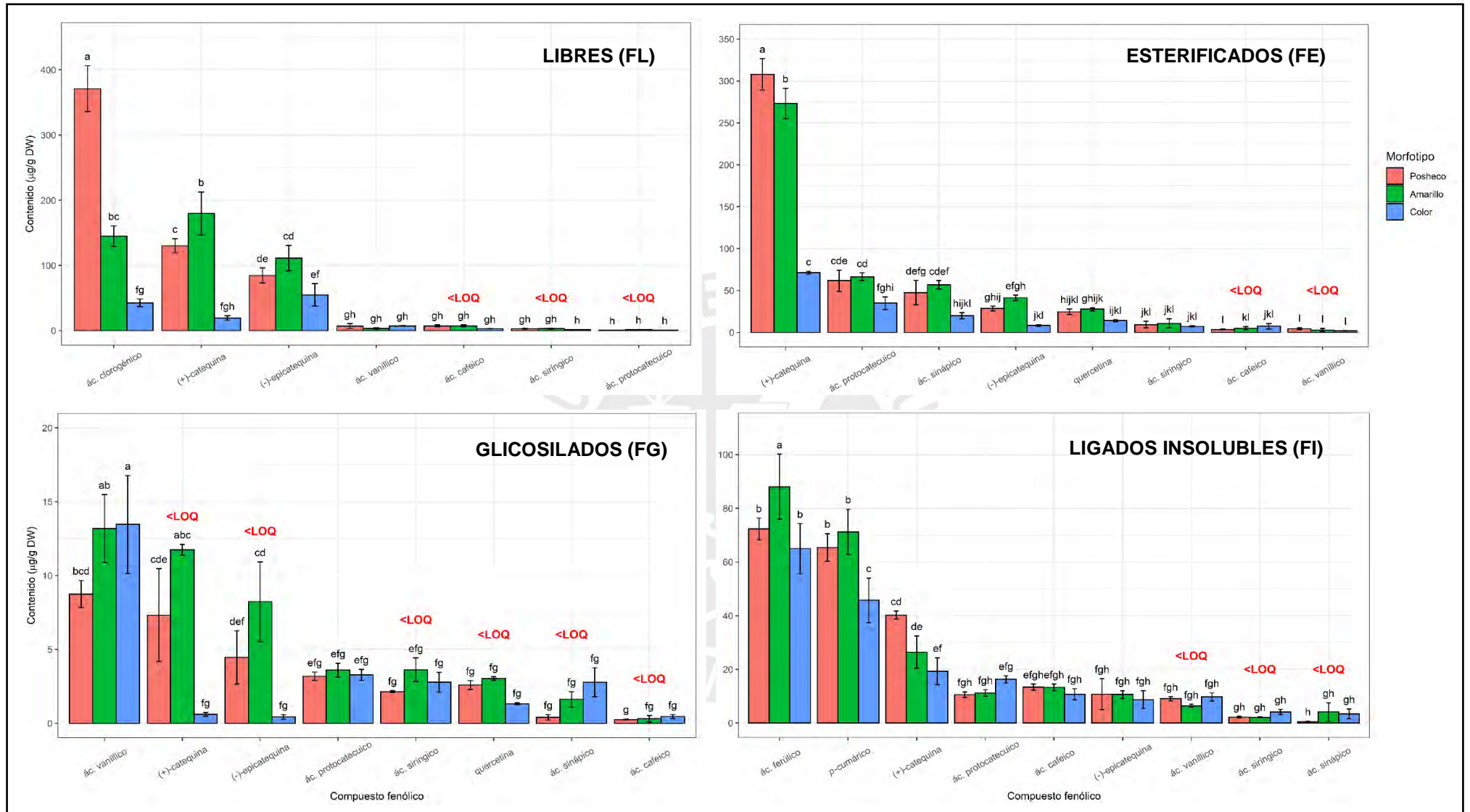


Figura A14. Separación por HPLC-DAD (RP) a 280 nm de las fracciones de las cáscaras de aguajes.



**Figura A15.** Concentración promedio (n=3) de fenólicos en las fracciones de las cáscaras de tres morfotipos de aguajes. Las barras de error reflejan la desviación estándar. Letras distintas implican diferencias significativas entre los valores mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## Tablas complementarias

**Tabla A1.** Parámetros para la separación preliminar de fenólicos por HPLC-DAD (RP).

Parámetro	Descripción
Columna	RP-18e LichroCart® (250 mm x 4 mm, 5 µm)
Temperatura	35°C
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	A: Agua con TFA 0.1% B: ACN con TFA 0.1%
Flujo de fase móvil	1 mL/min
Gradiente de elución	B: 5 a 20% en 30 min → 20% por 15 min → 20% a 30% por 10 min → 30% a 70% por 4 min → 70% por 5 min → 70% a 5% por 1 min → 5% por 10 min.  Tiempo de elución: 59 min Tiempo total (incluido lavado): 75 min
Longitudes de onda de detección	230, 254 y 280 nm (sin referencia)
Espectros UV-Visible	190 – 400 nm

**Tabla A2.** Estimación de los efectos de la temperatura y tiempo en la extracción de fenólicos.

Término	Estimación	Error estándar	Razón t	Valor p
Constante del modelo	779.775	3.402389	229.18	<.0001
Tiempo (30,60)	15.875	3.402389	4.67	0.0095
Temperatura (40,60)	51.775	3.402389	15.22	0.0001
Tiempo*Temperatura	-2.025	3.402389	-0.60	<b>0.5838</b>