

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ACEITE Y DEL EXTRACTO METANÓLICO
HIDROFÍLICO DE LAS SEMILLAS DE LÚCUMA (*Pouteria lucuma*)
PROCEDENTES DE CHILCA, CAÑETE**

Tesis para optar el título de Magíster en Química que presenta el Bachiller

Pedro Alonso Guerrero Castillo

Asesora: Dra. Robles Caycho, Juana Rosa María

San Miguel, Febrero 2018



“Pero tú, persevera hasta el fin y descansa, que al final de los tiempos te levantarás para recibir tu recompensa.” »

Daniel 12:13



Este trabajo está dedicado a
Dios, a mi familia, a mi novia
y a mi tío Hermógenes
Guerrero Alarcón

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es el resultado de la constancia y el esfuerzo propio y del apoyo de personas que de una u otra manera han hecho posible su culminación, por ello hago mención al agradecer:

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC) y a CIENCIA ACTIVA por la beca otorgada. Convenio 231-2015 FONDECYT.

A la Dra. Juana María Robles Caycho, quien me asesoró en la elaboración y redacción del presente trabajo.

A la M Sc. Otilia Acha de la Cruz, jefa del laboratorio Labicer ubicado en la Universidad de Ingeniería, al brindar acceso al equipo de cromatografía de gases con el que se pudieron realizar los análisis cualitativos y cuantitativos del aceite.

A la Bach. Sarita Salomé Reyes Cubas, por la realización de los análisis cualitativos y cuantitativos del aceite en el equipo de cromatografía basado en un método elaborado por ella.

Al Dr. Carlos Areche Medina, de la Universidad de Chile, por el cromatograma de UHPLC-ESI-MS/MS del extracto metanólico hidrofílico, así como su orientación en la interpretación de los resultados obtenidos.

A la Profa. Moraima Molina, por su orientación en la elaboración de FAMES del aceite y su apoyo moral durante la realización de los experimentos.

A la Sra. Parodi, dueña de la heladería OVNI, por brindarnos las semillas de lúcuma.

A mis maravillosos padres, por haber creído en mí y apoyado todos mis sueños e ideales y por enseñarme el valor de la perseverancia y el esfuerzo.

A mis amigos de maestría, en especial a Miki, Erika, Miguel, Luis y Rafael por los gratos momentos que hemos compartido, su apoyo y genuina amistad que me brindaron y espero que perdure.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la composición del aceite y del extracto metanólico hidrofílico de las semillas de lúcuma (*Pouteria lucuma*), las cuales son generadas como residuos agroindustriales. Estas provienen del distrito de Chilca (ubicado en la provincia de Cañete, a 62 km de Lima), cedidas por la heladería OVNI. La metodología consiste en la obtención del extracto metanólico hidrofílico y del aceite, el primero proviene de la maceración de la semilla con metanol y remoción de la parte lipofílica con hexano, mientras que el aceite es resultado de la separación con hexano a los extractos generados por maceración con metanol y acetona de forma secuencial y por extracción con equipo Soxhlet al residuo final con hexano. Así, metabolitos como ácidos grasos libres, ácidos grasos esterificados, triterpenos lineales, triterpenos esteroidales y no esteroidales, entre otros, son identificados en las tres fracciones que comprende el aceite mediante GC-MS y se registra $851,49 \pm 1,29$ mg de β -sitosterol y $75,42 \pm 1,02$ mg de estigmasterol por cada 100 g de aceite. Mientras que con el GC-FID y estándares de FAMES se reporta la presencia de los ácidos oleico, palmítico, esteárico y (9E)-octadecenoico, quienes conforman el 30 % del aceite. El contenido de fenoles totales es de $1130,63 \pm 11,89$ mg EAG/100 g de semilla seca y de flavonoides totales de $661,23 \pm 4,73$ mg quercetina/100 g de semilla seca en el extracto metanólico hidrofílico. Mediante UHPLC-ESI-MS/MS, se reporta que metabolitos como aminoácidos, ácidos orgánicos, ácido gálico, una amplia gama de flavonoides, entre otros, están contenidos en el mismo extracto y con empleo del reactivo DPPH se registra que este posee una concentración inhibitoria media (IC_{50}) a $41 \mu\text{g} / \text{mL}$. En base a los resultados se concluye que este residuo agroindustrial posee un valor agregado por explorar.

Palabras clave:

Lúcuma; semilla; metabolitos; fitoesteroles; flavonoides

ABSTRACT

The aim of this work is to determine the composition of the oil and hydrophilic methanolic extract of lucuma seeds (*Pouteria lucuma*), which are generated as agroindustrial waste. These come from the district of Chilca (located in the province of Cañete, 62 km from Lima), donated by the OVNI ice cream shop. The methodology consists in obtaining the hydrophilic methanolic extract and the oil, the first comes from the maceration of the seed with methanol and the removal of the lipophilic part with hexane, while the oil is the result of the separation with hexane at the extracts generated by maceration with methanol and acetone sequentially and by extraction with Soxhlet equipment to the final residue with hexane. Thus, metabolites such as free fatty acids, esterified fatty acids, linear triterpenes, steroidal and non-steroidal triterpenes, among others, are identified in the three fractions comprising the oil by GC-MS and 851.49 ± 1.29 mg of β -sitosterol and 75.42 ± 1.02 mg of stigmasterol per 100 g of oil. While with the GC-FID and FAME standards, the presence of oleic, palmitic, stearic and (9E) -octadecenoic acids is reported, which make up 30% of the oil. The content of total phenols is 1130.63 ± 11.89 mg EAG / 100 g of dry seed and total flavonoids of 661.23 ± 4.73 mg of quercetin / 100 g of dry seed in the hydrophilic methanolic extract. Through UHPLC-ESI-MS / MS, it is reported that metabolites such as amino acids, organic acids, gallic acid, a wide range of flavonoids, among others, are contained in the same extract and with the use of DPPH reagent it is recorded that it possesses a medium inhibitory concentration (IC50) at $41 \mu\text{g} / \text{ml}$. Based on the results, it is concluded that this agroindustrial waste has an added value to be explored.

Key words:

Lucuma; seeds; metabolites; phytoesters; flavonoids

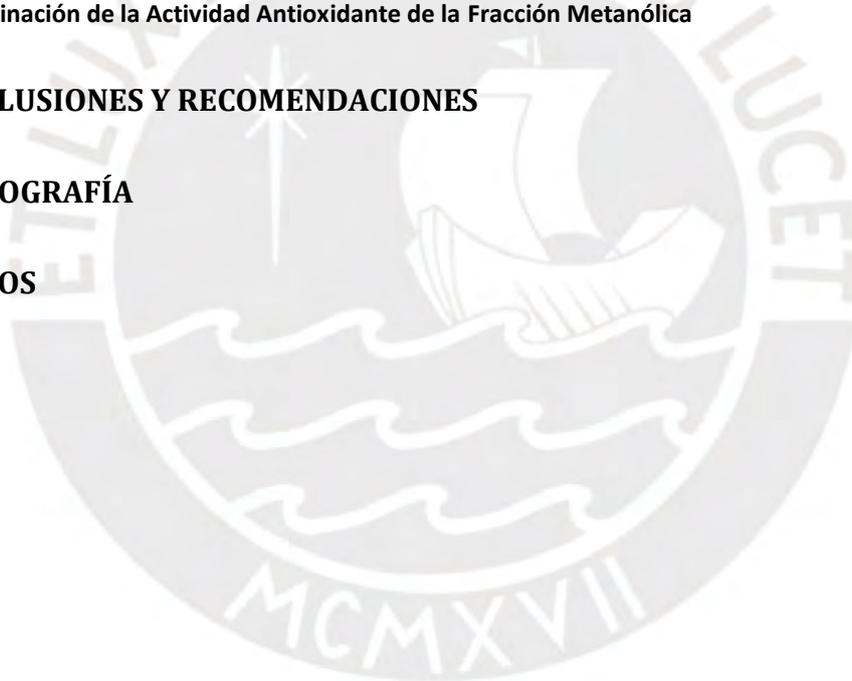
ABREVIATURAS

GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
UHPLC-DAD-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia con detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masa/masa con ionización por electroespray
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
AGS	Ácidos grasos saturados
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
SGP	Ácidos grasos poliinsaturados
EPA	Ácido eicopentanoico
DPA	Ácido docosapentanoico
DHA	Ácido docosahexanoico
ACP	Esteroil-acil
MVA	Ácido mevalónico
DXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
SMT1	Metiltransferasa 1
ACAT-2	AcetilCoA-colesterol-aciltransferasa-2
ERO o ROS	Especies reactivas oxidantes
EC	Epicatequina
EGC	Epigallocatequina-3-galato
ECG	Epicatequina-3-galato
EGCG	Epigallocatequina-3-O-galato
HHDP	Ácido hexahidroxifénico
FAMES	Metil ésteres de ácidos grasos
PEG2	Prostaglandina E2
COX-2	Ciclooxigenasa 2
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolisacáridos
EAG	Equivalente de ácido gálico
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
m/z	Relación masa/carga

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del Problema y Pregunta de Investigación	4
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Generalidades de la Lúcumá (<i>Pouteria lucuma</i>)	6
3.2.1. Características	6
3.2.2. Taxonomía	6
3.2 Lípidos	7
3.2.1. Lípidos Saponificables	7
3.2.2.1. Ácidos Grasos	7
3.2.2.2. Triacilglicéridos	12
3.2.2. Lípidos Insaponificables	14
3.2.2.1. Fitoesteroles y Fitoestanoles	14
3.2.2.2. Tocoferoles y Tocotrienoles	19
3.3 Antioxidantes	21
3.3.1. Especies con Actividad Antioxidante	21
3.3.1.1. Vitamina E	22
3.3.1.2. Flavonoides	22
3.3.1.3. Taninos	26
3.3.2. Contenido de Fenoles Totales	28
3.3.3. Contenido de Flavonoides Totales	28
3.3.4. Método espectrofotométrico del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) para la evaluación de la actividad antioxidante	28
3.4 Generalidades de la Cromatografía	29
3.4.1. Cromatografía de gases (GC)	29
4. HIPÓTESIS	31
5. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1 Reactivos y Equipos	32
5.2 Metodología	33
5.2.1. Recolección y Pretratamiento de la Muestra	33
5.2.2. Determinación del Porcentaje de Humedad de la Muestra	33
5.2.3. Extracción y Separación de Fases	33
5.2.4. Identificación de Metabolitos del Aceite por GC-MS	34
5.2.5. Cuantificación de Fitoesteroles por GC-MS	35
5.2.6. Preparación y Cuantificación de FAMES del Aceite por GC-FID	36
5.2.7. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto	37
5.2.8. Determinación del Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica	37
5.2.9. Determinación del Perfil Metabólico de la Fracción Metanólica por UHPLC-DAD-ESI-MS/MS	38
5.2.10. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica	39

6. RESULTADOS	40
6.1. Determinación del Porcentaje de Humedad de la Muestra	40
6.2. Determinación del Porcentaje de Rendimiento de Extracción	40
6.3. Identificación de los Metabolitos del Aceite de la Semilla de Lúcumá	42
6.4. Determinación Cuantitativa de Fitoesteroles Presentes en el Aceite	48
6.5. Determinación Cuantitativa de FAMES Presentes en el Aceite	49
6.6. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto	51
6.7. Determinación de la Cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica	51
6.8. Determinación del Perfil Metabolómico de la Fracción Metanólica	52
6.9. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica	58
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
7.1. Identificación de los Metabolitos del Aceite de la Semilla de Lúcumá	59
7.2. Determinación Cuantitativa de Fitoesteroles Presentes en el Aceite	65
7.3. Determinación Cuantitativa de FAMES Presentes en el Aceite	66
7.4. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto	67
7.5. Determinación de la Cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica	68
7.6. Determinación del Perfil Metabolómico de la Fracción Metanólica	68
7.7. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica	78
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
9. BIBLIOGRAFÍA	81
10. ANEXOS	91



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de cabezas de serie n-3 y n-4	9
Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas	11
Figura 3. Reacciones químicas de los ácidos grasos	11
Figura 4. Estructura de un triacilglicérido	13
Figura 5. Biosíntesis de triacilglicéridos en semillas oleaginosas	13
Figura 6. Reacciones químicas de los triacilglicéridos	14
Figura 7. Estructura básica de los fitoesteroles	15
Figura 8. Esteroles libres más comunes en plantas	16
Figura 9. Modificaciones del grupo 3 β -OH de los esteroles	16
Figura 10. Ruta biosintética de los fitoesteroles	18
Figura 11. Tipos de tocoferoles y tocotrienoles	20
Figura 12. Estructura base de los flavonoides	22
Figura 13. Biosíntesis de los flavonoides	24
Figura 14. Reacción de Shinoda	24
Figura 15. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases	29
Figura 16. Esquema del tratamiento de la muestra	34
Figura 17. Cromatograma de la mezcla estándar de fitoesteroles	48
Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico hidrofílico	58
Figura 19. Metabolitos presentes simultáneamente en las tres fracciones aisladas del aceite	60
Figura 20. Uridina 5-metil éster del ácido oxiacético y sus fragmentos ionizados	71
Figura 21. 5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavan-3-ol y sus fragmentos ionizados	72
Figura 22. Galoepicatequina-3-O-galato y sus fragmentos ionizados	73
Figura 23. Galoepicatequina-hexosa y sus fragmentos ionizados	74
Figura 24. 2,4-dihidroxifenil metil cetona y sus fragmentos ionizados	75
Figura 25. Etilgalato y sus fragmentos ionizados	76
Figura 26. 2-metoxipirogalol y sus fragmentos ionizados	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categoría taxonómica de la lúcuma	6
Tabla 2. Nombres y abreviaturas para denominar a los ácidos grasos	7
Tabla 3. Comparación entre los tres diferentes grupos de ácidos grasos	8
Tabla 4. Principales ácidos grasos presentes en la dieta	10
Tabla 5. Comparación entre tocoferoles y tocotrienoles	20
Tabla 6. Tipos de flavonoides	25
Tabla 7. Clasificación de taninos y ocurrencia en plantas	27
Tabla 8. Tipos de detectores en cromatografía de gases	30
Tabla 9. Condiciones de operación del equipo GC-MS	35
Tabla 10. Condiciones de operación del equipo GC-FID	37
Tabla 11. Porcentaje promedio de humedad de la semilla de lúcuma	40
Tabla 12. Porcentaje promedio del rendimiento de extracción de la fracción metanólica y del aceite total	41
Tabla 13. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 1	42
Tabla 14. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 2	44
Tabla 15. Metabolitos presentes en el extracto hexánico	46
Tabla 16. Concentración de fitoesteroles encontrados a partir de la curva de patrones	48
Tabla 17. Contenido total de fitoesteroles en el aceite de semilla de lúcuma	49
Tabla 18. Concentración de FAMES en muestras transesterificadas	50
Tabla 19. Contenido total de ácidos grasos en el aceite de semilla de lúcuma	50
Tabla 20. Metabolitos secundarios de la fracción metanólica del extracto	51
Tabla 21. Contenido de fenoles totales de la fracción metanólica del extracto	51
Tabla 22. Contenido de flavonoides totales de la fracción metanólica del extracto	52
Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcuma	53

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país rico en diversidad de productos agrícolas, los cuales son exportados al extranjero o comercializados en el mismo país, para consumo directo o en forma de materia prima procesada para elaboración de diferentes productos comestibles. Como ejemplo podemos mencionar a la lúcuma, la cual se exporta en forma de harina y cuyo margen de ventas se ha incrementado con los años, de tal manera que en el 2005, el Ministerio de Comercio Exterior le dio la denominación de “producto bandera” a esta fruta y desde entonces es muy reconocida a nivel mundial. Las exportaciones de la pulpa y harina de lúcuma se han incrementado mucho; en el 2014 el valor de estas exportaciones llegó a los 2,9 millones de dólares, incrementándose diez veces más que del año 2009 (Indecopi, 2015).

Sin embargo esa misma harina de lúcuma, que hasta hoy en día es muy valorada en el mercado de Estados Unidos y de la Unión Europea (Aguilar, 2015), presentaba poco estudio acerca de su composición.

En el año 2009 se comparó la cantidad de compuestos fenólicos (metabolitos que presentan una potente actividad antioxidante) presentes en la pulpa de seis frutas nativas del Perú, entre ellas la lúcuma (*Pouteria lucuma*) la cual se trabajó en forma de pulpa fresca y como harina. Los resultados de este estudio señalaron que, a pesar que el extracto de la pulpa fresca tuvo una mayor cantidad de compuestos fenólicos que el extracto de la harina, la actividad antioxidante de ambos es similar debido a los tipos de compuestos fenólicos presentes (Pinto et al., 2009).

En un estudio llevado a cabo en el 2011, a partir del extracto de harina de lúcuma peruana, se aislaron e identificaron tres flavonoides glicosidados, cuya estructura base es el dihidrokaempferol y ácido gálico. A la presencia de estos metabolitos se atribuye la actividad antioxidante del extracto de la harina de lúcuma (Dini, 2011).

Otro estudio acerca de la lúcuma (*Pouteria lucuma*) que se llevó a cabo en el 2016, tuvo el propósito de determinar algunos metabolitos primarios y secundarios presentes en esta fruta. Se emplearon dos variedades comerciales de lúcuma Seda y Beltrán, obtenidas del

valle de Huacho (Perú), se reportó la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa en cantidades similares en ambas, pero con diferencia significativa en el contenido de inositol. La mayor cantidad de carotenoides fueron encontrados en la variedad Beltrán, el γ -tocoferol estuvo presente únicamente en esta variedad a diferencia del α -tocoferol que fue encontrado en ambas. Las dos variedades presentaron compuestos fenólicos en cantidades similares, los flavanoles derivados de la catequina (García Ríos, 2016).

En el mismo año se realizó un trabajo similar para determinar los principales metabolitos primarios y secundarios presentes en la pulpa de la lúcuma; para ello emplearon el mesocarpo de tres biotipos diferentes de *Pouteria lucuma* (Montero, Rosalia y Leiva) procedentes de Chile, se encontró la presencia de azúcares como fructosa, glucosa, sucrosa e inositol, con marcada diferencia en cantidad entre las tres variedades, siendo el biotipo Montero el de mayor proporción. Por otra parte, como metabolitos secundarios se obtuvo que la variedad Rosalia presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos y por consiguiente, mayor propiedad antioxidante; además de los tres biotipos, Rosalia fue el único que evidenció propiedades antihiperlipémicas (Fuentealba et al., 2016).

Hasta este punto se ha visto el desarrollo de trabajos en la pulpa de la lúcuma con énfasis en la caracterización de los principales metabolitos primarios y secundarios, así como la actividad antioxidante inherente a la cantidad de fenoles totales, propia de cada especie de esta fruta.

Aunque los aportes de estas investigaciones son relevantes, la cantidad de estudios acerca de la lúcuma como pulpa son escasos y limitados, mas aún son solo tres los trabajos llevados a cabo con las semillas, las cuales son generadas como residuos agroindustriales en grandes cantidades, debido a la alta demanda en exportación de esta fruta en forma de harina o pulpa fresca.

Se llegó a determinar la presencia de azúcares como glucosa y xilosa, además de compuestos cianogénicos glicosidados como lucumina, lucuminamida y ácido lucumínico, a partir del extracto metanólico de la semilla de *Calocarpum sapota* (Takeda, Gonda, & Hatano, 1997).

Se desarrollaron patentes en las que se emplearon semillas de la familia Sapotaceae (géneros *Calocarpum*, *Crhysophyllum* y *Lucuma*) en las cuales se describieron cómo obtener glicósidos cianogénicos (WO2006009418 A1, 2006) y lípidos fijos totales (WO2006009417 A1, 2006) para la preparación de cosméticos y composiciones dermatológicas.

En el 2010 se llevó a cabo una investigación en la cual extrajeron el aceite de la semilla de lúcuma (*Pouteria lucuma*) mediante maceración con heptano. Los triacilglicéridos presentes en este aceite fueron caracterizados por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS), de esta forma determinaron que los ácidos linoleico y oleico eran mayoritarios. Adicionalmente se encontraron propiedades de migración celular, angiogénesis y de cicatrización de heridas, inherentes al aceite de la semilla de lúcuma (Rojo et al., 2010).

Estos trabajos brindan un notable aporte acerca de algunos metabolitos presentes, sin embargo en la fracción hidrofílica de las semillas pertenecientes a la familia Sapotaceae, no mencionan nada acerca de la presencia de compuestos con propiedad antioxidante. En base a que los extractos metanólicos de la pulpa de la lúcuma presentan dicha actividad potencial, es tentativa una investigación para descubrir si las semillas presentan componentes con actividad antioxidante. Asimismo, no establece si los fitoesteroles están presentes en el aceite de la semilla en cantidad relevante, ya que estos tienen la propiedad de ser hipocolestémicos (Muñoz Jáuregui, Alvarado-Ortíz Ureta, & Encina Zelada, 2011).

En el presente estudio se busca indagar sobre la presencia de fitoesteroles en el aceite de la semilla de lúcuma y la de compuestos con actividad antioxidante en el extracto metanólico de la misma; de encontrarse estos componentes, dotará de valor agregado a este residuo agroindustrial que actualmente aún se desecha y a la vez podrá ser materia de estudio para trabajos posteriores.

1.1. Formulación del Problema y Pregunta de Investigación

La lúcuma es una fruta muy comercializada, siendo el Perú el principal productor (Yahia & Gutierrez-Orozco, 2011), es así que según la Dirección Regional de Agricultura de Lima del MINAG, en los años 2010, 2011 y 2012 se ha reportado una producción anual de 12 489; 12 792 y 13 522 toneladas respectivamente, exportándose como fruta entera, pulpa, conserva y la popular harina de lúcuma, hacia países como EE.UU., Chile, Alemania, Reino Unido, entre otros.

Se debe tener en cuenta que no solo la pulpa de las frutas es importante por tener metabolitos aprovechables, sino que otras partes de la misma también lo son; en la uva por ejemplo, el compuesto llamado resveratrol es beneficioso contra las enfermedades del corazón, Alzheimer (Pasinetti, Wang, Ho, Zhao, & Dubner, 2015), cáncer e incluso puede promover la longevidad (Wang, Chen, & Yu, 2010), este compuesto está presente en la cáscara y semilla de esta fruta. De esta manera, se llevaron a cabo investigaciones no solo con la harina de la lúcuma, sino también estudios acerca de la semilla de *Lucuma mammosa* y de *Pouteria lucuma*, determinaron la presencia de metabolitos que poseen propiedades regenerativas a nivel dérmico, dotándola de esta manera de una aplicación a nivel industrial.

Sin embargo, no se ha llevado a cabo un perfil lipídico de la materia insaponificable de la semilla de *Pouteria lucuma*; tampoco se han encontrado estudios en semillas de esta fruta, en los cuales hayan determinado la presencia de componentes con propiedades antioxidantes.

En consecuencia, en base a nuestra biodiversidad asociada al hecho de que la composición química varía de una especie a otra y que los estudios que se realizaron a la semilla de *Pouteria lucuma* son limitados, surge nuestra interrogante ¿qué tipo de metabolitos están presentes en el aceite y en el extracto metanólico de la semilla de *Pouteria lucuma* para que estos residuos agroindustriales sean valorados?

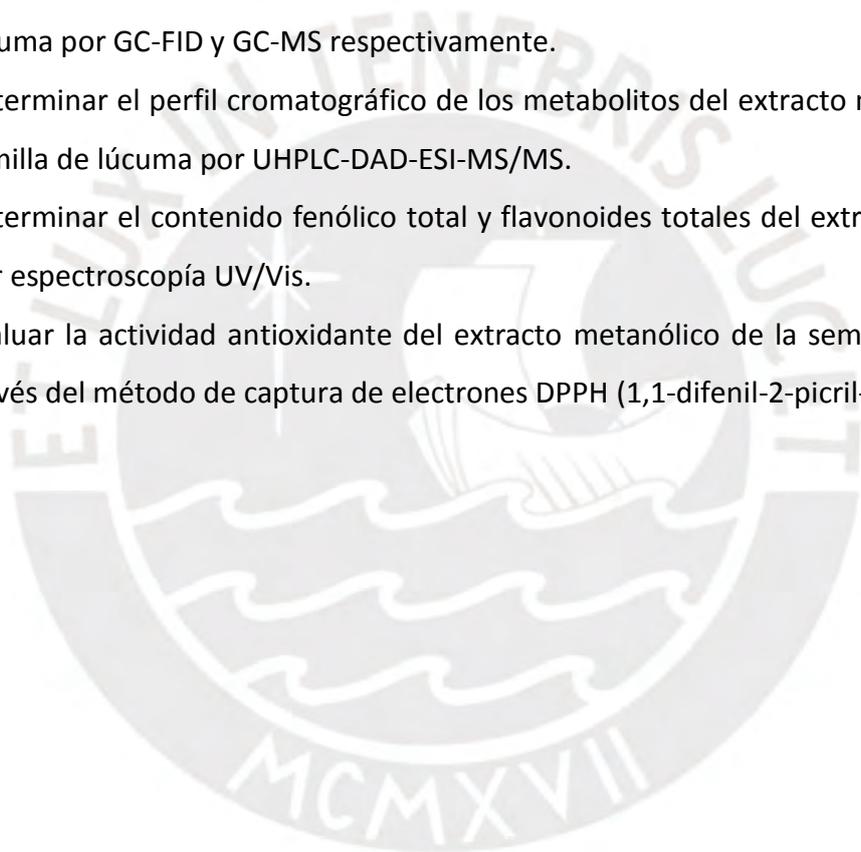
2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la composición química del aceite y de los metabolitos secundarios del extracto metanólico de la semilla de lúcumo (*Pouteria lucuma*), así como también medir la actividad antioxidante atribuible a los metabolitos de dicho extracto.

2.2 Objetivos Específicos

- Analizar el perfil de metabolitos presentes en el aceite de la semilla de lúcumo por GC-MS.
- Cuantificar los ácidos grasos y fitoesteroles presentes en el aceite de la semilla de lúcumo por GC-FID y GC-MS respectivamente.
- Determinar el perfil cromatográfico de los metabolitos del extracto metanólico de la semilla de lúcumo por UHPLC-DAD-ESI-MS/MS.
- Determinar el contenido fenólico total y flavonoides totales del extracto metanólico por espectroscopía UV/Vis.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de la semilla de lúcumo a través del método de captura de electrones DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de la Lúcuma (*Pouteria lucuma*)

3.2.1. Características

La lúcuma, nativa de las tierras altas de Perú, Ecuador y Chile, es una fruta climatérica, cuya madurez se ve evidenciada por el cambio de coloración en su cáscara que pasa de un color verde a una tonalidad amarilla (Yahia & Gutierrez-Orozco, 2011). En el Perú, los valles de Cañete, Huaral, Huacho y Chincha son los que actualmente están produciendo lúcuma de la mejor calidad, con la finalidad de exportación (Indecopi, 2015), en forma de pulpa seca y como harina deshidratada.

El árbol de la lúcuma alcanza entre 8 a 15 m, es de hojas perennes y debido a su muy alta sensibilidad a temperaturas muy frías ha sido imposible introducirlo a países como Estados Unidos y Canadá. Por otro lado, el fruto presenta una silueta ovoide con un apéndice puntiagudo, un tamaño alrededor de 7,5-10 cm; pulpa de textura algo seca, coloración naranja amarillenta y frecuentemente con dos semillas, aunque puede llegar hasta cinco. Las variedades más comunes son “Seda” y “Palo” (Yahia & Gutierrez-Orozco, 2011)

Los métodos de propagación de la lúcuma incluyen injertos de vástagos en los porta-huertos de plántulas y por propagación de esquejes frondosos bajo niebla o en invernaderos, sin embargo, la primera genera alta variabilidad en la producción (Duarte, 1990)

3.2.2. Taxonomía

La **Tabla 1** nos brinda información acerca de la taxonomía de la lúcuma.

Tabla 1. Categoría taxonómica de la lúcuma

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Sapotaceae
Género	Pouteria
Especie	<i>Pouteria lucuma</i>

Fuente: Arena (2012)

3.2 Lípidos

3.2.1. Lípidos Saponificables

3.2.2.1. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas, poseen longitudes que oscilan entre cuatro y veintidos carbonos y presentan un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo metilo (-CH₃), ubicados en extremos opuestos de la cadena. En la **Tabla 2** se muestra las abreviaturas que se emplean para referirse a los ácidos grasos.

Tabla 2. Nombres y abreviaturas para denominar a los ácidos grasos

Nombre	Común	<ul style="list-style-type: none">- Se les ha designado con nombres triviales a aquellos ácidos grasos que son los más abundantes en una determinada fuente de materia.- Ejemplo: ácido linoleico.
	Sistemático	<ul style="list-style-type: none">- Brinda información sobre la cantidad de átomos de carbono y de dobles enlaces presentes en la molécula. Ejemplo: ácido octadienoico.
Abreviatura	Nomeclatura Δx	<ul style="list-style-type: none">- Informa sobre el número de átomos de carbono y dobles enlaces en la molécula y la posición de estos.- La numeración se empieza por el carbono del grupo carboxilo y la posición de los dobles enlaces se indica por la letra griega Δ.- Ejemplo: el ácido linoleico sería 18:2 Δ 9,12.
	Nomeclatura n-x / ωx	<ul style="list-style-type: none">- Informa sobre el número de átomos de carbono y dobles enlaces en la molécula y la posición de estos dobles enlaces.- Cada carbono del ácido graso se empieza a enumerar por el metilo más alejado y la posición de los dobles enlaces se indica con la letra griega ω o por la letra n.- Si en caso existen dos o más dobles enlaces, separados por un grupo metileno, solo se especifica la posición del doble enlace del carbono más cercano al metilo más externo.- Ejemplo: el ácido linoleico sería 18:2, n-6 o también 18:2, ω6.

Fuente: Adaptado de Palou et al (2008).

Los ácidos grasos se clasifican según la cantidad de dobles enlaces o insaturaciones, así tenemos ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP). La **Tabla 3** compara las características de estos tres grupos.

Tabla 3. Comparación entre los tres diferentes grupos de ácidos grasos

Ácidos Grasos Saturados (AGM)	Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGM)	Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGM)
<ul style="list-style-type: none"> - Son aquellos que no presentan dobles enlaces; estos abundan en las grasas animales. - Se pueden llegar a sintetizar a partir de unidades de dos carbonos (acetil-CoA), que provienen del consumo excesivo de carbohidratos, reacción que tiene lugar en el hígado. - Algunos ácidos grasos saturados comunes son: butírico, mirísitico, palmítico, láurico, entre otros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Son aquellos que presentan solamente un doble enlace y que generalmente presentan configuración cis. - Pueden ser sintetizados. - Los AGM, al igual que otros ácidos grasos, son absorbidos en el intestino casi en su totalidad para luego ser transformados a otros ácidos grasos o ser incorporados a lípidos tisulares. - El más importante, presente en nuestra dieta, es el ácido oleico, abundante en el aceite de oliva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Son aquellos que presentan entre dos a seis dobles enlaces, separados por un grupo metileno. - Los ácidos poliinsaturados más frecuentes están contenidos en las series n-6 y n-3.

Fuente: Adaptado de Palou et al (2008).

Las series $\omega 6$ (o n-6) y $\omega 3$ (o n-3) presentan como cabezas de serie al ácido linoleico y el ácido α -linolénico respectivamente, cuyas estructuras se muestran en la **Figura 1**. Tanto el ácido linoleico como el α -linolénico son esenciales ya que nuestro organismo no puede sintetizarlos, por otro lado, ambos se metabolizan mediante enzimas, elongasas y desaturasas, produciéndose un alargamiento e introducción de dobles enlaces adicionales.

De esta manera, el ácido araquidónico es obtenido a partir del ácido linoleico, mientras que los ácidos eicosapentanoico (EPA), docosapentanoico (DPA) y docosahexanoico (DHA), a partir del ácido α -linolénico (Palou, 2008). La **Tabla 4** muestra los principales ácidos grasos presentes en nuestra dieta.

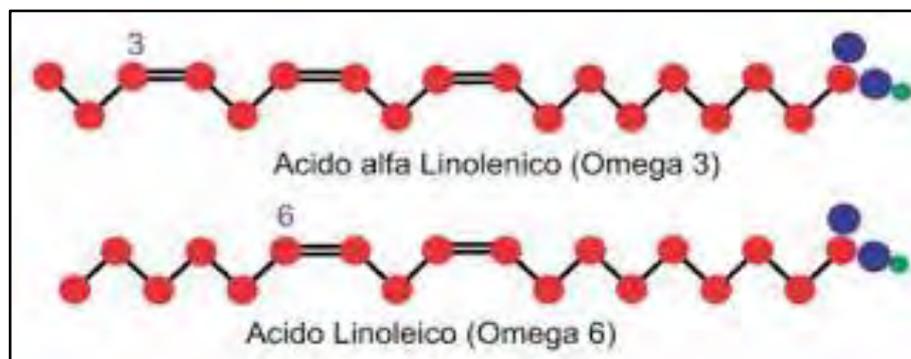


Figura 1. Estructura química de cabezas de serie n-3 y n-4

Fuente: <https://ndnatural.net/2014/09/14/omega-369/>

La biosíntesis novo de los ácidos grasos en las plantas se produce en los plastidios y requiere como precursores directos el acetil- y malonil-CoA para el proceso de cebado y elongación de las cadenas nacientes. En semillas oleaginosas la proteína desaturasa, transportadora de esteroil-acil (ACP), cataliza la desaturación de ácidos grasos, luego la hidrólisis de las cadenas acilo de ACP son catalizadas por las enzimas acil-ACP tioesterasas y se produce la terminación de la elongación de la cadena del ácido graso plastidial. Posteriormente, los ácidos grasos libres son activados a los ésteres de CoA, exportados desde el plastidio y reesterificados a CoA en el retículo endoplasmático (Thelen & Ohlrogge, 2002), este proceso se ilustra en la **Figura 2**.

Los ácidos grasos participan en diferentes reacciones, por ejemplo, pueden sufrir una reacción de saponificación en la que interactúan con el NaOH o KOH y se produce una sal del ácido graso, comúnmente denominado jabón; la esterificación de Fisher, en medio ligeramente ácido, produce el éster; la hidrogenación de ácidos grasos insaturados con hidrógeno gaseoso y un catalizador metálico (Ni o Pt) genera ácidos grasos total o parcialmente saturados. Las reacciones mencionadas se ilustran en la **Figura 3**.

Tabla 4. Principales ácidos grasos presentes en la dieta

Nombre Sistemático	Nombre Común	Abreviatura
Ácidos Grasos Saturados		
Ácido butánico	Ácido butírico	4:0
Ácido hexanoico	Ácido caproico	6:0
Ácido octanoico	Ácido caprílico	8:0
Ácido decanoico	Ácido cáprico	10:0
Ácido dodecanoico	Ácido láurico	12:0
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	14:0
Ácido pentadecanoico	Ácido pentadecílico	15:0
Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	16:0
Ácido heptadecanoico	Ácido margárico	17:0
Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	18:0
Ácidos Grasos Monoinsaturados <i>cis</i>		
Ácido hexadecenoico	Ácido palmitoleico	16:1 Δ 9c
Ácido octadecenoico	Ácido oleico	18:1 Δ 9c (n-9; ω 9)
Ácido eicosenoico	Ácido gadoleico	20:1 Δ 9c
Ácidos Grasos Monoinsaturados <i>trans</i>		
Ácido octadecenoico	Ácido elaídico	18:1 Δ 9t (n-9; ω 9)
Ácidos Grasos Polinsaturados n-3		
Ácido octadecatienoico	Ácido α -linolénico	18:3 Δ 9c,12c,15c (n-3; ω 3)
Ácido eicosapentanoico	EPA	20:5 Δ 5c,8c,11c,14c,17c (n-3; ω 3)
Ácido docosapentanoico	DPA	22:5 Δ 7c,10c,13c,16c,19c (n-3; ω 3)
Ácido docosahexanoico	DHA	22:6 Δ 4c,7c,10c,13c,16c,19c (n-3; ω 3)
Ácidos Grasos Polinsaturados n-6		
Ácido octadecadienoico	Ácido linoleico	18:2 Δ 9c,12c (n-6; ω 6)
Ácido octadecatienoico	Ácido gammalinolénico	18:2 Δ 6c,9c,12c (n-6; ω 6)
Ácido eicosatetraenoico	Ácido araquidónico	20:4 Δ 5c,8c,11c,14c (n-6; ω 6)
Ácidos Linoleico Conjugado		
Ácido octadecadienoico	Ácido ruménico	18:2 Δ 9c,11t
Ácido octadecadienoico	---	18:2 Δ 10t,12c

Fuente: Palou et al (2008).

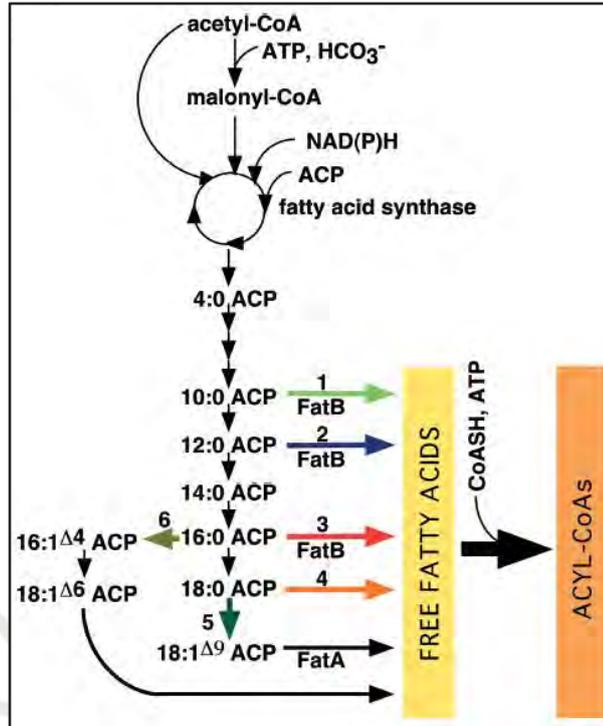


Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas

Fuente: Thelen & Ohlrogge, (2002)

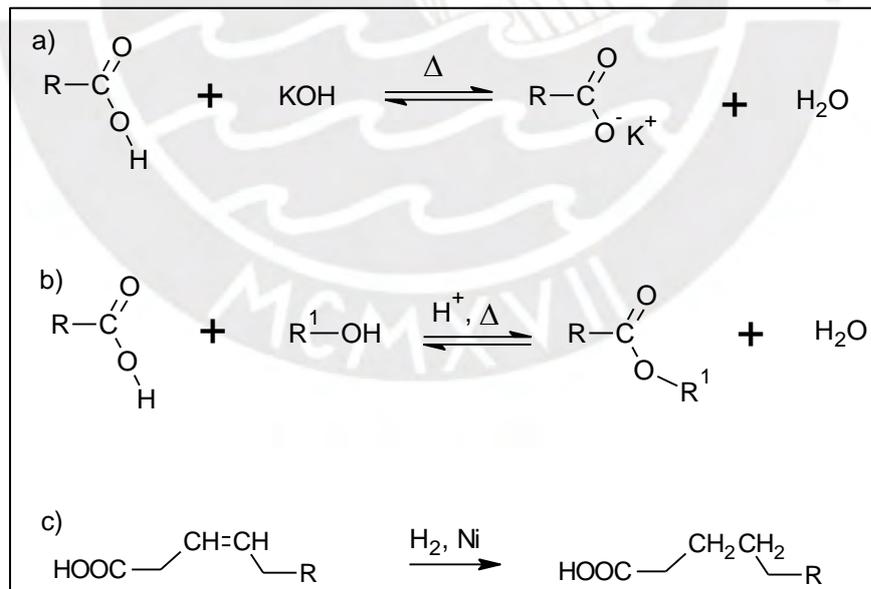


Figura 3. Reacciones químicas de los ácidos grasos

(a) Reacción de saponificación, (b) reacción de esterificación de Fisher y (c) reacción de hidrogenación.

R, R¹: cadenas carbonadas largas, saturadas o insaturadas.

Los ácidos grasos se encuentran en alimentos tanto de origen vegetal como animal, que forman parte de nuestra dieta alimenticia; por ejemplo encontramos ácidos grasos saturados en, la mantequilla el ácido butírico (4:0); en la leche materna y el aceite de coco, el ácido láurico (12:0); en el aceite de palma, los ácidos láurico (12:0) y palmítico (16:0); en la carne los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Uno de los ácidos grasos monoinsaturados muy importante y que no debe faltar en nuestra dieta, es el ácido oleico (18:0) que es abundante en el aceite de oliva. De los ácidos poliinsaturados, el ácido linoleico (18:2) se encuentra en muy alta proporción en aceites como el de girasol y el de cártamo; además, en la yema del huevo y en frutos secos; el ácido α -linolénico (18:3) se encuentra abundantemente en aceite de semillas, verduras de hojas verde y en pescados (Palou, 2008).

Los ácidos grasos tienen una importancia trascendental ya que no solo son reservas de energía a largo plazo o componentes de membranas celulares o que tienen función reguladora, ya que controlan la actividad de algunas enzimas al unirse covalentemente a ellas; además los ácidos grasos poliinsaturados n-3 inhiben la promoción y progresión de la carcinogénesis mediante diferentes mecanismos bioquímicos (Larsson, Kumlin, Ingelman-Sundberg, & Wolk, 2004). El ácido docosahexanoico (DHA) es muy importante en el cerebro, ya que además de aumentar la proliferación de neuritas, también promueve la sinaptogénesis y la expresión sináptica de la sinapsina (Cao et al., 2009).

Podrían ser buenos para prevenir enfermedades cardiovasculares, mediante un aumento relativo del colesterol “bueno” (asociado a las lipoproteínas HDL) y por los efectos sobre los vasos sanguíneos (Massaro & De Caterina, 2002). No obstante, no es bueno abusar de una dieta demasiado rica en ácidos grasos, ya que un exceso de los saturados está relacionado a tener riesgos de enfermedades cardiovasculares por aumentar el colesterol “malo”.

3.2.2.2. Triacilglicéridos

Son moléculas esterificadas de glicerol donde los ácidos grasos pueden ser iguales o diferentes como se muestra en la **Figura 4**. Si los triacilglicéridos (TAG) presentan cadenas de ácidos grasos saturados, estos fundirán a mayor temperatura (caso de las grasas animales); de otro modo si poseen cadenas con insaturaciones, fundirán a menor temperatura (caso de

aceites vegetales). En los TAG que poseen una estructura asimétrica, en donde los tres ácidos grasos no son equivalentes, solo las posiciones extremas son atacadas por las lipasas intestinales (Palou, 2008).

En la síntesis de triacilglicéridos en las semillas oleaginosas, el flujo de las cadenas de ácidos grasos acilados en el retículo endoplasmático, conduce finalmente a la esterificación en las tres posiciones de la molécula de glicerol para generar el TAG (Thelen & Ohlrogge, 2002), como se esquematiza en la **Figura 5**.

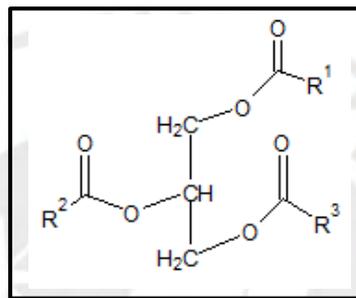


Figura 4. Estructura de un triacilglicérido

R¹, R², R³: cadenas carbonadas largas, saturadas o insaturadas.

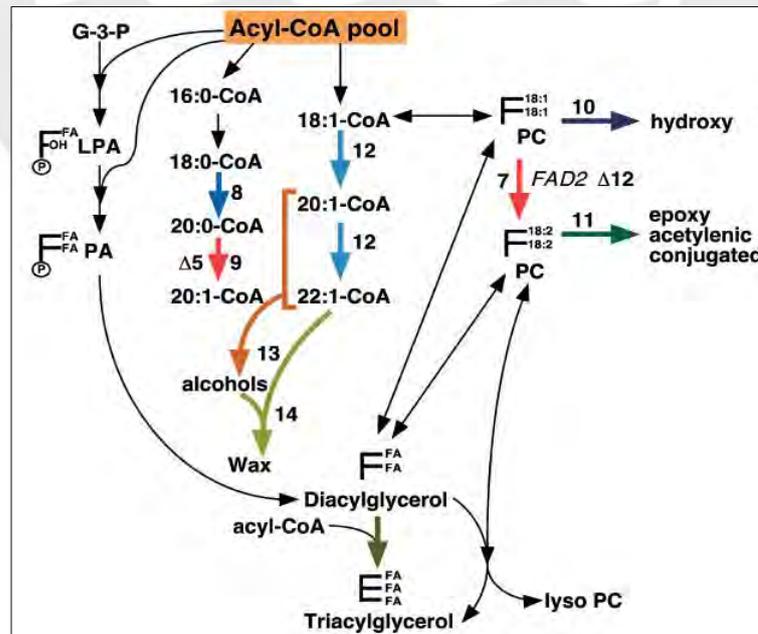


Figura 5. Biosíntesis de triacilglicéridos en semillas oleaginosas

Fuente: Thelen & Ohlrogge (2002)

Los triacilglicéridos sufren reacciones de saponificación y transesterificación como los ácidos grasos, así la saponificación con una solución de KOH concentrada en calor, produce jabón y glicerol y la transesterificación genera glicerol y metilésteres de ácidos grasos, conocidos también como FAMES por sus siglas en inglés, estas reacciones se ilustran en la **Figura 6**.

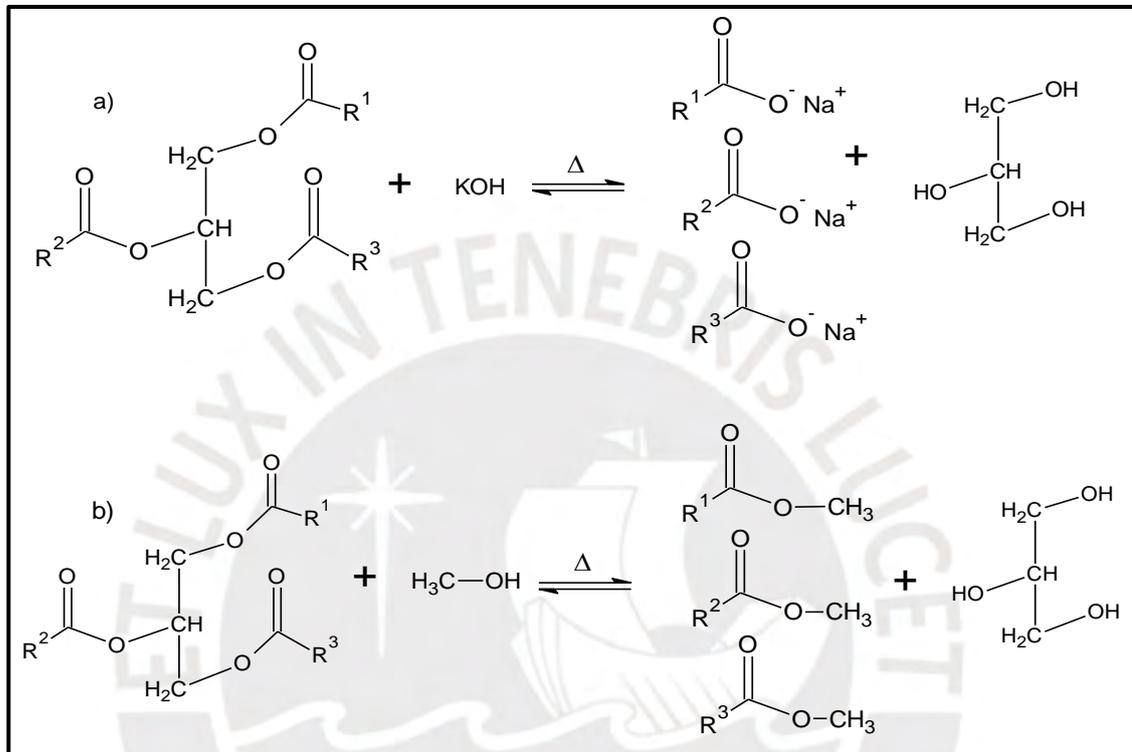


Figura 6. Reacciones químicas de los triacilglicéridos

(a) Reacción de saponificación, (b) reacción de transesterificación.
R¹, R², R³: cadenas carbonadas largas, saturadas o insaturadas.

3.2.2. Lípidos Insaponificables

3.2.2.1. Fitoesteroles y Fitoestanoles

Los esteroides vegetales (conocidos como fitoesteroides) pertenecen a la familia de los triterpenos, estructuralmente son similares al colesterol ya que presentan como parte de su molécula al ciclopentanoperhidrofenantreno, pero además incluyen un grupo etilo o metilo en el C-24, cuya estructura básica se muestra en la **Figura 7**. Los fitoesteroides tienen la propiedad de ser insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos apolares como hexano, heptano, éter de petróleo.

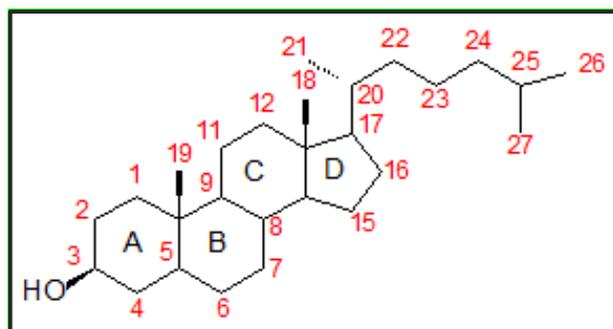


Figura 7. Estructura básica de los fitoesteroles

Fuente: www.lipidhome.co.uk

Se sabe que las plantas no presentan colesterol, en su lugar están presentes los esteroides vegetales, los cuales actúan como componentes estructurales de la membrana vegetal y como intermediarios para la biosíntesis de celulosa y metabolitos secundarios como los alcaloides. Se subdividen en esteroides y estanoles, los primeros presentan un doble enlace en posición 5, mientras que los estanoles no lo presentan. Adicionalmente, estos últimos son menos abundantes que los esteroides, por ello cuando nos referimos a esteroides y estanoles vegetales, la palabra “esterol” incluye a ambos (Palou Oliver, 2005).

De forma natural, los esteroides vegetales se pueden encontrar de dos formas, libre o esterificada. La forma libre está distribuida en menor proporción en las plantas, siendo la más abundante el β -sitosterol, seguido por el campesterol y el estigmasterol (Palou Oliver, 2005; Lagarda, García-Llatas, & Farré, 2006).

Los esteroides esterificados (compuestos “conjugados”) con ácidos grasos, ferulato o ácido ferúlico, mediante un enlace con el grupo 3β -OH del esteroide, son altamente liposolubles. Los primeros están presentes en la mayoría de las plantas y además constituyen el 50 % del total de esteroides en algunos alimentos, seguidos por los ésteres de ferulato en cantidades aún apreciables y finalmente los esteroides glicosidados en menor grado (Palou Oliver, 2005). La **Figura 8** muestra los tipos de esteroides libres más comunes y la **Figura 9** ilustra las modificaciones del grupo 3β -OH de los esteroides vegetales libres para producir los diferentes tipos de esteroides esterificados.

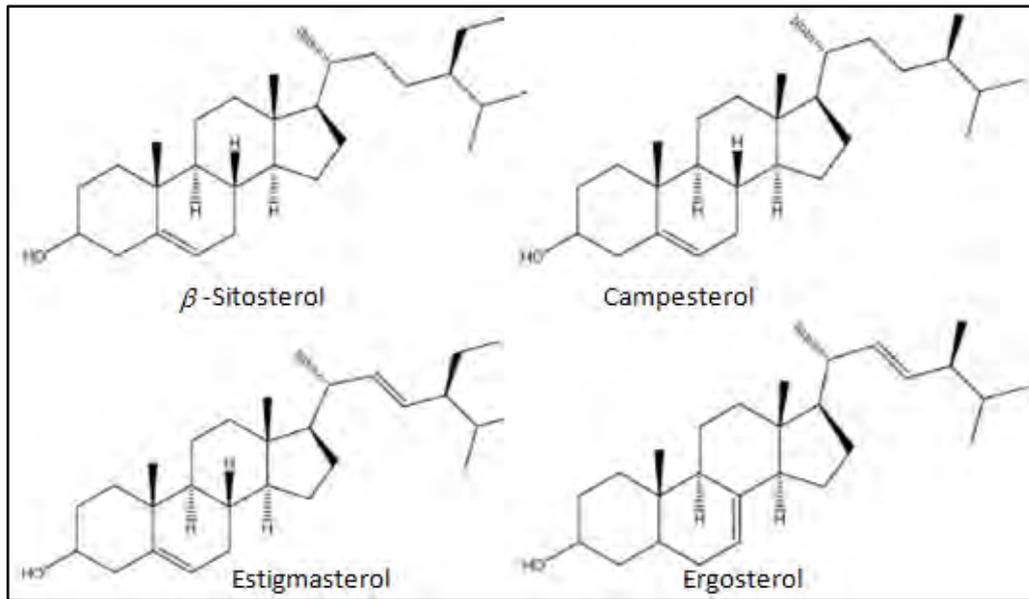


Figura 8. Esteroles libres más comunes en plantas

Fuente: Lagarda et al (2006)

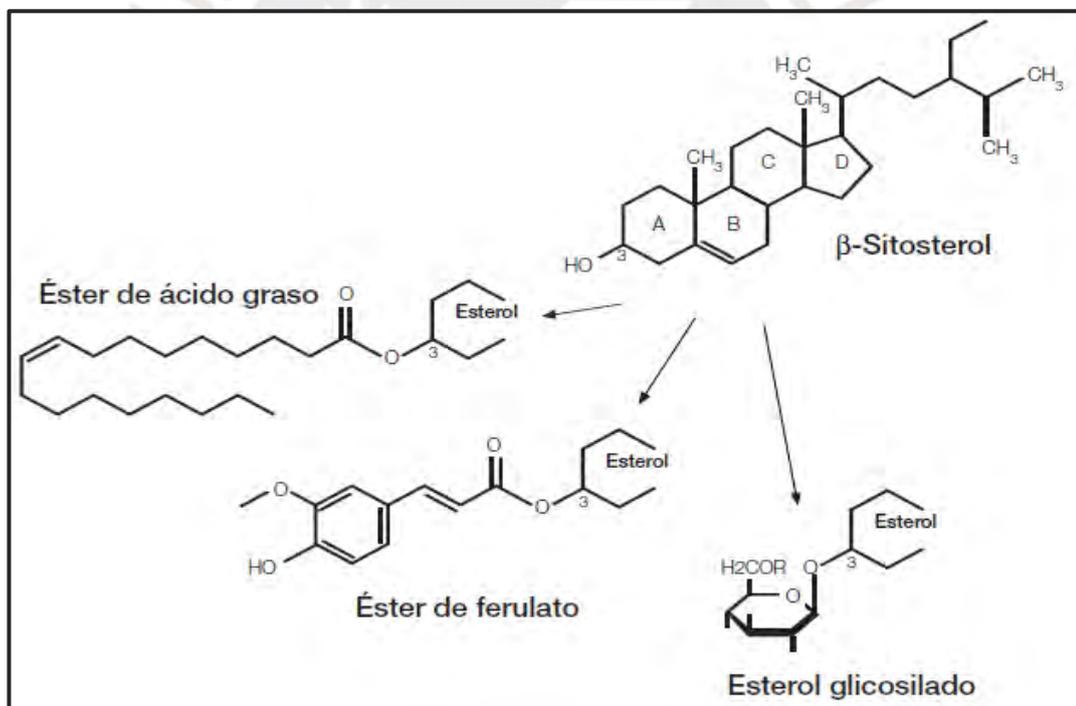


Figura 9. Modificaciones del grupo 3β-OH de los esteroles

Fuente: Palou Oliver (2005)

En las plantas, la ruta hacia los isoprenoides (cinco unidades de carbono similares al isopreno) y los fitoesteroles, son sintetizados a partir de la fijación del CO₂ y la formación de azúcar. Este último puede seguir dos rutas para formar el Δ³-isopentildifosfato (IPP) según se

produzca en el citosol o en el plastidio. Para la primera ruta de síntesis, el azúcar se convierte en acetato y este a la vez se transforma en ácido mevalónico (MVA), con la participación de la enzima HMGCoA-reductasa (HMGR); luego el MVA se fosforila y el carbono del carboxilo se pierde en forma de CO₂ para producir IPP. Sin embargo, cuando la ruta de síntesis de IPP es en el plastidio, sigue una vía independiente del mevalonato, en donde no es necesario que el acetato sea un intermediario. Esta vía independiente es la del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), donde participa la DXP sintasa. Posteriormente, en cualquiera de las dos vías, seis de las unidades isoprenoides se unen para producir escualeno («Pathways of Phytosterol Biosynthesis», 2012).

La vía isopentenoide hacia el óxido de escualeno se bifurca para dar paso a la ruta del esterol; en los hongos la ruta esterólica empieza con la formación de lanosterol mientras que en las plantas el cicloartenol es producido a partir del óxido de escualeno mediante la enzima 2,3 (S)-oxidoescualeno-cicloartenol ciclasa (cicloartenol sintasa), posteriormente es convertido a 24-metilenocicloartenol por la enzima metiltransferasa 1 (SMT 1), como primer paso para introducir el grupo metilo en el C-24; luego la enzima ciclopropilesterol isomerasa abre el anillo ciclopropano. Continúan más pasos lineales hasta la síntesis de 24-metilenlofenol, de allí se produce una bifurcación para dar lugar a dos vías alternativas, una conduce a la síntesis de sitoesterol y estigmasterol mientras que la otra, la síntesis de campesterol. En efecto, existen más de treinta pasos catalizados por enzimas en la biosíntesis de esteroides en plantas (Christie, 2017). La **Figura 10** muestra la vía sintética de los fitoesteroides a partir del óxido del escualeno.

Los fitoesteroides libres, al igual que el colesterol, presentan el grupo esteroide en su estructura, en ella el hidroxilo (OH-) se encuentra a dos carbonos de una insaturación, como resultado, se puede emplear la reacción de Liebermann-Burchard para su identificación mediante el empleo de anhídrido acético, cloroformo y gotas de ácido sulfúrico concentrado para generar una coloración rojiza que pasa a una tonalidad azulina hasta llegar a una coloración verdosa intensa. Otra reacción que permite identificar el grupo esteroide es la reacción de Salkowsky, en la cual al agregar cloroformo y ácido sulfúrico y dejar separar en

fases, se observa un color rojo en la parte superior y en la inferior una coloración rojo-amarillenta con fluorescencia verde.

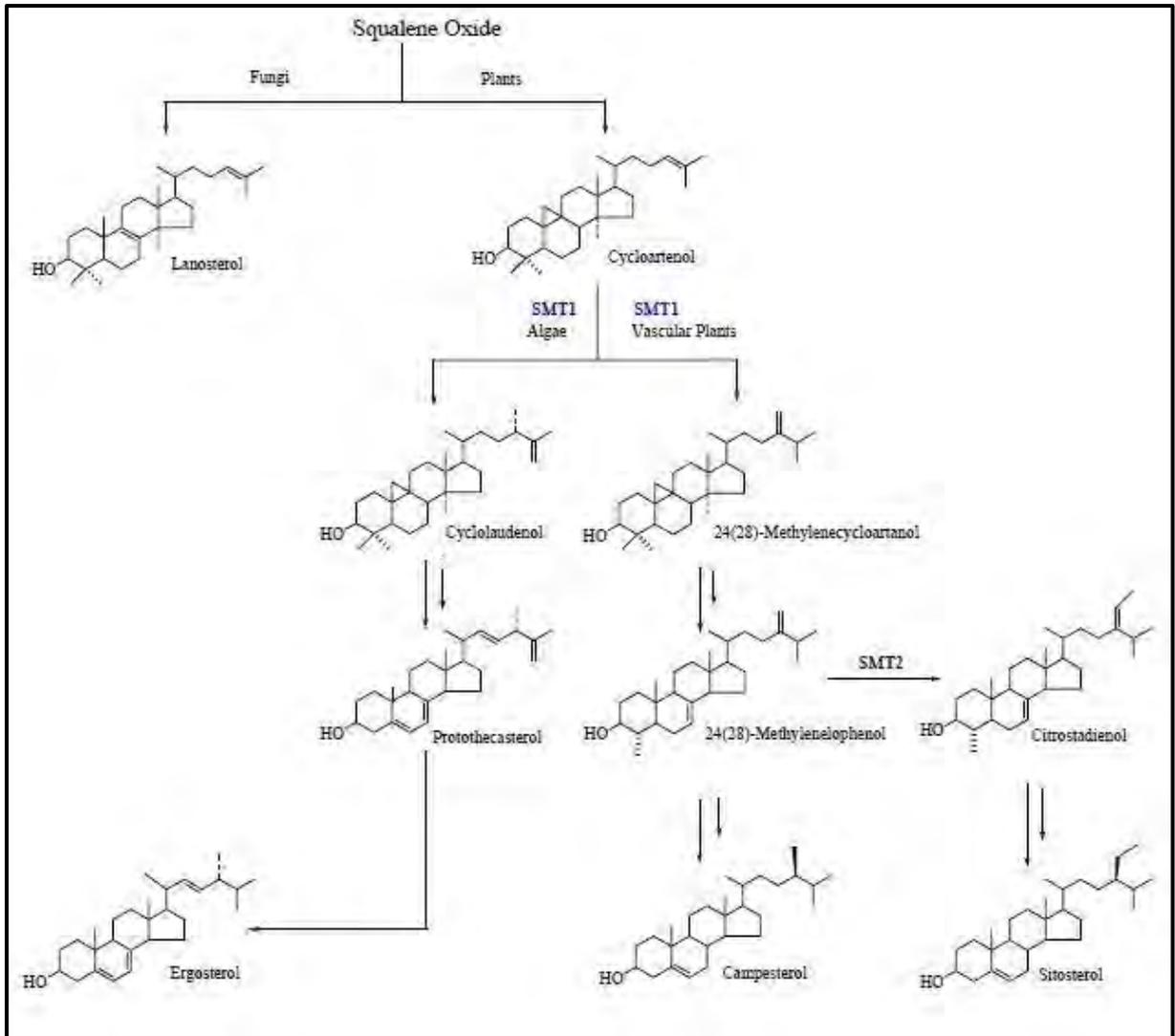


Figura 10. Ruta biosintética de los fitoesteroides

Fuente: Zhou et al (2004)

El ser humano no puede sintetizar esteroides vegetales, por ello es crucial que estas moléculas las obtenga de su dieta (Palou Oliver, 2005). Existen diversos alimentos que son fuentes de fitoesteroides, la mayor presencia de estos compuestos está en los aceites vegetales y en sus productos. Las semillas también son muy ricas en fitoesteroides, aunque estas no son frecuentemente consumidas o lo son en muy pequeñas cantidades, pueden contribuir significativamente al consumo total de esteroides vegetales. A pesar de que los

cereales, vegetales, frutas y vallas no son tan ricos en fitoesteroles, pueden ser una buena fuente de estos compuestos ya que presentan un alto consumo (Ogbe et al., 2015).

Los esteroides vegetales son muy importantes ya que desarrollan un rol vital para prevenir y contrarrestar el cáncer de colon (Sadek et al., 2017), seno (Llaverias et al., 2013) y próstata (Awad et al., 2001), los mecanismos de acción anticancerígena de estos dos últimos los resume Ramprasath & Awad (2015).

Es conocido que los fitoesteroides tienen capacidad hipocolestémica (Romero & Vásquez, 2012; Racette, Lin, Ma, & Ostlund, Jr, 2015) y poseen tres mecanismos de acción. El primero de estos es cuando el colesterol es desplazado de la micela mixta por lo que no podrá ser absorbido y será eliminado con las heces; el segundo mecanismo involucra que los fitoesteroides inhibirán la acción de la enzima acetilCoA-colesterol-aciltransferasa-2 (ACAT-2) y de esta manera impedirán la esterificación del colesterol y su incorporación a los quilomicrones; el tercer y último mecanismo implica que el colesterol no esterificado es nuevamente excretado al lumen intestinal a través de un transportador tipo ABC (Muñoz Jáuregui et al., 2011; Meco López, Pascual Fuster, & Solà Alberich, 2016). Aunque la obtención de esteroides vegetales de nuestra dieta alimenticia es trascendental, se ha visto que disminuye la cantidad de carotenos del organismo, sin embargo esto se puede recuperar mediante la ingesta de alimentos con alto contenido de carotenos (Noakes et al., 2002).

3.2.2.2. Tocoferoles y Tocotrienoles

La vitamina E incluye a los tocoferoles y tocotrienoles, compuestos que se caracterizan por tener el anillo 6-cromanol con una cadena lateral de 16 carbonos, son liposolubles y también en etanol, cloroformo y acetona. Aunque los tococromanoles son generalmente estables al álcali, a los ácidos y al calor en ausencia de oxígeno, pueden ser oxidados por el oxígeno atmosférico en presencia de luz, calor o iones de metales (Casani, 2000).

A pesar que los tocoferoles y los tocotrienoles están muy relacionados, poseen ciertas diferencias, como se muestran en la **Tabla 5**, por lo que les atribuyen distintos grados de actividad en el organismo.

Tabla 5. Comparación entre tocoferoles y tocotrienoles

Tocoferoles	Tocotrienoles
- Cadena lateral saturada.	- Cadena lateral con 3 insaturaciones (grupo farnesilo).
- Poseen 3 carbonos asimétricos que generarían 8 isómeros ópticos, sin embargo en la naturaleza solo se presenta la configuración absoluta RRR (2R, 4'R, 8'R).	- Poseen un carbono asimétrico en la posición 2.
- Los sustituyentes del anillo les da la designación del compuesto.	- En la naturaleza están presentes exclusivamente con una configuración 2R, 3'E, 7'E.
	- Los sustituyentes del anillo les da la designación del compuesto.

Fuente: Adaptado de Casani (2000).

Tanto los tocotrienoles como los tocoferoles presentan 4 moléculas diferentes, se utilizan letras griegas para distinguirlas una con otra, que se originan al modificar la posición de un sustituyente del anillo de 6-cromanol, como se muestra en la **Figura 11**; así por ejemplo, si R¹ y R² son CH₃ estamos hablando del α-tocoferol.

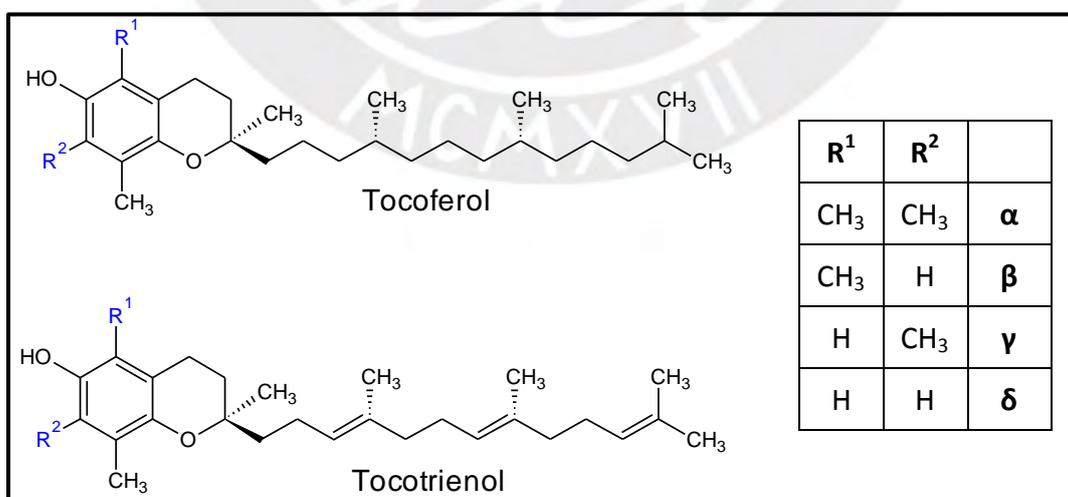


Figura 11. Tipos de tocoferoles y tocotrienoles

Fuente: Colombo (2010)

Los organismos fotosintéticos son los únicos que pueden sintetizar tococromanoles y lo realizan en interior de los plastidios; de ello, aparatos fotosintéticos pueden ser protegidos de la toxicidad del oxígeno y la peroxidación lipídica. La enzima clave para la biosíntesis de tocoferoles es la tocoferol ciclasa (Colombo, 2010). Aceites vegetales de soya, canola, maíz y girasol presentan gran cantidad de tocoferoles siendo el último de los cuatro el que presenta mayor cantidad de α -tocoferol (Grilo et al., 2014).

3.3 Antioxidantes

El organismo humano se encuentra afectado por especies reactivas oxidantes denominadas ERO (o ROS por sus siglas en inglés), que presentan en su estructura uno o más electrones desapareados, estos se producen durante el metabolismo por contaminantes ambientales, radiaciones y por consumo de sustancias tóxicas como alcohol, tabaco y drogas; la vida media de estos radicales es corta, lo que incrementa su rapidez de propagación con moléculas aledañas y genera un daño potencial a la célula, denominado estrés oxidativo (Coronado et al., 2015).

El ser humano, mediante su dieta, incorpora sustancias que contrarrestan la acción de los radicales libres u otras especies reactivas permitiendo un equilibrio, lo cual conlleva a que sea menor la toxicidad por oxidación y que haya menos daño celular. Estas sustancias son denominadas antioxidantes dietéticos y forman parte de los alimentos de consumo cotidiano (Coronado et al., 2015). Los antioxidantes más eficaces son aquellos que pueden interrumpir la reacción radicalaria en cadena, se caracterizan por tener estructuras con alta conjugación, que pueden ser lineales y/o anillos aromáticos o fenólicos; estas al donar un átomo de hidrógeno al radical, lo estabilizan y se vuelven radicales, que serán intermedios altamente estables debido a la deslocalización por resonancia que presenta la estructura (Piljac, 2015).

3.3.1. Especies con Actividad Antioxidante

Existen diversas sustancias que cumplen un rol de antioxidante en nuestro organismo, muchos de estos son consumidos en nuestra dieta diaria.

3.3.1.1. Vitamina E

La descripción de la vitamina E fue hecha en el apartado 3.2.2.2.

3.3.1.2. Flavonoides

Son moléculas que presentan un núcleo base denominado 2-fenil-benzo- γ -pirano, el cual consta de dos anillos bencénicos (A y B) combinados por medio del anillo C de pirano. Adicionalmente los flavonoides presentan espectros con absorciones intensas en el espectro UV, se pueden distinguir dos bandas, la que corresponde al anillo A, de 240 – 285 nm, denominada banda II y la perteneciente al anillo B, de 300 – 550 nm, banda I (Kühnau, 1976). La **Figura 12** muestra la estructura básica de un flavonoide y además la numeración designada para este tipo de metabolito.

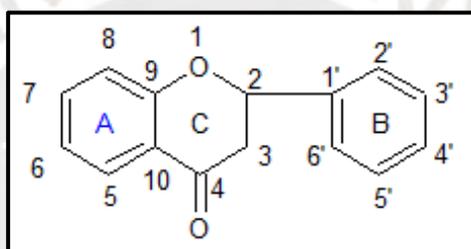


Figura 12. Estructura base de los flavonoides

Fuente: Kühnau (1976)

Estas moléculas están presentes solo en organismos fotosintéticos, en ellos se va a llevar a cabo la biosíntesis de los flavonoides, la cual es una ruta mixta que consta de la vía shikimato y la del ácido malónico. Mediante la ruta del ácido shikímico, a partir de la eritrosa-4-fosfato y el ácido fosfoenolpiruvato, se produce una serie de reacciones que conllevan a la formación de este ácido shikímico y además aminoácidos aromáticos, de los cuales la fenilalanina es la que genera la mayoría de los compuestos fenólicos, al eliminar una molécula de amonio se produce el ácido *trans*-cinámico, la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza este proceso (García & Carril, 2011; Tazzini, 2015).

Mediante la introducción de un grupo hidroxilo a la posición 4 del ácido *trans*-cinámico se genera el ácido *p*-cumárico, esta etapa es catalizada por la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H); tanto el ácido *trans*-cinámico como el ácido *p*-cumárico son compuestos fenólicos simples denominados fenilpropanoides ya que en su estructura presentan un anillo

bencénico y una cadena lateral de tres carbonos. Posteriormente la enzima 4-coumarato-CoA liasa (4CL) cataliza la reacción entre el grupo carboxílico del ácido *p*-cumárico con la CoA y forma un enlace tioéster para dar lugar al *p*-cumaroil-CoA, este es el punto de ramificación en la vía del fenilpropanoide para generar compuestos fenólicos, ya sea polifenoles flavonoides (ubicados en el anillo B de la estructura del flavonoide) o no flavonoides (Tazzini, 2015).

Una vez formado el *p*-cumaroil-CoA, este reacciona con 3 moléculas de malonil-CoA mediante procesos de condensación, ciclación y aromatización catalizados por la enzima chalcona sintasa y forma el anillo A de la estructura del flavonoide, la molécula en su conjunto es la naringerina chalcona, que es un precursor de los flavonoles y antocianinas (García & Carril, 2011; Tazzini, 2015). Si la misma condensación es catalizada por la estilbeno sintasa produciría estilbenos (García & Carril, 2011). No es común que las chalconas se acumulen en las plantas ya que la naringenina chalcona es convertida a (2S)-naringenina (una flavona) al ser catalizada por la chalcona isomerasa para cerrar el anillo C (Tazzini, 2015).

A partir del sistema de chalcona-flavanona, varias vías conducen a los otros subgrupos de flavonoides (Kühnau, 1976). Así las (2S)-flavanonas experimentan una isomerización estereoespecífica convirtiéndose en 2R y 3R dihidroflavonoles; es decir la naringenina pasa a ser dihidrokaemferol (Tazzini, 2015). La **Figura 13** ilustra los pasos de la biosíntesis de los flavonoides. Los subgrupos de flavonoides formados a través del sistema chalcona-flavanona son muchos, sus principales características se describen en la **Tabla 6**.

El reconocimiento de los flavonoides se puede realizar mediante la prueba de Shinoda que es específica para este tipo de metabolitos. Esta técnica está basada en la formación del ion flavilio que presenta un color de rosa débil a rojo escarlata, mientras más intensa es la coloración, indica mayor presencia de flavonoides. La prueba de Shinoda se fundamenta en que el zinc en polvo o las granallas de magnesio reaccionan con el ácido clorhídrico concentrado liberando hidrógeno, que por reducción produce el ión flavilio. Dan positiva a

esta reacción todos los flavonoides a excepción de chalconas, auronas e isoflavonas (Pech, 2014). La **Figura 14** muestra la reacción de Shinoda para flavonoides.

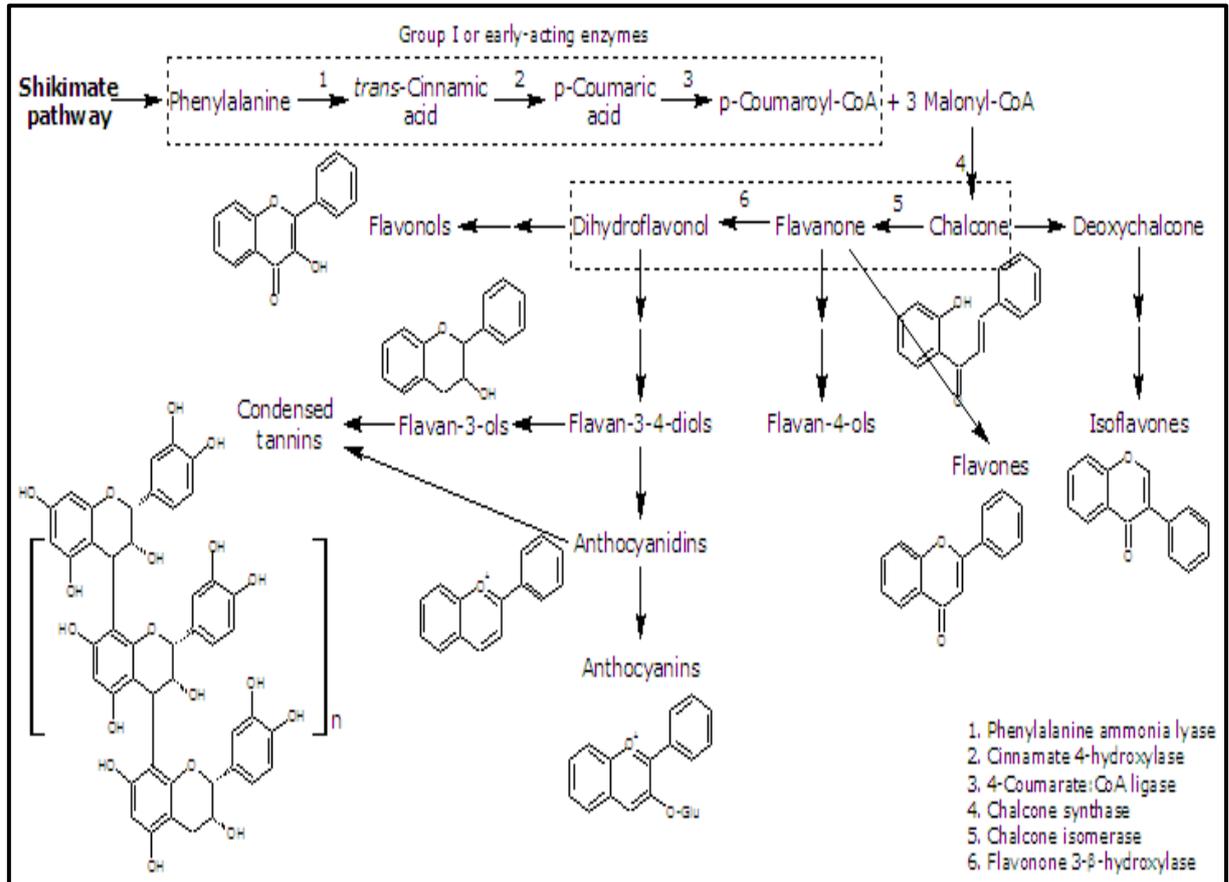


Figura 13. Biosíntesis de los flavonoides

Fuente: Tazzini (2015)

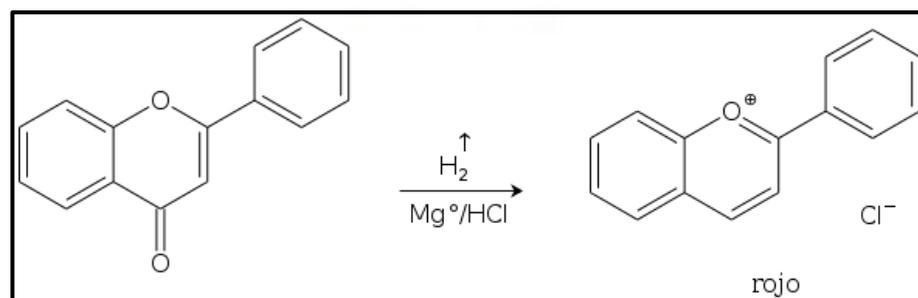


Figura 14. Reacción de Shinoda

Fuente: Pech (2014)

Tabla 6. Tipos de flavonoides

FLAVONOIDE	CARACTERÍSTICA	EJEMPLO
Flavona	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta insaturación entre carbonos C₂ y C₃. - No presenta OH en carbono C₃. 	Apigenina, toringina, galangina, oroxilina
Flavonol	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta insaturación entre carbonos C₂ y C₃. - Presenta OH en C₃. 	Miricetina, quercetina, astragalina.
Flavanona	<ul style="list-style-type: none"> - No presenta insaturación entre carbonos C₂ y C₃. - No presenta OH en carbono C₃. 	Eridictiol, hesperitina, naringenina
Flavanol	<ul style="list-style-type: none"> - No presenta insaturación entre carbonos C₂ y C₃. - Presenta OH en C₃. - No presenta grupo carbonilo en C₄. 	Galocatequina, epicatequina, epicatequina-3-O-galato
Flavananol	<ul style="list-style-type: none"> - No presenta insaturación entre carbonos C₂ y C₃. - Presenta OH en carbono C₃. 	Alpinona, engelitina, astilbina
Isoflavona	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta el anillo B unido al carbono C₃ en vez de al carbono C₂. - Si presenta OH en carbono C₂ es un isoflavonol, si no lo presenta es una isoflavona. 	Genisteína, prunetina, podospicatina, caviunina
Chalcona	<ul style="list-style-type: none"> - No presenta anillo C. - Son más amarillos que los anteriores. 	Isobutrin, naringenina, chalcona, lanceoletina
Aurona	<ul style="list-style-type: none"> - Anillo C de 5 miembros. - Presenta OH en carbonos C₅, C₇, C_{3'} y C_{4'}. 	Leptosidina, aureusidina
Antocianidina	<ul style="list-style-type: none"> - Ausencia del grupo carbonilo C=O en carbono C_{4'}. - Presenta oxonio en carbono la posición 1. - Presenta OH en carbono C₃. 	Cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina
Furanoflavonoide	<ul style="list-style-type: none"> - Anillo de 5 miembros fusionado al anillo A del flavonoide entre carbonos C₆ y C₇. 	5-hidroxi-2''-isopropenil-3-metoxifurano-(2'',3'':7,8)-flavona
Piranoflavonoide	<ul style="list-style-type: none"> - Anillo de 6 miembros fusionado al anillo A del flavonoide. - Hay de dos tipos: lineal (anillo fusionado entre carbonos C₆ y C₇) y angular (anillo fusionado en C₇ y C₈). 	Licoisoflavona B

Fuente: Adaptado de Martínez-Flórez et al. (2002) y Geissman (1962)

Se ha comprobado que los flavonoides como la diosmina, quercetina, kaempferol, entre otros presentan un gran poder quelante para diversos cationes como Cu^{2+} y Fe^{2+} (Van Acker et al., 1996). Adicionalmente flavonoides como la quercetina, son conocidos por proteger el ADN del daño oxidativo que causaría el ataque de especies como $\bullet\text{OH}$ o H_2O_2 , sin embargo es fundamental la concentración de los iones metálicos quelantes Cu^{2+} y Fe^{2+} , puesto que a baja concentración ($\leq 25 \mu\text{M}$), la quercetina presentará un rol protector, mientras que a concentraciones mayores ($\geq 25 \mu\text{M}$), aumenta el daño al ADN por ERO y en consecuencia actuaría como un agente cancerígeno (Nimse & Pal, 2015). Otros flavonoides como la epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) y la epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), pertenecientes al grupo de los flavan-3-oles, se encuentran principalmente en forma de agliconas y presentan una actividad antioxidante potencialmente mayor, a comparación del resto de flavonoides; la EGCG presente en el té verde es la biológicamente más activa previniendo el envejecimiento de la piel por la liberación de los radicales libres (Inja Bogdan & Baumann, 2009).

En un estudio se demostró los efectos fotoprotectores de los polifenoles (EC, EGC, ECG, EGCG) presentes en el té verde, cuando fueron aplicados en forma tópica a la piel humana se observó que disminuyen el eritema inducido por la radiación UV, además de reducir el número de células quemadas, el daño del ADN y proteger las células de Lagerhans (Elmets et al., 2001). Entre otras propiedades que exhiben los flavonoides tenemos que son antiinflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antimicrobianos y previenen enfermedades cardiovasculares (Tanwar & Modgil, 2012).

3.3.1.3. Taninos

Son moléculas que se originan como subproducto de procesos químicos en el interior de las plantas, es decir son metabolitos secundarios y tienen la capacidad de interactuar con las proteínas para generar precipitados insolubles. En efecto, viene de la palabra “tanning” (impermeabilización y conservación), empleada para describir el proceso por el cual las pieles de los animales se transforman en cuero al usar extractos de plantas que presentan estos metabolitos (Cannas, 2015). Adicionalmente, se les atribuye el tener una capacidad

antioxidante elevada, un claro ejemplo es el ácido gálico que manifiesta la propiedad de inhibir la acción oxidativa del peróxido de hidrógeno en el organismo (Yen, Duh, & Tsai, 2002). La **Tabla 7** resume los tipos de taninos y la distribución de estos metabolitos en las plantas.

Tabla 7. Clasificación de taninos y ocurrencia en plantas

CLASIFICACIÓN	
Galotaninos	<ul style="list-style-type: none"> - Son los más simples. - Ésteres de un poliol: glucosa con varias moléculas de ácido gálico. - Se hidrolizan por ácidos, bases y vía enzimática.
Elagiotaninos	<ul style="list-style-type: none"> - Son ésteres del ácido hexahidroxi-difénico (HHDP). - Se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico unido por enlace carbono-carbono lineal. - Por hidrólisis, el HHDP sufre una lactonización espontánea produciendo el ácido elágico.
Taninos complejos	<ul style="list-style-type: none"> - Formados por galotaninos o elagiotaninos enlazados por una catequina.
Taninos condensados	<ul style="list-style-type: none"> - No presentan glucosa. - Son polímeros de flavan-3-ol (proantocianidina oligomérica cuyo monómero es la catequina) y flavan-3,4-diol (leucoantocianidina). - Están unidas entre sí por enlaces carbono-carbono en la posición 4 → 8 y 4 → 6.
OCURRENCIA EN LA PLANTA	
Tejidos de brotes	<ul style="list-style-type: none"> - Comunes en la parte externa del brote. - Como protección contra la congelación.
Tejidos de hojas	<ul style="list-style-type: none"> - Comunes en la epidermis superior. - Sirven para reducir la palatabilidad, los protegen de los depredadores.
Tejidos de raíz	<ul style="list-style-type: none"> - Comunes en la hipodermis. - Como barrera química contra patógenos de plantas.
Tejidos de semillas	<ul style="list-style-type: none"> - Principalmente en la capa que esta entre el tegumento externo y la capa aleurona. - Propiedades alelopáticas y bactericidas.
Tejidos de tallo	<ul style="list-style-type: none"> - Comúnmente en el floema y xilema. - Regulan el crecimiento de estos tejidos.

Fuente: Adaptado de Khanbabaee & van Ree (2001) y Cannas (2015)

3.3.2. Contenido de Fenoles Totales

Como los compuestos fenólicos son considerados moléculas con una alta capacidad de neutralizar los radicales libres, su cuantificación es una prueba analítica que se realiza comúnmente a los extractos procedentes de algún material biológico, para ello se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de sales de tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en un medio acidificado con ácido clorhídrico y fosfórico. La reacción que permite determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales se lleva a cabo mediante un mecanismo que aún no está esclarecido del todo, pero se asume que implica una secuencia de reacciones reversibles de reducción de uno o dos electrones en la que el medio básico (producido por la adición de carbonato) disocia el protón fenólico y se genera el ión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu que conduce a la formación de un complejo azulado (Sánchez-Rangel et al, 2013).

3.3.3. Contenido de Flavonoides Totales

Al poseer los flavonoides una potencial actividad antioxidante, la determinación de la cantidad total de flavonoides es una técnica analítica ampliamente utilizada en extractos procedentes de algún material biológico, la reacción se basa en la formación de un complejo entre los flavonoides presentes y el cloruro de aluminio (AlCl_3) para luego determinar espectrofotométricamente el complejo formado (Soares, Silva, & Pezzini, 2015).

3.3.4. Método espectrofotométrico del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) para la evaluación de la actividad antioxidante

La prueba está basada en que el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo es neutralizado por compuestos con gran densidad electrónica, de esta manera el radical de color violeta que absorbe a 520 nm se estabiliza apreciándose una disminución de absorbancia por pérdida gradual del color violeta (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995).

3.4 Generalidades de la Cromatografía

3.4.1. Cromatografía de gases (GC)

Es una técnica instrumental que permite la separación de compuestos ya sean inorgánicos u orgánicos. Se emplea como fase móvil el gas portador, que generalmente es helio el cual difundirá a un flujo establecido. La muestra es volatilizada e introducida al inyector para luego ser diluida y transportada por el gas inerte a lo largo de toda la columna, en donde se irán separando los componentes para llegar finalmente al detector. La **Figura 15** muestra el esquema básico de un cromatógrafo de gases.

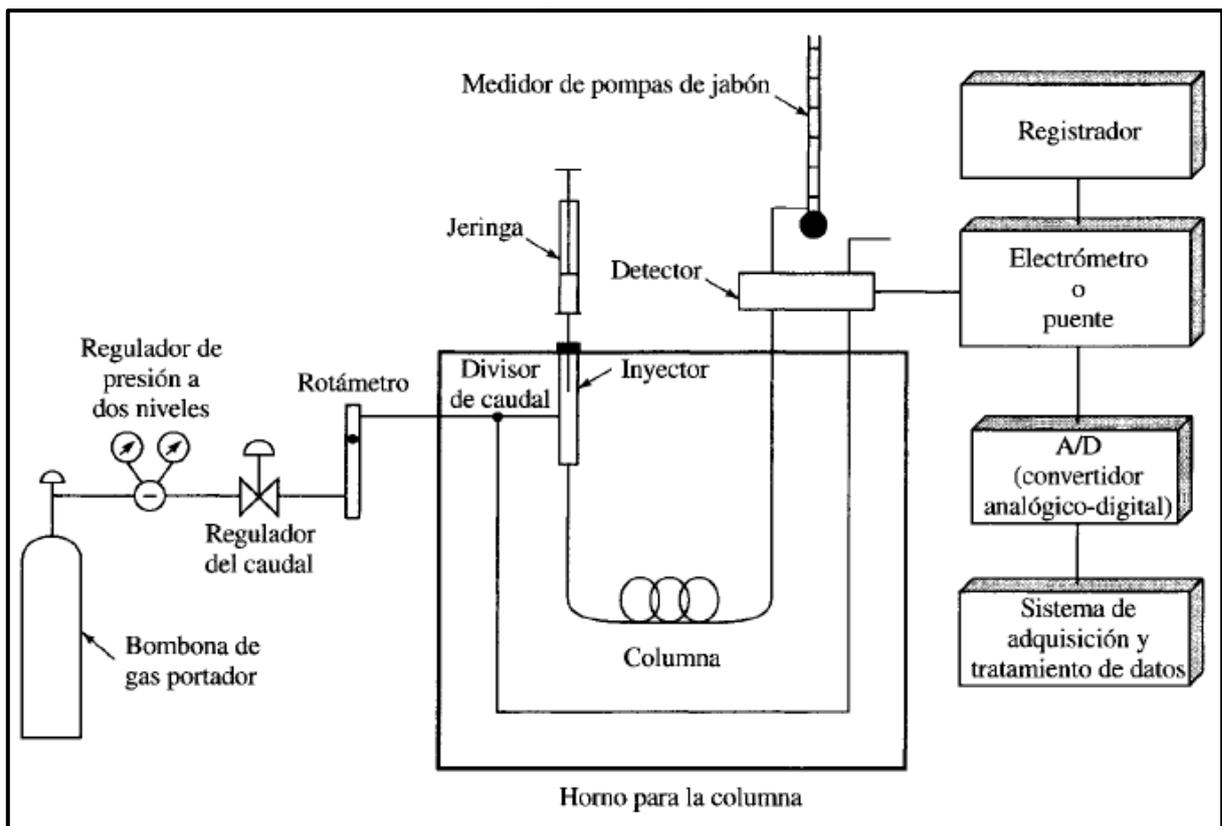


Figura 15. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases

Fuente: Skoog et al (2001)

La cromatografía de gases se divide en dos tipos, de gas-sólido y de gas-líquido. En la **Tabla 8** se muestran las características de los detectores frecuentemente empleados en la cromatografía de gases.

Tabla 8. Tipos de detectores en cromatografía de gases

TIPO DE DETECTOR	CARACTERÍSTICAS
Conductividad térmica (TCD)	<ul style="list-style-type: none"> - Es universal. - Basado en el efecto de la temperatura sobre la resistividad de un filamento. - Detecta cualquier componente que tenga una diferencia en su capacidad de conducción térmica frente al He. - Tiene como desventaja el ser poco sensible.
Ionización de llama (FID)	<ul style="list-style-type: none"> - Es relativamente universal. - Su respuesta está referida al número efectivo de carbonos (ECN por sus siglas en inglés) que hay en la molécula ya sea carbonos alifáticos, aromáticos, etc. - Grupos funcionales como carbonilo, alcohol, halógenos y amina, originan pocos iones en la llama.
Fotoionización (PID)	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente sensible. - No es un detector universal ya que está dirigido a compuestos que son capaces de ser ionizados por radiación UV de alta energía, como los aromáticos mas no a los alcanos.
Ionización termoiónica (TID)	<ul style="list-style-type: none"> - No son universales. - Se les conoce como detectores de nitrógeno y fósforo. - Presentan una perla de cesio o rubidio instalado encima de la llama, la cual ocasiona que tenga dos modos de operación (modo N-P y modo solo P).
Captura de electrones (ECD)	<ul style="list-style-type: none"> - No es un detector universal, usado generalmente para compuestos halogenados y grupos nitro (elevada afinidad electrónica).
Emisión atómica por plasma de microondas (AED)	<ul style="list-style-type: none"> - Detector exclusivo de elementos. - Emplea un magnetón para generar plasma produciéndose emisión elemental que es detectada usando un policromador de rejilla, el cual hace un barrido de longitudes de onda para detectar el tipo de elemento presente.
Espectrómetro de masas (MS)	<ul style="list-style-type: none"> - Es un detector universal - Se puede obtener información de la masa molecular y de la estructura del compuesto analizado mediante la ionización de las moléculas. - Mediante campos eléctricos, los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su masa carga (m/z).

Fuente: Adaptado de Skoog et al (2001)

4. HIPÓTESIS

Las semillas de *Pouteria lucuma* presentan metabolitos con propiedad antioxidante en su extracto metanólico y fitoesteroles en su aceite, con lo cual estos residuos agroindustriales serán valorados y podrán generar investigaciones posteriores.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos y Equipos

- Metanol (QP)
- Hexano (QP)
- Acetona(QP)
- Cloroformo grado HPLC
- Diclorometano grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Solución estándar de β -sitosterol 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cloroformo Marca SUPELCO
- Solución estándar de estigmasterol 10 mg/mL en cloroformo Marca SUPELCO
- Solución estándar de ergosterol 10 mg/mL en cloroformo Marca SUPELCO
- Solución estándar mezcla de FAMES 30 mg/mL en diclorometano Marca RESTEK
- Reactivo de Folin-Ciocalteu Sigma Aldrich
- Estándar de ácido gálico sólido 97 % Sigma Aldrich
- Estándar de quercetina sólida ≥ 95 % Sigma Aldrich
- Estándar de difenil-picril-hidrazilo (DPPH) sólido Sigma Aldrich
- Viales ámbar para automuestreadores Marca Agilent
- Tapas rosca para viales Agilent Marca RESTEK
- Molino de martillos Marca INQUIMET
- Rotavapor modelo R206 Marca SENCO
- Baño con sonicador (60 Hz, 245 W) modelo 08895-22 Marca Cole-Parmer
- Cromatógrafo de gases modelo GC-2010 Plus marca Shimadzu acoplado a un espectrómetro de masa Modelo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japón) con cuadrupolo de filtro de masa controlado por GCMS Solution Software (Shimadzu, Japón). El cromatógrafo además presenta un detector de ionización de llama (FID).
- Sistema Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC y un compartimiento de columna Thermo Scientific Dionex Ultimate Series TCC-3000RS 3000 y un detector de separaciones rápidas PDA controlado por Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA y Dionex Softron GmbH Parte de Thermo Fisher Scientific, Alemania). Espectrómetro de masas de enfoque exacto (Thermo, Bremen, Alemania).

5.2 Metodología

5.2.1. Recolección y Pretratamiento de la Muestra

Las semillas de lúcuma (*Pouteria lucuma*) se obtuvieron en el distrito de Chilca, ubicado en la provincia de Cañete, a 72 km de Lima, cedidas por la heladería OVNI quienes no solo cultivan las lúcumas sino que además elaboran helados con esta fruta y otros productos, como la harina de lúcuma. Se recolectó aproximadamente un kilo de semillas en marzo de 2017 en su tiempo de cosecha.

Las semillas frescas se limpiaron y se les removió el epicarpio que es duro y de color marrón, posteriormente, las semillas desnudas fueron sumergidas en nitrógeno líquido con lo cual se aumentó su rigidez y luego se molieron en un molino de martillos a un tamaño de partícula de 250 μm . El producto fue embolsado herméticamente y almacenado en congelador a 0 °C hasta su uso posterior.

5.2.2. Determinación del Porcentaje de Humedad de la Muestra

Se pesaron aproximadamente 2 gramos de semilla molida fresca, los cuales fueron llevados a sequedad a una temperatura de 135 °C en una estufa eléctrica durante 2 horas. Posteriormente se pesó la muestra seca. Se realizó el procedimiento por triplicado para obtener el porcentaje de humedad promedio de la semilla.

5.2.3. Extracción y Separación de Fases

Se pesó aproximadamente 187 gramos de material fresco (con porcentaje de humedad ya determinado), luego se llevó a cabo la extracción y separación del extracto siguiendo el flujograma que se presenta en la **Figura 16**. Este procedimiento se realizó por triplicado con la finalidad de obtener un porcentaje promedio del rendimiento de extracción de la fracción metanólica hidrofílica y del aceite.

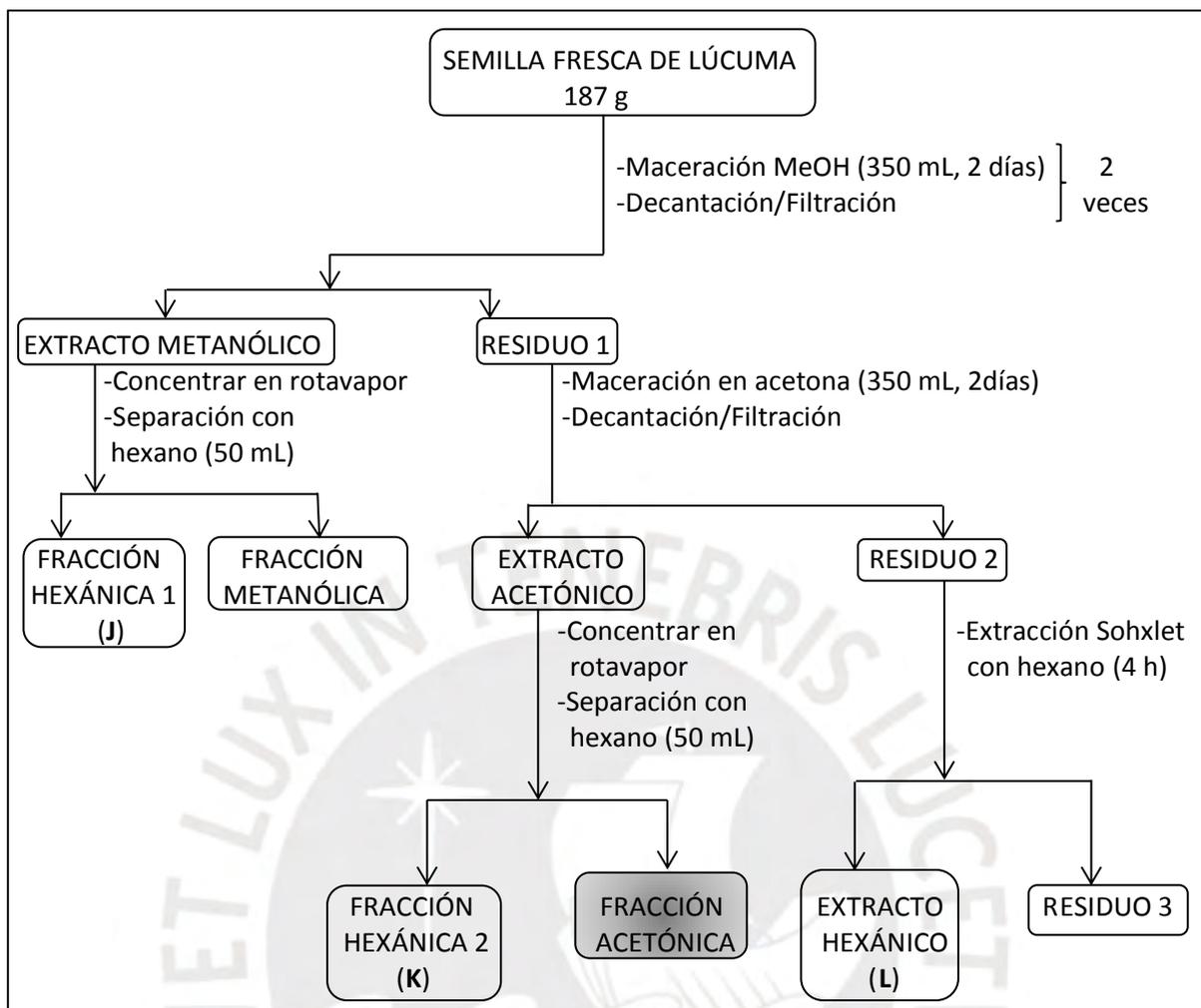


Figura 16. Esquema del tratamiento de la muestra

Todas las fracciones obtenidas fueron concentradas en rotavapor hasta completa eliminación del solvente, luego se registró el peso de cada fracción y finalmente se les incorporó nitrógeno gaseoso para guardarlas en el congelador a 0 °C hasta su posterior empleo. La fracción acetónica no fue trabajada en la presente investigación.

5.2.4. Identificación de Metabolitos del Aceite por GC-MS

Se pesaron aproximadamente 100 mg de las fracciones hexánica 1, hexánica 2 y del extracto hexánico (obtenido del residuo 2), en viales rotulados con las letras **J**, **K** y **L** respectivamente y se registró sus masas correspondientes. Posteriormente, cada muestra fue disuelta y llevada hasta 1 mL con cloroformo.

Se tomaron alícuotas de cada muestra y se hicieron diluciones sucesivas hasta obtener aproximadamente 500 mg/L, luego se colocaron en el automuestreador y se inyectaron al cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La **Tabla 9** detalla las condiciones cromatográficas llevadas a cabo durante el proceso de operación.

Tabla 9. Condiciones de operación del equipo GC-MS

Columna Capilar	Rtx-5MS
	Longitud: 30 m
	Diámetro: 0,25 mm
	Fase: 5 % difenil 95 % dimetilpolisiloxano
Programación de temperatura	T1: 120 °C / 1 minuto
	R1: 10 °C / minuto
	T2: 240 °C / 1 minuto
	R2: 20 °C / minuto
	T3: 290 °C / 20 minutos
	Tiempo total de corrida: 30 minutos
Inyector	Automático: AOC-20 i/s
	Temperatura: 290 °C
	Volumen de inyección: 1 µL
	Modo de inyección: Splitless
Gas	Gas transportador: He
	Flujo total: 4 mL / minuto
	Presión: 80,6 kPa
Detector	Tipo: Espectrómetro de masa
	Temperatura del detector: 260 °C
	Potencial de ionización: 70 eV

5.2.5. Cuantificación de Fitoesteroides por GC-MS

Se tomaron alícuotas de los estándares de fitoesteroides (β -sitosterol, estigmasterol y ergosterol) para ser diluidos con cloroformo y llevados a una concentración de 100 ppm; luego se elaboró una mezcla de estos que se diluyó hasta una concentración de 20 ppm cada uno. Luego se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas (GC-MS) y se obtuvieron los tiempos de retención de cada fitoesterol. Posteriormente se prepararon diluciones de la mezcla de fitoesteroides, con concentraciones 0,1; 1; 2; 5 y 10 ppm para obtener la curva de patrones.

Con las soluciones **J**, **K** y **L**, se realizaron diluciones sucesivas con cloroformo, de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 200 μL y se llevó a 2 mL, luego 100 μL que se llevó a 2 mL; de esta manera se obtuvieron concentraciones de 529 mg/L para la muestra **J**; 505,5 mg/L para **K** y 503,5 mg/L para **L**. Estas diluciones fueron inyectadas por triplicado al GC-MS para ser cuantificadas mediante la curva de patrones realizada.

Las condiciones cromatográficas llevadas a cabo durante el proceso de operación se describen en la **Tabla 9**. Los tiempos de retención y los fragmentos característicos del espectro de masas por modo de ionización electrónica fue determinado por SIM, empleándose para el β -sitosterol la relación m/z de 81; para el estigmasterol, 55 y para el ergosterol, 253; basándose en la evaluación automática del sistema. La cantidad de fitoesteroles en la muestra se expresó como mg del fitoesterol por 100 gramos de aceite conformado por las muestras **J**, **K** y **L**.

5.2.6. Preparación y Cuantificación de FAMES del Aceite por GC-FID

Se pesó aproximadamente 110 mg de cada una de las fracciones iniciales (hexánica 1, hexánica 2 y el extracto hexánico obtenido del residuo 2) y fueron rotuladas con las letras **C**, **F** e **I**. Se procedió a la transesterificación en base al método de Orozco-Solano et al., (2010) con ligeras modificaciones, para obtener los FAMES, para ello, a cada muestra se le adicionó 2 mL de KOH 0,5 N y se dejó reaccionar en un baño con sonicator a 60 °C durante una hora. Finalmente se adicionó 3 mL de hexano, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se extrajo la fase orgánica con pipeta Pasteur.

Se removió completamente el hexano con un flujo de nitrógeno gaseoso y los FAMES libres de solvente fueron disueltos y llevados hasta un volumen de 1 mL en diclorometano. Tanto los FAMES de las muestras como los de la mezcla estándar fueron colocadas en el automuestreador e inyectadas al cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama. Las condiciones cromatográficas llevadas a cabo durante el proceso de operación se muestran en la **Tabla 10**. La cuantificación se llevó a cabo mediante áreas registradas de los tiempos de retención de los FAMES de la mezcla estándar, mediante normalización directa.

La cantidad de FAMES en la muestra se expresó como g de ácido graso por 100 gramos de aceite.

Tabla 10. Condiciones de operación del equipo GC-FID

Columna Capilar	STABILWAX FID
	Longitud: 30 m
	Diámetro: 0,25 mm
Programación de temperatura	T1: 80 °C / 2 minutos
	R1: 14 °C / minuto
	T2: 180 °C / 12 minutos
	R2: 12 °C / minuto
	T3: 220 °C / 10 minutos
	R3: 10 °C / minuto
	T4: 240 °C / 10 minutos
Inyector	Automático: AOC-20 i/s
	Temperatura: 250 °C
	Volumen de inyección: 1 µL
	Modo de inyección: Split
Gas	Gas transportador: He
	Flujo total: 203,0 mL / minuto
	Presión: 156,0 kPa
Detector	Tipo: Ionización de llama
	Temperatura del detector: 250 °C

5.2.7. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto

Se realizó un screening fitoquímico a la fracción metanólica siguiendo el procedimiento propuesto por Lock (1994), para lo cual se tomó 1 mL de solución acuosa de la fracción metanólica para cada prueba cualitativa.

5.2.8. Determinación del Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica

Para cuantificar los fenoles totales se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología de Yu et al. (2003) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 50 mg de la fracción metanólica y se llevó hasta un volumen de 50 mL con agua; posteriormente, se tomó una alícuota de 400 µL y se colocó en una fiola de 10 mL, a la cual se le adicionó 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperó por 4 minutos y se adicionó

1500 μL de Na_2CO_3 , se llevó a un volumen de 10 mL y se dejó reaccionar por 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado. Para la curva de patrones, se empleó ácido gálico como estándar, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 3, 4, 6, 8, 9 y 10 ppm y luego se siguió el mismo procedimiento realizado con la muestra. El contenido de fenoles totales de la muestra se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 gramos de semilla seca.

La cuantificación de flavonoides totales se llevó a cabo mediante el método descrito por Zhishen et al. (1999) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 50 mg de la fracción metanólica y se llevó hasta un volumen de 50 mL con metanol, de esta solución se tomó una alícuota de 700 μL y se colocó en una fiola de 10 mL a la cual se adicionó 300 μL de NaNO_2 , se dejó reaccionar durante 5 minutos para luego añadir 300 μL de AlCl_3 . Se dejó reaccionar durante 6 minutos y se adicionaron 2 mL de NaOH 1 M, se homogenizó y se llevó a volumen de 10 mL con metanol. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 320 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado. Para la curva de patrones, se empleó quercetina aglicona como estándar, con el cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 3, 4, 5 y 8 ppm y se siguió el mismo procedimiento realizado con la muestra. El valor de contenido de flavonoides totales de la muestra se expresó como mg de quercetina por 100 gramos de semilla seca.

5.2.9. Determinación del Perfil Metabolómico de la Fracción Metanólica por UHPLC-DAD-ESI-MS/MS

El perfil metabolómico se obtuvo mediante la inyección de 10 μL de la fracción metanólica, previamente disuelta en metanol:agua (9:1), al equipo UHPLC-DAD-ESI-MS/MS, esta determinación se realizó en la Universidad de Antofagasta, Chile.

Los parámetros del cromatógrafo y del espectrómetro de masas fueron los mismos empleados por Castro et al. (2017).

5.2.10. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica

Esta determinación se llevó a cabo mediante el uso del reactivo DPPH siguiendo la técnica descrita por Li et al (2008) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de DPPH a 0,08 mM y se tomaron alícuotas de 3 mL para que reaccionen con 1 mL de la muestra preparada a diferentes concentraciones (0 – 80 ppm). Finalmente se dejaron en un ambiente sin luz durante media hora y se prosiguió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición y por regresión lineal se obtiene la concentración inhibitoria media (IC_{50}).



6. RESULTADOS

6.1. Determinación del Porcentaje de Humedad de la Muestra

La **Tabla 11** muestra el porcentaje promedio de humedad de la semilla de lúcuma obtenido a partir de tres mediciones de la muestra.

Tabla 11. Porcentaje promedio de humedad de la semilla de lúcuma

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Porcentaje de Humedad (%)
1	2,0795	0,9029	56,58
2	2,0711	0,9143	55,85
3	2,0804	0,8994	56,77
Porcentaje Promedio de Humedad (%)		Desviación Estándar	
56,40		0,49	

6.2. Determinación del Porcentaje de Rendimiento de Extracción

Las fracciones metanólica desengrasada, hexánica 1, hexánica 2 y el extracto hexánico obtenido por soxhlet del residuo 2, mostraron las siguientes características:

- fracción metanólica: coloración marrón rojiza y textura viscosa con olor dulce,
- fracción hexánica 1: textura viscosa con coloración amarillo oscuro y olor algo picante,
- fracción hexánica 2: textura viscosa y un color amarillo más oscuro,
- extracto hexánico: coloración amarillo pálido, una textura viscosa y un olor muy picante.

La **Tabla 12** muestra los porcentajes promedio del rendimiento de extracción de la fracción metanólica desengrasada y del aceite total (fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico) obtenidos de la semilla de lúcuma.

Tabla 12. Porcentaje promedio del rendimiento de extracción de la fracción metanólica y del aceite total

Muestra	Peso muestra húmeda (g)	Peso muestra seca* (g)	Peso fracción metanólica (g)	Peso fracción hexánica 1 (g)	Peso fracción hexánica 2 (g)	Peso extracto hexánico (g)	Peso Aceite total** (g)
1	187,1028	81,6330	14,3874	0,6072	2,4748	0,7578	3,8398
2	189,3921	82,5750	15,1089	0,6090	2,5089	0,8005	3,9184
3	187,5970	82,1290	14,7022	0,6069	2,4767	0,7530	3,8366
Porcentaje Promedio de la Fracción Metanólica (%)	Desviación Estándar		Porcentaje Promedio del Aceite Total (%)			Desviación Estándar	
17,94	0,33		4,71			0,04	

(*) El peso de la muestra seca se calculó a partir del porcentaje promedio de humedad obtenido anteriormente.

(**) El peso del aceite total se obtuvo de la suma del peso de la fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico.

6.3. Identificación de los Metabolitos del Aceite de la Semilla de Lúcumá

Los metabolitos fueron identificados por el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas mediante la comparación de sus espectros de masa con los reportados por la biblioteca del equipo, NIST 14, las mediciones se hicieron a las muestras diluidas de la fracción hexánica 1 (J), fracción hexánica 2 (K) y extracto hexánico (L). Se obtuvo espectros con porcentajes mayores al 80 % de similitud (basado en la recomendación hecha por el fabricante).

Los metabolitos presentes en las diluciones de J, K y L se muestran en las **Tabla 13**, **Tabla 14** y **Tabla 15** respectivamente. Los cromatogramas completos de dichas diluciones se pueden apreciar en los **ANEXO A**, **ANEXO B** y **ANEXO C**.

Tabla 13. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 1

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
1	3,657	α -Terpineol	451674	0,01
2	3,874	5-Hidroximetilfurfural	1424732	0,03
3	4,654	3-Etilheptanol	407664	0,01
4	5,679	Niacinamida	3684561	0,07
5	6,764	Guanosina	7095177	0,14
6	6,897	β -D-Glucopiranosá, 1,6-anhidro	8273927	0,16
7	6,975	Ácido n-decanoico	6212621	0,12
8	8,031	Hexadecanal	1963650	0,04
9	8,627	Trietil isocianurato	3926910	0,08
10	9,138	Tetradecanal	93643017	1,80
11	9,621	Ácido tetradecanoico	4093001	0,08
12	10,018	(Z)-7-Hexadecenal	1104133	0,02
13	10,231	Metil éster del ácido pentadecanoico	3846026	0,07
14	11,062	Metil éster del ácido (9Z)-hexadecenoico	6255995	0,12
15	11,284	Metil éster del ácido hexadecanoico	76853023	1,48
16	11,929	Etil éster del ácido hexadecanoico	310019056	5,97
17	12,130	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$	540879531	10,42
18	12,633	Ácido oleico	36254597	0,70

Tabla 13. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 1 (Continuación)

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
19	12,764	Oxacicotetradecan-2-ona	20217675	0,39
20	12,988	Metil éster del ácido (9Z, 12Z)-octadecadienoico	164036441	3,16
21	13,030	Metil éster del ácido (9E)-octadecenoico	88306429	1,70
22	13,201	Metil estearato	75102704	1,45
23	13,604	Etil éster del ácido linoleico	359892527	6,93
24	13,660	Etil oleato	78893906	1,52
25	13,713	(9E)-Octadecen-1-ol	126661704	2,44
26	13,848	Isopropil linoleato	127372627	2,45
27	13,960	Etil éster del ácido octadecanoico	541324239	10,42
28	14,352	Hexadecanamina	70800465	1,36
29	14,503	Cloruro de palmitoilo	81279045	1,57
30	14,713	N,N-Dimetil octanamida	53937714	1,04
31	14,929	Ácido octadecanedioico	53577325	1,03
32	15,065	2-Hidroxi-1,3-propanedil éster del ácido octadecanoico	89517248	1,72
33	15,211	(9Z)-Octadecen-1-ol	63756788	1,23
34	15,270	Cis-11-hexadecenal	59099088	1,14
35	15,344	Triglato de citronelilo	15918016	0,31
36	15,575	(9Z)-Octadecenamida	32556488	0,63
37	15,653	Hexadecano	24307961	0,47
38	15,959	Hexadecanamida	84216460	1,62
39	16,587	Glicerol-1-palmitato	190916957	3,68
40	16,759	Diisooctil ftalato	75848675	1,46
41	17,381	2-Fenil-3-butin-2-ol	40964815	0,79
42	17,558	Heneicosano	26846722	0,52
43	17,802	Metil éster del ácido (12Z,15Z)-octadecadienoico	275151483	5,30
44	18,057	Bis(2-etilhexanilo) éster del ácido 1,3-bencendicarboxílico	82632539	1,59
45	18,317	(13Z)-Docosenamida	32598284	0,63
46	18,411	Ácido erúxico	13178396	0,25
47	18,597	Escualeno	65054056	1,25

Tabla 13. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 1 (Continuación)

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
48	20,189	psi-Caroteno	24641450	0,47
49	20,839	γ -Tocoferol	13492344	0,26
50	20,962	Acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ol,	8736719	0,17
51	21,377	7-dehidrodiosgenina-3-acetato	6629692	0,13
52	21,947	α -Tocoferol	66556348	1,28
53	22,518	Vitamina E	47176553	0,91
54	24,239	1-Triacontanol	8943562	0,17
55	24,450	Estigmasterol	25660976	0,49
56	25,543	β -Sitosterol	359803338	6,93
57	26,169	α -Amirina	37345504	0,72
58	26,359	Latosterol	16912180	0,33
59	28,576	β -Amirina	394415404	7,60
60	29,142	Acetato de lanosta-8,24-dien-3-ol	19156996	0,37
61	29,338	Betulina	43189868	0,83
			5193017006	100,00

(*) El área de cada componente fue dividido por el área del pico sumado de todos los componentes para calcular el porcentaje de área.

Tabla 14. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 2

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
1	4,118	1-Cloro-3-etenilbenceno	4230400	0,31
2	7,006	Hidroxitolueno butilado	1122316	0,08
3	8,695	Trietil isocianurato	10193072	0,74
4	10,240	Metil éster del ácido pentadecanoico	658707	0,05
5	11,262	Metil éster del ácido hexadecanoico	26117726	1,90
6	11,664	Ácido n-hexánico	44935339	3,27
7	11,721	Dibutil ftalato	20328847	1,48
8	11,907	Etil éster del ácido hexadecanoico	11450850	0,83
9	12,913	Metil éster del ácido (9Z, 12Z)-octadecadienoico	43216077	3,14

Tabla 14. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 2 (Continuación)

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
10	12,957	Metil éster del ácido (9E)-octadecenoico	33806271	2,46
11	13,152	Metil estearato	12370598	0,90
12	13,360	(7E)-Tetradecenol	82445238	6,00
13	13,528	Etil éster del ácido linoleico	76520646	5,57
14	13,794	Isopropil linoleate	29534646	2,15
15	14,415	Cloruro de palmitoilo	4894687	0,36
16	14,851	2-Hidroxi-1,3-propanedil éster del ácido octadecanoico	23589597	1,72
17	15,591	(9Z)-Octadecenamida	2341250	0,17
18	15,865	Hexadecanamida	15210443	1,11
19	16,209	<i>cis</i> -9-Hexadecenal	73370386	5,34
20	16,343	2,3-Dihidroxi-propil éster del ácido octadecanoico	50242056	3,65
21	16,671	Diisooctil ftalato	12449527	0,91
22	17,513	Heneicosano	19908050	1,45
21	17,980	Bis(2-etilhexanilo) éster del ácido 1,3-bencendicarboxílico	71987794	5,24
24	18,189	(13Z)-Docosenamida	7038122	0,51
25	18,521	Escualeno	28116976	2,05
26	18,858	1-Hexacosanol	6193474	0,45
27	19,002	Docosane	79562835	5,79
28	20,354	Octadecanal	35371341	2,57
29	20,934	Triacotano	49746758	3,62
30	21,063	Octacosanol	46553203	3,39
31	21,741	α -Tocoferol	15316962	1,11
32	22,322	Vitamina E	15754133	1,15
33	23,008	Ledol	88187574	6,41
34	24,003	1-Triacotanol	67989160	4,95
35	24,653	Estigmasterol	2871920	0,21
36	24,944	5,6-Dihidroergosterol	39372362	2,86
37	25,792	β -Sitosterol	5264535	0,38
38	25,925	α -Amirina	4745318	0,35
39	26,791	2-Hexadecil 1,1'-biciclopentil	44849903	3,26

Tabla 14. Metabolitos presentes en la fracción hexánica 2 (Continuación)

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área* (%)
40	28,058	β -Amirina	145600709	10,59
41	28,794	Acetato de lanosta-8,24-dien-3-ol	5979451	0,43
42	28,944	Acetato de lup-20(29)-en-3-ol	12547184	0,91
43	29,254	Betulina	2875048	0,21
			1374861491	100,00

(*)El área de cada componente fue dividido por el área del pico sumado de todos los componentes para calcular el porcentaje de área.

Tabla 15. Metabolitos presentes en el extracto hexánico

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área (%)
1	5,508	1-Dodecanol	744674	0,03
2	9,162	Tetradecanal	2074360	0,09
3	9,294	Ecgonina	929931	0,04
4	11,284	Metil éster del ácido hexadecanoico	19263843	0,86
5	11,850	Ácido n-hexadecanoico	93364818	4,17
6	11,943	Etil éster del ácido hexadecanoico	36664290	1,64
7	12,330	Ácido 10-undecinoico	29357324	1,31
8	12,945	Metil éster del ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico	197479131	8,83
9	12,988	Metil éster del ácido (9E)-octadecenoico	68494949	3,06
10	13,197	Metil estearato	128460578	5,74
11	13,594	Etil éster del ácido linoleico	361436482	16,15
12	13,642	Etil oleato	65812172	2,94
13	13,771	Isopropil linoleato	239006790	10,68
14	13,885	Etil éster de ácido octanoico	48468815	2,17
15	14,499	Cloruro de palmitoilo	57030491	2,55
16	14,749	(8Z)-Oxacicloheptadec-8-en-2-ona	17659623	0,79
17	14,919	2-Hidroxi-1,3-propanedil éster del ácido octadecanoico	103116647	4,61

Tabla 15. Metabolitos presentes en el extracto hexánico (Continuación)

# Componente	Tiempo de Retención (Tr)	Nombre del Componente	Área	Porcentaje de Área (%)
18	15,381	(7Z)-Hexadecenal	7250780	0,32
19	15,447	Cimetidina	3115180	0,14
20	15,528	(9Z)-Octadecenamida	13348949	0,60
21	15,922	Hexadecamida	40586386	1,81
22	16,291	Cis-9-hexadecenal	158386925	7,08
23	16,409	2,3-dihidropropil ester del ácido octadecanoico	67218140	3,00
24	16,794	Diisooctil ftalato	19009708	0,85
25	17,475	(9Z)-Tetradecenal	8315112	0,37
26	17,568	Heneicosano	12503271	0,56
27	17,681	Oxaciclododecan-2-ona	6476845	0,29
28	18,009	Bis(2-etilhexanilo) éster del ácido 1,3-bencendicarboxílico	9367277	0,42
29	18,588	Escualeno	43445345	1,94
30	18,930	1-Hexacosanol	7620131	0,34
31	19,045	Docosano	37342676	1,67
32	20,879	Triacontano	13234738	0,59
33	20,997	Octacosanol	15739736	0,70
34	21,891	α -Tocoferol	17896040	0,80
35	22,491	Vitamina E	10145076	0,45
36	23,089	Ledol	13297801	0,59
37	24,120	1-Triacontanol	5482617	0,25
38	24,444	Estigmasterol	2297754	0,10
39	25,161	5,6-Dihidroergosterol	44812341	2,00
40	25,735	β -Sitosterol	2891284	0,13
41	26,017	α -Amirina	3629870	0,16
42	26,246	Latosterol	1167193	0,05
43	26,762	2-Hexadecil-1,1'-Biciclopentil	4987323	0,22
44	28,340	β -amirina	174867393	7,82
45	29,068	Acetato de lanosta-8,24-dien-3-ol	8082837	0,36
46	29,247	Betulina	15665173	0,70
			2237548819	100,00

(*) El área de cada componente fue dividido por el área del pico sumado de todos los componentes para calcular el porcentaje de área.

6.4. Determinación Cuantitativa de Fitoesteroles Presentes en el Aceite

La **Figura 17** muestra una parte del cromatograma que se realizó a la mezcla estándar de fitoesteroles, en esta imagen se observan picos con tiempos de retención de 23,720 min perteneciente al ergosterol; de 24,700 min, del estigmasterol y de 25,710 min, del β -sitosterol.

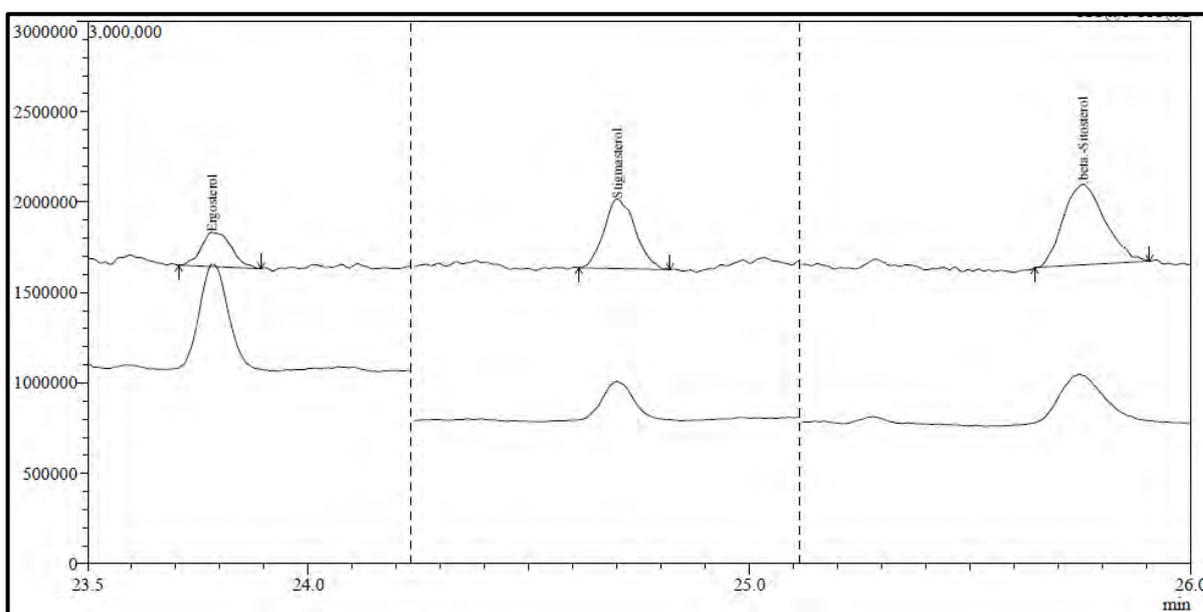


Figura 17. Cromatograma de la mezcla estándar de fitoesteroles

Los valores registrados en la **Tabla 16** se obtuvieron a partir de alícuotas diluidas de las muestras **J**, **K** y **L**, al ser comparadas con la curva de patrones de la mezcla de fitoesteroles. Estos valores fueron corregidos aplicando el factor de dilución.

Tabla 16. Concentración de fitoesteroles encontrados a partir de la curva de patrones

Muestra	Concentración de β -sitosterol (ppm)			Concentración de estigmasterol (ppm)			Concentración de ergosterol (ppm)		
Dilución de J	16,367	16,391	16,319	0,329	0,340	0,309	-	-	-
Dilución de K	2,420	2,412	2,442	0,251	0,239	0,265	-	-	-
Dilución de L	1,418	1,431	1,442	0,860	0,852	0,841	-	-	-

En la **Tabla 17** se muestra los contenidos de fitoesteroles presentes en la fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico, en base a los resultados obtenidos de las diluciones **J, K y L** y las masas correspondientes. También se registra las cantidades de β -sitosterol y estigmasterol total presentes en el aceite, expresados cada uno como miligramos de sustancia por cada 100 mg de aceite.

Tabla 17. Contenido total de fitoesteroles en el aceite de semilla de lúcumo

Muestra	Peso (g)	Contenido de β -sitosterol (mg)			Contenido de estigmasterol (mg)		
Fracción Hexánica 1	1,8231	56,4058	56,4885	56,2404	1,1338	1,1718	1,0618
Fracción Hexánica 2	7,4604	35,7155	35,5974	36,0402	3,7049	3,5273	3,9110
Extracto Hexánico	2,3113	6,5093	6,5690	6,6195	3,9478	3,9111	3,8606
Peso total del aceite* (g)	β -sitosterol total: (mg / 100 g aceite)		Desviación estándar	estigmasterol total: (mg / 100 g aceite)		Desviación estándar	
11,5948	851,49		1,29	75,42		1,02	

(*) El peso del aceite total se obtuvo de la suma del peso de la fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico.

6.5. Determinación Cuantitativa de FAMES Presentes en el Aceite

El peso de las muestras transesterificadas **C, F e I** se registran en la **Tabla 18**, las cuales mostraron presencia de FAMES de palmítico, (9E)-octadecenoico, esteárico y oleico, al ser comparados con la mezcla estándar de FAMES (**ver cromatogramas en ANEXO D**), también se reporta las concentraciones de dichos compuestos.

Se determinó el contenido de FAMES de palmítico, (9E)-octadecenoico, esteárico y oleico, en base a los resultados mostrados en la **Tabla 18** y las masas respectivas de la fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico, los que se registran en la **Tabla 19** expresados en g de ácido graso/100 g de aceite.

Tabla 18. Concentración de FAMES en muestras transesterificadas

	Muestra C	Muestra F	Muestra I
Peso (mg)	118,0	117,2	117,6
Concentración de FAME palmítico (mg/mL)	15,425 (Tr: 19,442)	5,369 (Tr: 19,393)	2,581 (Tr: 19,378)
Concentración de FAME esteárico (mg/mL)	5,533 (Tr: 25,239)	2,520 (Tr: 25,225)	---
Concentración de FAME (9E)-octadecenoico (mg/mL)	13,022 (Tr: 25,699)	8,402 (Tr: 25,681)	2,581 (Tr: 25,666)
Concentración de FAME oleico (mg/mL)	42,460 (Tr: 26,783)	12,751 (Tr: 26,731)	5,442 (Tr: 26,716)

Tabla 19. Contenido total de ácidos grasos en el aceite de semilla de lúcumo

Muestra	Peso (mg)	Contenido de FAME palmítico (mg)	Contenido de FAME esteárico (mg)	Contenido FAME (9E)-octadecenoico (mg)	Contenido FAME oleico (mg)
Fracción Hexánica 1	1823,10	238,31	85,49	201,19	656,01
Fracción Hexánica 2	7460,4	341,77	160,41	534,83	811,67
Extracto Hexánico	2311,3	50,73	---	57,53	106,96
Peso total del aceite* (g)	ácido palmítico total: (g/100 g aceite)	ácido esteárico total: (g/100 g aceite)	ácido (9E)-octadecanoico total: (g/100 g aceite)	ácido oleico total: (g/100 g aceite)	
11,59	5,443	2,122	6,845	13,586	

(*) El peso del aceite total se obtuvo de la suma del peso de la fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico.

6.6. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto

Los tipos de metabolitos secundarios encontrados en la fracción metanólica del extracto mediante screening fitoquímico son reportados en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Metabolitos secundarios de la fracción metanólica del extracto

Metabolito	Reactivo de Identificación	Presencia	Cantidad relativa
Saponinas	espuma	sí	+
Flavonoides	Shinoda	sí	+++
Antocianinas	acetato de plomo	no	-
Betalaínas	acetato de plomo	no	-
Quinonas	Bornträger	no	-
Cumarinas	NaOH 10 %	sí	+
Taninos	gelatina	sí	++

Leyenda: (-) ausencia, (+) poco, (++) regular, (+++) abundante

6.7. Determinación de la Cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica

Se obtuvo la concentración de fenoles totales de la muestra diluida al emplear una curva del estándar de ácido gálico, ($r^2 = 0,9981$). Luego de multiplicarlo por el factor de dilución, se determinó el contenido de fenoles totales presentes en la semilla seca de lúcumo, expresado en mg EAG /100 g semilla seca, los valores se registran en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Contenido de fenoles totales de la fracción metanólica del extracto

Peso de la Fracción Metanólica (g)	Peso de Muestra Seca* (g)	Concentración de fenoles totales (ppm)	Corrección de concentración por factor de dilución (ppm)	Concentración de fenoles totales en muestra (mg)
0,0531	0,2960	3,31	66,20	3,31
		3,35	67,00	3,35
		3,38	67,60	3,38
Contenido total promedio de fenoles totales en extracto (mg EAG/100 g semilla de lúcumo seca)				Desviación estándar
1130,63				11,89

(*) El peso de la muestra seca se calculó a partir del porcentaje promedio de humedad

La concentración de flavonoides totales de la muestra diluida se obtuvo al utilizar una curva del estándar de quercetina ($r^2 = 0,9992$), posteriormente se multiplicó por el factor de dilución para determinar el contenido de flavonoides totales en semilla seca de lúcumo, expresado en mg de quercetina/100 g semilla seca, los valores se reportan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Contenido de flavonoides totales de la fracción metanólica del extracto

Peso de la fracción metanólica (g)	Peso de Muestra Seca* (g)	Concentración de flavonoides totales (ppm)	Corrección de concentración por factor de dilución (ppm)	Concentración de flavonoides totales en la muestra (mg)
0,0627	0,3495	3,26	46,57	2,3255
		3,21	45,86	2,2930
		3,24	46,29	2,3145
Contenido total promedio de flavonoides totales en el extracto (mg quercetina/100 g semilla de lúcumo seca)				Desviación estándar
661,23				4,73

(*) El peso de la muestra seca se calculó a partir del porcentaje promedio de humedad

6.8. Determinación del Perfil Metabólico de la Fracción Metanólica

Se encontraron al menos 48 compuestos en el extracto metanólico hidrofílico (**ver cromatograma en ANEXO E**), que se muestran en la **Tabla 23** donde se indica el nombre tentativo, la clase a la que pertenecen, el tiempo de retención al cual fueron obtenidos, la masa encontrada y teórica del ion molecular así como los fragmentos hijos representativos.

Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcumá

Pico #	Identificación tentativa	Composición elemental [M-H] ⁻	t _R (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Precisión (Δ ppm)	MS ⁿ iones (Δ ppm)	Clase	Referencia
1	Asparragina	C ₄ H ₇ O ₃ N ₂ ⁻	1,27	131,04622	131,04579	3,28	113,03494	aminoácido	(Abu-Reidah, Contreras, Arráez-Román, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2013)
2	Ácido quínico	C ₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	1,34	191,05611	191,05573	1,99	n.d.	ácido orgánico	(Gómez Romero, 2010)
3	Ácido cítrico	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	1,53	191,01972	191,01942	1,57	111,0087	ácido orgánico	(Gómez Romero, 2010)
4	Sacarosa	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	1,74	341,10894	341,10916	0,65	113,03484	carbohidrato	(Gómez Romero, 2010)
5	Glp-hexose	C ₁₁ H ₁₆ O ₈ N ⁻	1,78	290,08814	290,08829	0,52	128,03453 200,05573	aminoácido glicosidado	(Abu-Reidah et al., 2013)
6	Ácido isocítrico	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	1,80	191,01973	191,01935	1,99	111,00790	ácido orgánico	(Gómez Romero, 2010)
7	Ácido piroglutámico	C ₅ H ₆ O ₃ N ⁻	1,83	128,03532	128,03467	5,07	n.d.	aminoácido	(Gómez Romero, 2010)
8	Glu	C ₅ H ₈ O ₄ N ⁻	1,88	146,04588	146,04524	4,38	128,03453	aminoácido	(Gómez Romero, 2010), (Abu-Reidah et al., 2013)
9	Leucina/isoleucina	C ₆ H ₁₂ O ₂ N ⁻	1,91	130,08735	130,08659	5,84	n.d.	aminoácido	(Abu-Reidah et al., 2013)
10	Tirosina	C ₉ H ₁₀ O ₃ N ⁻	1,98	180,06662	180,06613	2,72	163,03958	aminoácido	(Abu-Reidah et al., 2013)
11	Leucina/isoleucina 2	C ₆ H ₁₂ O ₂ N ⁻	2,05	130,08735	130,08685	3,84	n.d.	aminoácido	(Abu-Reidah et al., 2013)
12	Ácido succínico	C ₄ H ₅ O ₄ ⁻	2,16	117,01933	117,01862	6,06	n.d.	ácido orgánico	(Abu-Reidah et al., 2013)
13	Uridina 5-metil éster de ácido oxiacético	C ₁₂ H ₁₅ O ₉ N ₂ ⁻	2,50	331,07830	331,07843	0,39	111,00804 127,00278	nucleósido	---

Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcumá (*Continuación*)

Pico #	Identificación tentativa	Composición elemental [M-H] ⁻	t _R (min.)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Precisión (Δ ppm)	MS ⁿ iones (Δ ppm)	Clase	Referencia
14	Ácido gálico	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	2,79	169,01425	169,01385	2,37	125,02361	Tanino	(Sandhu & Gu, 2010)
15	Pirogalol	C ₆ H ₅ O ₃ ⁻	3,27	125,02442	125,02377	5,20	n.d.	Alcohol Fenólico	---
16	Fenilalanina	C ₉ H ₁₀ O ₂ N ⁻	3,34	164,07170	164,07126	2,68	147,04454	Aminoácido	(Abu-Reidah et al., 2013)
17	Galocatequina-hexosa 1	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	3,65	467,11950	467,11969	0,41	125,02372 137,02350 167,03450	Flavonoide glicosidado	---
18	Ácido pantotético	C ₉ H ₁₆ O ₅ N ⁻	4,49	218,10340	218,10316	1,10	146,00438	Vitamina	(Abu-Reidah et al., 2013), (Gómez Romero, 2010)
19	Galocatequina 1	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	5,67	305,06668	305,06683	0,49	125,02369 137,02368 219,06622	Flavonoide	(Sandhu & Gu, 2010)
20	Triptófano	C ₁₁ H ₁₁ O ₂ N ₂ ⁻	6,94	203,08260	203,08229	1,53	116,04983	Aminoácido	(Abu-Reidah et al., 2013)
21	Galocatequina-hexosa 2	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	8,31	467,11950	467,11981	0,66	125,02357 137,02409 167,03468 245,52000	Flavonoide glicosidado	---
22	Galocatequina-hexosa 3	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	8,70	467,11950	467,11990	0,86	125,02363 137,02367 167,03435	Flavonoide glicosidado	---
23	Galocatequina 2	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	9,23	305,06668	305,06680	0,39	125,02364 137,02368 219,06563	Flavonoide	(Sandhu & Gu, 2010)

Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcum (Continuación)

Pico #	Identificación tentativa	Composición elemental [M-H] ⁻	t _R (min.)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Precisión (Δppm)	MS ⁿ iones (Δppm)	Clase	Referencia
24	Ácido protocatéquico / Ácido gentílico	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	9,27	153,01933	153,01877	3,66	109,02861 108,02080	Ácido Hidroxibenzoico	(Gómez Romero, 2010)
25	Catequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	9,58	289,07176	289,07184	0,28	109,02863 123,04440 125,02366 137,02371 151,03970	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
26	2,4-dihidroxifenil metil cetona	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	9,78	151,04006	151,03958	3,18	109,02870 137,02380	Cetona aromática	---
27	Vitexina	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	9,94	431,09837	431,09879	0,60	312,18161	Flavonoide glicosidado	(Lin et al., 2015)
28	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	10,27	289,07176	289,07208	1,11	109,02865 123,04442 125,02362 137,02370 151,03946	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
29	Galloepicatechin 3-O-gallate	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	10,37	457,07764	457,07809	0,99	125,02364 169,01370	Flavonoid	---
30	Desconocido	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ ⁻	10,71	225,11323	225,11311	0,53		---	---

Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcumá (*Continuación*)

Pico #	Identificación tentativa	Composición elemental [M-H] ⁻	t _R (min.)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Precisión (Δppm)	MS ⁿ iones (Δppm)	Clase	Referencia
31	Ácido Hidroxibenzoico 1	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	11,05	137,02442	137,02383	4,31	n.d.	Ácido Hidroxibenzoico	(Abu-Reidah et al., 2013)
32	Etil galato	C ₉ H ₉ O ₅ ⁻	11,11	197,04555	197,04524	1,57	125,02356	Derivado de Hidroxibenzoico	---
33	Mircetin ramnosido	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	11,15	463,08820	463,08844	0,52	137,02364 151,03947 271,02490 316,02094	Flavonoide glicosidado	(Sandhu & Gu, 2010)
34	Floretin hexosido	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₀ ⁻	11,61	435,12967	435,13007	0,92	119,04995 123,04432	Flavonoide glicosidado	(Ibdah & Gang, 2014)
35	Taxifolina I	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁻	11,71	303,05103	303,05130	0,89	125,02371	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
36	metoxipirogalol	C ₇ H ₇ O ₄ ⁻	12,03	155,03498	155,03447	3,29	125,02390	Derivado alcohol fenólico	---
37	Taxifolina II	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁻	12,30	303,05103	303,05127	0,79	125,02351	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
38	Miricetina	C ₁₅ H ₉ O ₈ ⁻	12,43	317,03029	317,03052	0,73	107,01299 137,02377 151,00305	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
39	Quercetina	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	12,54	301,03538	301,03555	0,57	121,02872 151,03957	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)

Tabla 23. Perfil metabolómico de la fracción metanólica de la semilla de lúcumá (*Continuación*)

Pico #	Identificación tentativa	Composición elemental [M-H] ⁻	t _R (min.)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Precisión (Δppm)	MS ⁿ iones (Δppm)	Clase	Referencia
40	5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavan-3-ol	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	12,63	287,05611	287,05637	0,91	125,02360	Flavonoide	---
41	Ácido Hidroxibenzoico 2	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	13,05	137,02442	137,02377	4,74	n.d.	Ácido Hidroxibenzoico	(Abu-Reidah et al., 2013)
42	Eriodictiol chalcona	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	14,05	287,05611	287,05618	0,24	107,01305 135,04427 151,00316	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
43	Desconocido	C ₃₀ H ₄₅ O ₇ ⁻	15,50	517,31708	517,31708	0,00		Saponina	---
44	Apigenina	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	16,76	269,04555	269,04550	0,19	151,03949	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010), (Lin et al., 2015)
45	Naringenina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	16,99	271,06120	271,06134	0,52	107,01289 119,04941 151,00276	Flavonoide	(Gómez Romero, 2010)
46	Desconocido	C ₃₀ H ₄₅ O ₇ ⁻	17,42	517,31708	517,31714	0,12		Saponina	---
47	Desconocido	C ₃₀ H ₄₅ O ₆ ⁻	18,35	501,32216	501,32236	0,40		Saponina	---
48	Desconocido	C ₂₉ H ₄₁ O ₆ ⁻	19,02	485,29086	485,29108	0,45		Saponina	---

n.d: no determinado

6.9. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica

En la **Figura 18** se observa el porcentaje de inhibición del DPPH frente a diferentes concentraciones de la muestra.

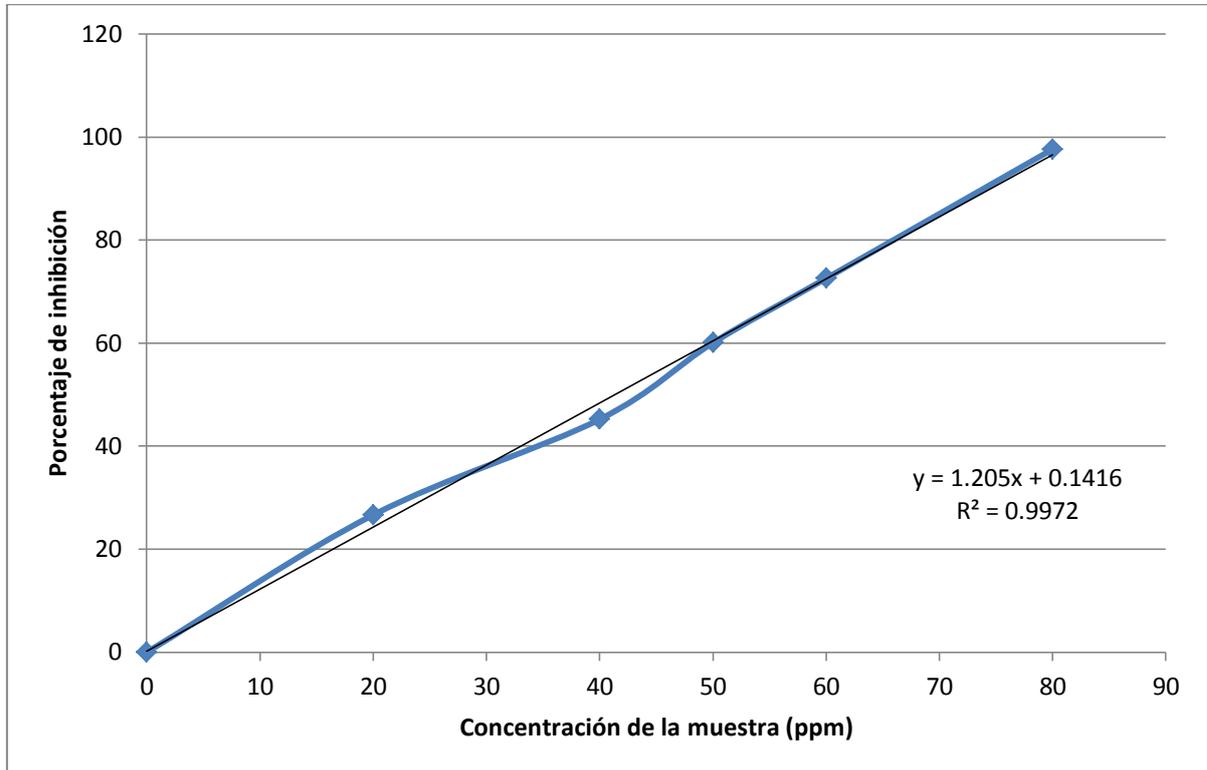


Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico hidrofílico

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Identificación de los Metabolitos del Aceite de la Semilla de Lúcumá

De los resultados obtenidos por GC-MS, se aprecia que presenta ácidos grasos libres que puede ser debido a la formación biosintética de los mismos en la planta, que emplea como precursores el acetil- y malonil-CoA, los cuales dotan de acidez característica al aceite. Por otro lado, el contenido de ácidos grasos libres también puede ser debido a la acción de la enzima lipasa, que cataliza la hidrólisis de ésteres de los acilglicéridos, esta enzima actúa en la interfase aceite-agua, donde su sitio activo es expuesto tanto a la parte hidrofóbica como a la acuosa (Badui, 2006).

Adicionalmente, se evidencia que monoésteres de ácidos grasos están presentes en el aceite; en primera instancia resultaría incongruente encontrar como metabolitos a ácidos grasos monoesterificados, ya que éstos se encuentran por lo general en forma libre o unidos a moléculas de glicerol, formando los acilglicéridos y necesitan pasar por una reacción de transesterificación para generar ácidos grasos monoesterificados, sin embargo, en trabajos anteriores se ha demostrado la presencia de estos compuestos de forma natural en las plantas (Gherman, Culea, & Cozar, 2000; Ajoku, Okwute, & Okogun 2015). Esto hace suponer que la existencia de compuestos como metil éster del ácido hexadecanoico, etil éster del ácido linoleico entre otros, presentes en el aceite, sea debido a procesos biosintéticos dentro de la planta. Por otro lado, se debe tener en cuenta que a pesar que los ácidos grasos monoesterificados presentan un porcentaje de área relativamente considerable en cada cromatograma, como se puede apreciar en las **Tabla 13**, **Tabla 14** y **Tabla 15**, cabe mencionar que están muy por debajo, en cantidad, a comparación de los ácidos grasos en forma de triacilglicéridos.

Aunque las tres fracciones del aceite (fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico) presentan compuestos diferentes, algunos de ellos son idénticos como ácidos grasos libres, ácidos grasos monoesterificados, triterpenos acíclicos y esteroides en estas tres fracciones, solo que su proporción es notablemente diferente como se puede apreciar en las **Tabla 13**, **Tabla 14** y **Tabla 15**.

La **Figura 18** muestra la estructura molecular de los metabolitos que están presentes en las tres fracciones, así como sus respectivos espectros de masas, en los cuales se muestra sus picos distintivos con los que fueron identificados.

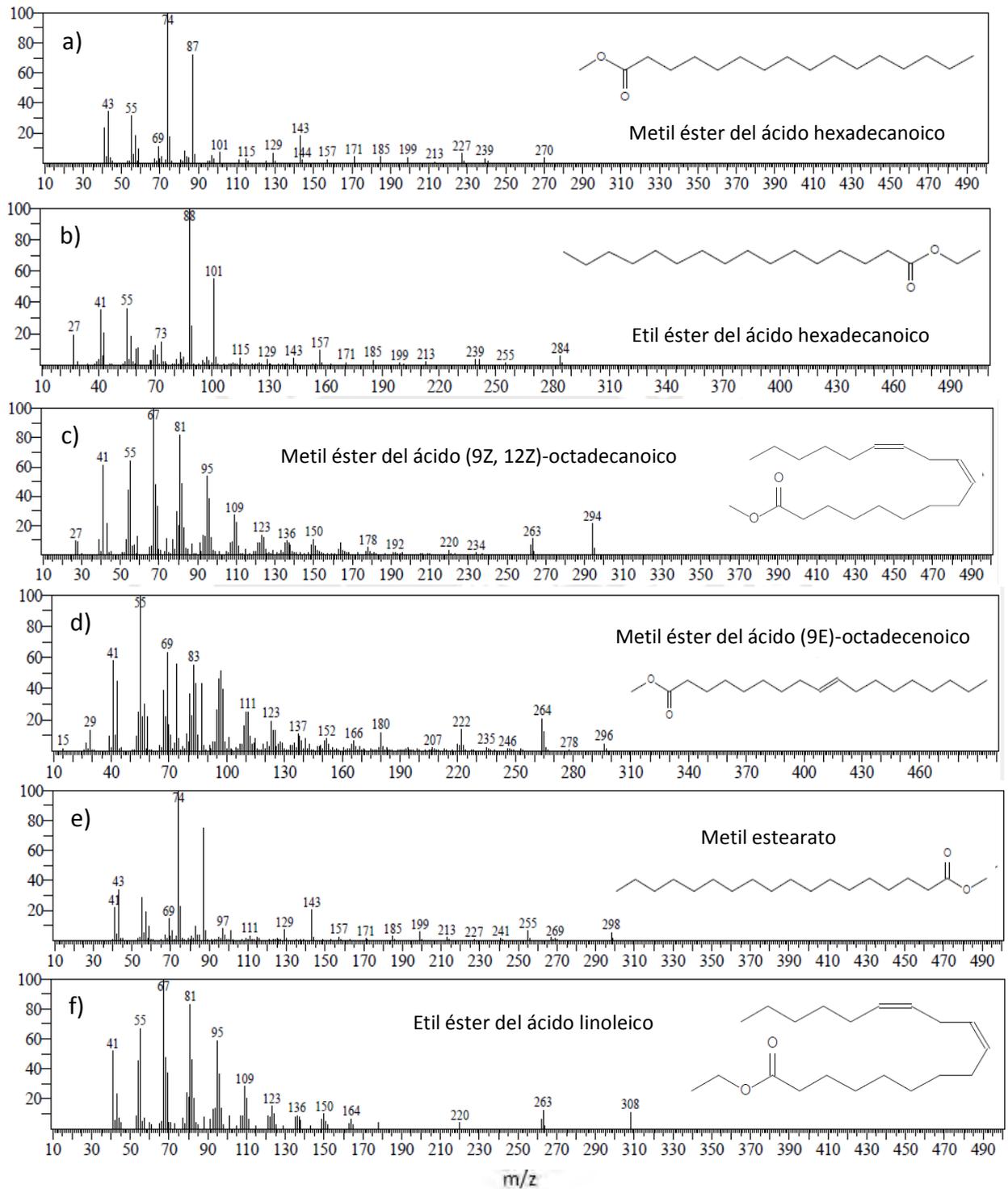


Figura 19. Metabolitos presentes simultáneamente en las tres fracciones aisladas del aceite

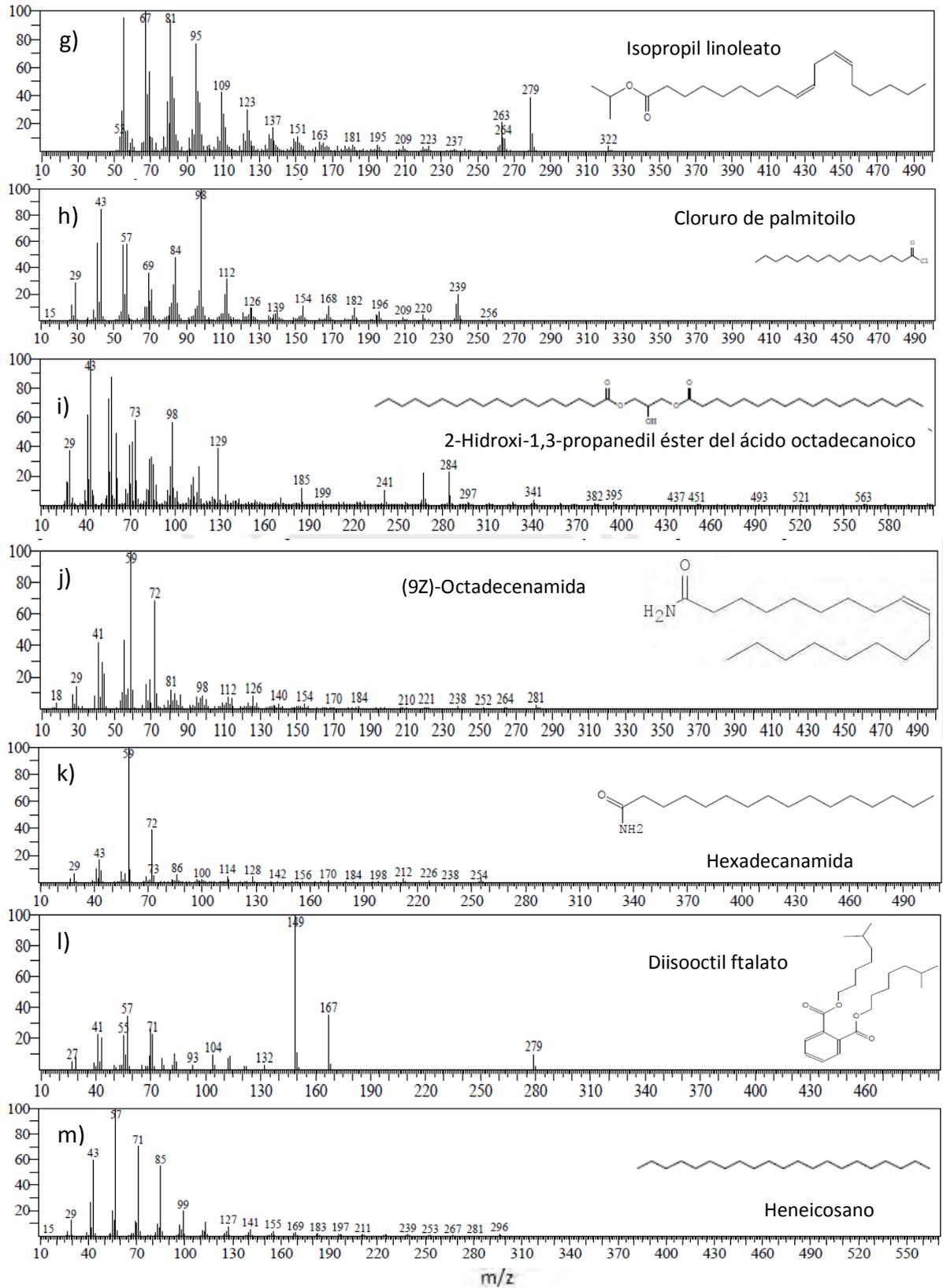


Figura 19. Metabolitos presentes simultáneamente en las tres fracciones aisladas del aceite (Continuación)

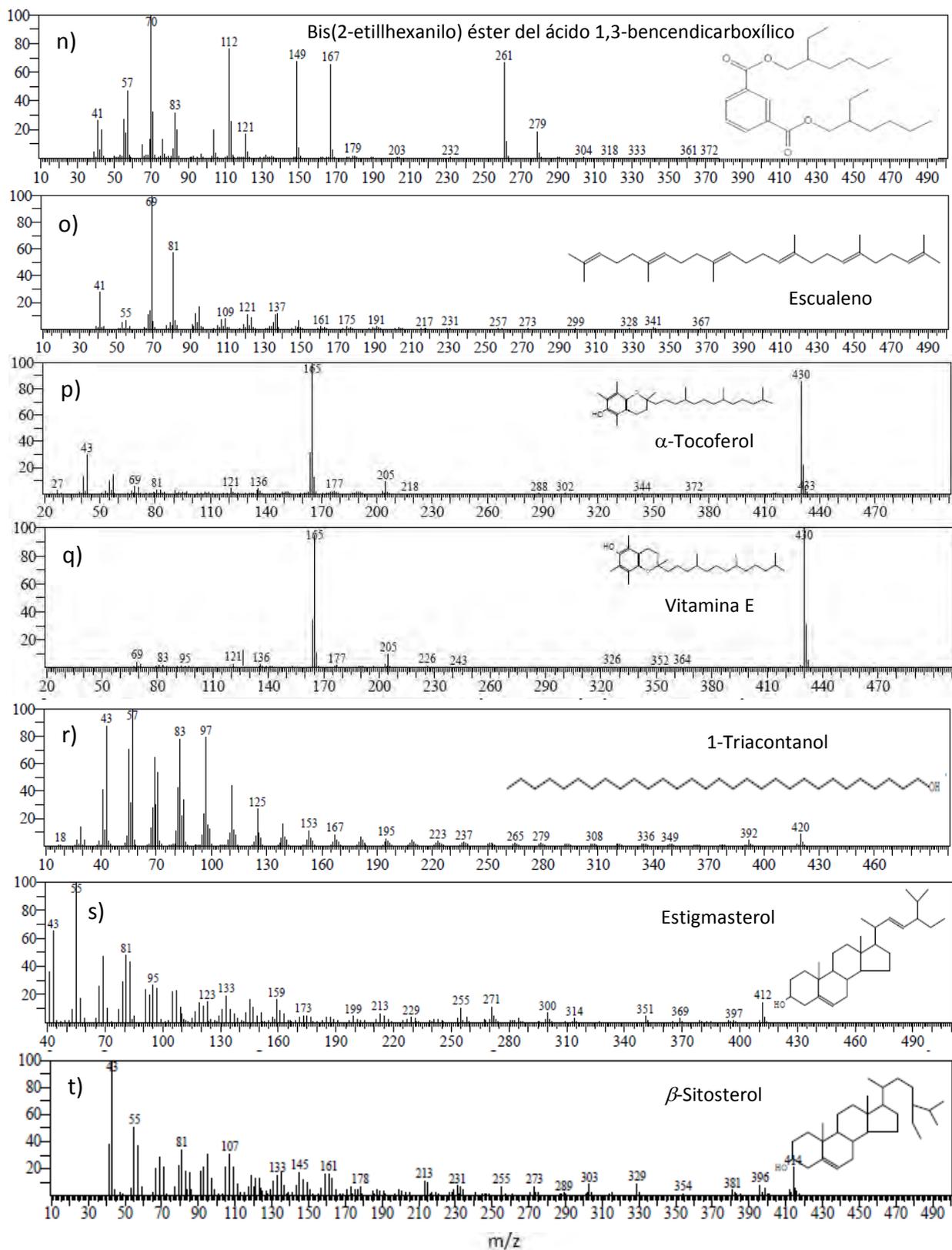


Figura 19. Metabolitos presentes simultáneamente en las tres fracciones aisladas del aceite (Continuación)

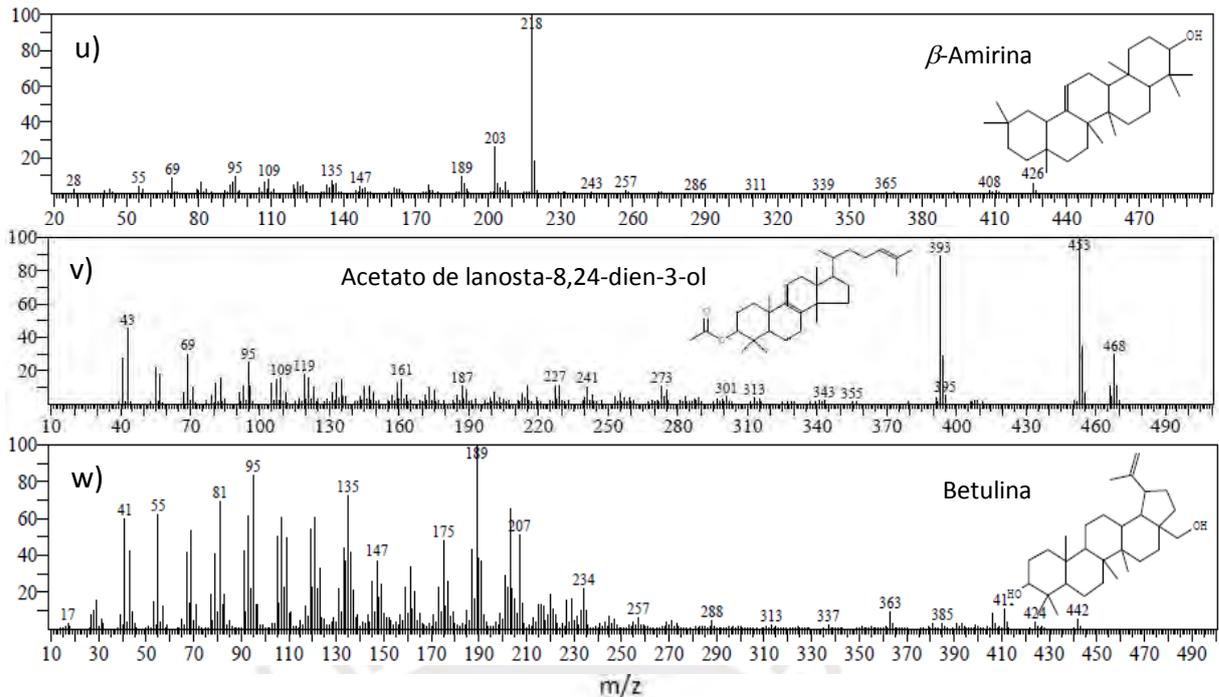


Figura 19. Metabolitos presentes simultáneamente en las tres fracciones aisladas del aceite (*Continuación*)

El aceite de semilla de lúcumo presenta como uno de sus componentes al escualeno, esto es relevante ya que un estudio sobre este metabolito reveló su capacidad de prevenir cáncer de seno, al proteger a las células mamarias normales frente al daño oxidativo del ADN (Warleta et al., 2010). Adicionalmente, se le asigna la capacidad de ser un agente de entrega de medicamentos, de esta manera, en el tratamiento de cáncer de colon con *cis*-platino complejoado con nanopartículas de escualeno, demostró ser potencialmente más citotóxico frente a células cancerosas en comparación al *cis*-platino no complejoado, debido a una mayor acumulación intracelular y plastinación de ADN, lo que comprobó el efecto del escualeno como un buen vehículo del fármaco (Kotelevets et al., 2017). Por otro lado, el escualeno en este aceite nos da un indicio de la posibilidad de encontrar metabolitos que posean el grupo ciclopentanoperhidrofenantreno en su estructura, ya que mediante la enzima cicloartenol sintasa, el óxido de escualeno es ciclado para formar este núcleo esteroidal. En efecto, las **Tabla 13**, **Tabla 14** y **Tabla 15** pone en manifiesto que metabolitos con núcleo esteroidal como estigmasterol y β -sitosterol están presentes en el aceite, estos metabolitos han sido muy estudiados anteriormente y se les asignan propiedades hipocolestémicas (Romero & Vásquez, 2012; Racette, Lin, Ma, & Ostlund, 2015).

Otros componentes presentes en el aceite y que son derivados de la ciclación del escualeno, aunque no presenten el núcleo esteroidal, son la amirina y la betulina, en la **Figura 19 u y w**, se puede observar la estructura química de cada uno con su respectivo pico distintivo de m/z de 218 y 189 respectivamente. En el caso de la amirina, este compuesto consta de dos isómeros α y β , estudios llevados a cabo con estos metabolitos destacaron su actividad anti-inflamatoria (Gupta, Bhalla, Tangri, & Bhargava, 1971; Aragao, Pinheiro, Bandeira, Lemos, & Viana, 2008; Melo et al., 2011), asociado al hecho que la β -amirina impide la sobreexposición de prostaglandina E2 (PGE2), ciclooxigenasa 2 (COX-2) e interleucina 6 (IL-6) mediante la inhibición de la traslocación del factor nuclear kappa beta (factor de transcripción con un importante rol en el sistema inmune) del citoplasma al núcleo cuando se ha producido la inflamación estimulada por lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas (Krishnan, Mathew, Vijayalakshmi, & Helen, 2014).

Por otro lado, se publicó un trabajo en el cual habían estudiado a la betulina, un triterpenoide con un núcleo de anillo pentacíclico (estructura lupano) y encontraron que este metabolito presentaba la capacidad de reducir las placas ateroscleróticas (Tang et al., 2011). Además de ello, la presencia de tocoferoles en el aceite lo dota de propiedades antioxidantes, ya que en conjunto con los tocotrienoles conforman la vitamina E.

De lo expuesto anteriormente podemos aseverar que el aceite de semilla de lúcuma (obtenidas durante la etapa de cosecha en el Valle de Chilca), no solo posee ácidos grasos, sino que además presenta una amplia gama de metabolitos entre terpenos, fitoesteroles, tocoferoles, entre otros. Esto contrasta con un trabajo que se llevó a cabo con semillas de lúcuma, en el cual manifestaron que el aceite obtenido fue una mezcla de ácidos grasos en un porcentaje de 99,7 %, es decir casi en su totalidad, cuyos constituyentes mayoritarios eran los ácidos linoleico y oleico (Rojo et al., 2010). Aquí tenemos una gran contradicción, sin embargo debemos tener en cuenta que la manera como trataron la muestra en el trabajo mencionado fue distinto al del presente, puesto que ellos transesterificaron la muestra y analizaron el producto como un todo perteneciente al aceite y en ese proceso pudo haberse eliminado metabolitos como fitoesteroles entre otros. Adicionalmente, se debe considerar que el contenido de metabolitos en frutas varía de acuerdo al grado de madurez, diferencias

genéticas, condiciones medioambientales y procesamiento (Deighton, Brennan, Finn, & Davies, 2000; da Silva Pinto, Lajolo, & Genovese, 2008).

7.2. Determinación Cuantitativa de Fitoesteroles Presentes en el Aceite

Los patrones de fitoesteroles (ergosterol, estigmasterol y β -sitosterol) presentaron un tiempo de retención relativamente lejano uno del otro, por ello fue posible realizar una mezcla de estos tres para llevar a cabo el análisis cuantitativo en el aceite en sus tres diferentes fracciones (fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico). El análisis cuantitativo se realizó a las tres fracciones con la finalidad de asegurar que los fitoesteroles sean cuantificados en su totalidad, esto se puede afirmar ya que las fracciones fueron obtenidas mediante el uso de solventes con una polaridad decreciente de forma secuencial.

De la **Tabla 17** se puede observar que de las tres fracciones, la que tiene menor peso es la fracción hexánica 1, sin embargo hay que enfatizar que también es la que presenta una mayor cantidad de β -sitosterol. Para analizar esto recordemos que esta fracción se obtuvo cuando se extrajo con hexano, la parte lipofílica del extracto metanólico, se puede asumir que el grupo hidroxilo de la estructura del β -sitosterol interactuó con el metanol durante la maceración de la semilla, lo que condujo a la presencia de este metabolito en dicho extracto y posteriormente en la fracción hexánica 1.

La fracción hexánica 1 (fracción lipídica del extracto metanólico) es la que posee la menor cantidad de estigmasterol mientras que el extracto hexánico (obtenido del residuo 2) presenta el mayor contenido de este metabolito. Esto se puede deber a la naturaleza del estigmasterol, cuya estructura presenta un doble enlace que le da un carácter más apolar.

Se determinó que el aceite de semilla de lúcumo presentó mayor cantidad de β -sitosterol ($851,49 \pm 1,29$ mg/100 g aceite) que de estigmasterol ($75,42 \pm 1,02$ mg/100 g de aceite), este resultado concuerda con lo mencionado en estudios anteriores, los cuales indican que el β -sitosterol es el componente mayoritario entre los fitoesteroles (Palou Oliver, 2005; Lagarda, García-Llatas, & Farré, 2006). Adicionalmente, no se encontró ergosterol, este resultado es respaldado por el hecho que las plantas vasculares generan en su biosíntesis

β -sitosterol, estigmasterol, entre otros fitosteroles, pero no producen ergosterol ya que este metabolito es generado por plantas avasculares como las algas (Zhou et al., 2004).

Adicionalmente, podemos contrastar la cantidad de fitosteroles obtenida en el aceite de semilla de lúcuma con estudios realizados en aceites de diferentes semillas. Así, la cantidad encontrada en el aceite de semilla de lúcuma en este estudio es mayor que las registradas en otros trabajos, cuando emplearon sachá inchi de Perú, reportaron una cantidad de 75,49 y 74,62 mg/100 g aceite para estigmasterol y β -sitosterol respectivamente (Muñoz et al., 2010); con la semilla de uva de Brasil, registraron 32,57 y 91,94 mg/100 g de aceite para estigmasterol y β -sitosterol respectivamente (Shinagawa, Santana, Araujo, Purgatto, & Mancini-Filho, 2017). Otro estudio llevado a cabo con diferentes frutos secos, comúnmente consumidos, reportaron cantidades de estigmasterol y β -sitosterol respectivamente, de 3,81 y 99,12 mg/100 g de aceite de avellana; 16,3 y 136,33 mg/ 100 g de aceite de maní; 5,17 y 207,17 mg/100 g de aceite de almendra (Maguire, O'Sullivan, Galvin, O'Connor, & O'Brien, 2004), como se puede observar, estas cantidades son menores en comparación de lo obtenido en el presente estudio.

7.3. Determinación Cuantitativa de FAMES Presentes en el Aceite

El análisis cuantitativo en este estudio se realizó a las tres diferentes fracciones del aceite a fin de asegurar que los ácidos grasos sean cuantificados en su totalidad, se encontró ácido palmítico, esteárico, (9E)-octadecenoico y oleico, quienes unidos al glicerol presentan la mayor parte de los triacilglicéridos presentes en el aceite de semilla de lúcuma.

De las tres fracciones del aceite, fracción hexánica 1, fracción hexánica 2 y extracto hexánico, la última es la que registra menor cantidad de ácidos grasos; esto es debido a que la primera maceración con metanol y la segunda maceración con acetona, ambas hechas a la misma muestra de semillas de lúcuma de manera secuencial, extrajeron la mayor parte de ácidos grasos. Además, entre la fracción hexánica 2 y la fracción hexánica 1, la primera presentó la mayor cantidad de ácidos grasos ya que esta representa más de la mitad del total del aceite de la semilla de lúcuma. Adicionalmente, en este estudio se encontró que de los ácidos grasos que conforman los triacilglicéridos en el aceite, el ácido oleico es el que está presente en mayor cantidad con 13,586 g/100 g de aceite, seguido del ácido (9E)-octadecenoico,

(6,845 g/100 g aceite), palmítico (5,443 g/100 g aceite) y esteárico (2,122 g/100 g aceite), todos en conjunto conforman alrededor de un 30 % en contenido del aceite.

La cantidad de ácidos grasos que conforman los triacilglicéridos en el aceite de semilla de lúcuma en este estudio es inferior al registrado en el trabajo llevado a cabo por Rojo et al. (2010) en cual menciona que la cantidad de ácidos grasos en el aceite de semilla de lúcuma es aproximadamente el 99 %.

7.4. Screening Fitoquímico de la Fracción Metanólica del Extracto

En la **Tabla 20** se puede apreciar los reactivos empleados para la identificación cualitativa del tipo de metabolitos presentes en el extracto metanólico hidrofílico.

La detección de saponinas se evidenció cuando se agitó la solución de la muestra y apareció espuma que se mantuvo durante más de 3 minutos. La presencia de flavonoides se determinó con la prueba de Shinoda (limaduras de magnesio y ácido clorhídrico concentrado) al observar una coloración naranja que poco a poco se fue intensificando más.

En el extracto metanólico hidrofílico también se pudo detectar la presencia de cumarinas ya que al papel Whatman humedecido en NaOH 10 %, se le colocó un poco de esta muestra y se observó fluorescencia amarillenta al emplear lámpara UV a 365 nm. Para la determinación de taninos se empleó solución de gelatina, en la cual en contacto con la muestra se pudo observar un precipitado blanco.

Por otro lado, cuando se agregó solución de acetato de plomo a la muestra no se formó precipitado marrón, lo que demuestra que no hay betalaínas, no apareció precipitado de color azul-verdoso o grisáceo, lo cual confirma que no hay antocianinas. Otro tipo de metabolitos que no están presentes en esta muestra son las quinonas, pues cuando se le realizó la prueba de Bornträger no se evidenció una coloración rosada en la parte bencénica.

7.5. Determinación de la Cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales de la Fracción Metanólica

De lo reportado en las **Tabla 21** y **Tabla 22** se observa que hay una mayor cantidad de fenoles totales ($1130,63 \pm 11,89$ mg EAG/100 g de semilla de lúcumá seca) que de flavonoides totales ($661,23 \pm 4,73$ mg quercetina/100 g de semilla de lúcumá seca), esto es congruente ya que los fenoles totales cuantificados son un conjunto muy grande que abarcan compuestos que en su estructura poseen anillo bencénico sustituido con uno o más grupos hidroxilo y pueden contener a metabolitos como flavonoides, taninos, antocianinas entre otros, mientras que la prueba de flavonoides totales cuantifica solo compuestos flavonólicos como flavonas, flavanonas, flavonoles, etc.

No hay estudios en los que se haya realizado extracciones hidrofílicas de semilla de lúcumá; así que la cantidad de fenoles totales que se encontró en este extracto solo se puede comparar con estudios que se han llevado a cabo con semillas de otras frutas. De esta manera, en el presente trabajo se determinó que la semilla de lúcumá presenta una gran cantidad de fenoles totales, esta es mayor que la presente en semillas de mandarina (20,99 a 28,72 mg EAG/ 100 g semilla), de naranja (19,84 a 23,04 mg EAG/ 100 g semilla) y de limón (15,27 a 21,23 mg EAG/ 100 g semilla) reportado por İnan, Özcan, & Aljuhaimi (2017), pero es menor que la registrada en semillas de manzana con 1744,00 mg EAG/ 100 g semilla (Xu et al., 2016) y que en semillas de uva con 10520,00 mg EAG/ 100 g semilla (Da Porto, Porretto, & Decorti, 2013).

El alto contenido de compuestos fenólicos totales presente en el extracto hidrofílico de la semilla de lúcumá nos haría pensar que puede presentar una gran capacidad antioxidante, sin embargo, una alta cantidad de este tipo de compuestos no es un determinante, para ello es necesario saber cuáles son los compuestos fenólicos que están presentes.

7.6. Determinación del Perfil Metabolómico de la Fracción Metanólica

Con el uso del UHPLC-DAD- ESI-MS/MS, en el extracto metanólico hidrofílico de la semilla de lúcumá se pudieron detectar metabolitos primarios y secundarios, mediante sus valores de masa ionizada representativa y el uso de bibliografía que reporte el mismo valor de la fracción ionizada para el mismo compuesto. Para aquellos que no se encontraron en

bibliografía se procedió a elucidar su posible estructura basadas en la fracción de masa ionizada que nos reportó el equipo.

Como metabolitos primarios, encontrados en el extracto metanólico hidrofílico tenemos aminoácidos libres como asparragina, leucina, ácido piroglutámico, ácido glutámico, tirosina, triptófano y fenilalanina, este último es importante ya que da un indicio de la posibilidad de la presencia de flavonoides en el extracto, ya que la fenilalanina es un precursor de este tipo de metabolito en su ruta biosintética, también se corrobora con la prueba que se hizo de flavonoides totales. Adicionalmente, como metabolitos primarios, se encontraron ácidos orgánicos como ácido quínico, ácido cítrico, ácido isocítrico y ácido succínico. Cada uno de estos aminoácidos y ácidos orgánicos con sus respectivas masas ionizadas fueron registrados en la **Tabla 23**.

La sacarosa y la uridina 5-metil éster de ácido oxiacético (nucleósido) son metabolitos primarios también encontrados en este extracto, el primero fue identificado por la masa ionizada de su fragmentación registrada en la bibliografía, por otro lado como el segundo no ha sido reportado, se realizó una elucidación estructural como molécula tentativa basándonos en la masa ionizada correspondiente a sus fragmentos registrados por el equipo ($C_4H_3O_2N_2^-$, $C_4H_3O_3N_2^-$, $C_{12}H_{15}O_9N_2^-$). Tanto el ión molecular de uridina 5-metil éster de ácido oxiacético como sus fragmentos ionizados con sus respectivas masas se puede observar en la **Figura 20**.

Como metabolitos secundarios presentes en este extracto se pudieron encontrar una gran variedad de flavonoides, corroborando el alto valor que se obtuvo en la prueba de flavonoides totales. Compuestos flavonólicos aglicosidados como galocatequina, catequina, epicatequina, taxifolina, miricetina, quercetina, eridictiol chalcona, apigenina y naringenina fueron identificados por la masa ionizada de sus fragmentaciones registradas en la bibliografía y los flavonoides 5,7,3',4'-tetrahydroxi-flavan-3-ol y galoepicatequina-3-O-galato, no se encontraron en bibliografía y se elucidaron estructuralmente cada uno como molécula tentativa, teniendo en cuenta la masa ionizada correspondiente a sus fragmentos obtenidos por el equipo; $C_6H_5O_3^-$ y $C_{15}H_{11}O_6^-$ para 5,7,3',4'-tetrahydroxi-flavan-3-ol y $C_6H_5O_3^-$, $C_7H_5O_5^-$ y

$C_{22}H_{17}O_{11}^-$ para galoepicatequina-3-O-galato. Los fragmentos ionizados de estos metabolitos con sus respectivas masas se representan en la **Figura 21 y Figura 22** respectivamente.

Algunos de los compuestos flavonólicos, presentes en el extracto metanólico hidrofílico, como galocatequina, catequina, mircetina y galocatequina-3-O-galato coinciden con los reportados en un estudio anterior que se hizo a la pulpa de tres especies del género *Pouteria* (Ma, Yang, Basile, & Kennelly, 2004).

Además este extracto también presenta flavonoides glicosidados como vitexina, galocatequina-hexosa, mircetina ramnósido, floretín hexósido. La galocatequina-hexosa se encontró a diversos tiempos de retención, lo cual implica que se trataría de isómeros configuracionales. De forma general la **Figura 23** muestra los fragmentos ionizados de la galocatequina-hexosa con sus respectivas masas ($C_6H_5O_3^-$, $C_7H_5O_3^-$, $C_8H_7O_4^-$ y $C_{21}H_{23}O_{12}^-$), considerando que no se encontró en bibliografía.

Se encontraron también otros metabolitos secundarios como 2,4-dihidroxifenil metil cetona ($C_6H_5O_2^-$, $C_7H_5O_3^-$ y $C_8H_7O_3^-$), etilgalato ($C_6H_5O_3^-$ y $C_9H_9O_5^-$), metoxipirogalol ($C_6H_5O_3^-$ y $C_7H_7O_4^-$). Todos estos compuestos con sus respectivos fragmentos ionizados se detallan en las **Figura 24, Figura 25 y Figura 26** respectivamente.

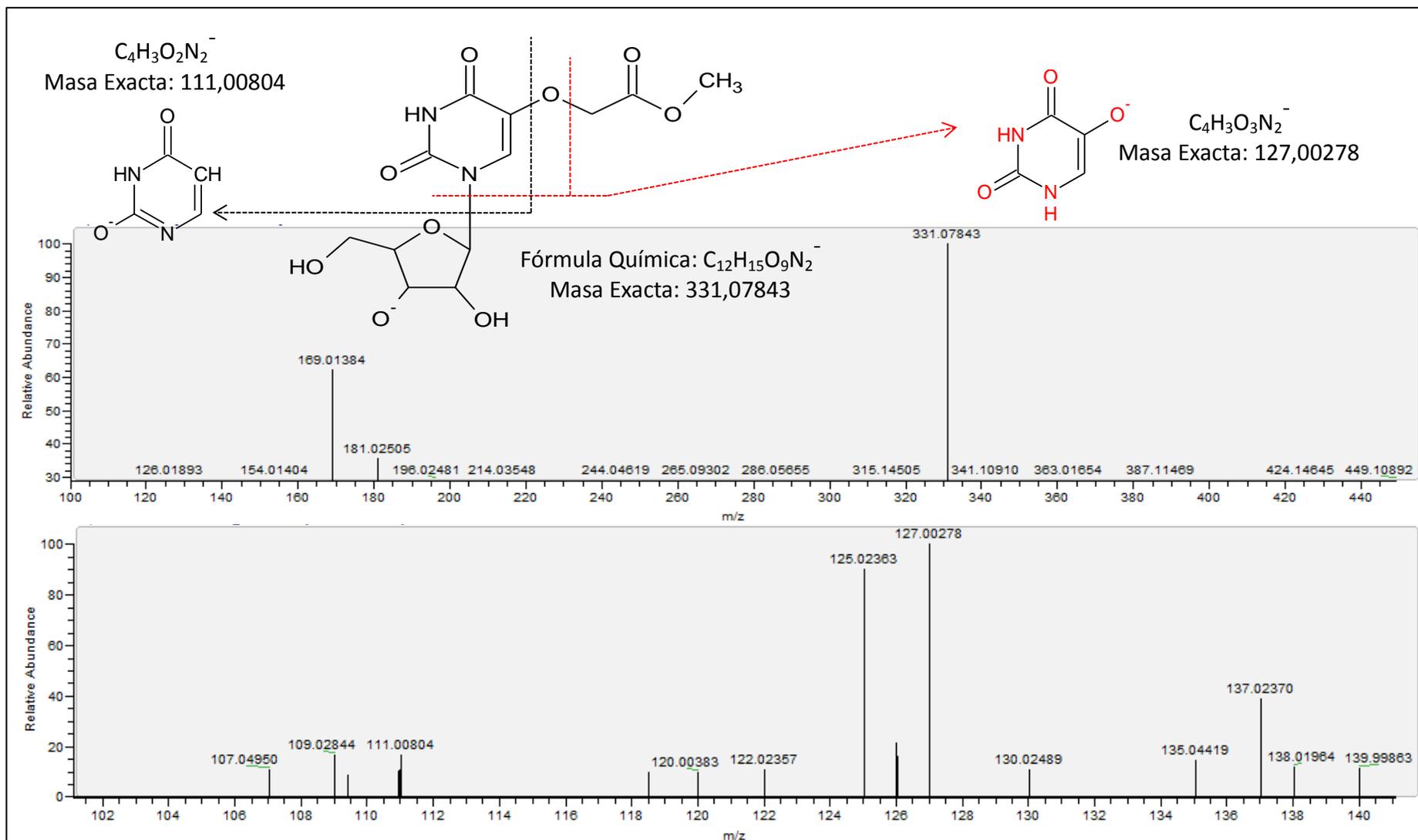


Figura 20. Uridina 5-metil éster del ácido oxiacético y sus fragmentos ionizados

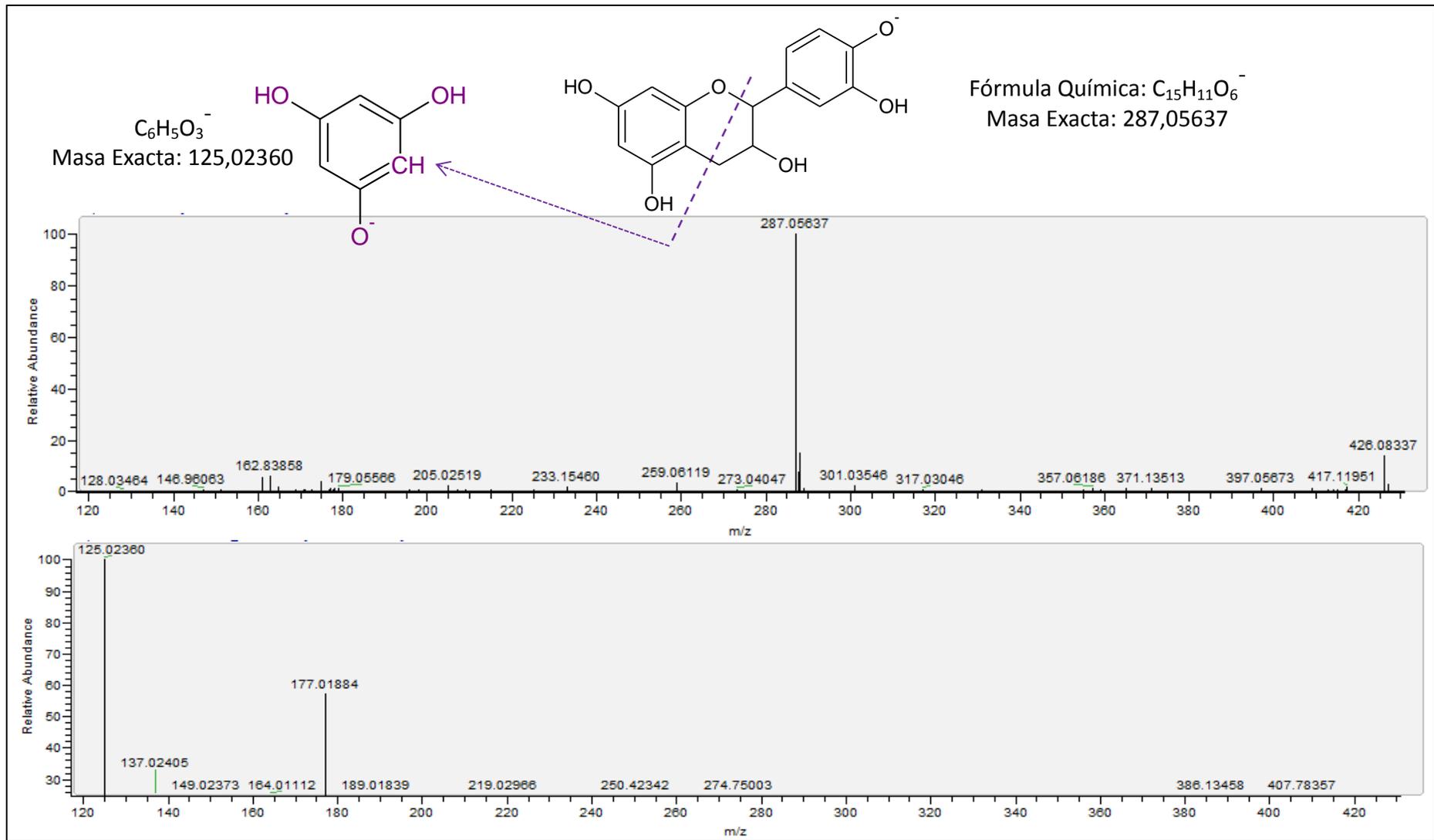


Figura 21. 5,7,3',4'-tetrahydroxi-flavan-3-ol y sus fragmentos ionizados

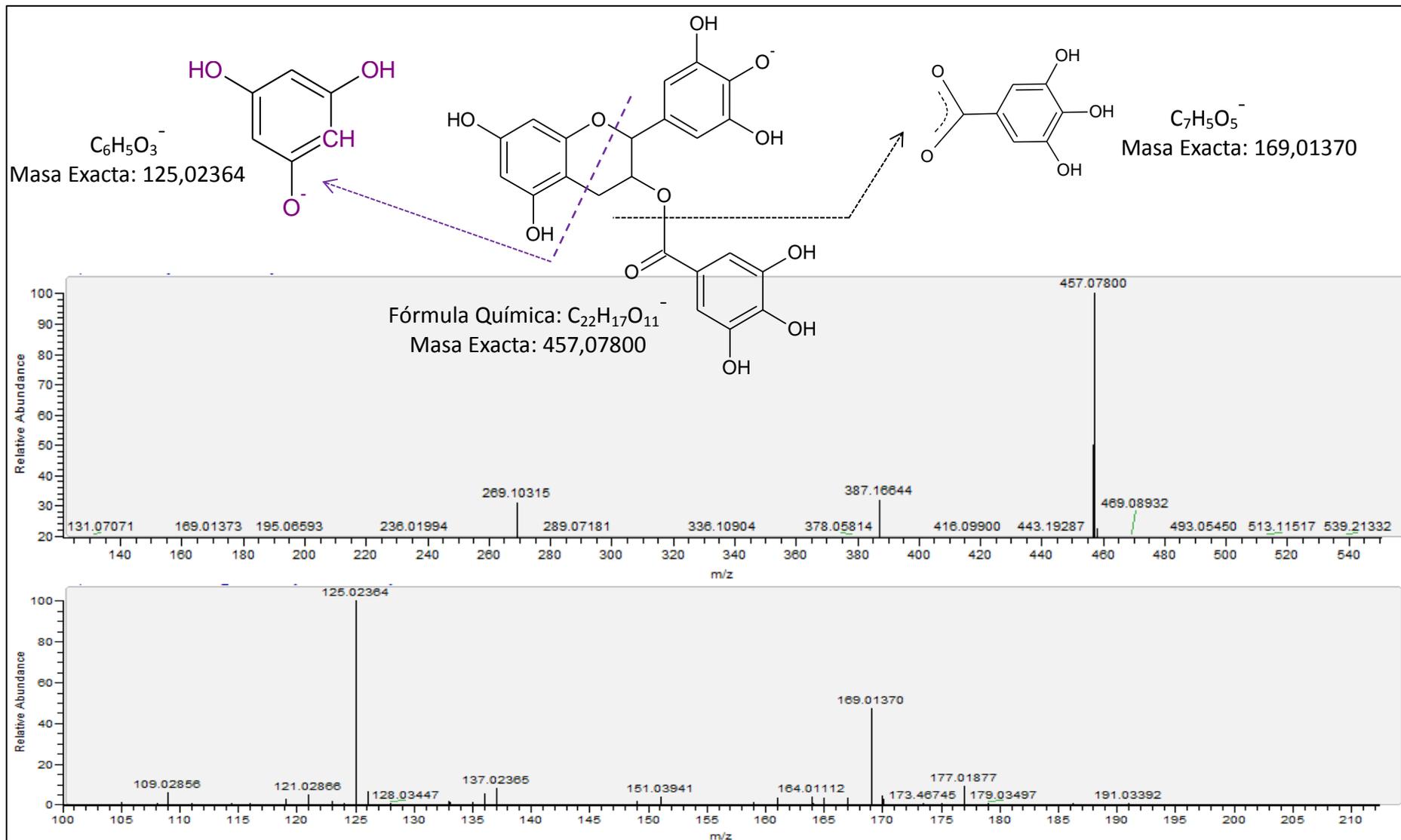


Figura 22. Galloepicatequina-3-O-galato y sus fragmentos ionizados

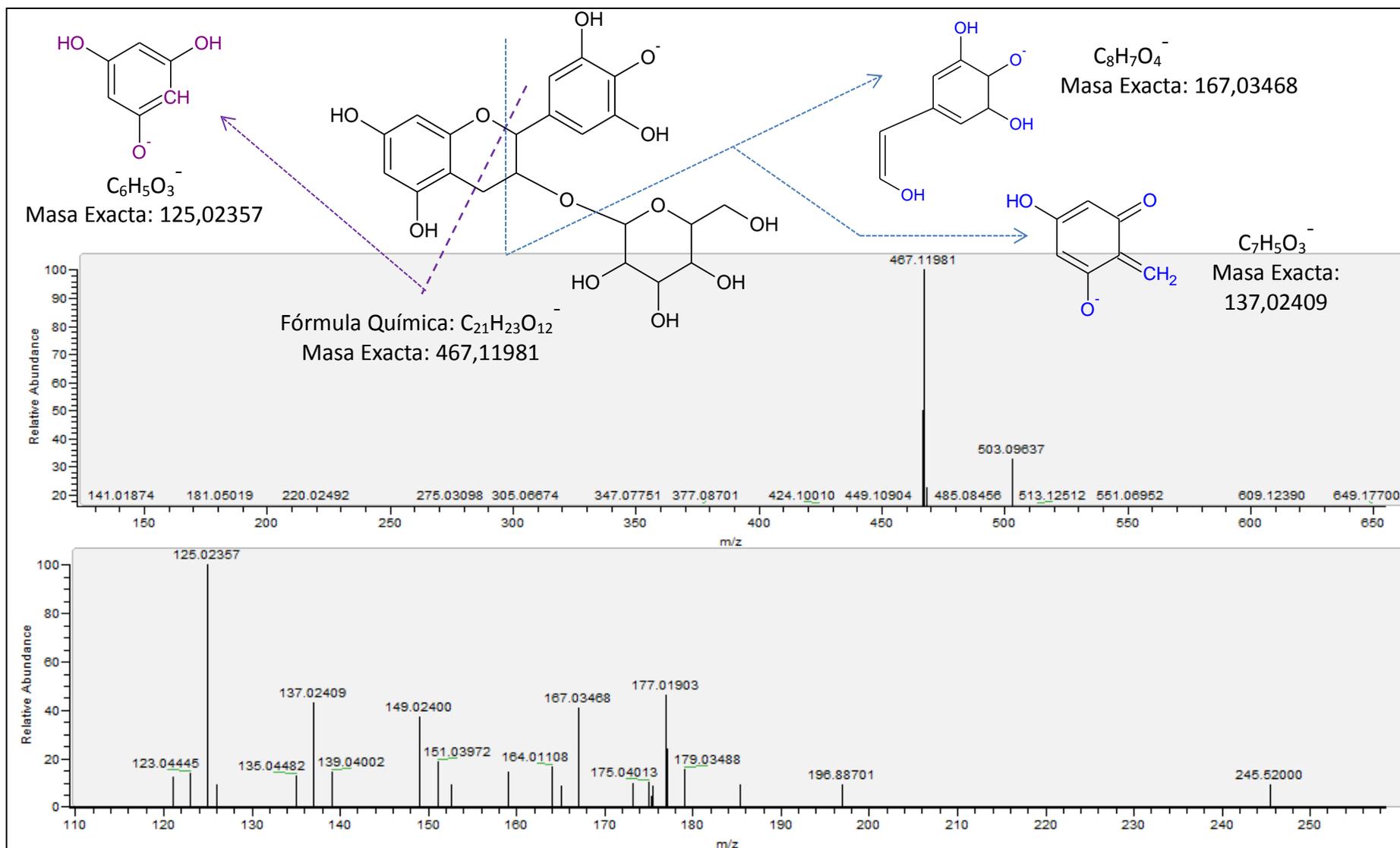


Figura 23. Galloepicatequina-hexosa y sus fragmentos ionizados

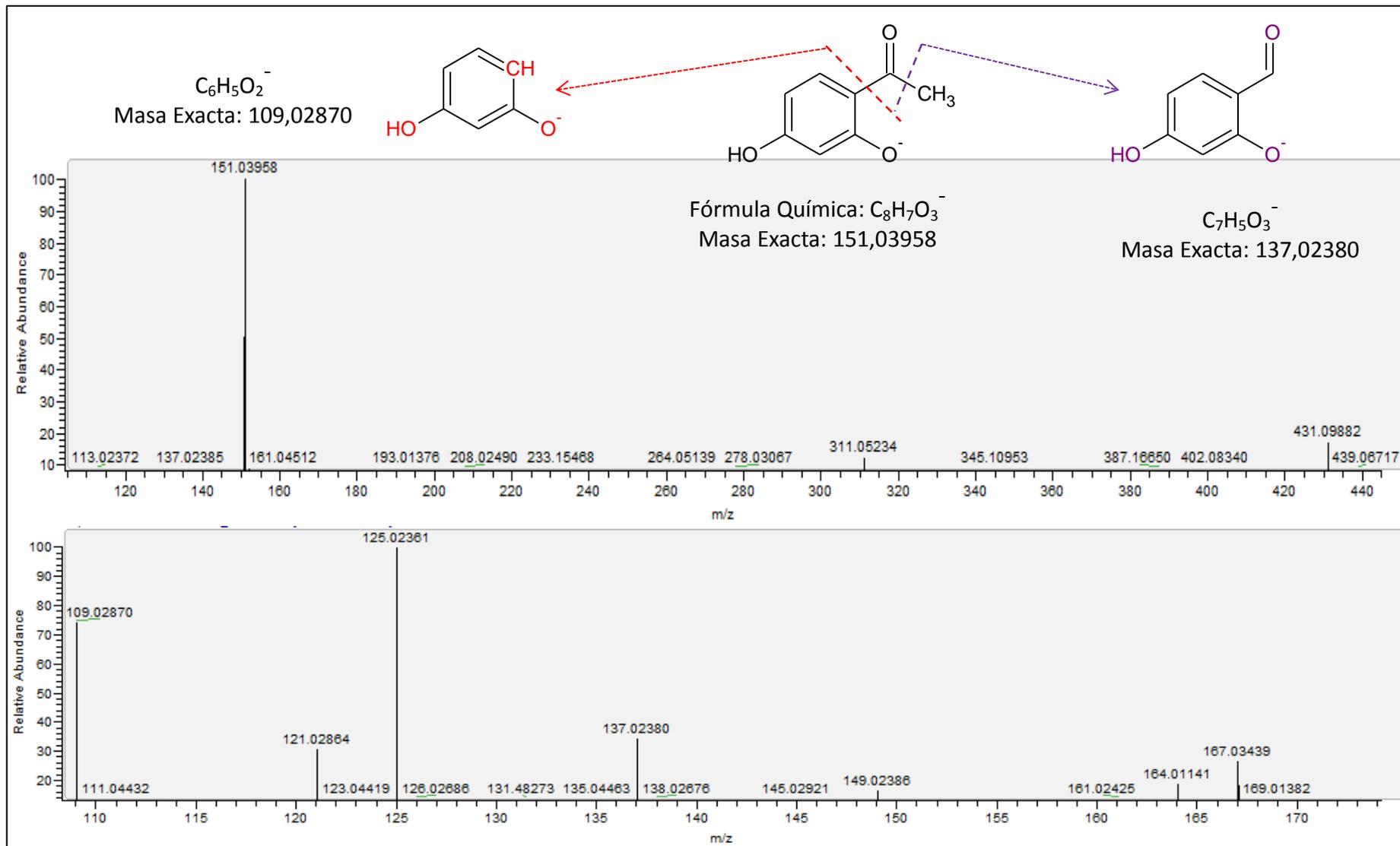


Figura 24. 2,4-dihidroxifenil metil cetona y sus fragmentos ionizados

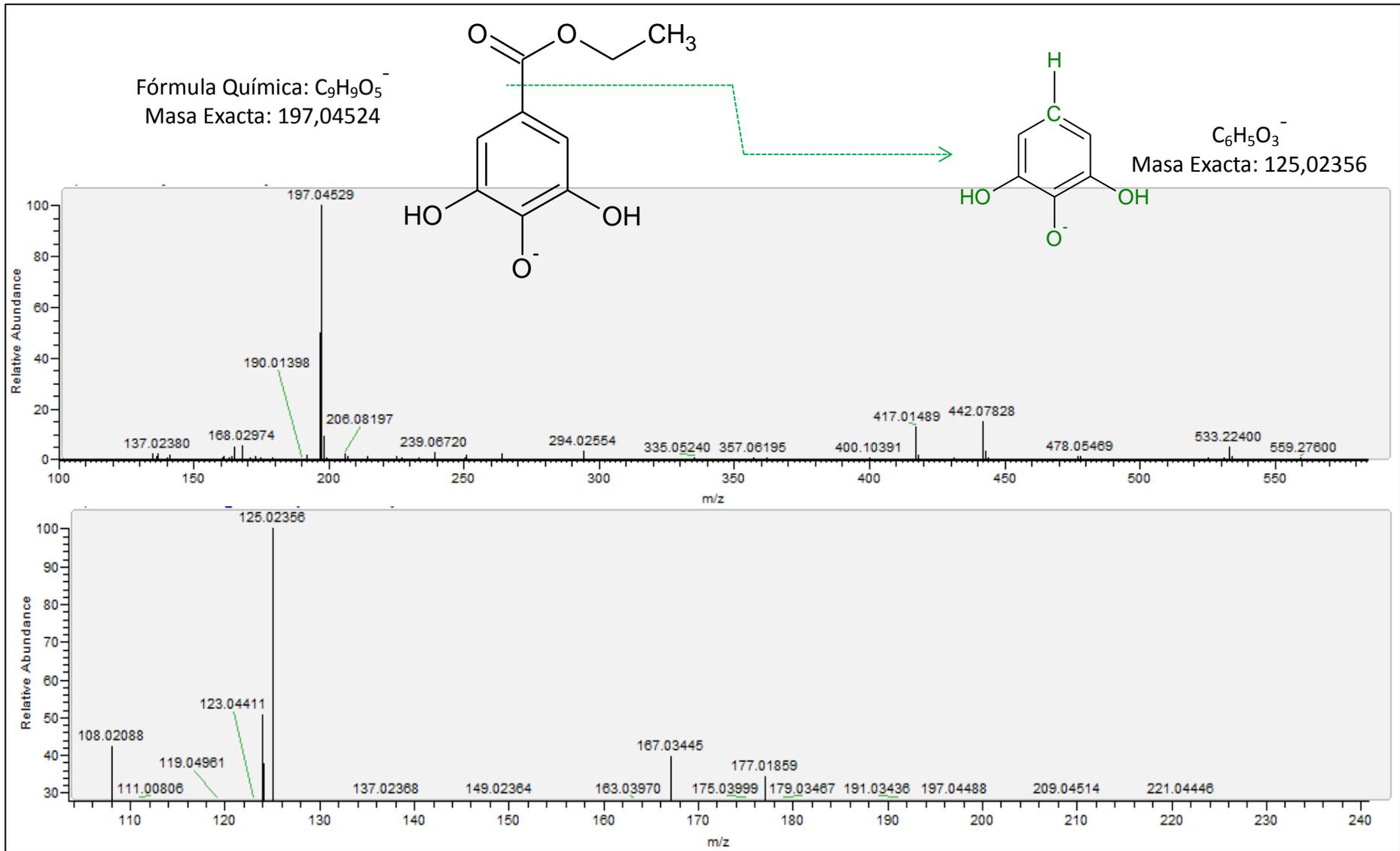


Figura 25. Etalgalato y sus fragmentos ionizados

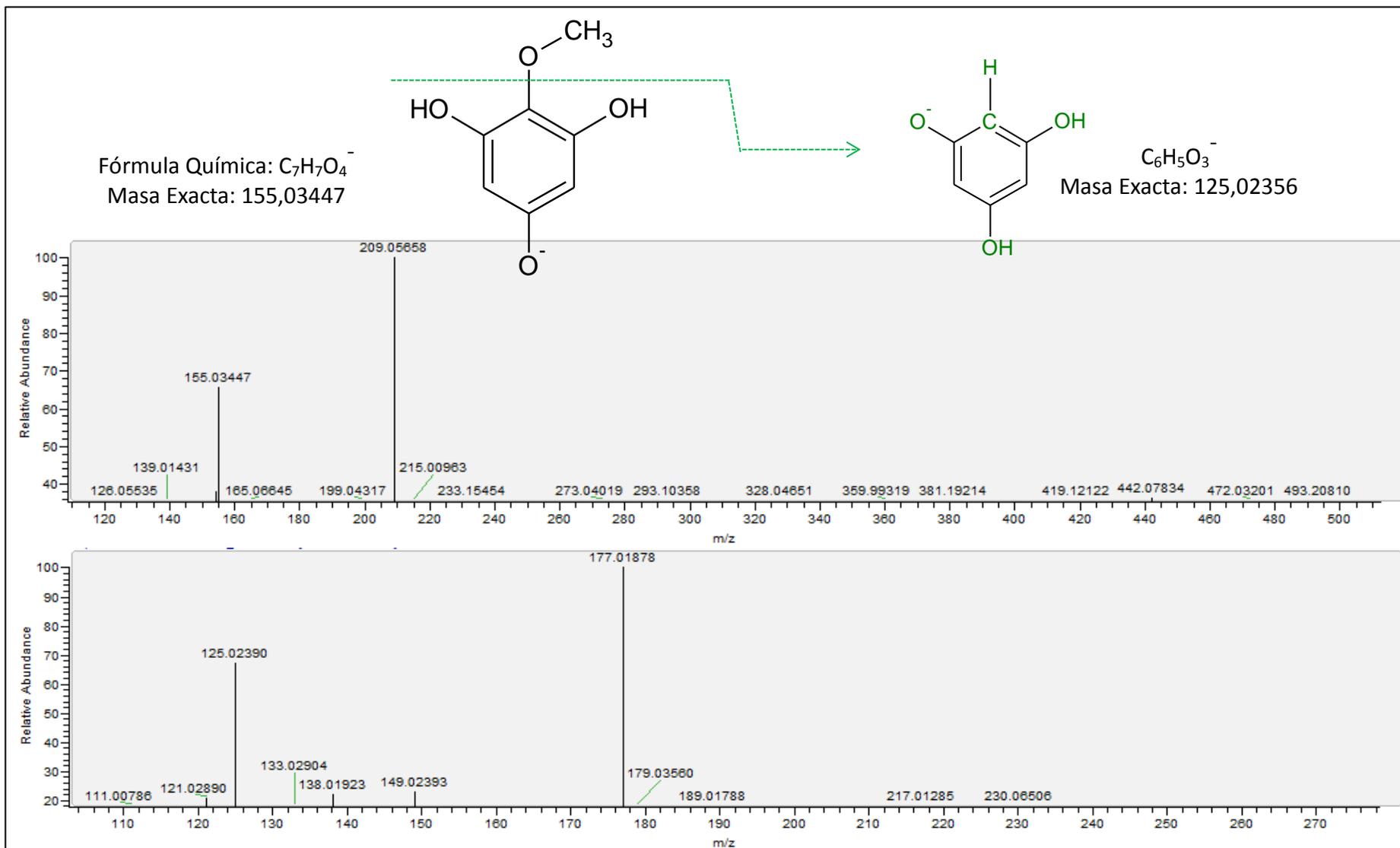


Figura 26. 2-metoxipirogalol y sus fragmentos ionizados

7.7. Determinación de la Actividad Antioxidante de la Fracción Metanólica

Por regresión lineal de la curva de la **Figura 18** se obtuvo que el extracto metanólico hidrofílico posee una concentración inhibitoria media (IC_{50}) a $41 \mu\text{g/mL}$, lo que nos muestra una moderada actividad antioxidante del extracto hidrofílico, esto se puede deber al tipo de compuestos fenólicos presentes, los cuales están contenidos en la **Tabla 23**. En efecto, metabolitos como ácido gálico, galocatequina, miricetina y catequina dotarían de gran capacidad antioxidante al extracto (Ma et al., 2004).

El valor de IC_{50} obtenido representa una capacidad antioxidante nada despreciable, sin embargo debemos tener en cuenta que la presencia de flavonoides glicosidados en el extracto, disminuyen el poder antioxidante porque el azúcar unido al grupo OH del anillo bencénico le impide donar el protón para estabilizar a alguna especie radicalaria.



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del trabajo realizado con las semillas de lúcuma obtenidas durante la etapa de cosecha del fruto en el valle de Chilca, se concluye:

- La cantidad promedio de aceite presente en las semillas no es tan grande respecto al obtenido de la semilla de uva u otras fuentes reportadas, el porcentaje en masa fue 4,71 %, mientras que el rendimiento obtenido para el extracto metanólico hidrofílico fue de 17,94 %.
- El aceite de esta semilla no solamente posee ácidos grasos como oleico, palmítico, esteárico y octadecenoico, los cuales conforman un 30 % del contenido del aceite, sino que además presenta otros metabolitos como ácidos grasos monoesterificados, tocoferoles, compuestos esteroidales, entre otros. Esto contrasta con lo reportado en un trabajo realizado anteriormente con semilla de lúcuma.
- A pesar que la cantidad de aceite en la semilla es pequeña, el contenido de fitosteroles de este aceite es muy grande, con un cantidad de β -sitosterol y estigmasterol de $851,49 \pm 1,29$ y $75,42 \pm 1,02$ mg/100 g de aceite respectivamente, sobrepasa por mucho a la cantidad de fitosteroles reportada en trabajos realizados con otras semillas.
- La presencia de compuestos con grupos fenólicos en el extracto metanólico hidrofílico, es considerablemente alta, así el contenido de fenoles totales es de $1130,63 \pm 11,89$ mg EAG/100 g de semilla seca y el de los flavonoides totales es $661,23 \pm 4,73$ mg quercetina/100 g de semilla seca.
- En perfil metabolómico del extracto metanólico hidrofílico se encontró no solo aminoácidos y ácidos orgánicos, sino que además se identificaron moléculas con anillo fenólico en su estructura como taninos y flavonoides, entre los cuales podemos mencionar: ácido gálico, pirogalol, epicatequina, galocatequina, galoepicatequina 3-O-galato, quercetina, mircetina, apigenina, entre otros. La presencia de estos compuestos corrobora la relativamente alta cantidad de fenoles y flavonoides totales.

- El extracto metanólico hidrofílico posee una actividad antioxidante moderada, ya que presenta una concentración inhibitoria media con 41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto, lo cual es fundamentado por el tipo de metabolitos encontrados.

De lo expuesto anteriormente se asevera que, las semillas de lúcuma obtenidas de Chilca son residuos agroindustriales que se pueden aprovechar ya que su aceite es fuente de tocoferoles, amirina, caroteno y tiene la ventaja de poseer una mayor cantidad de fitoesteroles que los aceites de frutos secos comerciales, además de tener una amplia gama de compuestos fenólicos en su extracto.

Por otra parte este trabajo, al ser relativamente novedoso, direcciona a realizar más estudios con la semilla de lúcuma, con énfasis en que por ejemplo:

- Se puede llevar a cabo extracciones con fluidos supercríticos o con líquidos iónicos, de esta manera no solo se emplearían métodos verdes para la extracción, sino que además permitiría verificar cuál es el más idóneo en base a sus resultados.
- Sería interesante realizar más pruebas biológicas tales como citotoxicidad del aceite o debido a la presencia de flavonoides en extracto metanólico hidrofílico, evaluar su actividad gastroprotectora, antitumoral entre otras y compararlas con las de otras fuentes biológicas.
- Se puede buscar aplicaciones a los extractos obtenidos, por ejemplo el uso de algunos de los compuestos encontrados, se pueden encapsular en algún polímero natural y ser empleados ya sea como aditivo alimenticio o como fármaco de liberación controlada.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Reidah, I. M., Contreras, M. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *Journal of Chromatography A*, *1313*, 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.020>
- Aguilar, D. (2015). *Lucuma as an exotic high quality fruit imported into Portugal and the UE*. Recuperado a partir de <https://run.unl.pt/handle/10362/15777>
- Ajoku, G. A., Okwute, S. K., & Okogun, J. I. (2015). Isolation of Hexadecanoic Acid Methyl Ester and 1,1,2-Ethanetricarboxylic Acid- 1-Hydroxy-1, 1-Dimethyl Ester from the Calyx of Green *Hibiscus sabdariffa* (Linn). *Natural Products Chemistry & Research*, *3*(2), 1-5. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000169>
- Aragao, G. F., Pinheiro, M. C. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., & Viana, G. de B. (2008). Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Isomeric Mixture of Alpha- and β -Amyrin from *Protium heptaphyllum*(Aubl.) March. *Journal Of Herbal Pharmacotherapy*, *7*(2), 31-47. https://doi.org/10.1300/J157v07n02_03
- Arena. (2012, mayo 4). DESCRIPCIÓN DE LA LÚCUMA. Recuperado 29 de octubre de 2017, a partir de <http://fundamentosdemarketing-lucuma.blogspot.com/2012/05/clima.html>
- Awad, A. B., Fink, C. S., Williams, H., & Kim, U. (2001). In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *European Journal of Cancer Prevention*, *10*(6), 507–513.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta Edición). México: Pearson Educación.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25–30.
- Cannas, A. (2015). Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules. Recuperado a partir de <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin.html>

- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.-S., Jun, S. B., Lovinger, D., & Kim, H.-Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *Journal of Neurochemistry*, *111*(2), 510-521. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x>
- Casani, R. (2000). Vitamin E. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (5^a ed., Vols. 1–26).
- Castro, O. N., Benites, J., Rodilla, J., Santiago, J. C., Simirgiotis, M., Sepulveda, B., & Areche, C. (2017). Metabolomic Analysis of the Lichen *Everniopsis trulla* Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry (UHPLC-Q-OT-MS). *Chromatographia*, *80*(6), 967-973. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3304-4>
- Christie, W. (2017). Sterols (plant sterols), sterol esters, sterol glycosides, ergosterol, from plants, algae and fungi - structure, occurrence, biochemistry and function. Recuperado 24 de junio de 2017, a partir de <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/plant-st/index.htm>
- Colombo, M. L. (2010). An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol—Perspectives. *Molecules*, *15*(4), 2103-2113. <https://doi.org/10.3390/molecules15042103>
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, *42*(2), 206–212.
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(4), 1076-1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, *107*(4), 1629-1635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>
- de la Llata Romero, L. (2006). *WO2006009417 A1*.
- de la Llata Romero, L., & de la Llata Romero, M. (2006, enero 26). *WO2006009418 A1*.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(9), 1307–1313.

- Dini, I. (2011). Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. *Food Chemistry*, 124(3), 884-888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.013>
- Duarte, O. (1990). Propagación del lúcumo (*Lucuma obovata* H.B.K.) por estacas terminales con hojas. *Acta Horticulturae*, 310, 235-238. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.310.28>
- Elmets, C. A., Singh, D., Tubesing, K., Matsui, M., Katiyar, S., & Mukhtar, H. (2001). Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(3), 425-432. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.112919>
- Fuentealba, C., Gálvez, L., Cobos, A., Olaeta, J. A., Defilippi, B. G., Chirinos, R., ... Pedreschi, R. (2016). Characterization of main primary and secondary metabolites and in vitro antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. *Food Chemistry*, 190, 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.111>
- García, A. Á., & Carril, E. P.-U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3). Recuperado a partir de <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- García Ríos, D. H. (2016). Caracterización de algunos metabolitos primarios y secundarios en dos variedades comerciales de lúcumo (*Pouteria lucuma*). Recuperado a partir de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2565>
- Geissman, T. (1962). *The chemistry of flavonoid compounds*. New York: The MacMillan Company.
- Gherman, C., Culea, M., & Cozar, O. (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*, 53(1), 253-262.
- Gómez Romero, M. (2010). *Desarrollo y Evaluación de Estrategias Analíticas Para la Caracterización de Compuestos Bioactivos en Alimentos funcionales* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Grilo, E. C., Costa, P. N., Gurgel, C. S. S., Beserra, A. F. de L., Almeida, F. N. de S., & Dimenstein, R. (2014). Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(2), 379-385. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000031>

- Gupta, M. B., Bhalla, T. N., Tangri, K. K., & Bhargava, K. P. (1971). Biochemical study of the anti-inflammatory activity of α and β -amyrin acetate. *Biochemical Pharmacology*, 20, 401-405.
- Ibdah, M., & Gang, D. R. (2014). Use of coupled ion mobility spectrometry-time of flight mass spectrometry to analyze saturated and unsaturated phenylpropanoic acids and chalcones. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 38.
- İnan, Ö., Özcan, M. M., & Aljuhaimi, F. (2017). Effect of location and Citrus species on total phenolic, antioxidant, and radical scavenging activities of some Citrus seed and oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, e13555. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13555>
- Indecopi. (2015). Lúcumá. *Comisión Nacional contral la Biopiratería*, 8.
- Inja Bogdan, A., & Baumann, M. L. (2009). Educación Médica Continua. *DERMATOLOGIA*, 8.
- Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641–649.
- Kotelevets, L., Chastre, E., Caron, J., Mougin, J., Bastian, G., Pineau, A., ... Couvreur, P. (2017). A Squalene-Based Nanomedicine for Oral Treatment of Colon Cancer. *Cancer Research*, 77(11), 2964-2975. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1741>
- Krishnan, K., Mathew, L. E., Vijayalakshmi, N. R., & Helen, A. (2014). Anti-inflammatory potential of β -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology*, 22(6), 373-385. <https://doi.org/10.1007/s10787-014-0218-8>
- Kühnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. En *World review of nutrition and dietetics* (Vol. 24, pp. 117–191). Karger Publishers. Recuperado a partir de <http://www.karger.com/Article/Abstract/399407>
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1486-1496. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.052>

- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*, 79(6), 935–945.
- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., & Wang, H. (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6), 67-73.
- Lin, Y., Xu, W., Huang, M., Xu, W., Li, H., Ye, M., ... Chu, K. (2015). Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhua Kanggan Tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. *Molecules*, 20(7), 12209-12228. <https://doi.org/10.3390/molecules200712209>
- Llaverias, G., Escolá-Gil, J. C., Lerma, E., Julve, J., Pons, C., Cabré, A., ... Blanco-Vaca, F. (2013). Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.01.007>
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica*. Lima, Perú: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Ma, J., Yang, H., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2004). Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three *Pouteria* Species by Selected Ion Monitoring Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5873-5878. <https://doi.org/10.1021/jf049950k>
- Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 171-178. <https://doi.org/10.1080/09637480410001725175>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271–278.

- Massaro, M., & De Caterina, R. (2002). Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 12, 42-21.
- Meco López, J. F., Pascual Fuster, V., & Solà Alberich, R. (2016). La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 28(6), 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2016.04.001>
- Melo, C. M., Morais, T. C., Tomé, A. R., Brito, G. A. C., Chaves, M. H., Rao, V. S., & Santos, F. A. (2011). Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research*, 60(7), 673-681. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0321-x>
- Muñoz, A., Ramos, F., Alvarado, C., Castañeda, B., Barnett, E., Yañez, J., & Cajaleón, D. (2010). Evaluación del contenido de fitoesteroides, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidantes en semilla de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(3), 234-241.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Alvarado-Ortiz Ureta, C., & Encina Zelada, C. (2011). Fitoesteroides y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Horizonte Médico*, 11(2). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/html/3716/371637122007/>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, 5(35), 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Noakes, M., Clifton, P., Ntanos, F., Shrapnel, W., Record, I., & McInerney, J. (2002). An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *The American journal of clinical nutrition*, 75(1), 79-86.
- Ogbe, R. J., Ochalefu, D. O., Mafulul, G., & Olaniru, O. B. (2015). A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J. Plant Sci. Res*, 5, 10-21.
- Orozco-Solano, M., Ruiz-Jiménez, J., & Luque de Castro, M. (2010). Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to

- determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 1227-1235.
- Palou, A. (2008). *El Libro blanco de las grasas en la alimentación funcional*. Barcelona: Unilever España.
- Palou Oliver, A. (2005). *El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*. Barcelona: Instituto Flora.
- Pasinetti, G. M., Wang, J., Ho, L., Zhao, W., & Dubner, L. (2015). Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1202-1208. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.006>
- Pathways of Phytosterol Biosynthesis. (2012). Recuperado 24 de junio de 2017, a partir de http://biocyclopedia.com/index/plant_pathways/pathways_of_phytosterol_biosynthesis.php
- Pech, P. por R. (2014). La Botica. Recuperado 19 de julio de 2017, a partir de <http://propanona.blogspot.com/2014/09/>
- Piljac, J. (2015, octubre 27). Antioxidants: Mechanisms of Action and Effectiveness. Recuperado 18 de julio de 2017, a partir de <https://brunswicklabs.com/blog/antioxidants-mechanisms-of-action-and-effectiveness/>
- Pinto, M. D. S., Ranilla, L. G., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., & Shetty, K. (2009). Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 278-291. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0113>
- Racette, S., Lin, X., Ma, L., & Ostlund, Jr, R. (2015). Natural Dietary Phytosterols. *Journal of AOAC International*, 98(3), 679-684. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGERacette>

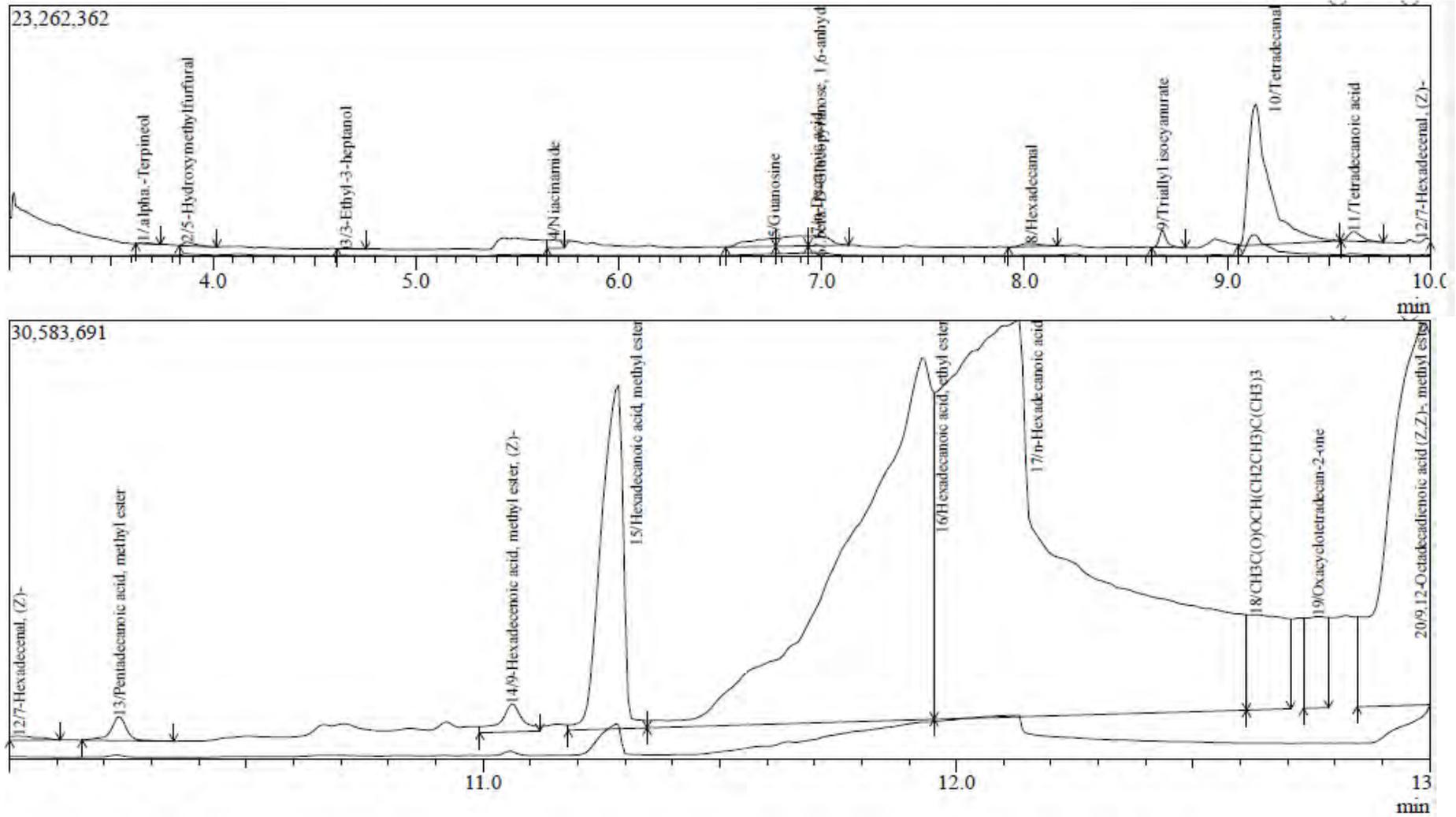
- Ramprasath, V. R., & Awad, A. (2015). Role of Phytosterols in Cancer Prevention and Treatment. *Journal of AOAC International*, 98(3), 735-738.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGERamprasath>
- Rojo, L. E., Villano, C. M., Joseph, G., Schmidt, B., Shulaev, V., Shuman, J. L., ... Raskin, I. (2010). Original Contribution: Wound-healing properties of nut oil from *Pouteria lucuma*. *Journal of cosmetic dermatology*, 9(3), 185–195.
- Romero, J., & Vásquez, E. M. (2012). Fitoesteroles y Fitoestanoles: eficaces para disminución de lípidos plasmáticos. *Revista CES Salud Pública*, 3(2), 165-173.
- Sadek, N. F., Yuliana, N. D., Prangdimurti, E., Priosoeryanto, B. P., & Budijanto, S. (2017). Plant Sterol Esters in Extruded Food Model Inhibits Colon Carcinogenesis by Suppressing Inflammation and Stimulating Apoptosis. *Journal of Medicinal Food*.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3876>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990.
<https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sandhu, A. K., & Gu, L. (2010). Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4681-4692. <https://doi.org/10.1021/jf904211q>
- Shinagawa, F. B., Santana, F. C. de, Araujo, E., Purgatto, E., & Mancini-Filho, J. (2017). Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *Food Science and Technology*, (0).
<https://doi.org/10.1590/1678-457x.08317>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). Cromatografía de Gases. En *Principios de Análisis Instrumental* (Quinta, p. 1024). Madrid, España: Mc Graw Hill.

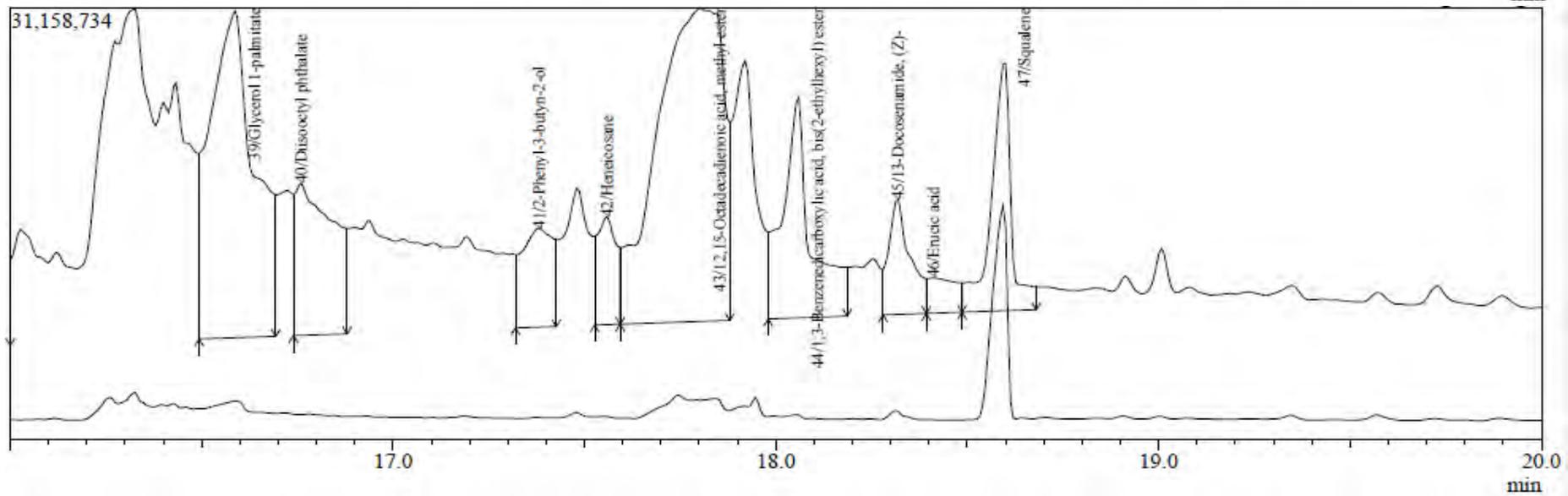
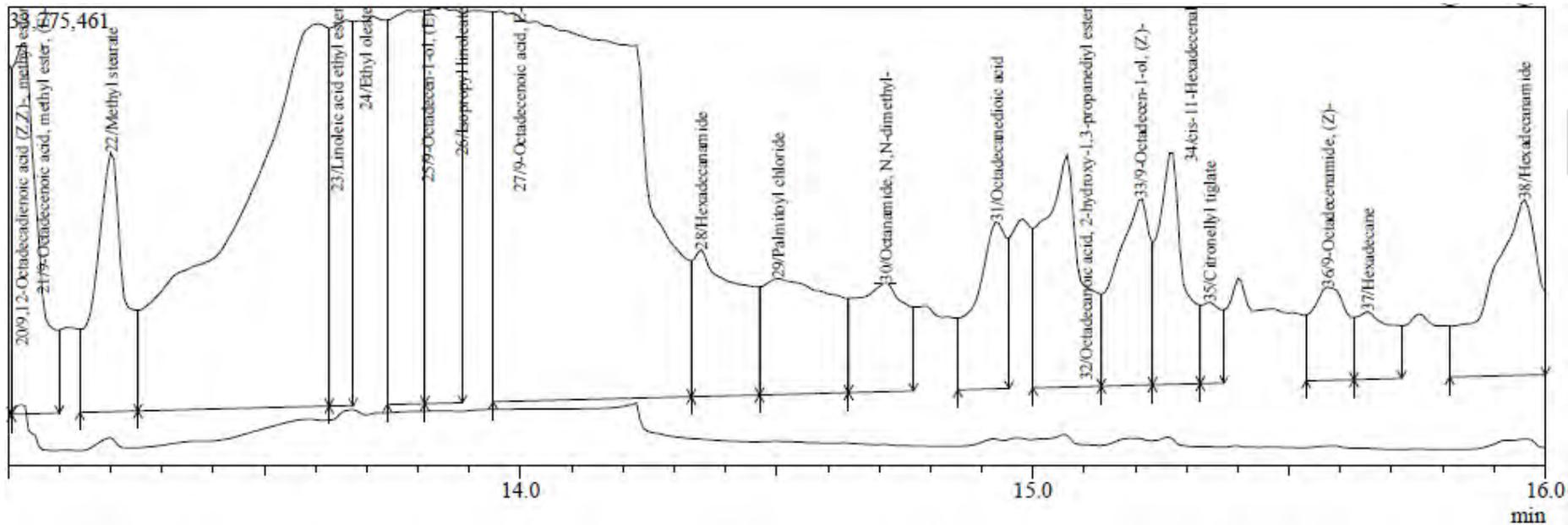
- Soares, L., Silva, L., & Pezzini, B. (2015). Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy Magazine*, 11(41), 96. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149721>
- Takeda, T., Gonda, R., & Hatano, K. (1997). Constitution of Lucumin and its related glycosides from *Calocarpum sapota* Merril. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(4), 697-699.
- Tang, J.-J., Li, J.-G., Qi, W., Qiu, W.-W., Li, P.-S., Li, B.-L., & Song, B.-L. (2011). Inhibition of SREBP by a Small Molecule, Betulin, Improves Hyperlipidemia and Insulin Resistance and Reduces Atherosclerotic Plaques. *Cell Metabolism*, 13(1), 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.004>
- Tanwar, B., & Modgil, R. (2012). FLAVONOIDS: DIETARY OCCURRENCE AND HEALTH BENEFITS. *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*, 2(1), 59. <https://doi.org/10.5455/spatula.20120328100506>
- Tazzini, N. (2015). Flavonoid biosynthesis in plants: genes and enzymes. Recuperado 19 de julio de 2017, a partir de <http://www.tuscany-diet.net/2015/10/26/flavonoid-biosynthesis/>
- Thelen, J. J., & Ohlrogge, J. B. (2002). Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering*, 4(1), 12-21. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0204>
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A., & others. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Wang, Y., Chen, H., & Yu, O. (2010). Metabolic engineering of resveratrol and other longevity boosting compounds. *BioFactors*, 36(5), 394-400. <https://doi.org/10.1002/biof.126>
- Warleta, F., Campos, M., Allouche, Y., Sánchez-Quesada, C., Ruiz-Mora, J., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1092-1100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.031>

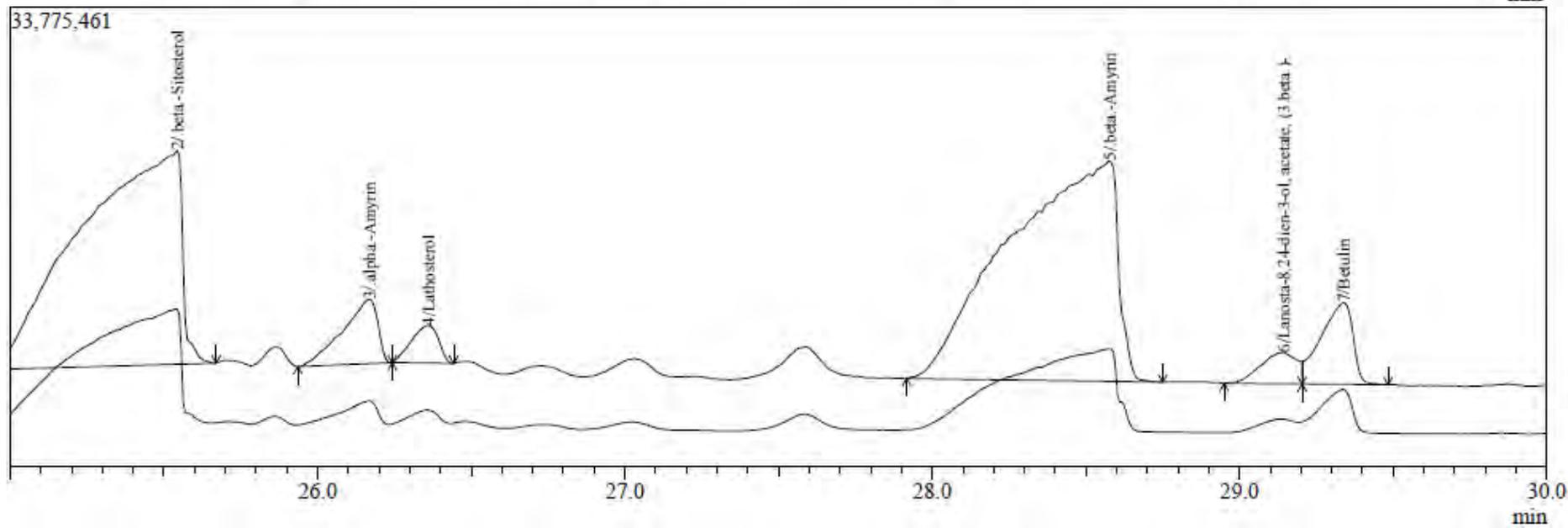
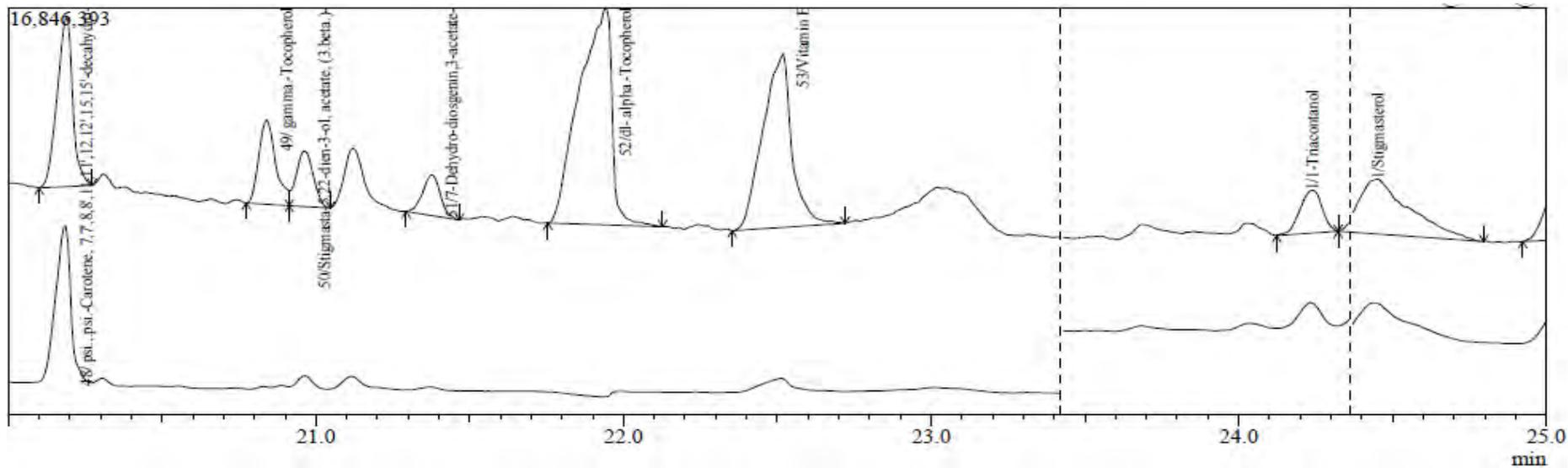
- Xu, Y., Fan, M., Ran, J., Zhang, T., Sun, H., Dong, M., ... Zheng, H. (2016). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 379-388. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.002>
- Yahia, E. M., & Gutierrez-Orozco, F. (2011). Lucuma (*Pouteria lucuma* (Ruiz and Pav) Kuntze). En *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (Vol. 3, pp. 443-449). Queretaro, México.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., & Tsai, H.-L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), 307–313.
- Yu, L., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Haley, S. (2003). Antioxidant Properties of Bran Extracts from “Akron” Wheat Grown at Different Locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1566-1570. <https://doi.org/10.1021/jf020950z>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Zhou, W., Song, Z., Kanagasabai, R., Liu, J., Jayasimha, P., Sinha, A., ... Nes, W. D. (2004). Mechanism-based enzyme inactivators of phytosterol biosynthesis. *Molecules*, 9(4), 185–203.

10. ANEXOS

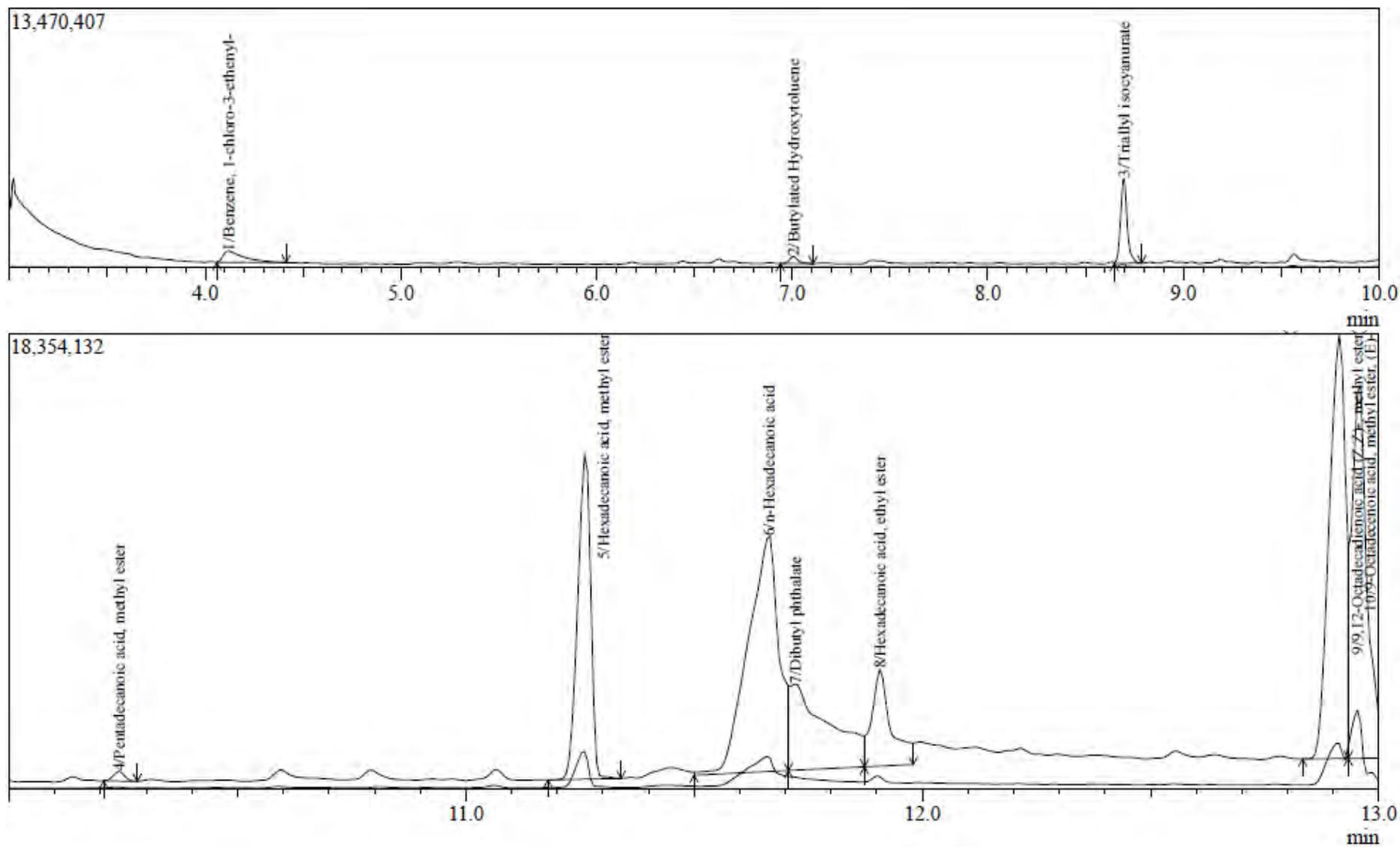
ANEXO A: Cromatograma de la fracción hexánica 1 por GC-MS

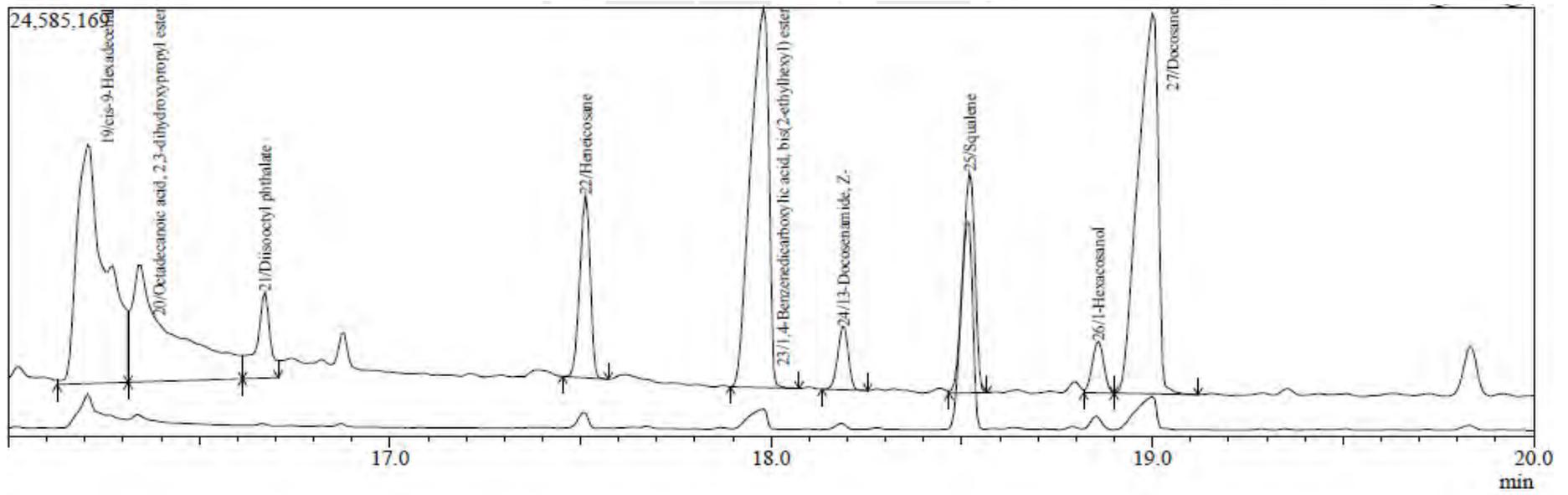
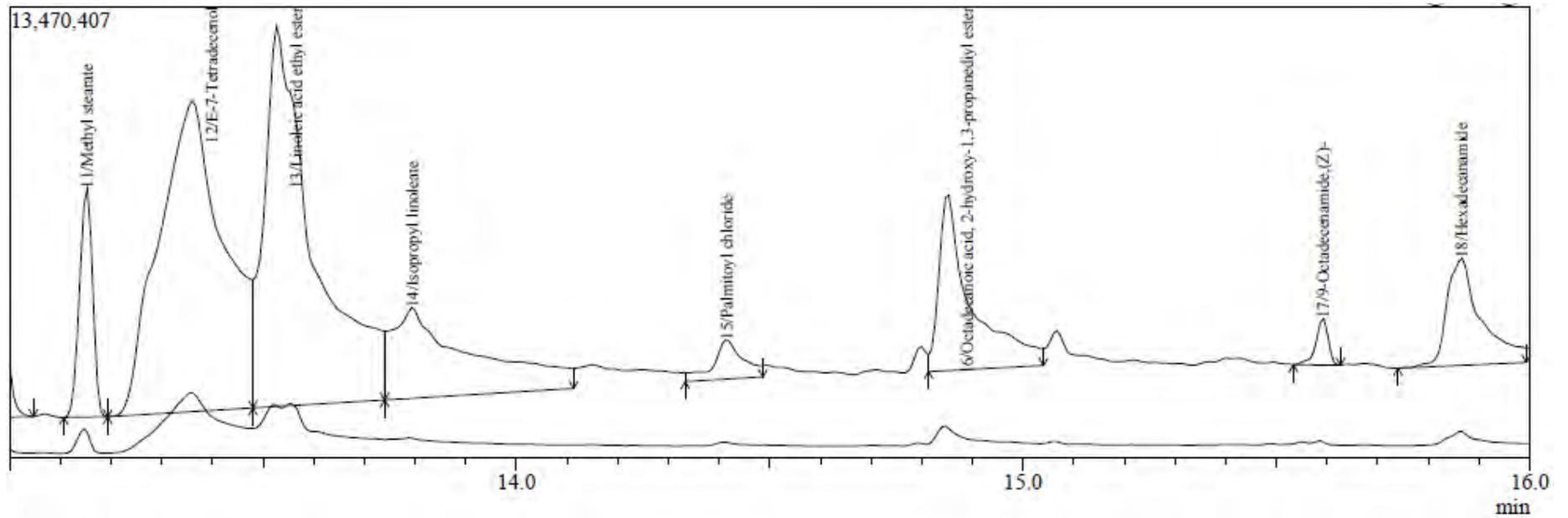


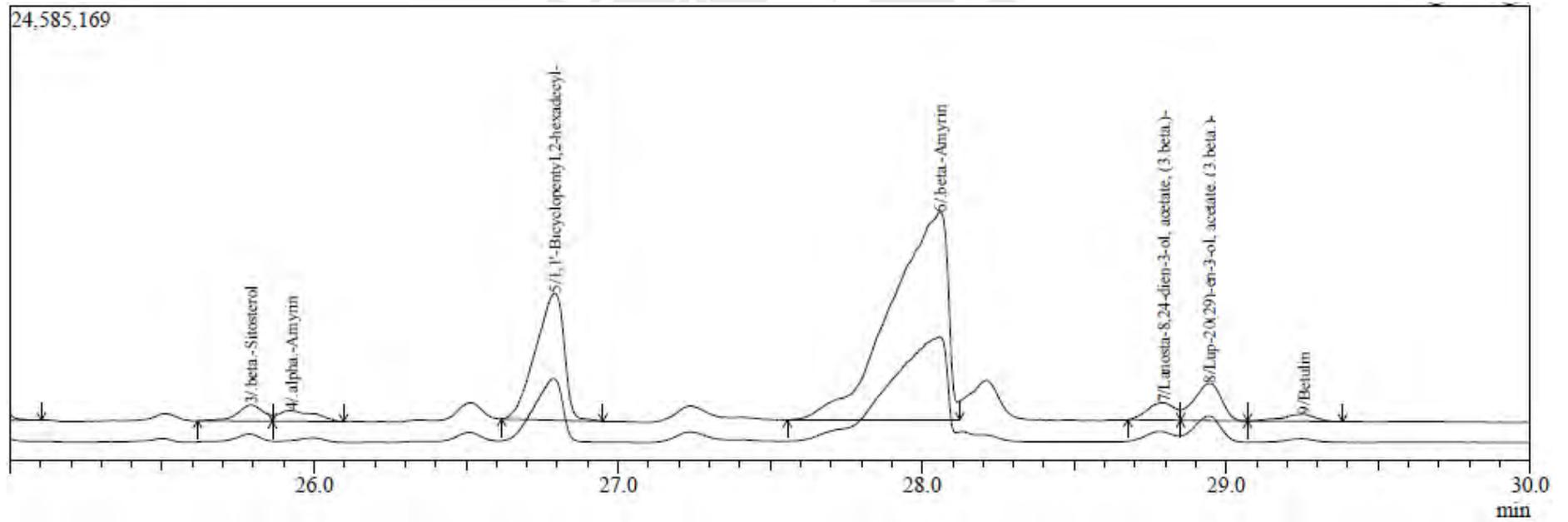
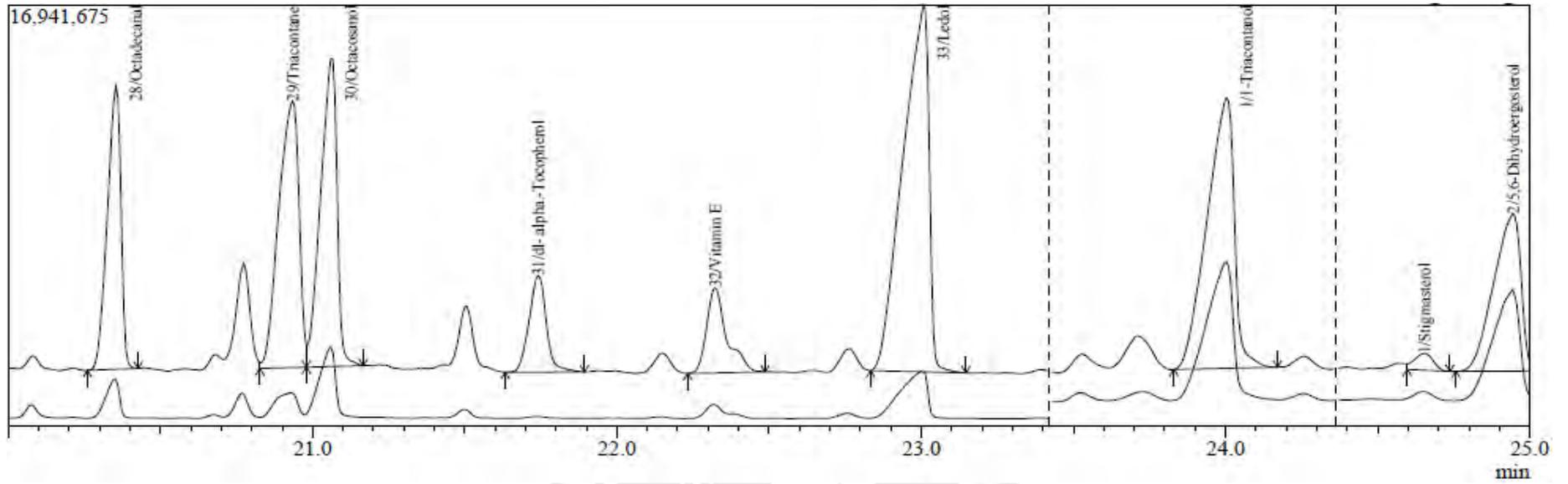




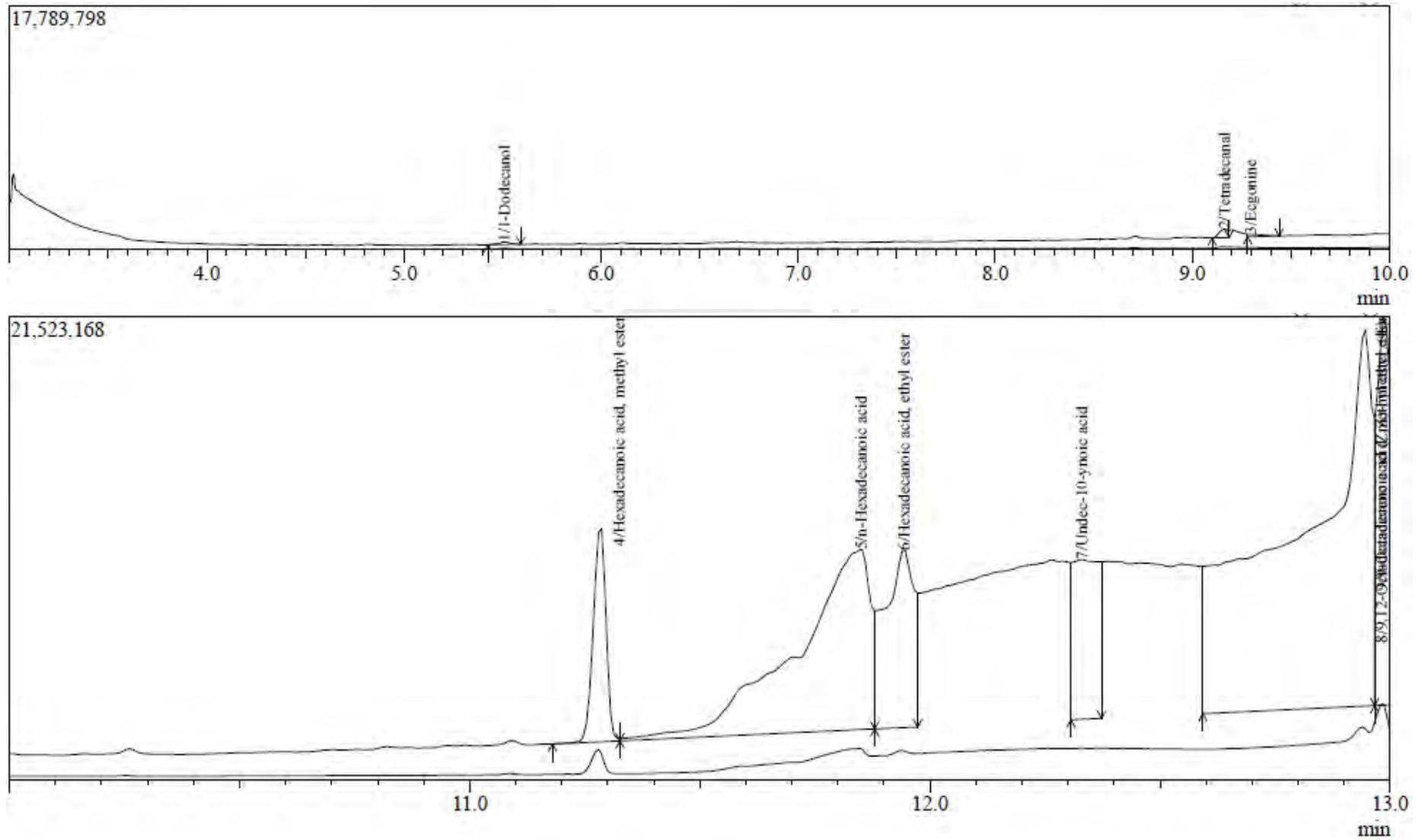
ANEXO B: Cromatograma de la fracción hexánica 2 por GC-MS

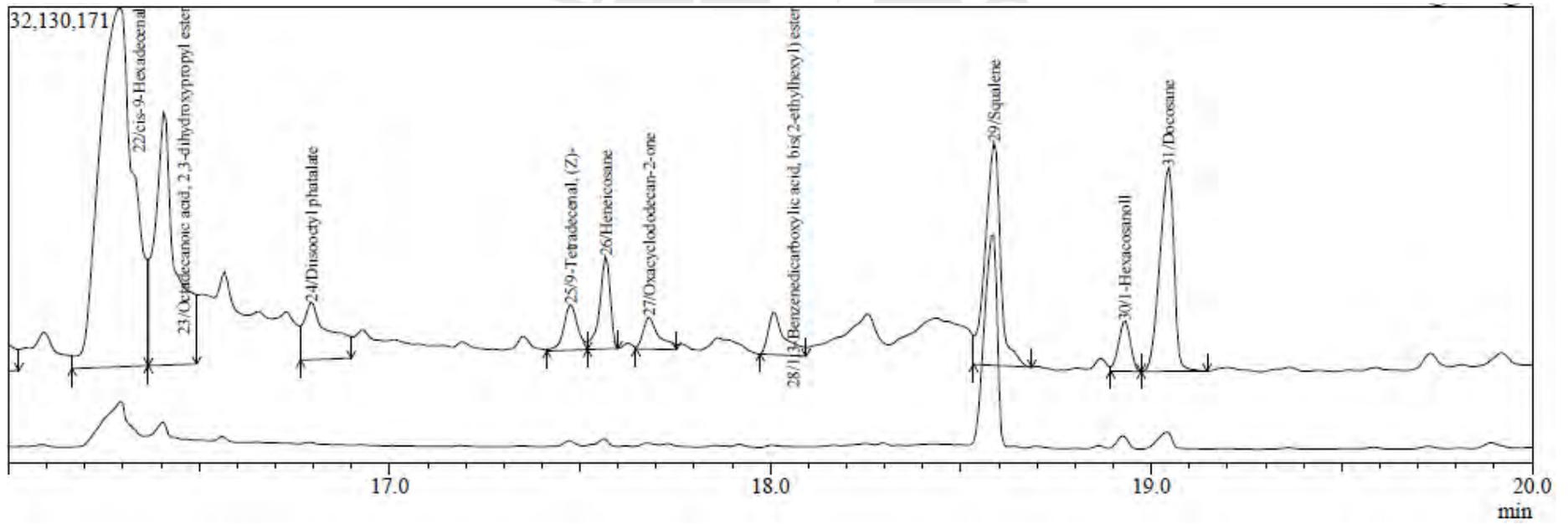
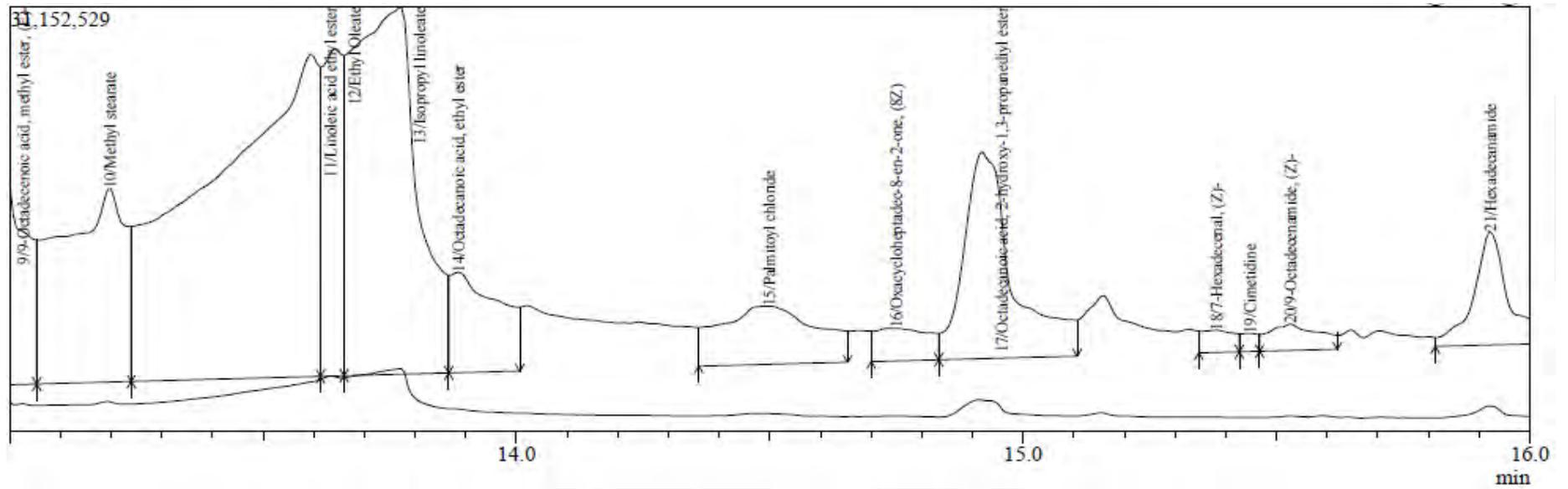


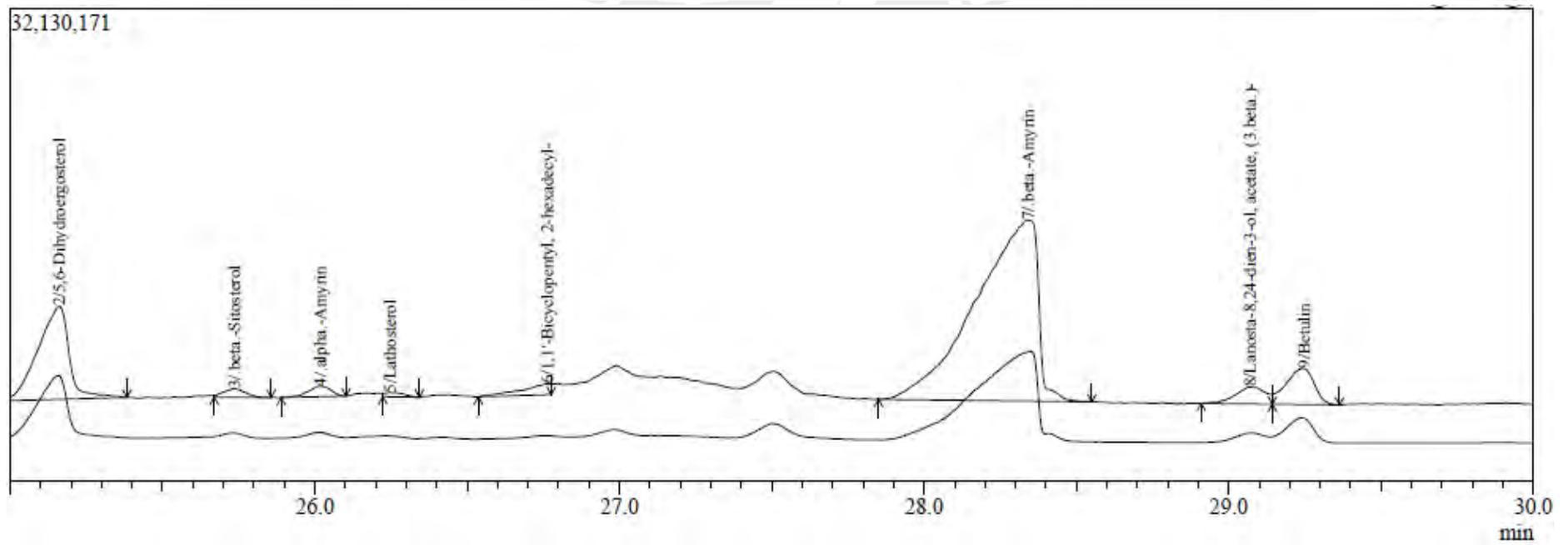
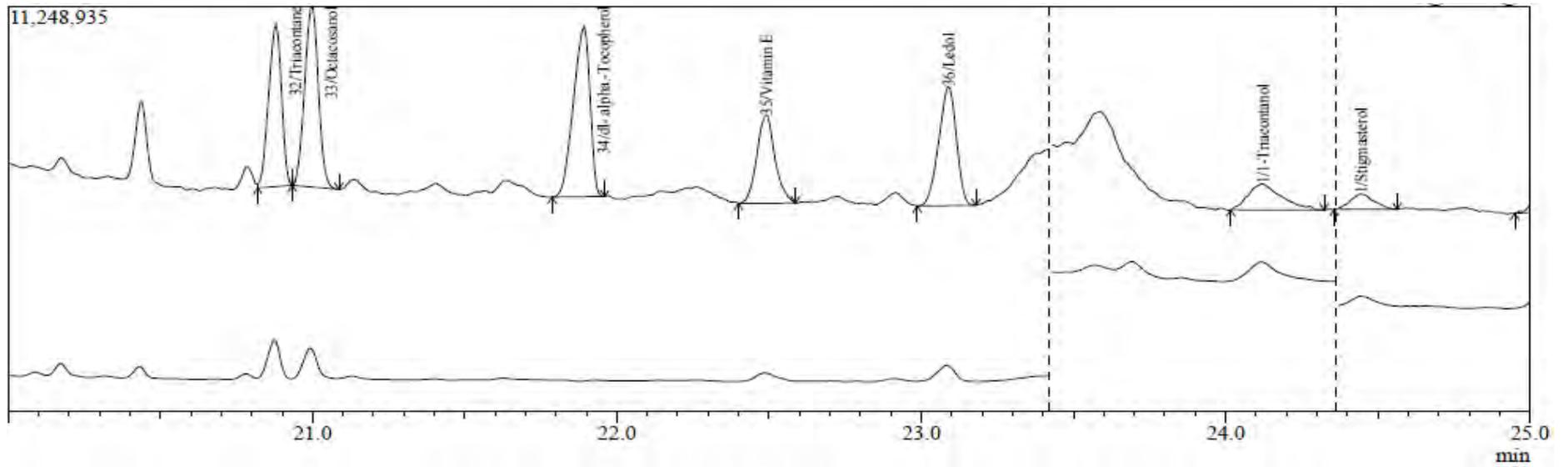




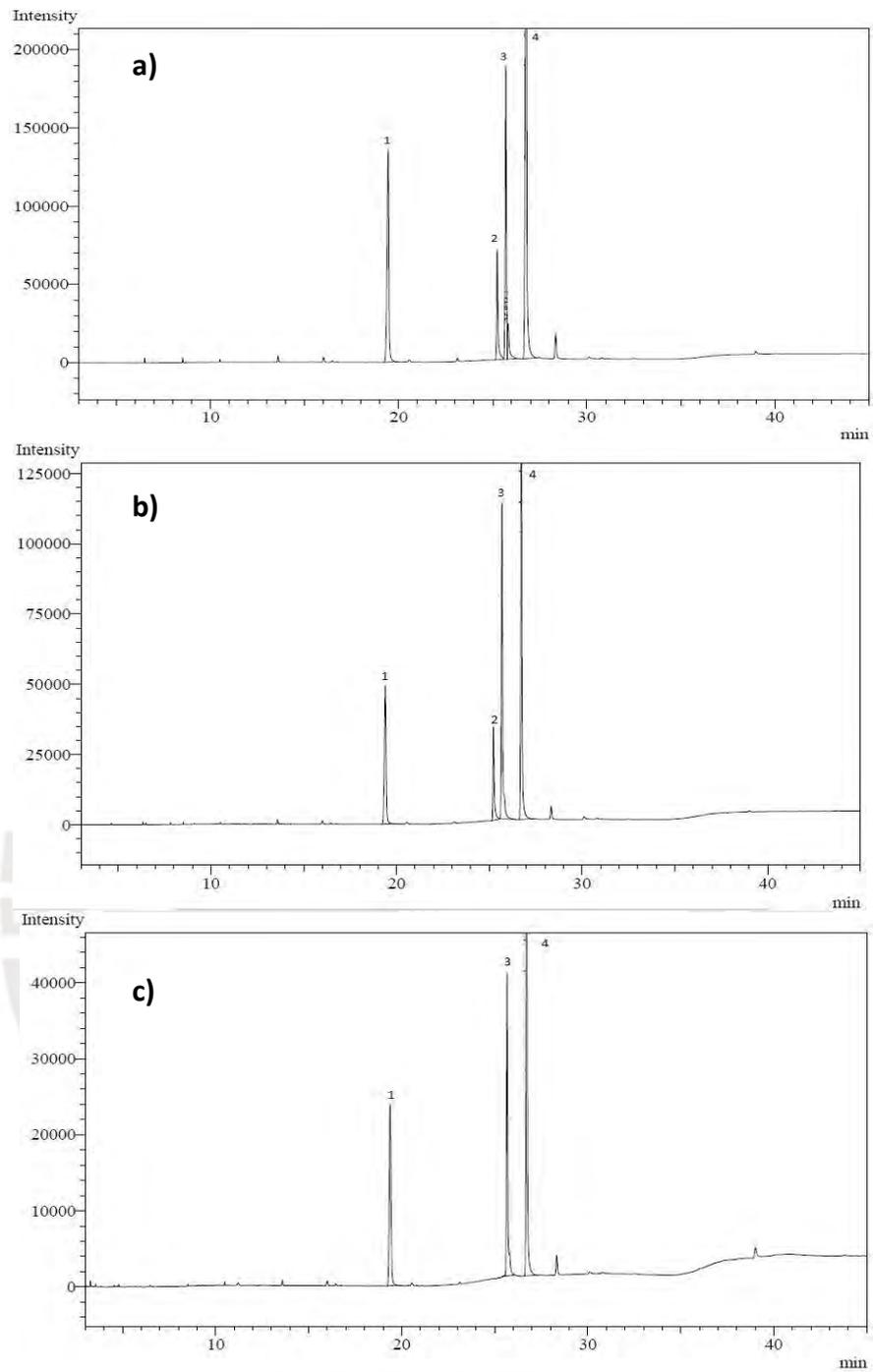
ANEXO C: Cromatograma del extracto hexánico por GC-MS







ANEXO D: Cromatogramas por GC-FID



a) Fracción hexánica 1 transesterificada

b) Fracción hexánica 2 transesterificada

c) Extracto hexánico transesterificado

1: Metil palmitoleate

2: Metil estearate

3: Metil 9E-octadecenoate

4: Metil oleate

ANEXO E: Cromatograma de la fracción metanólica por UHPLC-ESI-MS/MS

