



Facultad de Farmacia
Escuela de Química y Farmacia
Farmacopea Chilena

Caracterización del contenido de polifenoles y de la capacidad antioxidante en hojas de diferentes cultivares de palto (*Persea americana* Mill.) en dos estadios de maduración.

Unidad de investigación II para optar al título de Químico Farmacéutico

Benjamin Alexander Astudillo Lazo

Directora: Q.F. Marcela Escobar P.
Codirector: Ing. Agr. Samuel Valdebenito P.

Noviembre 2025

Dedicatoria

Dedicado a Inés y César, mis padres, personas humildes de esfuerzo y sacrificio, que siempre soñaron y lucharon para que su hijo tuviera las oportunidades que ellos no tuvieron. Desde pequeño me inculcaron la meta de terminar una carrera universitaria y, con un amor inmenso, confiaron en mí incluso cuando yo dudaba.

Este logro no es solo mío, sino de nosotros tres como familia. Ustedes siempre dijeron que la educación era la única herencia que podían dejarme, pero hoy entiendo que me entregaron mucho más: me dieron su esfuerzo, su amor y sus valores, incluso cuando cargaban con tanto sobre sus hombros.

Gracias por la vida hermosa que me dieron. Los amo y los admiro profundamente.

Agradecimientos:

A mi familia

A mi madre, padre y hermano, por ser mi ejemplo y las personas a quienes más amo y admiro. Gracias por su amor incondicional, su paciencia y esa fe ciega que siempre me ha sostenido. Gracias por no dejarme caer y por enseñarme, con su propia fuerza, que incluso en los malos momentos es posible levantarse con una sonrisa. Ustedes son mi motor, mi guía y mi mayor motivación. Todo lo que soy se los debo a ustedes, y espero algún día hacerlos sentir tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ustedes.

A mi abuela Nora, abuela Bernarda, tía Karen, tía Jocy, Nene y a mis primos: crecí rodeado de su cariño, juegos y paciencia. Gracias por permitirme vivir una infancia feliz y por continuar acompañándome con un amor que siempre he sentido, aunque no los vea tan seguido como quisiera. A mis abuelas, gracias por cada comida, cada abrazo y cada momento dedicado; espero poder retribuir, al menos un poco, todo lo que hicieron por mí. A mis tías, gracias por cuidarme siempre, por darme trabajo cuando lo necesité y por estar presentes en cada dificultad familiar.

A mis amigos de la vida

A Diego, Joaquín y Vicente, gracias por una amistad tan hermosa. Ustedes han sido refugio, apoyo y alegría en los peores y mejores momentos. No somos familia por sangre, pero sí por elección, y eso lo valoro profundamente. Más de diez años juntos y nunca me he sentido solo gracias a ustedes. Los admiro como personas y me enorgullecen los adultos en los que se han convertido; sus logros siempre serán también los míos.

A Antonia, Simón, los gemelos, Tomás, Levin, Nico y tantos otros: gracias por todo lo aprendido con cada uno de ustedes y por permitirme llamarles amigos.

Doy gracias por estar rodeado de personas maravillosas que desean verme bien, así como yo deseo lo mejor para ellos.

Resumen:

La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante presente en hojas de palto (*Persea americana* Mill.) en dos estadios diferentes de maduración, considerando siete cultivares: Hass, Zutano, Edranol, Isabel, Esther, Gem y Negra de la Cruz, recolectadas en la estación experimental La Palma (PUCV) y se procesaron siguiendo protocolos de la Farmacopea Chilena. Para ello se emplearon métodos espectrofotométricos, incluyendo Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles, el método de cloruro de aluminio para flavonoides y DPPH para la actividad antioxidante. Adicionalmente, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ácido clorogénico (AC) y quercetina galactósido (QG).

Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas entre las variedades evaluadas ($p > 0,05$) para todas las mediciones realizadas. Edranol en el estadio maduro mostró el contenido más alto de polifenoles totales (295 ± 25 mg/g), en el estadio inmaduro, mientras que Gem en estadio maduro mostró el menor contenido. En este caso, se observó una interacción significativa entre variedad y estadio, evidenciando un comportamiento diferencial entre genotipos.

Para el contenido de flavonoides totales, se observó que la variedad con mayor concentración fue Hass en estadio inmaduro (571 ± 50 mg/g) La variedad que mostró una menor concentración fue Hass en el estadio maduro. En general, los flavonoides totales disminuyeron significativamente con la madurez foliar en todas las variedades evaluadas.

En cuanto a los resultados de la capacidad antioxidante, se determinó que la variedad que presentó la mayor concentración de equivalentes de Trolox en base seca fue Negra de la Cruz (252 ± 29 mg/g) en el estadio inmaduro. La variedad que presentó una menor concentración fue Gem en el estadio maduro. Se observó dependencia del estadio foliar, siendo las variedades en estadio inmaduro las que presentaron valores significativamente mayores respecto a su par en estadio maduro.

La evaluación de compuestos fenólicos mostró que la variedad Isabel presentó la mayor concentración de ácido clorogénico (37 ± 5 mg/g) y de quercetina galactósido ($18,3 \pm 2,4$ mg/g) en el estadio inmaduro. Hass registró el menor contenido de AC en hojas maduras, mientras que Ester en ambos estadios tenía la menor cantidad de QG. En general, todas las variedades exhibieron una marcada disminución de ácido clorogénico al pasar de hojas jóvenes a maduras; sin embargo, la concentración de quercetina galactósido se mantuvo estable entre estadios, conservando el mismo orden jerárquico entre genotipos, lo que indica que este metabolito varía principalmente entre variedades y no según la edad foliar.

Se identificaron cultivares y estadios de maduración óptimos para el aprovechamiento de hojas como fuente alternativa de compuestos funcionales. Los resultados permitieron establecer correlaciones entre contenido polifenólico, flavonoides, ácidos fenólicos (quercetina galactosido y acido clorogénico) y actividad antioxidante, contribuyendo así a la valorización de residuos agrícolas y a la posible aplicación de estos compuestos en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Abstract:

This study aimed to characterize the polyphenol content and antioxidant capacity of avocado (*Persea americana* Mill.) leaves at two different maturity stages, using seven cultivars—Hass, Zutano, Edranol, Isabel, Esther, Gem, and Negra de la Cruz—collected from the La Palma experimental station (PUCV) and processed according to the Chilean Pharmacopoeia. Spectrophotometric methods were used, including Folin–Ciocalteu for total polyphenols, the aluminum chloride method for flavonoids, and DPPH for antioxidant activity. Additionally, high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to quantify chlorogenic acid (AC) and quercetin galactoside (QG).

The results revealed statistically significant differences among cultivars ($p > 0.05$) for all measurements. Edranol in the mature stage showed the highest total polyphenol content (295 ± 25 mg/g), whereas Gem in the mature stage presented the lowest values. A significant interaction between cultivar and maturity stage was observed, indicating differential behavior among genotypes.

For total flavonoid content, Hass in the immature stage exhibited the highest concentration (571 ± 50 mg/g), while the same cultivar in the mature stage showed the lowest. Overall, total flavonoids significantly decreased with leaf maturity in all cultivars evaluated.

Regarding antioxidant capacity, Negra de la Cruz in the immature stage exhibited the highest concentration of Trolox equivalents on a dry-weight basis (252 ± 29 mg/g), while Gem in the mature stage showed the lowest. Antioxidant capacity was strongly dependent on leaf maturity, with immature leaves consistently presenting significantly higher values than their mature counterparts.

Analysis of specific phenolic compounds showed that Isabel displayed the highest concentrations of chlorogenic acid (37 ± 5 mg/g) and quercetin galactoside (18.3 ± 2.4 mg/g) in the immature stage. Hass recorded the lowest AC content in mature leaves, while Esther had the lowest QG content in both stages. Overall, chlorogenic acid markedly decreased from young to mature leaves in all cultivars; however, quercetin galactoside remained stable across stages, maintaining the same hierarchical order among genotypes, suggesting that this metabolite varies mainly among cultivars rather than with leaf age.

Optimal cultivars and maturity stages for the use of leaves as an alternative source of functional compounds were identified. The results allowed the establishment of correlations among polyphenol content, flavonoids, phenolic acids (quercetin galactoside and chlorogenic acid), and antioxidant activity, contributing to the valorization of agricultural residues and the potential application of these compounds in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries.

Abreviaciones

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Abs	Absorbancia
AC	Acido clorogénico
AUP	Agua ultrapura
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
E1	Estadio 1 o inmaduro
E6	Estadio 6 o maduro
EA	Estándar analítico
FT	Flavonoides totales
G	Gramos
G_{cal}	G calculado o constante de Grubbs experimental
G_{tab}	G tabulado o valor critico tabulado de Grubbs
L	Litros
µL	Microlitros
Mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
Min	Minutos
mL	Mililitros
Nm	Nanómetros
PA	Para análisis
PT	Polifenoles totales
%In	Porcentaje de inhibición
Q_{cal}	Q calculado o constante de Dixon experimental
Q_{tab}	Q tabulado o valor critico tabulado de Dixon
QG	Quercetina galactosido
t_{cal}	T calculado o constante de Student experimental
t_{tab}	T tabulado o valor critico tabulado o constante de Student tabulada

Índice:

Contenido

1. Introducción	11
1.1.- <i>Persea americana</i> Mill.....	3
1.2 Variedades y cultivares de palto:.....	3
1.3 Metabolitos presentes en las hojas de <i>P americana</i>	4
1.4 Capacidad antioxidante.....	5
1.5.- Polifenoles.	5
1.6.- Flavonoides.....	6
1.7.- Ácidos fenólicos:	6
2.- Objetivos	9
3.- Materiales, reactivos, soluciones y métodos:	10
3.1.- Materiales, reactivos y soluciones de trabajo:	10
3.1- Soluciones de trabajo necesarias:.....	11
3.2.- Metodología:	12
3.2.2.- Preparación de extracto madre de la muestra vegetal:	13
3.2.3.- Cuantificación de polifenoles totales (PT):	13
3.2.4.- Cuantificación de flavonoides totales (FT):	14
3.2.5.- Evaluación de capacidad antioxidante mediante DPPH:.....	16
3.2.6.- Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina galactósido por HPLC:	17
4.- Análisis estadístico:	19
4.1.- Análisis de linealidad del sistema en curvas de calibrado:	19
4.2.- Análisis de diferencias significativas entre muestras:	19
4.3.- Analisis de Dixon y Grubs:	20
4.3.1.- Test de Dixon:	20
4.3.2.- Test de Grubbs:.....	21
5.- Resultados y discusión:	22
5.1.- Curva de calibrado para la cuantificación de polifenoles totales (PT):	22
5.1.1.- Cuantificación de polifenoles totales en hojas de diversas variedades de palto:	23
5.2.- Curva de calibrado para la cuantificación de flavonoides totales:.....	25

5.2.1.- Cuantificación de flavonoides totales en hojas de diversas variedades de palto:	26
5.3.- Curva de calibrado para la cuantificación de capacidad antioxidante, DPPH:	28
5.3.1.- Cuantificación de capacidad antioxidante en hojas de diversas variedades de palto:.....	29
5.4.- Identificación de ácido clorogénico (AC) y quercetina galactósido (QG) mediante HPLC:	32
4.5.- Cuantificación de ácido clorogénico:	35
4.6.- Cuantificación de quercetina galactosido:	38
5.- Conclusión:.....	41
6.- Referencias	42

1. Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad, las diversas civilizaciones que han surgido en los distintos continentes han recurrido al uso de las plantas como fuente de bienestar y salud. Las especies botánicas, disponibles en sus respectivos entornos, han sido empleadas tanto en la prevención como en el tratamiento de enfermedades, gracias a su accesibilidad, facilidad de preparación y escasos efectos secundarios asociados. Estas propiedades beneficiosas para la salud se deben a la gran cantidad de compuestos bioactivos presentes en las diversas especies del reino vegetal (Berdonces, 2003).

Hoy en día mediante el estudio y la práctica de la etnobotánica se ha logrado extraer compuestos activos de plantas utilizadas por generaciones en la medicina tradicional y aplicarlos en la medicina moderna para seguir mejorando la calidad de vida de las comunidades (Domingo-Fernández *et al.*, 2023). Estos conocimientos adquiridos por los diferentes pueblos a lo largo del tiempo han dado origen a diversos sistemas de medicina tradicional propios de cada una de sus culturas, las cuales utilizando los recursos vegetales a su disposición propios de la geografía de la zona mejoraban su calidad de vida y que hoy son estudiados mediante la disciplina de la etnobotánica para ser integrado en la medicina moderna en el desarrollo de nuevos medicamentos (Yuan *et al.*, 2016).

Ejemplos representativos de esta práctica, que ilustran la riqueza y diversidad del conocimiento etnobotánico, es el uso de *Dioscorea bulbifera* L., una planta utilizada tradicionalmente para tratar afecciones como tos, resfriados, hemorroides y úlceras en regiones como África, China e India. Su uso ha sido documentado incluso en la primera farmacopea conocida de la historia, el Tang Bencao (Sharma *et al.*, 2024). En el contexto europeo, particularmente en Italia, se encuentra evidencia del empleo de bebidas alcohólicas fermentadas a base de plantas por parte de diversos pueblos del norte y este de la Toscana. Estos preparados, registrados desde la primera Farmacopea Europea en

1498, eran utilizados principalmente para tratar enfermedades del sistema digestivo, así como del sistema respiratorio, genitourinario y circulatorio, debido a la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas (Egea *et al.*, 2015). Por otra parte, en África se destaca el uso tradicional de *Syzygium guineense* (Willd.) DC, empleado para tratar condiciones como epilepsia y diarrea (Dogara *et al.*, 2025). En Asia, específicamente en la frontera entre India y Pakistán, las comunidades de Bali y China utilizan aproximadamente 60 especies de plantas, principalmente de las familias *Asteraceae* y *Lamiaceae*, para abordar hasta 55 problemas de salud distintos. Ambas culturas comparten el uso de 22 especies comunes (Hussain *et al.*, 2024). Asimismo, en China, las raíces secas de *Peucedanum decursivum* son empleadas por la medicina tradicional para tratar infecciones del tracto respiratorio (Tao *et al.*, 2024).

En América, la situación no es distinta, pues se documenta un profundo vínculo entre las plantas y las prácticas culturales. Un caso notable es el de *Ceiba pentandra* L, venerada por pueblos indígenas desde Centroamérica hasta Argentina, no por sus propiedades medicinales sino por su relevancia simbólica y espiritual (Tareau *et al.*, 2021). En el norte del continente, los pueblos indígenas de Canadá utilizaban plantas productoras de bayas, especialmente de la familia *Ericaceae*, como fuente de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios. Por ejemplo, las raíces y hojas del arándano bajo eran empleadas por el pueblo Mi'kmaq para tratar el reumatismo, mientras que hojas y tallos del arándano rojo era utilizado por los Innu para aliviar la pleuresía (Weber, 2021). En la región mesoamericana, las culturas descendientes de los mayas, presentes en zonas de Guatemala, Belice y México, mantienen aún hoy sistemas de medicina tradicional independientes. Cada grupo conserva su propia farmacopea, utilizada por chamanes para tratar infecciones, trastornos digestivos y otros problemas de salud. Las especies provienen mayoritariamente del bosque primario y, en menor medida, de huertos familiares, destacando el uso de plantas de las familias *Rubiaceae*, *Piperaceae* y *Asteraceae* (Arnason *et al.*, 2021).

Entre todas las plantas medicinales utilizadas en América, destaca con singular fuerza una especie que ha trascendido a su valor alimentario para consolidarse como un recurso medicinal ancestral de alto valor terapéutico: el palto (*Persea americana* Mill.). Se ha documentado el uso de infusiones acuosas elaboradas a partir de la semilla de palto para el tratamiento de diversas afecciones gastrointestinales. Entre los principales usos se encuentran el combate de parásitos, lombrices intestinales, gusanos, así como la diarrea crónica y otros trastornos digestivos. Estos efectos terapéuticos se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antibacterianas, los cuales se encuentran en altas concentraciones en la semilla del fruto (Sánchez-Quezada *et al.*, 2024).

Por otra parte, encontramos en la literatura reportes del uso de la hoja de *P. americana* para el tratamiento de infecciones urinarias, bronquitis y reumatismo en Brasil, además de estarse desarrollando estudios en peces cebras sobre sus capacidades protectoras de las células ciliadas para el tratamiento de la pérdida auditiva neurosensorial, gracias al amplio espectro fitoquímico presente en las hojas permite el tratamiento de múltiples patologías (Park *et al.*, 2019).

1.1.- *Persea americana* Mill.

El palto o aguacate es una especie vegetal originaria de México y Centroamérica. Se trata de un árbol perenne y frondoso que puede alcanzar hasta 20 metros de altura. Sus hojas son oblongas, de entre 7,5 y 15 cm de largo; sus flores son pequeñas, de tonalidad verdosa, y sus frutos carnosos presentan una cáscara esclerosada, con distintas tonalidades según la variedad y el estadio de maduración (Araújo *et al.*, 2018; Bhore & Sloan, 2021; Olas, 2024). Esta especie pertenece a la familia Lauraceae, género *Persea*, y especie *Persea americana* (*P. americana*). Cada árbol puede producir hasta mil frutos por año, que solo maduran tras caer del árbol. Presenta dicogamia patogénica, un mecanismo de reproducción sexual que impide la autofecundación. Esto se logra mediante dos fases diferenciadas en la apertura de las flores: primero ocurre la fase femenina y, posteriormente, la masculina. Al evitar la autofecundación, los nuevos árboles desarrollan frutos de mejor calidad y alcanzan una mayor producción en comparación con aquellos originados por autofecundación. El árbol comienza su producción aproximadamente cinco años después de la germinación, alcanzando su máximo rendimiento hacia los diez años (Alcaraz & Hormaza, 2014; Araújo *et al.*, 2018).

El consumo de palta se asocia con diversos beneficios para la salud, especialmente en el ámbito cardiovascular y metabólico. Su pulpa es una fuente destacada de lípidos saludables, predominando los ácidos grasos monoinsaturados, entre los cuales el ácido oleico es el más abundante, que ha demostrado contribuir a la mejora del perfil lipídico y a la reducción de procesos inflamatorios. Además, no solo la pulpa, sino también otras partes del fruto como la cáscara y la semilla contienen metabolitos bioactivos, entre ellos ácidos grasos y compuestos antioxidantes, que pueden ser aprovechados con fines terapéuticos (Chen & Zhu, 2025). Diversos estudios atribuyen al fruto propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antifúngicas, lo que refuerza su potencial como un alimento funcional (Jesus *et al.*, 2015).

1.2 Variedades y cultivares de palto:

Las diversas variedades de palto cultivadas actualmente en el mundo provienen de tres razas principales de *Persea americana*: la variedad mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), originaria de las selvas del sur de México y el norte de Guatemala; la variedad guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*), procedente de las tierras altas de Guatemala; y la variedad antillana (*P. americana* var. *americana*), adaptada a climas cálidos similares a los de las tierras bajas de Colombia, estas tres razas tienen la capacidad de cruzarse entre sí (Yin *et al.*, 2023).

La capacidad de reproducción entre las razas de palto ha permitido el desarrollo de numerosas cultivares mediante técnicas de hibridación y clonación. Estas técnicas se utilizan para evitar la variabilidad fisiológica y productiva que suele surgir con la propagación tradicional (Ircanaupa, 2009; Castillo-Argaez *et al.*, 2021). La hibridación y la clonación consisten, en términos generales, en tomar un vástago de la planta con las características deseadas y unirlo a un sistema radicular que posea cualidades específicas, especialmente en términos de resistencia a factores de estrés biótico y abiótico (Warschefsky *et al.*, 2016). La concentración de metabolitos secundarios en el palto, como ácidos grasos, compuestos volátiles y antioxidantes, puede variar significativamente según la variedad de la planta que

se analice. Estas diferencias no solo se observan entre frutos, sino también en otras partes como la semilla, la cáscara y las hojas, lo que sugiere una influencia genética importante sobre el perfil fitoquímico de cada variedad (Chen & Zhu, 2025). Existen tres variedades de palto originales, de las cuales en Chile se han obtenido diferentes cultivares entre las que encontramos Hass (siendo la más consumida), Negra de la Cruz, Fuerte, Bacon, Zutano, Edranol, Isabel, Gem y Esther utilizadas para consumo humano en altas cantidades, debido al rico sabor y beneficios para la salud que presenta el fruto (Gardiazabal, 2009).

A nivel mundial, la producción ha presentado una tendencia creciente entre los años 2000 y 2023, donde a inicios de siglo se producía 2,7 millones de toneladas métricas, mientras que en el año 2023 fue de 10,47 millones de toneladas métricas (Statista, 2025). En Chile el consumo, la producción y la exportación del fruto ha ido en aumento, siendo la especie más consumida la Hass, al igual que en el resto del mundo. Por su parte la producción es alta ya que en regiones como la de Valparaíso y Coquimbo se dan las condiciones climáticas necesarias, su cuidado es sencillo en comparación a otros productos y la creciente demanda del fruto lo hacen un negocio lucrativo. La exportación en Chile es favorable debido a que el marco legal del país permite asegurar una producción de calidad, que conlleva una alta demanda del fruto tanto a nivel local como internacional, siendo Estados Unidos, China y la Unión Europea los principales importadores. (Guevara *et al.*, 2021). Además del consumo directo del fruto, sus biorresiduos como la cáscara, el cuesco y las hojas, han ido en aumento y se utilizan industrialmente para la extracción de compuestos bioactivos, polifenoles, saponinas y taninos, que son aprovechables por la industria farmacéutica y alimentaria (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2022; Gumustepe *et al.*, 2023). Por ello, es fundamental evaluar las diferencias entre cultivares en cuanto a la concentración de estos compuestos, con el fin de seleccionar de manera más eficiente la materia prima para su aprovechamiento (Chen & Zhu, 2025).

En particular, las hojas del palto representan una fuente prometedora de compuestos bioactivos, debido a su alto contenido en polifenoles y antioxidantes, a la escasa explotación industrial actual y a la gran cantidad generada durante las podas agrícolas (Gumustepe *et al.*, 2023). Esto convierte a las hojas en una alternativa viable y sostenible para la obtención de principios activos, especialmente en zonas de alta producción de palta.

1.3 Metabolitos presentes en las hojas de *P americana*.

Las hojas de palto tienen un uso destacado en la medicina tradicional, donde se emplean en la preparación de infusiones con propiedades diuréticas, antiinflamatorias y analgésicas. Además, se utilizan para estimular la función de la vesícula biliar en el tratamiento de afecciones renales y de la vejiga. Extractos alcohólicos de las hojas también se han aplicado tradicionalmente para aliviar dolores de cabeza, convulsiones y molestias reumáticas. Por otro lado, se ha demostrado que los extractos acuosos e hidroalcohólicos poseen propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas, antivirales, hipoglucemiantes y antioxidantes. Estos efectos terapéuticos se atribuyen principalmente a la presencia de compuestos fitoquímicos como los polifenoles y otros antioxidantes, los cuales suelen ser extraídos mediante métodos artesanales para su uso medicinal (Adesola *et al.*, 2025).

Entre los metabolitos que podemos encontrar presentes en las hojas de palto están (Z)-13-octadecenal, ácido hexadecanoico, éster etílico del ácido linoleico, óxido de cariofileno, fitol, ácido linoleico, entre otros compuestos beneficiosos para la salud (Olaoluwa Agunloye et al., 2025).

1.4 Capacidad antioxidante.

Durante la respiración celular, el organismo genera radicales libres como subproductos. Cuando su acumulación supera la capacidad del sistema antioxidante endógeno, se produce un estado de estrés oxidativo, que puede desencadenar daños en células y tejidos. Este fenómeno está relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión, cáncer, patologías neurodegenerativas, úlceras gástricas, artritis, pancreatitis y envejecimiento prematuro. Los radicales libres son moléculas inestables con electrones desapareados, lo que los hace altamente reactivos frente a macromoléculas biológicas, especialmente en órganos sensibles como el cerebro y el páncreas (Jesus et al., 2015). En este contexto, diversos fitoquímicos presentes en las hojas del palto, como la ramnetina, luteolina, rutina, quercetina y apigenina, han mostrado actividad antioxidante. Estos compuestos pueden inhibir o retrasar la progresión de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, desempeñando un papel protector frente a los daños celulares (Owolabi et al., 2010). Además, la capacidad antioxidante de estos compuestos naturales tiene aplicaciones en la industria alimentaria, donde ayuda a retardar la oxidación de los lípidos en los alimentos, prolongando su vida útil (Ebrahimi & Lante, 2021). Existen diferentes métodos para medir la capacidad antioxidante, entre estos encontramos el método que utiliza 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), un radical libre considerado estable y que presenta coloración violeta en solución. Cuando los antioxidantes presentes en el extracto vegetal reaccionan cediendo electrones al radical libre (DPPH), el DPPH se reduce y cambia el color de la solución a amarillo o incoloro, el cambio de color es cuantificado al medir la absorbancia por espectrofotometría e interpolado en una curva de calibrado realizada con concentraciones conocidas de estándar de Trolox (Mishra et al., 2012).

1.5.- Polifenoles.

Los polifenoles son metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, sintetizados de forma natural por diversas especies vegetales (Ebrahimi et al., 2025). De hecho, constituyen los antioxidantes más abundantes que pueden extraerse de muestras botánicas. Además, se les atribuyen importantes beneficios para la salud, ya que algunos han demostrado poseer propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antitumorales. También se les conoce como compuestos fenólicos, debido a que contienen uno o más anillos fenólicos con grupos hidroxilo unidos. Según las características estructurales de sus anillos, los polifenoles se clasifican en diferentes grupos, como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos.

Los polifenoles de origen vegetal se consideran potentes antioxidantes debido a sus características estructurales, principalmente la presencia de uno o más anillos aromáticos con múltiples grupos hidroxilo, los cuales les permiten neutralizar especies reactivas de oxígeno. Su actividad antioxidante se ejerce mediante distintos mecanismos, entre ellos la transferencia de hidrógeno (HAT) y la transferencia de electrones (SET), procesos mediante los cuales los polifenoles estabilizan radicales libres al donar un átomo de hidrógeno o un

electrón. Además, muchos polifenoles poseen la capacidad de quelar iones metálicos de transición, como hierro y cobre, impidiendo reacciones de tipo Fenton que generan radicales altamente reactivos. La eficacia antioxidante de estos compuestos está estrechamente relacionada con la cantidad, posición y grado de sustitución de los grupos hidroxilo en su estructura, así como con la conjugación del sistema aromático, lo que explica la variabilidad en su actividad biológica (Bhuyan & Handique, 2022).

1.6.- Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos bioactivos, pertenecen al grupo de los polifenoles, que como mencionamos anteriormente está ampliamente distribuido en el reino vegetal en frutas, verduras, té, vino tinto y chocolate. Presentan actividad antiinflamatoria, antitumoral y protector cardiovascular. Todos los flavonoides tienen en común su núcleo 2-fenil cromona pero debido a su baja solubilidad en agua, estabilidad y biodisponibilidad necesitan modificarse por técnicas como hidroxilación, glicosilación entre otras para poder ser aprovechadas para mejorar la salud de los pacientes (Yang *et al.*, 2025).

Un ejemplo es la quercetina, se considera un polifenol común en la naturaleza, normalmente en forma de glucósidos, es decir junto a residuos de azúcar en varios tipos de frutas y verduras, siendo la cebolla quien presenta la mayor cantidad. Tiene actividad antioxidante, buena solubilidad en lípidos y alcoholes, pero mala en agua. Presenta un núcleo de flavona formado por dos anillos de benceno y está conectado por un anillo de pirona heterocíclico. Su fórmula química es $C_{15}H_{10}O_7$. Al estar unidos a los glucósidos tienen una mala absorción directa que mejora al hidrolizar el azúcar (Deepika & Maurya, 2022).

Por su parte la quercetina galactósido o también conocida como hiperósido es un glucósido del flavonol, presente en una amplia gama de especies del reino vegetal. Este compuesto se forma por la glicosilación con galactosa en el grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo de la quercetina. La glicosilación permite a la planta almacenarlo de forma más eficiente, ya que aumenta su solubilidad en agua y disminuye su reactividad. Al igual que otros flavonoides presenta actividades antioxidantes, favorables para el tratamiento de diversas patologías, haciéndolo una alternativa farmacológica para tratar o prevenir patologías provocadas por especies reactivas de oxígeno (Jang, 2022).

Presentan una estructura química común C6-C3-C6, formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un anillo heterocíclico que contiene oxígeno (anillo C). Las diferencias entre los flavonoides dependen principalmente del número y la posición de los grupos hidroxilo y otros sustituyentes en estos anillos, así como del grado de oxidación del anillo central. Estas variaciones estructurales permiten clasificar a los flavonoides en distintas subclases y determinan sus propiedades químicas y biológicas (Hosseini Hassanpour & Doroudi, 2023).

1.7.- Ácidos fenólicos:

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Su estructura química incluye una fracción fenólica, que les confiere la capacidad de actuar como antioxidantes. Diversos estudios han demostrado que el consumo habitual de estos compuestos a través de la dieta puede otorgar múltiples beneficios para la salud,

debido a su reconocida actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, antimicrobiana, antidiabética y antimutagénica (Kumar *et al.*, 2024).

Entre los diferentes tipos de ácidos fenólicos, destacan el ácido cafeico y el ácido clorogénico, ambos con potente capacidad antioxidante. Esta propiedad permite asociar su ingesta con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. La actividad antioxidante de estos compuestos depende de varios factores estructurales, siendo el más relevante la cantidad de grupos hidroxilo (-OH) presentes: a mayor número de estos grupos, mayor será su eficacia como antioxidantes. Además, los ácidos fenólicos cumplen un rol clave en las plantas, especialmente en especies aromáticas, donde participan en procesos como el crecimiento, la absorción de nutrientes y la defensa frente a depredadores y patógenos (Pedreiro *et al.*, 2024).

El ácido cafeico es una sustancia bioactiva perteneciente a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, caracterizada por la presencia de grupos funcionales fenólicos y acrílicos. Destaca por su amplio espectro de propiedades farmacológicas, lo que le confiere utilidad en diversos contextos terapéuticos. Se encuentra de forma abundante en alimentos de consumo habitual como frutas, verduras y café. Además, cuando se incorpora en formulaciones farmacéuticas, ha demostrado efectos beneficiosos para la salud, entre los que se incluyen actividades antiinflamatorias, antivirales, anticancerígenas, antidiabéticas, antibacterianas, neuroprotectoras y hepatoprotectoras, atribuibles principalmente a su capacidad antioxidante (Goyal *et al.*, 2024).

Son caracterizados por un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y un grupo ácido carboxílico, lo que los distingue dentro de los polifenoles. Estructuralmente se clasifican principalmente en ácidos hidroxibenzoicos, con un esqueleto C6–C1 (por ejemplo, ácido gálico), y ácidos hidroxicinámicos, con un esqueleto C6–C3 (como el ácido cafeico o el ácido ferúlico), que pueden estar presentes en forma libre o como ésteres y glucósidos en las plantas. Estas diferencias estructurales influyen directamente en sus propiedades químicas y biológicas, incluyendo su capacidad para donar hidrógeno o electrones a radicales libres y quelar metales, mecanismos que subyacen a su actividad antioxidante (Kiokias & Oreopoulou, 2021).

El ácido clorogénico pertenece a la familia de los ácidos cafeoilquínicos, que son ésteres formados por la unión del ácido cafeico con el ácido quínico. Las diferentes formas de estos compuestos se distinguen por los sitios específicos donde ocurre dicha unión. Este metabolito secundario está presente en varios alimentos de origen vegetal, tales como el café, la papa, el tomate y la berenjena. Se le atribuyen propiedades anticancerígenas, antimutagénicas e hipoglucemiantes, asociadas a su actividad antioxidante. Al ser consumido en la dieta, el ácido clorogénico es metabolizado principalmente en el intestino grueso, donde se transforma en ácido cafeico, un compuesto más estable que presenta alta biodisponibilidad y facilidad de absorción (Marković & Tošović, 2016).

Actualmente, la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos en distintas matrices se lleva a cabo principalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica se caracteriza por su alta sensibilidad, precisión y capacidad para realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos de múltiples compuestos. En un sistema HPLC, los ácidos fenólicos se separan a través de una columna cromatográfica, y un detector

específico permite su identificación y cuantificación de manera eficiente, lo que la convierte en una herramienta fundamental en el análisis de estos metabolitos (Cheng *et al.*, 2022).

Aunque la literatura científica confirma la presencia de compuestos antioxidantes en las hojas y otras partes del palto, resulta fundamental determinar cuál es la especie y el estadio de desarrollo del árbol más adecuados para la recolección de hojas, con el fin de optimizar la extracción de fitoquímicos destinados a la elaboración de medicamentos, suplementos alimentarios y cosméticos, entre otros. Por ello, este proyecto tiene como objetivo comparar el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales, quercetina galactósido (QG) y ácido clorogénico (AC), así como evaluar la capacidad antioxidante en dos estadios de hojas de siete ejemplares de palto, con el propósito de identificar la materia prima de mayor calidad para su uso farmacéutico. Siendo estos siete cultivares Hass, Zutano, Edranol, Isabel, Esther, Gem y Negra de la cruz.

2.- Objetivos

Objetivo General:

Caracterizar el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante en dos estadios (inmaduro y maduro) de maduración de las hojas de 7 variedades de cultivares de palto.

Objetivo específico:

1. Evaluar el contenido polifenoles en las hojas de los cultivares de palto en los estadios (E) de maduración E1 o inmaduro y E6 o maduro utilizando métodos espectrofotométrico y cromatográfico.
2. Evaluar la capacidad antioxidante de las hojas de cada cultivar en los estadios E1 y E6 con el ensayo DPPH.
3. Correlacionar el cultivar palto y el estadio de maduración de las hojas con el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante.

3.- Materiales, reactivos, soluciones y métodos:

3.1.- Materiales, reactivos y soluciones de trabajo:

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron diversos materiales, instrumentos de laboratorio, reactivos químicos y soluciones de trabajo que se detallan en las siguientes tablas (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Materiales y equipos de laboratorio

Balanza analítica modelo AS 220/C/2, Radwag.	Baño ultrasonido 30H, Elmasonic.
Centrífuga modelo 5702 R, Eppendorf.	Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de arreglo de Diodo para Uv-Vis.
Espátula con microcuchara.	Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25, PerkinElmer
Filtro de jeringa de Nylon 0,22µm de 13mm.	Frasco plástico hermético y protegido de la luz.
Gradilla.	Matraz aforado clase A de 5,10, 50 y 100 mL.
Micropipeta p100 y p1000.	Molino IKA A-11 basic.
Papel kraft.	Pipeta graduada 10 mL.
Pipetas Pasteur.	Placa de 90 pocillos de fondo plano.
Probeta de 100 mL.	Puntas micropipeta amarillas y azules.
Tamiz 0,355 um.	Tubo Falcon de 50 mL.
Vaso precipitado 50 mL.	Viales para HPLC de 1,5mL.

Tabla 2. Reactivos necesarios.

Nombre	Características
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)	Aldrich Chemistry, 97%
Ácido clorogénico (AC)	Aldrich Chemistry, ≥95%

Ácido orto-fosfórico	Merck, 99%
Ácido gálico anhidro	Merck, para análisis (PA)
Acetonitrilo	Scharlau, HPLC
Agua ultrapura (AUP)	Ultrapura (UP) > 7,5 Ω
Carbonato de sodio anhidro	Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$
Cloruro de aluminio hexahidratado (6H ₂ O)	Merck, $\geq 97\%$
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	Aldrich Chemistry, estándar analítico (EA)
Etanol	Scharlau, PA
Hidróxido de sodio	Merck, PA
Metanol	Scharlau, PA
Metanol	Scharlau, HPLC
Nitrito de sodio	Merck, PA
Quercetina	Sigma-Aldrich, Certified Reference Material
Quercetina 3-D-galactosido	Sigma-Aldrich, $\geq 97\%$ (HPLC)
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich, PA

3.1- Soluciones de trabajo necesarias:

- I. Carbonato de sodio 7,5% p/v: pesar 7,5 g de carbonato de sodio, disolver con AUP y llevar a 100 mL en matraz aforado.
- II. Hidróxido de sodio 0,645M: pesar 2,58 g de hidróxido de sodio PA y disolver con AUP y llevar a 100 mL en matraz aforado para aforar con AUP.
- III. Metanol 80% PA: mezclar 20 mL de AUP y 80 mL de metanol PA y almacenar en envase hermético.
- IV. Metanol 80% HPLC: mezclar 20 mL de AUP y 80 mL de metanol grado HPLC y almacenar en envase hermético.
- V. Nitrito de Sodio 0,85%: pesar 0,85 g, disolver con AUP y llevar con AUP a 100 mL.
- VI. Solución madre de 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) de 480 mg/L: Pesar 20 mg y aforar a 50 mL con metanol para hacer la solución madre.
- VII. Solución Básica: mezclar 1 volumen de etanol absoluto por 3 volúmenes de una solución de hidróxido de sodio 0,645 M y almacenar en un recipiente plástico.
- VIII. Solución de Cloruro de Aluminio 10%: pesar con exactitud 10 g de Cloruro de aluminio, disolver con AUP y aforar a 100 mL.

- IX. Solución de DPPH: pesar 20 mg de DPPH y aforar a 100 mL con metanol en matraz protegido de la luz. Tomar 25 mL de la solución madre y aforar a 50 mL con metanol.
- X. Solución madre de ácido clorogénico 1160 mg/L: pesar 11,6 mg de ácido clorogénico y aforar a 10 mL con metanol HPLC al 80%.
- XI. Solución madre de ácido gálico 1200 mg/L: pesar 12 mg de ácido gálico y aforar a 10 mL con metanol 80% HPLC.
- XII. Solución madre de quercetina 1028 mg/L: pesar 10,28 mg del estándar y aforar a 10 mL con metanol 80% para obtener una concentración de 1 mg/mL.
- XIII. Solución madre de quercetina galactósido 300 mg/L: pesar 3 mg de quercetina galactósido y aforar a 10 mL con metanol HPLC 80%
- XIV. Solución de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10: tomar 3 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y diluir con 30 de AUP.

3.2.- Metodología:

Para el acondicionamiento del material vegetal, preparación de los extractos, cuantificación de la capacidad antioxidante por DPPH, polifenoles y flavonoides totales, quercetina galactósido y ácidos clorogénico, se utilizaron los procedimientos disponibles en el laboratorio de la Farmacopea Chilena de la Universidad de Valparaíso, Las muestras de los estadios E1 y E6, descritos en la tabla N°3, fueron obtenidas desde la estación experimental la palma PUCV ubicada en calle San Francisco s/n, La Palma, Comuna de Quillota, Latitud -32° 53' 35" S y Longitud: -71° 12' 13" W.

Tabla 3. Diferenciación de los estados de crecimiento foliar en hojas de *Persea americana* Mill., según la longitud de la lámina foliar.

Estado foliar	Longitud de hoja (mm)	Descripción general
E1	0,0 – 59,9	Hoja muy joven, reciente emergente; tonalidad rojiza a verde pálido; lámina pequeña, muy tierna y en estado inicial de expansión.
E2	60,0 – 99,9	Hoja joven en expansión, de coloración rojiza a verde claro; textura aún tierna.
E3	100,0 – 129,9	Hoja en crecimiento activo, con predominio de verde claro y ligera pérdida de tonalidad rojiza.
E4	130,0 – 149,9	Hoja en fase intermedia de desarrollo; verde más intenso, lámina más firme y estructura casi completa.
E5	150,0 – 169,9	Hoja casi madura, color verde intenso, textura coriácea incipiente.
E6	≥170	Hoja completamente desarrollada, verde oscura, coriácea y funcionalmente madura.

3.2.1.- Acondicionamiento de muestra vegetal: las hojas de palto recolectadas se liofilizaron y se llevaron a polvo en un Molino IKA A-11 basic, seguido de un tamizado con tamiz de 355 μm para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

3.2.2.- Preparación de extracto madre de la muestra vegetal: se pesaron aproximadamente 500 ± 20 mg de la muestra vegetal acondicionada para realizar una extracción con 10 mL de metanol 80% PA en tubos Falcon, se llevó a sonicar a temperatura ambiente, luego a centrifugar para finalmente retirar y conservar el sobrenadante en matraz aforado de 50 mL. Se repitió tres veces el procedimiento conservando los residuos sólidos en el tubo Falcon que quedan al retirar el sobrenadante, obteniendo 30 mL de extracto que se aforaron hasta 50 mL en matraz aforado. Este extracto, en sextuplicado, se utilizó para realizar todos los procedimientos descritos.

3.2.3.- Cuantificación de polifenoles totales (PT):

3.2.3a.- Curva de calibración:

- I. A partir de la solución madre de 1200 mg/L de ácido gálico se tomaron las alícuotas indicadas en la tabla N°4 y se llevaron a matraces aforados de 5 mL, aforando a volumen con metanol 80% PA, obteniéndose soluciones de ácido gálico entre 48 y 180 mg/L.

Tabla 4. Alícuotas y concentraciones respectivas para curva de calibrado de polifenoles totales expresados como ácido gálico.

Estándar	Alícuota (uL)	Concentración (mg/L)
1	200	48
2	250	60
3	400	96
4	500	120
5	600	144
6	750	180

- II. En un tubo Falcon se depositaron 500 μL cada solución diluida de ácido gálico y se agregaron 2,5 mL de solución de reactivo de Folin-Ciocalteu diluida. Se agitaron y llevaron a oscuridad durante 8 min. También se preparó el blanco, reemplazando los 500 μL de la solución de ácido gálico diluida por metanol 80% PA.

- III. Se agregaron 2 mL de la solución de carbonato de sodio 7,5% p/v, seguido de agitación y se resguardo de la luz por 1 hora.
- IV. Por cada punto de la curva de calibrado el procedimiento se repitió seis veces para obtener una absorbancia promedio.
- V. Se realizó la lectura de la absorbancia a 765 nm.
- VI. Se registraron los valores de absorbancia que se obtuvieron de las soluciones estándares y el blanco para construir la curva de calibrado correspondiente donde el eje X corresponde a las concentraciones y el eje Y corresponde a las absorbancias.
- VII. Se determinó la ecuación de la recta con los valores que se obtuvieron de la pendiente (m), intercepto (b) y un coeficiente de regresión lineal (r) mayor o igual a 0,99. Esto se hizo con el fin de poder calcular la concentración de las soluciones de las muestras por interpolación.

3.2.3b.- Cuantificación de polifenoles totales en muestras vegetales.:

- I. Se depositaron 500 µL del extracto madre de la muestra vegetal en un tubo Falcon. También se preparó el blanco usando 500 µL de metanol 80% PA.
- II. Se agregaron 2,5 mL de solución de reactivo de Folin-Ciocalteu diluida. Se agitaron y llevaron a oscuridad durante 8 min.
- III. Se agregaron 2 mL de la solución de carbonato de sodio 7,5% p/v, seguido de agitación y se resguardo de la luz por 1 hora.
- IV. De cada una de las variedades se hicieron seis extractos, en los cuales el procedimiento se repitió tres veces en cada uno de ellos para obtener una absorbancia promedio.
- V. Se realizó la lectura de las absorbancias a 765 nm.
- VI. Se registraron los valores de absorbancia y se interpoló en la recta de la curva de calibrado el valor de la absorbancia para conocer la concentración de polifenoles del extracto, expresados como mg/L de ácido gálico. Para calcular el contenido de PT de la muestra vegetal, se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = ((C * Vi) / Me) * 100.$$

- R: porcentaje de PT expresados como ácido gálico.
- C: concentración en mg/L de polifenoles equivalentes en ácido gálico obtenido desde la curva de calibrado.
- Me: masa inicial de la muestra vegetal.
- Vi: Volumen inicial de solución madre

3.2.4.- Cuantificación de flavonoides totales (FT):

3.2.4a.- Elaboración de la curva de calibrado:

- I. A partir de una solución madre de 1028 mg/L de quercetina se tomaron las alícuotas indicadas en la tabla N°5 y se llevaron a matraces de 5 mL, aforando a volumen con metanol 80% PA, obteniendo soluciones de quercetina entre 51,4 y 308,4 mg/L

Tabla 5. Alícuotas y concentraciones respectivas para la curva de calibrado de flavonoides

Estándar	Alícuota (uL)	Concentración (mg/L)
1	250	51,4
2	500	102,8
3	750	154,2
4	1000	205,6
5	1500	308,4

- II. En un tubo Falcon se depositaron 600 μ L cada solución diluida de quercetina y se agregaron 1,5 mL de solución de nitrito de sodio 0,85%p/v. Se agitaron y dejaron reposar por 6 min. También se preparó el blanco reemplazando los 500 μ L de la solución de ácido gálico diluida por metanol 80%.
- III. Se agregaron 200 μ L de la solución de cloruro de aluminio 10% p/v, seguido de agitación y se dejó reposar por 5 min.
- IV. Se agregaron 2 mL de solución básica y se llevó a agitación.
- V. Por cada punto de la curva de calibrado el procedimiento se repitió seis veces para obtener una absorbancia promedio.
- VI. Se realizó la lectura de la absorbancia a 510 nm.
- VII. Se registraron los valores de absorbancia que se obtuvieron de las soluciones estándares y el blanco para construir la curva de calibrado correspondiente donde el eje X corresponde a las concentraciones y el eje Y corresponde a las absorbancias.
- VIII. Se determinó la ecuación de la recta con los valores que se obtuvieron de la pendiente (m), intercepto (b) y un coeficiente de regresión lineal (r) mayor o igual a 0,99. Esto se hizo con el fin de poder calcular la concentración de las soluciones de las muestras por interpolación.

3.2.4b.- Cuantificación de FT en muestras vegetales:

- I. Se depositaron 600 μ L de cada muestra problema en tubos Falcón de 5 mL y 1,5 mL de solución de nitrito de sodio 0,85% p/v, dejando reposar por 6 minutos. También se preparó el blanco reemplazando los 600 μ L de la solución de quercetina diluida por metanol 80%.
- II. Se agregaron en cada tubo 200 μ L de solución de cloruro de aluminio 10% p/v, se agitaron y se dejaron reposar por 5 min.
- III. Se agregaron 2 mL de solución básica con posterior agitación en vortex.
- IV. De cada una de las variedades se hicieron seis extractos, en los cuales el procedimiento se repitió tres veces en cada uno de ellos para obtener una absorbancia promedio.

- V. Se realizó la lectura de las absorbancias a 510 nm.
- VI. Se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos de las soluciones de muestra problema en la curva de calibración generada con los valores de absorbancia obtenidos de las soluciones estándar y el blanco previamente. Para calcular el contenido de FT de la muestra vegetal, se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = ((C * V_i) / M_e) * 100$$

Donde:

- R: porcentaje de FT expresados como quercetina.
- C: concentración en mg/mL de flavonoides equivalentes quercetina de extracto obtenidos desde la curva de calibrado.
- Me: masa inicial de la muestra vegetal.
- Vi: Volumen inicial de solución madre.

3.2.5.- Evaluación de capacidad antioxidante mediante DPPH:

3.2.5a.- Elaboración de la curva de calibrado

- I. De una solución madre de Trolox de 480 mg/L se hicieron disoluciones en matraces aforados de 10 mL con metanol PA, para obtener las soluciones de concentraciones deseadas como se muestran en la tabla 6, entre 12 y 96 mg/L:

Tabla 6. Alícuotas y concentraciones respectivas para la curva de calibrado de capacidad antioxidante

Estándar	Alícuota (uL)	Concentración (mg/L)
1	250	12
2	500	24
3	750	36
4	1000	48
5	1500	72
6	2000	96

- II. En un tubo Falcon se depositaron 200 µL cada solución diluida de trolox y se agregaron 2 mL de DPPH diluido. Se agitaron y dejaron reposar en oscuridad por 15 min. También se preparó el blanco reemplazando los 200 µL de la solución de trolox diluida por metanol.
- III. Por cada punto de la curva de calibrado el procedimiento se repitió cuatro veces para obtener un porcentaje de inhibición promedio.
- IV. Se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm.

- V. Se calculó el porcentaje de inhibición (%In) de cada estándar con la siguiente formula:

$$\%In = \left(\frac{A_0 - A_m}{A_0} \right) * 100 .$$

Donde A_0 es la absorbancia del blanco y A_m es la absorbancia de la muestra o el estándar.

- VI. Se determino la ecuación de la recta con los valores de absorbancia en el eje X y los valores de %In obtenidos de las soluciones estándar en el eje Y, con lo que se obtuvieron la pendiente (m), intercepto (b) y el coeficiente de regresión lineal (r) mayor o igual a 0,99. Esto se hizo con el fin de poder calcular la concentración de las soluciones de las muestras por interpolación

3.2.5b.- Cuantificación de capacidad antioxidante de los extractos:

- I. Se tomaron 200 uL de las seis repeticiones de la muestra en tubos de ensayo con tapa y se agregaron 2 mL de DPPH diluido. Se agito y reservo en oscuridad por 15 minutos. También se preparó el blanco reemplazando los 200 µL de la solución de trolox diluida por metanol.
- II. De cada una de las variedades se hicieron seis extractos, en los cuales el procedimiento se repitió tres veces en cada uno de ellos para obtener un porcentaje de inhibición promedio.
- III. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 517 nm.
- IV. Se calculó el porcentaje de inhibición (%In) de cada muestra con la siguiente formula:

$$\%In = \left(\frac{A_0 - A_m}{A_0} \right) * 100 .$$

Donde A_0 es la absorbancia del blanco y A_m es la absorbancia de la muestra.

- V. Se interpolaron los valores de %In obtenidos de las soluciones de muestra problema en la curva de calibración generada con los valores de %In obtenidos de las soluciones estándar y el blanco.
Para el cálculo del de la capacidad antioxidante en la muestra vegetal, se usó la siguiente fórmula:

$$\%In = (A - b)/m)$$

Donde:

- %In: porcentaje de inhibición de la muestra
- A: absorbancia medida.
- b: intercepto de la ecuación de la recta.
- m: pendiente de la ecuación de la recta.

3.2.6.- Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina galactósido por HPLC:

3.2.6a.- Preparación de la curva de calibrado:

- I. De una solución madre de concentración 300 mg/L y 1160 mg/L de QG y de AC, respectivamente, se tomaron las siguientes alícuotas en matraces de 5mL, luego se aforo con metanol 80% HPLC para obtener las concentraciones respectivamente señaladas en la tabla 7:

Tabla 7: Alícuotas y concentraciones respectivas para la curva de calibrado de ácido clorogénico y quercetina galactósido.

Estándar	Quercetina galactósido		Ácido clorogénico	
	Alícuota (uL)	Concentración (mg/L)	Alícuota (uL)	Concentración (mg/L)
1	250	15	430	94,3
2	500	30	850	188,5
3	1380	82,8	1270	282,7
4	3000	180	1700	377
5	-	-	2120	471,2

- II. Las soluciones estándar diluidas se filtraron con filtros de nylon de 0,22 µm de tamaño de poro y se recibieron en viales de 1,5 mL debidamente etiquetados.
- III. Se inyectaron en el equipo de HPLC y las condiciones analíticas de separación fueron en gradiente, utilizando las siguientes fases móviles: fase A constituida por 99,9% de agua ultrapura y 0,1% de ácido fosfórico; y fase B consistente en acetonitrilo. El flujo que se utilizó fue de 1 mL/min, una temperatura de horno de 30°C y detección a una longitud de onda de 280 nm para AC y 365 nm para QG.
- IV. Se registraron los valores de área obtenidos en los cromatogramas de los estándares para construir la curva de calibrado correspondiente donde el eje X corresponde a las concentraciones y el eje Y corresponde a las áreas.
- V. Se determinó la ecuación de la recta con los valores de la pendiente (m), intercepto (b) y un coeficiente de regresión lineal (r) mayor o igual a 0,99. Esto con el fin de calcular la concentración de las muestras por interpolación.

3.2.6b.- Cuantificación de quercetina galactosido y ácido clorogénico en muestras vegetales:

- I. Los extractos de las muestras (n=6) se filtraron a través de filtros de nylon de 0,22 µm de tamaño de poro y se recibieron en viales de 1,5mL debidamente etiquetados.
- II. Se registraron los valores de las áreas de las soluciones problema obtenidos en los cromatogramas e interpolaron en la recta de la curva de calibrado el valor de la concentración de QG y AC de los extractos, expresados como mg/L de QG y AC respectivamente.

Para calcular el contenido de QG y AC en la muestra vegetal, se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = ((C * Vi) / Me) * 100.$$

- R: porcentaje de QG o AC.
- C: concentración en mg/L de QG o AC obtenidas desde la curva de calibrado
- Me: masa inicial de la muestra vegetal.
- Vi: Volumen inicial de solución madre

4.- Análisis estadístico:

4.1.- Análisis de linealidad del sistema en curvas de calibrado:

Siguiendo lo indicado en la “Guía técnica N°1” del ISP se construyeron curvas de calibrado de respuesta versus concentración a partir de diluciones de una solución estándar que comprendieron diferentes rangos de concentración según lo requiriese el método aplicado. Cada nivel de concentración fue analizado según metodología indicada con anterioridad y con los datos obtenidos se determinó la ecuación de la recta del modelo de regresión lineal.

Las concentraciones respectivas de las muestras se determinaron a partir de los valores obtenidos experimentalmente por la siguiente ecuación:

$$Y = mX + b$$

donde:

- Y: eje de la curva de calibrado con el valor de absorbancia, %In o área, según corresponda el caso.
- X: eje de la curva de calibrado con el valor de la concentración.
- m: estimador de la pendiente de la recta.
- b: estimador del intercepto de la recta.

La hipótesis nula (H_0) establece que no existe correlación entre X e Y. Para evaluar si la correlación es significativa, se debe determinar si existen fundamentos estadísticos para rechazar H_0 . Así, cuando el valor calculado (t_{cal}) es mayor que el valor crítico tabulado (t_{tab}), se rechaza la hipótesis nula H_0 , siendo la correlación lineal significativa.

Para demostrar la linealidad del método analítico en el rango de trabajo se determinó la constante de Student experimental (t_{cal}) con la siguiente formula:

$$t_{cal} = \frac{|r\sqrt{n-2}|}{\sqrt{1-r^2}}$$

donde:

- r = coeficiente de correlación de la curva
- n = número de niveles de concentración de la curva
- r^2 = coeficiente de correlación de Pearson

El valor de t_{cal} fue calculado para cada curva de calibrado de cada método y se comparó con la constante de Student tabulada (t_{tab}) correspondiente al 95 % de confianza y con n-2 grados de libertad. Si el valor obtenido para t_{cal} era mayor a t_{tab} se concluye que existe una correlación lineal significativa entre ambas variables (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

4.2.- Análisis de diferencias significativas entre muestras:

Los análisis estadísticos se realizaron en R (versión 4.3.3). Se verificaron los supuestos de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Para cada variable se compararon tres modelos: un modelo lineal clásico (LM), un modelo lineal mixto (LMM) con efecto aleatorio de repetición, y un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución Gamma. La selección se basó en los valores de AIC, BIC y R^2 (marginal y condicional). El LMM mostró el mejor ajuste y fue adoptado como modelo final:

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + E_j + (V \times E)_{ij} + (1 | \text{Extracción}_k)$$
donde V_i es la variedad, E_j el estadio y E_k la extracción.

Las medias marginales estimadas (EMMs) se obtuvieron con el paquete emmeans, aplicando comparaciones de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$) y letras de significancia asignadas con multcompView. Los resultados se representaron mediante gráficos de barras (media $\pm$ error estándar).

4.3.- Analisis de Dixon y Grubs:

Con el objetivo de identificar y, si correspondía, descartar valores atípicos dentro de las series de datos obtenidos, se aplicaron dos pruebas estadísticas: el test de Dixon y el test de Grubbs. Al realizar ambos métodos, estos permitieron evaluar si un valor extremo se podía considerar estadísticamente anómalo dentro de su respectivo conjunto de datos.

4.3.1.- Test de Dixon:

El test de Dixon se aplicó con el propósito de evaluar si el valor mínimo o máximo de cada conjunto de datos podía clasificarse como un valor atípico.

Previamente, cada conjunto de datos fue ordenado de menor a mayor y se identificaron los valores extremos a evaluar.

El valor calculado (Q_{cal}) se comparó con el valor crítico tabulado (Q_{tab}) correspondiente al test de Dixon para $n = 6$ y un nivel de confianza del 95 %. Cuando $Q_{cal} > Q_{tab}$, el valor extremo se considera atípico y puede justificarse su eliminación del análisis, en caso contrario, se conserva dentro del conjunto de datos.

Q_{cal} se determinó con la siguiente formula:

$$Q_{cal\ minimo} = \frac{X_2 - X_1}{X_6 - X_1}$$

$$Q_{cal\ maximo} = \frac{X_6 - X_5}{X_6 - X_1}$$

donde:

- X_1 : dato obtenido con menor valor del conjunto de datos.
- X_2 : segundo dato obtenido con menor valor del conjunto de datos.
- X_6 : dato obtenido con mayor valor del conjunto de datos.
- X_5 : segundo dato obtenido con mayor valor del conjunto de datos.

El valor de Q_{cal} fue calculado para cada conjunto de datos obtenidos en cada variedad, en cada uno de los métodos y se comparó con el valor crítico tabulado (Q_{tab}) correspondiente al 95 % de confianza y con $n = 6$ datos experimentales. Si el valor obtenido para Q_{cal} era mayor a Q_{tab} se concluye que ese valor es atípico (Aslam, 2020).

4.3.2.- Test de Grubbs:

El test de Grubbs nos permitió evaluar si el valor máximo o mínimo de una serie de datos presentaba una desviación significativa respecto del promedio del conjunto, por lo cual se aplicó como complemento al test de Dixon.

El valor calculado (G_{cal}) se comparó con el valor crítico tabulado (G_{tab}) para el test de Grubbs a un nivel de confianza del 95% y con $n = 6$ datos experimentales.

Cuando $G_{cal} > G_{tab}$, el valor extremo se clasifica como valor atípico con significancia estadística.

G_{cal} se determinó con la siguiente formula:

$$G_{cal} = \frac{|X_i - \bar{X}|}{s}$$

donde:

- X_i : valor extremo evaluado (mínimo o máximo).
- $\bar{X}$: promedio del conjunto.
- s : desviación estándar muestral.

El valor de G_{cal} fue calculado para cada conjunto de datos obtenidos en cada variedad, para cada uno de los métodos y se comparó con el valor crítico tabulado (G_{tab}) correspondiente al 95 % de confianza y con $n = 6$ datos experimentales. Si el valor obtenido para G_{cal} era mayor a G_{tab} se concluye que ese valor es atípico (Aslam, 2020).

5.- Resultados y discusión:

Los estudios realizados compararon la concentración de polifenoles en siete variedades de *P. americana* (Edranol, Esther, Gem, Hass, Isabel, Negra de la cruz y Zutano), cada variedad se evaluó en dos estadios, siendo estos el estadio 1 o inmaduro y estadio 6 o maduro. Los resultados obtenidos y el análisis estadístico realizado muestra diferencias significativas en el contenido de PT en cada una de las variedades, indicando que existe variación natural en las concentraciones de PT entre las variedades de la especie.

Al realizar un análisis estadístico ANOVA, acompañados de comparaciones múltiples mediante Tukey, se pudo confirmar que las concentraciones de las cinco variables metabólicas analizadas, es decir PT (mg/g de muestra), FT (mg/g de muestra), DPPH (mg Trolox/g de muestra), ácido clorogénico (mg/g de muestra) y quercetina galactósido (mg/g de muestra) difieren significativamente entre cada variedad, lo que valida que las diferencias entre los grupos estudiados no fueron cuestión de azar, si no diferencias reales en las composiciones fenólicas de cada variedad en ambos estadios.

5.1.- Curva de calibrado para la cuantificación de polifenoles totales (PT):

El gráfico 1, muestra la curva de calibrado realizada con el estándar de ácido gálico para la cuantificación de PT podemos observar una relación lineal entre la concentración conocida del estándar y la absorbancia medida en el espectrofotómetro en el rango UV-Visible, obteniendo como resultado la ecuación de la recta $y = 0,0083x + 0,2798$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9974$. Este valor, al ser cercano a 1, indica que existe una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas del estándar y las absorbancias medidas, lo que confirma un alto grado de ajuste del modelo lineal. Además, al aplicar la prueba de "t de Student", el valor de t_{cal} (39,5) es mayor al valor de t_{tab} (2,7), por lo que se rechaza hipótesis nula H_0 , concluyéndose que la correlación lineal es significativa para la probabilidad considerada. Esta curva de calibrado fiable nos permite cuantificar las concentraciones de polifenoles totales como ácido gálico de las muestras analizadas al interpolar las absorbancias obtenidas de las mismas con la curva de calibrado.

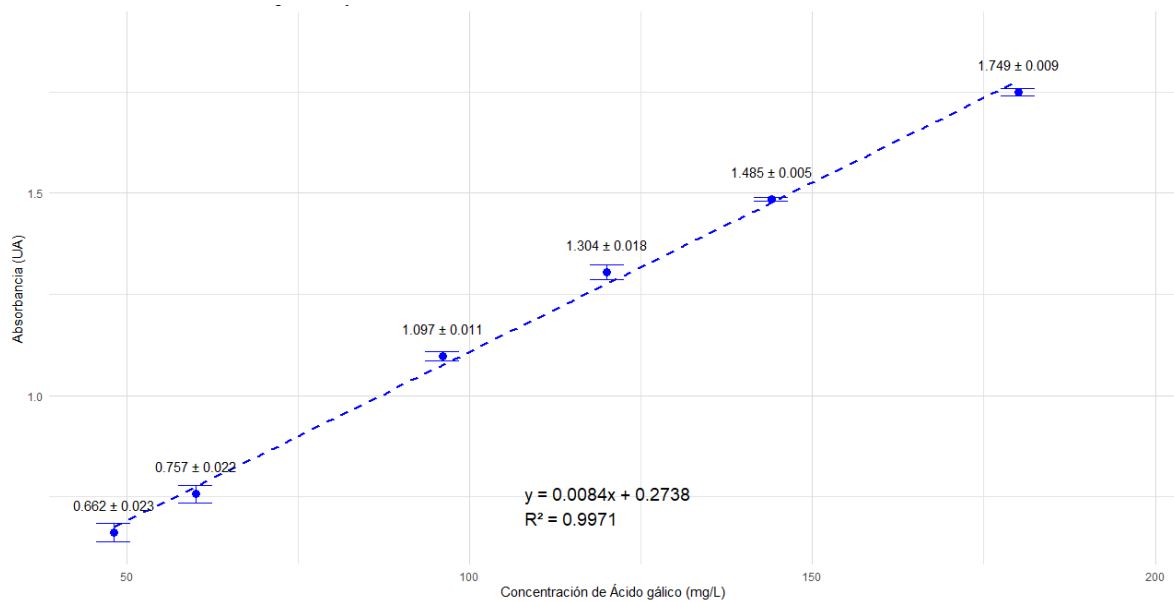


Gráfico 1: curva de calibrado para polifenoles totales, expresados como ácido gálico.

5.1.1.- Cuantificación de polifenoles totales en hojas de diversas variedades de palto:

Mediante la ecuación de la recta $y = 0,0084x + 0,2738$ se calculó la concentración de polifenoles totales en las siete variedades de hojas de palto.

Los gráficos 2 y 3 presentan los resultados obtenidos al cuantificar la concentración de PT en las siete variedades y ambos estadios mediante la técnica colorimétrica de Folin-Ciocalteu.

Los contenidos de PT obtenidos son expresados como mg/g de ácido gálico en base seca y se reportan como el promedio $\pm$ desviación estándar para cada una de las muestras analizadas.

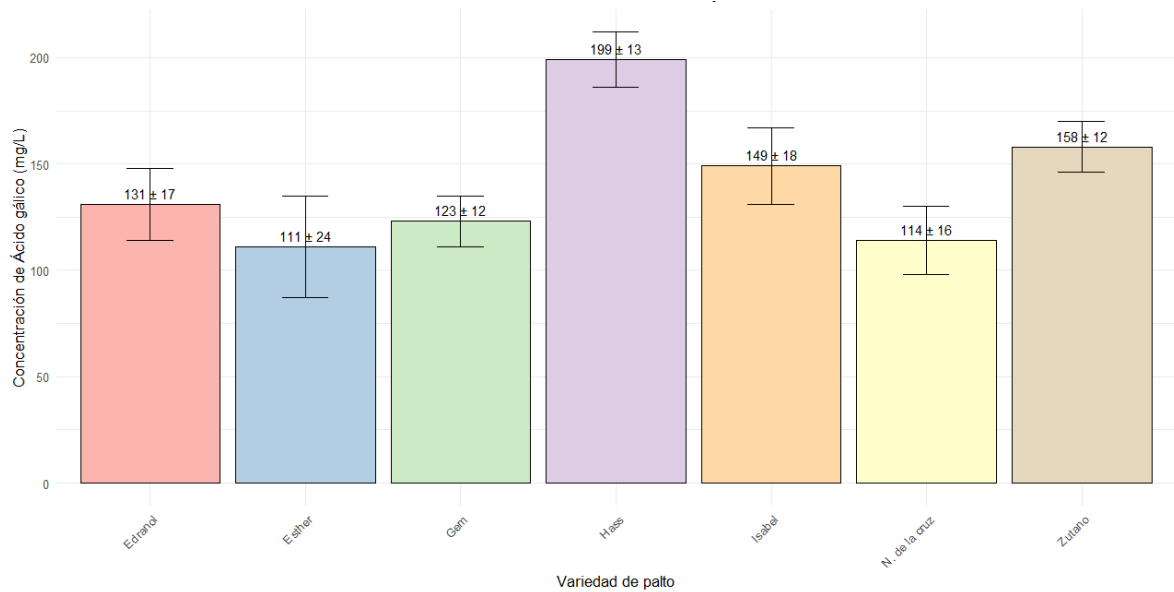


Gráfico 2: Contenido de polifenoles totales, expresados como ácido gálico, por variedad en estadio 1.

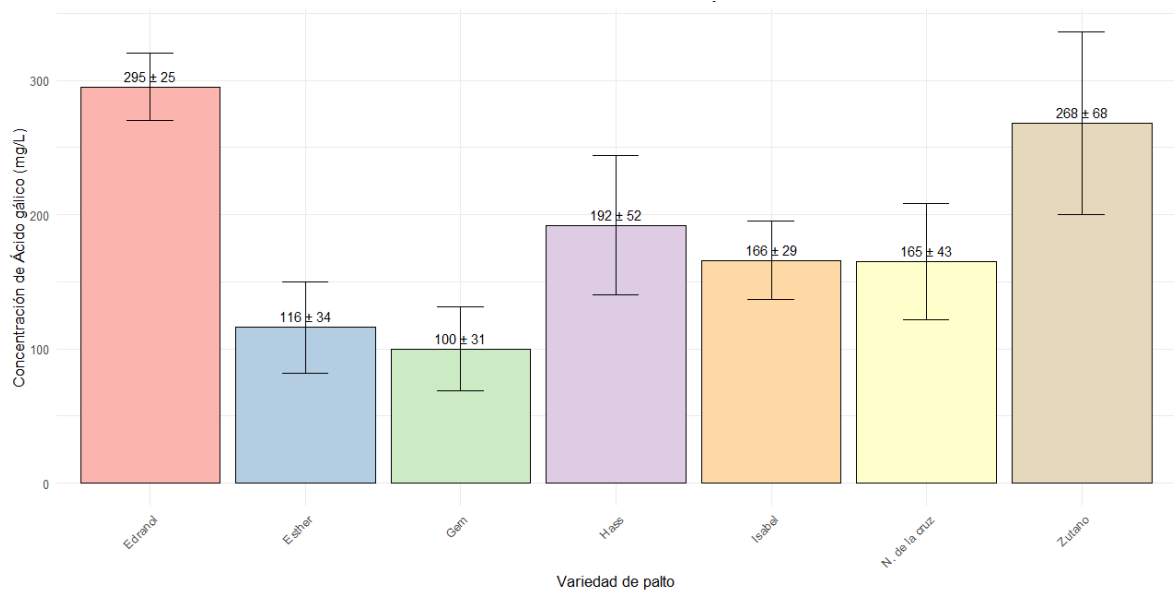


Gráfico 3: Concentración de polifenoles totales, expresados como ácido gálico, por variedad en estadio 6.

Tras aplicar el análisis ANOVA y Tukey podemos decir que el contenido de PT presentó una diferencia significativa entre la variedad y el estadio de desarrollo ($p < 0,001$), lo que evidencia un comportamiento diferencial entre los genotipos. Esto indica que las variaciones observadas en la concentración de polifenoles entre las variedades no se deben al azar, sino que corresponden a diferencias reales atribuibles a las características propias de cada genotipo.

Esto nos permite concluir que, entre las siete variedades y considerando ambos estadios, el que presenta una mayor cantidad de PT es la variedad Edranol en el estadio seis con 295 ± 25 mg/g, por lo que sería el candidato con mayor potencial de bioactividad y capacidad antioxidante de todas las muestras analizadas en este estudio. Mientras que la variedad que presentó una menor concentración de PT fue Gem en el estadio 6. También podemos observar que en las variedades *Edranol* y *Zutano* se registró un incremento de PT en hojas maduras, mientras que en *Hass*, *Esther* y *Negra de la Cruz* la tendencia fue inversa, con valores significativamente mayores en hojas jóvenes. Estas diferencias reflejan un balance variable entre síntesis y degradación fenólica entre variedades, posiblemente asociado a la actividad enzimática (PAL, PPO) o al grado de lignificación foliar (Cao et al., 2025; Medda et al., 2020; Zhang, 2023).

Como se ha mencionado anteriormente, existen registros bibliográficos que avalan y explican la diferencia de compuestos fenólicos entre variedades de la misma especie por factores diversos, tales como condiciones ambientales, estado fenológico y diferencias genotípicas (Irakli et al., 2021; Pérez et al., 2023). Sin embargo, para el presente estudio todas las muestras fueron recolectadas del mismo lugar, con condiciones ambientales similares, por lo que la diferencia en las concentraciones de PT observadas se puede atribuir a factores genéticos propios de cada variedad.

Para la varianza medida se obtuvieron valores relativamente altos, en comparación a la encontrada en bibliografía, un ejemplo de esto es el trabajo presentado por Araujo, et al en el cual se presenta una varianza máxima menor al 4%, esto se puede atribuir a interferencias en el procedimiento llevado a cabo para evaluar PT. Las interferencias se pueden atribuir a la presencia de vitaminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos o complejos metálicos, ya que también pueden interactuar con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Otros factores que pueden alterar las mediciones son el tiempo que se deja reaccionar el RFC y el pH de la solución, el cual debe ser cercano a 10 y se logra al agregar la solución de carbonato de sodio (Araujo et al., 2018). Otra posible razón para el alto valor de la varianza es que la técnica aplicada es manual de múltiples repeticiones, lo cual la vuelve susceptible al error humano.

En contraste, la cantidad de PT encontrada en hojas de palto de la variedad Edranol fue de 295 mg AG/g de muestra, por lo que, al compararla con los contenidos documentados en variedades australianas de *P. americana*, en cáscara, hueso y pulpa, las hojas contienen mayores cantidades de PT, siendo la cáscara madura de Hass con 77,8 mg AG/g de muestra la siguiente parte de la planta evaluada con mayor contenido de PT (Lyu et al., 2023).

5.2.- Curva de calibrado para la cuantificación de flavonoides totales:

En la curva de calibrado para quercetina, representada en el gráfico 4, que permite la cuantificación de flavonoides totales, podemos observar una relación lineal entre la concentración conocida del estándar y la absorbancia medida en el espectrofotómetro en el rango UV-Visible, obteniendo como resultado una ecuación de la recta tal que $y = 0,0012x + 0,1787$, además el valor de R^2 es de 0,9966. Este valor, al ser cercano a 1, indica que existe una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas del estándar y

las absorbancias medidas, lo que confirma un alto grado de ajuste del modelo lineal. Además, al aplicar la prueba de “t de Student”, el valor de t_{cal} (29,4) es mayor al valor de t_{tab} (3,2), por lo que se rechaza hipótesis nula H_0 , concluyéndose que la correlación lineal es significativa para la probabilidad considerada. Esta curva de calibrado fiable nos permite cuantificar las concentraciones de flavonoides totales como quercetina de las muestras analizadas al interpolar las absorbancias obtenidas de las mismas con la curva de calibrado.

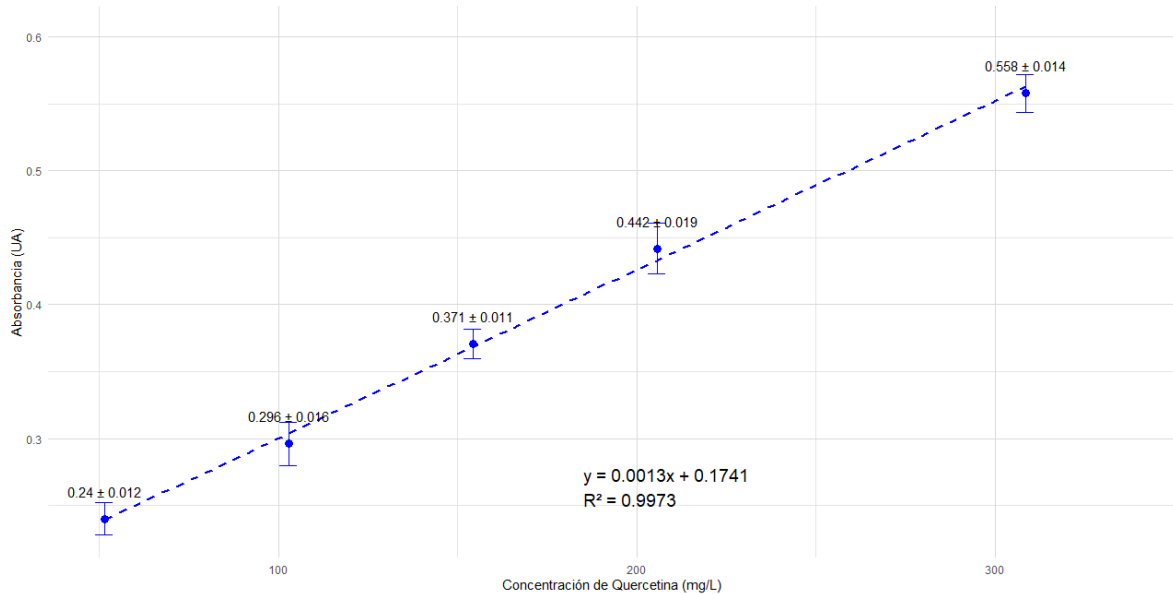


Gráfico 4: curva de calibrado para flavonoides totales expresados como quercetina.

5.2.1.- Cuantificación de flavonoides totales en hojas de diversas variedades de palto:

Mediante la ecuación de la recta $y = 0,0013x + 0,1741$ se calculó el contenido de flavonoides totales, expresados como quercetina, en las siete variedades de hojas de palto.

Los gráficos 5 y 6 presentan el contenido de FT en las siete variedades y ambos estadios mediante la técnica colorimétrica de cloruro de aluminio.

Las concentraciones de flavonoides totales obtenidas son expresadas como mg/g de quercetina en base seca y se reportan como el promedio $\pm$ desviación estándar para cada una de las muestras analizadas.

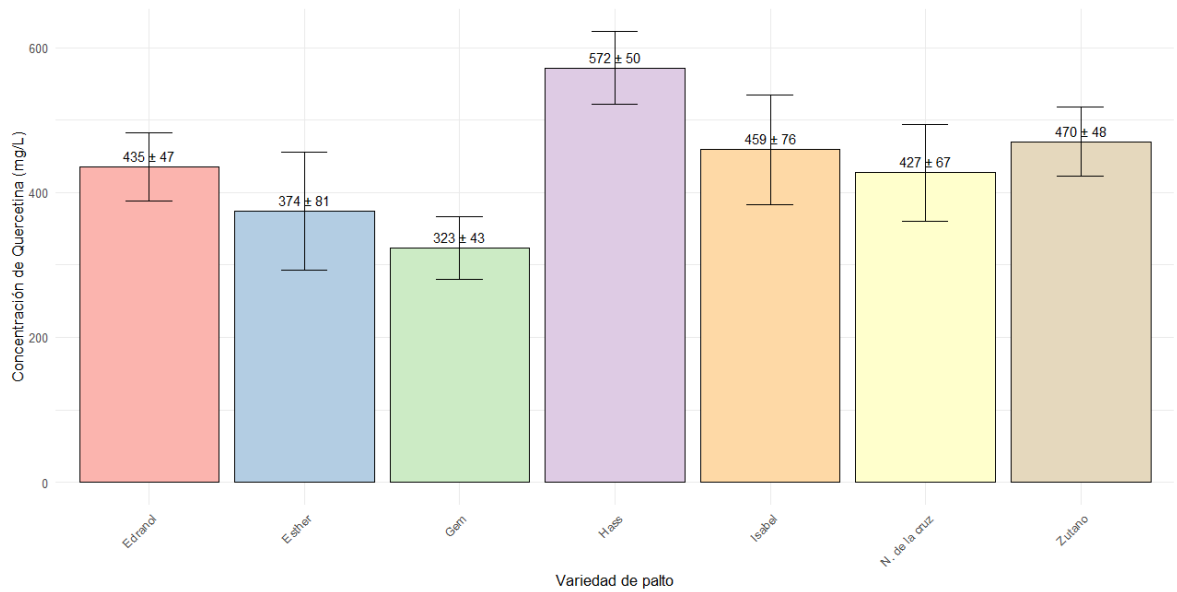


Gráfico 5: Contenido de flavonoides totales por variedad en estadio 1, expresados como mg de quercetina por g de muestra en base seca.

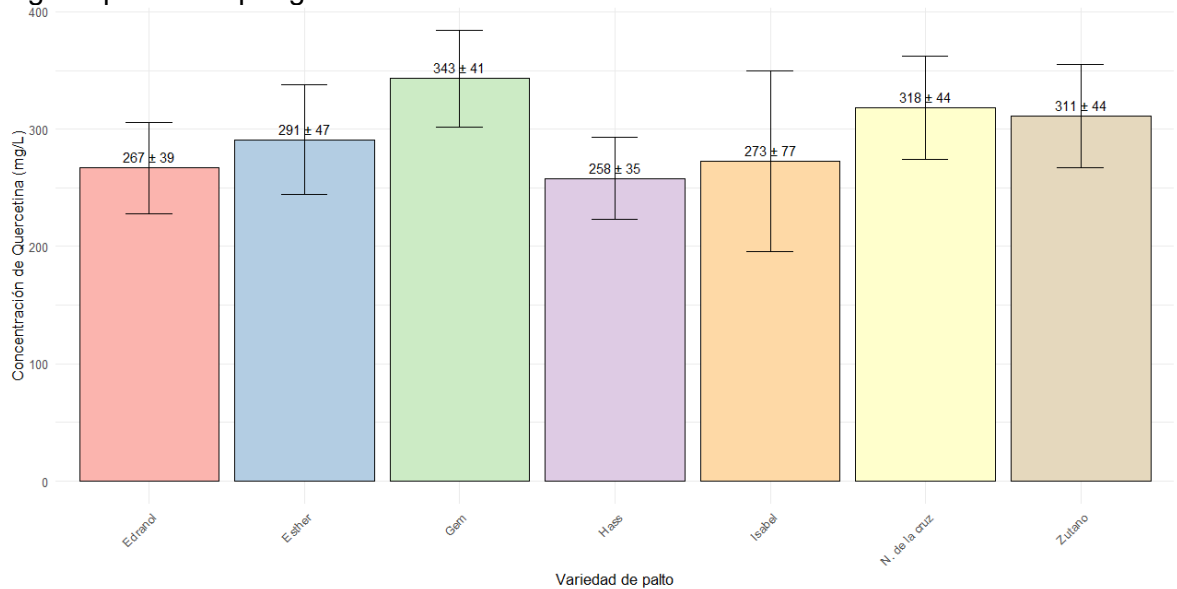


Gráfico 6: Contenido de flavonoides totales por variedad en estadio 6, expresados como mg de quercetina por g de muestra en base seca.

Tras aplicar el análisis ANOVA y Tukey podemos decir que el contenido de flavonoides totales presentó una interacción significativa entre la variedad y el estadio de desarrollo ($p < 0,001$), lo que evidencia un comportamiento diferencial entre los genotipos. Esto indica que las variaciones observadas en la concentración de polifenoles entre las variedades no se deben al azar, sino que corresponden a diferencias reales atribuibles a las características propias de cada genotipo.

Esto nos permite señalar que, entre las siete variedades en ambos estadios, la que presentó una mayor concentración de FT fue *Hass* en el estadio 1, seguida de *Zutano* e *Isabel*

también en el estadio inmaduro, mientras que *Hass* en estadio 6 presentó los valores más bajos. En el estadio 6 todas las variedades redujeron sus niveles, excepto en el caso de la variedad Gem que aumentó, aunque se mantuvo parcialmente el patrón jerárquico observado en el estadio juvenil, nuevamente teniendo como excepción la variedad Gem. En conjunto, FT reflejó un patrón metabólico coherente con la ontogenia foliar, altamente determinado por el genotipo y con disminución generalizada por madurez. También podemos observar que los flavonoides totales disminuyeron significativamente con la madurez foliar en la mayoría de las variedades evaluadas. En promedio, los valores del estadio 6 fueron entre un 30 % y un 50 % inferiores a los del estadio 1, lo que es coherente con el papel de los flavonoides como compuestos fotoprotectores y antioxidantes primarios en tejidos jóvenes. Este patrón también ha sido descrito en diversas especies tropicales y subtropicales, donde las hojas jóvenes presentan altas concentraciones de compuestos fenólicos que contribuyen a la protección frente al estrés lumínico, concentraciones que tienden a disminuir conforme avanza la edad foliar (Yu et al., 2023).

Como se ha mencionado anteriormente hay registros bibliográficos que avalan y explican la diferencia de compuestos fenólicos entre variedades de la misma especie por factores diversos, tales como condiciones ambientales, estado fenológico y diferencias genotípicas (Irakli et al., 2021; Pérez et al., 2023). Sin embargo, para el presente estudio todas las muestras fueron recolectadas del mismo lugar, por lo que las condiciones ambientales eran similares, por lo cual la diferencia en las concentraciones de FT observadas se puede atribuir a factores genéticos propios de cada variedad.

Al medir la concentración total de flavonoides se detectó una sobreestimación en comparación a los polifenoles totales, esto se puede atribuir a la propia metodología usada, ya que esta depende de la formación de complejos entre el cloruro de aluminio y los flavonoides presentes. Esto provoca que cuando comparamos la absorbancia obtenida de las muestras donde hay múltiples tipos de flavonoides que forman complejos además de la quercetina, al comparar las absorbancias obtenidas por las muestras con la curva de calibrado puede llevar a subestimación o sobreestimación según el estándar utilizado, ya que hay diferencias estructurales entre los flavonoides, lo que altera su capacidad para formar complejos con el reactivo. En este caso se puede asumir que en la muestra hay flavonoides presentes, provocando una mayor capacidad para acomplejarse con el cloruro de aluminio o bien que hay otros metabolitos que puedan acomplejarse y afectar la medición como fenoles no flavonoides, pigmentos, lípidos, taninos o polisacáridos (Shraim et al., 2021; Sultana et al., 2024).

También cabe señalar que hay un alto valor de la varianza obtenida experimentalmente lo que se puede asociar a que la metodología aplicada se realiza de forma manual con múltiples repeticiones, lo cual la vuelve susceptible al error humano, además de las posibles interacciones ya señaladas anteriormente.

5.3.- Curva de calibrado para la cuantificación de capacidad antioxidante, DPPH:

La curva de calibrado realizada para este ensayo podemos observar una relación lineal entre la concentración conocida de trolox y la absorbancia medida en el espectrofotómetro en el rango UV-Visible, obteniendo como resultado una ecuación de la recta tal que $y = 0,8482x - 4,7233$, además el valor de R^2 es de 0,9994. Como este valor, al ser cercano a 1, indica que existe una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas del

estándar y las absorbancias medidas, lo que confirma un alto grado de ajuste del modelo lineal. Además, al aplicar la prueba de “t de Student”, el valor de t_{cal} (84,9) es mayor al valor de t_{tab} (2,7), por lo que se rechaza hipótesis nula H_0 , concluyéndose que la correlación lineal es significativa para la probabilidad considerada. Esta curva de calibrado, presentada en el gráfico, permitió cuantificar la capacidad antioxidante de las muestras analizadas como mg de trolox al interpolar las absorbancias obtenidas de las mismas con la curva de calibrado.

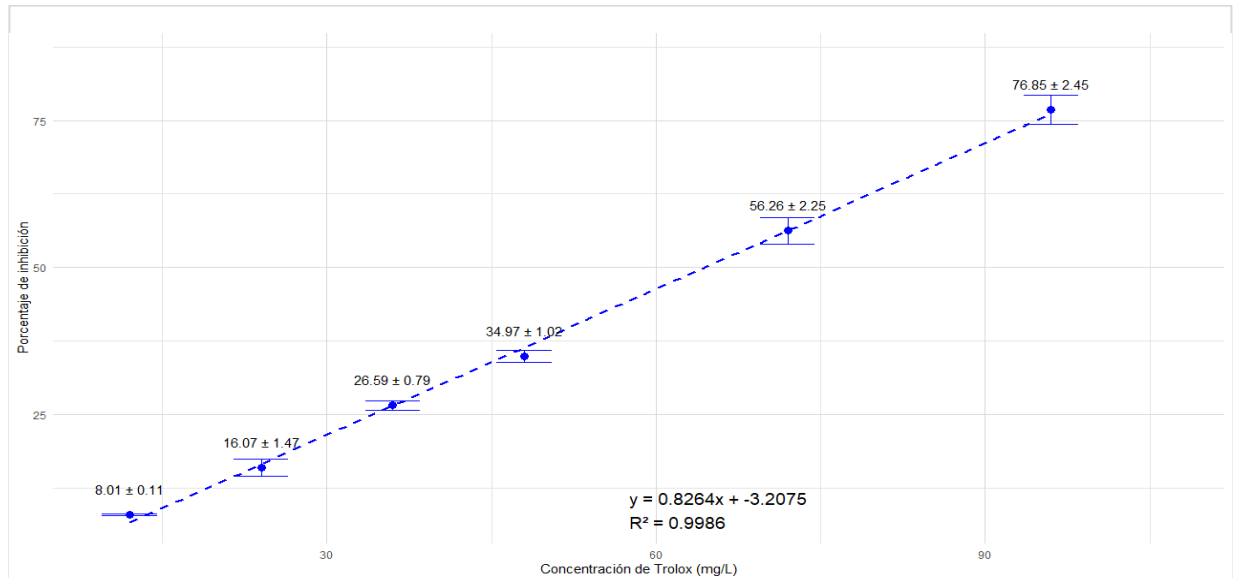


Gráfico 7: curva de calibrado de Trolox para determinación de capacidad antioxidante

5.3.1.- Cuantificación de capacidad antioxidante en hojas de diversas variedades de palto:

Mediante la ecuación de la recta $y = 0,8264x - 3.2075$ se calculó la capacidad antioxidante de las siete variedades de hojas de palto.

Los gráficos 8 y 9 presentan la capacidad antioxidante DPP, expresada como mg de trolox/g de muestra en base seca. para las siete variedades y ambos estadios.

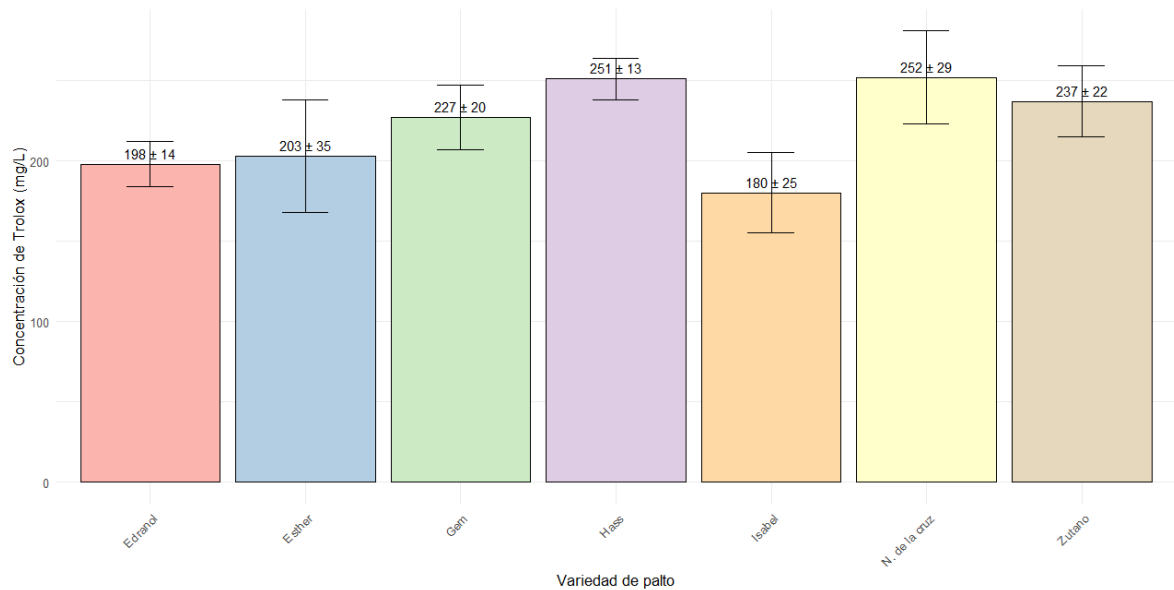


Gráfico 8: Capacidad antioxidante, expresada como mg de trolox/g de muestra en base seca, por variedad en estadio 1.

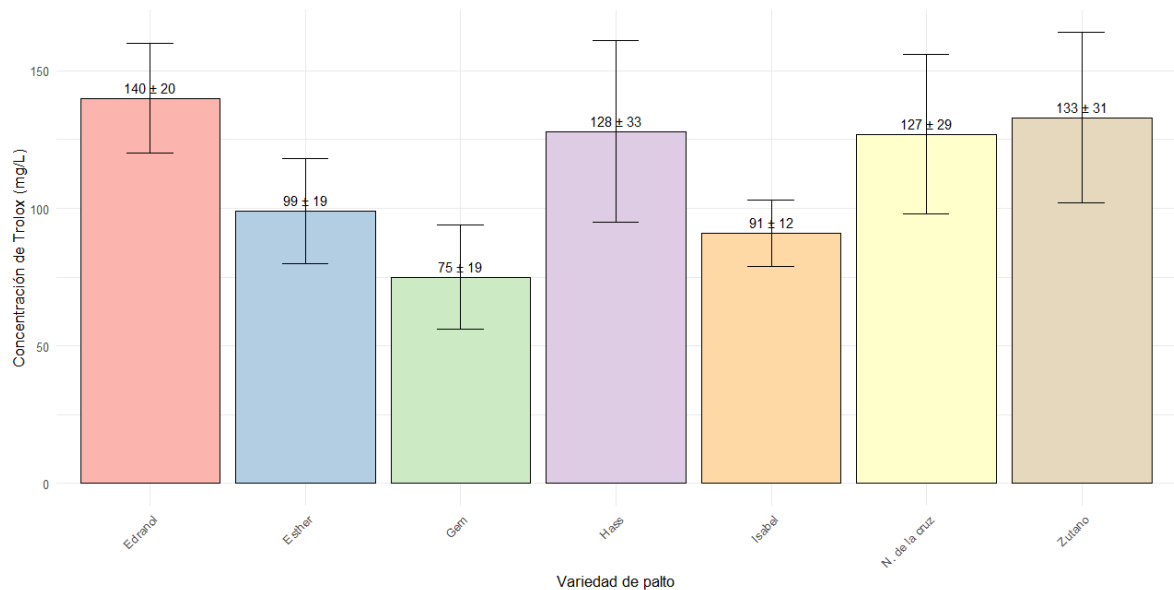


Gráfico 9:
Capacidad antioxidante, expresada como mg de trolox/g de muestra en base seca, por variedad en estadio 6.

Tras aplicar el análisis ANOVA y Tukey podemos decir que la capacidad antioxidante DPPH, presentó una interacción significativa entre la variedad y el estadio de desarrollo ($p < 0,001$), lo que evidencia un comportamiento diferencial entre los genotipos. Esto indica que las variaciones observadas en la concentración de trolox entre las variedades no se deben al azar, sino que corresponden a diferencias reales atribuibles a las características propias de cada genotipo.

Esto nos permite concluir que la actividad antioxidante, evaluada por el ensayo DPPH, mostró un patrón claramente dependiente de la madurez foliar. En todas las variedades, las hojas jóvenes (estadio 1) presentaron valores significativamente superiores a los observados en hojas maduras (estadio 6), con reducciones de entre 30 % y 60 %. Este comportamiento está directamente correlacionado con las tendencias observadas en AC y FT, indicando que la capacidad radicalaria depende en gran medida de la concentración de compuestos fenólicos. En el estadio 1, *Hass* y *Negra de la Cruz* exhibieron la mayor actividad antioxidante, seguidas por *Zutano* y *Gem*, mientras que *Edranol* e *Isabel* mostraron los niveles más bajos. En el estadio 6, aunque los valores absolutos disminuyeron, se mantuvo la misma jerarquía relativa entre variedades, a excepción de *Edranol* que paso a ser la de mayor concentración en este estadio. Estos resultados demuestran que la capacidad antioxidante foliar está determinada tanto por el genotipo como por la edad fisiológica de la hoja.

La edad fisiológica de la hoja afecta su capacidad antioxidante ya que, durante el desarrollo foliar se producen cambios marcados en la composición de pigmentos. En las hojas jóvenes, la acumulación de antocianinas y otros flavonoides en vacuolas actúa como una pantalla óptica que atenúa la radiación excesiva, reduciendo la entrada de fotones a los cloroplastos y minimizando así la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debidas al exceso lumínico. Por el contrario, al madurar la hoja se observa un descenso en la proporción relativa de estos pigmentos fotoprotectores no fotosintéticos, acompañado por un aumento de pigmentos fotosintéticos como clorofilas y carotenoides que optimizan la captura de luz para la fotosíntesis. En consecuencia, el rol principal de los pigmentos cambia: en hojas jóvenes predominan estrategias de protección ante estrés lumínico, mientras que en hojas maduras predominan pigmentos orientados a la eficiencia fotosintética y al uso óptimo de la luz disponible. (Agati et al., 2021)

Como se ha mencionado anteriormente hay registros bibliográficos que avalan y explican la diferencia de compuestos fenólicos entre variedades de la misma especie por factores diversos, tales como condiciones ambientales, estado fenológico y diferencias genotípicas (Irakli et al., 2021; Pérez et al., 2023). Sin embargo, para el presente estudio todas las muestras fueron recolectadas del mismo lugar, por lo que se puede decir que las condiciones ambientales eran similares, por lo cual la diferencia en la actividad antioxidante observada se puede atribuir a factores genéticos propios de cada variedad.

En los resultados obtenidos podemos observar un valor de varianza relativamente alto, lo que se puede explicar ya que el ensayo DPPH presenta varias limitaciones que comprometen su capacidad para reflejar con precisión la actividad antioxidante real de un extracto. Según Schaich et al. (2015), los resultados pueden variar significativamente debido a las diferencias estructurales entre compuestos fenólicos, que reaccionan con el radical DPPH mediante mecanismos distintos (transferencia de hidrógeno o de electrones), generando velocidades de reacción desiguales. Además, la presencia de agua en el disolvente afecta la estabilidad y solubilidad tanto del DPPH como de ciertos antioxidantes, alterando la cinética y la extensión de la reacción. A esto se suman problemas asociados al carácter lipofílico del radical DPPH, que limita su interacción con antioxidantes más polares, y a la interferencia por color o turbidez de las muestras, que puede modificar las lecturas espectrofotométricas. En conjunto, estos factores hacen que el DPPH sea más adecuado para comparaciones cualitativas que para una cuantificación absoluta de la capacidad antioxidante (Schaich et al., 2015).

Cabe señalar que para los ensayos de PT, FT y capacidad antioxidante, a pesar de que presentaron una varianza alta con respecto al promedio, los datos obtenidos fueron sometidos a test de Grubbs y Dixon para detectar datos atípicos, en ambos casos los resultados obtenidos indican que no había presencia de datos atípicos en ninguno de los grupos analizados. Otra posible razón para el alto valor de la varianza es que la técnica aplicada es manual de múltiples repeticiones, lo cual la vuelve susceptible al error humano.

5.4.- Identificación de ácido clorogénico (AC) y quercetina galactósido (QG) mediante HPLC:

Al comparar los cromatogramas y espectros obtenidos en el análisis cromatográfico de los estándares de ácido clorogénico y quercetina galactósido y de los extractos de las siete variedades en ambos estadios, podemos confirmar la presencia tanto de AC como de QG en todas las muestras analizadas, ratificados por la comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción UV-Visible. Además, se encontró rutina en las variedades Edranol, Hass, Gem y Negra de la cruz en el estadio uno, pero no fue cuantificada. Bajo estos mismos criterios pudimos descartar la presencia en las muestras de ácido cafeico, quercetina, ácido ferúlico, ácido neoclorogénico y quercitrina. Cabe señalar que la longitud de onda que presentaba máxima absorbancia el ácido clorogénico fue 280nm, mientras que quercetina galactósido presento a 365nm.

Las figuras 1, 2 y 3 presentan respectivamente los cromatogramas a 280nm del estándar de ácido clorogénico, la variedad Edranol en el estadio uno y para el estadio seis de la variedad Isabel a modo de ejemplo, ya que es posible identificar el ácido clorogénico en las siete variedades y en ambos estadios.

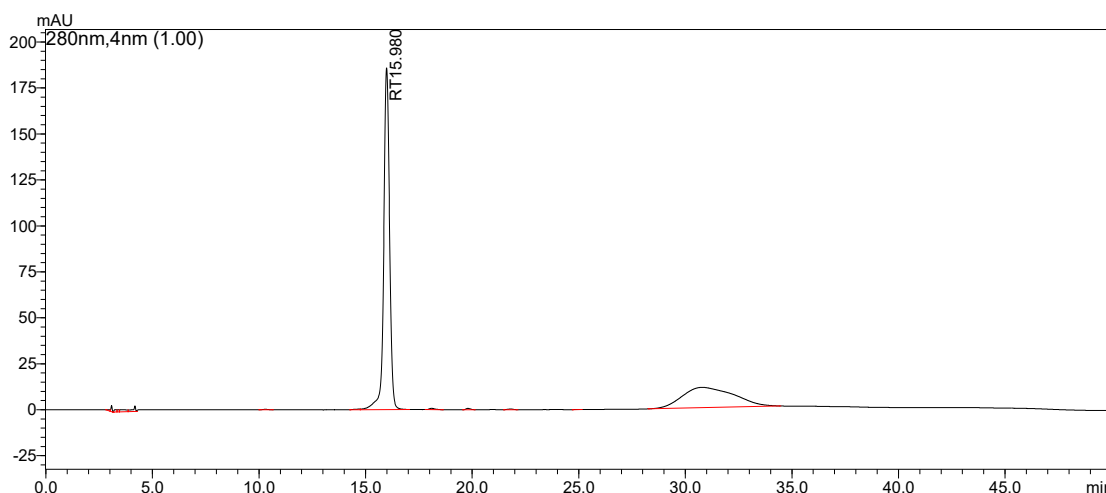


Figura 1: Cromatograma del estándar de ácido clorogénico, de concentración 111mg/L y un tiempo de retención de 15,980 min.

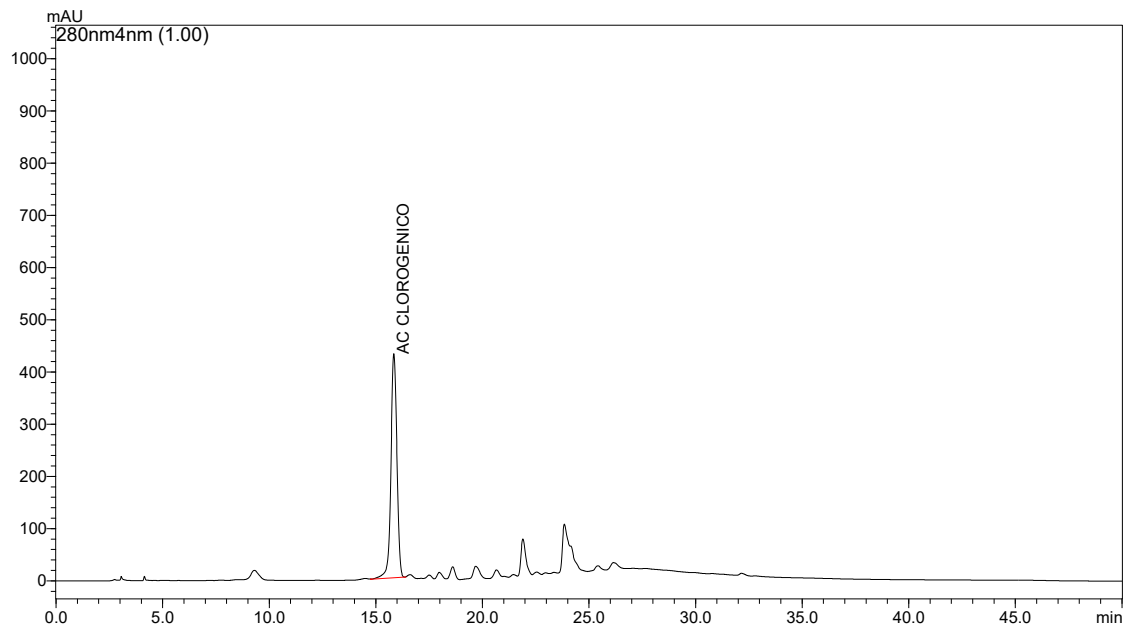


Figura 2: Cromatograma de un extracto de *Persea americana* var. Edranol, estadio 1, con pico cromatográfico de ácido clorogénico a un tiempo de retención de 15,839 min

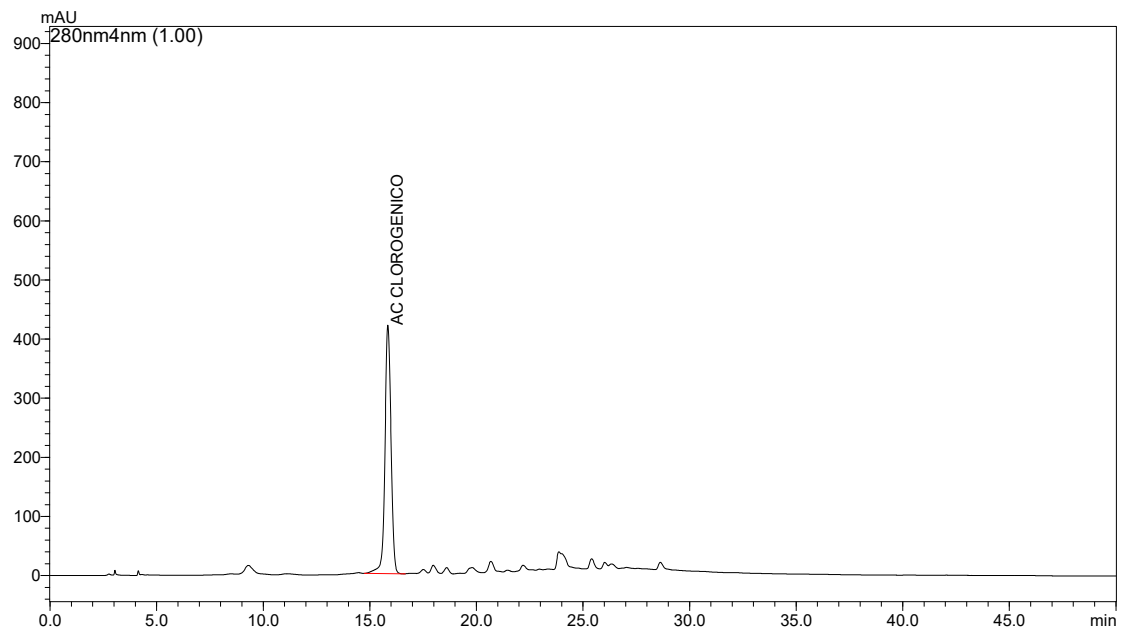


Figura 3: Cromatograma de un extracto de *Persea americana* var. Isabel, estadio 6, con pico cromatográfico de ácido clorogénico a un tiempo de retención de 15,840 min.

Las figuras 4, 5 y 6 presentan respectivamente los cromatogramas a 365nm del estándar, la variedad Gem en el estadio inmaduro y la variedad Zutano para el estadio maduro a modo de ejemplo y es posible identificar la quercetina galactósido en todas las muestras analizadas.

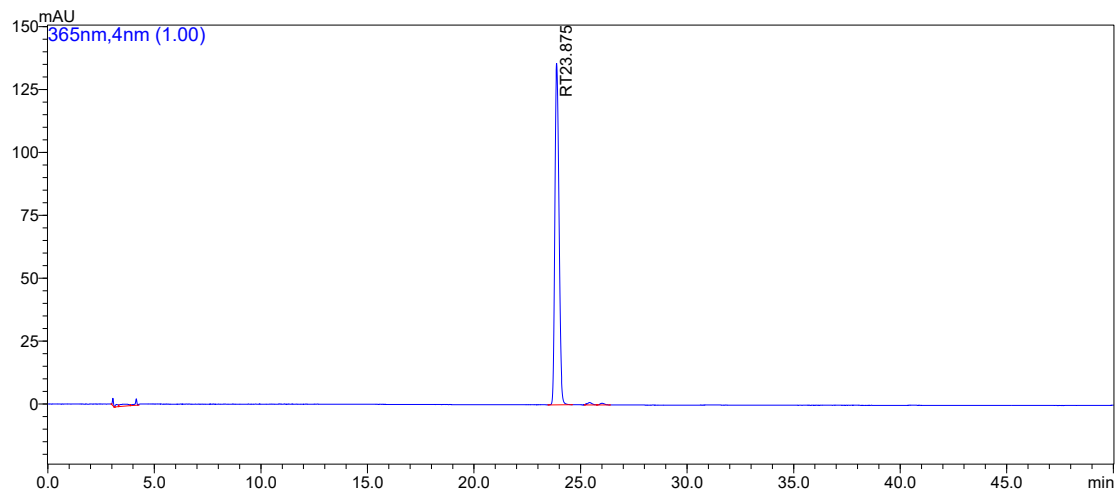
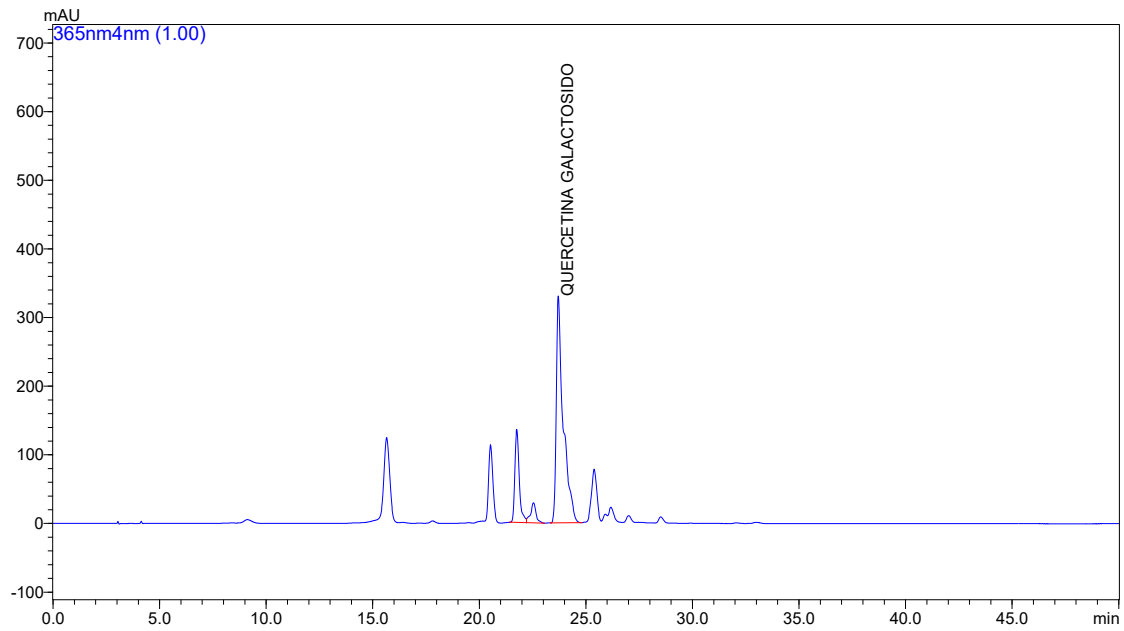


Figura 4: Cromatograma del estándar de quercetina galactosido de concentración 30 mg/L y un tiempo de retención de 23,874 min



- Figura 5: Cromatograma un extracto de *Persea americana* var. Gem, estadio 1, con pico cromatográfico de quercetina galactósido a un tiempo de retención de 23,702 min.

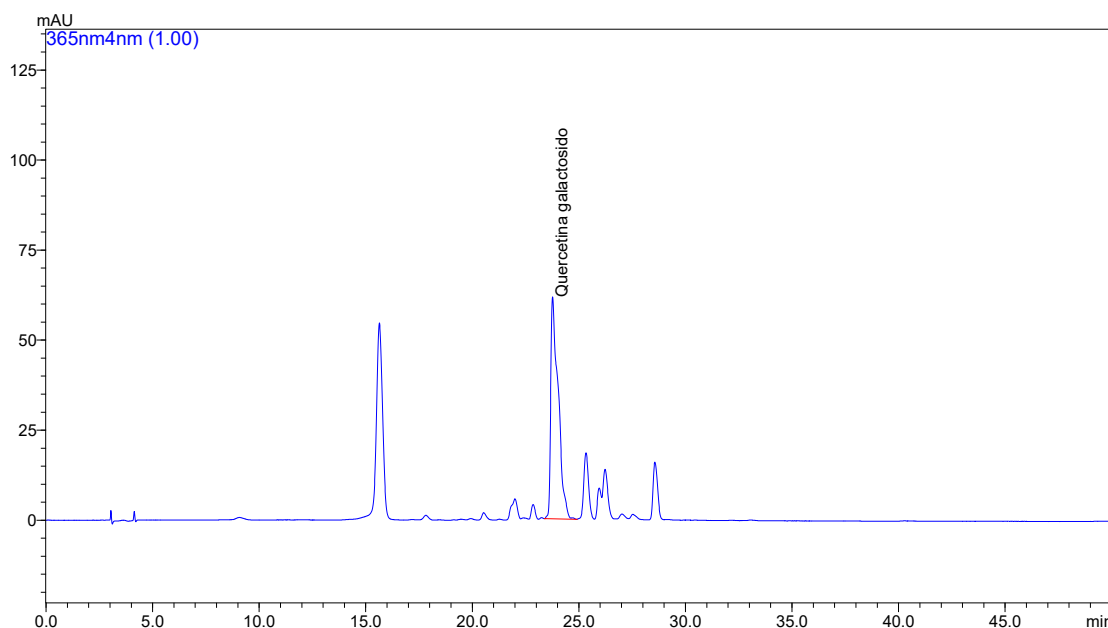


Figura 6: Cromatograma un extracto de *Persea americana* var. Zutano, estadio 6, con pico cromatográfico de quercetina galactósido a un tiempo de retención de 23,587 min.

4.5.- Cuantificación de ácido clorogénico:

Para la generar la curva de calibrado de ácido clorogénico, se inyectaron 5 puntos de concentraciones conocidas del estándar de ácido clorogénico en el rango de concentraciones entre 94 y 471 mg/L, obteniéndose las respectivas áreas cromatográficas. El gráfico 10, representa la curva de calibrado obtenida de ácido clorogénico presento una relación lineal entre la concentración y el área medida, dando como resultado una ecuación de la recta $y = 31761x - 337431$, además el valor de R^2 es de 0,9996. Este valor, al ser cercano a 1, indica que existe una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas del estándar y las absorbancias medidas, lo que confirma un alto grado de ajuste del modelo lineal. Además, al aplicar la prueba de "t de Student", el valor de t_{cal} (84,8) es mayor al valor de t_{tab} (3,2), por lo que se rechaza hipótesis nula H_0 , concluyéndose que la correlación lineal es significativa para la probabilidad considerada. Esta curva de calibrado fiable nos permite cuantificar la concentración de ácido clorogénico en las muestras analizadas al interpolar las absorbancias obtenidas de las mismas con la curva de calibrado.

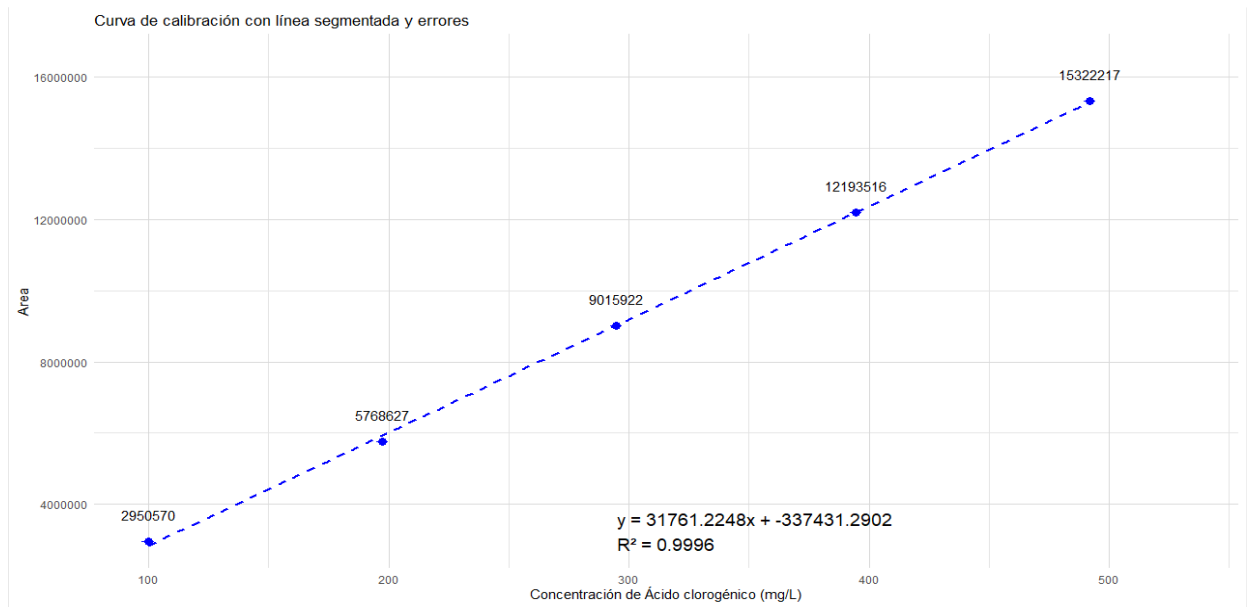


Gráfico 10: Curva de calibrado de ácido clorogénico

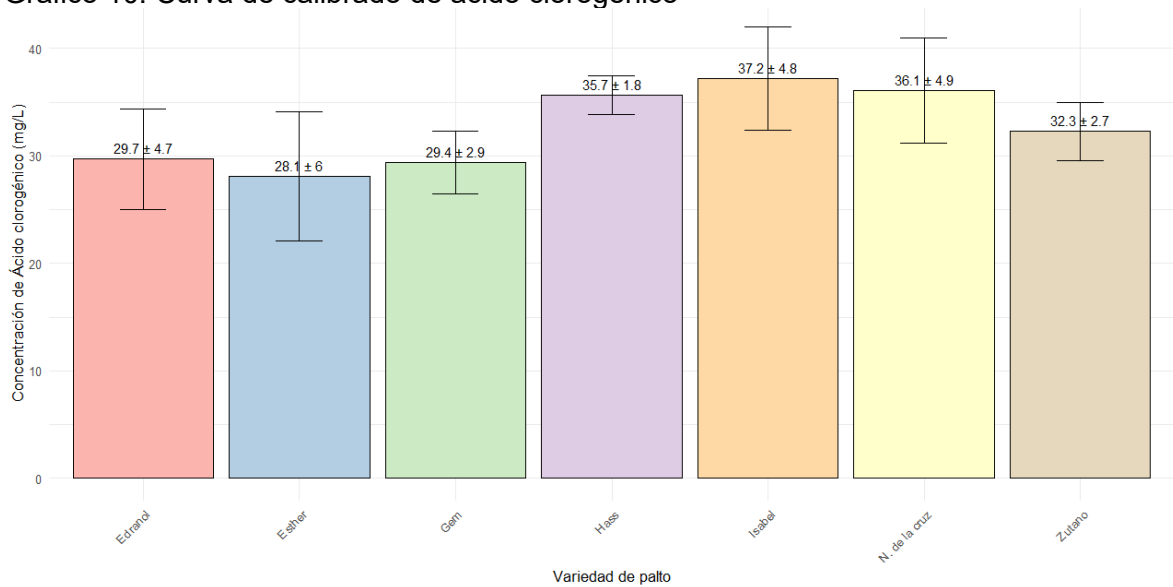


Gráfico 11: Contenido de ácido clorogénico, mg/g de muestra en base seca, por variedad en estadio 1.

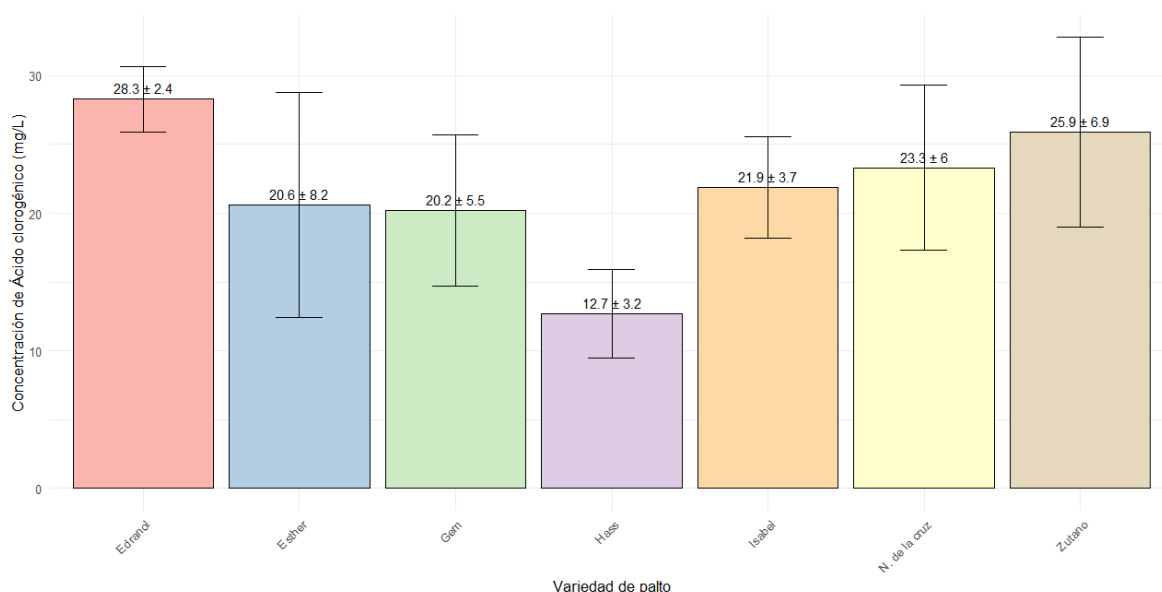


Gráfico 12: Contenido de ácido clorogénico, mg/g de muestra en base seca, por variedad en estadio 6.

El contenido de AC presentó diferencias significativas entre estadios y variedades ($p < 0.001$). Podemos observar en el gráfico 11 que el contenido de AC, en las variedades del estadio 1 presentan mayores valores de este, en particular las más altas se observaron en *Isabel*, *Negra de la Cruz* y *Hass*, mientras que *Esther* y *Edranol* presentaron los valores más bajos. En el estadio 6, las diferencias entre variedades fueron menos marcadas, pero *Zutano* y *Negra de la Cruz* mantuvieron niveles superiores. Estos resultados confirman que, aunque la reducción con la madurez es general, la magnitud del cambio depende del genotipo, ya que en general, todas las variedades mostraron una disminución marcada de AC desde hojas jóvenes (E1) hacia hojas maduras (E6), observable en el gráfico 12, manteniendo el mismo patrón de jerarquía en la mayoría de los genotipos, a excepción de Edranol que entre ambos estadios mantiene valores similares. Este comportamiento sugiere un efecto ontogénico dominante, donde la maduración foliar reduce la capacidad biosintética o el almacenamiento de compuestos fenólicos tipo ácido clorogénico, en concordancia con estudios que demuestran variaciones ontogénicas en el contenido fenólico durante la maduración foliar de *Persea americana* (Kingne et al., 2019).

Como se indicó previamente, existen antecedentes bibliográficos que respaldan y describen las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos entre distintas variedades de una misma especie, influenciadas por diversos factores como el ambiente, el estado fenológico o las diferencias genéticas (Pérez et al., 2023; Irakli et al., 2021). No obstante, en este estudio todas las muestras fueron recolectadas en un mismo sitio, por lo que compartían condiciones ambientales similares. Por ello, las diferencias observadas en las concentraciones de AC podrían explicarse principalmente por las características genéticas propias de cada variedad.

4.6.- Cuantificación de quercetina galactosido:

Para la cuantificación de QG presente en las muestras, se inyectaron 4 puntos de concentraciones conocidas del estándar de QG en el rango de concentraciones entre 15 y 180 mg/L obteniéndose las respectivas áreas cromatográficas.

La curva de calibrado obtenida de QG presentó una relación lineal entre la concentración conocida del estándar y el área medida, dando como resultado una ecuación $y = 63165x - 83104$, además el valor de R^2 es de 0,9980. Este valor, al ser cercano a 1, indica que existe una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas del estándar y las absorbancias medidas, lo que confirma un alto grado de ajuste del modelo lineal. Además, al aplicar la prueba de "t de Student", el valor de t_{cal} (31,8) es mayor al valor de t_{tab} (4,3), por lo que se rechaza hipótesis nula H_0 , concluyéndose que la correlación lineal es significativa para la probabilidad considerada. Esta curva de calibrado fiable nos permite cuantificar la concentración de QG en las muestras analizadas al interpolar las absorbancias obtenidas de las mismas con la curva de calibrado.

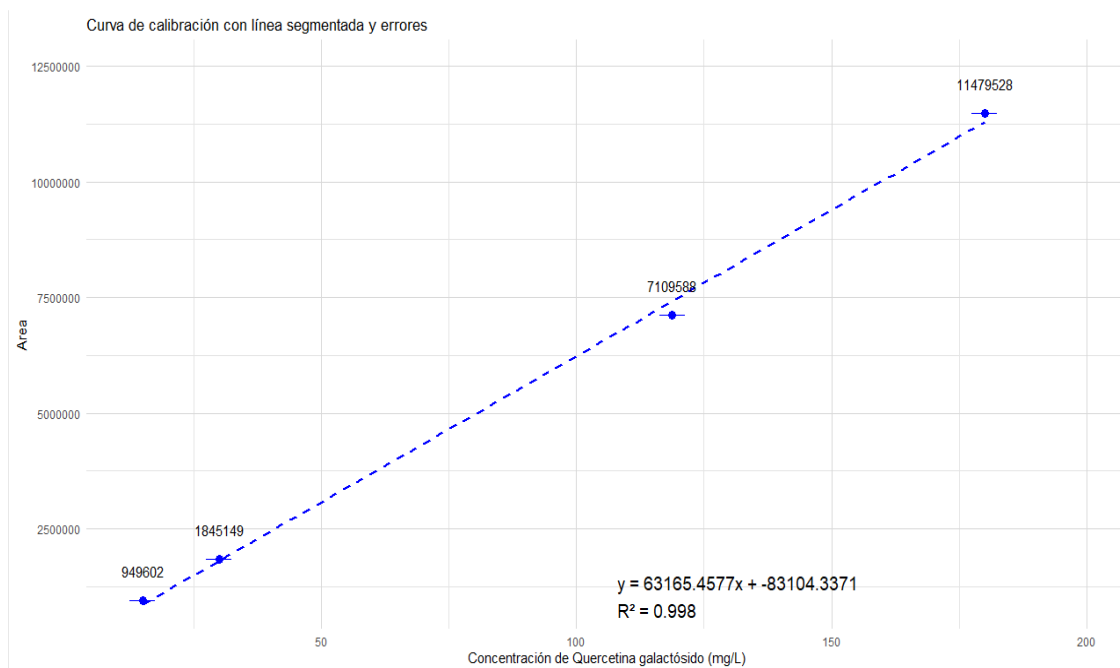


Gráfico 13: curva de calibrado de quercetina galactósido.

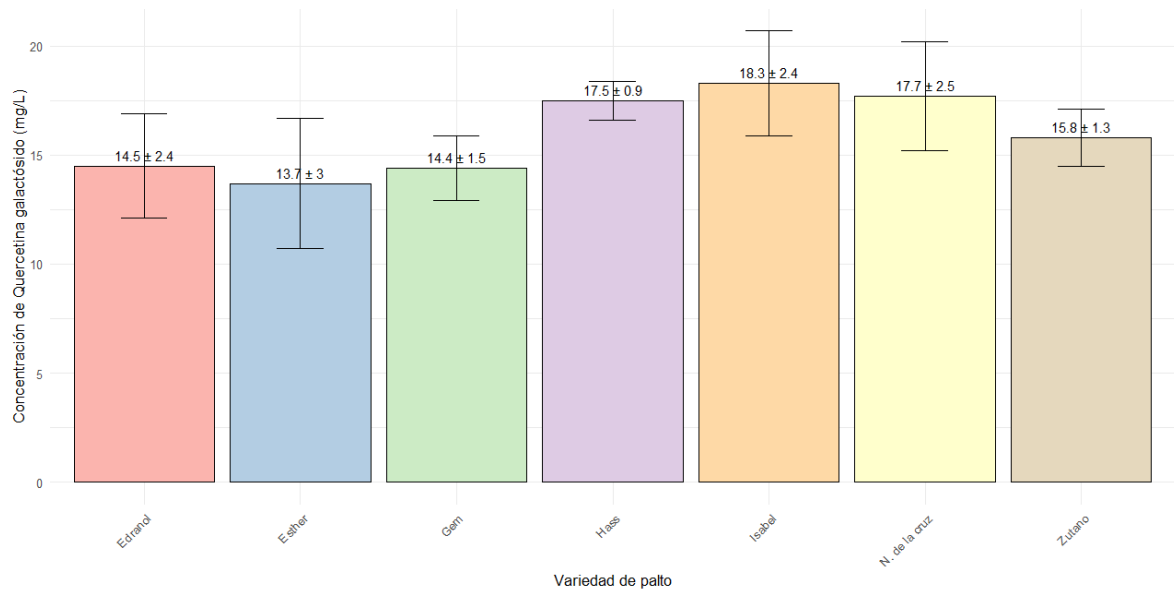


Gráfico 14: Contenido de quercetina galactósido, mg/g de muestra en base seca, por variedad en estadio 1.

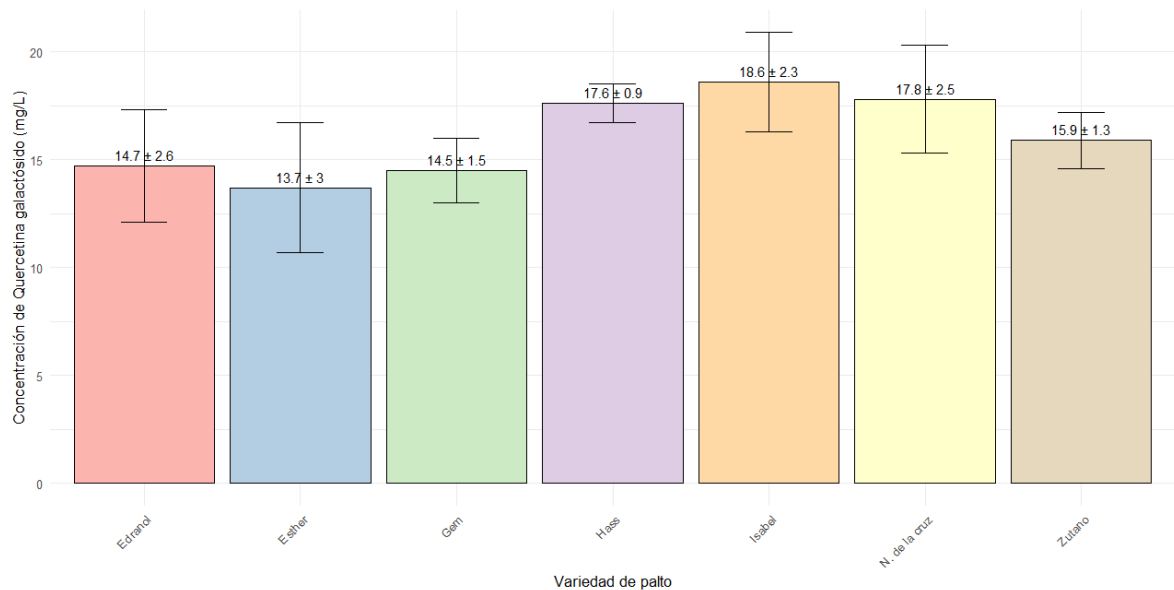


Gráfico 15: Contenido de quercetina galactósido, mg/ g de muestra en base seca, por variedad en estadio 6.

Los gráficos 14 y 15, muestran que el contenido de QG se mantuvo estable entre los dos estadios evaluados, sin diferencias significativas dentro de cada variedad ($p > 0,05$). Este resultado sugiere que el nivel de QG es independiente del grado de madurez y que su contenido responde principalmente a diferencias genéticas entre variedades. Las comparaciones entre genotipos mostraron que *Isabel*, *Negra de la Cruz* y *Hass* presentaron los valores más altos en ambos estadios, mientras que *Esther* y *Edranol* mantuvieron los valores más bajos. En consecuencia, QG puede considerarse un marcador metabólico

varietal estable, útil para discriminar genotipos independientemente del estado fisiológico de la hoja.

Tal como se mencionó antes, la literatura científica reporta que el contenido de compuestos fenólicos puede variar entre variedades pertenecientes a la misma especie, debido a factores como las condiciones ambientales, el estado de desarrollo de la planta y su genotipo (Irakli et al., 2021; Pérez et al., 2023). Sin embargo, en este trabajo todas las muestras fueron tomadas desde la misma ubicación, lo que garantizó condiciones ambientales equivalentes. En consecuencia, las diferencias detectadas en las concentraciones de QG se atribuyen principalmente a la variabilidad genética de cada variedad.

5.- Conclusión:

Como conclusión podemos decir que, en conjunto, las variables AC, FT y DPPH presentan disminuciones consistentes con la madurez foliar, en cambio PT muestra respuestas dependientes del genotipo y por otra parte, QG se mantiene estable entre los estadios evaluados. Las diferencias entre variedades fueron significativas en las 5 variables metabólicas analizadas, aunque con distinta magnitud, esto evidencia la existencia de mecanismos metabólicos diferentes entre genotipos en la regulación de compuestos fenólicos. El ácido clorogénico y los flavonoides totales explican gran parte de la diferencia observada entre variedades en la actividad antioxidante, indicando una relación metabólica estrecha entre ambos y su contribución en la respuesta antioxidante de las hojas. Por su parte, la estabilidad de la quercetina galactósido sugiere su uso potencial como marcador distintivo para cada variedad, por su capacidad de diferenciar entre genotipos, ya que es independiente del estadio de desarrollo.

Desde otra perspectiva, estos resultados confirman que la madurez de la hoja, modula de manera consistente el perfil de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, reflejando modificaciones en el metabolismo secundario, los que se pueden asociar a cambios en la función fotosintética y en la exposición a estrés oxidativo que sufra la planta. Cabe señalar que la intensidad y tipos de modificaciones dependen del genotipo evaluado, lo que refuerza la importancia de considerar la variabilidad genética de las capacidades antioxidantes en tejidos vegetales.

La combinación de marcadores como FT y DPPH, permite avanzar hacia una caracterización más precisa del comportamiento metabólico diferenciado por variedades, lo que tiene posibles aplicaciones en selección de cultivares, manejo agronómico y estudios comparativos de fisiología vegetal.

6.- Referencias

1. **Adesola**, A., Abiodun, M., & Steve, I. (2025, Marzo). Nutritional, phytochemical and functional properties of avocado (*Persea Americana* Mill) leaf: Evaluation of its derivative extraction. *Food Chemistry Advances*, 6, 100869. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100869>
2. **Agati**, G., Guidi, L., Landi, M., & Tattini, M. (2021, Agosto 27). Anthocyanins in photoprotection: knowing the actors in play to solve this complex ecophysiological issue. *New Phytologist*, 232(6), 2228-2235. <https://doi.org/10.1111/nph.17648>
3. **Alcaraz**, M. L., & Hormaza, J. I. (2014, Diciembre 17). Optimization of controlled pollination in avocado (*Persea americana* Mill., Lauraceae). *Scientia Horticulturae*, 180, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.022>
4. **Araujo**, G., Silvano, H., & Pastore, G. (2018, Marzo). Modification and validation of Folin Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. *Brazilian Journal of Food Research*, 9(1), 125-140.
5. **Araújo**, R. G., Rodriguez, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018, Octubre). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
6. **Arnason**, J., Cal, V., Pesek, T., Awad, R., Bourbonnais-Spear, N., Collins, S., Otarola-Rojas, M., Walshe-Roussel, B., Audet, P., Anh Ta, C., Balick, M., & Ferrier, J. (2021, Julio 12). A review of ethnobotany and ethnopharmacology of traditional medicines used by Q'eqchi' Maya Healers of Xna'ajeb' aj Ralch'o'och', Belize. *Botany*, 100(2), 219-230. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0069>

7. **Aslam**, M. (2020, Septiembre). Introducing Grubbs's test for detecting outliers under neutrosophic statistics – An application to medical data. *Journal of King Saud University - Science*, 32(6), 2696-2700. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.06.003>
8. **Aslam**, M. (2020, Abril 01). On detecting outliers in complex data using Dixon's test under neutrosophic statistics. *Journal of King Saud University-Science*, 32(3), 2005-2008. doi: 10.1016/j.jksus.2020.02.003
9. **Berdonces**, J. L. (2003). Historia de la fitoterapia. *Natura Medicatrix*, 21(3), 142-152.
10. **Bhore**, S. J., & Sloan, H. (2021, Diciembre 31). (PDF) *The Avocado (Persea americana Mill.): A Review and Sustainability Perspectives*. ResearchGate. Retrieved June 18, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/357601300_The_Avocado_Persea_america_Mill_A_Review_and_Sustainability_Perspectives
11. **Bhuyan**, U., & Handique, J. (2022, Septiembre 27). Chapter 6 - Plant polyphenols as potent antioxidants: Highlighting the mechanism of antioxidant activity and synthesis/development of some polyphenol conjugates. *Studies in Natural Products Chemistry*, 75, 243-266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91250-1.00006-9>
12. **Castillo-Argaez**, R., Konkol, J. L., Vargas, A. I., Ploetz, R. C., & Schaffer, B. (2021, Septiembre 20). Disease severity and ecophysiology of rootstock/scion combinations of different avocado (*Persea americana* Mill.) genotypes in response to laurel wilt. *Scientia Horticulturae*, 287, 110250. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110250>

13. **Cao, Q.**, Yuan, X., Zhang, C., Deng, X., Jiang, Y., & Wang, B. (2025, Abril 22). An opinion on the roles of phenylalanine ammonia-lyase in the browning of fresh-cut fruit and vegetables. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1561620. 10.3389/fnut.2025.1561620
14. **Chen, J.**, & Zhu, F. (2025, Abril 11). Characterization of physicochemical properties, fatty acids, flavor volatiles and phenolic compounds of avocado varieties. *Food Chemistry*, 482, 143533.
15. **Cheng, J.**, Zhou, C., Xie, Y., Wang, M., Zhou, C., Shuang Li, X., Du, Y., & Lu, F. (2022, Mayo 12). A new method for simultaneous determination of 14 phenolic acids in agricultural soils by multiwavelength HPLC-PDA analysis. *RSC Advances*, 12(23), 14939-14944. <https://doi.org/10.1039/d1ra09433e>
16. **Deepika**, & Maurya, P. K. (2022, Abril 13). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>
17. **Dogara, A. M.**, Bradosty, S. W., Al-Zahrani, A. A., Hamad, S. W., & Almalki, H. D. (2025, Enero 13). Ethnobotany, bioactive compounds and pharmacology of *Syzygium guineense* (Willd.) DC: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 339, 119149. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.119149>
18. **Domingo-Fernández, D.**, Gadiya, Y., Mubeen, S., Bollerman, T. J., Healy, M., Chanana, S., Sadovsky, R. G., Healey, D., & Colluru, V. (2023, Septiembre 15). Modern drug discovery using ethnobotany: A large-scale cross-cultural analysis of traditional medicine reveals common therapeutic uses. *iScience*, 26(9), 107729. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107729>

19. **Ebrahimi, P., & Lante, A.** (2021, Septiembre 21). Polyphenols: A Comprehensive Review of their Nutritional Properties. *The Open Biotechnology Journal*, 15, 164-172. DOI: 10.2174/1874070702115010164
20. **Ebrahimi, P., Lante, A., & Grossmann, L.** (2025, Mayo 31). Protein-polyphenol complexation vs. conjugation: A review on mechanisms, functional differences, and antioxidant-emulsifier roles. *Food Hydrocolloids*, 169, 111590. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111590>
21. **Egea, T., Signorini, M. A., Bruschi, P., Rivera, D., Obón, C., Alcaraz, F., & Palazón, J. A.** (2015, Diciembre 4). Spirits and liqueurs in European traditional medicine: Their history and ethnobotany in Tuscany and Bologna (Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 241-255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.053>
22. **Gardiazabal, F.** (2009). Palto y cítricos: generalidades del cultivo. In *Manejo de plagas en paltos y cítricos*. (pp. 15-40). R. Ripa.
23. **Goyal, A., Deep Singh, V., Solanki, K., & Verma, A.** (2024, Junio 4). Revealing the Curative Possibilities: A Comprehensive Exploration of Caffeic Acid. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 26(9), 1303 - 1313. DOI: 10.2174/0113892010309341240517071344
24. **Guevara, W., Hidalgo-Alcázar, C., & Rojas, J.** (2021, Abril 30). Analysis of the Chilean avocado (PALTA) agroindustry in the international market. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 37(1), 54-64. <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-6aawg30006>
25. **Gumustepe, L., Kurt, N., Aydın, E., & Ozkan, G.** (2023, Julio 6). Comparison of ohmic heating- and microwave-assisted extraction techniques for avocado leaves

valorization: Optimization and impact on the phenolic compounds and bioactivities.

Food Science & Nutrition, 11(9), 5609-5620. doi: 10.1002/fsn3.3556.

26. **Hosseini** Hassanpour, S., & Doroudi, A. (2023, Agosto). Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 13(4), 354–376.
10.22038/AJP.2023.21774
- 27.
28. **Hussain**, B., Abbas, Z., Alam, J., Harun, N., Mulk Khan, S., Ahmad, Z., Han, H., Yoo, S., & Raposo, A. (2024, Abril 15). Cross-cultural ethnobotany of the Baltis and Shinas in the Kharmand district, Trans-Himalaya India-Pakistan border. *Heliyon*, 10(7), e28613. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28613>
29. **Irakli**, M., Kargiotidou, A., Tigka, E., Beslemes, D., Fournomiti, M., Pankou, C., Stavroula, K., Tsivelika, N., & Vlachostergios, D. (2021, Junio 4). Genotypic and Environmental Effect on the Concentration of Phytochemical Contents of Lentil (*Lens culinaris* L.). *Agronomy*, 11(6), 1154. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061154>
30. **Ircanaupa**, E. (2009, Noviembre 13). Propagacion clonal de paltos {*Persea americana* Mill.) por etiolación. Topara-Chincha [Tesis para obtener el título profesional de ingeniera agrónoma]. In *UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS*.
31. **Instituto de Salud Pública de Chile**. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos (Guía Técnica N.º 1). ISP.

32. **Jang**, E. (2022, Julio 25). Hyperoside as a Potential Natural Product Targeting Oxidative Stress in Liver Diseases. *Antioxidants*, 11(8), 1437. <https://doi.org/10.3390/antiox11081437>
33. **Jesus**, D., Oliveira, J. R., Oliveira, F. E., Higa, K. C., Junqueira, J. C., Jorge, A. O., Back-Brito, G. N., & Oliveira, L. D. (2015, Octubre 29). Persea americana Glycolic Extract: In Vitro Study of Antimicrobial Activity against Candida albicans Biofilm and Cytotoxicity Evaluation. *The Scientific World Journal*, 2015(1), 531972. <https://doi.org/10.1155/2015/531972>
34. **Kingne**, F., Tonfack, F., Doungue, H., SriLakshmi, M., & Macaire, H. (2019, Enero). Phenolic content and antioxidant activity of young and mature mango (Mangifera indica) and avocado (Persea americana) leave extracts. *Int*
35. **Kiokias**, S., & Oreopoulou, V. (2021, Septiembre 6). A Review of the Health Protective Effects of Phenolic Acids against a Range of Severe Pathologic Conditions (Including Coronavirus-Based Infections). *Molecules*, 26(17), 5405. <https://doi.org/10.3390/molecules26175405>
36. **Kumar**, N., Goel, N., & Simal-Gandara, J. (2024). Chapter 1 - Phenolic acids: a brief overview. In *Advancement of Phenolic Acids in Drug Discovery* (pp. 1-14). Naresh Kumar. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18538-0.00008-1>
37. **Lyu**, X., Tuncay, A., Barrow, C., Dunshea, F., & Suleria, H. (2023, Enero 12). Phenolic Compounds Profiling and Their Antioxidant Capacity in the Peel, Pulp, and Seed of Australian Grown Avocado. *Antioxidants*, 12(1), 185. <https://doi.org/10.3390/antiox12010185>

38. **Marković**, S., & Tošović, J. (2016, Noviembre 1). Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids. *Food Chemistry*, 210, 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.019>
39. **Medda**, S., Dessena, L., & Mulas, M. (2020, Septiembre 3). Monitoring of the PAL Enzymatic Activity and Polyphenolic Compounds in Leaves and Fruits of Two Myrtle Cultivars during Maturation. *Agriculture*, 10(9), 389. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090389>
40. **Mishra**, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012, Febrero 15). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH radical dot assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
41. **Olaoluwa** Agunloye, M., Owu, D., Onaadepo, O., Nnaemeka Ugwu, F., & Michael Ogunyemi, O. (2025, Julio 25). Phytochemical characterization of ethanolic and ethyl acetate extracts of avocado *Persea americana* leaves by FT-IR and GC-MS reveals potential bioactive compounds. *Scientific Reports*, 15, 27035. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-12150-z>
42. **Olas**, B. (2024, Diciembre 19). The Pulp, Peel, Seed, and Food Products of *Persea americana* as Sources of Bioactive Phytochemicals with Cardioprotective Properties: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(24), 13622. <https://doi.org/10.3390/ijms252413622>
43. **Owolabi**, M. A., Abass, M. M., Emeka, P. M., Jaja, S. I., Nnoli, M., & Dosa, B. O. (2010, Septiembre). Biochemical and histologic changes in rats after prolonged administration of the crude aqueous extract of the leaves of *Vitex grandifolia*. *Pharmacognosy Research*, 2(5), 273-278. doi: 10.4103/0974-8490.72322

44. **Park**, S., Nam, Y. H., Rodriguez, I., Parks, J. H., Kwak, H. J., Oh, Y., Oh, M., Park, M. S., Lee, K. W., Lee, J. S., Kim, D. H., Park, Y. H., Moon, I. S., Choung, S.-Y., Jeong, K. W., Hong, B. N., Kang, T. H., & Kim, S. H. (2019, Noviembre). Chemical constituents of leaves of *Persea americana* (avocado) and their protective effects against neomycin-induced hair cell damage. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 739-743. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.08.004>
45. **Pedreiro**, S., Lopes, M., Sanchez, A., & Ramos, F. (2024). Chapter 4A - Antioxidant methods, in vitro and in vivo studies of phenolic acids. In *Advancement of Phenolic Acids in Drug Discovery* (pp. 61-144). Naresh Kumar. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18538-0.00013-5>
46. **Pérez**, M., Vera, A., Mondragón, D., Sandoval, S., Carrillo, J., Mayek, N., & Chávez, J. (2023, Septiembre 6). Effects of Annual Growth Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in the Roots of *Eryngium montanum*. *Plants*, 12(18), 3192. [10.3390/plants12183192](https://doi.org/10.3390/plants12183192)
47. **Rodríguez-Martínez**, B., Romaní, A., Eibes, G., Garrote, G., Gullón, B., & del Río, P. (2022, Noviembre). Potential and prospects for utilization of avocado by-products in integrated biorefineries. *Bioresource Technology*, 364, 128034. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128034>
48. **Sánchez-Quezada**, V., Velázquez-Guadarrama, N., Mendoza-Elizalde, S., Hernández-Iturriaga, M., Vázquez Landaverde, P., & Loarca-Piña, G. (2024, Septiembre 15). Bioaccessibility of bioactive compounds present in *Persea americana* Mill. seed ingredient during oral-gastric digestion with antibacterial capacity against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, 331, 118259. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118259>

49. **Schaich**, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015, Octubre). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18(B), 782-796. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>
50. **Sharma**, S., Kaul, S., & Kumar Dhar, M. (2024, Julio). A systematic review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Dioscorea bulbifera* L. (Dioscoreaceae). *South African Journal of Botany*, 170, 367-393. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.05.014>
51. **Shraim**, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M., & Hijji, Y. M. (2021, Octubre). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
52. **Singhania**, R. R., Agarwal, R. A., Kumar, R. P., & Sukumaran, R. K. (2017). Bioeconomy and Biorefinery: Valorization of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass and Potential Use of Avocado Residues as a Promising Resource of Bioproducts. In *Waste to Wealth* (pp. 141-170). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_8
53. **Statista**. (2025, May 28). *Avocado production worldwide 2023*. Statista. Retrieved June 18, 2025, from <https://www.statista.com/statistics/577455/world-avocado-production/>
54. **Sultana**, S., Lozada, I., Yong, L., Foster, K., & Locher, C. (2024, Noviembre 21). A Critical Exploration of the Total Flavonoid Content Assay for Honey. *Methods and Protocols*, 7(6), 95. <https://doi.org/10.3390/mps7060095>
55. **Tao**, Y., Pu, J., & Wang, P. (2024, Noviembre 15). Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and quality control of *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim: A

- critical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 334, 118542. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118542>
56. **Tareau**, M.-A., Greene, A., Odonne, G., & Davy, D. (2021, Septiembre 14). Ceiba pentandra (Malvaceae) and associated species: Spiritual Keystone Species of the Neotropics. *Botany*, 100(2), 127-140. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0099>
57. **Warschefsky**, E. J., Klein, L. L., Frank, M. H., Chitwood, D. H., Londo, J. P., von Wettberg, E. J.B., & Miller, A. J. (2016, Mayo). Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes. *Trends in Plant Science*, 21(5), 418-437. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>
58. **Weber**, J. T. (2021, Septiembre 13). Traditional uses and beneficial effects of various species of berry-producing plants in eastern Canada. *Botany*, 100(2), 175-182. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0086>
59. **Yang**, Z.-Y., Zhao, S.-D., Wu, Y.-R., Zhou, Q., Wang, W., Zhou, Y.-B., & Liu, K. (2025, Mayo 19). Comparison of hydroxylated flavonoids and their interaction with protein-based carriers. *Food Chemistry*, 487(144716). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144716>
60. **Yin**, M. H., Vargas, A. I., Fuentealba, C., Shahid, M. A., Bassil, E., & Schaffer, B. (2023, Marzo). Differences in physiological and biochemical responses to short-term flooding among the three avocado (*Persea americana* Mill.) races. *Plant Physiology and Biochemistry*, 196, 925-939. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.032>
61. **Yu**, Z.-C., Lin, W., He, W., Ya, G.-Z., Zheng, X.-T., Luo, Y.-N., Zhu, H., & Peng, C.-L. (2023, Marzo 2). Dynamic changes of the contents of photoprotective substances and photosynthetic maturation during leaf development of evergreen tree species in subtropical forests. *Tree Physiology*, 43(6), 965–978. 10.1093/treephys/tpad026

62. **Yuan**, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016, Abril 29). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5), 559. <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.
63. **Zhang**, S. (2023, Febrero 25). Recent Advances of Polyphenol Oxidases in Plants. *Molecules*, 28(5), 2158. 10.3390/molecules28052158