



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y  
PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**Composición lipídica, de azúcares y  
persina en aguacate y algunas especies  
afines**

**EMMANUEL IBARRA ESTRADA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2015**

La presente tesis titulada “Composición lipídica, de azúcares y persina en aguacate y algunas especies afines” realizada por el alumno EMMANUEL IBARRA ESTRADA, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD -**  
**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

DIRECTOR DE TESIS:



Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego

ASESOR:



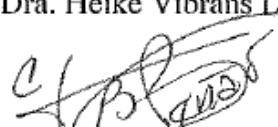
Dr. Eduardo Campos Rojas

ASESORA:



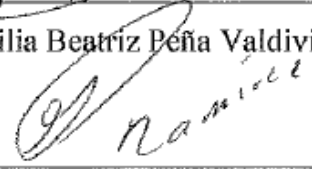
Dra. Heike Vibrans Lindemann

ASESORA:



Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

ASESOR:



Dr. Gustavo Ramírez Valverde

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2015

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México por el apoyo económico brindado a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Al Colegio de Postgraduados por ser parte muy importante de mi formación profesional.

Al Dr. R. Marcos Soto Hernández por brindarme apoyo y compartir conocimientos en mis tesis de Licenciatura, Maestría en Ciencias y Doctorado en Ciencias.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego por brindarme su apoyo y conocimientos durante mis estudios de doctorado, además de ser un excelente amigo y persona.

Al Dr. Eduardo Campos Rojas por compartir conocimiento, trabajo y apoyar esta investigación.

A la Dra. Heike Vibrans Lindemann por su apoyo, recomendaciones y críticas durante el trabajo de investigación, realización de la tesis y sus cursos.

A la Dra. Cecilia B. Peña Valdivia por su apoyo y recomendaciones en la realización del trabajo de investigación y tesis, y por siempre estar dispuesta a ayudar.

Al Dr. Gustavo Ramírez Valverde por su apoyo, recomendaciones y sugerencias en el proceso de investigación.

Al Dr. Young Hae Choi, líder del grupo de Productos Naturales del Instituto de Biología de la Universidad de Leiden, Países Bajos, por recibirme en su equipo de trabajo, por sus enseñanzas y su amistad.

A Erika Wilson, Hye Kyong Kim, Natali Rianika Mustafa y Robert Verpoorte por su ayuda, amistad y excelente recibimiento en el grupo de trabajo del Laboratorio de Productos Naturales, del Instituto de Biología de la Universidad de Leiden.

Al personal del Laboratorio de Fitoquímica del COLPOS: Mercedes Alvarado, Domingo González, Joaquina Tapia, Juan Buendía, Rubén San Miguel, Israel Castillo y Macrina Pérez por su amistad, apoyo y ayuda durante mi tiempo en el Colegio de Postgraduados; todos, excelentes personas.

Al personal de servicios académicos por su amistad, apoyo y ayuda en todo momento: Griselda Delgadillo, Luciana Soriano (Chuy), Lucia Miranda y la Lic. Carmen Padilla.

Al personal de biblioteca por su apoyo, ayuda y amistad: Mariana, Anita, Guadalupe, Ray, Luz y Mario.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Martha Estrada Campos y Anselmo Ibarra Rentería, solo gracias a ellos se pudieron lograr los objetivos. Con absoluto respeto y admiración.

A mis hermanos Martha Elva, Adrián y Marco Antonio.

A mis sobrinas Danna, Yareli, Yulissa y Yuritzi.

A la familia García Gutiérrez por su gran apoyo durante tanto tiempo: María Gutiérrez Maldonado, Mario García Flores, Anabel, Jacqueline, Fanny y Paulo.

A Mercedes Alvarado, Domingo González, Joaquina Tapia y Rubén San Miguel por su apoyo y amistad durante tantos años; con todo respeto.

A mis excelentes amigos: Jonathan Ramírez Galicia (QaTisisisisisimo), Misael J. Ayala Villegas, Iván Zamudio Valencia, Jorge L. Nieves Juárez (Cobacha), Josué Ramírez Galicia, Diego Montiel Oscura, J. Gari García Ponce (y Jamil), Sandra Salazar Aguilar, Jorge Vargas Ramírez, Juan Guerrero Santana (Juanito), Susana E. Ramírez Sánchez, Griselda S. Zárate, Erik Pérez Ramírez, Alejandro Guerrero Santana, Fátima Rasgado Bonilla, Violeta Castillo Elizalde, Karen Varela Portugués, Maurilio López Ortega, Alma D. Hernández Fuentes, Francisco J. Sandoval Domínguez, Librado A. Torres Durán, E. Omar Jiménez Márquez, A. Yhair Salas González, Fredi Bernal Guerrero, Braulio Torres Morales, Virgilio Moreno, Dilan Nieves Juárez, Enrique Canales Islas, Adolfo López Pérez, Gabriel Santoyo Resendiz, Eleodoro Hernández Meneses, Alonso Méndez López (Jamaico), Dr. Amalio Santacruz Varela y Faustino H. Alegría (Larraguivel).

A mis excelentes amigas y amigos del Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Biología de la Universidad de Leiden: Manuela Mandrone (Italia - Mexicanera), Cecilia Guizar González (México), Ana Cristina Ralha de Abreu (Portugal), Aline Valderrama Coqueiro (Brasil), Erika Wilson (Argentina), Natali Rianika Mustafa (Indonesia), ShiKai Yan (China), Hye Kyong Kim (Corea del Sur) y Young Hae Choi (Corea del Sur).

A mis amigos y compañeros del invernadero de aguacate: Jacqueline del C. Luna Olivares, Don Eusebio Moreno Silva (don chevo), Marcelo Garrido Torres, Dr. Juan Ayala Arreola y Mercedes Martínez Villagómez.

## Resumen

El aguacate ha sido objeto de numerosos estudios acerca de su composición química. Esta especie y otras especies del género *Persea* poseen una variabilidad química sobresaliente, lo cual es importante en la salud y alimentación. El aguacate es importante para nuestro país, ya que su producción y exportación a diversos países del mundo representa el ingreso de importantes divisas. El entendimiento de la fisiología del aguacate es un punto relevante principalmente el comportamiento de los ácidos grasos, pues éstos son considerados los compuestos más importantes de este fruto. El gasto energético por parte del árbol de aguacate para soportar el crecimiento del fruto es elevado, por lo que el conocer la ruta de formación y/o movilización de los compuestos más abundantes en esta estructura vegetal es un punto tratado en el Capítulo I, en el cual se trató de correlacionar el contenido de ácidos grasos de la hoja y de la pulpa del fruto de aguacate, con el fin de tomar el contenido de ácidos grasos de hoja como predictor del contenido de ácidos grasos en pulpa de fruto antes de la cosecha de frutos. De acuerdo a los resultados obtenidos, no existió tal correlación, sin embargo, se obtuvieron resultados interesantes en cuanto a los altos contenidos de aceite y de ácidos grasos importantes de algunos genotipos. Por otra parte, la gran variabilidad química y la presencia de algunos compuestos distintivos en algunas especies, como en este caso en aguacate, ayudan a la clasificación de las razas y especies relacionadas del mismo género. Se realizaron, en los Capítulos II y III, estudios metabólicos basados en Resonancia Magnética Nuclear Protónica y en Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas, respectivamente, y análisis multivariados con los objetivos de obtener las similitudes y diferencias en composición química general (estudio no dirigido) y en composición de ácidos grasos de cáscara y pulpa de frutos de aguacate, *Persea nubigena* y *Persea schiedeana*; además de obtener una clasificación quimiotaxonómica. De acuerdo a los resultados, la raza antillana es muy diferente en composición química, tanto general como de ácidos grasos, de las razas mexicana y guatemalteca. Éstas dos últimas razas comparten ciertas similitudes, además de que el híbrido (guatemalteco X mexicano) más importante, ‘Hass’, se colocó justo entre esas dos últimas razas. Por último, *P. nubigena*, presentó similitudes con la raza mexicana y guatemalteca, y *P. schiedeana* se separó claramente del resto de los genotipos (razas y *P. nubigena*).

## Abstract

Avocado has been subject of numerous studies about its chemical composition. This species and other species of the genus *Persea* have an outstanding chemical diversity, which is important in health and nutrition. Avocado is very important for Mexico, as their production and exports to various countries of the world represents the entry of major currencies. Understanding of the physiology of avocado is an important topic, mainly about fatty acids, as these are considered the most important compounds of this fruit. Energy consumption by the avocado tree to bear fruit growth is high, so knowing the path of creation and/or mobilization of the most abundant compounds in the plant is studied in Chapter I; we tried to find correlation between fatty acid content of the leaf and pulp of avocado fruit in order to use the fatty acid content of leaf as a predictor of fatty acid content in the pulp of pulp before harvest time. According to the results, there was no such correlation; however, interesting results were obtained in terms of high oil content and fatty acid composition of some important genotypes. Moreover, the great chemical variability and the presence of some distinctive compounds in some species, as in this case in avocado help to the classification of races and related species of the same genus. Metabolomic studies based on Proton Nuclear Magnetic Resonance and Gas Chromatography - Mass Spectrometry were carried out in Chapters II and III, respectively, and multivariate data analysis with the aim of obtaining the similarities and differences in general chemical composition and fatty acid composition of skin and pulp of avocado, *Persea nubigena* and *Persea schiedeana* fruits; it was also obtained a chemotaxonomic classification. According to the results, the West Indian race is very different in both general chemical composition and fatty acid composition from Mexican and Guatemalan races. These last races share certain similarities; furthermore, the most important hybrid genotype (Guatemalan X Mexican), 'Hass', was placed just between these last two races (Guatemalan and Mexican races). Finally, *P. nubigena* presented similarities with Mexican and Guatemalan races, and, finally, *P. schiedeana* was clearly separated from the other genotypes (all races and *P. nubigena*).

## CONTENIDO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD.....	1
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIAS .....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1 Historia y distribución del aguacate .....	17
2.2 Origen y domesticación.....	20
2.3 Producción y comercialización del aguacate.....	21
2.4 Composición y usos del fruto.....	24
2.5 Estudio de la composición química del aguacate .....	28
2.6 Literatura Citada .....	32
III. Relación entre el contenido de ácidos grasos de hoja y pulpa de aguacate ( <i>Persea americana</i> Miller) .....	37
3.1. Resumen.....	37
3.2. Abstract .....	38
3.3. Introducción .....	39
3.4. Materiales y Métodos .....	41
3.4.1. Colecta de material vegetal .....	41
3.4.2. Extracción de aceite de hoja y pulpa de aguacate .....	41
3.4.3. Derivatización de ácidos grasos .....	41
3.4.4. Análisis estadístico .....	42
3.5. Resultados .....	42
3.6. Discusión.....	44
3.7. Conclusiones .....	46
3.8. Literatura citada .....	46
IV. Estudio metabólico basado en Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- <sup>1</sup> H) de pulpa y cáscara de aguacate, y algunas especies de <i>Persea</i> .....	52
4.1. Resumen.....	52
4.2. Abstract .....	53
4.3. Introducción.....	54
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
4.4.1. Material Vegetal.....	57

4.4.2.	Preparación de muestras.....	58
4.4.3.	Análisis de Datos.....	59
4.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.5.1.	Análisis metabólico en pulpa y cáscara de aguacate y especies afines.....	59
4.5.2.	Análisis de componentes principales en pulpa de aguacate y especies afines.....	67
4.5.3.	Análisis discriminante en pulpa de aguacate.....	71
4.5.4.	Análisis de componentes principales en cáscara de aguacate.....	78
4.5.5.	Análisis discriminante en cáscara de aguacate.....	80
4.6.	Conclusiones.....	85
4.7.	Literatura Citada.....	86
4.8.	Anexos.....	89
V.	Contenido de aceite y composición de ácidos grasos en pulpa y cáscara de frutos de las razas de aguacate y <i>Persea</i> spp.....	97
5.1.	Resumen.....	97
5.2.	Abstract.....	98
5.3.	Introducción.....	99
5.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
5.4.1.	Material Vegetal.....	108
5.4.2.	Extracción de aceite.....	109
5.4.3.	Derivatización de ácidos grasos.....	110
5.4.4.	Análisis de Datos.....	110
5.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
5.5.1.	Pulpa.....	111
5.5.2.	Cáscara.....	127
5.6.	Conclusiones.....	140
5.7.	Literatura Citada.....	140
VI.	Discusión General.....	149
6.2.	Conclusiones Generales.....	153
6.3.	Literatura Citada.....	153



## LISTA DE CUADROS

Cuadro II-1. Producción de aguacate en México (FAOSTAT, 2015). .....	21
Cuadro II-2. Producción nacional por entidad federativa en 2012 (FAOSTAT, 2015).....	22
Cuadro II-3. Superficie cosechada de los principales productores (miles de hectáreas) (FAOSTAT, 2015). .....	22
Cuadro II-4. Rendimiento de aguacate de los principales países (hectogramos por hectárea) (FAOSTAT, 2015). .....	23
Cuadro II-5. Producción mundial de aguacate (principales países productores) (toneladas) (FAOSTAT, 2015). .....	23
Cuadro II-6. Principales países exportadores de aguacate (toneladas) (FAOSTAT, 2015).....	24
Cuadro II-7. Valor de exportación de aguacate (Dólares X 1000) (FAOSTAT, 2015). .....	24
Cuadro II-8. Composición de la porción comestible de aguacates California (principalmente 'Fuerte' por 100 g (Knight Jr., 2002). .....	27
Cuadro II-9. Contenido de vitaminas de la pulpa de aguacate (Knight, 2002). .....	27
Cuadro III-1. Contenido de aceite y ácidos grasos en pulpa y hoja de aguacate. ....	48
Cuadro III-2. Coeficientes de correlación (r) y su probabilidad (P) de contenido de aceite y ácidos grasos de hoja y pulpa de 25 genotipos de aguacate. ....	51
Cuadro IV-1. Genotipos de aguacate y especies afines utilizados para la extracción de aceite de pulpa y cáscara. ....	58
Cuadro V-1. Genotipos utilizados para la extracción de aceite de pulpa y cáscara. ....	109

## LISTA DE FIGURAS

Fig. IV-1. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por ACP a partir del análisis de RMN-1H (C: Cáscara [verde], P: Pulpa [azul]) .....	60
Fig. IV-2. Gráfico de dispersión de las variables características de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H; todas las variables aparecieron en verde y se resaltan en azul y rojo las variables que caracterizan a la pulpa y cáscara, respectivamente).....	61
Fig. IV-3. Puntuación de contribución de las variables analizadas en el estudio metabolómico de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H, todas las variables aparecieron en verde y se resaltan en azul y rojo las variables que caracterizan a la pulpa y cáscara, respectivamente) .....	61
Fig. IV-4. Separación de las razas y especies analizadas basado en el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines (P = Pulpa; C = Cáscara) (Ant = Antillana, Gua = Guatemalteca; Mex = Mexicana; Pnub = <i>P. nubigena</i> ; Pschi = <i>P. schiedeana</i> ; Hib = Híbrido ('Hass')).....	63
Fig. IV-5. Gráfico de dispersión de las variables características de cáscara y pulpa (las variables (X) son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). En este caso se resaltan las variables distintivas de la raza mexicana (Azul) y de la raza antillana (rojo), las cuales se describen en el gráfico de puntuación de contribución .....	64
Fig. IV-6. Puntuación de contribución de las variables analizadas del estudio metabolómico de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). Se resaltan las variables distintivas de las razas mexicana (azul) y antillana (rojo). .....	64
Fig. IV-7. Gráfico de dispersión de las variables analizadas del estudio metabolómico de cáscara y pulpa (las variables (X) son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H; todas las variables están en verde y se resaltan en azul y rojo las variables distintivas de las razas y especies mencionadas en el gráfico). (Y = clasificación por raza y especies). .....	65
Fig. IV-8. Puntuación de contribución de las variables analizadas (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). Azul = Variables distintivas de 'Hass' y <i>P. nubigena</i> ; Rojo = Variables distintivas de la raza Guatemalteca y <i>P. schiedeana</i> .....	66
Fig. IV-9. Visión general de los coeficientes de contribución de las razas de aguacate y especies afines .....	67
Fig. IV-10. . Distribución de las razas de aguacate y especies afines por ACP. Análisis de pulpa por RMN <sup>1</sup> H .....	68
Fig. IV-11. . Gráfico de dispersión de las variables analizadas de pulpa y cáscara de aguacate (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Azul: raza Antillana; Rojo: raza Mexicana, 'Hass') .....	69
Fig. IV-12. Coeficientes de contribución - variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Azul = Antillana; Rojo = Mexicana, 'Hass') .....	69
Fig. IV-13. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Azul = Guatemalteca; Rojo = <i>P. schiedeana</i> ) .....	70
Fig. IV-14. Coeficientes de contribución - variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Azul = Guatemalteca; Rojo = <i>P. schiedeana</i> ) .....	71

Fig. IV-15. Análisis discriminante (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines. Análisis de pulpa por RMN <sup>1</sup> H. (Ant = Antillana; Gua = Guatemalteca; Mex = Mexicana, Pnub = <i>P. nubigena</i> ; Pschi = <i>P. schiedeana</i> ; Hib = Híbrido ('Hass')) .....	72
Fig. IV-16. Gráfico de dispersión de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) .....	72
Fig. IV-17. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Rojo = Guatemalteca; Azul = <i>P. schiedeana</i> ) .....	73
Fig. IV-18. Gráfico de dispersión de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) .....	74
Fig. IV-19. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Rojo = Antillana; Azul = Mexicana).....	74
Fig. IV-20. Gráfico de distribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) de 'Hass' y <i>P. nubigena</i> .....	75
Fig. IV-21. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) de 'Hass' y <i>P. nubigena</i> .....	75
Fig. IV-22. Visión general de los coeficientes de contribución en pulpa de las razas de aguacate y especies afines .....	76
Fig. IV-23. Similitud de las razas de aguacate y especies afines según los compuestos contenidos en la cáscara, analizado por ACP. Análisis de cáscara por RMN <sup>1</sup> H.....	78
Fig. IV-24. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Rojo = Antillana; Azul = Guatemalteca).....	79
Fig. IV-25. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Rojo = Antillana; Azul = Guatemalteca).....	80
Fig. IV-26. Análisis discriminante (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines. Análisis de cáscara por RMN <sup>1</sup> H.....	81
Fig. IV-27. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) .....	81
Fig. IV-28. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Azul = Antillana; Rojo = Mexicana).....	82
Fig. IV-29. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) .....	83
Fig. IV-30. . Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>1</sup> H) (Rojo = 'Hass' y <i>P. nubigena</i> ; Azul = Guatemalteca y <i>P. schiedeana</i> ).....	83
Fig. IV-31. Visión general de los coeficientes de contribución en cáscara de las razas de aguacate y especies afines .....	84
Fig. V-1. Estructura y nomenclatura de los ácidos grasos. ....	99
Fig. V-2. Contenido de aceite en pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones) .....	112
Fig. V-3. Contenido de ácido oleico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones) .....	114
Fig. V-4. Contenido de ácido palmítico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones) .....	115
Fig. V-5. Contenido de ácido linoleico de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones) .....	116
Fig. V-6. Contenido de ácido palmitoleico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones) .....	117

Fig. V-7. Contenido de ácido <i>trans</i> -13-octadecenoico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	118
Fig. V-8. Contenido de ácido esteárico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	119
Fig. V-9. Contenido de ácido docosanoico (behénico) de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	120
Fig. V-10. Contenido de ácido lignocérico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	121
Fig. V-11. Contenido de ácido araquídico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	121
Fig. V-12. Contenido de ácido mirístico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	122
Fig. V-13. Contenido de ácido 9-metil-eicosanoico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	122
Fig. V-14. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por análisis de componentes principales de acuerdo a la composición de ácidos grasos del aceite de pulpa de aguacate. Los colores indican las razas y especies analizadas (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = Mexicana; Pn = <i>P. nubígena</i> ; Ps = <i>P. schiedeana</i> ). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos.....	123
Fig. V-15. Gráfico de dispersión de las variables (ácidos grasos) de acuerdo al ACP de aceite de pulpa de aguacate. Este gráfico se compara con el gráfico de distribución de razas (Fig. 14) para determinar que variables (ácidos grasos) son característicos de las razas y especies analizadas.	124
Fig. V-16. Gráfico de dispersión de los genotipos y los ácidos grasos de aceite de pulpa de aguacate analizados en el análisis de componentes principales. X (verde) representa a los ácidos grasos. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = <i>P. nubígena</i> ; Ps = <i>P. schiedeana</i> ). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos .....	125
Fig. V-17. . Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate, resultado del análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = <i>P. nubígena</i> ; Ps = <i>P. schiedeana</i> ). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos .....	126
Fig. V-18. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate y variables mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. Y = raza o especie (clasificación); X = variables (ácidos grasos).....	127
Fig. V-19. Contenido de aceite de cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	128
Fig. V-20. Contenido de ácido oleico de cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	129
Fig. V-21. Contenido de ácido palmítico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	130
Fig. V-22. Contenido de ácido linoleico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	131
Fig. V-23. Fig. 23. Contenido de ácido palmitoleico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	132
Fig. V-24. Contenido de ácido <i>cis</i> -vaccénico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	133
Fig. V-25. Contenido de ácido iso-esteárico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones).....	134

Fig. V-26. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por análisis de componentes principales de acuerdo a la composición de ácidos grasos del aceite de cáscara de aguacate. Los colores indican las razas y especies analizadas (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = <i>P. nubigena</i> ; Ps = <i>P. schiedeana</i> ). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos.....	135
Fig. V-27. Gráfico de dispersión de las variables (ácidos grasos) de acuerdo al análisis de componentes principales de cáscara de aguacate. Este gráfico se compara con el gráfico de distribución de razas (Fig. 26) para determinar que variables (ácidos grasos) son característicos de las razas y especies analizadas .....	136
Fig. V-28. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate, resultado del análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = <i>P. nubigena</i> ; Ps = <i>P. schiedeana</i> ). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos .....	137

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO IV-1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de pulpa de aguacate y especies afines. ....	89
ANEXO IV-2. Zona aromática del espectro de RMN <sup>1</sup> H de pulpa de aguacate y especies afines. .....	90
ANEXO IV-3. Zona de azúcares del espectro de RMN <sup>1</sup> H de pulpa de aguacate y especies afines. .....	91
ANEXO IV-4. Zona de aminoácidos del espectro de RMN <sup>1</sup> H de pulpa de aguacate y especies afines. ....	92
ANEXO IV-5. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de cáscara de aguacate y especies afines. ....	93
ANEXO IV-6. Zona aromática del espectro de RMN <sup>1</sup> H de cáscara de aguacate y especies afines. .....	94
ANEXO IV-7. Zona de azúcares del espectro de RMN <sup>1</sup> H de cáscara de aguacate y especies afines. ....	95
ANEXO IV-8. Zona de aminoácidos del espectro de RMN <sup>1</sup> H de cáscara de aguacate y especies afines. ....	96

## I. Introducción General

El aguacate es uno de los frutales más importantes en nuestro país, y la demanda de éste en el mundo se incrementa año con año ya que se ha incorporado a la dieta de muchos países debido a su versatilidad culinaria y propiedades. Esta especie es conocida por su sabor, su textura y sus propiedades nutricionales y funcionales. Su producción en México ayuda a generar empleos, ya que demanda mano de obra para distintas actividades. Debido a su demanda, se ha incrementado la superficie mundial destinada a su producción y en México se consume en gran cantidad, además de que ocupa un lugar importante en los recursos agrícolas de nuestro país. Por esto es importante promover la colecta, conservación, evaluación, potenciación, mejoramiento y aprovechamiento del aguacate. México es el principal productor y exportador de aguacate en el mundo, y la variedad más comercializada es ‘Hass’, lo cual puede ser una limitante ya que no existen otras variedades que compitan en calidad con ésta. Existe una carencia de cultivares alternativos a ‘Hass’, esta variedad ocupa la mayoría de la superficie cultivada en México destinada a aguacate. Esto confirma la necesidad de contar con cultivares de calidad y productividad semejante o superior a esta variedad que garanticen mayor número de opciones en las zonas productoras. Aparte de su uso como alimento, el aguacate es materia prima para la industria pues puede utilizarse para obtener aceites, y elaborar jabones, lociones, cremas y champús, cuya aplicación se basa en su composición química. Los cultivares de aguacate difieren en una variedad de características, como las anatómicas y las relacionadas con la calidad del fruto.

La calidad buena del fruto al final de la madurez es uno de los componentes más críticos, y se puede lograr, cuando los árboles se nutren apropiadamente para producir frutos con el tamaño y la forma adecuados. Existen distintas variedades de aguacate no aptas para su explotación comercial, pues además de su calidad se tienen que tomar en cuenta otros aspectos. De las razas de aguacate, la guatemalteca y la mexicana, o los derivados de estas son las que más se cultivan para uso comercial. La distribución de las razas depende de la altitud, temperatura, tipo de suelo, entre otras condiciones ambientales. En México crecen las tres razas en diferentes regiones, y algunas pueden converger en el mismo ambiente (Ozdemir y Topuz, 2004).

Debido a la importancia del aguacate en nuestro país, a su demanda creciente y a que se trata de un recurso fitogenético de gran valor, en esta investigación nos enfocamos al estudio de su

composición química e identificación del o los cultivares que pudieran competir con la calidad con los aguacates comerciales.

El aguacate presenta gran diversidad de compuestos químicos beneficiosos para la salud de los consumidores. Entre los compuestos de mayor interés en aguacate están: los ácidos grasos (saturados, insaturados y poliinsaturados), lípidos complejos, compuestos derivados de lípidos como las vitaminas liposolubles, los carotenoides, acetogeninas, pigmentos de origen no graso, azúcares, entre otros (Liu *et al.*, 2002, Ashton *et al.*, 2006; Meyer y Terry, 2008).

Los estudios del contenido de aceite y su composición química de aguacate son abundantes, pues el aceite es un componente fundamental e importante del fruto y su calidad, prácticamente se basa en la composición de ácidos grasos. Los compuestos lipídicos son el componente mayor en la pulpa del fruto de aguacate. Aspectos como el sabor, la textura y parte de las características nutricionales del fruto pueden relacionarse con la cantidad y tipo de esos compuestos. La diversificación del uso de variedades o especies se busca con el fin de promover uso de la mayor parte de la base genética que existe en México, ya que la producción se basa en ‘Hass’, y existen otras variedades que tienen potencial para utilizarse también en la obtención de aceite y pulpa, y que tienen algunas ventajas, como porte bajo y productividad mayor (Bora *et al.*, 2001; Ozdemir y Topuz, 2004).

Los estudios metabolómicos son la base para identificar compuestos múltiples en las plantas y se basan en un grupo de técnicas que se desarrollan en el uso de aparatos analíticos para la identificación y cuantificación de metabolitos. En este estudio planteó la posibilidad de obtener el perfil de ácidos grasos, identificar las diferencias entre las razas, y evaluar si la correlación entre el contenido de aceite de hoja y fruto es significativa. Otros compuestos menos estudiados también pueden ser de gran importancia y en la calidad del aguacate. Entre ellos pueden estar las heptosas, que son azúcares poco comunes en la naturaleza, con siete carbonos en su estructura (diferentes a los azúcares comunes que presentan 6 o 5 C). Estos azúcares están relacionados con funciones importantes como protección contra estreses ambientales y de patógenos, y moléculas de transporte de energía en las plantas y además de ciertas propiedades medicinales en los humanos (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Bertling y Bower; 2006). Estos compuestos pueden tener aplicaciones en la medicina e industrial, por lo que es relevante realizar un estudio acerca de su presencia en este fruto tan importante en nuestro país.



Como parte del presente estudio, también se planteó el objetivo de realizar un análisis quimiotaconómico que permitiera conocer las diferencias y similitudes entre las razas de aguacate y las especies afines. Los resultados podrían aplicarse al mejoramiento genético del fruto, mediante sus características químicas más importantes, y a la obtención de información para generar variedades con mejor calidad. Esto último ayudaría a promover la competencia con los cultivares comerciales actuales más importantes y mejorar su comercialización a mediano o largo plazo. También se espera conocer y promover las cualidades químicas de las razas, con énfasis en las mexicanas.

## II. Revisión de Literatura General

### 2.1 Historia y distribución del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae del orden de las Laurales. Lauraceae es una familia pantropical (es decir, que aparece en las regiones tropicales de los continentes mayores) de cerca de 50 géneros y 2500-3000 especies de árboles y arbustos (Rowher, 1993). En esta familia se incluyen especies de importancia económica y cultural, como el laurel (*Laurus nobilis* L.). El aguacate es el producto de consumo básico más importante de la familia Lauraceae.

El aguacate es el producto de consumo básico más importante de la familia Lauraceae. La familia Lauraceae está agrupada taxonómicamente con otras familias de plantas con flores tales como Magnoliaceae, Annonaceae, Piperaceae y Canelaceae, las cuáles se ubican en las angiospermas basales (Chanderbali *et al.*, 2008). Éstas representan las familias más antiguas de plantas con flores en el planeta, ya que surgieron hace más de 100 millones de años durante el período Cretácico (Judd *et al.*, 2008). Lauraceae cuenta con diversas características florales primitivas: pequeñas flores trímeras con sépalos y pétalos no diferenciados llamados tépalos, y un ovario inferior (Lorea, 2009). El aguacate se ha convertido en una planta modelo, genéticamente hablando, para elucidar desarrollos florales ancestrales de angiospermas, y para ayudar en el entendimiento de la evolución de flores de angiospermas y de gimnospermas (Chanderbali *et al.*, 2008, 2009).

*Persea* pertenece a un género complejo que ha causado ciertas confusiones en su clasificación a lo largo del tiempo, tal género incluye a *Alseodaphne* Nees, *Apollonias* Nees, *Dehaasia* Blume,

*Machilus* Rumph. ex Nees, *Nothaphoebe* Blume y *Phoebe* Nees (Kostermans, 1962). Kopp (1966) reconoció dos subgéneros de *Persea*: *Persea* y *Eriodaphne*. *Persea* subgénero *Persea* está caracterizada por tépalos iguales y subiguales, opuestos y generalmente caducos en fruto, anteras cuadriloculares, glándulas estipitadas en la base de los estambres del tercer verticilo, y un gineceo pubescente. El subgénero *Eriodaphne* Nees está reconocido por su tépalos desiguales (los tres interiores son claramente más largos que los tres exteriores), son persistentes y patentes en el fruto, las anteras tienen un número variable de lóculos (0, 2 o 4), glándulas sésiles en la base de los filamentos de los tres estambres interiores, y un gineceo pubescente o glabro (sin pubescencia). Las principales diferencias entre los dos subgéneros son fáciles de observar, y la mayoría de las especies pueden ser fácilmente puestas en un subgénero, con unas pocas excepciones (van der Werff, 2002).

Kopp (1966) incluyó cuatro especies en el subgénero *Persea*: *P. floccosa* Mez, *P. schiedeana* Nees, *P. steyermarkii* C.K. Allen y *P. americana*, el aguacate domesticado, esta última con tres variedades botánicas: var. *americana*, var. *drymifolia* (Schlechtendal & Chamisso) Blake y var. *nubigena* (Williams) Kopp. Por su parte, Williams (1977) mencionó en tal subgénero a *P. floccosa*, *P. schiedeana*, *P. steyermarkii*, *P. americana* con dos variedades (var. *americana* y var. *drymifolia*), consideró a *P. nubigena* como especie propia con dos variedades botánicas (var. *nubigena* Williams y var. *guatemalensis* Williams) y dos nuevas especies: *P. parvifolia* Williams y *P. primatogena* Williams & Molina (sinónimo de *Beilschmiedia riparia* Miranda) (Nishida, 1999). *P. parvifolia* tiene como sinónimo a *P. pallescens* (Mez) Lorea-Hernández, una nueva combinación en *Persea* subgénero *Persea* (Lorea-Hernández, 2009). Van der Werff (2002) publicó el concepto más amplio a la fecha del subgénero *Persea*, en el que incluyó a *P. drymifolia*, *P. floccosa*, *P. steyermarkii* y *P. nubigena* en *P. americana* como sinónimos sin variedades infraespecíficas formales. Scora *et al.* (2002) propusieron un concepto similar de *P. americana*, pero mantuvo las tres variedades botánicas reconocidas por Kopp en 1966 y propuso cinco nuevas variedades basadas en *P. floccosa*, *P. nubigena* var. *guatemalensis*, *P. steyermarkii*, *P. tolimanensis* y *P. zentmyerii*. Cabe resaltar que los estudios de clasificación están basadas en caracteres morfológicos y desarrollos florales.

Las diferencias entre razas se relacionan primariamente a las preferencias ecológicas y características del fruto (Bergh y Ellstrand, 1986). Así, la raza mexicana está caracterizada por su adaptación al clima mediterráneo, relativamente tolerante al frío y temprana madurez del fruto

con una cáscara delgada de color púrpura-negra. Los aguacates guatemaltecos son poco tolerantes al frío debido a su origen de clima tropical de montaña, tiene cáscara gruesa y resistente, la cual permanece verde hasta la madurez. Los antillanos están adaptados a condiciones de tierras bajas tropicales húmedas y son muy sensibles al frío, pero muestran tolerancias a la salinidad del suelo y otras condiciones edáficas adversas. Sus frutos tienen cáscara delgada verde amarillenta, y el más bajo contenido de aceite (Chanderbali *et al.*, 2013).

Las razas de aguacate están distribuidas de acuerdo con la altitud y temperatura. La raza mexicana se encuentra por arriba de los 2000 m de altitud (zona templada), la guatemalteca entre los 1000 y 2000 m (zona subtropical), la antillana por debajo de los 1000 m (zona tropical) y los híbridos tienen una adaptación intermedia (Barrientos y López, 1998).

Bergh y Lahav (1996) reconocieron diferencias distintivas en tolerancia al clima, forma del árbol y de la hoja, flor y características del fruto. Mencionan que los cultivares guatemaltecos tienen los genes hortícolas más útiles, dominan el germoplasma de los cultivares de aguacate subtropicales del mundo los cuales son los más importantes para el comercio mundial, y los mejores tipos son reconocidos por su deseable calidad de fruto, pequeñas semillas y madurez tardía del fruto. Los cultivares mexicanos de buena calidad son raros, pero han contribuido con el descubrimiento de genes responsables de la tolerancia al frío y la madurez temprana. La raza antillana, o sus híbridos con los tipos guatemaltecos, son muy importantes y se están posicionando en la industria mundial tropical y subtropical, debido a que ha aumentado la producción de plántulas en países subdesarrollados. Los frutos de la raza antillana son conocidas por su bajo contenido de aceite pero, relativamente alto contenido de azúcares, y un sabor claramente menos a “nuez” que los de cultivares subtropicales. A pesar de su gran variabilidad, juegan un papel importante en la mejora de dietas de la mayoría de la gente pobre en los países tropicales menos desarrollados.

Árboles de las razas guatemalteca y antillana, especialmente su ambiente de crecimiento habitual, pueden alcanzar alturas que exceden los 30 m, mientras los mexicanos son más pequeños con alrededor de 15 m. Las diferencias en cuanto al tamaño de los frutos parece resultar principalmente del número de células en lugar del tamaño de las mismas. En ocasiones, el fruto de ‘Hass’ resulta pequeño, lo cual se debe al aborto prematuro de la cubierta de la semilla, lo cual se debe al estrés por la alta temperatura (Moore-Gordon, 1997).

## 2.2 Origen y domesticación

Es bien sabido que el aguacate es originario de la región de Mesoamérica (principalmente, centro y sur de México, y Guatemala) y su centro de domesticación es igualmente esta región (Williams, 1977). Tales determinaciones se han hecho tomando como base diversos estudios, exploraciones y descubrimientos; se han encontrado restos fósiles de aguacate de 8,000 años de antigüedad en el Valle de Tehuacán (Cueva de Coxcatlán) en Puebla, México (Smith, 1966). Lo cual se puede relacionar con la distribución actual del aguacate para determinar su centro de origen y domesticación. La distribución que se vino dando a lo largo de los años se dio quizá debido al intercambio comercial entre civilizaciones antigua y nativas. Tal distribución se dio primero hacia Centroamérica y posteriormente se extendió a Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú, principalmente, en donde en su momento fue encontrado y descrito por los españoles. Aparte de los descubrimientos hechos en el Valle de Tehuacán, también se dieron hallazgos significativos de aguacates primitivos en diversas partes, desde la Sierra Madre Oriental en el sur de Nuevo León, hasta Costa Rica en Centroamérica, lo cual apoya que se trata del centro de origen del aguacate y posiblemente de todo el subgénero *Persea* (Williams, 1977).

El origen particular de cada una de las razas se dio de la siguiente manera: la raza mexicana se originó en el centro de México, la guatemalteca en el sur de México y Guatemala, y la raza antillana en la península de Yucatán y en Centroamérica (desde Guatemala hasta Panamá) (Storey *et al.*, 1986); pero Ben-Ya'acov *et al.* (1995) proponen una cuarta raza, la Costaricensis, originaria de Costa Rica (Fig. 1).

La domesticación del aguacate, agave, maíz, algodón, calabaza, camote y yuca ocurrió en el período clásico Maya (Turner y Miksicek, 1984). El aguacate domesticado se extendió por varias regiones de México y Centroamérica. Las razas mexicana, guatemalteca y antillana se establecieron en huertas pequeñas (de traspatio) durante varios siglos. La reproducción de nuevos árboles se hacía por semilla y así fue como se promovió una gran diversidad genética que facilitó la adaptación del aguacate a diversas regiones. Las primeras evidencias arqueológicas indican que el aguacate fue encontrado entre los primeros cultivos en el proceso de domesticación. En el caso de los primeros habitantes de Tehuacán, el aguacate fue encontrado junto con *Capsicum annuum*, *Cucurbita mixta*, *Amaranthus* spp., *Phaseolus* spp., *Zea mays*, *Diospyros digyna*, *Casimiroa* sp., *Pouteria campechiana*, entre otros (MacNeish, 1964). En áreas tropicales existe evidencia de que la raza antillana fue encontrada junto con especies de palmas comestibles

(*Acrocomia aculeate*) y especies con raíces comestibles (Piperno y Holst, 1998), mientras que en la zona Maya existe evidencia de que el aguacate fue encontrado junto con *Zea mays*, *C. annuum*, *Cucurbita* sp., *Manilkara sapota* y *Theobroma cacao* (Turner y Miksicsek, 1984).

### 2.3 Producción y comercialización del aguacate

México es líder mundial en el mercado del aguacate. Este cultivo en nuestro país ocupa más de 150,000 ha, lo que representa menos del 1 % de la superficie cultivada, pero aporta cerca del 3.4 % del valor de la producción agrícola total. La producción de aguacate en 2012 alcanzó 1.3 millones de toneladas y para 2013 se contó con una cifra de 1.5 millones (Cuadro II-1). En los años 2007 al 2012, el volumen de producción se ha incrementado a una tasa media anual de 2.9 %, sin embargo, para 2013 se observa un crecimiento mayor a ese promedio, de 11.5 %, debido principalmente a la mayor superficie destinada a su cultivo. El 57 % del volumen es de temporal y el restante 43 %, de riego. El rendimiento de temporal alcanza las 9.6 t / ha, el de riego 10.8 t / ha, 13 % más que el primero. El 96.4 % de la producción del país corresponde al aguacate ‘Hass’, el 2.7 % al criollo, 0.1 % a ‘Fuerte’ y el resto no se encuentra documentado (FAOSTAT, 2015).

**Cuadro II-1. Producción de aguacate en México (FAOSTAT, 2015).**

Año	Superficie (miles de ha)		Volumen producción (miles de t)	Rendimiento (t / ha)	Precio medio rural (\$ / t)	Valor producción (millones de pesos)
	Sembrada	Cosechada				
2000	94	94	907	9.6	4646	4216
2001	95	94	940	10.0	5351	5031
2002	98	94	901	9.6	4483	4039
2003	98	95	905	9.5	5937	5374
2004	102	100	987	9.9	6164	6086
2005	112	103	1022	9.9	7457	7617
2006	115	106	1134	10.8	8043	9123
2007	117	110	1143	10.4	10517	12019
2008	122	113	1162	10.3	10719	12459
2009	129	122	1231	10.1	12245	15073
2010	134	123	1107	9.0	12795	14166
2011	142	127	1264	10.0	14347	18136
2012	151	130	1316	10.1	12619	16608
2013p	168	144	1468	10.2	N / D	N / D

**Nota:** p = Datos preliminares; N / D = No determinado.

Michoacán concentra el 84.9 % del volumen de producción de aguacate en el país y 89.3 % del valor generado. Otras entidades que participan en la producción, aunque no mayor al 3 % del volumen total son: Jalisco, Morelos, Nayarit, Estado de México y Guerrero (Cuadro II-2).

**Cuadro II-2. Producción nacional por entidad federativa en 2012 (FAOSTAT, 2015)**

Estado	Volumen		Valor	
	Miles de toneladas	Participación (%)	Millones de pesos	Participación
<b>Michoacán</b>	1117.3	84.9	14835.7	89.3
<b>Jalisco</b>	40.8	3.1	494.7	3.0
<b>Morelos</b>	35.5	2.7	276.0	1.7
<b>Nayarit</b>	29.2	2.2	132.4	0.8
<b>México</b>	28.8	2.2	291.7	1.8
<b>Guerrero</b>	14.8	1.1	135.9	0.8
<b>Resto del país</b>	49.7	3.8	441.7	2.7
<b>Total nacional</b>	1316.1	100.00	16608.1	100.00

Nuestro país es el principal productor mundial, aquí se produce el 30 % de la oferta. Las exportaciones alcanzan hoy cerca de 600000 t con un valor de más de mil millones de dólares, principalmente dirigidas a Estados Unidos (80 %), Japón (9 %) y Canadá (5 %). En 2013 se cosecharon 144,244 ha (Cuadro II-3).

**Cuadro II-3. Superficie cosechada de los principales productores (miles de hectáreas) (FAOSTAT, 2015).**

País	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>México</b>	112479	121491	123403	126598	130308	144244
<b>Chile</b>	33800	33500	34057	36388	36386	36355
<b>Colombia</b>	18470	19255	21592	24513	27556	32064
<b>Perú</b>	14370	16292	17750	19339	23642	25753
<b>Estados Unidos</b>	29473	26819	24253	24261	25000	26138
<b>Sudáfrica</b>	16000	14500	15000	13800	16350	16446
<b>Rep. Dominicana</b>	5832	7183	10557	10648	11184	12922
<b>Brasil</b>	9453	8411	11111	10753	9568	9664

El rendimiento de producción en nuestro país se colocó en el cuarto lugar a nivel mundial con 101760.7 hg/ ha (hectogramos por hectárea), esto es poco más de 10.1 t por ha, detrás de República Dominicana, Brasil y Perú (Cuadro II-4).

**Cuadro II-4. Rendimiento de aguacate de los principales países (hectogramos por hectárea) (FAOSTAT, 2015).**

País	2008	2009	2010	2011	2012	2013
México	103346	101322	89717	99854	100999	101760
Perú	94852	96621	103870	110482	113579	111979
Brasil	155732	165365	137871	149145	167122	162957
Chile	36281	69314	48853	42939	43972	45317
Colombia	99603	98171	95147	87744	92612	94604
Rep. Dominicana	322597	256643	273430	277108	259308	299904
Sudáfrica	52208	52914	55469	54889	56026	54723
Estados Unidos	35703	100978	65208	84675	95398	67038

En 2013, México produjo cerca de 1.5 millones de toneladas, colocándose en primer lugar por arriba de países como Perú, República Dominicana, Colombia, Brasil, Chile, Estados Unidos y Sudáfrica (Cuadro II-5).

**Cuadro II-5. Producción mundial de aguacate (principales países productores) (toneladas) (FAOSTAT, 2015).**

País	2008	2009	2010	2011	2012	2013
México	1162429	1230973	1107135	1264141	1316104	1467837
Perú	136303	157415	184370	213662	268525	288386
Brasil	147214	139089	153189	160376	159903	157482
Chile	122633	232202	166382	156247	160000	164750
Colombia	183968	189029	205443	215089	255207	303340
Rep. Dominicana	188139	184357	288683	295080	290011	387546
Sudáfrica	83534	76726	83204	75748	91603	89999
Estados Unidos	105230	270813	158150	205432	238495	175226

En cuanto a la exportación de este cultivo, en el Cuadro II-6 se puede observar que México es el principal exportador con casi 500,000 t y se encuentre muy por arriba en este rubro del resto de los países exportadores.

**Cuadro II-6. Principales países exportadores de aguacate (toneladas) (FAOSTAT, 2015).**

País	2008	2009	2010	2011	2012
México	270928	337977	326127	347209	494481
Perú	51298	48346	59521	81431	83576
Brasil	1801	2932	2464	3263	4273
Chile	84918	166192	108116	102820	91527
Colombia	25	32	56	123	5
Rep. Dominicana	19039	12117	12193	10431	17158
Sudáfrica	54472	46162	50569	30285	54502
Estados Unidos	18459	11624	28592	17919	29630

Las exportaciones representan ingresos al país productor, por lo que se puede decir que el aguacate representa uno de los cultivos más importantes pues ingresa al país (debido a exportaciones) más de 877 millones de dólares, según el último dato reportado en 2012 (Cuadro II-7).

**Cuadro II-7. Valor de exportación de aguacate (Dólares X 1000) (FAOSTAT, 2015).**

País	2008	2009	2010	2011	2012
México	577193	645412	594010	887642	877908
Perú	72840	64393	84638	164399	136208
Brasil	2366	3606	2929	6200	6841
Chile	88185	283646	184731	227697	159257
Colombia	34	54	108	172	11
Rep. Dominicana	18528	9948	10984	11503	19346
Sudáfrica	31815	24962	43570	30887	61332
Estados Unidos	29850	20574	49490	59469	82469

## 2.4 Composición y usos del fruto

Los frutos de *Persea* son carnosos y por lo general negros en la madurez, están soportados en receptáculos agrandados que pueden formar cúpulas para encerrar completamente las estructuras (Rohwer, 1993).

El principal uso del aguacate es su consumo en fresco ya que es un alimento rico en energía. Lo particular de esta fruta es que contiene por mucho más aceite que la mayoría de las frutas que conocemos, además de que tiene dos o tres veces más proteína. En México, se consume más en forma de guacamole (Náhuatl ahuaca-mulli), y en tortillas de maíz (Coe, 1994). La condición del



aguacate como alimento varía con la región donde se consume y el grado de familiaridad con el cual es considerado por la población local. En regiones de algunos países como Guatemala, México y países cercanos, el aguacate es una materia prima tradicional, ya que se consume como parte de la alimentación diaria. Es un ingrediente de amplio consumo, como ya se mencionó en forma de guacamole principalmente, el cual se compone por puré de pulpa de aguacate, tomate, cebolla y ajo, jugo de limón, cilantro, chile jalapeño y sal (Anusasananan, 2001), y es altamente apreciado. En otros países es un producto de importación caro, consumido en ensaladas en ciudades donde se ha incorporado a la dieta en la actualidad (Knight Jr., 2002).

El contenido nutrimental de la pulpa de aguacate depende de varios factores, entre los que destacan el cultivar, el grado de madurez, la región donde crece, y condiciones de crecimiento. Además de los usos tradicionales, también se conocen aplicaciones industriales para el aguacate, en el cuál se toman en cuenta aguacates que no son aptos para su transporte o exportación, debido a daños mecánicos u otro tipo de daños. Por ejemplo, California exporta aguacates a México que son procesados y re-exportados a los Estados Unidos (Shepherd y Bender, 2001). Estos subproductos incluyen pulpa deshidratada, pulpa congelada, pulpa empacada al alto vacío y refrigerada lista para comer como guacamole, y tal mercado va creciendo año con año (FAO-Tropical Fruits, 2010).

El aceite de aguacate es otro uso importante del aguacate, especialmente del aguacate de desecho. La industria del aceite de aguacate ha aumentado con el paso del tiempo en países como México, Israel, y Sudáfrica. El aceite es extraído de la pulpa de aguacate usando solventes, decoloración y desodorización. La mayoría de este aceite es utilizado para la industria cosmética donde es apreciado por su contenido de vitamina E y propiedades emolientes, pero es considerado no apto para consumo. En Nueva Zelanda se comercializa el aceite extravirgen extraído por prensado en frío de aguacate de ‘Hass’ de segunda calidad (Eyres *et al.*, 2001). En la última década ha ganado mercado el uso del aceite de aguacate comestible, por ejemplo, para ensaladas.

Hasta hoy existe información suficiente de las propiedades benéficas del aguacate basado en su contenido nutrimental y contenidos de compuestos funcionales, sin embargo, la mayoría de las investigaciones han sido dirigidas a las principales variedades comerciales como lo son ‘Hass’, ‘Fuerte’, entre otras pocas. Son diversos los beneficios a la salud que presenta el aguacate, entre los más importantes se pueden mencionar los siguientes: reducción de riesgos de enfermedades

coronarias, cataratas, diabetes, hipertrofia prostática benigna, cáncer de próstata (y otros tipos de cáncer) y degeneración macular (Birkbeck, 2002; Ashton *et al.*, 2006), además de algunas propiedades adicionales del aceite: curación de heridas y hepatoprotección (Kawahishi *et al.*, 2001). Por su parte, los pigmentos de la pulpa de aguacate (clorofilas, carotenoides y antocianinas) contribuyen enormemente a mantener la salud; tales pigmentos se encuentran y se obtiene en diferentes estructuras vegetales del aguacate (Ding *et al.*, 2007). Todos los efectos mencionados están relacionados con diferentes tipos de compuestos químicos y la naturaleza química-estructural de éstos.

Aparte de las propiedades de los pigmentos, el aguacate es ampliamente reconocido por su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y bajos niveles de grasas saturadas, bastante similar al aceite de oliva. El alto consumo de aguacate ha sido relacionado con la reducción de lipoproteínas de baja densidad (colesterol malo) e incremento de lipoproteínas de alta densidad (colesterol bueno) (Birkbeck, 2002). Además de los compuestos ya mencionados, el aguacate también presenta altos niveles de proteína (2 - 4 %), los más altos niveles de potasio entre los frutos comunes (igual o más grande que el plátano), altas concentraciones de antioxidantes, y apreciables cantidades de vitaminas A, B y E (Lyle, 2006) (Cuadros II-8 y II-9).

**Cuadro II-8. Composición de la porción comestible de aguacates California (principalmente ‘Fuerte’ por 100 g (Knight Jr., 2002).**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Agua (g)	73.6
Energía alimentaria	171
Componentes de Energía (g)	
Proteína	2.2
Lípidos	17
Carbohidratos totales	6
Fibra	1.5
Minerales (mg)	
Calcio	10
Fósforo	42
Hierro	0.6
Sodio	4
Potasio	604
Vitaminas (mg)	
A	290
Ácido Ascórbico	14
Tiamina	0.1
Riboflavina	0.2
Niacina	1.6

**Cuadro II-9. Contenido de vitaminas de la pulpa de aguacate (Knight, 2002).**

<b>Componente (por 100 g de peso fresco)</b>	<b>Intervalo de Concentración</b>
$\beta$ -caroteno (pro-vitamina A) (IU)	370-750
$\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (IU)	1.6-2.4
Ácido ascórbico (vitamina C) (mg)	1.6-30
Biotina ( $\mu$ g)	3.2-10
Colina (mg)	17-22
Folacina ( $\mu$ g)	30-62
Niacina (mg)	1.4-3.5
Ácido pantoténico (mg)	0.25-1.14
Piridoxina (vitamina B6) (mg)	0.22-0.62
Riboflavina (vitamina B2) ( $\mu$ g)	95-230
Tiamina-HCl (vitamina B1) ( $\mu$ g)	60-240
Fitol menaquinona (vitamina K) ( $\mu$ g)	0-8
Calciferoles (vitamina D)	No reportada

Los consumidores de aguacate tienden a consumir nutrientes clave como fibra, vitaminas K y E, potasio y magnesio. El aguacate contiene estos compuestos y muchos más que son importantes para la nutrición. El aguacate nos presenta un amplio panorama de estudio en cuanto a su composición química, principalmente en aquellos cultivares, variedades y / o razas que no se han estudiado.

## **2.5 Estudio de la composición química del aguacate**

El estudio de los compuestos químicos presentes en aguacate es de gran importancia y nos ayudará a sentar las bases para usar la información química de este frutal, por ejemplo en mejoramiento genético, o en su caso en aumentar el interés en aquellas variedades o razas que son poco consumidas, con lo cual se le pueden encontrar nuevas aplicaciones. En este estudio se aborda el estudio químico del aguacate a través de técnicas y estrategias en las cuales se combinan la identificación y la cuantificación de metabolitos celulares usando sofisticadas técnicas analíticas y la aplicación de métodos estadísticos y multivariados para el análisis de datos y su interpretación. En el desarrollo de métodos analíticos a lo largo del tiempo, se ha avanzado significativamente en tecnología lo que ha dado lugar a mejoras en la manera en que los sistemas biológicos son visualizados, analizados e interpretados (Sumner *et al.*, 2003).

Los aspectos mencionados forman la estructura base de la metabolómica, que es el estudio cualitativo y cuantitativo de una célula, un tejido o un organismo en cuanto a su contenido de metabolitos, en lo que se llama “metaboloma” (conjunto de metabolitos). La composición química de un organismo nos da una visualización de lo que es la interacción con el medio ambiente en que se encuentre y de factores genéticos. El análisis completo del metaboloma es muy complicado, ya que existe una gran complejidad en cuanto al contenido y la forma de interacción entre compuestos químicos (Kim *et al.*, 2011).

En los avances en tecnología mencionados anteriormente se han hecho grandes inversiones para desarrollar técnicas que analicen los diferentes productos celulares, ya que todos los compuestos son de diferente naturaleza y función, además de que varían en concentración, por lo que es difícil detectar a algunos de ellos, pero que sin embargo cumplen funciones primordiales en el metabolismo. El grupo de compuestos químicos (los que participan en la expresión de genes, las proteínas, y los metabolitos) se incluyen en diferentes enfoques como la genómica, la proteómica y la metabolómica. Estas ramas de estudio son importantes para ser el entendimiento

del comportamiento de un organismo y sus múltiples respuestas a los estímulos ambientales y factores genéticos (Roessner y Bowne, 2009).

La metabolómica es la más reciente de las ramas ómicas y su auge se ha venido viviendo en los últimos años, por lo que el número de estudios ha aumentado considerablemente; se le ha puesto mucha atención debido a que ayuda a generar conocimiento que ayuda a complementar la información y conocimiento que ofrecen la proteómica y la genómica. La metabolómica, en los últimos años, se ha aplicado en campos de la biología como la genómica funcional, fisiología, toxicología, patología, quimiotaxonomía, ecología química e investigación en productos naturales (Verpoorte *et al.*, 2007) lo cual nos muestra la gran variabilidad de aplicaciones, por lo que se comprende la importancia que ha tomado últimamente. Tomando en cuenta que el objetivo de la metabolómica es la evaluación de los cambios en concentraciones relativas de los metabolitos, debido a interacciones con factores externos (como los ambientales) o interno (factores genéticos) (Oliver *et al.*, 1998), se puede afirmar que es una rama de estudio que resulta relevante en diversas aplicaciones como lo son la salud, la alimentación y la agricultura en general.

Como se mencionó anteriormente, un estudio metabolómico ayuda a complementar los estudios genéticos, debido a que los componentes del metaboloma pueden ser vistos como los productos finales de la expresión de genes, y ayudan a definir el fenotipo de una célula o tejido. El estado bioquímico característico de un organismo puede ser medido, monitoreado y evaluado para determinar la función de los genes, para lo cual se utilizan la cuantificación y determinación de los compuestos químicos (Fiehn *et al.*, 2000). Para lograr un buen análisis del metaboloma se debe seguir ciertos pasos que ayuden a no modificar la verdadera expresión o comportamiento del organismo en el momento en que se requiera estudiar; tales pasos son: la colecta y extracción de las muestras, el análisis de los extractos, la reducción de los datos (incluyendo la estadística) y, por último, la correcta identificación de los metabolitos (Choi y Verpoorte, 2014). Hasta hoy, existen varias tecnologías de cuantificación e identificación de compuestos químicos y reportes en los cuales se comparan las ventajas y limitaciones de tales usadas en metabolómica: espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja y ultravioleta (UV), con o sin combinación con cromatografía (Verpoorte *et al.*, 2007).

RMN es una de las opciones que ofrece un panorama general de composición y son diversos los protocolos que han sido publicados junto con otras técnicas (Kim *et al.*, 2011), como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Lisec *et al.*, 2006), y la

cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) (De Vos *et al.*, 2007). En estos protocolos, se han examinado y tomado en cuenta la sensibilidad, la selectividad, y la diversidad de metabolitos detectados, además de la especificidad de tejidos vegetales específicos y naturaleza u origen químico de los compuestos a estudiar (Choi y Verpoorte, 2014). A través de las tecnologías mencionadas se obtiene una gran cantidad de datos que posteriormente requieren del uso de procedimientos matemáticos y estadísticos para extraer eficientemente la máxima cantidad de información y correcta interpretación. El análisis de componentes principales (ACP) es común en la reducción de datos sin supervisión, se usa como el primer paso del análisis de datos multivariados y es seguido por una variedad de métodos con supervisión dependiendo de calidad de los datos y los intereses de la investigación, como los análisis discriminantes (Berrueta *et al.*, 2007). La mayoría de los procedimientos aquí señalados se aplican en algunos de los experimentos aquí presentados.

Como todos los procedimientos, técnicas y protocolos, los estudios metabolómicos tienen sus limitaciones o desventajas; la mayor de las limitaciones es no poder obtener el metaboloma completo en un solo estudio, lo cual está relacionado a la complejidad química del metaboloma, la interacción entre los compuestos, las matrices en las que se encuentren, la variación biológica en la mayoría de los organismos vivos, y las limitaciones de la instrumentación (Sumner *et al.*, 2003).

Actualmente, se sabe que una sola tecnología analítica, sea cual sea, no provee la suficiente visualización del metaboloma completo, es decir, información de todos los metabolitos en un solo estudio, y por lo tanto, se necesitan varias de éstas para lograr un entendimiento real y completo del comportamiento del metabolismo (Hall *et al.*, 2002). Para seleccionar la tecnología más adecuada se debe tener en cuenta la velocidad de análisis, la selectividad y la sensibilidad, además del tipo de compuesto que se desea analizar; la relación entre la técnica y el compuesto químico a analizar está dada por la naturaleza de este último. Algunas técnicas como la RMN son rápidas y selectivas, pero presentan baja sensibilidad, es decir no detectas cantidades o concentraciones bajas de compuestos. Otras como la electroforesis capilar acoplada a un detector por fluorescencia inducida por láser son altamente sensibles, pero de baja selectividad. También, los métodos acoplados como CG-EM y CL-EM ofrecen buena sensibilidad y selectividad, pero los tiempos de análisis son más largos; con la ventaja que ofrecen resultados precisos en identificación y cuantificación (Sumner *et al.*, 2003). Aparte de todo esto, es importante detectar

cambios en el metabolismo, los cuáles pueden ser drásticos o sutiles, dependiendo del tipo de interacción que se esté dando. Los cambios drásticos en el metabolismo son fácilmente detectables, sin embargo, los cambios sutiles requieren procesos analíticos más profundos, y un análisis e interpretación de resultados rigurosos para determinar si los cambios son significativos o no, y para ser capaces de asociarlos a ciertos factores (Miller y Miller, 2005).

En cuanto a las técnicas cromatográficas utilizadas para la separación e identificación de compuestos se puede mencionar que la cromatografía de gases y de líquidos son las más importantes y las más utilizadas. La cromatografía de gases es una herramienta altamente aplicable en análisis de ácidos grasos en diferentes áreas de investigación, con los procesos de derivatización correspondientes aplicados a las muestras, ya que se requiere un cambio o modificación de la molécula para convertirlas en semi- o volátiles y se puedan adaptar al flujo de gas, lo cual ayudará a una mejor separación (Seppänen *et al.*, 2002). El análisis de este tipo de compuestos requiere de una gran resolución cromatográfica especialmente para evidenciar la posición y geometría de isómeros de ácidos grasos insaturados y de su número de carbonos (Ruiz *et al.*, 2010), problema muy frecuente en diversos compuestos, especialmente metabolitos primario, por sus parecidos estructurales. Junto con la CG, la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) (en fase normal y fase reversa) se ha usado en el análisis y separación de ácidos grasos y otros compuestos. Por ejemplo, la CL en fase reversa también se utiliza para el análisis de ácidos orgánicos, ácidos grasos poliinsaturados (hidroxilados), prostaglandinas, leucotrienos, otros lípidos polares y lipoproteínas. La fase normal combina efectos de partición de la fase estacionaria polar sólida y la fase móvil no polar para separar los compuestos eficientemente. Ambas técnicas se usan acoplados a EM, lo cual es muy eficiente en la identificación de los metabolitos separados y detectados; en el caso de CG-EM, se utiliza, por lo general, la ionización electrónica para el análisis de ácidos grasos, con la cual se generan iones positivos y una extensa fragmentación, y con la suma de las masas de los fragmentos se obtiene el peso molecular del compuesto de interés, el cual se identifica, generalmente, por comparación con librerías espectrales integradas en los equipos; este tipo de ionización es utilizada en conjunto con técnicas de derivatización para obtener información estructural, pero presenta algunos problemas para la cuantificación. Por su parte, la ionización química es una forma de ionización más apacible con poca fragmentación que reproduce el ion pseudo-molecular del ácido carboxílico casi intacto (Quehenberger *et al.*, 2011). Por otra parte CLAR se ha aplicado también

en el estudio pigmentos de aguacate tanto en pulpa como en cáscara (carotenoides y antocianinas), azúcares de 7 carbonos y azúcares comunes, además de otros compuestos menos conocidos como acetogeninas y otros derivados de ácidos grasos (Ashton *et al.*, 2006; Meyer and Terry, 2008; Liu *et al.*, 1999, 2002).

Para llevar a cabo un buen análisis de los metabolitos presentes en un organismo (sea en el tejido o célula que sea) se debe poner atención en los pasos mencionados y asegurarse de obtener información fidedigna acerca del comportamiento metabólico de la especie en estudio de acuerdo a las condiciones en que se desarrollen. En el caso del estudio químico del aguacate, se ha mencionado que los compuestos más importantes son del tipo lipídico, específicamente los ácidos grasos; sin embargo, el aguacate presenta gran variedad de compuestos en sus diferentes estructuras con diferentes propiedades para lo cual se utilizan diversas técnicas analíticas para su identificación y cuantificación.

Por todo lo mencionado, resulta de gran importancia conocer las cualidades basadas en composición química de cada una de las razas y genotipos de aguacate y especies afines, a la vez que los estudios aquí propuestos pueden ayudar a conocer las diferencias y similitudes entre las razas y especies afines estudiadas, además apoyar o refutar estudios genéticos que se hayan realizado anteriormente, todo a través de estudios de naturaleza metabolómica dirigidos y no dirigidos basados en técnicas analíticas como la RMN y métodos cromatográficos acoplados a EM. Con los datos se podrá potenciar la aplicación, uso y cualidades de los genotipos y razas estudiadas con el fin de promover su consumo y competencia con las variedades más importantes comercialmente hablando.

## **2.6 Literatura Citada**

- Anusasananan, L. L. 2001. Avocado green. *Sunset* 206: 186.
- Ashton, O. B. O., M. Wong, T. K. McGhie, R. Vather, Y. Wang, C. Requejo J., P. Ramankutty, and A. B. Woolf. 2006. Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10151-10158.
- Barrientos P., A., y L. López. 1998. Historia y genética del aguacate. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S. C. Coatepec Harinas, México. p: 33-51.



- Ben-Ya'acov, A., A. Solis, and E. Peri. 1995. Progress of the study on the avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. Program and books of Abstracts of the World Avocado Congress III, Tel-Aviv, Israel. p.109
- Bergh, B. O., and N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. California Avocado Society Yearbook 70: 135-14.
- Bergh, B. O., and E. Lahav. 1996. Avocados. *In*: Janick, J., and J. N. Moore (eds.) Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits. Wiley, West Lafayette, Indiana, USA. pp: 113-166.
- Berrueta L., R. M. Alonso-Salces., and K. Heberger. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A* 1158: 196-214.
- Bertling, I., y J. P. Bower. 2006. Avocado sugars during early fruit development. *South African Avocado Growers' Associatio Yearbook* 29:38-39.
- Birkbeck, J. 2002. Health benefits of avocado oil. *Food New Zealand*. April-May: 40-42.
- Bora, P. S., N. Narain, R. V. M. Rocha, y M. Q. Paulo. 2001. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (Cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites* 52: 171-174.
- Chanderbali, A. S., V. A. Albert, V. E. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 2008. *Persea americana* (avocado): Bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays* 30: 386-396.
- Chanderbali, A. S., V. A. Albert, J. Leebens M., N. S. Altmane, D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 2009. Transcriptional signatures of ancient floral developmental genetics in avocado (*Persea americana*; Lauraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8929-8934.
- Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis, and B. N. Wolstenholme. 2013. Taxonomy and botany. *In*: *The Avocado: Botany, Production and Uses*. 2 ed. Eds. B. A. Schaffer, B. N. Wolsthenholme, and A. W. Whiley. Croydon, United Kingdom pp: 31-50.
- Choi, Y. H., and R. Verpoorte. 2014. Metabolomics: What you see is what you extract. *Phytochemical Analysis* 25: 289-290.
- Coe, S. D. 1994. *America's First Cuisines*. University of Texas Press, Austin, Texas. 276 p.
- De Vos, R. C., S. Moco, A. Lommen, J. J. Keurentjes, R. J. Bino, and R. D. Hall (2007) Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* 2: 778-791.

- Ding, H., Y. W. Chin, A. D. Kinghorn, and S. M. D'Ambrosio. 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology* 17: 386-394.
- Eyres, L., N. Sherpa, and G. Hendricks. 2001. Avocado oil: a new edible oil from Australasia. *Lipid Technology* 13: 84-88.
- FAOSTAT. 2015. <http://faostat3.fao.org/home/E>
- FAO-Tropical Fruits. 2010. Tropical Fruits: Avocado market generic promotions: United States, Chile, and South Africa. Available at: <http://www.fao.org/economic/est/commodity-markets-monitoring-and-outlook/tropical-fruits/en/>.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, and L. Willmitzer. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18: 1157-1161.
- Hall, R., M. Beale, O. Fiehn, N. Hardy, L. Sumner, and R. Bino. 2002. Plant metabolomics as the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell* 14: 1437-1440.
- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellog, P. E. Stevens, and M. J. Donoghue. 2008. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 611 p.
- Kawahishi, H., Y. Fukumoto, M. Hatakeyama, P. He, H. Arimoto, and T. Matsuzawa 2001. Liver injury suppressing compounds from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2215-2221.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2011. NMR-bases metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology* 29: 267-275.
- Knight Jr., R. J. 2002. History, distribution and uses. *In: The avocado, botany, production, and uses*. B. Schaffer, A. W. Whiley, and B. N. Wolstenholme (Eds.). CAB International. Croydon, United Kingdom 1-14.
- Koop, L. E. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea*-Lauraceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14: 1-120.
- Kostermans, A. J. G. H. 1962. The Asiatic species of *Persea* Mill. (Lauraceae). *Reinwardtia* 6: 189-194.
- Lisec, J., N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, and A. R. Fernie. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.

- Liu, X., P. W. Robinson, M. A. Madore, G. W. Witney, y M. L. Arpaia (1999) 'Hass' avocado carbohydrate fluctuation I. Growth and phenology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 671-675.
- Liu, X., J. Sievert, M. L. Arpaia, y M. A. Madore. 2002. Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 108-114.
- Lyle, S. 2006. *Fruit and Nuts - A comprehensive guide to the cultivation, uses and health benefits of over 300 food-producing plants*. Timber press, Portland, Oregon, USA. p: 480.
- Lorea H., F. G. 2009. *Persea pallescens*, a new combination for *Phoebe pallescens* (Lauraceae, *Persea*), a mistaken taxon of Mexico and Guatemala. *Novon* 19: 201-203.
- MacNeish, R. S. 1964. Ancient Mesoamerican Civilization. *Science* 143: 531-537.
- Meyer, M. D., y L. A. Terry. 2008. Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7439-7445.
- Miller, J. N., and J. C. Miller. 2005. *Statistic and chemometrics for analytical chemistry*. 5<sup>th</sup> Ed. Prentice Hall, New York, USA. 268 p.
- Moore-Goordon., C. S. 1997. Aspects of avocado fruit growth and development: towards understanding the 'Hass' small fruit syndrome. Ph. D. thesis, Department of Horticultural Science, University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa.
- Nishida, S. 1999. Revision of *Beilschmiedia* (Lauraceae) in the Neotropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 657-701.
- Oliver, S. G., M. K. Winson, D. B. Kell, y F. Baganz. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16: 373-378.
- Ozdemir, F., y A. Topuz. 2004. Changes in dry matter, oil content, and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry* 86: 79-83.
- Piperno, D. R., and I. Holst. 1998. The presence of starch grains on prehistoric tools from the humid tropics: indication of early tuber use and agriculture in Panama. *Journal of Archaeological Science* 25: 765-776.

- Quehenberger, O., A. M. Armando, and E. A. Dennis. 2011. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811: 648-656.
- Roessner, U., and J. Bowne. 2009. What is metabolomics all about? *BioTechniques* 46: 363-365.
- Rowher, J. G. 1993 Lauraceae. *In*: Kubitzki, K., J. Rowher, and V. Bittrich (eds) *The families and genera of flowering plants*. Springer, Berlin. pp. 426-437.
- Ruiz, A., G. Reglero, and E. Ibañez. 2010. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 305-326.
- Shepherd, J., and G. Bender. 2001. A history of the avocado industry in California. *California Avocado Society Yearbook* 85: 29-50.
- Scora, R. W., B. N. Wolstenholme, and U. Lavi. 2002. Taxonomy and botany. *In*: Whaley, A. W., B. Schaffer, and B. N. Wolstenholme (eds). *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 15-37.
- Seppänen, T., I. Laakso, and R. Hiltunen. 2002. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta* 465: 39-62.
- Smith, C. E. J. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* 20: 169-175.
- Storey, W. B., B. O. Bergh, and G. A. Zentmyer. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 127-133.
- Sumner, L. W., P. Mendes, and R. A. Dixon. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817-836.
- Turner, B. L., and C. H. Miksicek. 1984. Economic plants species associated with prehistoric agriculture in the Maya lowlands. *Economic Botany* 38: 179-193.
- Van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon* 12: 575-586.
- Verpoorte, R., Y. H. Choi, and H. K. Kim. 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews* 6: 3-14.
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31: 315-320.

### **III. Relación entre el contenido de ácidos grasos de hoja y pulpa de aguacate (*Persea americana* Miller)**

#### **3.1. Resumen**

Se realizó el análisis del contenido de aceite y composición lipídica de pulpa y hoja de aguacate para determinar si existe relación entre ellas, con el fin de explorar la posibilidad de predecir la calidad de aceite en los frutos. Se realizó una extracción simple de aceite con solvente, con ayuda de agitación y reposo, como principales puntos del primer proceso. El contenido de aceite se determinó por diferencia de peso, y posteriormente se procedió a cuantificar los ácidos grasos presentes en el aceite por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Se colectaron hojas completamente maduras y frutos en madurez fisiológica de árboles de aguacate de 25 genotipos, y se realizaron tres repeticiones por genotipo. A los datos se les realizó un análisis de correlación múltiple. Los resultados indicaron que el contenido de aceite en hoja es muy bajo en comparación al contenido de aceite en pulpa, esto a pesar de que coinciden con la presencia de algunos ácidos grasos, sin embargo, su proporción es totalmente diferente. Mientras en pulpa la presencia de ácido oleico es predominante en la gran mayoría de las variedades analizadas, en hoja, el ácido palmítico es el de mayor presencia, aunque en pulpa también se encuentra como el segundo ácido graso de mayor contenido. De acuerdo a los resultados obtenidos solo se presentó correlación entre algunos ácidos grasos de ambas estructuras vegetales. Los principales ácidos grasos que se vieron correlacionados entre estructuras vegetales, fueron el ácido vaccénico de la hoja, el ácido esteárico tanto de hoja como de pulpa y el ácido *Z*-metil-5,11,14,17-eicosatetraenico. Estos ácidos grasos no son los principales en aguacate, sin embargo, pueden poseer propiedades o funciones importantes. En general, los ácidos grasos se presentan en ambas estructuras vegetales, pero al parecer, debido a su contenido y composición, sus funciones e importancia son totalmente diferentes.

### 3.2. Abstract

Analysis of oil content and lipid composition of pulp and avocado leaf was performed to determine the correlation between them, in order to explore the possibility of predicting oil quality in the fruit. A simple solvent extraction of oil was performed using shaking and rest, as the main points of the first process. The oil content was determined by weight difference, and then proceeded to quantify the fatty acids present in the oil through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Fully mature leaves and fruits at physiological maturity of 25 genotypes of avocado trees were collected, and three replicates were performed per genotype. The data were evaluated by a multiple regression analysis. The results indicated that the oil content in leaf is very low compared to the oil content in pulp, even though it coincides with the presence of some fatty acids, however, the ratio is entirely different. While the presence of oleic acid in pulp is predominant in most varieties analyzed, in leaf, palmitic acid is the most abundant, although in pulp is also the second highest fatty acid content. According to the results obtained only correlation between some fatty acids of both structures are presented. The main fatty acids which were correlated among plant structures were vaccenic acid from leaf, stearic acid from both pulp and leaf, and the *Z*-methyl-5,11,14,17-eicosatetraenoic acid. These fatty acids are not main compounds of avocado, however, they may possess properties or important functions. In general, fatty acids are present in both plant structures, but apparently because of its content and composition, functions and importance are totally different.

### 3.3. Introducción

Hoy en día se ha dado especial atención a las propiedades nutricionales y funcionales de diferentes especies vegetales y se han mejorado las técnicas para el análisis de la composición química y ensayos que puedan comprobar tales efectos. Un aspecto que se tomó en cuenta en este estudio es la grasa que se consume en la dieta, que especialmente llama la atención ya que algunos tipos de éstas pueden ayudar a mejorar o recuperar la salud de forma significativa. Una especie que está implicada en este aspecto, es el aguacate (*Persea americana* Mill.), con propiedades nutraceuticas importantes y con un uso industrial que va a la alza por su aceite (cosmética, principalmente). En México el aguacate es uno de los frutales más importantes económicamente hablando, pues nuestro país es el principal productor y exportador a nivel mundial.

Los ácidos grasos son los principales y más estudiados compuestos químicos contenidos en el aceite de aguacate obtenido de la pulpa. Estos compuestos tienen implicaciones en la salud, pues ayudan a mejorar y/o reducir riesgos de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertensión arterial, diabetes mellitus y obesidad (Pérez *et al.*, 2005).

El aceite de origen vegetal alcanza el 25 % del consumo de calorías en la dieta humana (Brown *et al.*, 1999), y el balance de ácidos grasos saturados e insaturados tiene profundos efectos en la salud humana, particularmente en la mejora del metabolismo (Hulbert *et al.*, 2005).

El fruto de aguacate es una de las fuentes naturales importantes de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y disaturados (linoleico). El aceite de aguacate a menudo es comparado con el aceite de oliva debido a su similar composición en cuanto al contenido de ácidos grasos. El contenido de aceite en la pulpa del aguacate está por arriba del 20 % y se ha utilizado en aplicaciones alimenticias, medicinales y cosméticas (Peréz *et al.*, 2005). Esencialmente, el aceite es fuente de energía y nutriente básico que suministra ácidos grasos (entre ellos los esenciales), vitaminas y antioxidantes. Estas funciones son relevantes en cualquier estructura vegetal que se encuentren.

Los ácidos grasos, tanto en forma libre como parte de lípidos complejos, tienen un papel fundamental en el metabolismo: es el mayor combustible metabólico (almacenamiento y transporte de energía), es componente esencial de las membranas celulares, y como reguladores de genes. Además, los lípidos de la dieta proveen ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) que son precursores metabólicos poderosos como los eicosanoides, además de otras importantes

funciones. Estos compuestos son pobremente solubles en agua en su forma no asociada (ácida), mientras que son relativamente hidrofílicos como sales de potasio o sodio, y son fácilmente extraídos con solventes no polares de soluciones o suspensiones por la baja de pH para formar el grupo carboxilo no cargado (Rustan y Drevon, 2005).

Los lípidos de membrana (especialmente los ácidos grasos) son las mayores barreras que delinear la célula y sus compartimentos, y forman los sitios donde muchos procesos esenciales ocurren, incluyendo la captura de luz y las reacciones de transporte de electrones de la fotosíntesis (van Meer *et al.*, 2008). Los ácidos grasos en las células casi no se encuentran en la forma de ácidos grasos libres, en su lugar, su grupo carboxilo es esterificado o modificado de otra manera. En membranas, casi todos los ácidos grasos son encontrados esterificados a glicerol, a los cuáles se les denomina glicerolípidos. La localización de la síntesis de ácidos grasos en plantas es realizada en los plastidios a diferencia de los animales y hongos, lo cual da la pauta a pensar en diversos mecanismos para exportar estos compuestos del plastidio a otros sitios de la célula (Ohlrogge y Browse, 1995).

Las plantas que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico (18:2) y aquellos monoinsaturados como el ácido oleico (18:1), han sido cultivadas ampliamente y su aceite es muy consumido. Sin embargo, algunos aceites de plantas con semillas, tienden a ser escasos en cuanto al contenido de ácidos grasos de más de tres dobles enlaces, como el ácido linolénico (18:3). Las hojas de plantas silvestres comestibles usadas para propósitos culinarios dan bajos rendimientos de aceite, pero son una fuente rica de ácidos grasos esenciales tal como el ácido linolénico y el linoleico (Guil y Rodríguez, 1999). Es importante conocer la composición de ácidos grasos en hoja de aguacate y relacionarlo con alguno de los usos que se le da a la hoja en forma de extracto, ya sea de forma comestible o medicinal.

Por otra parte, la calidad del fruto de aguacate está muy relacionada con la calidad de aceite de la pulpa y su contenido de ácidos grasos (Ozdemir y Topuz, 2004). Cada temporada de cosecha existe una variación en el contenido y composición de aceite que pueden influir en la calidad del fruto, y el conocer de manera preventiva el contenido y composición de aceite y ácidos grasos de hoja de aguacate nos podría ayudar a predecir el contenido y calidad de aceite y ácidos grasos antes de la aparición del fruto en cada temporada, además de auxiliar en los programas de selección y mejoramiento genético para predecir la posible calidad del fruto antes de que los



árboles entren en producción. El objetivo de este estudio fue el de relacionar el contenido de ácidos grasos de distintos genotipos de aguacate en hoja y fruto.

### **3.4. Materiales y Métodos**

#### **3.4.1. Colecta de material vegetal**

En 2012, se colectaron hojas completamente maduras y frutos en madurez fisiológica (listos para cosechar) de árboles de aguacate de 25 genotipos de la Fundación Salvador Sánchez Colín, S.C., ubicada en Coatepec Harinas, Estado de México, México (19° 57' N, 99° 46' W) a 2140 msnm, con clima subhúmedo y temporada lluviosa en verano y algunas precipitaciones en invierno (Rogel *et al.*, 2000). Las muestras fueron colectadas de tres árboles diferentes. Cada fruto y hoja representó una repetición. Se analizaron tres repeticiones.

#### **3.4.2. Extracción de aceite de hoja y pulpa de aguacate**

La extracción de aceite de hoja y pulpa de aguacate, además de la reacción de derivatización de ácidos grasos se realizó de acuerdo al método que a continuación se describe: el proceso de extracción de ácidos grasos es similar para hoja (1.5 g) y pulpa (20 g). Para el caso de la hoja, ésta se trituró en un mortero con pistilo agregando a la vez nitrógeno líquido para un mejor rompimiento de las células. La pulpa se procesó haciendo una pasta y se eliminó el agua presente. Posteriormente se agregó hexano para la extracción de aceite (10 mL para el caso de hoja, y 30 mL para pulpa). La muestra se colocó en el baño ultrasónico por 30 min, para después centrifugar a 3500 g por 5 min, y este proceso se repitió 2 veces. Se secaron los extractos en rotaevaporador y se obtuvo el peso del aceite por diferencia de peso.

#### **3.4.3. Derivatización de ácidos grasos**

Para la cuantificación de ácidos grasos se realizó una reacción de derivatización a 100 µL de aceite. Se agregó 1 mL de NaOH 0.5 M, se dejó reaccionar por 30 min a 75 °C en baño de agua y posteriormente se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, para después agregar 1 mL de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol al 14 %, se dejó reaccionar por 20 min a 75 °C en baño de agua, luego el contenido se transfirió a un tubo de centrifuga de vidrio y se le agregó 1 mL de agua destilada y 1 mL de hexano, la solución se agitó en un Vortex por un minuto, en algunos

casos se centrifugó a 3500 rpm x 3. Se separó la fase orgánica (capa de hexano) y se le agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua y luego se transfirió el extracto de hexano a un vial de cromatografía de gases y se almacenó a -20 °C.

Para la cuantificación de ácidos grasos se empleó un cromatógrafo de gases (CG) Agilent Technologies 7890A acoplado a un detector selectivo de masas 5975C inert MSD. El flujo de He acarreador fue de 1 mL/min, la temperatura del horno fue de 100 °C, la temperatura del detector (MSD) fue de 250 °C y la temperatura del cuadrupolo de 150 °C. La primer rampa de calentamiento fue de 100 a 170 °C con un incremento de 10 °C/min, la segunda rampa de calentamiento fue de 170 a 280 °C con un incremento de 10 °C/min, con un tiempo total de la elusión de 33 min. El volumen de inyección fue de 1 µL.

#### **3.4.4. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de correlación múltiple de Pearson con el programa SigmaPlot 12.1. Se realizaron tres repeticiones por cada genotipo y estructura vegetal analizada.

### **3.5. Resultados**

En el fruto de aguacate el aceite y los ácidos grasos presentes en éste, son los componentes más importantes, químicamente hablando. El contenido de aceite en hoja es muy bajo en comparación con el aceite extraído de la pulpa (Cuadro III-1). En la mayoría de los genotipos analizados el porcentaje de aceite en hoja es del 0.67 %, aunque en algunos como Encinos, 148 PLS, 222 y Ariete el contenido varía desde 1.11 a 1.55 %. En pulpa, el contenido de aceite es mucho mayor en comparación con hoja. Los genotipos Pequeño y 222 presentaron porcentajes muy altos de contenido de aceite con arriba de 40 %. Algunos genotipos como Reed, 120 PLS, Fundación III, Pionero, Colín V-33 y Tepetl presentaron valores altos de aceite con porcentajes de entre 30 y 39 %. Llama la atención que la variedad ‘Hass’ presentó un nivel bajo de aceite rondando el 12 % de contenido. El resto de los genotipos presentaron niveles entre el 15 y 25 %. El genotipo Aries fue el que presentó el menor porcentaje de aceite con apenas 6.64 %.

En cuanto a la composición de ácidos grasos, podemos observar que ambas estructuras vegetales difieren en cuanto al contenido de estos compuestos. En pulpa el principal ácido graso fue el ácido oleico, y en hoja, el ácido palmítico fue el de mayor presencia en todos los genotipos analizados. El ácido oleico alcanzó altos niveles en algunos genotipos, por ejemplo en Colín V-

33 fue de alrededor de 80 %, Fuerte y Tepetl con alrededor de 75 y 71 %, respectivamente, y en Jiménez II 70 %. En genotipos como Pionero, Ariete, Filtro Negro y Derrumbe 92 se obtuvieron valores entre el 60 y 69 % lo cual también es indicativo de altos porcentajes de este compuesto.

El ácido palmítico fue el compuesto de mayor porcentaje en hoja; en algunos genotipos como Encinos, Jiménez II, Aries y Filtro Negro alcanzó hasta 76 % del total de ácidos grasos, mientras que en el resto de genotipos, entre 50 y 70 %. El ácido *cis*-vaccénico fue el segundo de mayor presencia en hoja alcanzando hasta un 47 % en Fuerte, y entre 20 y 40 % en el resto de los genotipos. También en hoja, el ácido esteárico estuvo en la mayoría de los genotipos, siendo Tepetl el que presentó el mayor porcentaje de este ácido graso saturado.

En general, la presencia de ácidos grasos en ambas estructuras no tiene una relación, ya que no se alcanzaron valores significativos de correlación en los compuestos analizados. Solo se presentó correlación positiva en donde se involucra al ácido esteárico de ambas estructuras vegetales ( $r = 0.503$ ,  $P = 0.0104$ ), y también se presentó correlación positiva entre el ácido esteárico y ácido (Z)-metil-5-8-11-14-eicosatetraenoico ( $r = 0.855$ ,  $P = 0.0000000513$ ). El ácido *cis*-vaccénico de hoja se ve influenciado negativamente por el ácido (Z)-metil-5,8,11,14-eicosatetraenoico ( $r = -0.581$ ,  $P = 0.00234$ ) y por el mismo ácido esteárico de la pulpa ( $r = -0.417$ ,  $P = 0.0378$ ), es decir, ante la presencia de estos dos ácidos grasos, se disminuye la cantidad de ácido *cis*-vaccénico (Cuadro III-2).

Los ácidos grasos de la pulpa se ven influenciados entre sí, pues presentan valores significativos de correlación. El ácido *trans*-13-octadecenoico está correlacionado significativamente con el Z-7-hexadecenoico ( $r = 0.812$ ,  $P = 0.000000819$ ), así como algunos otros ácidos grasos que presentan valores significativos con coeficientes de correlación positivos y negativos de entre  $r = 0.4 - 0.6$ . En sí, existe correlación entre unos pocos ácidos grasos en ambas estructuras vegetales, pero esta correlación no se presenta en los principales ácidos grasos del fruto de aguacate como lo son el ácido oleico y el ácido palmítico.

### 3.6. Discusión

En este estudio se encontró que el contenido de aceite en hoja es muy bajo con respecto al contenido en pulpa, mientras que en ésta última el aceite es un componente característico. En hoja, de acuerdo al tipo de compuestos encontrados, se puede mencionar que éstos actúan como un componente estructural en membranas y no como reserva de energía como lo hacen en la pulpa. Rustan y Drevon (2005) mencionaron que los ácidos grasos tanto en forma libre como parte de complejos lipídicos participan en un número importante de funciones en el metabolismo, siendo el mayor combustible metabólico (almacenamiento y transporte de energía), componente de membranas, y regulador de genes.

En hoja, no se presenta diferencia significativa en cuanto al contenido de aceite total entre variedades, se encontraron niveles muy bajos de aceite, por lo que no es posible tomarlo como base de comparación con la pulpa. Solo tres variedades del total presentaron un nivel más alto del contenido de aceite en hoja, pero no representan diferencia significativa con el resto. Sin embargo, en la pulpa el contenido de aceite es sobresaliente en algunas variedades, llamando fuertemente la atención como el genotipo Pequeño y el 222 con alrededor del 40 %.

Las diferencias tanto en contenido de aceite como del tipo y cantidad de ácidos grasos de la fracción lipídica de hoja de aguacate de las diferentes variedades fueron pequeñas y despreciables; sin embargo, dentro del bajo contenido de aceite en hojas se pudo determinar la presencia y dominancia de los ácidos grasos saturados, ácido palmítico y ácido esteárico. Tales ácidos grasos actúan como componentes fundamentales de las membranas celulares que debido a su estado de saturación les pueden dar más resistencia y solidez a tales estructuras celulares, y aportar mayor rigidez a las hojas en estado maduro. También, en hoja se encontró mayoritariamente un ácido graso que no estuvo presente en la pulpa de aguacate, el ácido vaccénico, el cual es insaturado, parecido estructuralmente al ácido oleico, ya que es un isómero geométrico y posicional de éste y es precursor del ácido linoleico conjugado (Wang *et al.*, 2008).

El ácido linoleico también fue encontrado en hoja de algunas variedades analizadas, tal como en los genotipos Hass, Pequeño, Aguilar, Tepetl y Fundación III. Como se mencionó, los ácidos grasos saturados son los que se presentan en mayor cantidad en hoja en comparación con los ácidos grasos insaturados, principalmente el ácido palmítico (16:0), el cual es el ácido graso saturado más común en animales, plantas y microorganismos (Rustan, and Drevon, 2005). Este

compuesto es el principal componente de los ácidos grasos de hojas de plantas resistentes y sensibles al frío, cuyos porcentajes oscilan entre el 35 y 55 % (Murata *et al.*, 1982).

En hoja de aguacate, el ácido palmítico alcanza niveles de más del 70 % en algunas variedades y la mayoría de ellas oscila entre el 30 y el 50 %, como punto adicional se pueden tomar en cuenta estos datos para estudiar la resistencia al frío de las diferentes variedades de aguacate. El otro ácido graso saturado es el ácido esteárico el cuál se encuentra en mayor cantidad en animales y en algunos hongos que en plantas (Rustan y Drevon, 2005). El ácido esteárico es saturado y se presenta como complemento del ácido palmítico como componentes abundantes en la hoja de aguacate, sobre todo en membranas. La presencia de ácidos grasos en membranas celulares se puede dar ya sea en forma libre (niveles muy bajos) y formando parte de fosfolípidos o en forma de ésteres unidos moléculas de naturaleza similar al colesterol (Funari *et al.*, 2003).

Los ácidos grasos insaturados se presentan en menor medida en las hojas. En este caso, se encontraron los ácidos oleico y *cis*-vaccénico, el primero de ellos en mucho menor medida, ya que solo se presentó en la variedad Fuerte, y el ácido *cis*-vaccénico se encontró en mayor cantidad en tal estructura vegetal. Como se mencionó, el ácido *cis*-vaccénico es parecido estructuralmente al ácido oleico, y en este caso no se encontró en pulpa pero si en hoja.

Anteriormente, Ratovohery *et al.* (1988) encontraron este ácido en la pulpa de aguacate de las variedades Zutano, Fuerte, Bacon y Lula, y en todos esos casos junto con ácido oleico y ácido linoleico. La poca presencia de este tipo de ácidos grasos hace suponer que las membranas celulares son poco fluidas, es decir hay un mayor nivel de rigidez y un tráfico de solutos más estricto en la etapa de desarrollo en que se encontraban al momento del estudio. Al comparar el contenido de aceite y ácidos grasos de ambas estructuras vegetales podemos darnos cuentas que no hay elementos para pensar que la presencia de tales compuestos esté influida por su presencia en una u otra estructura. En hoja el contenido de aceite total es demasiado bajo por lo que se puede decir que la hoja no se caracteriza por la presencia de aceite, lo que en pulpa es característico como lo muestran los datos.

Debido a los resultados presentados y al comportamiento de la presencia en tipo y cantidad de aceite y ácidos grasos, no es posible predecir o inferir la presencia y cantidad de aceite y de ácidos grasos antes de la aparición del fruto en el inicio o temporada de producción. El estudio de los ácidos grasos ofrece un amplio panorama de estudio hacia otros casos, por ejemplo, la participación de este tipo de compuestos en momentos de condiciones extremas (estreses) en las

que se encuentre la planta (o la estructura vegetal) y ver la influencia, los cambios y las funciones que pudiesen presentar estos compuestos ante tales situaciones.

### **3.7. Conclusiones**

El contenido de aceite en hoja y pulpa es diferente en proporción y composición. Se observó que el contenido de ácidos grasos en ambas estructuras es diferente, mostrándose el dominio de los ácidos grasos saturados principalmente ácido palmítico en la hoja y los ácidos grasos monoinsaturados en la pulpa principalmente ácido oleico. Debido a lo antes expuesto se concluye que no existe correlación entre el contenido de aceite y composición ácidos grasos de hoja y pulpa de aguacate, sin embargo estos compuestos químicos son lo de mayor dominancia e importancia en esta especie.

### **3.8. Literatura citada**

- Brown, L., B. Rosner, W. W. Willett, and F. M. Sacks. 1999. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 69:30-42.
- Funari, S. S., F. Barcelo, and P. V. Escribá. 2003. Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *Journal of Lipid Research* 44:567-575.
- Hulbert, A. J., N. Turner, and L. H. Storlien, and P. I. Else. 2005. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological Reviews* 80:155-169.
- Guil, J. L., and I. Rodríguez. 1999. Lipid classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants. *European Food Research and Technology* 209:313-316.
- Murata, N., N. Sato, N. Takahashi, and Y. Hamazaki. 1982. Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiology* 23:1071-1079.
- Ohlrogge, J., and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7:957-970.
- Ozdemir, F., and A. Topuz. 2004. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry* 86:79-83.
- Pérez, R., S. Villanueva y R. Cossío R. 2005. El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis* 3:1-11.

- Ratovohery, J. V., Y. F. Lozano, and E. M. Gaydou. 1988. Fruit development effect on fatty acid composition of *Persea americana* fruit mesocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36:287-293.
- Rogel, C. I., R. B. Muñoz y C. J. G. Cruz. 2000. Propagación de aguacatero por acodo utilizando etiolación, ácido indolbutírico y obstrucción de savia, en vivero. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6:101-104
- Rustan, A. C., and C. A. Drevon. 2005. Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Science Wiley*. 7 p.
- van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology* 9:112-124.
- Wang, Y., J. Lu, M. R. Ruth, S. D. Goruk, M. J. Reaney, D. R. Glimm, D. F. Vine, C. J. Field, and S. D. Proctor (2008) *Trans*-11-vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipemic effects in JCR:LA-cp rats. *The Journal of Nutrition* 138(1):2117-2122.

**Cuadro III-1. Contenido de aceite y ácidos grasos en pulpa y hoja de aguacate.**

Genotipo o Variedad	Estructura	Aceite Total	Palmitoleico	Palmítico	Linoleico	Oleico	Vaccénico	Trans-13-octadecenoico	Esteárico	Z-Metil-	Metil-8,11,14,17-eicosatetraenoico
										5,11,14,17-eicosatetraenoico	
<b>Hass</b>	Pulpa	11.96	0.51	8.90	4.15	58.29	NE	NE	0.53	0.24	27.44
	Hoja	0.67	NE	53.59	7.38	NE	29.07	NE	9.09	NE	NE
<b>Fuerte</b>	Pulpa	28.93	2.30	14.39	2.88	75.53	NE	NE	0.63	4.30	NE
	Hoja	0.67	2.79	44.99	NE	5.66	7.03	47.06	10.00	NE	NE
<b>Pequeño</b>	Pulpa	40.93	14.49	19.67	6.27	49.70	NE	15.11	0.46	5.10	NE
	Hoja	0.67	NE	54.07	2.36	NE	28.66	NE	16.03	NF	NE
<b>Aguilar</b>	Pulpa	14.58	0.72	11.06	10.80	68.75	NE	NE	0.47	NE	8.10
	Hoja	0.67	NE	36.92	6.69	NE	47.35	NE	9.04	NE	NE
<b>55 PV2</b>	Pulpa	24.85	0.67	9.46	7.61	57.70	NE	NE	0.31	0.14	24.21
	Hoja	1.33	NE	76.36	1.00	NE	22.62	NE	NE	NE	NE
<b>Encinos</b>	Pulpa	19.38	0.86	8.32	7.24	59.66	NE	NE	0.62	NE	23.32
	Hoja	1.55	NE	76.36	1.00	NE	22.62	NE	NE	NE	NE
<b>Reed</b>	Pulpa	39.87	4.76	22.85	9.91	56.60	E	2.05	0.32	NE	3.51
	Hoja	0.67	NE	67.52	1.00	NE	31.51	NE	NE	NE	NE
<b>Jiménez II</b>	Pulpa	13.66	3.59	15.49	4.44	70.16	NE	2.38	0.24	NE	3.74
	Hoja	0.67	NE	76.36	1.00	NE	22.62	NE	NE	NE	NE
<b>Aries</b>	Pulpa	6.64	0.51	19.53	6.88	64.86	NE	NE	0.69	NE	7.63
	Hoja	0.67	NE	76.36	1.00	NE	22.62	NE	NE	NE	NE
<b>Fundación III</b>	Pulpa	38.29	2.97	21.89	8.69	63.59	NE	1.36	NE	NE	1.47
	Hoja	0.67	NE	67.52	1.00	NE	31.51	NE	NE	NE	NE
<b>Filtro Negro</b>	Pulpa	18.30	1.46	21.10	8.36	68.10	NE	0.48	NE	0.48	NE



	Hoja	0.67	NE	76.36	1.00	NE	22.62	NE	NE	NE	NE
<b>Tepetl</b>	Pulpa	32.22	0.78	15.62	4.76	71.07	NE	NE	0.82	6.94	NE
	Hoja	0.67	NE	67.72	2.85	NE	9.11	NE	21.66	NE	NE
<b>148 PLS</b>	Pulpa	15.40	1.64	20.84	15.36	49.17	NE	1.57	0.37	NE	11.07
	Hoja	1.55	NE	69.13	NE	NE	30.67	NE	NE	NE	NE
<b>Derrumbe</b>	Pulpa	11.37	6.57	24.34	6.36	62.07	NE	0.64	NE	NE	NE
<b>92</b>	Hoja	0.67	NE	59.40	NE	NE	40.59	NE	NE	NE	NE
<b>120 PLS</b>	Pulpa	39.15	3.10	22.77	14.20	55.46	NE	1.82	NE	NE	2.96
	Hoja	0.67	NE	67.12	NE	NE	32.87	NE	NE	NE	NE
<b>222</b>	Pulpa	40.48	4.70	20.30	7.84	63.69	NE	1.33	NE	2.13	NE
	Hoja	1.33	NE	62.62	NE	NE	37.38	NE	NE	NE	NE
<b>Casitas</b>	Pulpa	25.80	8.34	21.88	9.21	59.27	NE	1.29	NE	0.10	NE
	Hoja	0.67	NE	60.64	NE	NE	39.35	NE	NE	NE	NE
<b>Ariete</b>	Pulpa	12.53	0.73	15.24	9.68	69.04	NE	0.57	0.10	NE	4.79
	Hoja	1.11	NE	64.23	NE	NE	35.76	NE	NE	NE	NE
<b>Duke</b>	Pulpa	14.77	5.55	26.18	4.34	62.73	NE	1.19	NE	NE	NE
	Hoja	0.67	NE	60.97	NE	NE	39.02	NE	NE	NE	NE
<b>Lamb Hass</b>	Pulpa	18.32	2.37	23.75	17.56	37.85	NE	0.33	0.22	NE	18.04
	Hoja	0.67	NE	63.43	NE	NE	36.56	NE	NE	NE	NE
<b>Fundación</b>	Pulpa	10.63	5.66	29.84	14.73	47.05	NE	1.24	NE	1.49	NE
<b>II</b>	Hoja	0.67	NE	61.14	13.08	NE	26.10	NE	NE	NE	NE
<b>Colín V-33</b>	Pulpa	34.35	0.28	10.25	4.76	79.27	NE	NE	0.37	NE	5.23
	Hoja	0.67	NE	66.32	NE	NE	33.68	NE	NE	NE	NE
<b>Mike</b>	Pulpa	9.63	0.10	13.35	6.58	40.83	NE	NE	0.93	0.49	37.98
	Hoja	0.67	NE	67.89	NE	NE	32.10	NE	NE	NE	NE

<b>Pionero</b>	Pulpa	35.72	0.60	15.42	5.19	69.64	NE	0.10	NE	NE	9.20
	Hoja	0.67	NE	54.70	NE	NE	45.30	NE	NE	NE	NE
<b>Colínmx</b>	Pulpa	11.13	0.33	5.87	6.73	38.29	NE	0.32	0.52	NE	48.02
	Hoja	0.67	NE	51.26	NE	NE	48.74	NE	NE	NE	NE

---

Los datos se presentan como porcentaje. NE = No encontrado. Promedio de tres repeticiones.



#### IV. Estudio metabolómico basado en Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) de pulpa y cáscara de aguacate, y algunas especies de *Persea*

##### 4.1. Resumen

Se realizó un estudio metabolómico de pulpa y cáscara de aguacate y dos especies afines a través de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) para determinar las diferencias o similitudes en composición química general entre ellas. Se utilizaron genotipos de la raza mexicana, raza guatemalteca y raza antillana, además de *Persea nubigena* y *Persea schiedeana*. Se obtuvo un extracto de pulpa y cáscara utilizando metanol deuterado junto con un buffer de extracción para el análisis de RMN. El procedimiento de extracción fue simple y rápido para lo cual se utilizó un equipo ultrasónico. Se realizó el análisis por medio de RMN-<sup>1</sup>H, y al espectro obtenido se le realizaron algunas modificaciones y correcciones para obtener una buena separación de picos a través de compartimentos de 0.4 ppm. Cada pico obtenido e identificado con su desplazamiento químico fue tomado como una variable. Se realizó análisis de componentes principales y de mínimos cuadrados parciales ortogonales (análisis no supervisado y supervisado, respectivamente) para determinar las diferencias y similitudes en composición química con el software SIMCA 13.0.3 Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que la raza antillana y *P. schiedeana* tienden a separarse de manera considerable del resto de los genotipos analizados; mientras que la raza mexicana, la guatemalteca, 'Hass' y *P. nubigena* comparten similitudes en cuanto a su composición química. Las distribuciones presentadas por los genotipos, tanto agrupaciones como separaciones, fueron muy similares en ambas estructuras vegetales. La raza antillana se caracterizó por la presencia de carbohidratos (alta concentración) y la raza mexicana por la presencia de compuestos de tipo aromático, mientras que el resto compartió similitudes de composición principalmente de la zona de aminoácidos del espectro, a excepción de *P. schiedeana* que contiene un tipo particular de compuestos de la zona aromática.

## 4.2. Abstract

A Proton Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) based metabolomic study of pulp and peel of avocado and two related species was performed to determine the differences or similarities about general chemical composition among them. Genotypes of the Mexican, Guatemalan and West Indian races were used, as well as *Persea nubigena* and *Persea schiedeana*. An extract of pulp and peel was obtained using deuterated methanol with extraction buffer for NMR analysis. The extraction process was simple and fast, and it was performed using an ultrasonic bath. The analysis was performed by  $^1\text{H-NMR}$ , and the spectrum obtained was corrected with some modifications in order to get good peak separation compartments (bucketing, 0.4 ppm each bucket). Each peak was obtained and identified with the chemical shift, and it was taken as a variable. Principal component analysis and partial least squares orthogonal (unsupervised and supervised analyzes, respectively) were performed to determine differences and similarities in chemical composition with the software SIMCA 13.0.3. The results allow us to affirm that the West Indian race and *P. schiedeana* tend to separate significantly from the other races and species analyzed; while the Mexican, and Guatemalan races, 'Hass' and *P. nubigena* share similarities in their chemical composition. The distribution of the genotypes was very similar in both plant structures. The West Indian race was characterized by the presence of carbohydrates (high concentration) and the Mexican race by the presence of aromatic compounds; while the rest of the races and species shared similarities in chemical composition mainly in the amino acids region of the spectrum, except for *P. schiedeana* which contain a particular type of aromatic compounds.

### 4.3. Introducción

La metabolómica es la identificación y cuantificación de todos los metabolitos presentes en un sistema (Verpoorte *et al.*, 2007; Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009) con pesos moleculares < 1500 Da (German *et al.*, 2005). Ocasionalmente, el intervalo puede ser más amplio (30 - 3000 Da) (Kim *et al.*, 2011). El metaboloma lo forman el grupo de pequeñas moléculas o metabolitos que se encuentran en la célula, en un órgano o un organismo (Wishart, 2008; Kim *et al.*, 2011). Las moléculas que forman parte del metaboloma incluyen a los péptidos, los aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, polifenoles, alcaloides, minerales o cualquier compuesto químico que sea usado, digerido o sintetizado por una célula u organismo dado (Wishart, 2008). Los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo son importantes para determinar el comportamiento del individuo, y estos compuestos son los productos finales de los procesos regulatorios celulares, y los niveles de estos pueden considerarse como la respuesta de los sistemas biológicos a cambios ambientales o genéticos, es por esto que se considera a la metabolómica como el enlace entre el genotipo y el fenotipo (Fiehn, 2002).

Un aspecto determinante del estudio metabolómico es el análisis cualitativo y cuantitativo de los metabolitos celulares. Estos nos ayudarán a conocer el estado bioquímico de un organismo, lo cual se puede utilizar para monitorear y evaluar la función de los genes, además de las respuestas del organismo a las condiciones en las que se desarrolle (Fiehn *et al.*, 2000). Se lleva a cabo a través del uso de técnicas analíticas especializadas en la separación e identificación de metabolitos. Tales técnicas deben ser de alta resolución, precisas y muy sensibles, además de poder analizar una gran variedad de compuestos de diferentes naturaleza y origen químico. Existen diversas tecnologías analíticas que se pueden utilizar dependiendo de la naturaleza química de los compuestos, entre ellas la resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases y de líquidos acopladas a espectrometría de masas (CG-EM y CL-EM) y electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (EC-EM) (Wishart, 2008).

Es sabido que una sola técnica analítica es insuficiente para proveer la completa visualización del metaboloma (Hall *et al.*, 2002), por lo que es necesario e importante realizar estudios por separado utilizando diversas técnicas o través de sistemas acoplados. La RMN tiene diversas aplicaciones en metabolómica por ejemplo en control de calidad, en

quimiotaxonomía (clasificación y caracterización), análisis de plantas genéticamente modificadas y en interacción estudios de interacción con otros organismos y el medio ambiente, además del estudio de enfermedades en humanos. En la actualidad el estudio del metaboloma basado en RMN es aceptado como una herramienta analítica eficiente para el estudio de sistemas biológicos (Kim *et al.*, 2011). La principal ventaja de la RMN sobre el resto de las técnicas analíticas es que puede detectar una amplia variedad de compuestos químicos de diferente naturaleza, además de que la cuantificación es fácil, es una técnica altamente reproducible y la identificación de metabolitos es sencilla (Verpoorte *et al.*, 2008). Además, es un método rápido y simple, pero a la vez es poco sensible, además de que en la preparación de los extractos el daño hacia éstos es mínimo (Sumner *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2010a).

Como se mencionó, la quimiotaxonomía es una de las aplicaciones de la RMN, ya que a través del perfil metabolómico obtenido por esta técnica se puede clasificar y caracterizar plantas y preparaciones derivadas de ellas. Existen diversos ejemplos de la aplicación de la técnica, como la clasificación de especies de *Ilex* (Kim *et al.*, 2010b), de *Cannabis sativa* (Choi *et al.*, 2004), de *Ephedra* y muestras comerciales de estas (Kim *et al.*, 2005), también, la diferenciación metabolómica y clasificación de especies de *Verbascum* (Georgiev *et al.*, 2011), la discriminación de preparaciones comerciales de *Matricaria* (Bailey *et al.*, 2002) y muestras comerciales de catuaba (Daolio *et al.*, 2008), entre otros. El uso de RMN en este estudio para clasificar químicamente las razas de aguacate y dos especies afines basado en un análisis por RMN-<sup>1</sup>H es idóneo.

El aguacate (*Persea americana* Miller) (Lauraceae) (Renner, 1999) se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rohwer, 1993); a través del tiempo ha sido objeto de estudio en cuanto a su composición química, principalmente de su contenido de ácidos grasos. De acuerdo a Lorea (2002), el género *Persea* (y en general la familia Lauraceae) son difíciles de clasificar taxonómicamente, debido a las características florales, ya que son muy similares entre las especies relacionadas y se traslapan (van der Werff, 2002). El aguacate es una especie muy variable (Knight Jr., 2002), lo cual se demuestra en las variaciones presentadas en la especie debido a las diferentes condiciones en que crecen (Galindo-Tovar, 2008), principalmente las condiciones ecológicas, como la temperatura y

humedad, y también, las características del fruto (textura y color de la cáscara, contenido de aceite) (Ashworth y Clegg, 2003).

En nuestro país se desarrollan las tres razas (categorías infraespecíficas informales) de aguacate, las cuales son ampliamente reconocidas: la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. et Cham. Blake), la raza guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Williams), y la raza antillana (*P. americana* var. *americana*), cada una con sus características particulares (Lavi *et al.*, 2003). Los aguacates de raza mexicana tienen buena adaptación al clima Mediterráneo, son tolerantes al frío, sus hojas tienen aroma a anís, sus frutos son de cáscara delgada, la cual es de color púrpura-negra. Por su parte, la raza guatemalteca es medianamente tolerante al frío y sus frutos se caracterizan por tener una cáscara rugosa y gruesa, la cual permanece verde hasta la madurez. Por otro lado, la raza antillana se desarrolla de manera óptima en condiciones tropicales húmedas, por lo tanto es sensible al frío, pero tiene la ventaja sobre las otras de que es muy tolerante a alta salinidad y otras condiciones edáficas adversas; además el contenido de aceite es el más bajo entre las razas, lo que le confiere una textura acuosa, además de que presenta un sabor dulce muy característico que no se encuentra en las otras dos razas (Ashworth y Clegg, 2003).

Existen otros genotipos de *Persea* que han sido cercanamente relacionados con las razas del aguacate domesticado, entre las que se encuentran *P. nubigena* (L. Wms.) (Kopp, 1966) y *P. schiedeana* Nees (Galindo-Tovar *et al.*, 2008), por poseer características físicas y de crecimiento, además de genotipos muy similares. Las principales características por las que se les relaciona se engloban en sus características morfológicas de flores, de frutos y formas de domesticación. Las variaciones presentadas entre los genotipos mencionados pueden deberse a la gran diversidad de ambientes que caracterizan las áreas de dispersión en donde se encuentran. Debido a las similitudes antes mencionadas, se he llegado a dudar si *P. schiedeana* es una variante de *P. americana* o si se trata de una especie diferente (van der Werff, 2002). La diversidad presentada en el género *Persea* es muy probable que se deba a los cambios sufridos durante su dispersión, debido a los animales dispersores o las condiciones ambientales entre las que se pueden destacar: la longitud de días, las estacionalidades, los hábitats, y la exposición a agentes causantes de enfermedades y a estas últimas como tal (Diamond, 2002); pero un aspecto muy importante causante de la gran



diversidad del aguacate es, aparte de las condiciones ambientales, el manejo y manipulación por parte del ser humano (Perales *et al.*, 2005).

Los tipos de aguacate y las especies relacionadas han sido descritas a través de sus características morfológicas, ecológicas y moleculares por diversos investigadores, pero han quedado dudas sobre la correcta agrupación o separación de tales genotipos. Los estudios moleculares se han basado en análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (Furnier *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1998), en minisatellites (Mhammed *et al.*, 1997) y microsateellites (Schnell *et al.* 2003; Ashworth y Clegg, 2003), además de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (Fielder *et al.*, 1998). Pero, los resultados han sido contradictorios, y no han resuelto realmente los problemas de clasificación. En este trabajo ensayamos a la metabolómica como una herramienta que nos podría ayudar a confirmar o refutar las clasificaciones y resultados obtenidos en otro tipo de estudios. El objetivo de estudio fue el de encontrar diferencias y/o similitudes en cuanto a la composición química general de diferentes genotipos de las razas de aguacate y especies afines, con lo que se presentará una clasificación química basada en RMN-<sup>1</sup>H.

#### **4.4. Materiales y Métodos**

##### **4.4.1. Material Vegetal**

Para el análisis por resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) se utilizaron pulpa y cáscara de los siguientes genotipos de aguacate de diferente raza y dos especies afines (Cuadro IV-1). Los frutos de raza guatemalteca ‘Olanca 2S3’ y ‘Guatemalteco Fundación’, algunos mexicanos (‘Duke 7’, ‘Pequeño Charly’ y ‘Thomas’), *Persea nubigena* y ‘Hass’ fueron colectados en la Fundación Salvador Sánchez Colín, S. C., Coatepec Harinas, Estado de México; el genotipo de raza guatemalteca ‘Corralito’ se colectó en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; los genotipos mexicanos ‘Semillero’, ‘Negrito’ y ‘Lechero’ se colectaron en Zacapala, Puebla; el genotipo mexicano ‘Don Cris’ se colectó en Tequexquináhuac, Texcoco, Estado de México; los genotipos de raza antillana en Yucatán, y *P. schiedeana* es originaria de Huatusco, Veracruz. Los frutos en madurez fisiológica (3 repeticiones) fueron obtenidos de diferentes posiciones del mismo árbol.

**Cuadro IV-1. Genotipos de aguacate y especies afines utilizados para la extracción de aceite de pulpa y cáscara.**

<b>Genotipo</b>	<b>Raza</b>	<b>Abreviatura en Gráficos</b>
‘Antillano 82’	Antillana	A-82
‘Doble Cosecha’	Antillana	Dcos
‘Lagunero’	Antillana	Lag
‘Guatemalteco Fundación’	Guatemalteca	GuF
‘Olanca 2S3’	Guatemalteca	O2S3
‘Corralito’	Guatemalteca	Cor
‘Hass’	Híbrido (G x M)	H
‘Pequeño Charly’ (Casita I)	Mexicana	Cas 1
‘Don Cris’	Mexicana	Cris
‘Duke 7’	Mexicana	Dk
‘Lechero’	Mexicana	Lec
‘Negrito’	Mexicana	Neg
‘Semillero’	Mexicana	Sem
‘Thomas’	Mexicana	Tho
<i>P. nubigena</i>	-	Pn
<i>P. schiedeana</i>	-	Ps

#### **4.4.2. Preparación de muestras**

La pulpa y la cáscara de las especies utilizadas se analizaron por separado con el método descrito por Kim *et al.* (2010). Se colectaron las muestras y se colocaron en un ultracongelador (SANYO VIP™ SERIES MDF U33V®) y posteriormente se liofilizaron (LABCONCO® MOD 7670520). Después las muestras se pesaron (25 mg) y se colocaron en un tubo eppendorf. Se le agregó CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en D<sub>2</sub>O (pH 6) que contenía 0.1 % (wt/wt) de trimetilsilil ácido propionico TSP. Las muestras se agitaron en un Vortex (Thomas Scientific®) por un minuto a temperatura ambiente (22 °C), para luego ser colocadas en un ultrasonicador (BRANSON® 3510) por 20 min a temperatura ambiente (22 °C). Después las muestras se centrifugaron por 10 min usando una centrifuga de microtubos (17000 g a temperatura ambiente). El sobrenadante (más de 1 ml) se traspasó a otro tubo eppendorf para su almacenamiento. 300 microlitros de ese sobrenadante se colocaron en tubos de RMN (5 mm). Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H fueron obtenidos en espectrómetro Bruker de 600 MHz AVANCE II NMR a 25 °C (frecuencia de protones de

600.13 MHz) equipado con una criosonda TCI y sistema gradiente Z. Se analizaron tres repeticiones por raza y especie relacionada.

#### **4.4.3. Análisis de Datos**

Los datos obtenidos por RMN-<sup>1</sup>H tuvieron que ser convertidos para el posterior análisis multivariado. Se utilizó el software AMIX (BRUKER) para convertir el espectro de RMN-<sup>1</sup>H obtenido en un archivo ASCII. En este paso, los picos obtenidos son integrados dentro de unos pequeños compartimentos (cubos), cuyo tamaño es definido por el usuario. El tamaño preferiblemente es 0.04 ppm para evitar efecto de la fluctuación de señales a causas del pH o la concentración. En este paso, también se eliminan las señales de agua y solventes para evitar su influencia en los resultados.

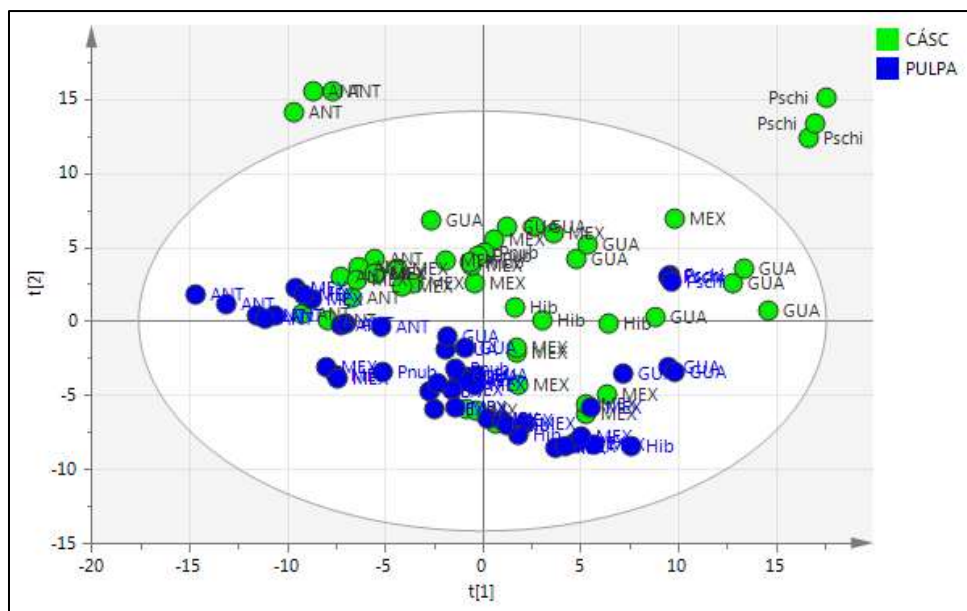
Después, los datos fueron sometidos a un análisis de componentes principales y un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales con el programa SIMCA UMETRICS 13.0.3.

### **4.5. Resultados y Discusión**

#### **4.5.1. Análisis metabolómico en pulpa y cáscara de aguacate y especies afines**

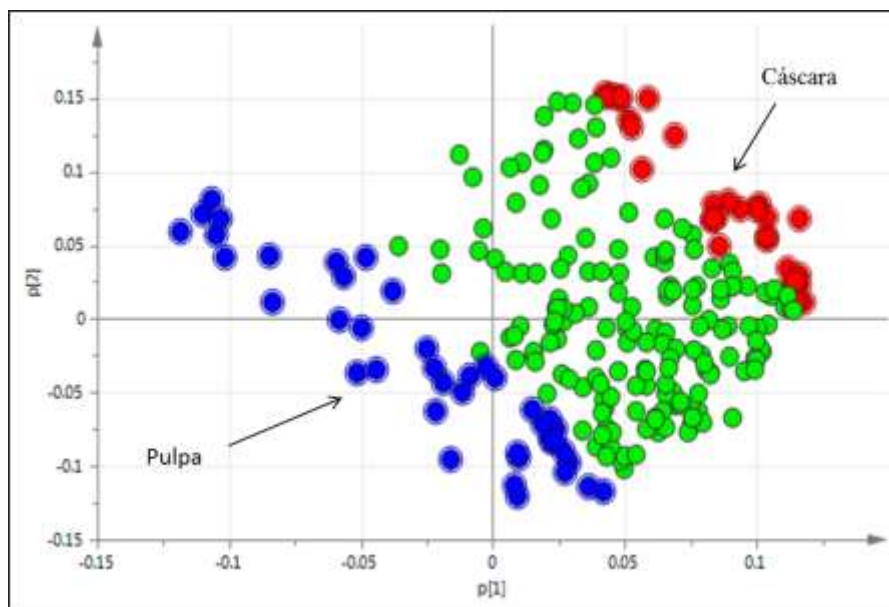
Con el análisis de componentes principales de los datos obtenidos de ambas estructuras vegetales se obtuvo un modelo con 18 componentes los cuáles explicaron el 97.1 % de la variabilidad, con los primeros 5 componentes explicando el 58 % de la variabilidad. Los primeros tres componentes explicaron el 43.5 %.

La separación entre las estructuras vegetales analizadas fue muy clara, a la vez que se logró distinguir, ligeramente, la separación entre las razas analizadas (Fig. IV-1). La raza antillana tiende a separarse del resto tanto en pulpa como en cáscara, al igual que *P. schiedeana*. El resto de las razas y genotipos tienden a agruparse en el centro del gráfico (raza mexicana, guatemalteca, 'Hass' y *P. nubigena*), que muestra el parecido químico entre éstas.

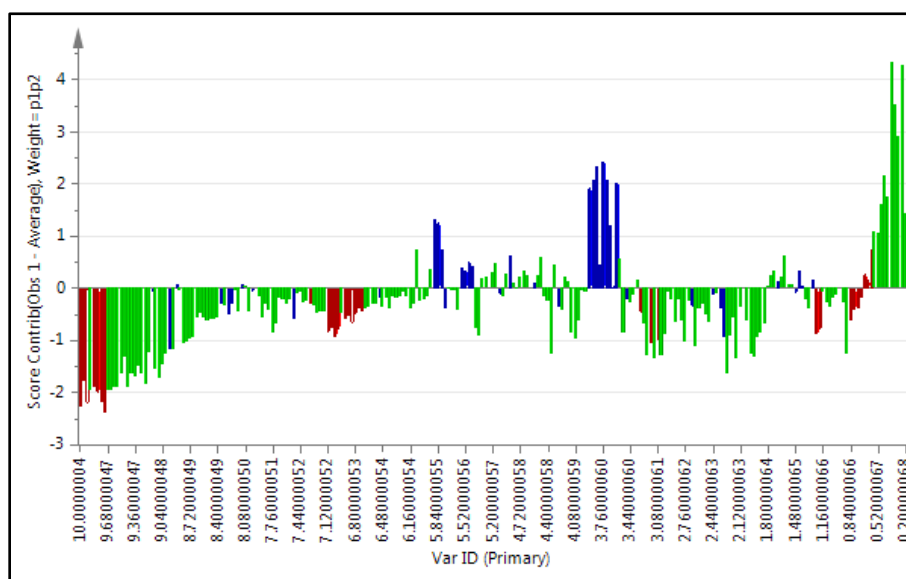


**Fig. IV-1. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por ACP a partir del análisis de RMN-1H (C: Cáscara [verde], P: Pulpa [azul])**

Las variables que caracterizan a las estructuras vegetales se concentran principalmente en la zona de azúcares del espectro y en la zona aromática. La pulpa se distingue, principalmente, por su contenido particular de azúcares y ácidos orgánicos, mientras que la cáscara, presenta particularidades en el tipo de aminoácidos y en el contenido de algunos compuestos de la región aromática del espectro (Figs. IV-2 y IV-3).



**Fig. IV-2. Gráfico de dispersión de las variables características de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H; todas las variables aparecieron en verde y se resaltan en azul y rojo las variables que caracterizan a la pulpa y cáscara, respectivamente)**



**Fig. IV-3. Puntuación de contribución de las variables analizadas en el estudio metabólico de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H, todas las variables aparecieron en verde y se resaltan en azul y rojo las variables que caracterizan a la pulpa y cáscara, respectivamente)**

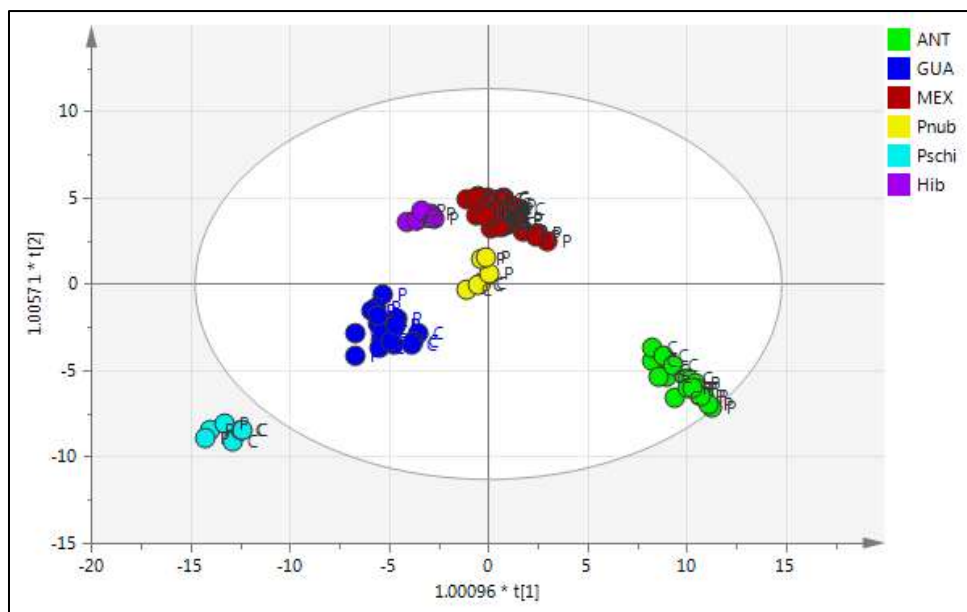
En general el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se divide en tres regiones de acuerdo a los desplazamientos químicos presentados. La primera región va de 0 a 4 ppm la cual abarca principalmente aminoácidos, la segunda región va de 4 a 8 ppm en la cual se identifica principalmente a los azúcares y la tercera región empieza desde los 8 ppm y está caracterizada por la presencia de compuestos de naturaleza aromática.

A la fecha no existen estudios metabolómicos de aguacate basados en RMN, por lo que los resultados presentados en este estudio resultan relevantes y novedosos. En general la CG-EM y CL-EM es la plataforma analítica más utilizada en estudio metabolómicos, en la que se utilizan procedimientos de ionización de la muestra, ya sea por impacto electrónico o ionización química combinándose con librerías espectrales para la identificación de compuestos químicos (Sumner *et al.*, 2003); pero hoy en día han surgido nuevas herramientas en las cuáles se pretende evitar la destrucción de la muestra, por ejemplo el acoplamiento de la CG con Ionización Química por Presión Atmosférica (APCI, por su siglas en inglés) ayuda a mejorar este proceso y evita dañar la muestra a analizar, además de que a través del acoplamiento de éstas con la espectrometría de masas en su modo tiempo de vuelo (MS-TOF, “mass spectrometry – Time of flight”) se mejora la sensibilidad de los aparatos y ayuda a detectar cantidades mínima de compuestos.

Se hace mención de esto, porque existe un estudio metabolómico basado en esta técnica (GC-APCI-TOF MS) por medio de la cual se investigó la maduración del fruto de aguacate a través de un estudio no dirigido (Hurtado-Fernández *et al.*, 2015), y al igual que este caso, se utilizó el análisis de componentes principales y el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales para explorar el perfil metabolómico de 13 variedades de aguacate de dos estados de maduración, siendo el objetivo principal investigar los cambios en la composición metabólica de frutos no maduros y maduros, observando diferencias en composición química, principalmente en azúcares, ácidos orgánicos y ácidos grasos.

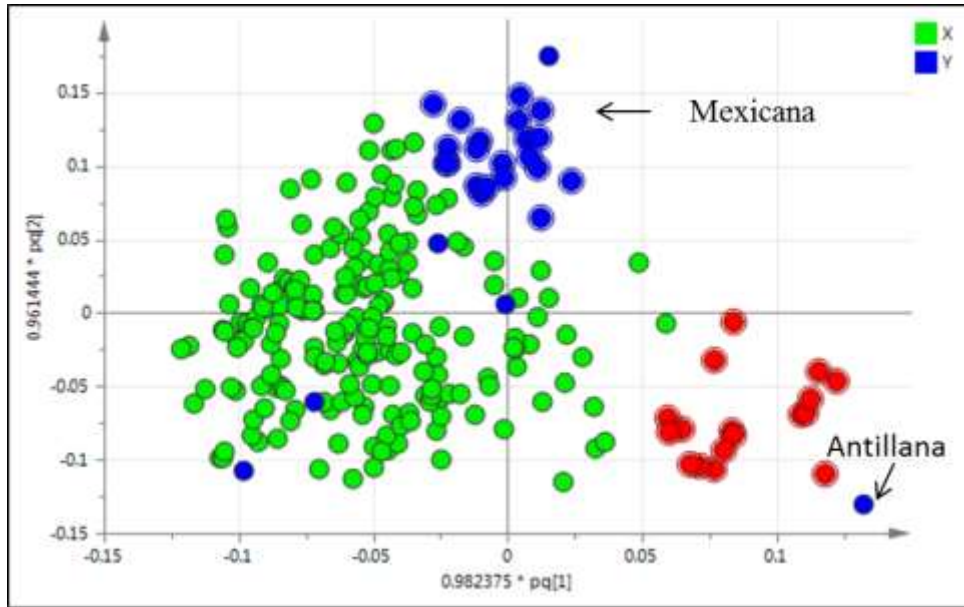
También se hizo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales utilizando los datos de cáscara y pulpa, a través del cual se puede observar la clara separación de la raza antillana de las razas mexicana y guatemaltecas, mientras que estas dos últimas tienden a estar agrupadas con ‘Hass’ y con *P. nubigena*. También, *P. schiedeana* presenta una clara separación del resto de los genotipos. Incluso dentro de los grupos clasificatorios, es decir, dentro de las razas y especies afines, se puede observar la

separación entre estructuras vegetales (**Fig. IV-4**). En este caso, ‘Hass’, al ser un híbrido entre la raza guatemalteca y mexicana, se posicionó justamente entre ellas, con un mayor acercamiento hacia la raza mexicana, aunque físicamente es más parecido a la raza guatemalteca, pero que en composición química es más similar a la raza mexicana.

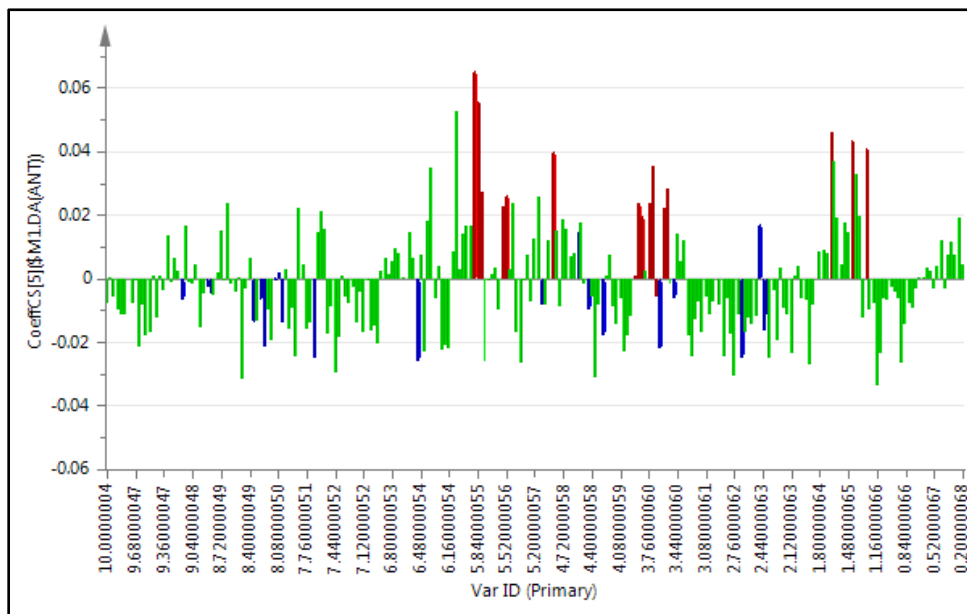


**Fig. IV-4. Separación de las razas y especies analizadas basado en el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines (P = Pulpa; C = Cáscara) (Ant = Antillana, Gua = Guatemalteca; Mex = Mexicana; Pnub = *P. nubigena*; Pschi = *P. schiedeana*; Hib = Híbrido (‘Hass’)**

Las que mayormente determina la diferencia de la raza antillana con el resto de las razas y especies son la concentración y tipo de azúcares, mientras que la raza mexicana, además de algunos aminoácidos característicos, presenta concentraciones particulares de compuestos de tipo aromático (Figs. IV-5 y IV-6).



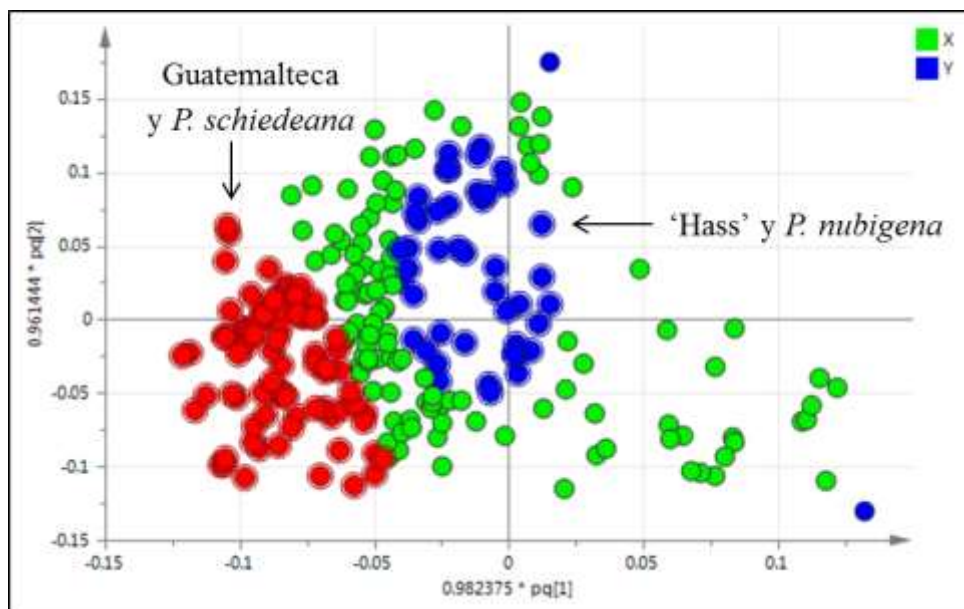
**Fig. IV-5. Gráfico de dispersión de las variables características de cáscara y pulpa (las variables (X) son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). En este caso se resaltan las variables distintivas de la raza mexicana (Azul) y de la raza antillana (rojo), las cuales se describen en el gráfico de puntuación de contribución**



**Fig. IV-6. Puntuación de contribución de las variables analizadas del estudio metabolómico de cáscara y pulpa (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). Se resaltan las variables distintivas de las razas mexicana (azul) y antillana (rojo).**

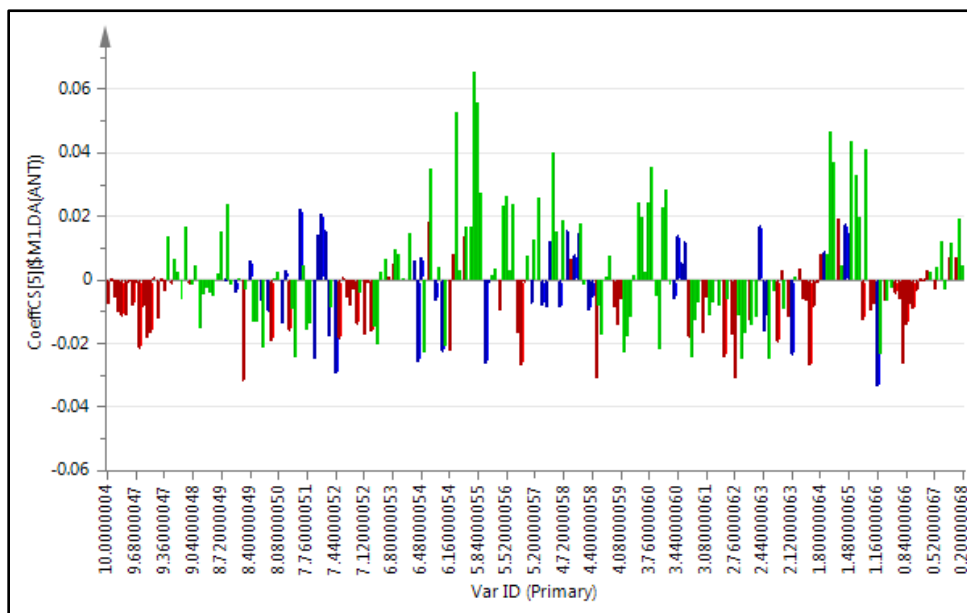


En el caso del resto de los genotipos, que tienden a estar más agrupados, se puede observar que, por ejemplo, las razas guatemalteca, *P. nubigena* y ‘Hass’, que igual comparten similitudes con la raza mexicana, se caracterizan por poseer una amplia variabilidad química, por ejemplo contienen algunos aminoácidos, azúcares y, particularmente, compuestos de la zona aromática del espectro, además de algunos ácidos orgánicos (Fig. IV-7).



**Fig. IV-7. Gráfico de dispersión de las variables analizadas del estudio metabólico de cáscara y pulpa (las variables (X) son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H; todas las variables están en verde y se resaltan en azul y rojo las variables distintivas de las razas y especies mencionadas en el gráfico). (Y = clasificación por raza y especies).**

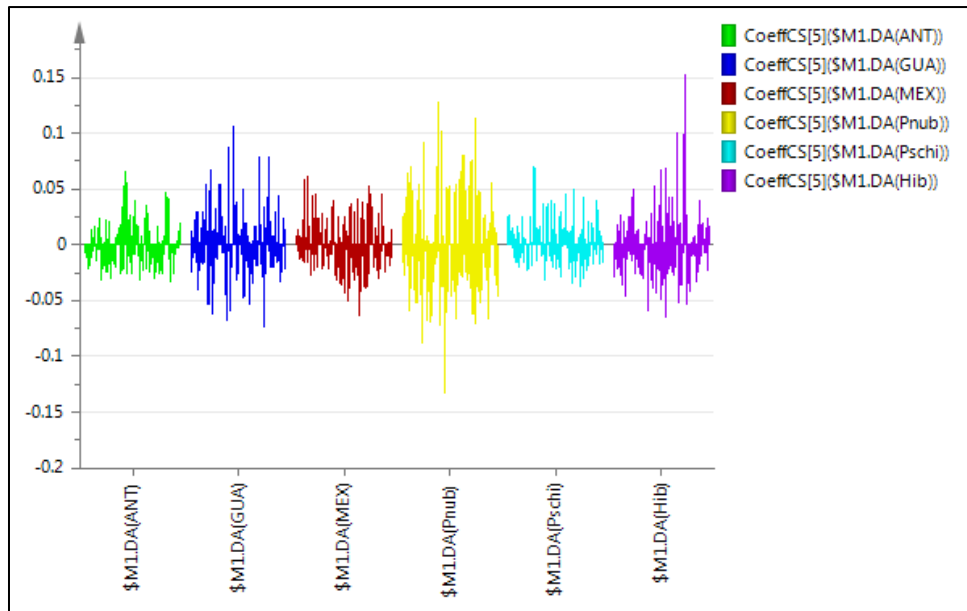
*P. schiedeana*, que es la otra especie que al igual que los genotipos de la raza antillana logra separarse del resto de las razas y especies afines, presenta una gran diversidad de compuestos químicos en sus estructuras vegetales (aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos), y comparte algunas similitudes con la raza guatemalteca, principalmente de compuestos aromáticos (Fig. IV-8).



**Fig. IV-8. Puntuación de contribución de las variables analizadas (las variables son los desplazamientos químicos del espectro de RMN-1H). Azul = Variables distintivas de ‘Hass’ y *P. nubigena*; Rojo = Variables distintivas de la raza Guatemalteca y *P. schiedeana***

El comportamiento de los compuestos analizados en cada una de las razas y genotipos fue variable. Se pudo, a través de la intensidad de los picos, determinar las similitudes y diferencias, además de la concentración de algunos compuestos. Para cada grupo se encontraron grupos de compuestos característicos (Fig. IV-9). Por mencionar un ejemplo, se pudo observar la gran similitud de los coeficientes de contribución de la raza guatemalteca y *P. nubigena*. La raza antillana y *P. schiedeana* son las que presentaron el comportamiento químico más diferente en comparación con el resto. La raza mexicana presentó una concentración muy particular de compuestos aromáticos, ya que los coeficientes de contribución mostrados en esa zona del espectro son muy característicos de esta raza. Esto coincide con el sabor especialmente aromático de estos aguacates.

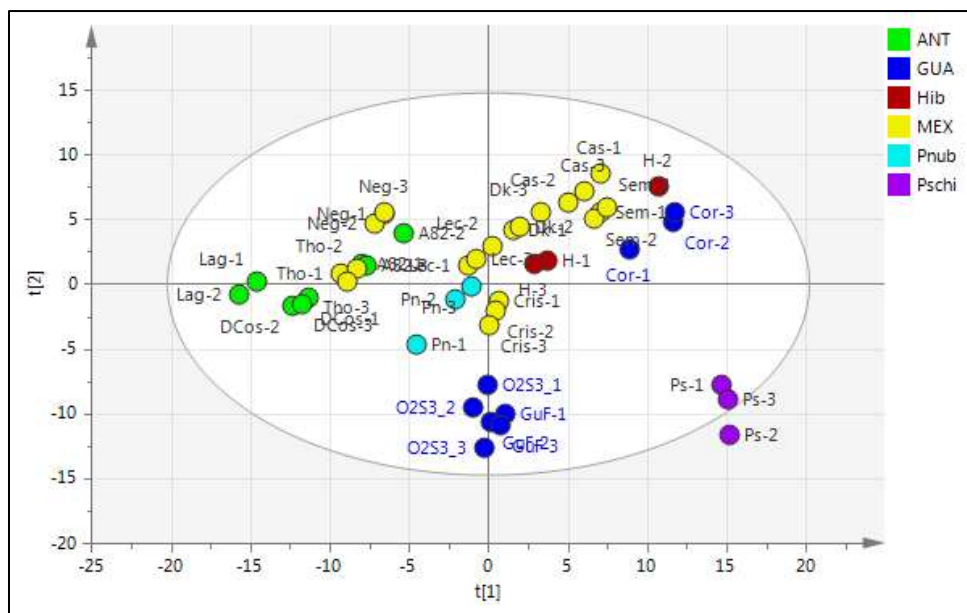
Las similitudes de ‘Hass’ con la raza guatemalteca, *P. nubigena* y la raza mexicana se deben principalmente al contenido de compuestos aminoacídicos, lo cual se puede corroborar al observar la intensidad de los coeficientes de contribución de esa zona del espectro.



**Fig. IV-9. Visión general de los coeficientes de contribución de las razas de aguacate y especies afines**

#### **4.5.2. Análisis de componentes principales en pulpa de aguacate y especies afines**

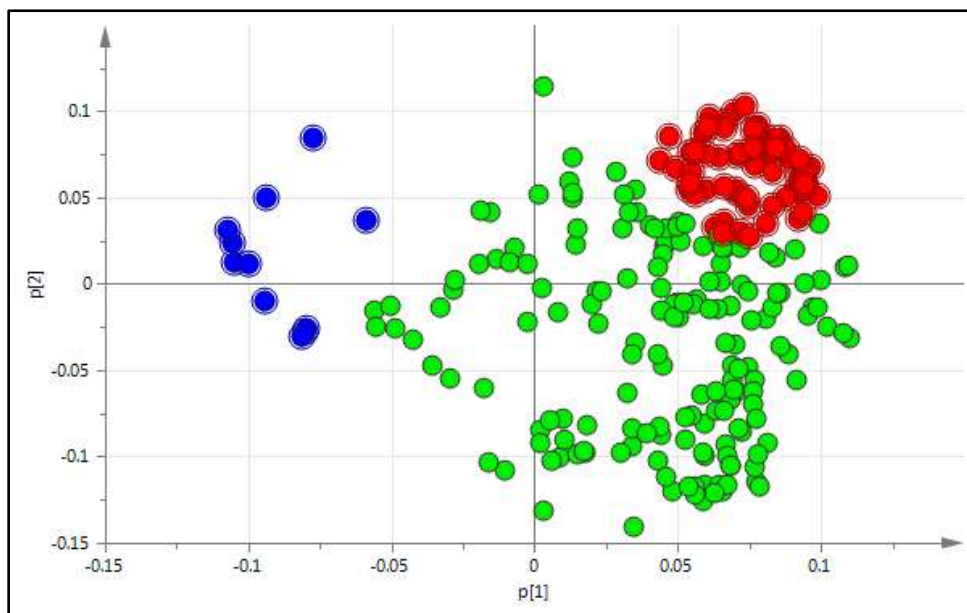
Aparte del análisis en conjunto, también se analizaron los datos de la pulpa y cáscara por separado, con las mismas herramientas estadísticas. En pulpa, el análisis de componentes principales arrojó un modelo con 5 componentes principales explicando el 68.10 % de variabilidad pero con los primeros 3 componentes explicando el 52.33 % de tal variabilidad. De nueva cuenta, se observa claramente la separación de *P. schiedeana* del resto de los genotipos, mientras que la raza antillana tendió a separarse igualmente del resto, pero tuvo alguna interacción con algunos genotipos mexicanos como lo son ‘Negrito’ y ‘Thomas’. Las razas guatemalteca, mexicana, ‘Hass’ y *P. nubigena* comparten similitudes, aunque los genotipos guatemaltecos ‘Olanca 2S3 y ‘Guatemalteco Fundación’ presentaron claras diferencias en su composición de pulpa con el genotipo ‘Corralito’, igualmente guatemalteco (Fig. IV-10).



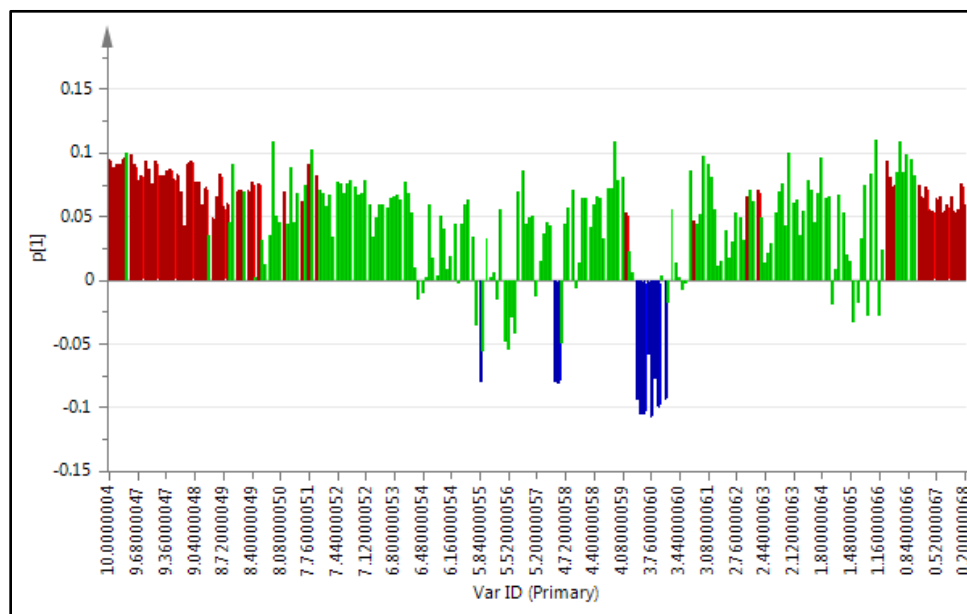
**Fig. IV-10. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por ACP. Análisis de muestra por RMN<sup>1</sup>H**

La raza mexicana presentó una composición muy particular de compuestos de tipo aromático, además de algunos aminoácidos característicos (color rojo) (Figs. IV-11 y IV-12); y en cuanto a la raza antillana, como se ha mencionado anteriormente, contienen un nivel de azúcares muy particular que lo distingue claramente del resto de las razas y especies afines (color azul).

Estos azúcares son característicos el aguacate; son de 7 carbonos, muy raros en la naturaleza y confinados a solo unas pocas especies; y presentan propiedades muy interesantes como antioxidantes, antiinflamatorias y se menciona que incluso pueden actuar contra el cáncer. Estos compuestos son la mannoheptulosa y el perseitol, además de los azúcares más comunes como lo son la glucosa, la fructosa y la sacarosa (todos contenidos en el aguacate) (Liu *et al.*, 1999, 2002).



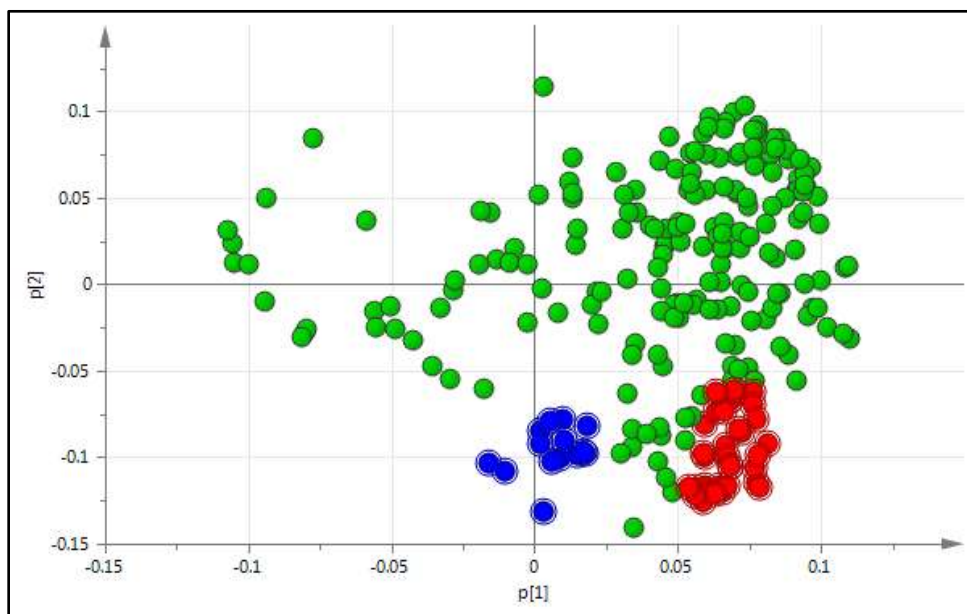
**Fig. IV-11. Gráfico de dispersión de las variables analizadas de pulpa y cáscara de aguacate (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ) (Azul: raza Antillana; Rojo: raza Mexicana, 'Hass')**



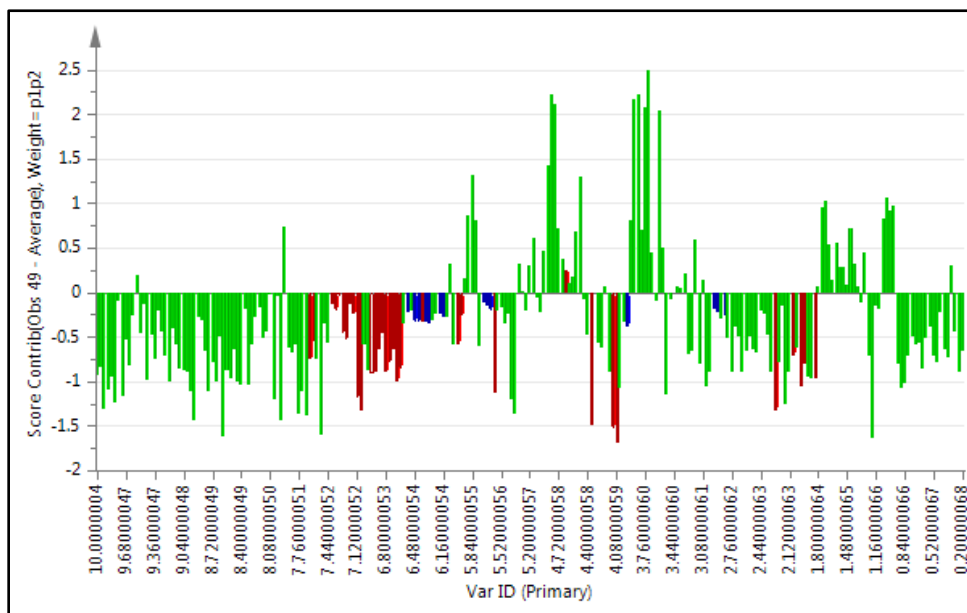
**Fig. IV-12. Coeficientes de contribución - variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ) (Azul = Antillana; Rojo = Mexicana, 'Hass')**

Las principales plataformas analíticas para poder determinar con precisión de qué tipo de compuestos se trata y su cuantificación son la cromatografía de líquidos y de gases acoplados a un detector de masas.

La raza guatemalteca (azul) y la *P. schiedeana* (rojo) (Figs. IV-13 y IV-14) presentan ciertas similitudes, principalmente en el contenido de azúcares, pero *P. schiedeana* se caracteriza principalmente por la presencia de algún tipo de compuesto de naturaleza aromática y compuestos aminoacídicos.



**Fig. IV-13. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ ) (Azul = Guatemalteca; Rojo = *P. schiedeana*)**



**Fig. IV-14. Coeficientes de contribución - variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H) (Azul = Guatemala; Rojo = *P. schiedeana*)**

#### 4.5.3. Análisis discriminante en pulpa de aguacate

Con un análisis discriminante se pueden clasificar los genotipos. Como se encontrado en los resultados anteriores y como confirmación, se puede observar la diferencia entre la raza antillana y *P. schiedeana*, y a la vez su diferencia del resto de los genotipos guatemaltecos, mexicanos, ‘Hass’ y *P. nubigena*, los cuáles comparten características en su composición química que se irán describiendo.

Es notable el acercamiento que existe entre ‘Hass’ y *P. nubigena* con la raza mexicana si lo comparamos con la raza guatemalteca, lo cual es curioso ya que la literatura indica que ‘Hass’ contiene, en su mayoría, herencia guatemalteca aunque también tiene características de la raza mexicana. Igualmente *P. nubigena* tiene una relación genética muy cercana a la raza guatemalteca (Galindo-Tovar *et al.*, 2008) (Fig. IV-15). En las Figs. IV-16 y IV-17 se pueden observar las características de la raza guatemalteca y *P. schiedeana*, en la que se destaca que en *P. schiedeana* se presenta una diversidad de compuestos en los que se incluyen compuestos aromáticos y de la zona aminoacídica, mientras que la raza guatemalteca presentó igualmente variabilidad pero con menor concentración.

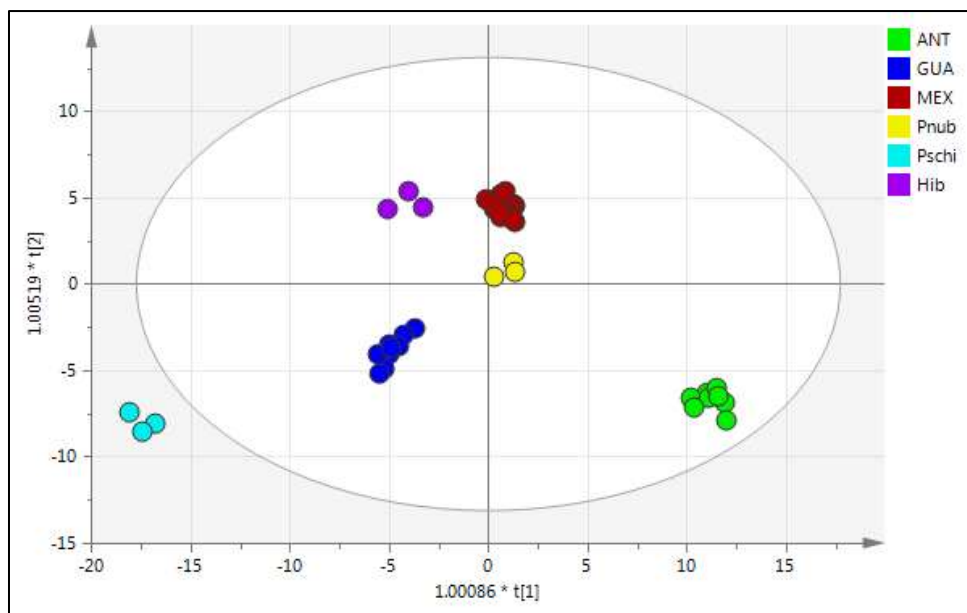


Fig. IV-15. Análisis discriminante (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines. Análisis de pulpa por RMN<sup>1</sup>H. (Ant = Antillana; Gua = Guatemalteca; Mex = Mexicana, Pnub = *P. nubigena*; Pschi = *P. schiedeana*; Hib = Híbrido ('Hass'))

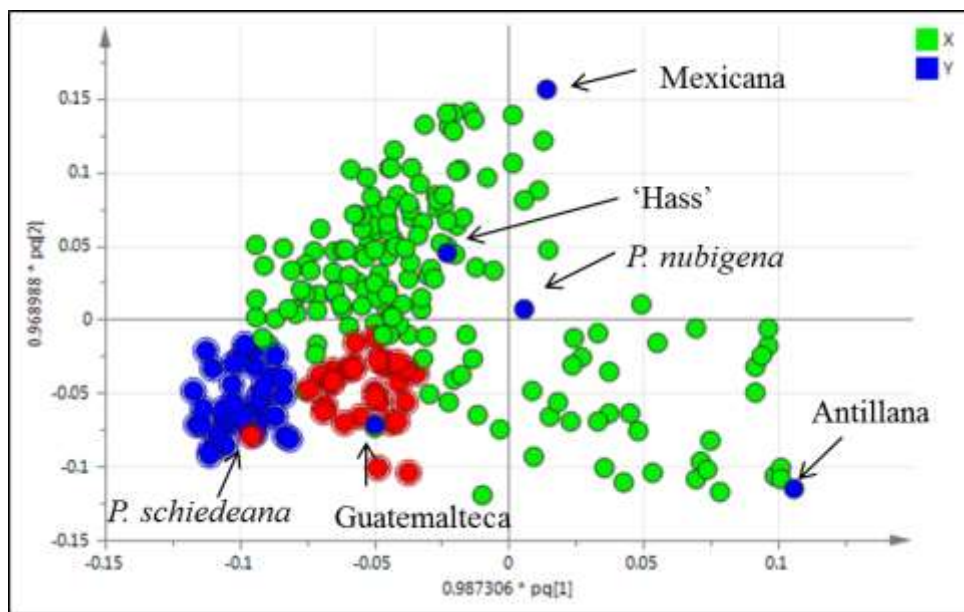
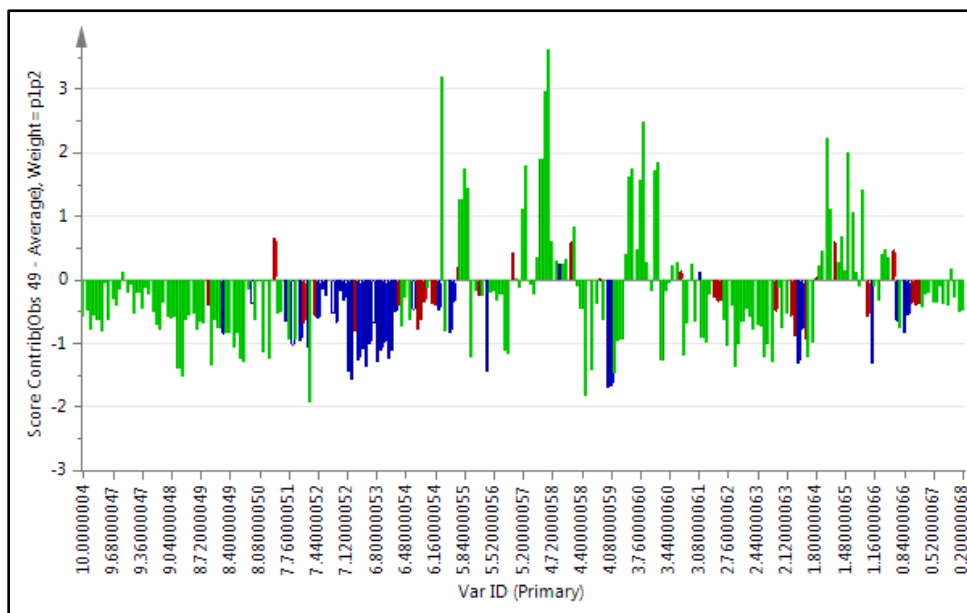


Fig. IV-16. Gráfico de dispersión de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H)





**Fig. IV-17. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H) (Rojo = Guatemala; Azul = *P. schiedeana*)**

En el análisis discriminante se confirma lo que anteriormente se había presentado, es decir, la raza antillana sobresalió por la concentración de azúcares, mientras que la raza mexicana se distinguió por la presencia de compuestos de naturaleza aromática (Figs. IV-18 y IV-19).

Los coeficientes de contribución presentados por la raza antillana sobresalieron en cuanto a tamaño; en otras palabras, entre más grande sea el coeficiente, quiere decir que más grande será el pico de identificación del compuesto, por lo que su concentración igualmente es alta con respecto a los demás. La concentración de compuestos de la zona de azúcares es notable para la raza antillana, además de otros compuestos de la zona de aminoácidos, mientras que con menor concentración, la raza mexicana presentó un tipo particular de compuestos aromáticos y compuestos de naturaleza aminoácida.

‘Hass’ y *P. nubigena*, posicionados entre la raza mexicana y guatemalteca, presentaron una gran variedad y concentración de compuestos químicos (Figs. IV-20 y IV-21). Contenían diversos tipos de aminoácidos y azúcares (en menor concentración que la raza antillana) y bajas concentraciones de compuestos de tipo aromático (en comparación con la raza mexicana).

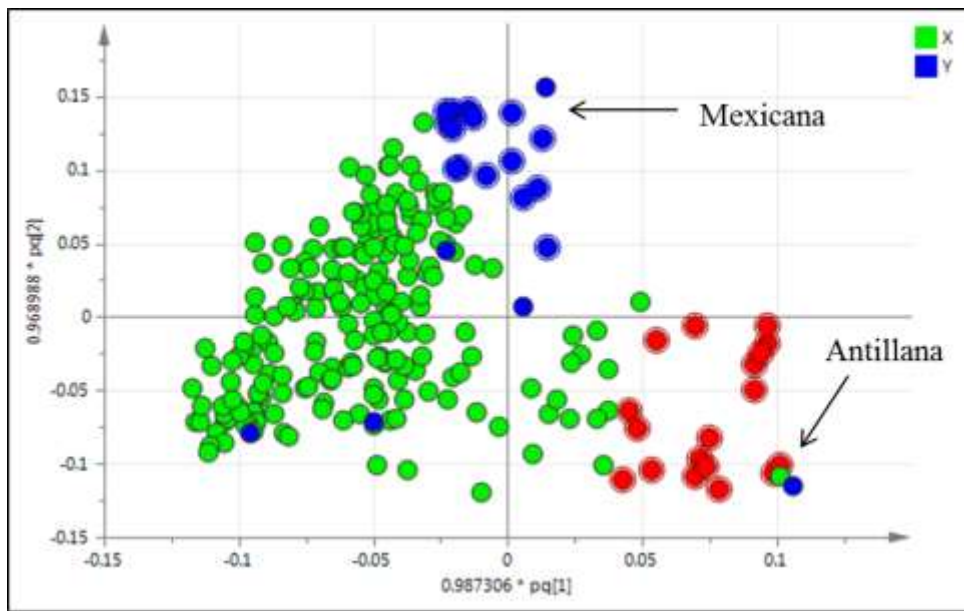


Fig. IV-18. Gráfico de dispersión de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ )

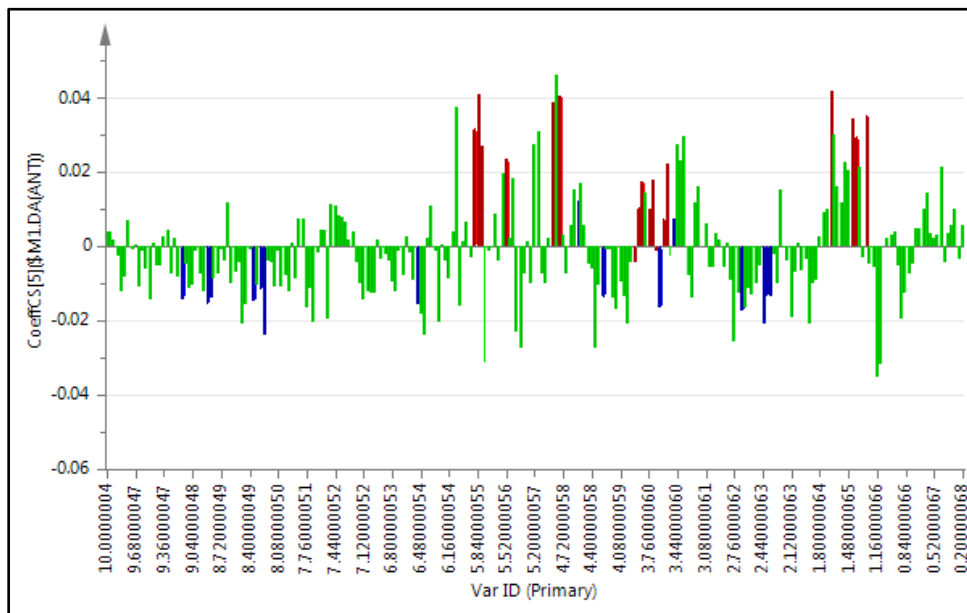


Fig. IV-19. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ) (Rojo = Antillana; Azul = Mexicana)

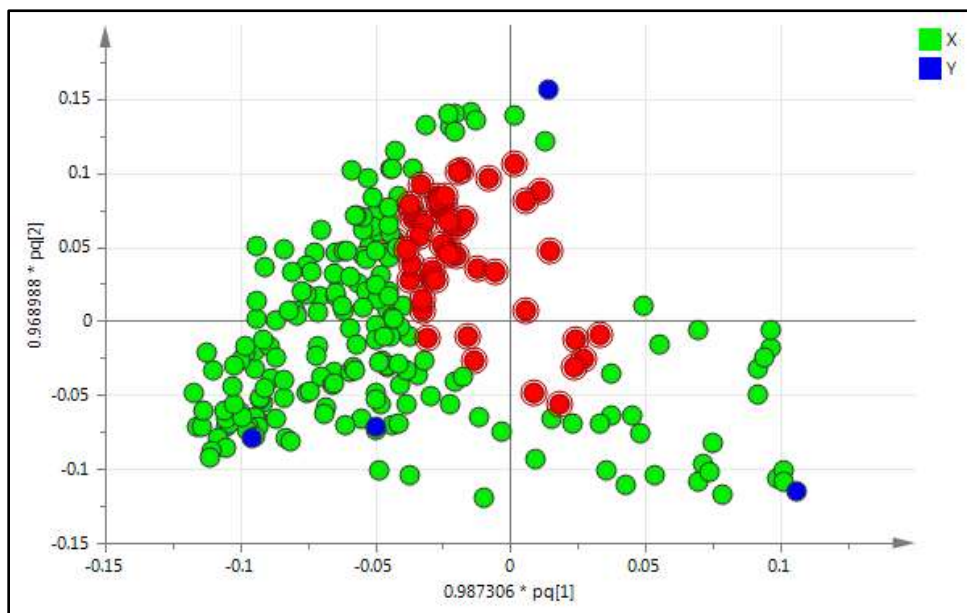


Fig. IV-20. Gráfico de distribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ ) de 'Hass' y *P. nubigena*

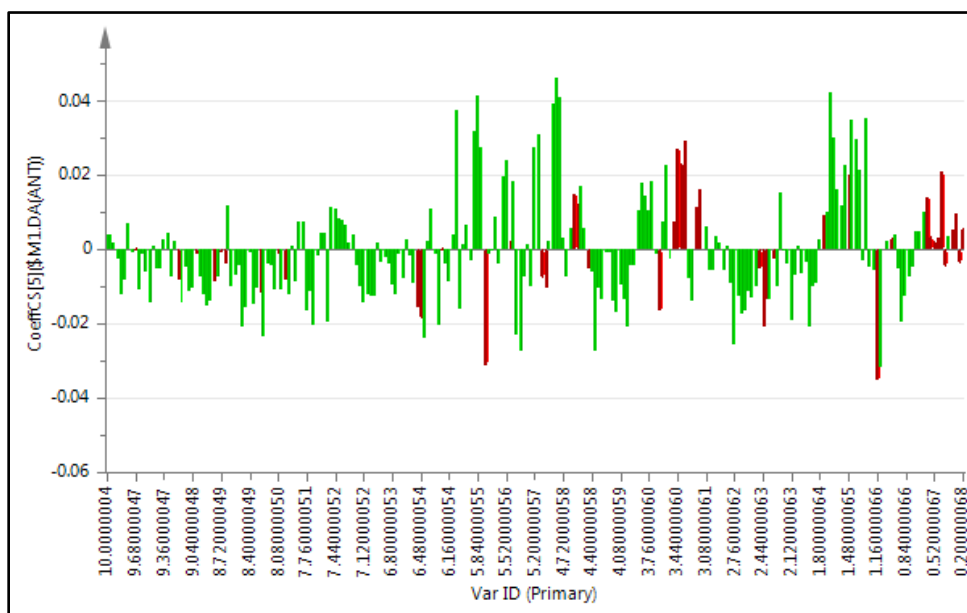
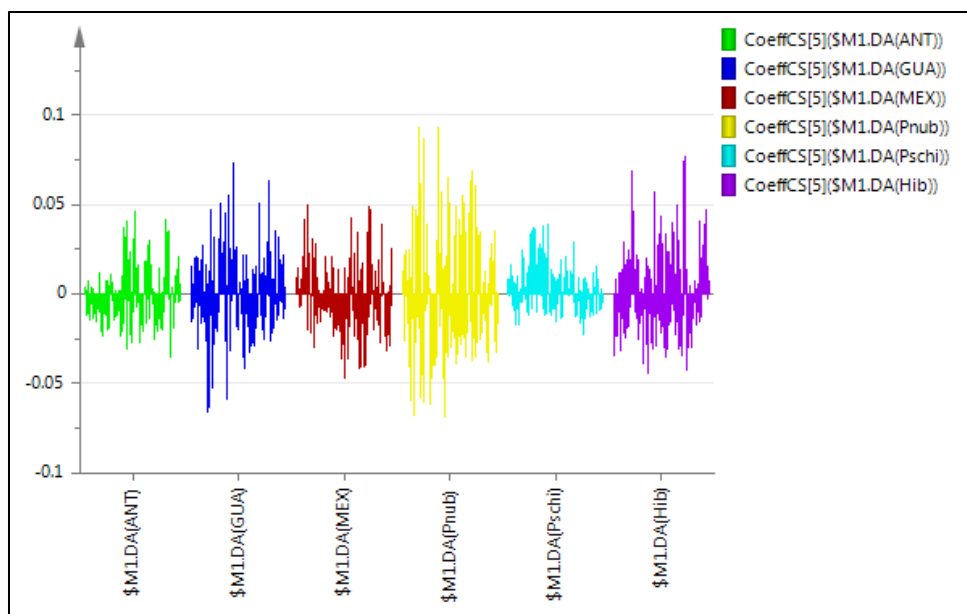


Fig. IV-21. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ ) de 'Hass' y *P. nubigena*

Las características morfológicas del fruto de cada raza y especie de *Persea* varían, en algunos casos sustancialmente. Los frutos de aguacate mexicano son, generalmente, pequeños, a diferencia de los híbridos comerciales que son más grandes (como ‘Hass’ y ‘Fuerte’). El fruto de la raza guatemalteca es el que tiene la mayor calidad de las tres razas y una ventaja que presenta se su mayor tiempo de maduración, lo cual ayuda a una mejor comercialización y transporte a largas distancias (Liu *et al.*, 2002). Los frutos antillanos son los más grandes, pero son bajos en cuanto al contenido de aceite, lo que hace que su calidad sea menor y su sabor diferente. En cuanto a *P. nubigena*, sus frutos son pequeños, globosos y verdes, mientras que su pulpa es escasa (Bergh y Ellstrand, 1986; Knight Jr., 1999).

El comportamiento de los coeficientes de contribución, es decir los picos detectados y por ende su concentración, fueron distintos entre las razas y especies afines (Fig. IV-22). Los coeficientes más parecidos son los presentados por las razas guatemalteca, *P. nubigena* y ‘Hass’ (azul, amarillo y púrpura, respectivamente); mientras que las raza antillana y *P. schiedeana* son las más diferentes (verde y turquesa, respectivamente).



**Fig. IV-22. Visión general de los coeficientes de contribución en pulpa de las razas de aguacate y especies afines**

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios de clasificación en aguacate y especies de *Persea* han sido contradictorios en sus resultados, por lo que este estudio metabolómico resulta en un muy buen apoyo para ayudar a tal clasificación. Este trabajo confirma la división en razas convencional La raza antillana aparece como la más diferente entre las tres razas, posiblemente debido a que es la que se desarrolla en las condiciones más extremas que la raza mexicana y la guatemalteca.

Ashworth y Clegg (2003) y Schnell *et al.* (2003) reportan a través de microsatélites y con el método “Neighbor-Joining” una separación muy similar a lo presentado en este estudio; estos autores reportan que, claramente, los híbridos mexicanos y guatemaltecos se colocan justo entre estas razas, y la raza antillana y las especies de *Persea* (*P. schiedeana*) son las que más claramente se separan, con algunas acercamientos entre *P. schiedeana* y la raza guatemalteca. En cuanto a estudios morfológicos, el resultado aquí mostrado sobre el acercamiento de *P. nubigena* y la raza guatemalteca concuerda con lo mostrado por Campos-Rojas *et al.* (2007) que mencionan la cercana relación entre *P. nubigena* y *P. guatemalensis*.

Se ha mencionado de la variabilidad de los compuestos encontrados en la pulpa de aguacate, tanto azúcares, aminoácidos y algunos compuestos de naturaleza aromática. En los Anexos (IV-1 – IV-4) se pueden observar algunos de los compuestos que se pudieron detectar en los espectros. Se pudieron identificar los compuestos gracias a las señales características de que estos presentan cuando son analizados en las mismas condiciones, es decir, se tomaron las referencias de estándares evaluados con el mismo medio y forma de extracción, misma preparación de muestra y mismo espectrómetro de RMN.

Dentro de los azúcares se pudo identificar a la  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosa, fructosa y sacarosa, pero no se logró identificar a los más importantes como lo son la mannoheptulosa y perseitol, ya que no se contaba con estándares. También se presentó una gran variabilidad de aminoácidos, entre los que destacan la valina, leucina, isoleucina, treonina, glutamato y lisina; e igualmente se identificaron algunos ácidos orgánicos que son muy importantes en algunas rutas metabólicas no solo del aguacate sino de la mayoría de las planta: ácido málico y ácido cítrico. En la zona aromática del espectro se identificó una señal característica para una antocianina, cianidin-3-O-glucósido (8.46 ppm) (McGhie *et al.*, 2006), y que igualmente ha sido reportada en aguacate ‘Hass’ por Ashton *et al.* (2006).

#### 4.5.4. Análisis de componentes principales en cáscara de aguacate

Al igual que en la pulpa, en cáscara se obtuvo un modelo de más de 20 componentes con los que se explicó el 97 % de la variabilidad, con los primeros 5 componentes explicando el 68.10 %, y los primeros 3 el 52.36 % de la variabilidad total.

Aunque, ciertamente, no se presentó una clara distribución de las razas y especies analizadas, algunos genotipos como *P. schiedeana* se separaron claramente del resto, mientras que el resto se distribuyó ampliamente por el gráfico sin un patrón obvio (Fig. IV-23).

Algo de llamar la atención es que dos genotipos de la raza antillana ('Antillano 82' y 'Doble Cosecha') comparten similitudes con algunos genotipos mexicanos, principalmente 'Thomas', 'Semillero' y 'Negrito'; mientras 'Lagunero' (antillano) se separó claramente del resto de los genotipos. 'Hass' se colocó entre la raza mexicana y guatemalteca; comparte diversas características químicas en la cáscara, como lo hizo en la pulpa. Los genotipos guatemaltecos se distribuyeron de manera más heterogénea. Sin embargo, tienden a estar cerca de la raza mexicana, 'Hass' y *P. nubigena*.

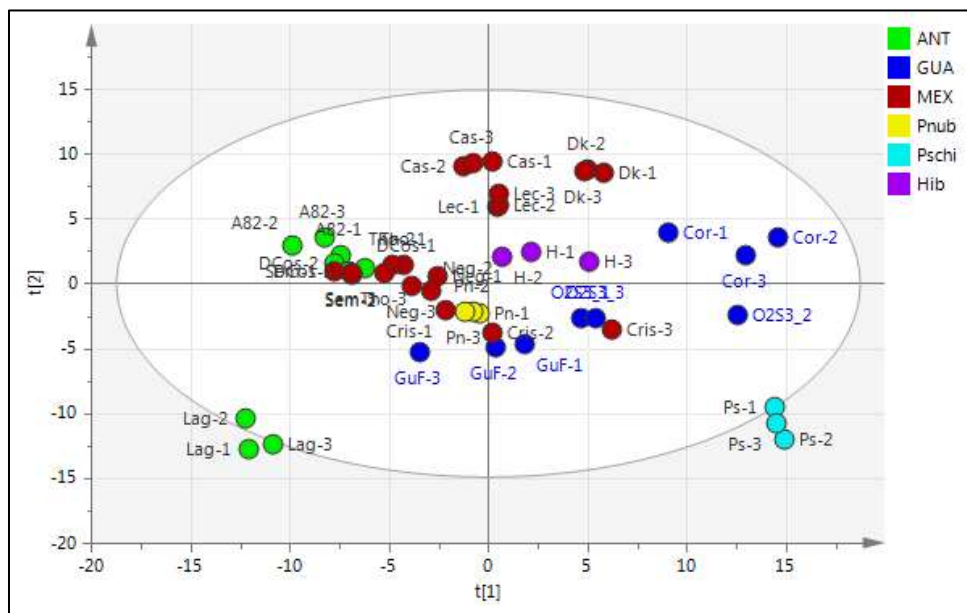
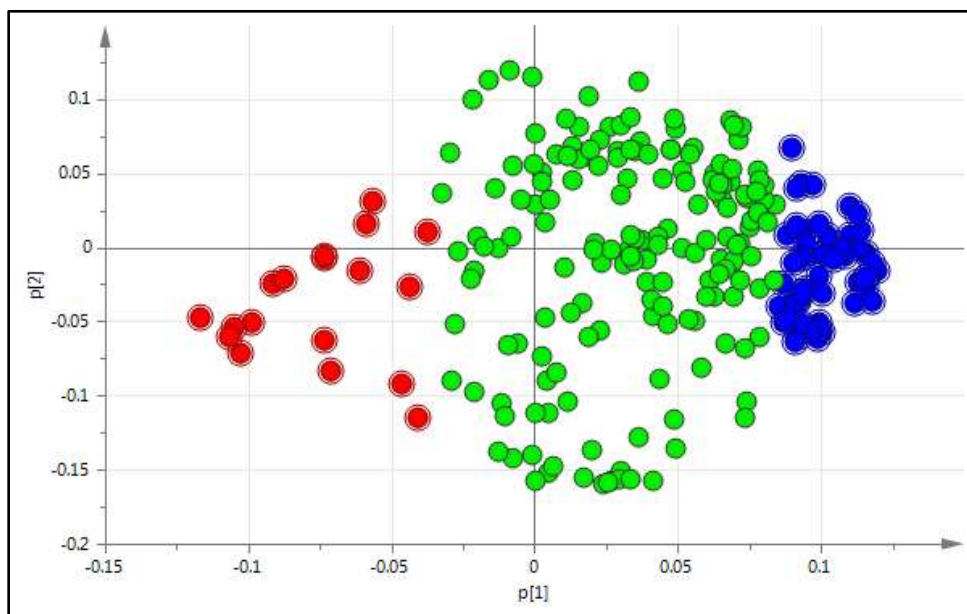


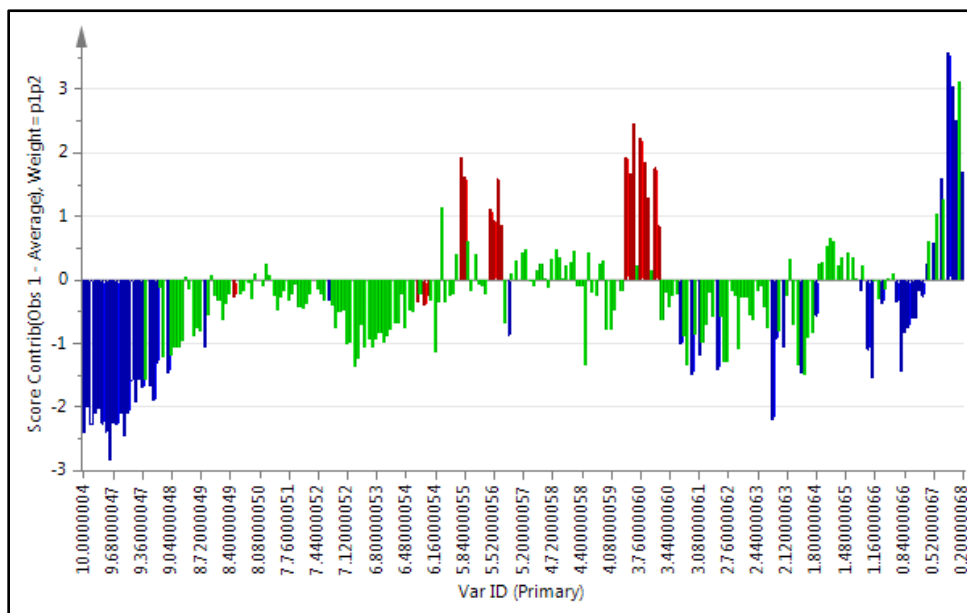
Fig. IV-23. Similitud de las razas de aguacate y especies afines según los compuestos contenidos en la cáscara, analizado por ACP. Análisis de cáscara por RMN<sup>1</sup>H

Las variables que caracterizaron a la raza antillana (rojo) son las encontradas en los desplazamientos químicos de la zona de carbohidratos, es decir entre 3.4 y 6 ppm del espectro del RMN-<sup>1</sup>H, mientras que en azul se conjuntan las variables que determinan lo distintivo de los genotipos de la raza guatemalteca, algunos genotipos mexicanos y *P. schiedeana*, principalmente (Fig. IV-24). En este caso, los compuestos que hacen diferentes a estos genotipos son los localizados en la zona aminoacídica (1 – 3 ppm) y en la zona aromática del espectro (más de 8 ppm) (Fig. IV-25).



**Fig. IV-24. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN-<sup>1</sup>H) (Rojo = Antillana; Azul = Guatemalteca)**

Lo que distinguió a los genotipos unos de otros no es el tipo de compuestos, sino la concentración de estos. Al parecer, en todos se encuentran los mismos tipos de compuestos con diferente variabilidad, principalmente los compuestos más comunes e importantes del aguacate como lo son los ácidos grasos, los azúcares y quizá, algunos pigmentos (carotenoides y antocianinas). Este tipo de resultados son los que se pueden determinar con un estudio metabolómico dirigido.



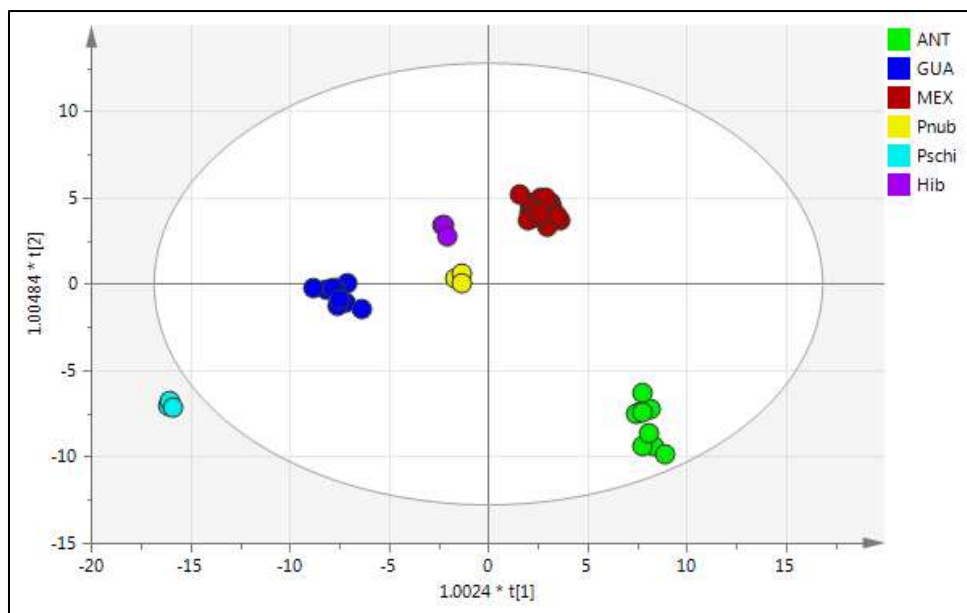
**Fig. IV-25. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H) (Rojo = Antillana; Azul = Guatemalteca)**

#### 4.5.5. Análisis discriminante en cáscara de aguacate

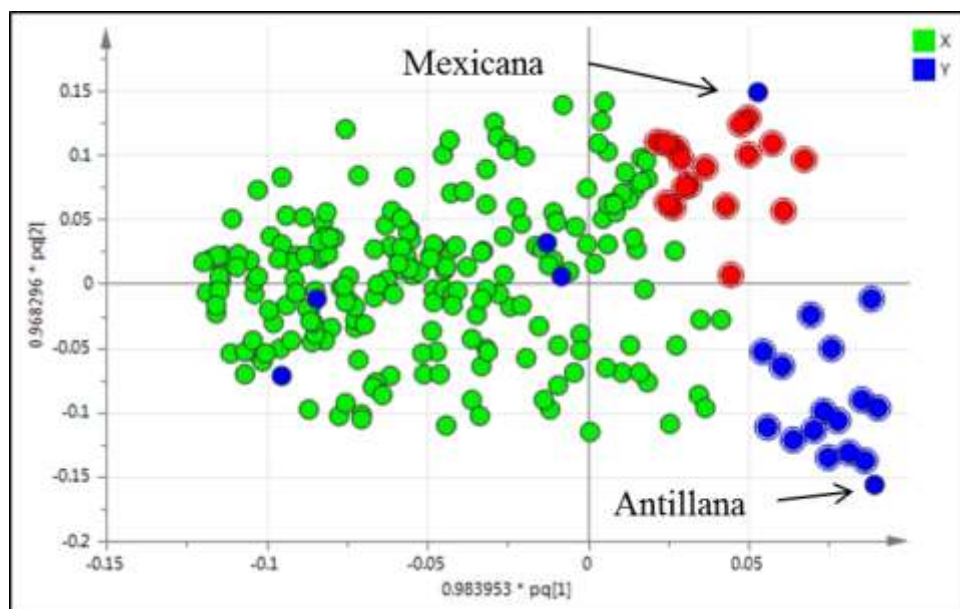
Para lograr una mayor distinción entre los genotipos analizados, se realizó un análisis discriminante (análisis supervisado) para determinar que variables influyen en la separación o agrupamiento de los genotipos. El análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales nos ofreció una mejor distribución de las razas y especies afines. Los genotipos de la raza antillana y *P. schiedeana* se separaron otra vez claramente del resto de los genotipos, mientras que ‘Hass’ y *P. nubigena* tienden a posicionarse entre la raza mexicana y la guatemalteca que en conjunto forman un gran grupo en el centro del gráfico (Fig. IV-26).

Como se viene observando con los datos ya presentados de pulpa, la separación y características en cáscara es similar, es decir, la raza mexicana se distinguió por la presencia de compuestos químicos de la zona aromática del espectro, mientras que la raza antillana presentó una concentración importante de compuestos de la zona de carbohidratos del espectro (Figs. IV-27 y IV-28).

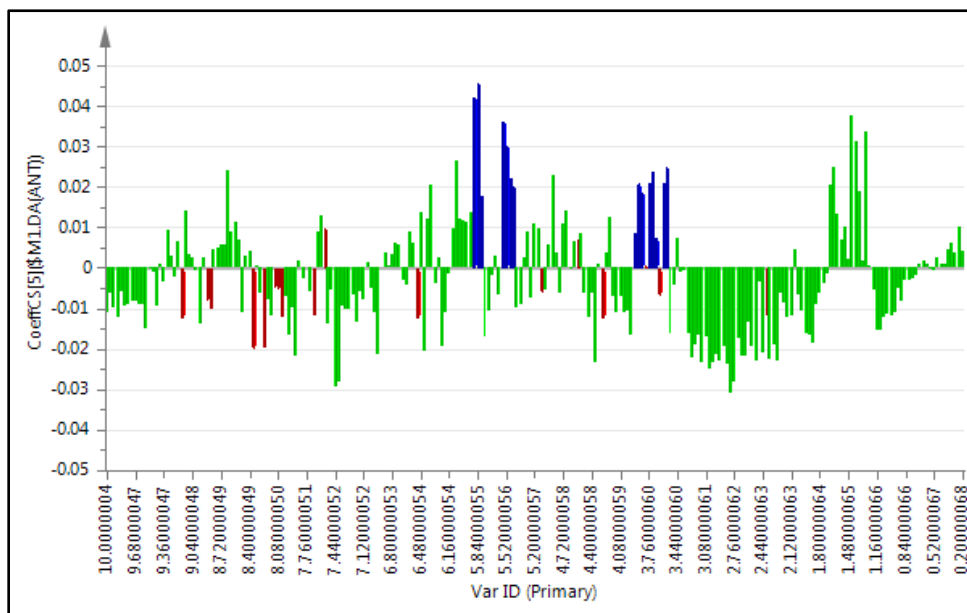




**Fig. IV-26. Análisis discriminante (OPLSDA) de las razas de aguacate y especies afines. Análisis de cáscara por RMN<sup>1</sup>H**



**Fig. IV-27. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H)**



**Fig. IV-28. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>1</sup>H) (Azul = Antillana; Rojo = Mexicana)**

También, se presenta la distribución de las variables que influyeron, en este caso, en el agrupamiento de la raza guatemalteca con *P. schiedeana*, y de ‘Hass’ con *P. nubigena* (Fig. IV-29), es decir, el parecido en composición química general. La variabilidad de los compuestos químicos es extensa en este caso; es decir, aparecen compuestos de todas las zonas del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. IV-30). Las concentraciones de compuestos de la zona de aminoácidos del espectro es relevante para *P. schiedeana* y la raza guatemalteca, al igual que algunos compuestos de la zona aromática, mientras que, para ‘Hass’ y *P. nubigena* se presenta igual una distribución de variables sobresaliente en todos las zonas del espectro, pero la concentración de los compuestos es baja en comparación *P. schiedeana* y la raza guatemalteca, es decir, igual comparten similitudes, pero la concentración es la que hace la diferencia. En la visión general de los coeficientes de contribución se puede observar el comportamiento de las variables analizadas (desplazamientos químicos), en los que la raza antillana y *P. schiedeana* se presentan como los más diferentes del resto (Fig. IV-31).

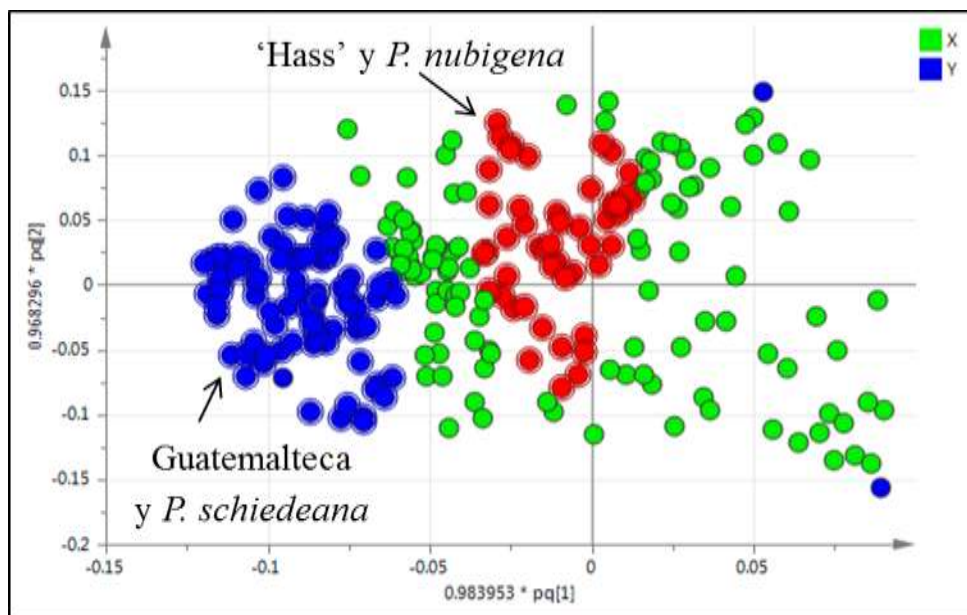


Fig. IV-29. Puntuación de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ )

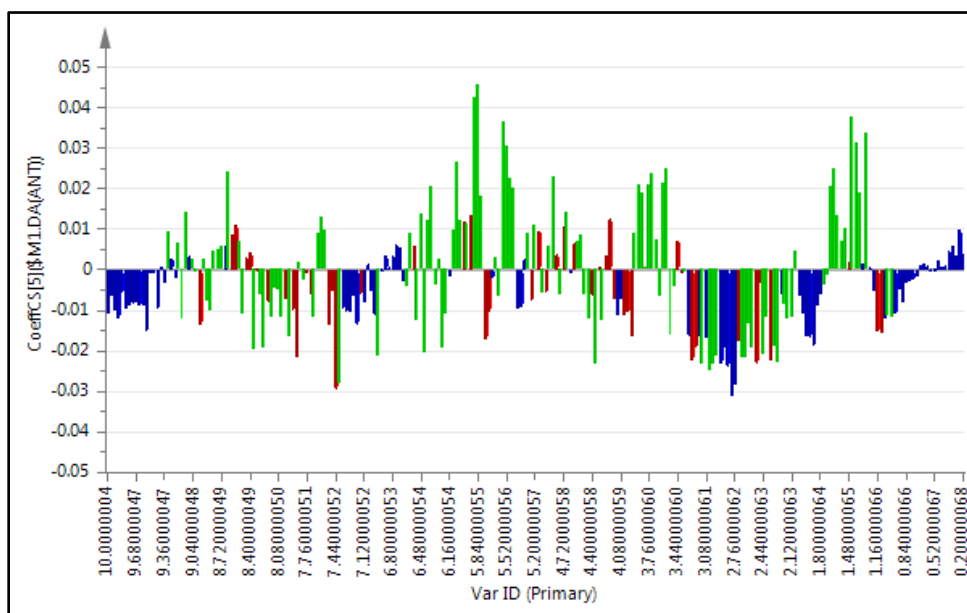
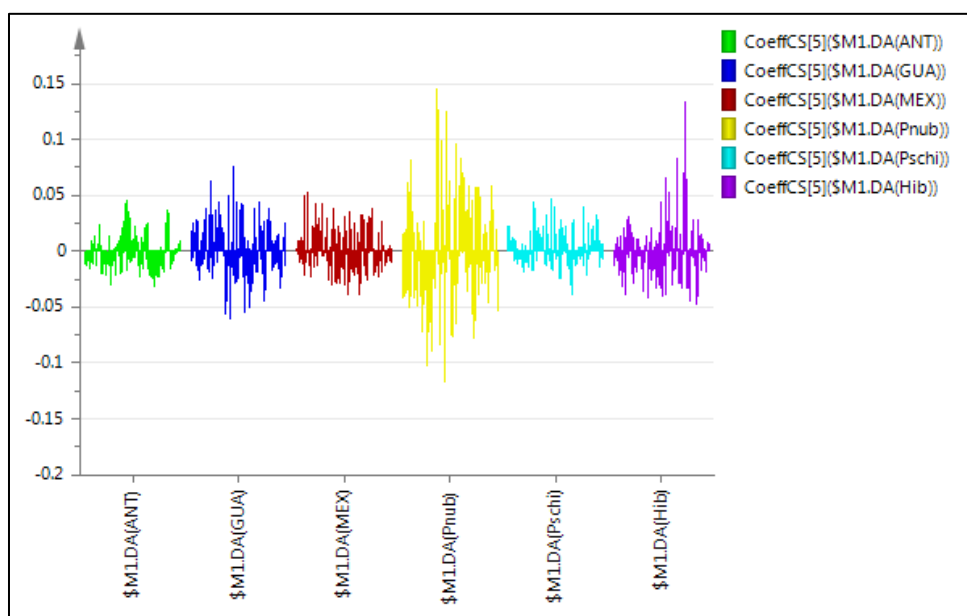


Fig. IV-30. Coeficientes de contribución de las variables analizadas (desplazamientos químicos del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ) (Rojo = 'Hass' y *P. nubigena*; Azul = Guatemala y *P. schiedeana*)

Cada una de las razas y especies afines tienen diferentes características morfológicas. La raza mexicana presenta una cáscara delgada y delicada, y la mayoría de las veces es consumida y presenta diversas propiedades a la salud humana; mientras que la cáscara de la raza guatemalteca es más gruesa y rugosa, lo cual no aplica en todos los genotipos de esta raza, y por último la raza antillana presenta una cáscara más delgada y lustrosa que la guatemalteca pero de color verde (Berg y Ellstrand, 1999; Knight Jr., 2002), tales diferencias, por ejemplo en color, se relacionan directamente con el contenido de ciertos compuestos químicos.



**Fig. IV-31. Visión general de los coeficientes de contribución en cáscara de las razas de aguacate y especies afines**

Los resultados aquí presentados, tanto de pulpa como de cáscara de aguacate y especies afines, tienden a mostrar que la raza antillana es la que se diferencia más de las razas mexicana y guatemalteca, mientras que estas dos, tienen ciertas similitudes en cuanto a su composición química. Como se mencionó anteriormente, varios estudios de diversa índole han intentado clasificar al género *Persea* y especialmente las razas hortícolas de aguacate. Mhameed *et al.* (1997) a través de un estudio hecho con marcadores mini-satélites de ADN concluyeron que la raza guatemalteca es muy parecida a la antillana pero que, contrariamente, ninguna de estas dos es similar a la raza Mexicana. Esto no coincide con

los resultados aquí presentados, pues la raza mexicana comparte características con la raza guatemalteca. Esta relación está apoyada por el hecho que ‘Hass’, que es un híbrido entre la raza guatemalteca y mexicana, está colocado justo entre estas dos razas, acercándose un poco más, químicamente, a la raza mexicana.

También, a través de un estudio de RFLP, se sugirió que la raza guatemalteca era un híbrido interespecífico entre *P. steyermarkii* y *P. nubigena* (Furnier *et al.*, 1990). En este estudio, *P. nubigena*, tanto en pulpa como en cáscara, se colocó muy cercano a la raza guatemalteca, lo cual apoya la relación entre ambos genotipos. El presente estudio confirma la presencia de tres grupos o razas hortícolas sugeridos previamente (Furnier *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1998).

En los Anexos IV-5 – IV-8 se puede observar la variabilidad de compuestos encontrados en la cáscara de aguacate y las especies relacionadas, cabe destacar que el contenido fue muy similar a la pulpa (en cuanto a compuestos derivados de metabolismo primario), pero es evidente la diferencia en la concentración de estos en los espectros mostrados.

#### **4.6. Conclusiones**

Las agrupaciones y separaciones en su mayoría apoyan la clasificación previa que se tenía.

Las razas de aguacate y especies relacionadas analizadas presentaron similitudes y diferencias en cuanto a su composición química. Las razas mexicana y guatemalteca tienden a agruparse junto con *P. nubigena* y ‘Hass’, mientras que la raza antillana y *P. schiedeana* se diferenciaron claramente de éstas.

La raza antillana se caracterizó por la presencia y concentración de azúcares, mientras que en el resto de las razas y genotipos se presentaron variaciones en la composición tanto de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos de naturaleza aromática, sobre todo la raza mexicana en cuanto a estos últimos tipos de compuestos. Las variaciones mencionadas se presentaron tanto en pulpa como en cáscara de las especies analizadas.

#### 4.7. Literatura Citada

- Ashton, O. B. O., M. Wong, T. K. McGhie, R. Vather, Y. Wang, C. Requejo J., P. Ramankutty, y A. B. Woolf. 2006. Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10151-10158.
- Ashworth, V. E. T. M., y M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationship among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94: 407-415.
- Bailey, N. J. C., J. Sampson, P. J. Hylands, J. K. Nicholson, y E. Holmes. 2002. Multicomponent metabolic classification of commercial feverfew preparations via high-field <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and chemometrics. *Planta Medica* 68:734-738.
- Bergh, B. O., y N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-14.
- Cevallos-Cevallos, J. M., J. I. Reyes-De-Corcuera, E. Etxeberria, M. D. Danyluk, y G. E. Rodrick. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20:557-566.
- Choi, Y. H., H. K. Kim, A. Hazekamp, C. Erkelens, A. W. M. Lefeber, y R. Verpoorte. 2004. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Natural Products* 67:953-957.
- Daolio, C., F. L. Beltrame, A. G. Ferreira, Q. B. Cass, D. A. G. Cortez, M. C. Ferreira. 2008. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochemical Analysis* 19:218-228.
- Davis, J. D., H. M. Kobayashi, M. T. Clegg, y M. T. Clegg. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *Journal of Heredity* 89:319-323.
- Diamond, J. M. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418:700-707.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, y L. Willmitzer. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18:1157-1161.

- Furnier, G. R., M. P. Cummings, y M. T. Clegg. 1990. Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity* 81:183-188.
- Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, y A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 441-450.
- Gama-Campillo, L. A., y P. A. Gómez. 1992. An ethnoecological approach for the study of *Persea*: a case study in Maya area. *In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> World Avocado Congress, CA.* pp: 11-17.
- Georgiev, M. I., K. Ali, K. Alipieva, R. Verpoorte, y Y. H. Choi. 2011. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* 72:2045-2051.
- German, J. B., B. D. Hammock, y S. M. Watkins. 2005. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 1:3-9.
- Hall, R., M. Beale, O. Fiehn, N. Hardy, L. Sumner, y R. Bino. 2002. Plant metabolomics as the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell* 14: 1437-1440.
- Hurtado-Fernández, E., T. Pacchiarotta, O. A. Mayboroda, A. Fernández-Gutiérrez, y A. Carrasco-Pancorbo. 2015. Metabolomic analysis of avocado fruits by GC-APCI-TOF MS: effects of ripening degrees and fruit varieties. *Anal. Bioanal. Chem.* 407:547-555.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, C. Erkelens, A. W. M. Lefeber, y R. Verpoorte. 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53:105-109.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, y R. Verpoorte. 2010a. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* 5: 536-549
- Kim, H. K., Saifullah, S. Khan, E. G. Wilson, S. D. Prat Kricun, A. Meissner, S. Goralier, A. M. Deelder, Y. H. Choi, y R. Verpoorte. 2010b. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-bases metabolomics. *Phytochemistry* 71:773-784.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, y R. Verpoorte. 2011. NMR-bases metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology.* 29: 267-275.
- Knight Jr., R. J. 2002. History, distribution and uses. *In: The avocado, botany, production, and uses.* Eds. Wiley, A. W., B. Schaffer, and B. N. Wolstenholme. Cap 1. CAB International: 1-14.

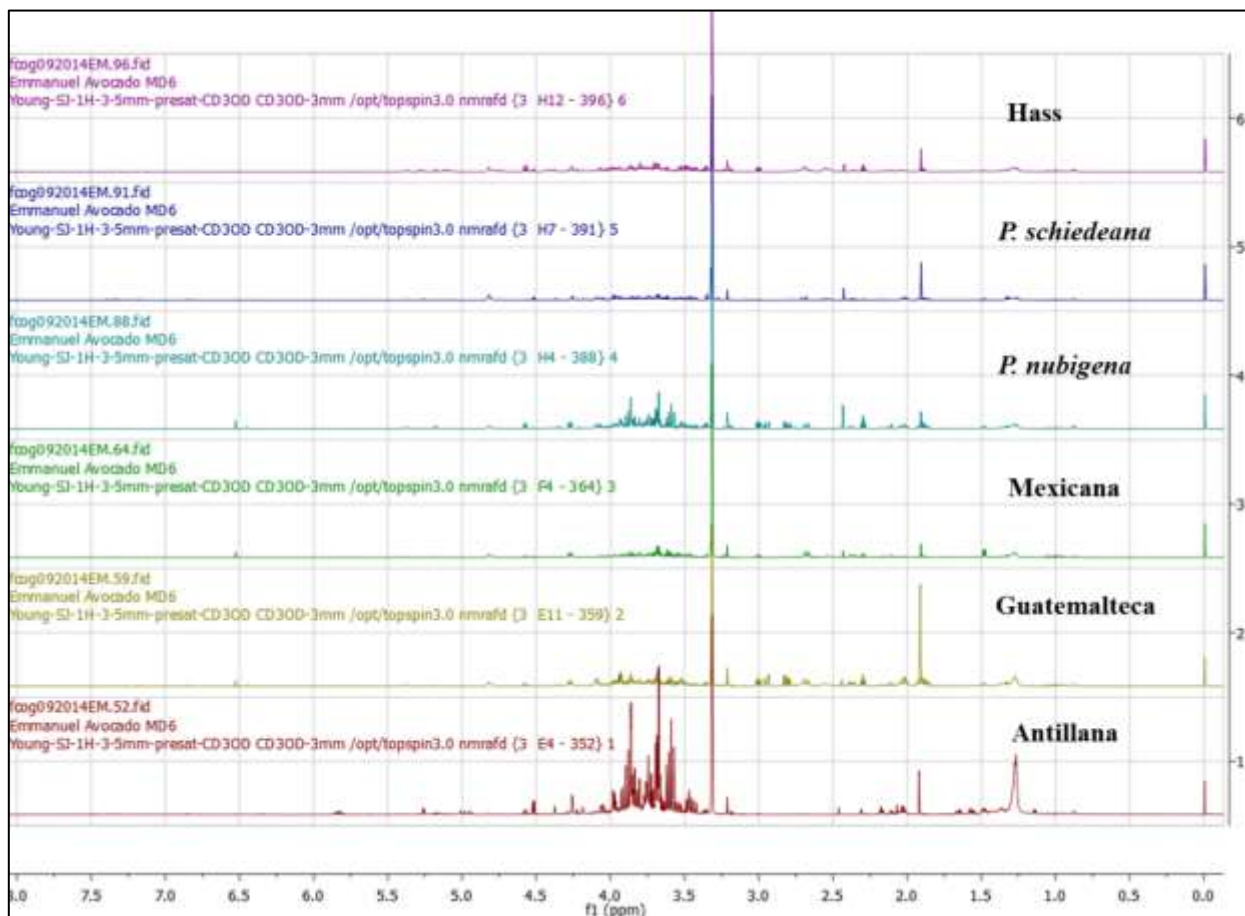
- Koop, L. E. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea*-Lauraceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14:1-120.
- Lavi, U., D. Sa'ada, I. Ragev, y E. Lahav. 2003. Avocado genetics and breeding-present and future. *World Avocado Congress VA* 42:134-135.
- Liu, X., P. W. Robinson, M. A. Madore, G. W. Witney, y M. L. Arpaia. 1999. 'Hass' avocado carbohydrate fluctuation I. Growth and phenology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 671-675.
- Liu, X., J. Sievert, M. L. Arpaia, y M. A. Madore. 2002. Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 108-114.
- Lorea-Hernández, F. J. 2002. La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71:59-70.
- McGhie, T. K., D. R. Rowan, y P. J. Edwards. 2006. Structural identification of two major anthocyanin components of Boysenberry by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8756-8761.
- Mhameed, S., D. Sharon, D. Kaufman, E. Lahav, J. Hillel, C. Degani, y U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94:279-286.
- Renner, S. S. 1999. Circumscription and phylogeny of Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany* 86:1301-1315.
- Rowher, J. G. 1993 Lauraceae. *In*: Kubitzki, K., J. Rowher, and V. Bittrich (eds) *The families and genera of flowering plants*. Springer, Berlin. pp: 426-437.
- Sumner, L. W., P. Mendes, y R. A. Dixon. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817-836.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*. 12: 575-586.
- Verpoorte, R., Y. H. Choi, y H. K. Kim. 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews* 6: 3-14.
- Verpoorte, R., Y. H. Choi, N. R. Mustafa, y H. K. Kim. 2008. Metabolomics: back to basics. *Phytochemistry Reviews* 7:525-537



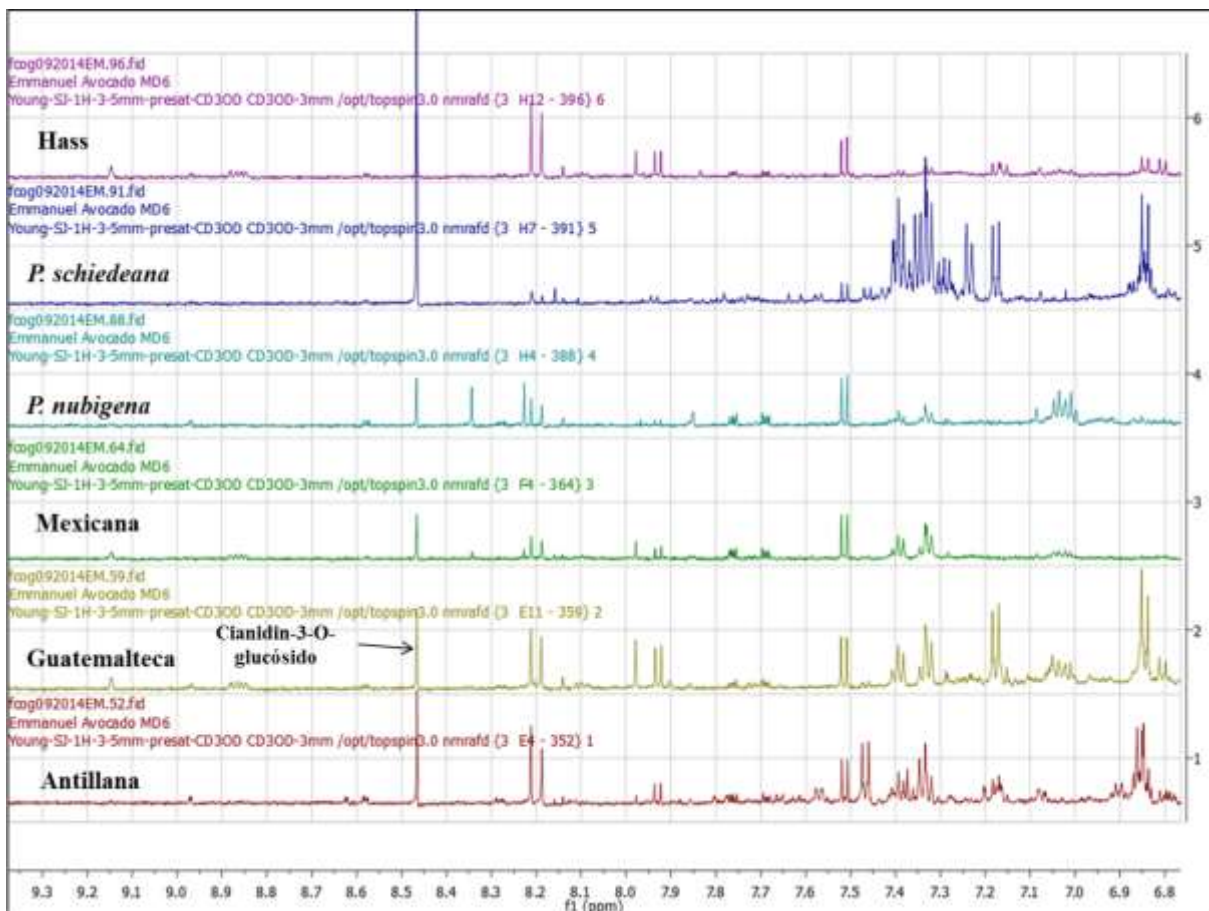
Wishart, D. S. (2008) Metabolomics: applications to food science and nutrition research. Trends in Food Science & Technology 19:482-493.

#### 4.8. Anexos

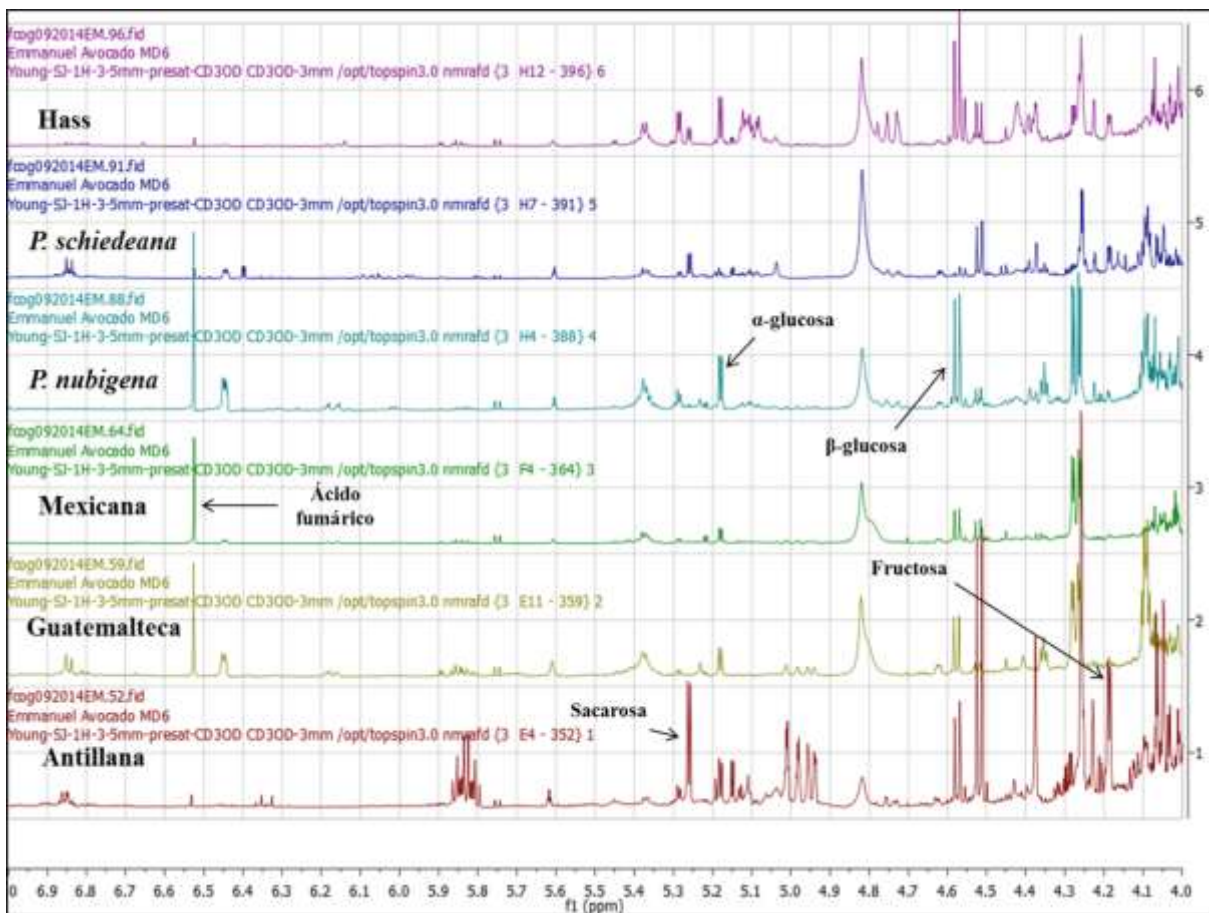
##### ANEXO IV-1. Espectro de RMN<sup>1</sup>H de pulpa de aguacate y especies afines.



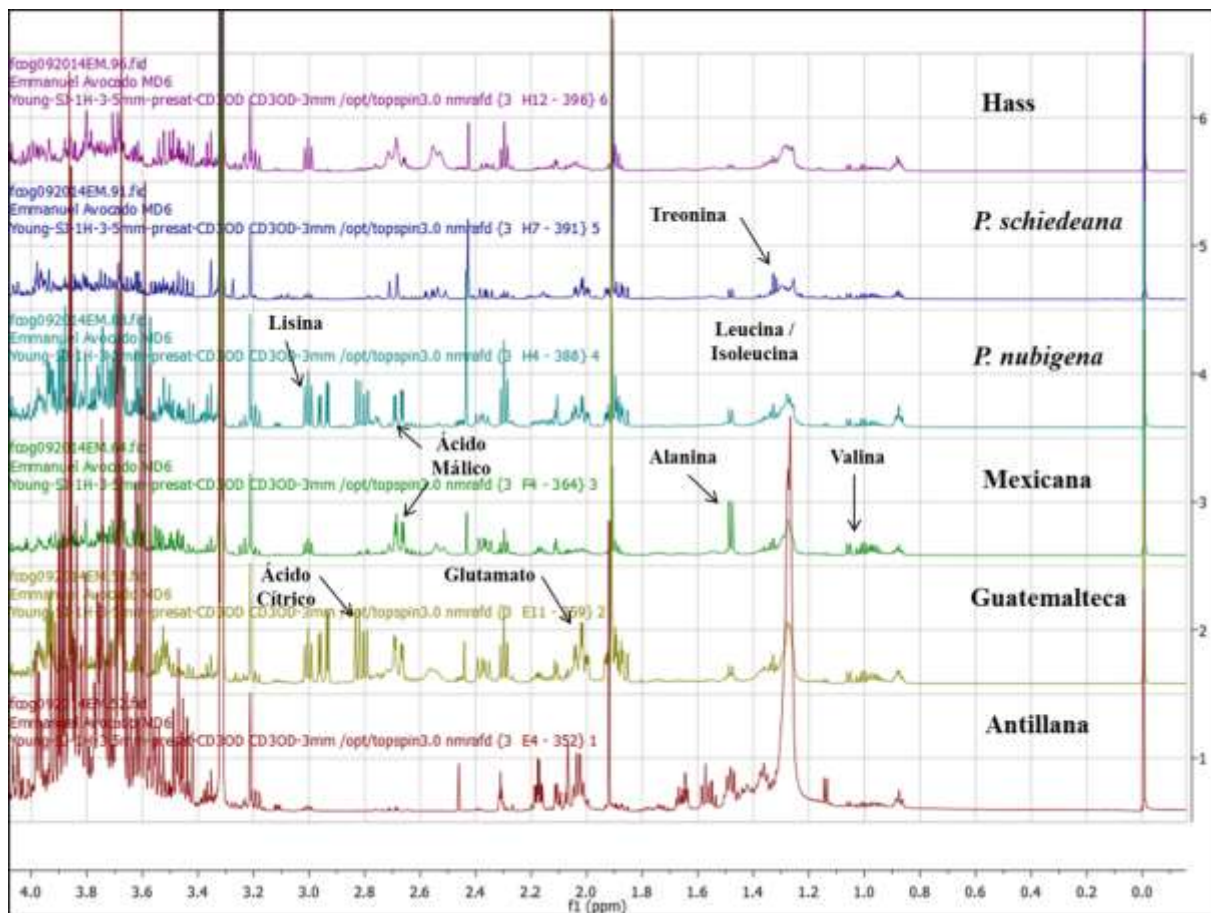
## ANEXO IV-2. Zona aromática del espectro de RMN<sup>1</sup>H de pulpa de aguacate y especies afines.



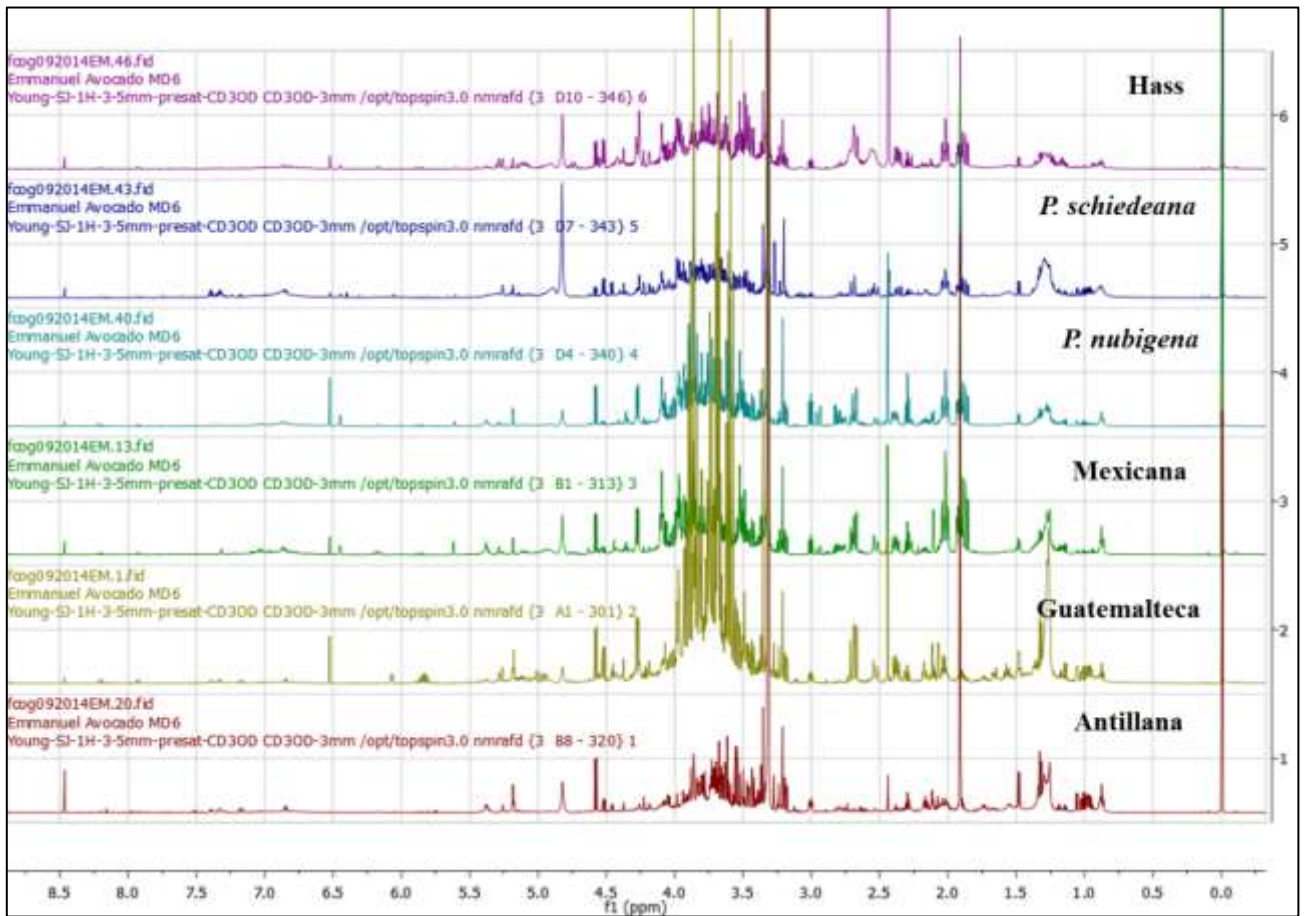
### ANEXO IV-3. Zona de azúcares del espectro de RMN<sup>1</sup>H de pulpa de aguacate y especies afines.



**ANEXO IV-4. Zona de aminoácidos del espectro de RMN<sup>1</sup>H de pulpa de aguacate y especies afines.**

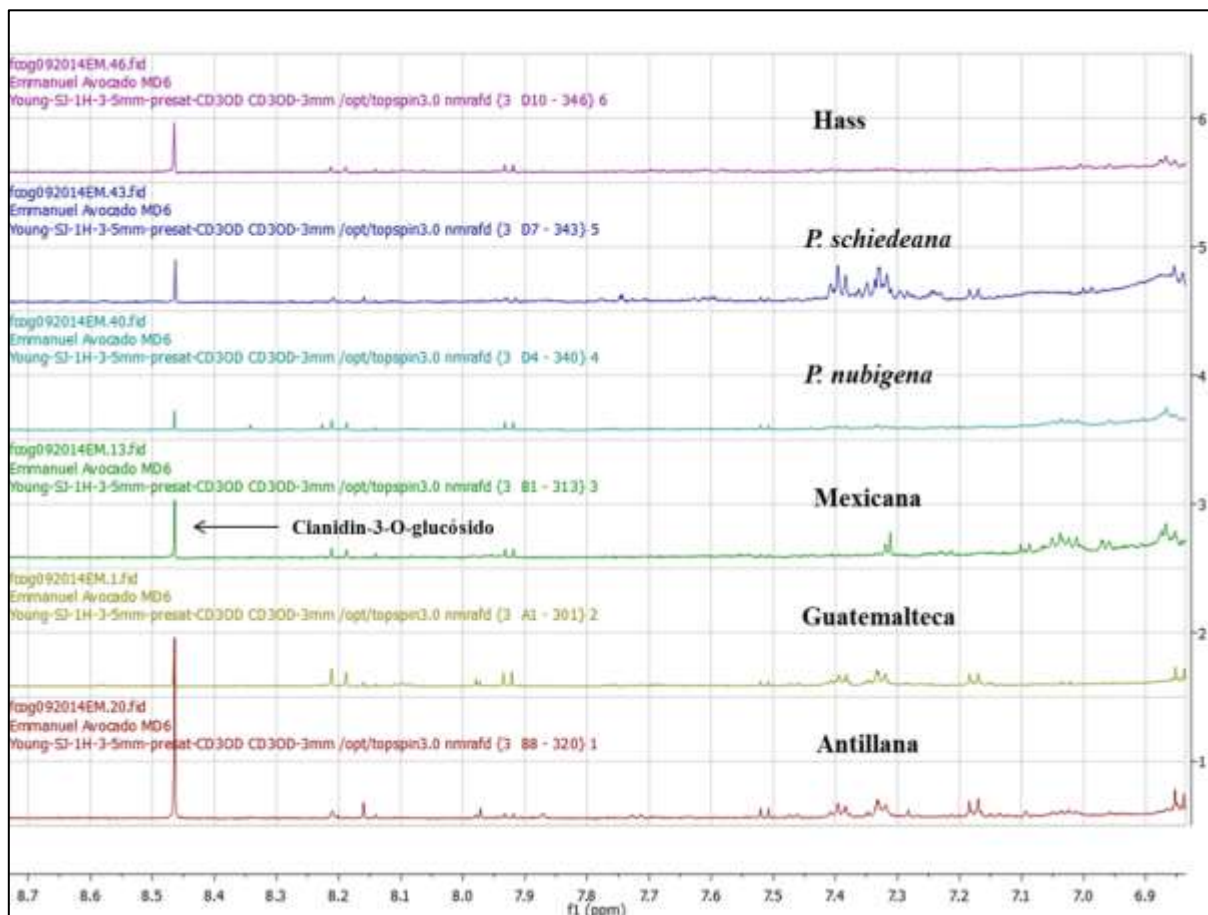


### ANEXO IV-5. Espectro de RMN<sup>1</sup>H de cáscara de aguacate y especies afines.

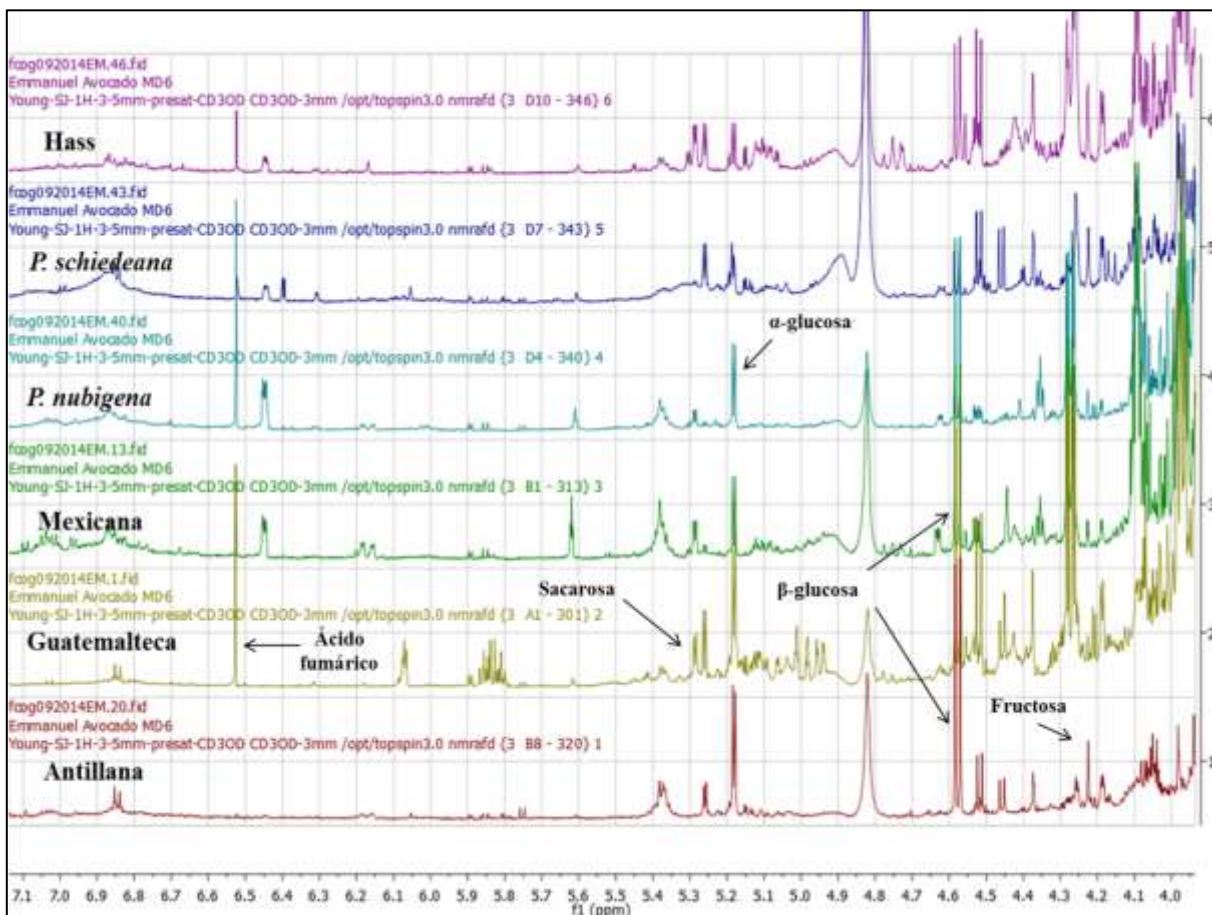




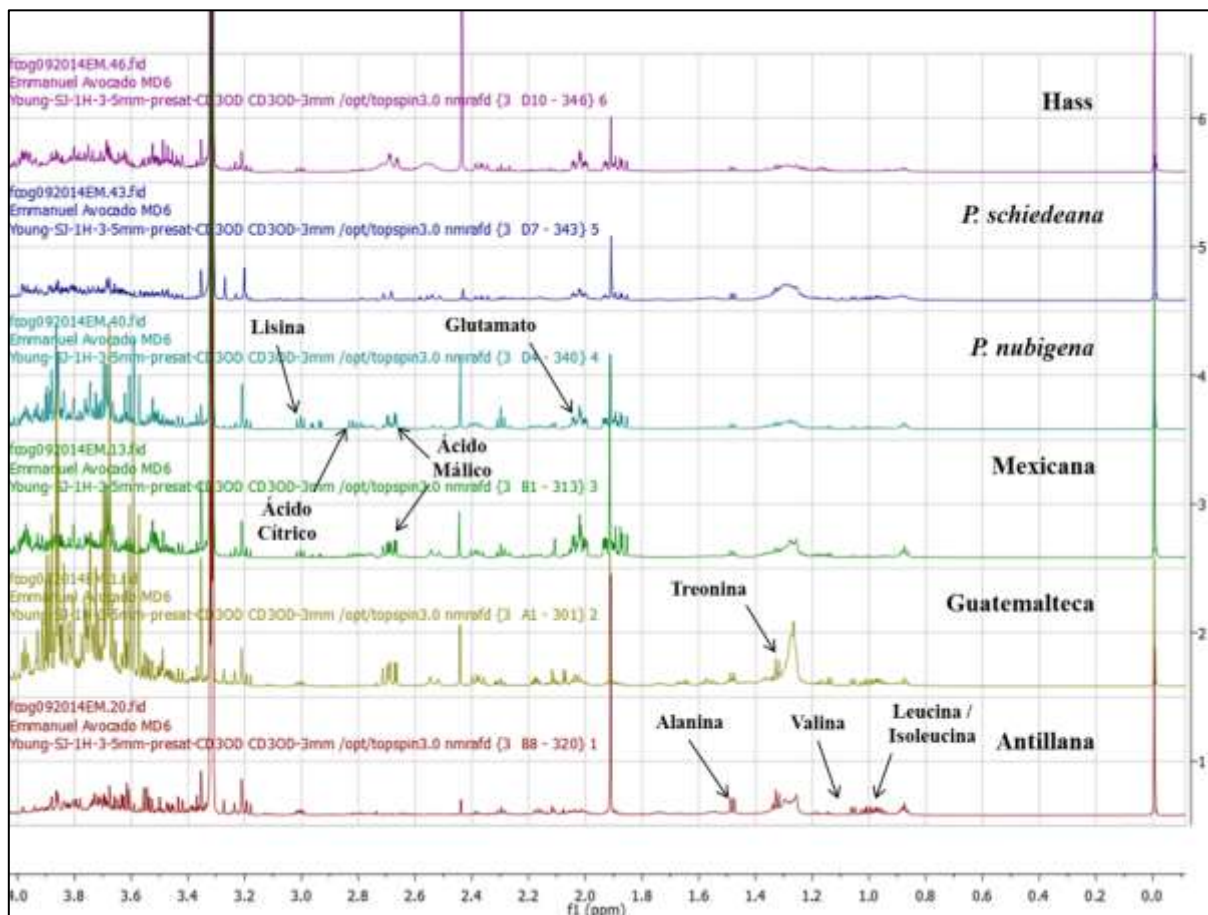
## ANEXO IV-6. Zona aromática del espectro de RMN<sup>1</sup>H de cáscara de aguacate y especies afines.



## ANEXO IV-7. Zona de azúcares del espectro de RMN<sup>1</sup>H de cáscara de aguacate y especies afines.



**ANEXO IV-8. Zona de aminoácidos del espectro de RMN<sup>1</sup>H de cáscara de aguacate y especies afines.**





## V. Contenido de aceite y composición de ácidos grasos en pulpa y cáscara de frutos de las razas de aguacate y *Persea* spp.

### 5.1. Resumen

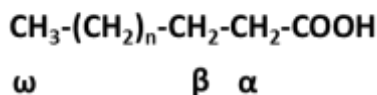
El aguacate es uno de los frutales más importantes, económicamente hablando, de nuestro país, y su variedad en cuanto a contenido químico es notable. En México existen las tres razas de aguacate, y todas se ellas tienen algunas características importantes que les ayudan a diferenciarse unas de otras, todo ellos debido a las diferentes condiciones en que se desarrollan. Los ácidos grasos son los compuestos químicos más importantes de la pulpa de aguacate, y algunos de ellos presentan propiedades y beneficios a la salud sobresalientes, como lo son el ácido oleico y el linoleico, además de algunos otros con importantes aplicaciones. Todos ellos presentan funciones importantes en los procesos fisiológicos de esta especie y de cualquier especie que los contenga. Se extrajo el aceite de pulpa y cáscara utilizando hexano como solvente con la ayuda de un baño de ultrasonido y homogenización para mejorar la extracción. Para determinar los ácidos grasos se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con previa derivatización con triflororuro de boro para convertir la molécula a una condición volátil. Se realizó un análisis de componentes de componentes principales para observar la variabilidad del contenido de ácidos grasos y un análisis discriminante para determinar que ácidos grasos son los característicos de cada una de las razas y especies afines. El aceite es un componente importante en la pulpa de aguacate, mientras que en la cáscara el contenido es muy bajo, pero sin embargo su contenido de ácidos grasos es importante. Los resultados mostraron que el contenido de aceite y ácido oleico caracterizaron a las razas mexicana y la guatemalteca, mientras que el contenido de ácido palmítico fue notable en la raza antillana. *Persea schiedeana* presentó buenos niveles de ácido linoleico, por su parte *P. nubigena* y ‘Hass’ presentaron contenidos similares a la raza mexicana y guatemalteca. En términos generales, la raza antillana presentó similitudes con *P. schiedeana* y con alguno de los genotipos guatemaltecos, mientras que las razas mexicana, algunos genotipos guatemaltecos, ‘Hass’ y *P. nubigena* fueron similares en cuanto a su contenido de ácidos grasos.

## 5.2. Abstract

Avocado is one of the most important fruits in the economy of Mexico, its chemical variability is remarkable. The three races of avocado that exist in this country are growing in different environments and all of them have excellent characteristics that differentiate them from each other. Fatty acids are important in plant physiology, and some of them are present in the avocado pulp, such as oleic and linoleic acid, which are beneficial to the health of consumers, and they also have others important applications. The aim of this study was to determine the differences in oil content and fatty acid composition to complement the study of nuclear magnetic resonance, in order to achieve a chemical classification of the races and species analyzed. Environmental conditions and adaptation, in addition to the genetic code of the genotypes determine their differences among them. The oil from pulp and peel was extracted with hexane in an ultrasonic bath. The analysis of fatty acids content was performed using boron trifluoride as derivatization reagent, and gas chromatography-mass spectrometry was used in order to identify and quantify the fatty acids. Principal component analysis and discriminant analysis were performed to determine if fatty acids are characteristic of races and species of the *Persea* genus. Oil is an important component in the pulp of avocado for its abundance, but its content in the peel is low, but the fatty acids content is important in both. The results showed that the oil content and oleic acid are characteristics of the Mexican and Guatemalan races, and palmitic acid was remarkable in the West Indian race. *Persea schiedeana* showed high content of linoleic acid, meanwhile *P. nubigena* and 'Hass' had similar content to the Mexican and Guatemalan races. Genotypes from West Indian race showed similarities in their composition with *P. schiedeana* and with one of the Guatemalan genotypes. Finally, genotypes from Mexican race, some Guatemalan genotypes, 'Hass' and *P. nubigena* were similar in their fatty acid content.

### 5.3. Introducción

Los ácidos grasos son cadenas carbonadas con un grupo metilo en una de las partes laterales de la molécula (designado omega,  $\omega$ ) y un grupo carboxilo en el otro lado de la molécula (Fig. V-1). El átomo de carbono próximo al grupo carboxilo es llamado carbono  $\alpha$ , y el subsecuente se denomina carbono  $\beta$ . En general, los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos alifáticos que actúan como bloques de construcción de lípidos complejos. Pueden ser saturados, monoinsaturados o polinsaturados dependiendo del número de dobles enlaces (Rustan y Drevon, 2005), difieren en longitud ya que presentan de 4-28 carbonos. Los ácidos grasos de cadena larga son cadenas alifáticas de 16 o más carbonos (Beerman *et al.*, 2003).



**Fig. V-1. Estructura y nomenclatura de los ácidos grasos.**

La letra n se usa a menudo en lugar de la letra griega  $\omega$  para indicar la posición del doble enlace más cercano al grupo metilo terminal. La nomenclatura sistemática para ácidos grasos puede también indicar la localización de los dobles enlaces con referencia al grupo carboxilo ( $\Delta$ ) (Rustan y Drevon, 2005).

Los ácidos grasos, tanto en forma libre y como parte de lípidos complejos, tienen funciones clave en el metabolismo (van Meer *et al.*, 2008), ya que actúan como el mayor combustible metabólico (almacenamiento y transporte de energía), así como componentes esenciales de las membranas, y como regulador de genes (Rustan y Drevon, 2005), además de que regulan la actividad de enzimas, y actúan como moléculas señalizadoras. Cuando actúan como componentes de membranas celulares lo hacen en forma de lípidos anfipáticos, es decir, como glicerofosfolípidos, predominantemente (Quehenberger *et al.*, 2011).

Los ácidos grasos de la dieta tienen funciones muy importantes para la salud, por ejemplo los poliinsaturados actúan como precursores de unos compuestos que actúan localmente, llamados eicosanoides (Rustan y Drevon, 2005; Ruiz *et al.*, 2010). Tanto los

ácidos grasos como los eicosanoides están relacionados con enfermedades crónicas tales como obesidad, diabetes, cáncer, artritis, asma y enfermedades cardiovasculares (Ruiz *et al.*, 2010).

En los ácidos grasos de cadena larga se incluyen los poliinsaturados, los cuáles contienen dos o más dobles enlaces y los principales grupos de ácidos grasos son el omega-3 y el -6. La nomenclatura más común de los ácidos grasos es con base en sus nombres comunes (por ejemplo, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, etc.) (Ruiz *et al.*, 2010). Siguiendo con el ejemplo del ácido linoleico, el cuál es un ácido graso de 18 carbonos con dos dobles enlaces, la estructura exacta está dada por el nombre sistemático: ácido cis-9, cis-12-octadecadienoico y por la abreviatura 18:2 cis  $\Delta^9$ , cis  $\Delta^{12}$  (Lobb y Chow, 2000).

Los ácidos grasos pueden encontrarse en la naturaleza en forma libre, o la mayoría de ellos formando parte de moléculas complejas a través de enlaces éster o amida. Existen diversos métodos para cuantificar a los ácidos grasos libres, los cuáles son métodos que con diversos pasos involucran fases como el procedimiento de extracción de los lípidos de la muestra, el aislamiento de ácidos grasos libres del resto de lípidos a través de cromatografía de capa fina y/o extracción en fase sólida, procedimientos de derivatización de ácidos grasos libres a metil ésteres de ácidos grasos, y la extracción de los metil ésteres para su cuantificación cromatográfica, lo cual es llevado a cabo, generalmente, a través de cromatografía de gases (CG) (Kotani *et al.*, 2000).

Como parte de lípidos complejos, los ácidos grasos son importantes para los mecanismos de aislamiento térmico y eléctrico, además de protección mecánica. Debido a su estructura química altamente reducida, los ácidos grasos rinden más del doble de energía al oxidarse comparados con los polisacáridos haciendo a la grasa la más eficiente forma de almacenamiento de energía en los organismos vivientes (Quehenberger *et al.* 2011). Pero si la concentración de ácidos grasos libres en la célula es demasiado alta puede ser tóxico, por lo tanto, estos compuestos son almacenados primariamente como triacilgliceroles y ésteres de esteroides en cuerpos lipídicos neutros intracelulares (gotas lipídicas) que funcionan como almacenes de energía y como un acopio de ácidos grasos y esteroides necesarios para la biosíntesis de membrana.

Los cuerpos lipídicos fueron originalmente encontrados en tejidos grasos tal como el tejido adiposo, pero posteriormente algunas investigaciones determinaron que estos

organelos se encuentran casi todos los tipos celulares (Martín y Patrón, 2006). Cuando se necesitan, los ácidos grasos son liberados de sus cuerpos de almacenamiento y/o de los lípidos de membrana por hidrólisis enzimática regulada por lipasas (Huang, 2001). Además, los ácidos grasos libres y sus sales pueden tener función como detergentes y jabones debido a sus propiedades anfipáticas y la formación de micelas (partículas coloides) (Rustan y Drevon, 2005).

Existen diferentes tipos de ácidos grasos en la naturaleza que cumplen diversas funciones de acuerdo a su estructura química.

Los monoeno más comunes tienen una longitud de cadena de 16-22 y un doble enlace con configuración *cis*-, lo cual significa que los átomos de hidrógeno en cada lado del doble enlace están orientados en la misma dirección. Los isómeros *trans*- pueden producirse durante el procesamiento industrial (hidrogenación) de aceites insaturados y en el tracto gastrointestinal de rumiantes. La presencia de un doble enlace causa restricción en la movilidad de la cadena acíclica. La configuración *cis*- da un enroscamiento en la forma molecular y los ácidos grasos *cis*- son termodinámicamente menos estables que los de la forma *trans*-. Los ácidos grasos *cis*- tienen punto de ebullición más bajo que los *trans*- o sus homólogos saturados.

En los ácidos grasos poliinsaturados el primer doble enlace puede ser encontrado entre el tercer y el cuarto átomo de carbono del carbono  $\omega$ ; estos son llamados ácidos grasos  $\omega$ -3. Si el primer doble enlace está entre el sexto y séptimo carbono, entonces se les llama  $\omega$ -6. Los dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados están separados uno de otro por un grupo metileno. Este tipo de ácidos grasos son esenciales para los organismos superiores y son solo producidos por plantas y fitoplancton (Rustan y Drevon, 2005).

Este tipo de compuestos tienen una función primordial en la bicapa membranal lipídica, actuando como barrera entre compartimentos y células y como una matriz en la cual se insertan las proteínas membranales. La bicapa es altamente organizada y muy activa en cuanto al efecto del ambiente sobre ella. Las propiedades físicas, función y acomodo de los diferentes compuestos están regulados por la composición de ácidos grasos (Dowhan y Bogdanov, 2009).

Una propiedad importante de las membranas es su fluidez y dinámica, ya que se realizan bastantes movimientos de transporte a través de ella, tales propiedades están reguladas por

el tipo de ácidos grasos, su longitud de cadena, el número y posición de dobles enlaces (Stillwell y Wassal, 2003). Existen otras funciones en las que se involucran los ácidos grasos, por ejemplo, la actividad de enzimas asociadas a membranas y receptores, los procesos de tráfico de compuestos y división celular (Stubbs y Smith, 1990), en el arreglo de los microdominios y señalización (Pike, 2009).

Los ácidos grasos representan del 30-35 % del consumo de energía en muchos países industriales, y las más importantes fuentes dietéticas de ácidos grasos son los aceites vegetales, productos lácteos y cárnicos, granos, peces y sus aceites (Rustan y Drevon, 2005). El ser humano no puede sintetizar ácidos grasos con dobles enlaces en la posición seis o menor, los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son esenciales para la salud humana y se obtienen de la dieta.

El compuesto de origen de la familia de los omega-6, ácido linoleico es abundante en la naturaleza, ya que se encuentra en las semillas de la mayoría de las plantas y se encuentra en mayor cantidad en aceites que se utilizan para cocinar, tal como el maíz y el girasol (Michelsen *et al.*, 2001). Otro ácido graso menos común pero igual importante es el ácido  $\alpha$ -linolénico, compuesto de origen de la familia omega-3. Estos dos últimos ácidos grasos mencionados, linoleico y  $\alpha$ -linolénico, pueden ser elongados y desaturados a ácidos grasos poliinsaturados de cadena más larga: ácido linoleico a ácido araquidónico (C20:4), y el  $\alpha$ -linoleico a ácido eicosapentanoico (C20:5) y ácido docosahexanoico (C22:6) (Ruiz *et al.*, 2010).

El ácido araquidónico es también uno de los ácidos grasos esenciales requeridos por la mayoría de los mamíferos, y se acumula rápidamente en el cerebro en desarrollo durante el último trimestre de gestación; un déficit en éste ácido resulta en un pobre crecimiento (Clandinin *et al.*, 1980). El consumo de ácido araquidónico como suplemento tiene efectos benéficos en pacientes humanos con amnesia, mejorando la disfunción cognitiva resultado de daños al cerebro o envejecimiento (Kotani *et al.*, 2006), y también suprime el crecimiento de tumores en pulmón, específicamente células A549 (Muzio *et al.*, 2006).

Los aceites vegetales son la mayor fuente de lípidos comestibles que son consumidos en el mundo. Son extraídos del endospermo de las semillas aceitosas o del pericarpio de frutos aceitosos, principalmente palma y oliva. Otra fuente importante es el aceite de fruto de aguacate (Ozdemir y Topuz, 2004), este fruto es una importante fuente de calorías, y su

característica más importante es su contenido de ácidos grasos monoinsaturados. Además, el aguacate es rico en fitoquímicos lipofílicos como la vitamina E, ácido ascórbico, vitamina B<sub>6</sub>, β-caroteno, esteroides y potasio. Algunos de estos compuestos presentan actividad antioxidante y contra radicales libres (Lee *et al.*, 2004).

El texto hasta aquí, las generalidades sobre ácidos grasos, deben estar en la intro, no en un capítulo/artículo. Y lo que sigue se puede reducir bastante, ya que muchas cosas dices varias veces (y muy obviamente en forma muy cercano al original; se escucha el inglés y no tu voz). Favor de integrar la información, no solo repetir lo que dicen las fuentes.

El fruto de aguacate aporta algunos compuestos químicos para formulaciones de productos farmacéuticos y cosméticos (Bora *et al.*, 2001). El contenido de aceite puede variar entre 15 y 30 % (en base a peso fresco), dependiendo del cultivar y estacionalidad (Lee *et al.*, 1983). La composición de ácidos grasos también depende de la localización geográfica, adicionalmente al cultivar y al estado de maduración (Ahmed y Barmore, 1980). En aguacates de raza mexicana y guatemalteca, el contenido de aceite varía de 10-13 % y de 15-25 %, respectivamente (Biale and Young, 1971), mientras que en los frutos caribeños se reporta bajo contenido (2.5-5%) (Hatton *et al.*, 1964). El contenido mínimo de aceite necesario para la comercialización del aguacate es del 8 %. Después de la maduración, el valor puede incrementarse a más del 20 % (Ozdemir y Topuz, 2004).

Estos valores se presentan en el período comprendido entre la cosecha, cuando se alcanza la madurez comercial, y la completa maduración. Es cuando el contenido de aceite se incrementa y ocurren cambios en la composición del aceite. Las concentraciones de ácidos grasos insaturados se incrementa y la de grasos saturados decrece (Martínez y Moreno, 1995). De acuerdo con Soares *et al.* (1992), la adulteración del aceite de oliva con aceite de aguacate a un nivel de 35 % es indetectable en cuanto al sabor ya que ambos presentan características similares. Esto último muestra que el aceite de aguacate puede competir directamente en cuanto a calidad de aceite, el cual es uno de los aceites más consumidos en el mundo. El aguacate es de gran importancia económica y nutricional para México (Villa *et al.*, 2011), y es considerado uno de las fuentes naturales más importantes de origen de ácidos grasos monoinsaturados derivados de alimentos y ácidos grasos esenciales (Jakab *et al.*, 2002).

El aceite de aguacate es el componente más importante de la sustancia seca del mesocarpio y es responsable del sabor y de su textura. Existen diversas técnicas de extracción y tratamiento del aceite de aguacate, lo cual modifica la cantidad de aceite extraído, su composición y cantidad de los ácidos grasos presentes. A través de técnicas de extracción por presión en frío han hecho posible su consumo directo con los siguientes beneficios para la salud humana: reducción de enfermedades cardiovasculares, por su contenido de  $\alpha$ -tocoferol (12-15 mg/g de aceite), prevención de cáncer de colon, de mama y próstata por su contenido de  $\beta$ -sitosterol (4.5 mg/g de aceite) el cual inhibe la absorción intestinal de colesterol disminuyendo los niveles de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad (LDL); disminuye el riesgo de trastornos oculares y cataratas por su contenido de luteína (xantofila), la cual se encuentra junto con otros pigmentos liposolubles o carotenoides (carotenos, xantofilas y clorofila) (Téliz y Mora, 2007).

Las relaciones entre los ácidos grasos monoinsaturados (oleico y palmitoleico) y saturados se comparan favorablemente con el aceite de oliva (Requejo *et al.*, 2003). El ácido linoleico es importante en la industria cosmética debido a sus propiedades benéficas a la piel, ya que actúa como antiinflamatorio, reductor de acné, y puede retener humedad (Letawe *et al.*, 1998), además de que ayuda a bajar activamente el colesterol sérico (Hesgted y Kritchevsky, 1997). Debido a la relación inversa entre el consumo de ácido linoleico y la concentración de colesterol en el plasma sanguíneo, y la relación entre este último y la incidencia de enfermedades coronarias, se recomienda incrementar el consumo de ácido linoleico a 4 - 10 % del consumo total de energía (Heyden, 1994). El aceite se acumula durante el crecimiento y maduración en el árbol, con un gran incremento en la fracción de ácido oleico; una vez que el fruto es cosechado, el aceite no se acumula más, y se ha demostrado que hay poco cambio en el perfil de ácidos grasos durante la maduración postcosecha (Ozdemir y Topuz, 2004; Meyer y Terry, 2008).

El aceite de aguacate contiene una cantidad de ácidos grasos insaturados comparable a los aceites de girasol, maíz, oliva, soya y cacahuate. Un ácido graso monoinsaturado está presente en todas las grasas y aceites, y en algunos aceites, como el de oliva, de canola y de aguacate es el principal tipo de ácido graso. El ácido oleico llega a alcanzar hasta un 80 % del total de los ácidos grasos en el aceite de aguacate (Ratovohery *et al.*, 1988).



El aceite de aguacate está en una posición intermedia entre los aceites vegetales respecto al contenido de los ácidos grasos poliinsaturados (11 - 15 %). Contiene niveles más elevados de este tipo de ácidos que el aceite de oliva o de palma, pero más bajos que en maíz, algodón, soya y girasol. Sin embargo, el aceite de aguacate contiene una cantidad baja de ácido linolénico (< 1 %) y su balance ácido linoleico / ácido linolénico no es favorable (23:1) (Mataix y Gil, 2002). La porción comestible del fruto es rica en ácidos oleico, palmítico, linoleico y palmitoleico, mientras que el ácido esteárico se presenta solo en cantidades traza (Lu *et al.*, 2009; Yahia, 2010). El consumo de este tipo de compuestos en la dieta ha sido relacionado en el decremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares ya que ayuda a preservar los niveles de lipoproteína de alta densidad y su capacidad para actuar como antioxidantes (López *et al.*, 1996). Sin embargo, la capacidad antioxidante y algunas otras propiedades de frutas y vegetales puede ser afectada por diversos factores, tales como el tipo de cultivar, condiciones agronómicas, manipulación postcosecha y estado de madurez del fruto (Kevers *et al.*, 2007).

Los lípidos almacenados son los triglicéridos presentes en las células grasas del mesocarpio o idioblastos (Platt *et al.*, 1983). Los idioblastos se distinguen por su gran tamaño y un complejo de paredes celulares de tres capas (Kaiser *et al.*, 1992).

La cáscara de aguacate la mayoría de las veces no tiene algún uso y generalmente es desechada. Pero, en algunos genotipos de raza mexicana es consumida. Se sabe de la presencia de ciertos compuestos químicos en la cáscara de aguacate ‘Hass’ con importantes propiedades para la salud humana, como pueden ser los carotenoides (luteína y  $\beta$ -caroteno), antocianinas (cianidina-3-O-glucósido), además de luteína y violaxantina en el aceite de la cáscara (Ashton *et al.*, 2006), diversidad de azúcares, como lo son la mannoheptulosa, glucosa, perseitol, sacarosa y fructosa (Liu *et al.*, 1999 y 2002) y compuestos fenólicos (ácido cafeolquínico, procianidinas, catequinas y quercetina) Kosinska *et al.*, 2012.

La cáscara del aguacate varía en su estado y forma física, que va desde cambios en el color (verde hasta negro, pasando por purpura) hasta la textura y grosor de esta. Este parte del fruto le ayuda a protegerse de diversos daños (daño mecánico principalmente) (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). La raza mexicana se distingue por su cáscara delgada y delicada, mientras que en la raza guatemalteca la cáscara a menudo (no siempre) es más gruesa y

rugosa. En la raza antillana la cáscara es verde y lustrosa, pero no es gruesa (Berg y Ellstrand, 1986; Knight Jr., 1999).

Para el análisis de los compuestos presentes, principalmente ácidos grasos, se utilizan una amplitud de técnicas (simple extracción con disolventes, extracción exhaustiva con Soxhlet, percolación, maceración, digestión, destilación de vapor, etc.) (Ruiz *et al.*, 2010), además de que se han modificado los métodos originales a través de los años, existiendo hoy en día una gran variedad de técnicas de análisis de ácidos grasos. Incluso se han combinado los procesos de extracción de compuestos lipídicos y azúcares, con resultados positivos (Meyer y Terry, 2008).

El análisis de ácidos grasos en particular se ha llevado a cabo a lo largo de las últimas décadas por medio de cromatografía de gases (CG) capilar, la cual es una técnica que ha sido adoptada como una herramienta altamente aplicable en trabajos analíticos a microescala en un número considerable de áreas de estudio. Esta técnica ha llegado a ser un procedimiento de rutina para el análisis de ácidos grasos de cadena larga, sin embargo, la separación de compuestos carboxilados por CG es complicado por su, relativamente, alta polaridad y además es necesario preparar derivados no polares de ácidos grasos los cuáles son más volátiles que los componentes del ácido graso libre. Es por eso que el análisis de metil ésteres de ácidos grasos es usado casi universalmente para el análisis de ácidos grasos por CG (Shantha y Napolitano, 1992).

El análisis de metil ésteres de ácidos grasos demanda alta resolución cromatográfica, especialmente, para proveer evidencias de isómeros geométricos y posicionales de ácidos grasos insaturados en mezclas complejas. Para cumplir con estos requisitos, son usadas fases estacionarias polares para la separación de mezclas complejas de metil ésteres de ácidos grasos, ya que permiten la separación de acuerdo a la insaturación y al número de carbonos (Gutnikov, 1995).

La generación de metil ésteres de ácidos grasos puede ser hecha en condiciones ácidas o alcalinas sobre lípidos aislados o ácidos grasos pero también combinando la extracción lipídica y la transesterificación de aceites con metilato de sodio, NaOH o KOH en medio seco. Bajo condiciones ácidas, los derivados más comunes de ácidos grasos son los metil ésteres obtenidos del calentamiento de ácidos grasos libres con un gran exceso de metanol anhidro en la presencia de un catalizador, trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) (Morrison y Smith,

1964), pero también se han descrito trabajos en condiciones ácidas con HCl en metanol o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol. El uso de BF<sub>3</sub> ha revelado un alto rendimiento de metilación requiriendo un corto tiempo para la reacción, sin embargo, se dice que el uso de este compuesto causa daños irreversibles a la columna del cromatógrafo de gases (Bronz, 2002).

Se ha mencionado a la CG como una técnica más precisa y rápida para el estudio de la variación y herencia de ácidos grasos en cultivos con semillas ricas en aceite tales como semilla de colza, semillas de lino y de azafrán. Para el análisis de los ácidos grasos por CG se tiene que realizar una reacción de derivatización, para lo cual existen diferentes formas de hacerlo. En las primeras aplicaciones la preparación de los metil ésteres de los ácidos grasos para el análisis por CG incluía, por ejemplo, la saponificación del aceite seguido por una acidificación y derivatización con diazometano en éter, o un más rápida, una esterificación usando metóxido de sodio (NaOMe) como un catalizador. Desde entonces, un número de ciertos procedimientos para transesterificación o metilación catalizada por ácidos o bases de ácidos grasos no esterificados han sido aplicados al análisis de ácidos grasos (Seppänen *et al.*, 2002). Los métodos de derivatización que esterifican el enlace lipídico y los ácidos grasos libres, por ejemplo los métodos de esterificación directa (HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH), saponificación-esterificación (hidróxido de potasio (KOH), HCl / MeOH) o trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub> / MeOH), aún son ampliamente utilizados. La esterificación por medio de BF<sub>3</sub> / MeOH se ha aplicado en el análisis de aceites y grasas, jabones, triglicéridos, poliésteres, lipoproteínas y fosfolípidos (Metcalf *et al.*, 1966), productos alimenticios (Sheppard *et al.*, 1974) y plaquetas (Mulder *et al.*, 1983).

La técnica de extracción de aceite y grasa más usada es el Soxhlet, en el cuál se usa éter de petróleo (recomendado por la AOAC) (Ruiz *et al.*, 2010) y también se usa hexano con esta técnica (Meyer y Terry, 2008), sin embargo hoy en día, la extracción simple con hexano o cloroformo-metanol es más rápida y eficiente. En general, el análisis de ácidos grasos por CG (como metil ésteres) en aceites (aceite de pez y oliva), grasa (leche), aceite y grasas procesados (hidrogenados y refinados) es una técnica bien establecida (AOCS, 2009).

El estudio de la composición de ácidos grasos en aguacate es de suma importancia, pues éste tipos de compuestos son los que distinguen al aguacate del resto de los frutales, ya que

son signos de calidad y de beneficios a la salud. Como ya se mencionó, existen diferencias marcadas en el contenido de aceite y composición de ácidos grasos entre las diferentes razas, pero que sin embargo, dicha diferencia puede ser utilizada para diversas aplicaciones de acuerdo al tipo y cantidad de los compuestos que estamos estudiando.

Este trabajo pretende determinar la diferencia en composición entre razas y algunas especies afines, y encontrar cuáles son los aguacates de mayor calidad tomando como base el contenido de ácidos grasos. Tales datos se pueden usar en un futuro para el mejoramiento genético del frutal, y tratar de obtener mayor variedad de aguacates de importancia comercial. Pueden ayudarnos a enaltecer la importancia de aguacates diferentes a los aguacates más importantes comercialmente, pues entre las razas pueden existir aguacates de mayor calidad, tomando como base su contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados, principalmente. A la vez, los resultados pueden ser una base para posteriores estudios en compuestos lipídicos derivados de ácidos grasos que normalmente actúan y/o ayudan a contrarrestar efectos negativos a la salud. El contenido de aceite y ácidos grasos en cáscara de aguacate no se ha tratado anteriormente por lo que este estudio ofrece conocer su composición sobre todo en aquellos genotipos en los que la cáscara es consumida al igual que la pulpa.

## **5.4. Materiales y Métodos**

### **5.4.1. Material Vegetal**

Para la extracción de aceite se utilizó pulpa y cáscara de genotipos de aguacate de diferentes razas y dos especies afines (CUADRO 5-1). Los frutos de raza guatemalteca ‘Olanca 2S3’ y ‘Guatemalteco Fundación’, algunos mexicanos (‘Duke 7’, ‘Pequeño Charly’ y ‘Thomas’), *Persea nubigena* y ‘Hass’ fueron colectados en la Fundación Salvador Sánchez Colín, S. C., Coatepec Harinas, Estado de México; el genotipo de raza guatemalteca ‘Corralito’ se colectó en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; los genotipos mexicanos ‘Semillero’, ‘Negrito’ y ‘Lechero’ se colectaron en Zacapala, Puebla; el genotipo mexicano ‘Don Cris’ se colectó en Tequexquináhuac, Texcoco, Estado de México; los genotipos de raza antillana en Yucatán, y *P. schiedeana* es originaria de Huatusco, Veracruz. Los frutos en madurez fisiológica (3 repeticiones) fueron obtenidos de diferentes posiciones del mismo árbol.

**Cuadro V-1. Genotipos utilizados para la extracción de aceite de pulpa y cáscara.**

<b>Genotipo</b>	<b>Raza</b>	<b>Abreviatura en Gráficos</b>
‘Antillano 82’	Antillana	A-82
‘Doble Cosecha’	Antillana	D Cos
‘Lagunero’	Antillana	Lag
‘Guatemalteco Fundación’	Guatemalteca	Gu Fn
‘Olanca 2S3’	Guatemalteca	O2S3
‘Corralito’	Guatemalteca	Cor
‘Hass’	Híbrido (G x M)	Hass
‘Pequeño Charly’ (Casita I)	Mexicana	Cas 1
‘Don Cris’	Mexicana	D Cris
‘Duke 7’	Mexicana	Duke
‘Lechero’	Mexicana	Lech
‘Negrito’	Mexicana	Neg
‘Semillero’	Mexicana	Semi
‘Thomas’	Mexicana	Tho
<i>P. nubigena</i>	-	Pn
<i>P. schiedeana</i>	-	Ps

#### **5.4.2. Extracción de aceite**

El procedimiento para la extracción de aceite de pulpa y cáscara de aguacate fue el utilizado por Meyer y Terry (2008) y Kim *et al.* (2010), este último para tratar de mejorar el rendimiento. La pulpa y la cáscara se liofilizaron por 48 h (previa maceración de la cáscara utilizando nitrógeno líquido), para posteriormente macerarlos en un mortero con pistilo. Las muestras se colocaron en un tubo Eppendorf (100 mg) para luego agregarle hexano y homogeneizar en un Vortex (Thomas Scientific®) por 2 min y ponerlos en un ultrasónico (BRANSON® 3510) por 30 min para una mejor extracción del aceite. Después de esto, la muestra se centrifugó a 13000 g durante 5 min. Al finalizar este paso, se separó la fase orgánica (hexano) y se colocó en un eppendorf diferente. Para la obtención del aceite se concentró la muestra (evaporación del hexano) en un concentrador a vacío.

### **5.4.3. Derivatización de ácidos grasos.**

Se agregó 1 mL de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol al 14 % al aceite obtenido. Se dejó reaccionar por 20 min a 70 °C en baño de agua, luego el contenido se transfirió a un tubo de centrifuga de vidrio y se le agregó 1 mL de agua destilada y 1 mL de hexano. La solución se agitó en un Vortex. Se separó la fase orgánica (capa de hexano) y se le agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua. Luego se transfirió el extracto de hexano a un vial de cromatografía de gases y se almacenó a -20 °C antes del análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas (Morrison y Smith, 1964; con algunas modificaciones).

Para la cuantificación de los ácidos grasos se empleó un cromatógrafo de gases (CG) Agilent Technologies 7890A acoplado a un detector selectivo de masas 5975C inert MSD. Se utilizó una columna HP-5ms de 30 m X 0.250 mm X 0.25 µm de (5 % - fenil) – metilpolisiloxano. El modo de ionización fue por impacto electrónico (IE) a 70 eV. El flujo de He acarreador fue de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue de 250 °C, la temperatura inicial del horno fue de 100 °C, la temperatura del detector (MSD) fue de 230 °C, la temperatura del cuadrupolo de 150 °C, la temperatura de la zona de interferencia fue de 280 °C. La primer rampa de calentamiento fue de 100 a 170 °C con un incremento de 10 °C/min, la segunda rampa de calentamiento fue de 170 a 280 °C con un incremento de 5 °C/min. El volumen de inyección fue de 1 µL. El análisis de cada muestra fue repetida tres veces (Zhao, 2012 con algunas modificaciones).

### **5.4.4. Análisis de Datos**

Los datos obtenidos (porcentaje de ácidos grasos) fueron sometidos a un análisis de componentes principales y un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales a través del programa SIMCA 13.0.3.

## 5.5. Resultados y Discusión

### 5.5.1. Pulpa

#### 5.5.1.1. Perfil de ácidos grasos

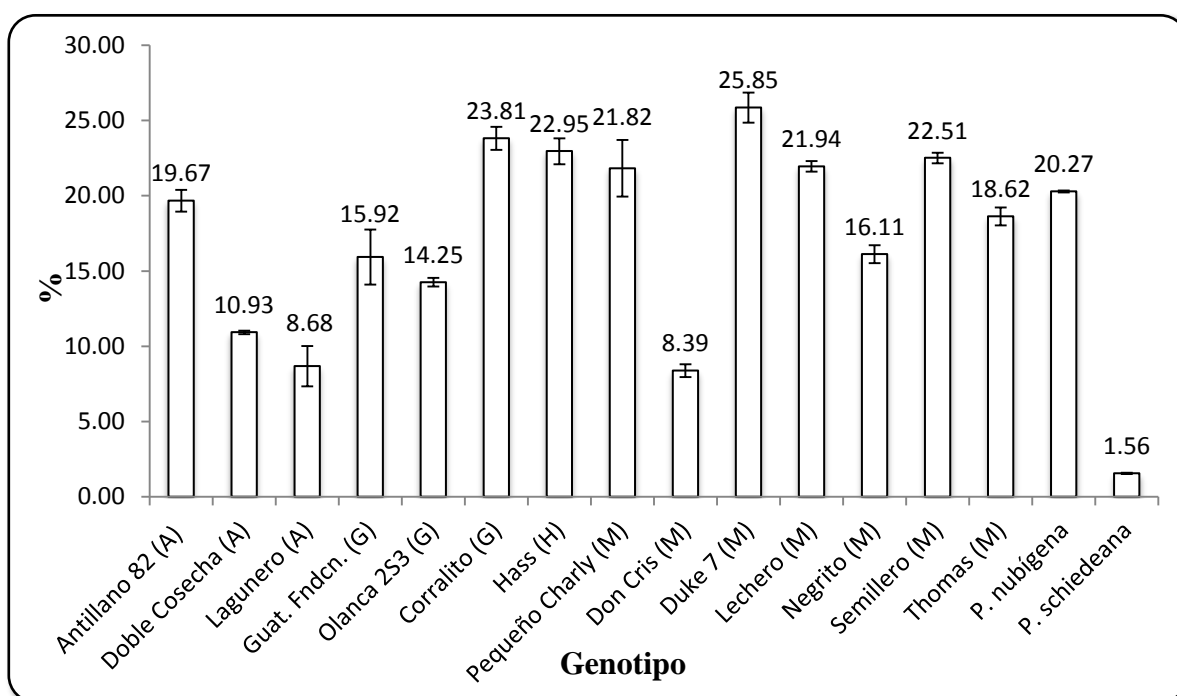
La técnica de extracción de aceite por homogenización con hexano empleada en este estudio dió buenos rendimientos de aceite de los genotipos analizados. El genotipo ‘Duke 7’ de la raza mexicana presentó el mayor contenido de aceite, seguido por ‘Corralito’ (guatemalteco), y en tercer lugar, ‘Hass’ (Fig. V-2). También, *P. nubigena* tuvo un alto porcentaje de aceite, al nivel de los mejores en este estudio.

De acuerdo a Biale y Young (1971) los genotipos de raza mexicana presentan porcentajes de aceite entre 10 y 13 % y los guatemaltecos de 15 a 25 %. Aquí se muestra que los genotipos con mayor contenido de aceite fueron los de raza mexicana (a excepción de ‘Don Cris’), con valores que oscilaron alrededor del 20 %. Los que presentaron niveles regulares de aceite fueron los genotipos de raza antillana (a excepción del ‘Antillano 82’) y los guatemaltecos, mientras que *P. schiedeana* se caracterizó por un muy bajo contenido de aceite.

La mayoría de los estudios dirigidos a conocer el contenido de aceite y ácidos grasos se han llevado a cabo en pocos genotipos de aguacate; ‘Hass’ y ‘Fuerte’ son los que más se han estudiado. Carvajal *et al.* (2014), Meyer y Terry (2008), Ozdemir y Topuz (2004), Ortiz-Moreno *et al.* (2003), Salas *et al.* (2000) y Takenaga *et al.* (2000) han focalizado sus estudios en ‘Hass’; así como Ozdemir y Topuz (2004) y Takenaga *et al.* (2000) lo han hecho con ‘Fuerte’. Otras variedades que se han analizado son ‘Bacon’ (Takenaga *et al.*, 2000), ‘Collinson’, ‘Baker’ y ‘Fortuna’ (Galvao *et al.*, 2014).

Meyer y Terry (2008) obtuvieron un rendimiento de 14 % de aceite en ‘Hass’ por medio de la misma técnica de extracción empleada aquí (homogenización + hexano) y 16 % empleando la extracción por Soxhlet + hexano. Tal contenido es menor al obtenido en este estudio por homogenización para ‘Hass’ (22.95 %), y también es mayor al que obtuvieron Ortiz-Moreno *et al.* (2003) para esta misma variedad (15.8 %). Por otra parte, Ozdemir y Topuz (2004) analizaron el contenido de aceite en diferentes tiempos de cosecha y obtuvieron variaciones de entre 11 - 19 % para ‘Hass’ y 14 - 20 % para ‘Fuerte’; mientras que Bora *et al.* (2001) indicaron 15.39 % de aceite total para esta variedad.

Hasta ahora la literatura indica que los aguacates de raza antillana presentan valores muy bajos en cuanto al contenido de aceite (menos de 5 %) (Hatton *et al.*, 1964). Sin embargo en este estudio los genotipos de raza antillana presentaron valores desde 8 hasta 19 %, este último dato para el genotipo ‘Antillano 82’. *P. schiedeana* fue el que presentó el más bajo contenido de aceite total, lo cual difiere totalmente con lo obtenido por Joaquín-Martínez *et al.* (2007) y Cruz-Castillo *et al.* (2007), quienes reportan valores de entre 24 y 36 % para varios genotipos de esta especie. Pero, ellos utilizaron cloroformo para la extracción del aceite y también fueron genotipos diferentes.



**Fig. V-2. Contenido de aceite en pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

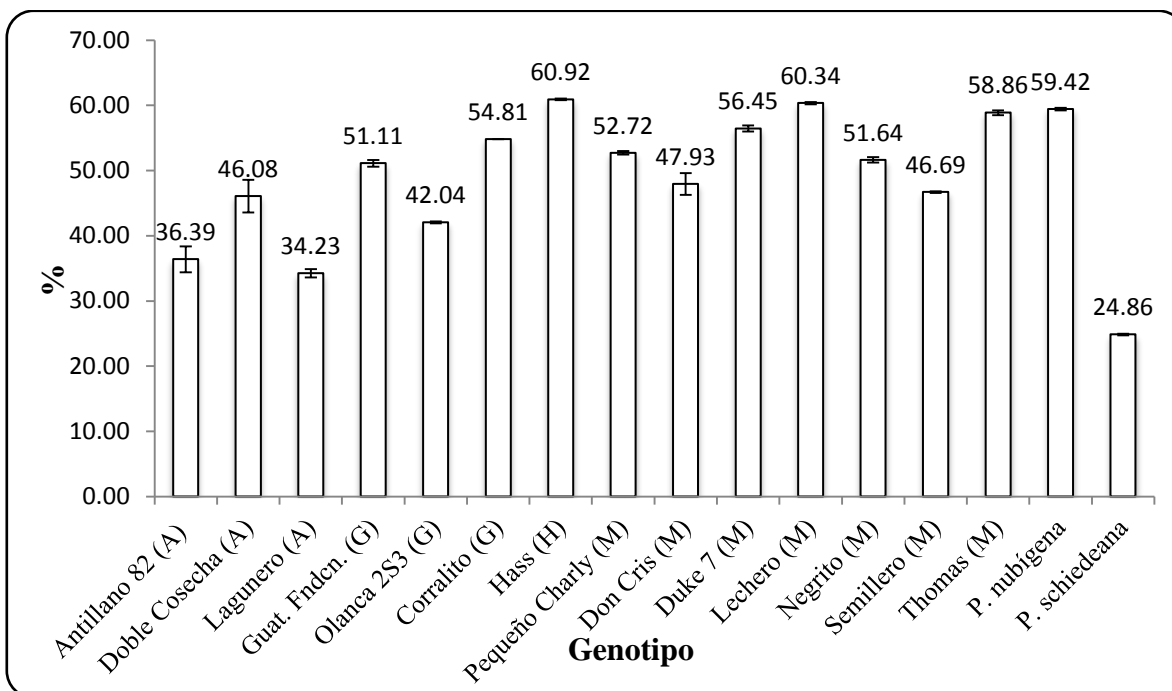
Los ácidos grasos son los compuestos químicos más importantes del aceite de pulpa de aguacate, y es el ácido oleico es el compuesto más característico y dominante (Meyer y Terry, 2008; Ozdemir y Topuz, 2004). Este compuesto era el de mayor abundancia en la mayoría de los genotipos analizados (Fig. V-3). Los genotipos de raza mexicana y guatemalteca tenían los mayores niveles de ácido oleico con variaciones de entre 50 y poco más de 60 %, junto con ‘Hass’ con casi 61 %. También, *P. nubigena* presentó un porcentaje



de este compuesto de más de 59 %. Los contenidos de los genotipos de raza antillana de este compuesto eran por debajo de 50 %. *P. schiedeana* tenía el nivel más bajo de todos.

El resultado de ‘Hass’ es consistente con lo reportado por Meyer y Terry (2008), un poco más de 58 % con dos formas de extracción (homogenización y Soxhlet). Varios otros autores (Ozdemir y Topuz, 2004, 59.5%; Ortíz-Moreno *et al.*, 2004, 60.3%, Takenaga *et al.*, 2000, 55.6%; Carvajal *et al.*, 2014, 58.8% de ácido oléico) obtuvieron resultados similares. Para la variedad ‘Fuerte’, los resultados son más variados: Bora *et al.* (2001) obtuvieron poco más de 64 % de ácido oleico en el aceite de pulpa, lo cual representa un valor más de alto de los que aquí se presentan; mientras que Ozdemir y Topuz (2004) obtuvieron 73 % de ácido oleico en esta variedad y Takenaga *et al.* (2000) apenas el 59 %, además de 63.1 % para ‘Bacon’. Otras variedades como ‘Fortuna’, ‘Collinson’ y ‘Baker’ presentaron menores niveles de ácido oleico (51 % para las dos primeras, y poco más de 32 % para la última, el cual es antillano) (Carvajal *et al.*, 2014). El valor obtenido en *P. schiedeana* es menor al reportado por Joaquín-Martínez *et al.* (2007) y por Cruz-Castillo *et al.* (2007), quienes reportaron valores que oscilan entre el 35 y 57 % en diversos genotipos de esta especie, con la diferencia, que ya se mencionó arriba, de que ellos utilizan cloroformo para la extracción del aceite, además de una técnica diferente de derivatización.

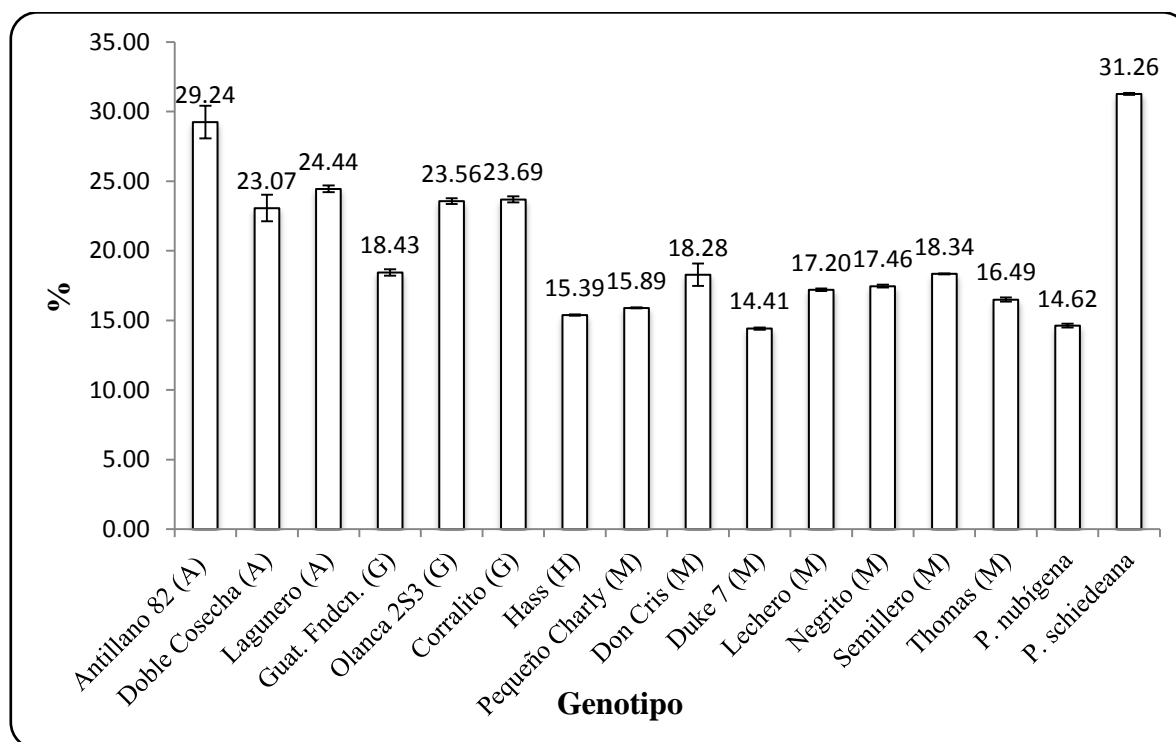
El nivel de ácido oleico en el aceite de aguacate representa beneficios a la salud, por lo que a partir de lo aquí mostrado podemos discernir cuales genotipos (y por lo tanto razas) son los más idóneos para el consumo humano tomando en cuenta este aspecto. Los genotipos de la raza mexicana y guatemaltecos presentaron los mayores niveles de este ácido, muy parecidos a ‘Hass’, además de *P. nubigena*; mientras que los antillanos y, sobre todo, *P. schiedeana* son los menos aptos en cuanto al contenido de ácido oleico. Generalmente, un bajo contenido de ácido oleico va acompañado por un aumento en el contenido de ácido linoleico el cuál es un ácido graso poliinsaturado con diversas propiedades que lo hacen aptos para el consumo, pero a la vez, el contenido de ácido linoleico está equilibrado con el contenido de ácido palmítico.



**Fig. V-3. Contenido de ácido oleico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido palmítico es el ácido graso saturado más predominante en la naturaleza, tanto en animales, plantas y microorganismos (Rustan y Drevon, 2005). En aguacate es uno de los compuestos más importantes junto con el ácido oleico. En los genotipos aquí analizados (**Fig. V-4**), se puede observar que *P. schiedeana* fue el que presentó el mayor porcentaje con más de 31 % del total de ácidos grasos presentes, similar a lo reportado por Joaquín-Martínez *et al.* (2007) y Cruz-Castillo *et al.* (2007) con valores entre 20 y 34 %. Los genotipos de raza antillana presentaron valores entre 23 y 30 %. Los genotipos guatemaltecos tenían niveles moderados de la sustancia, y los de más bajo contenido fueron los de raza mexicana con menos del 20 % en todos los casos. *P. nubigena* fue el genotipo con el menor contenido de ácido palmítico. En ‘Hass’, que en este estudio presentó poco más de 15 % de ácido palmítico, se han reportado valores de poco más de 22 % (Meyer y Terry, 2008), 23 % (Ozdemir y Topuz, 2004), 15.7 % extraído con hexano y 21.1 % tratado con microondas (Ortiz-Moreno *et al.*, 2003), 20 % (Takenaga *et al.*, 2000), 13 % (Salas *et al.*, 2000) y 16 % (Carvajal *et al.*, 2014). En ‘Fuerte’, el ácido palmítico fluctúa entre 21 y

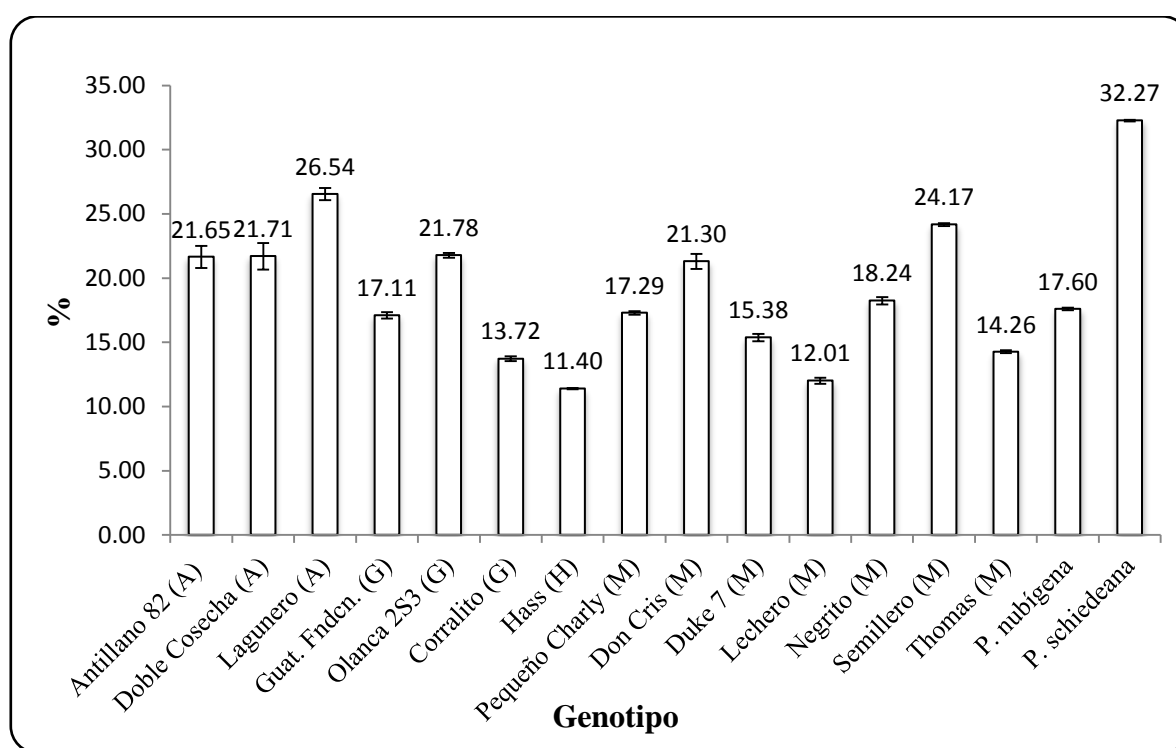
22 % (Ozdemir y Topuz, 2004; Bora *et al.*, 2001; Takenaga *et al.*, 2000). Un genotipo antillano, ‘Baker’, presentó un valor de poco más de 36 % de ácido palmítico (Galvao *et al.*, 2014).



**Fig. V-4. Contenido de ácido palmítico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

Uno de los ácidos grasos más importantes con beneficios a la salud es el ácido linoleico (Rustan y Drevon, 2005) el cual también está presente en el aguacate. Como puede observarse en la Fig. V-5, *P. schiedeana* presentó el mayor contenido con más de 32 %, lo cual es contrastante con lo reportado por Joaquín-Martínez *et al.* (2007) y Cruz-Castillo *et al.* (2007) quienes presentan valores muy bajos de ácido linoleico en diversos genotipos de esta especie (menos de 10 %), pero, como se mencionó anteriormente, ellos utilizaron otro método de extracción. Enseguida están los genotipos de la raza antillana (21 – 26 %), los genotipos mexicanos y los guatemaltecos, éstas última con fluctuaciones más notorias en cuanto al contenido de este compuesto ya que oscilaron desde poco más del 11 % hasta 24 %. Los valores reportados en otros estudios van desde un 9.6 % hasta 16.1 % en la variedad ‘Hass’ (Meyer y Terry, 2008; Ortiz-Moreno *et al.*, 2003; Ozdemir y Topuz, 2004;

Takenaga *et al.*, 2000; Carvajal *et al.*, 2014 y Salas *et al.*, 2000). En ‘Fuerte’, el ácido linoleico se presenta entre 9.2 y 11.5 % (Bora *et al.*, 2001; Ozdemiz y Topuz, 2004). Se reportó para ‘Baker’ (antillano) un porcentaje de 19.3 % de ácido linoleico, lo cual se puede tomar como un valor alto en comparación con las otras razas. En general, el ácido linoleico se presenta entre los tres o cuatro ácidos grasos más importantes del aguacate. En la raza antillana existe un equilibrio en el porcentaje de tres ácidos grasos: ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico, mientras que en la raza mexicana y guatemalteca el ácido oleico es el predominante.

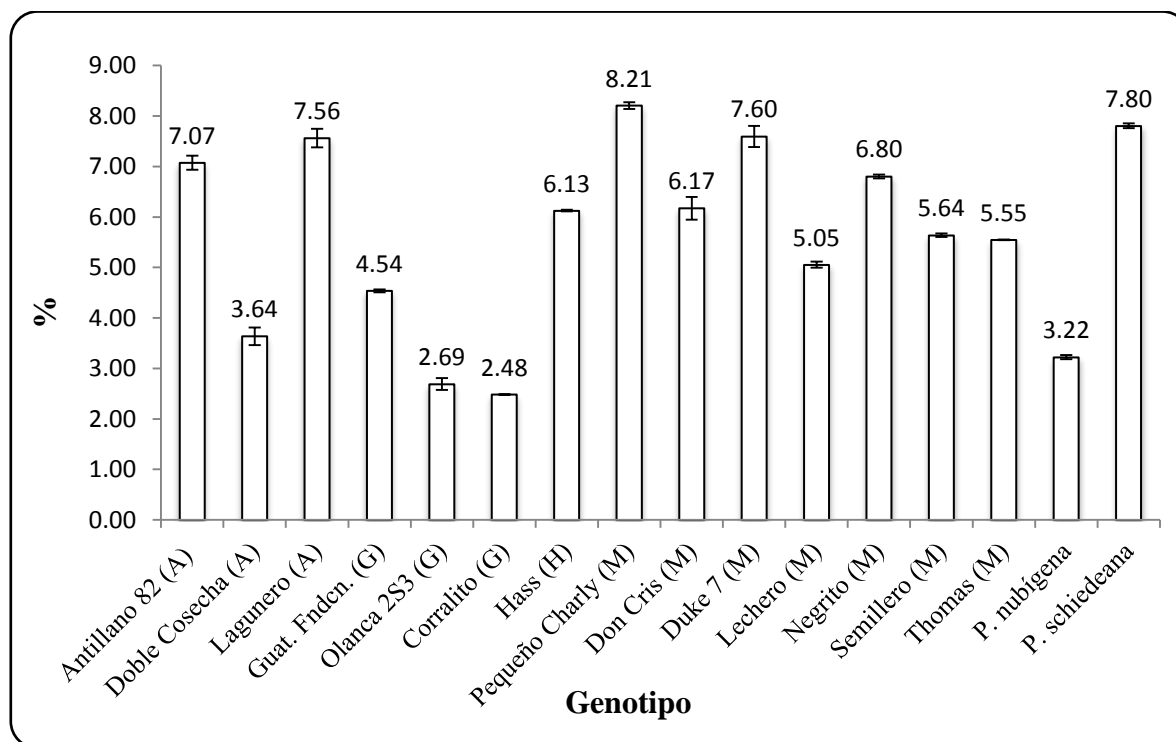


**Fig. V-5. Contenido de ácido linoleico de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

Otro de los ácidos grasos encontrados en aguacate, pero en mucho menor cantidad que los demás, es el ácido palmitoleico, ácido graso insaturado de 16 carbonos, que igual es un compuesto presente en animales y microorganismos, además de que está presente como componente mayoritario en algunas semillas aceitosas (Rustan y Drevon, 2005). De éste se presentaron altas variaciones entre todos los genotipos analizados (Fig. V-6). No se encontró una tendencia característica en alguna raza. ‘Pequeño Charly’ (mexicano) fue el

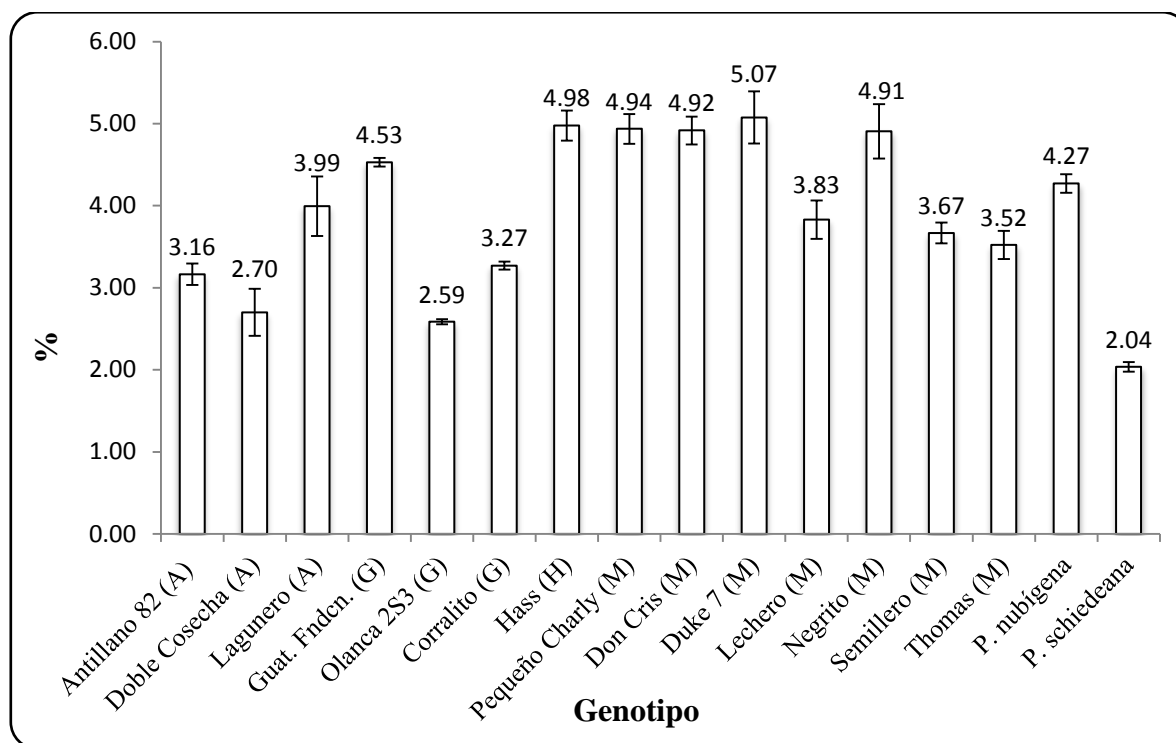
genotipo con mayor contenido, con más de 8 %, seguido por *P. schiedeana*, ‘Duke’ y ‘Lagunero’ (estos dos últimos mexicano y antillano, respectivamente). Los genotipos guatemaltecos produjeron los menores cantidades de este ácido graso (entre 2.5 y 3.2 %).

*P. schiedeana* tenía un nivel alto de este compuesto (7.8%), y anteriormente Joaquín-Martínez *et al.* (2007) reportaron valores desde 7.2 hasta 14.4. Sin embargo, Cruz-Castillo *et al.* (2007) indicaron valores por debajo de 4.5 %. Igualmente algunos de los antillanos presentaron valores por arriba del 7 %, sin embargo, en ‘Barker’ reportado por Galvao *et al.* (2014) se presentó poco más de 4 % de este compuesto. En la raza mexicana hay valores de más 5 % y hasta 8.21 %, que fue el más alto para los genotipos analizados (‘Pequeño Charly’). En ‘Hass’ se han reportado diferentes valores que van desde 6.5 % hasta 11.2 % (Meyer y Terry, 2008; Ortíz-Moreno *et al.*, 2003; Ozdemir y Topuz, 2004; Takenaga *et al.*, 2000; Carvajal *et al.*, 2014 y Salas *et al.*, 2000), intervalo en el cual se encuentra lo obtenido en este estudio. *P. nubigena* y dos de los genotipos guatemaltecos presentaron los niveles más bajos de ácido palmitoleico.



**Fig. V-6. Contenido de ácido palmitoleico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido *trans*-13-octadecenoico es estructuralmente similar al ácido oleico, con la diferencia de la configuración *trans*-, y el lugar de la insaturación. Este compuesto también está presente en aguacate (Fig. V-7), pero su nivel es bajo. Se presenta en todos los genotipos con variaciones entre 2 y 5 %, presentando el mayor contenido en los genotipos de raza mexicana, y el menor en *P. schiedeana*.

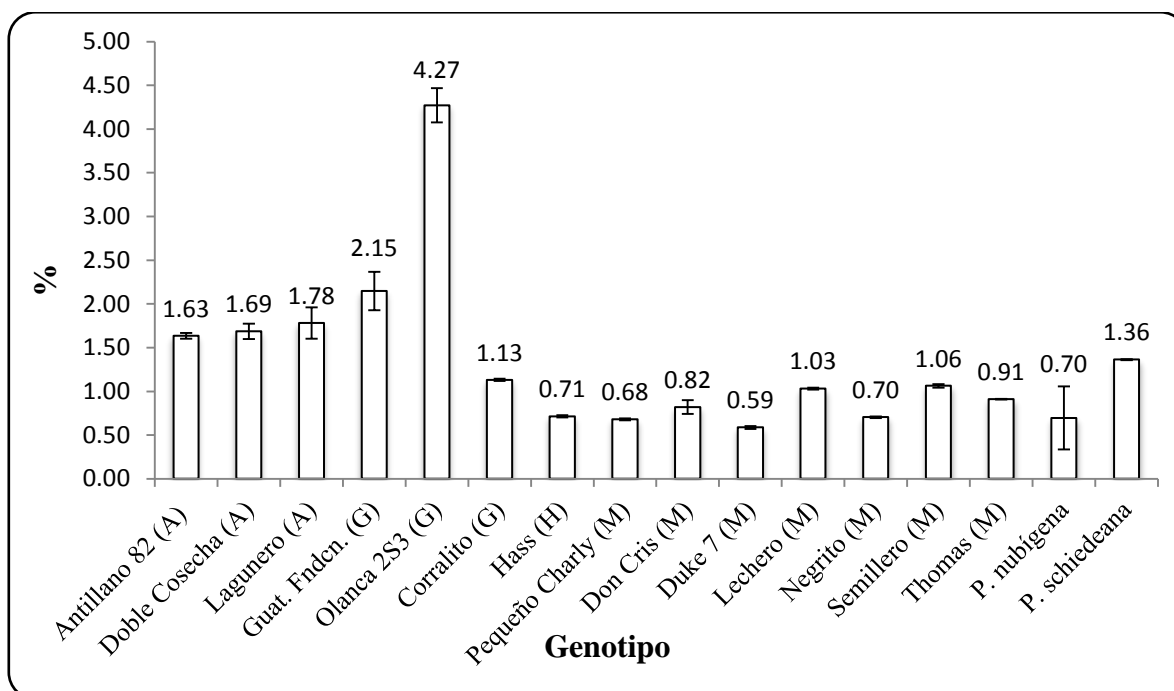


**Fig. V-7. Contenido de ácido *trans*-13-octadecenoico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido esteárico, ácido graso saturado, es un componente menor en la mayoría de las plantas, pero su presencia en animales y hongos es considerable (Rustan y Drevon, 2005). Está presente en el aceite de pulpa de aguacate, pero su contenido es muy bajo. En la mayoría de los genotipos se encuentra en menos de < 1 % como es el caso de la mayoría de los mexicanos, ‘Hass’ y *P. nubigena*. Los genotipos de raza guatemalteca y antillana fueron los que presentaron los niveles más altos de este compuesto, sobresaliendo ‘Olanca 2S3’ con más del 4 % (Fig. V-8). Los resultados coinciden con otros estudios que encontraron que el ácido esteárico estuvo presente en porcentajes menores al 1 % o (o incluso ausente) para ‘Hass’ (Meyer y Terry, 2008; Ortiz-Moreno *et al.*, 2003; Ozdemir y Topuz, 2004;

Takenaga *et al.*, 2000; Carvajal *et al.*, 2014 y Salas *et al.*, 2000) y ‘Fuerte’ (Ozdemir y Topuz, 2004; Boga *et al.* 2001).

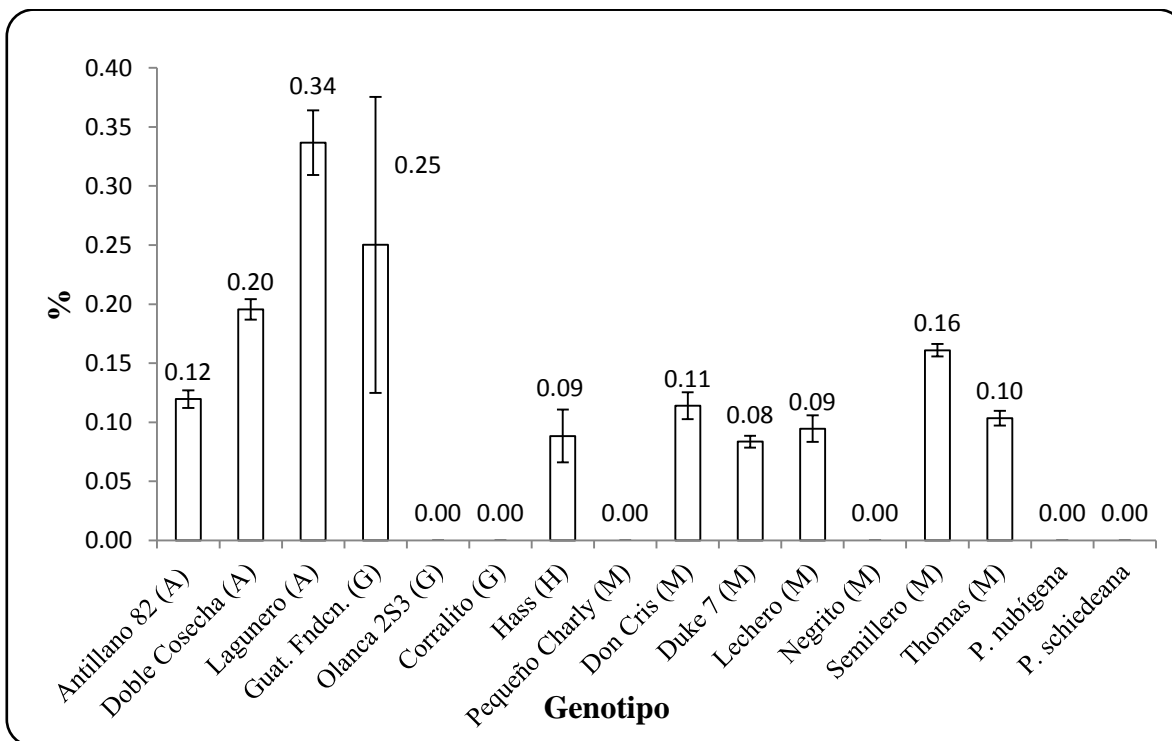
Los genotipos que presentaron valores por arriba del 1 % fueron los antillanos, los guatemaltecos y *P. schiedeana*. En otro estudio, la variedad antillana ‘Barker’ presentó 2.25 % de este ácido graso (Galvao *et al.*, 2014).



**Fig. V-8. Contenido de ácido esteárico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

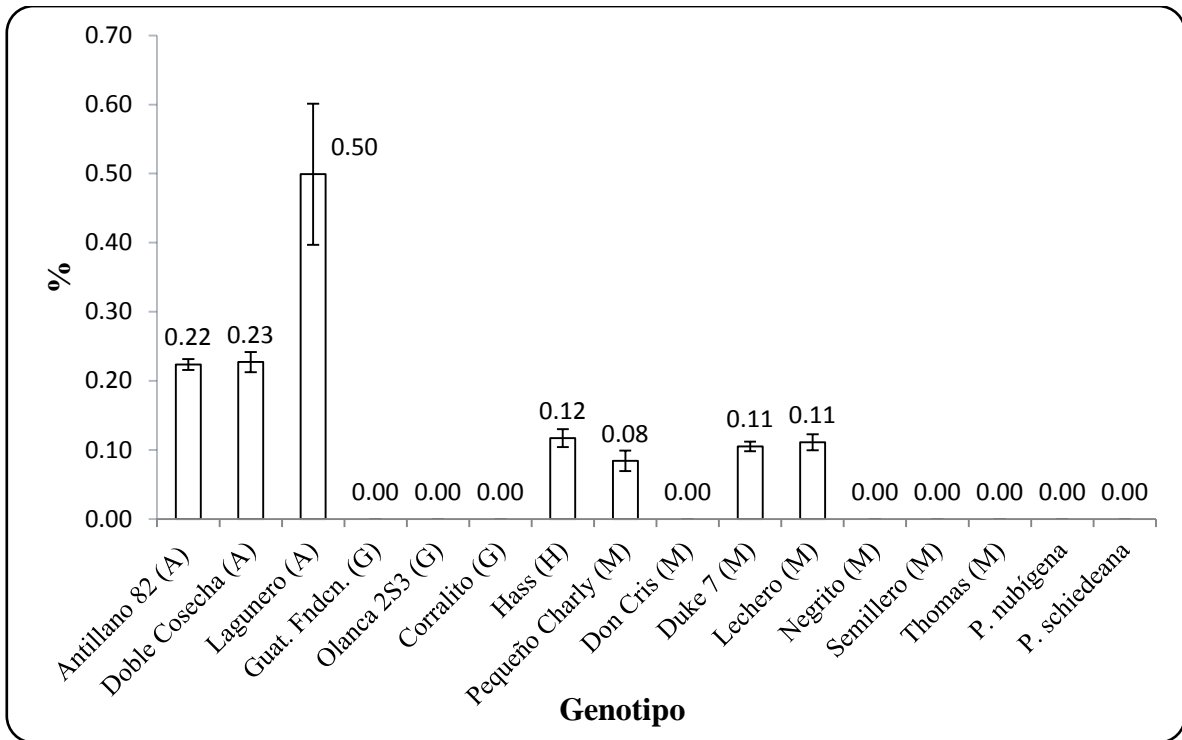
Además de los ácidos grasos conocidos del aguacate, el ácido oleico, el palmítico, el linoleico y el palmitoleico, también se encontraron otros ácidos grasos que son nuevos reportes para esta especie: el ácido docosanoico (behénico), el ácido lignocérico, el ácido araquídico, el ácido mirístico y el ácido 9-metil-eicosanoico (Figs. V-9, V-10, V-11, V-12 y V-13, respectivamente). Todos ellos estaban en cantidades muy bajas (< 1 %), incluso no presentándose en algunos genotipos, por lo que no resultan tan relevantes en la propiedades del aceite de aguacate como los ácidos grasos principales, pero es relevante mencionarlos. En general se observa que el contenido de aceite y la composición de ácidos grasos es altamente variable entre genotipos. Para los genotipos ya conocidos se encontraron datos similares, por lo general, considerando que el grado de maduración y factores ambientales también pueden influir en los aceites, y que los genotipos no son completamente

homogéneos. Pero, se muestra que existe un amplio acervo de germoplasma para obtener aceites de diferentes tipos y composiciones, y para usarlas en el mejoramiento.

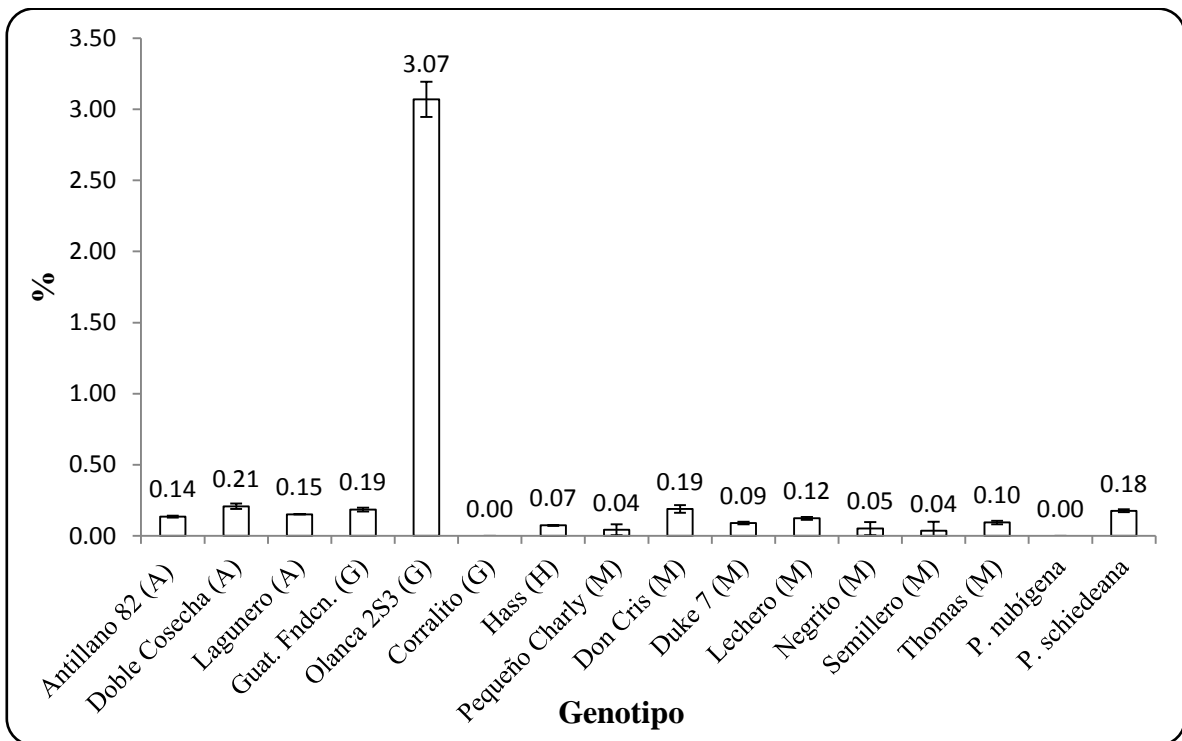


**Fig. V-9. Contenido de ácido docosanoico (behénico) de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

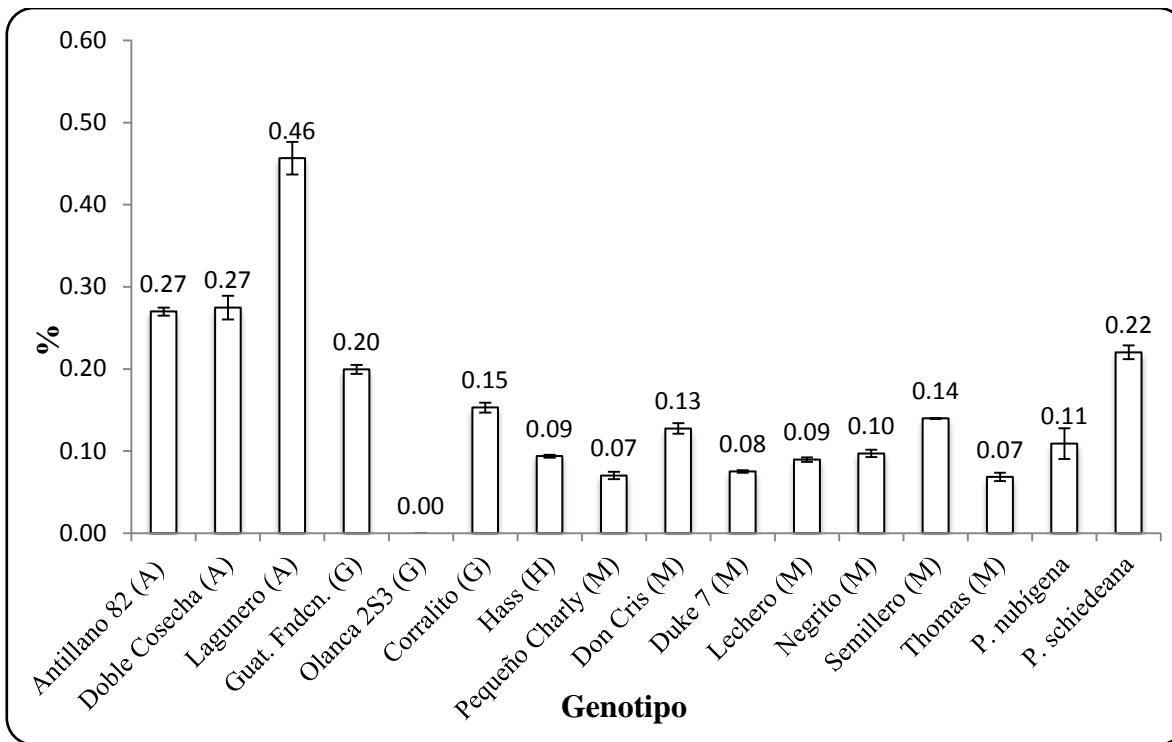




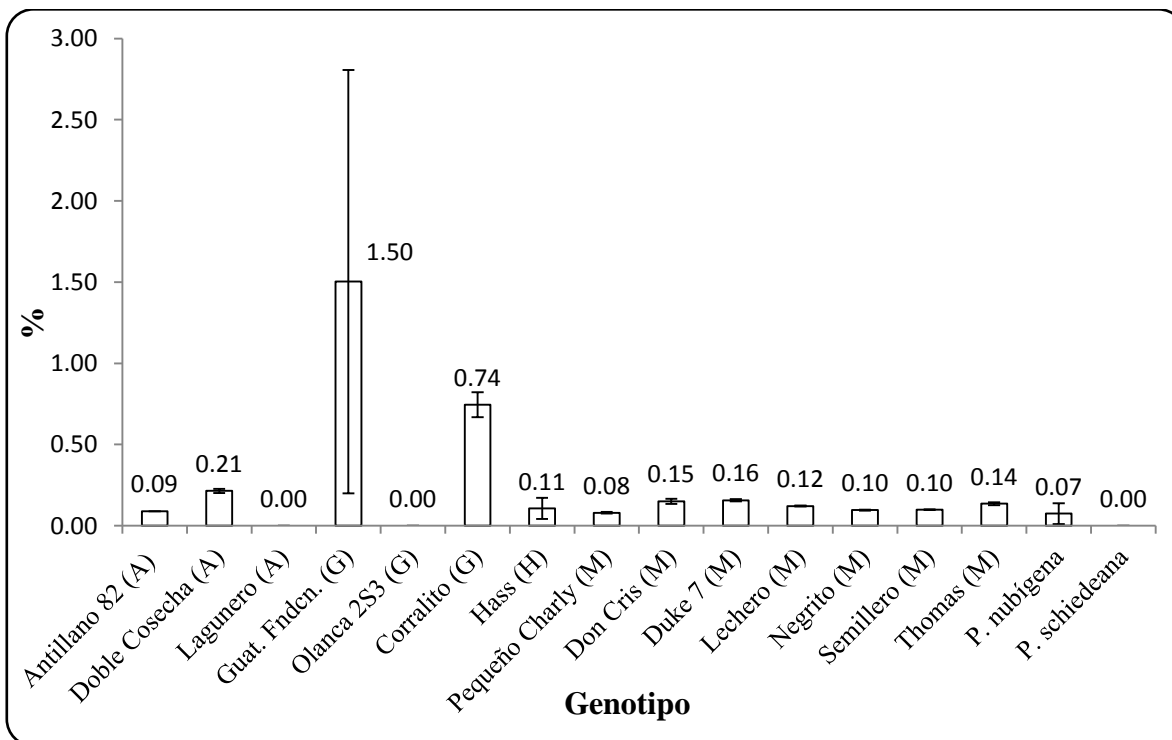
**Fig. V-10. Contenido de ácido lignocérico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**



**Fig. V-11. Contenido de ácido araquídico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**



**Fig. V-12. Contenido de ácido mirístico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

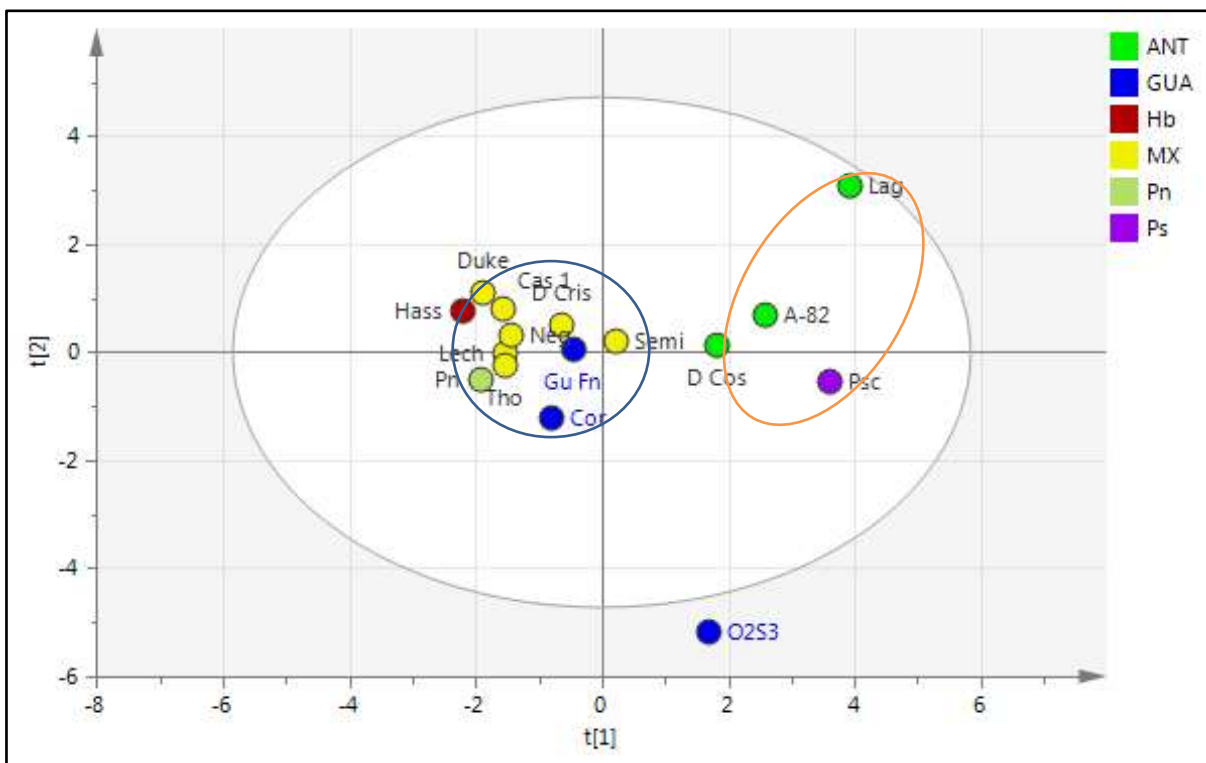


**Fig. V-13. Contenido de ácido 9-metil-eicosanoico de aceite de pulpa de aguacate (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

### 5.5.1.2. Análisis de Componentes Principales (pulpa de aguacate)

En el análisis de componentes principales a partir de los datos de los ácidos grasos se obtuvo un modelo de 8 componentes que explicó 99.9 % de la varianza, con los primeros tres componentes explicando casi el 80 % de tal variación (79.2 %).

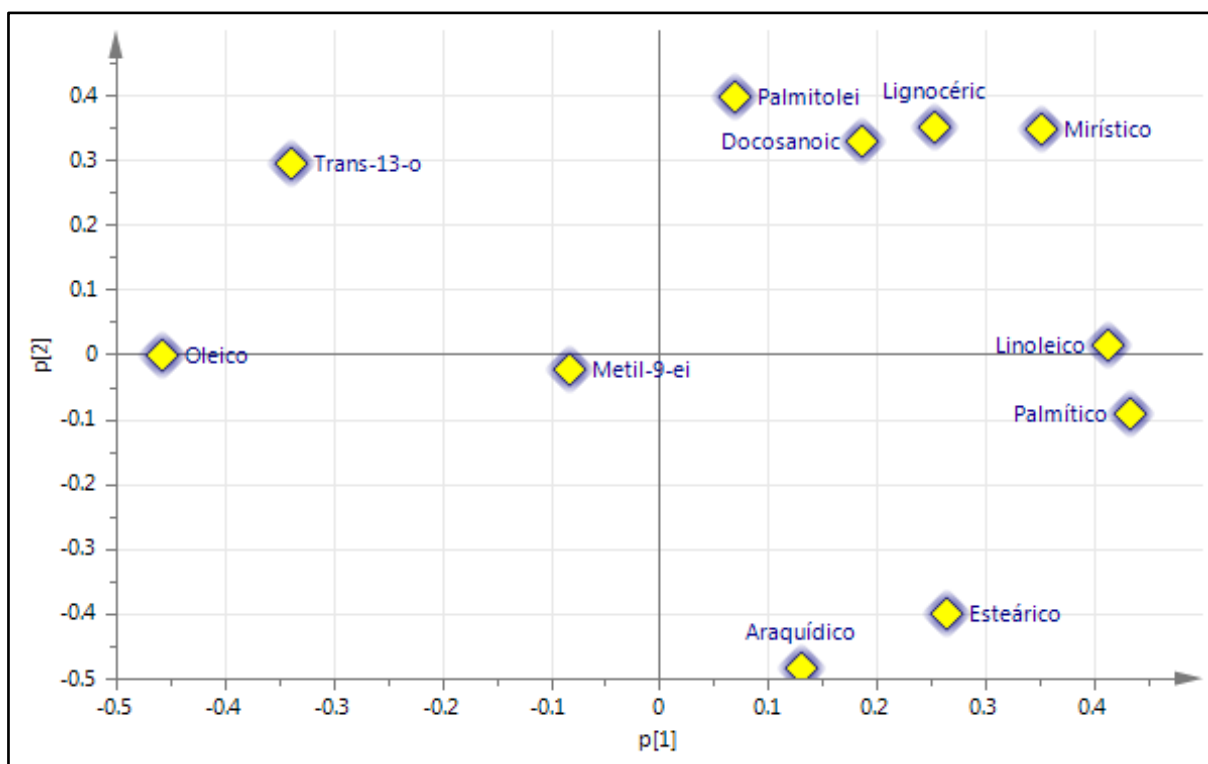
Las razas antillana y *P. schiedeana* tienden a separarse del resto de las razas y genotipos analizados (Fig. V-14). La raza mexicana, la guatemalteca, ‘Hass’ y *P. nubigena* tienden a agruparse, a excepción de ‘Olanca 2S3’ (raza guatemalteca).



**Fig. V-14. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por análisis de componentes principales de acuerdo a la composición de ácidos grasos del aceite de pulpa de aguacate. Los colores indican las razas y especies analizadas (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = Mexicana; Pn = *P. nubigena*; Ps = *P. schiedeana*). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos.**

La clara distinción de las razas antillana y *P. schiedeana* se basa en su contenido de los ácidos palmítico, linoleico y mirístico (Fig. V-15), mientras que las razas mexicana, guatemalteca, ‘Hass’ y *P. nubigena* se diferencian por su contenido de ácido oleico y *trans*-13-octadecenoico. Por último, ‘Olanca 2S3’ (raza guatemalteca) destaca por su contenido de ácido araquídico y esteárico.

Con base a estos resultados y, como se había mencionado, cuando un genotipo tiene bajo contenido de ácido oleico, tiende a caracterizarse por la presencia de los ácidos linoleico y palmítico, como es el caso de la raza antillana y *P. schiedeana*, según los datos presentados. Mientras que, contrariamente, los genotipos con alto contenido de ácido oleico presentan bajos niveles de ácido linoleico y niveles moderados de ácido palmítico.

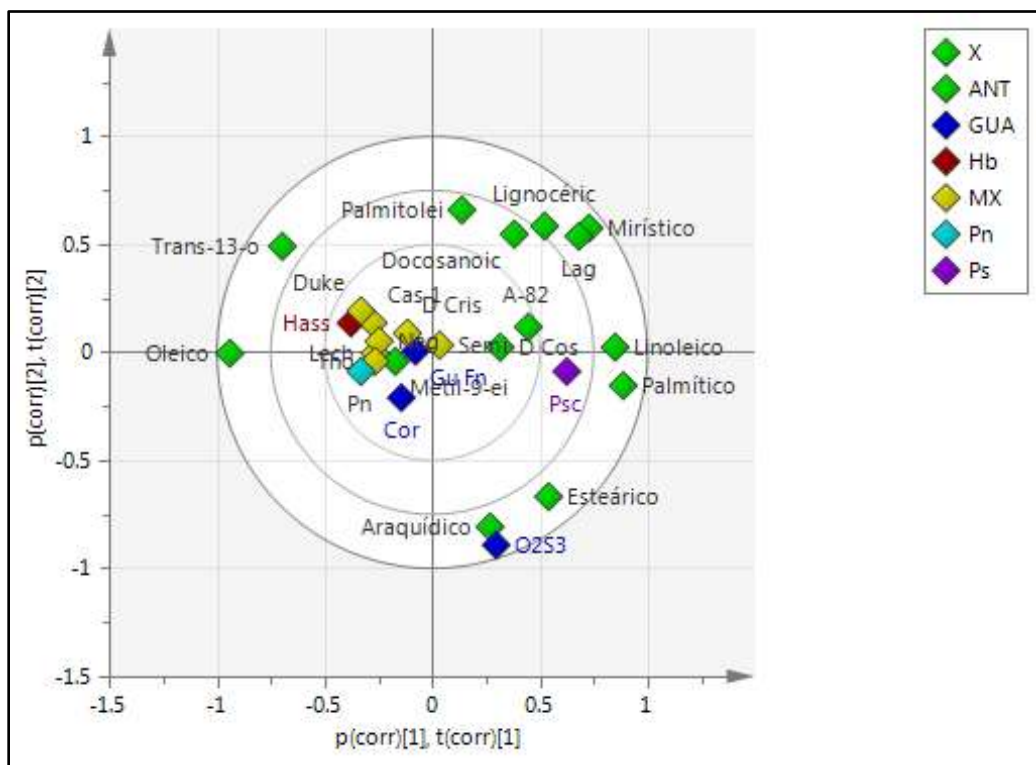


**Fig. V-15. Gráfico de dispersión de las variables (ácidos grasos) de acuerdo al ACP de aceite de pulpa de aguacate. Este gráfico se compara con el gráfico de distribución de razas (Fig. 14) para determinar que variables (ácidos grasos) son característicos de las razas y especies analizadas.**

En la Fig. V-16 se representa de manera más clara la distribución de los genotipos y las variables que los caracterizan. Se puede confirmar que los genotipos de la raza antillana ('Lagunero', 'Antillano 82' y 'Doble Cosecha', además de *P. schiedeana*) se caracterizan por contener ácido palmítico, ácido linoleico y ácido mirístico, además de otros ácidos de menor presencia.

El resto de los genotipos, a excepción de 'Olanca 2S3', se agrupan y distinguen por su contenido de ácido oleico y ácido *trans*-13-octadecenoico, además del presencia, en menor

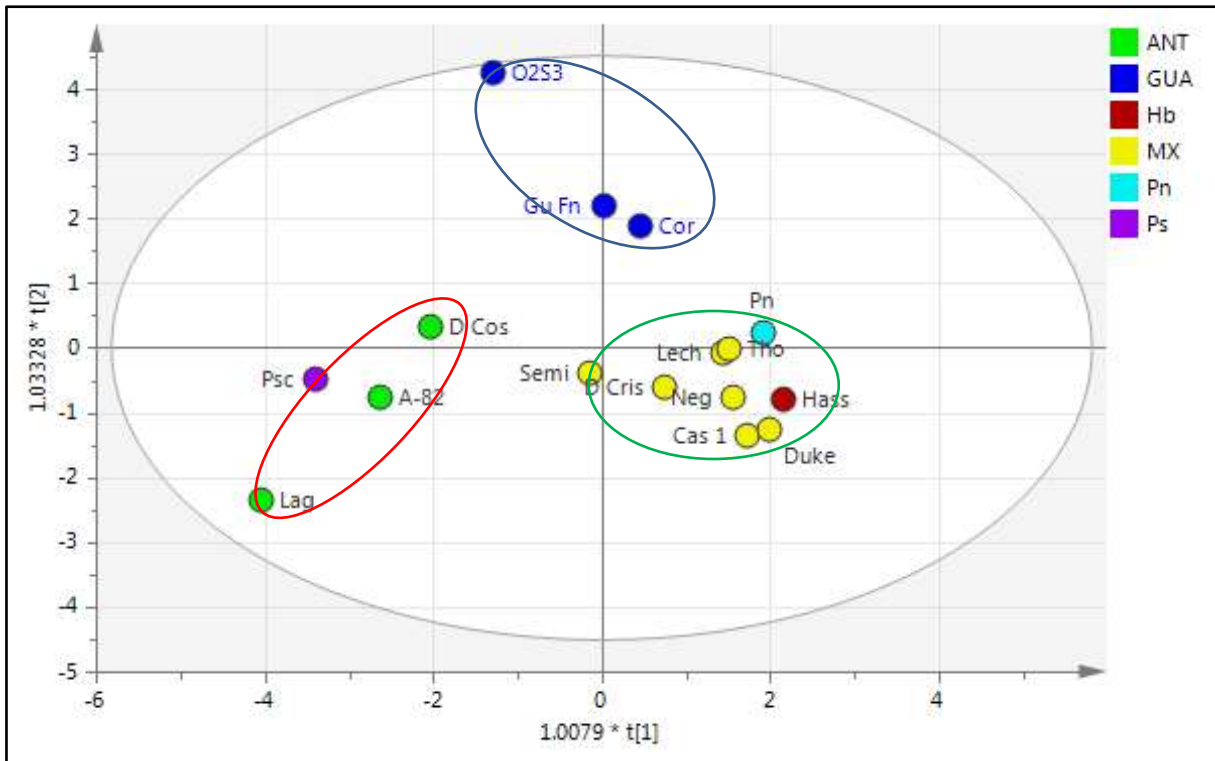
proporción del ácido metil-9-eicosanoico, el cual no se encontró en algunos genotipos antillanos ni en *P. schiedeana*. Los ácidos araquídico y esteárico ayudan a caracterizar a ‘Olanca 2S3’.



**Fig. V-16. Gráfico de dispersión de los genotipos y los ácidos grasos de aceite de pulpa de aguacate analizados en el análisis de componentes principales. X (verde) representa a los ácidos grasos. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = *P. nubigena*; Ps = *P. schiedeana*). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos**

### 5.5.1.3. Análisis discriminante

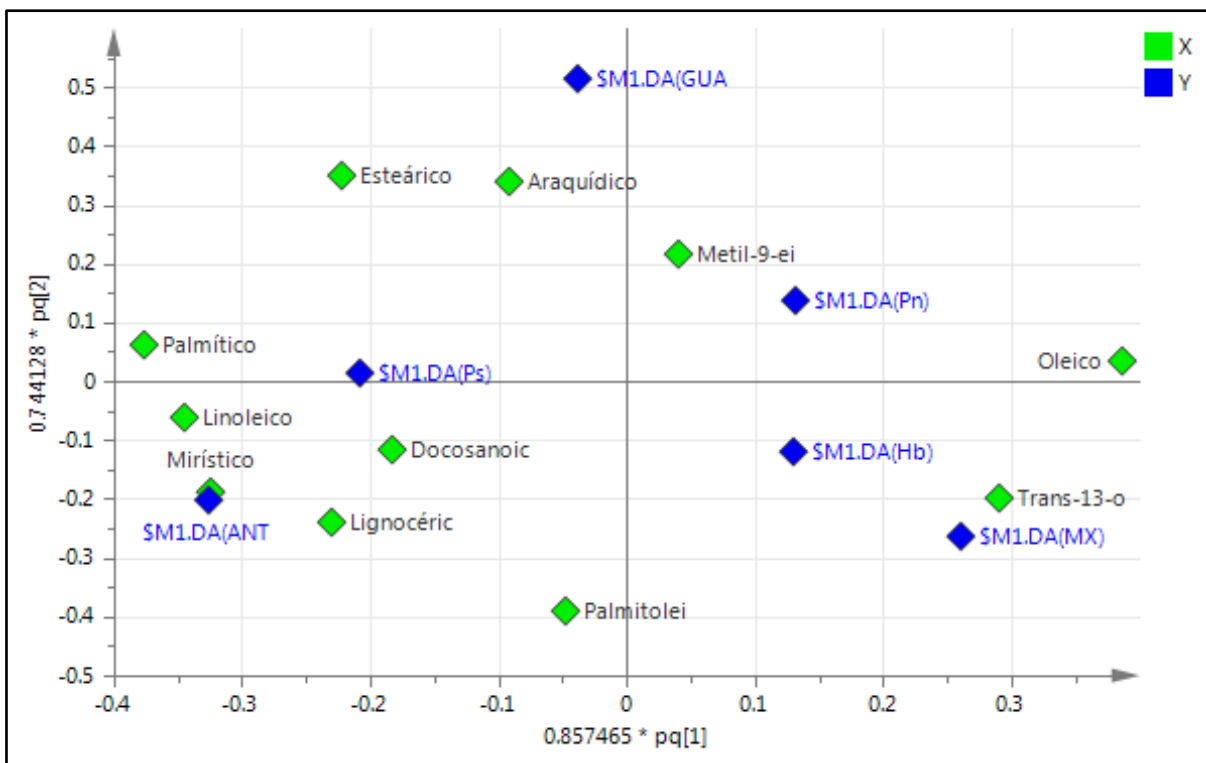
El análisis discriminante confirmó las agrupaciones de los componentes principales. Se puede observar la clara separación de grupo. La raza antillana y *P. schiedeana* comparten similitudes en cuanto a su composición de ácidos grasos en aceite de pulpa. Igualmente, la raza mexicana, ‘Hass’ y *P. nubigena* se agrupan compartiendo similitudes que más adelante se discutirán (Fig. V-17). En este análisis, la raza guatemalteca forma su propio grupo, pero dos de sus genotipos, ‘Guatemalteco Fundación’ y ‘Corralito’, comparten ciertas similitudes con los genotipos mexicanos, con ‘Hass’ y *P. nubigena*.



**Fig. V-17. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate, resultado del análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = *P. nubigena*; Ps = *P. schiedeana*). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos**

La raza antillana se caracteriza por la presencia de los ácidos mirístico, linoleico, palmítico, lignocérico y docosanoico, mientras que *P. schiedeana* también se caracteriza por la presencia todos estos compuestos (Fig. V-18). La raza guatemalteca está claramente diferenciada por la presencia del ácido araquídico y del esteárico, además del ácido 9-metil-eicosanoico; cabe recordar que esta raza también presenta como característica la presencia del ácido oleico.

*P. nubigena* además de presentar buenos niveles de ácido oleico, también se distingue por la presencia del ácido 9-metil-eicosanoico, mientras que ‘Hass’ y la raza los genotipos de la raza mexicana se distinguen por su contenido de ácido oleico y ácido *trans*-13-octadecenoico. El ácido palmitoleico estuvo presente en todas los genotipos, pero a diferencia de otros no mostró una clara tendencia en cuanto a su contenido, es decir variaba bastante incluso dentro de razas, por lo que no representa una característica propia de alguna de las razas o especies analizadas.



**Fig. V-18. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate y variables mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. Y = raza o especie (clasificación); X = variables (ácidos grasos)**

## 5.5.2. Cáscara

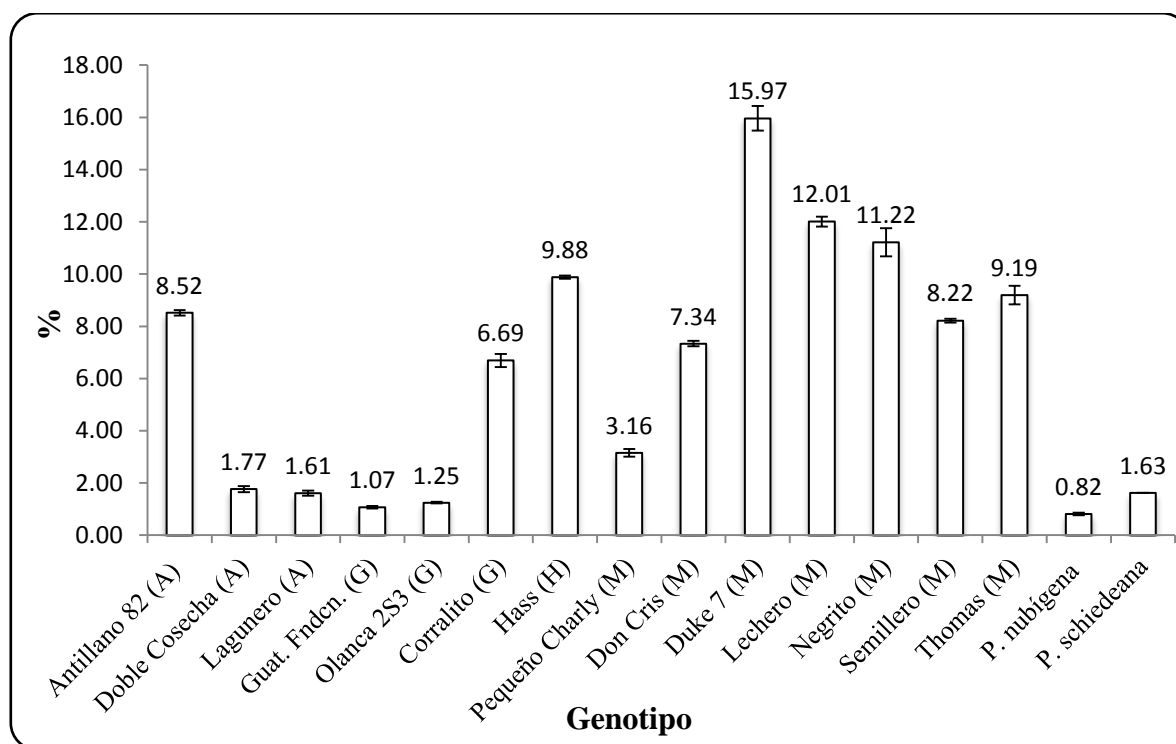
### 5.5.2.1. Perfil de ácidos grasos

En esta parte del estudio se muestra el contenido de aceite de la cáscara y su composición de ácidos grasos, lo cual es importante conocer para determinar qué tipo de compuestos de esta naturaleza se están consumiendo y si estos representan algún beneficio o daño a la salud. No existen antecedentes en cuanto al contenido de aceite y ácidos grasos de la cáscara de ningún genotipo de aguacate, por lo que resulta relevante conocer estos resultados.

Como sabemos la pulpa de aguacate se caracteriza por su contenido de aceite y ácidos grasos, lo cual no es una característica importante para la cáscara, pero que, sin embargo, podría ser destacable su composición. De manera general se observó un contenido de aceite relativamente bajo en todos los genotipos si lo comparamos con la pulpa (Fig. V-19). La raza mexicana es la que presenta mejores niveles de aceite en la cáscara con valores desde

7% hasta casi 16 %, a excepción de ‘Pequeño Charly’ con apenas 3 %. ‘Hass’ presenta un contenido moderado, llegando casi al 10 %. ‘Antillano 82’ (raza antillana) presenta un nivel moderado de aceite al igual que ‘Corralito’ (raza guatemalteca), lo que difiere del resto de los genotipos de ambas razas cuyos valores oscilan entre el 1 % y menos de 2 %. Las especies afines igualmente no se distinguen por el contenido de aceite en la cáscara pues ambas, *P. nubigena* y *P. schiedeana*, ronda apenas el 1 %.

Cómo podemos ver, el contenido de aceite de la cáscara de genotipos de la raza mexicana es en general el más alto comparado con el resto de las razas y especies. Esto podría representar un beneficio a la salud humana, dependiendo del tipo de ácidos grasos que contenga, lo cual se describirá más adelante.

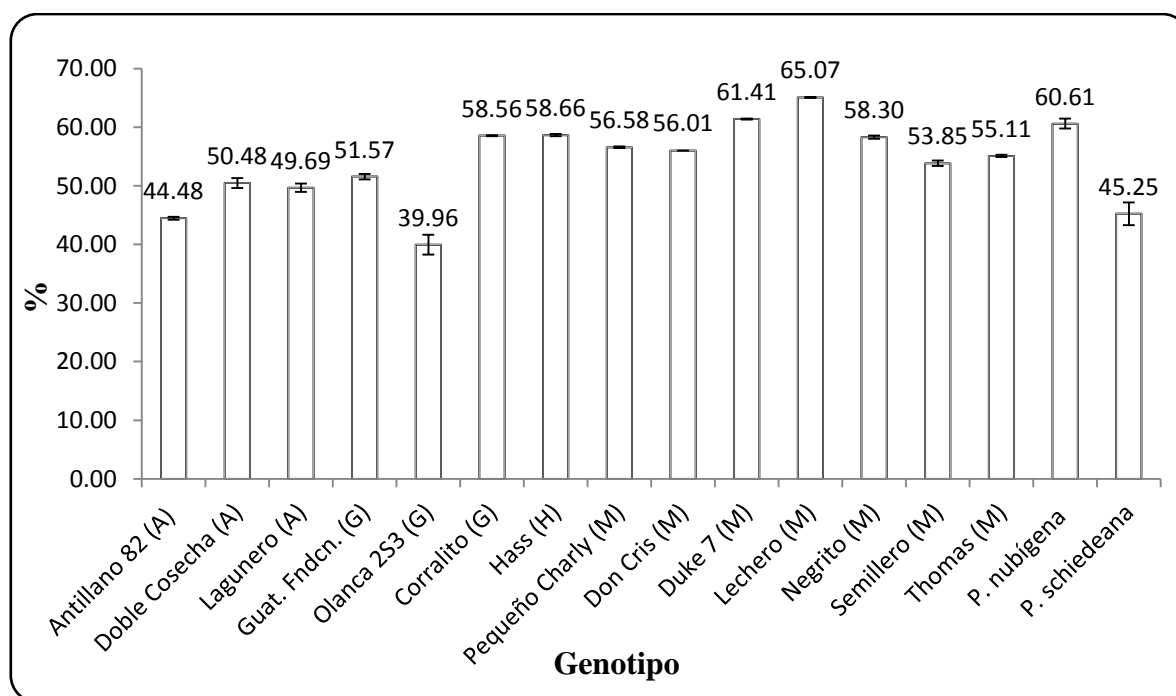


**Fig. V-19. Contenido de aceite de cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido oleico es el ácido graso más predominante en la pulpa de aguacate, pero en la cáscara no se conoce su contenido. Se encontró en este estudio que de manera general los genotipos de la raza mexicana son los que presentan el mayor contenido con valores que van desde 53 hasta 65 % (Fig. V-20). *P. nubigena* igualmente presenta un valor alto (más



de 60 %), mientras que *P. schiedeana* tiene un moderado contenido con aproximadamente 45 %. Los genotipos antillanos y guatemaltecos presentan niveles similares entre ellos, los cuales van desde alrededor de 39 % ('Olanca 2S3', el más bajo) hasta poco más de 51 %. Se destaca 'Lechero' como el que más ácido oleico contiene, con más de 65 %.

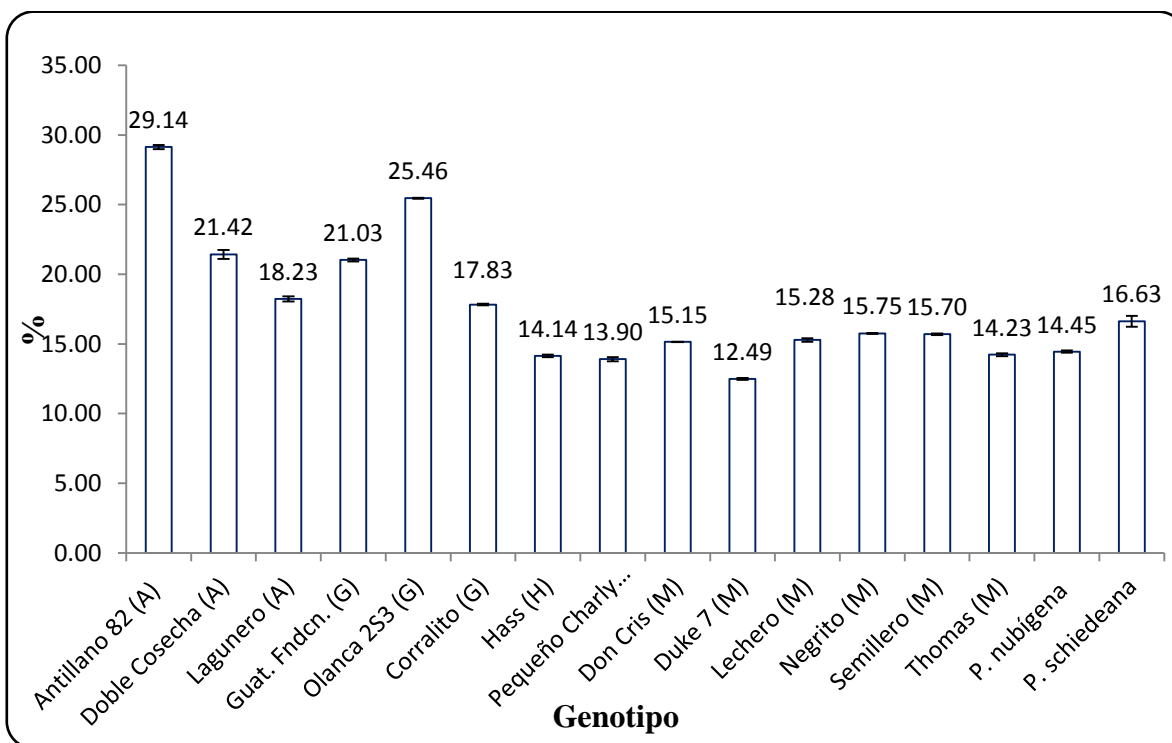


**Fig. V-20. Contenido de ácido oleico de cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

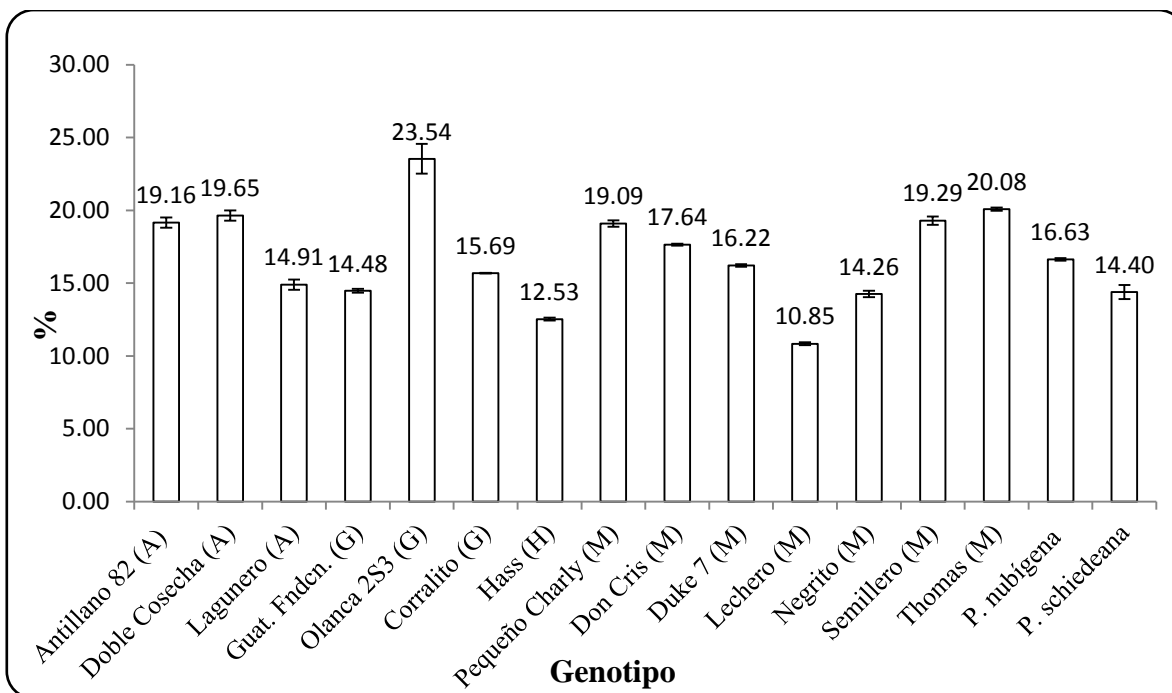
El ácido palmítico también está presente en la cáscara del aguacate. Las razas antillanas y guatemaltecas presentan los más altos porcentajes de este ácido grasos con valores que van desde el 17 % hasta el casi el 30 %. El genotipo 'Antillano 82' es el que presenta el mayor valor con 29.1 %. Los genotipos mexicanos, 'Hass', y las especies afines presentan valores muy similares sin grandes fluctuaciones que se encuentran entre poco más de 12 % y casi 17 %. El genotipo 'Duke 7' de la raza mexicana es el que presentó el menor contenido de ácido palmítico con 12.5 % (Fig. V-21).

No se presentó una clara tendencia en cuanto al contenido de ácido linoleico, es decir, no fue característico de alguna raza, sin embargo, sus niveles fueron importantes. Destacó 'Olanca 2S3' (guatemalteco) con 23.5 % como el de mayor contenido y 'Lechero'

(mexicano) como el de más baja presencia de este ácido graso (10.9 %). El resto de los genotipos y especies afines mostró niveles entre el 12 y 20 % (Fig. V-22).

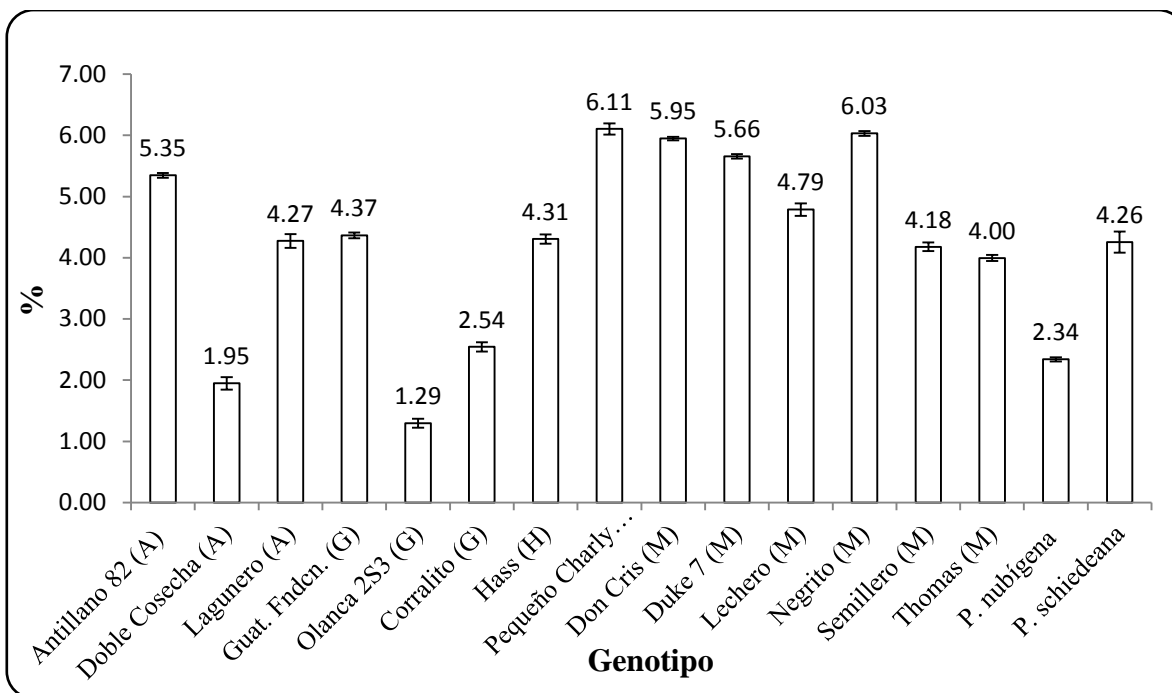


**Fig. V-21. Contenido de ácido palmítico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**



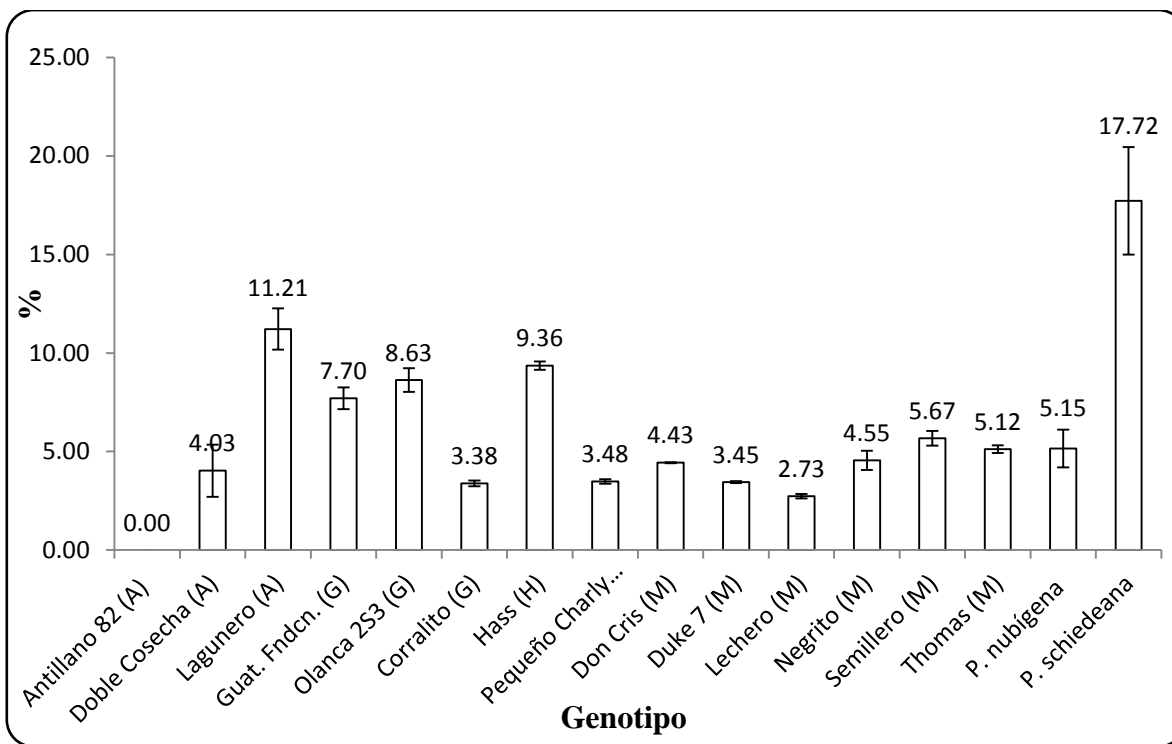
**Fig. V-22. Contenido de ácido linoleico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido palmitoleico, como se vio en el aceite de pulpa, está presente en concentraciones bajas en comparación con los ácidos grasos más comunes. En cáscara su contenido es muy similar al de pulpa, es decir, con valores muy variables entre los genotipos, y sin mostrar una tendencia en alguna de las razas o especies afines (Fig. V-23). Al igual que en pulpa, sus porcentajes no rebasan el 10 %. El genotipo que mayor contenido presentó era ‘Hass’ con poco más del 6 %, junto con ‘Negrito’. Todos los genotipos de la raza mexicana oscilaron entre 4 y 6 %. En los antillanos, el genotipo ‘Doble Cosecha’ (raza antillana) estuvo por debajo del 2 %, al igual que ‘Olanca 2S3’ de la raza guatemalteca, mientras que el resto de genotipos de estas dos razas presentaron niveles entre 2 y poco más de 5 %. *P. nubigena* y *P. schiedeana*, igualmente, presentaron niveles semejantes a la raza antillana y guatemalteca.



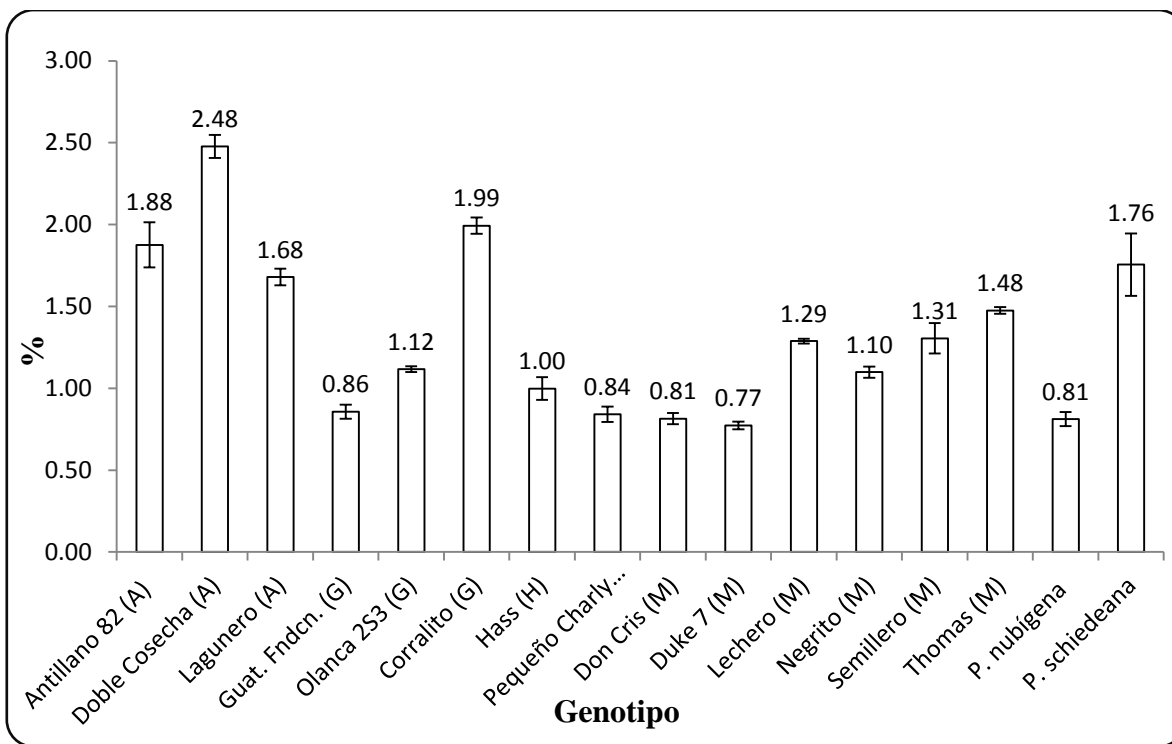
**Fig. V-23. Fig. 23. Contenido de ácido palmitoleico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

Otro de los ácidos grasos que pudiesen ser importantes debido a la insaturación que presenta y a su parecido estructural con el ácido oleico, es el ácido *cis*-vaccénico. Este compuesto no se presentó en pulpa, sin embargo, en cáscara su contenido estuvo al nivel (o superior) que el ácido palmitoleico (otro ácido graso insaturado) (Fig. V-24). En este caso *P. schiedeana* se destaca del resto en cuanto al contenido de este ácido graso, alcanzando casi 18 %. El resto de los genotipos oscila entre el 4 y poco más de 11 %. Otro genotipo que resalta con un contenido moderado de ácido *cis*-vaccénico es el ‘Lagunero’ (antillano), al igual que ‘Hass’, ‘Guatemalteco Fundación’ y ‘Olanca 2S3’ con valores que oscilan entre el 7.7 % y más de 9 %. Los genotipos que más bajos niveles presentaron fueron los mexicanos y *P. nubigena*, los cuales, en su mayoría, fluctuaron entre poco menos de 3 % y poco más de 5 %. Se presentó un caso excepcional en el que no estuvo presente este compuesto con el genotipo ‘Antillano 82’.



**Fig. V-24. Contenido de ácido *cis*-vaccénico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

El ácido iso-esteárico es otro de los ácidos grasos que en pulpa de aguacate no se ha encontrado. Sin embargo, en cáscara estuvo presente en bajas proporciones, incluso por abajo del 1 % en algunos genotipos. Los valores de todos los genotipos oscilaron entre el 0.8 % y casi 2.5 %. ‘Doble Cosecha’ fue el que mayor contenido presentó. Varios genotipos además de *P. nubigena* y ‘Guatemalteco Fundación’ tenían menos de 1 % (Fig. V-25).



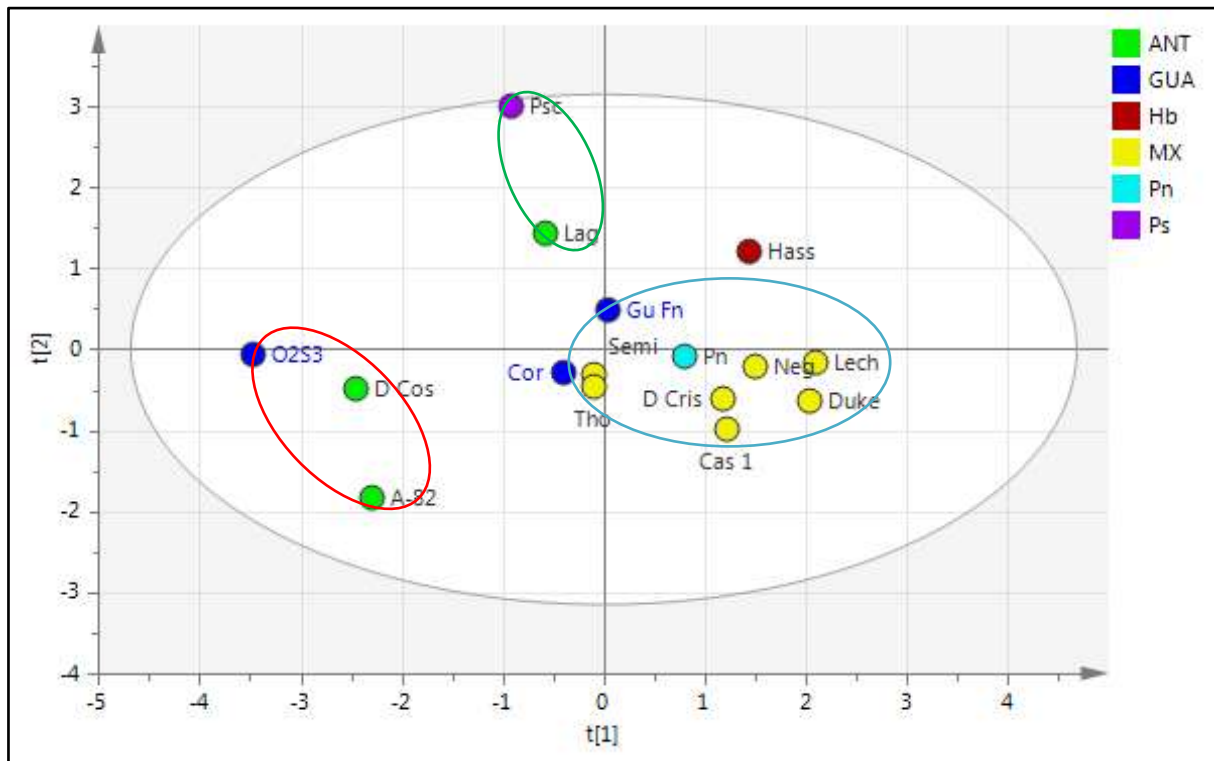
**Fig. V-25. Contenido de ácido iso-esteárico en cáscara de aguacate y especies afines (promedio y desviación estándar; tres repeticiones)**

### 5.5.2.2. Análisis de componentes principales

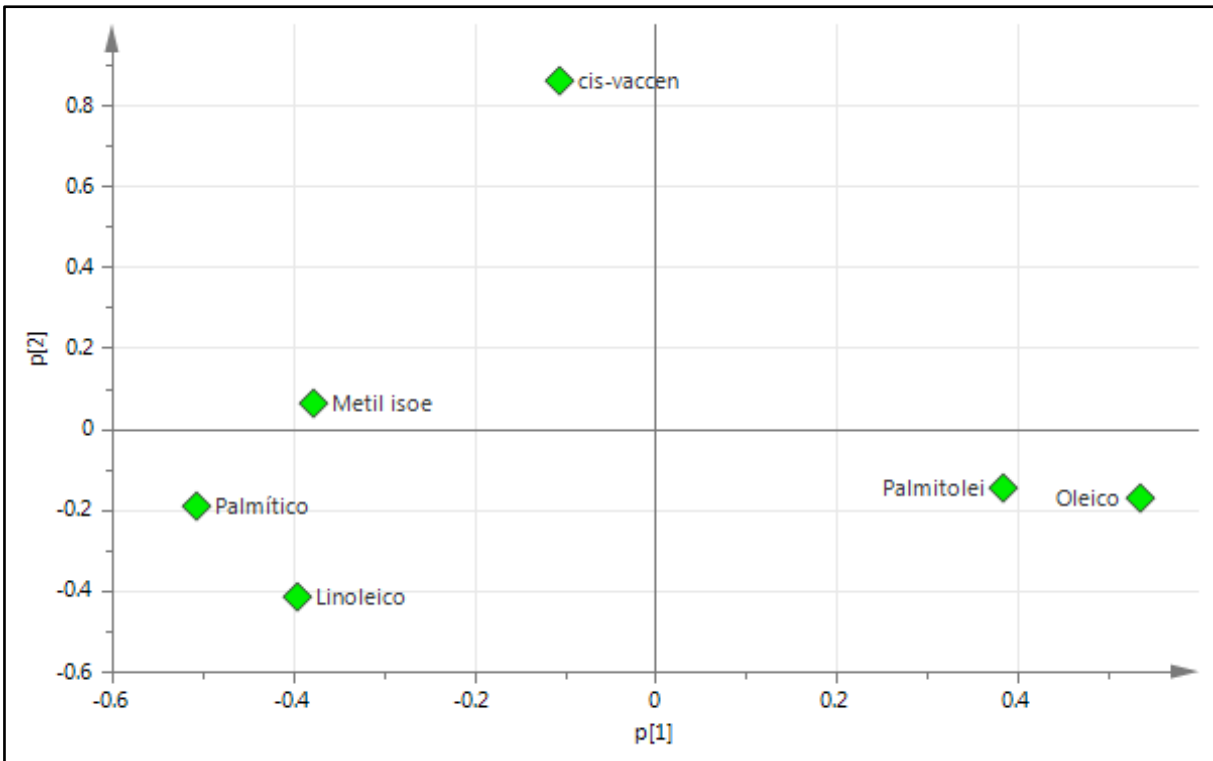
En el análisis de componentes principales, un modelo de 4 componentes explicó 93.6 % de la varianza, con los primeros 2 componentes explicando el 66 % de tal variación; con tres componentes se explicó el 81 % de la variabilidad.

Los genotipos de la raza mexicana tienden a agruparse en el centro del gráfico, junto con algunos genotipos guatemaltecos como lo son ‘Corralito’ y ‘Guatemalteco Fundación’, además de *P. nubigena* y ‘Hass’ (Fig. V-26). Los genotipos antillanos, ‘Doble Cosecha’ y ‘Antillano 82’ presentan similitudes con ‘Olanca 2S3’. ‘Lagunero’ y *P. schiedeana* tienden a separarse del resto, presentando alguna característica particular que los distingue del resto.

Se encontró claramente que lo que distingue a ‘Lagunero’ y *P. schiedeana* es su contenido de ácido *cis*-vaccénico (Fig. V-27), mientras que los genotipos mexicanos, ‘Hass’, *P. nubigena*, ‘Guatemalteco Fundación’ y ‘Corralito’ se diferencian por su mayor contenido de ácido oleico y palmitoleico. Por último, los ácidos palmítico, linoleico e isoesteárico son característicos de los genotipos ‘Doble Cosecha’ y ‘Antillano 82’, además de ‘Olanca 2S3’ (todos de la raza antillana).



**Fig. V-26. Distribución de las razas de aguacate y especies afines por análisis de componentes principales de acuerdo a la composición de ácidos grasos del aceite de cáscara de aguacate. Los colores indican las razas y especies analizadas (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = *P. nubigena*; Ps = *P. schiedeana*). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos**

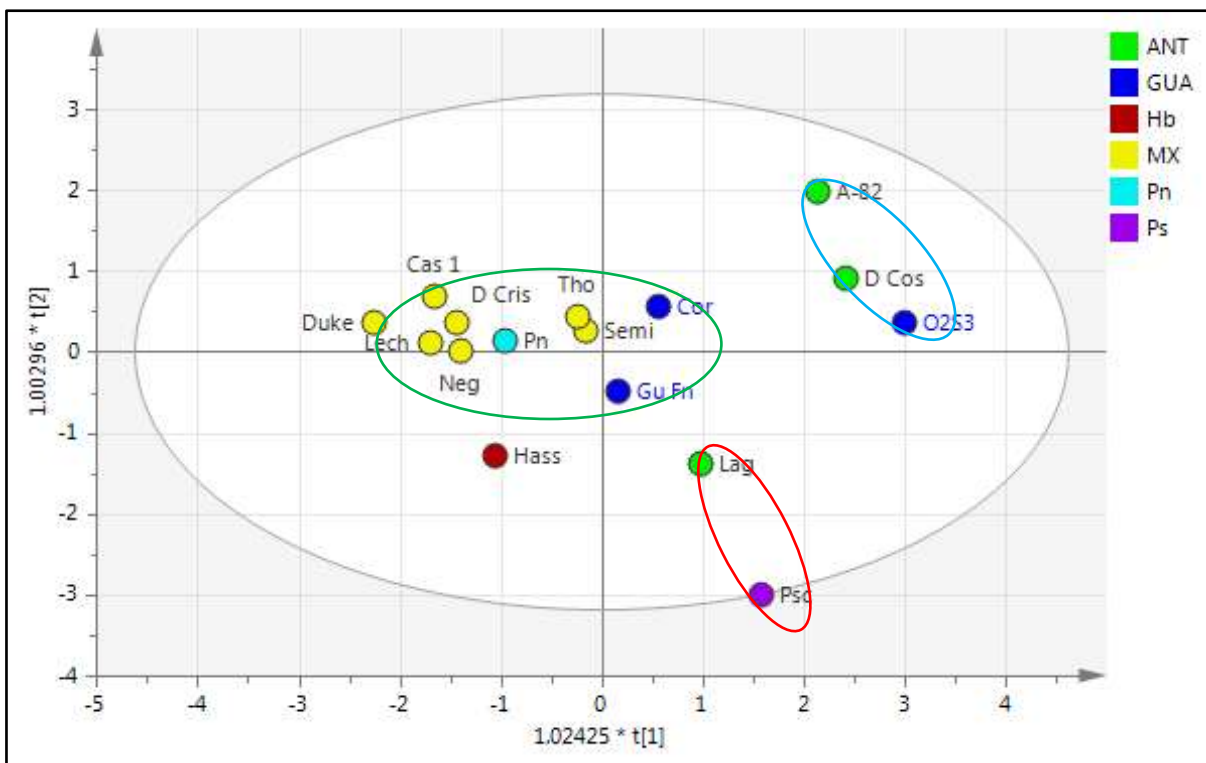


**Fig. V-27. Gráfico de dispersión de las variables (ácidos grasos) de acuerdo al análisis de componentes principales de cáscara de aguacate. Este gráfico se compara con el gráfico de distribución de razas (Fig. 26) para determinar que variables (ácidos grasos) son característicos de las razas y especies analizadas**

#### **5.5.2.2. Análisis discriminante (cáscara)**

El análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLSDA) nos muestra la tendencia de los genotipos mexicanos a agruparse con *P. nubigena*, ‘Hass’, y un par de genotipos guatemaltecos (‘Corralito’ y ‘Guatemalteco Fundación’). Los genotipos ‘Antillano 82’ y ‘Doble Cosecha’ forman un pequeño grupo con Olanca 2S3. Lagunero y *P. schiedeana* se separan del resto de los genotipos (Fig. V-28).

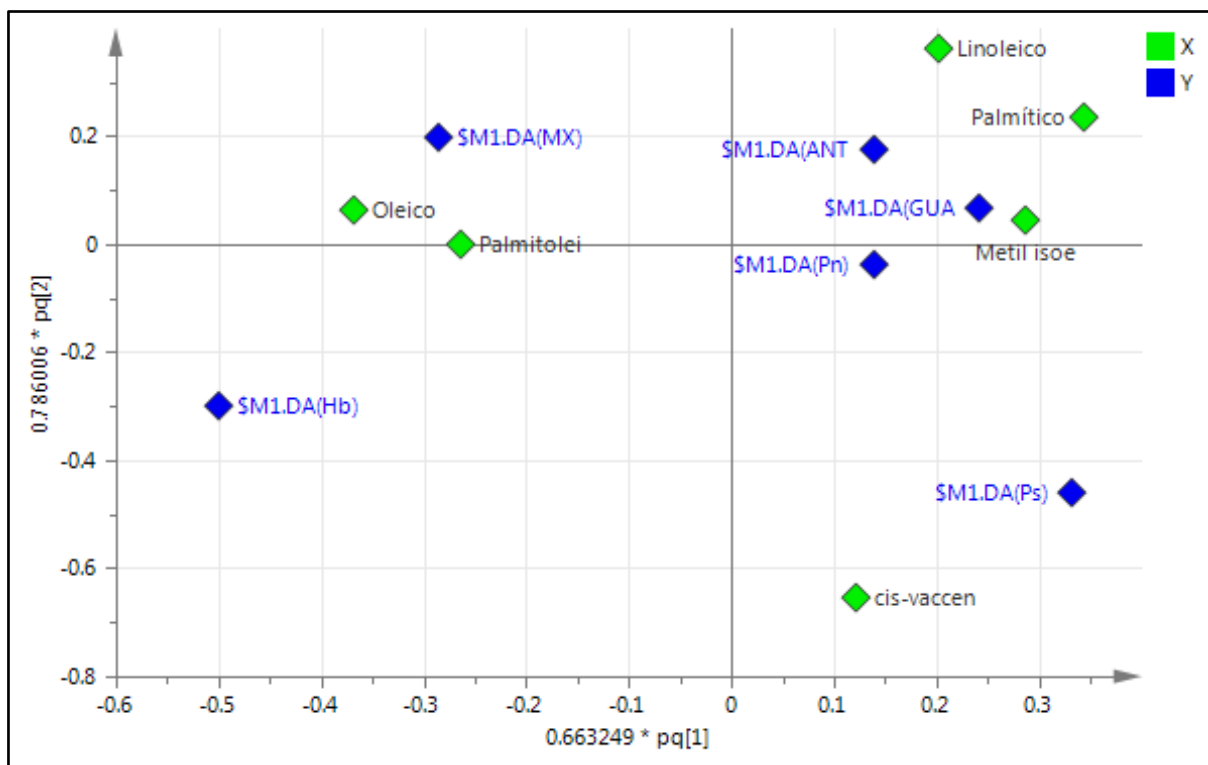




**Fig. V-28. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate, resultado del análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. (ANT = antillana; GUA = guatemalteca; Hb = Hass; MX = mexicana; Pn = *P. nubigena*; Ps = *P. schiedeana*). Los nombres dentro del gráfico indican los nombres de los genotipos**

En la Fig. V-29 se muestran las variables que están mayormente correlacionadas con las razas y especies estudiadas, lo cual nos indica que caracteriza a cada una de estas y si mantienen similitudes o diferencias respecto una de otra. La raza mexicana se caracteriza por el contenido de ácido oleico y palmitoleico, ‘Hass’ generalmente contiene altos niveles de estos mismos compuestos, lo cual se confirma en este estudio. *P. nubigena* contiene niveles más equilibrados en cuanto a los ácidos grasos más importantes como lo son el ácido oleico, el palmitoleico, el linoleico y el palmítico, de ahí su posición intermedia entre estas variables. La raza antillana se destaca por dos ácidos grasos importantes: ácido linoleico y ácido palmítico. La raza guatemalteca presenta mayor variabilidad entre sus genotipos, ya que algunos genotipos muestran buenos contenidos de ácido oleico, pero otros presentan buenas cantidades de ácido palmítico. Tales variaciones están relacionadas con las diferencias físicas de la cáscara de los genotipos guatemaltecos. Como mencionan Berg y Ellstrand (1986) y Knight Jr. (1999), no hay una tendencia en cuanto a este aspecto

de la raza guatemalteca, es decir, son diferentes. Finalmente, *P. schiedeana* se caracterizó por tener el mayor contenido de ácido *cis*-vaccénico y ser uno de los más bajos en ácido oleico, además de valores moderados de ácido palmítico.



**Fig. V-29. Gráfico de dispersión de los genotipos de aguacate y variables mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales. Y = raza o especie (clasificación); X = variables (ácidos grasos)**

Diversos estudios han pretendido distinguir o agrupar a las diferentes razas de aguacate y especies afines, y se han basado en caracteres morfológicos para elaborar análisis filogenéticos como Campos-Rojas *et al.* (2007) y Berg (1992), a la vez que también se han llevado estudios de tipo molecular para el mismo fin (Furnier *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1998; Fielder *et al.*, 1998; Mhameed *et al.*, 1997; Schnell *et al.*, 2003 y Ashworth y Clegg, 2003). Particularmente, Ashworth y Clegg (2003) y Schnell *et al.* (2003) reportan a través de microsatélites y con el método “Neighbor-Joining” una separación muy similar, en la que claramente los híbridos mexicanos y guatemaltecos se colocan justo entre estas razas, y la raza antillana y las especies de *Persea* (*P. schiedeana*) son las que más claramente se

separan, con algunas acercamientos entre *P. schiedeana* y la raza guatemalteca. En cuanto a estudios morfológicos, el resultado aquí mostrado sobre el acercamiento de *P. nubigena* y la raza guatemalteca concuerda con lo mostrado por Campos-Rojas *et al.* (2007) que mencionan la cercana relación entre *P. nubigena* y *P. guatemalensis*. El estudio de la composición de los ácidos grasos nos aporta información muy importante sobre las diferencias y similitudes entre razas y especies afines en cuanto a su composición, lo cual nos ayuda a corroborar los estudios que se han hecho basados en caracteres morfológicos y moleculares. Los resultados de estudio soportan de manera general las clasificaciones hechas anteriormente utilizando los caracteres mencionados.

En estudios con diferentes especies vegetales se han tomado como base a los ácidos grasos y compuestos de la misma naturaleza química para hacer clasificaciones taxonómicas. Alston y Turner (1963) (citado por Bagci, 2003) enfatizaron que se han hecho intentos para relacionar a los ácidos grasos directamente para solucionar problemas sistemáticos. Otros investigadores, como Aitzetmuller *et al.* (1999), Velasco y Goffman (1999) y Goffman *et al.*, (1999) han demostrado el potencial taxonómico de la evaluación de ácidos grasos en semillas en algunas familias de plantas. Este análisis puede ser útil en aguacate, pues los ácidos grasos son el componente químico más característico de esta especie. En un estudio en *Cannabis sativa*, la composición de ácidos grasos, tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8 fueron determinadas para determinar diferencias entre genotipos y tratar de obtener una significancia taxonómica en base a su composición (Bagci *et al.*, 2003).

Aunque el aceite no es un componente determinante en la cáscara, era importante determinar su composición pues esta estructura vegetal de algunos genotipos es consumida por la población. Como se mencionó anteriormente, se han llevado algunos estudios en cuanto a la composición de pigmentos, azúcares y compuestos fenólicos en la cáscara de aguacate en 'Hass' (Ashton *et al.* 2006; Liu *et al.*, 1999 y 2002; Kosinska *et al.*, 2012), la cual no es consumida, pero que podrían aislarse o extraerse para alguna aplicación principalmente para la mejora de alguna función del cuerpo. Ahora, con este estudio se podrá correlacionar el contenido de ácidos grasos de los distintos genotipos con el contenido de pigmentos y a la vez con alguna propiedad de estos en la salud, de ahí parte de

la importancia del conocer el contenido de ácidos en la cáscara de aguacate y especies relacionadas.

## 5.6. Conclusiones

Los resultados muestran que los genotipos de la raza mexicana representa la mejor opción para el consumo, por su contenido de aceite y composición de ácidos grasos en pulpa (principalmente ácido oleico). Pueden competir con la variedad 'Hass'. La cáscara de la raza mexicana contiene más ácido oleico que el resto de los genotipos por lo que su consumo es benéfico para la salud. La raza mexicana, guatemalteca, 'Hass' y *P. nubigena* son muy parecidas en cuanto su contenido de ácidos grasos tanto de pulpa como de cáscara, mientras que la raza antillana comparte similitudes con *P. schiedeana*. En este estudio metabolómico dirigido, se muestra que la raza antillana tiende a separarse de la raza mexicana y guatemalteca, lo cual corresponde con lo obtenido en el estudio no dirigido por Resonancia Magnética Nuclear.

## 5.7. Literatura Citada

- Ahmed, E. M., and C. R. Barmore. 1980. Avocado. *In*: Nagy, S., and P. E. Shaw (eds). Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses. AVI Publishing Inc. Westport Connecticut. pp: 121-156.
- Aitzetmuller, K., N. Tsevegsuren, and G. Werner. 1999. Seed oil fatty acid patterns of the *Aconitum*, *Delphinium*, *Helleborus* complex (Ranunculaceae). *Plant Systematic and Evolution* 215: 37-47.
- AOCS. Reapproved 2009. Official Method Ce1f-96. Determination of *cis*- and *trans*- fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC. [http://search.aocs.org/methods/search\\_methods\\_view\\_method.cfm?method=CE1F\\_96.pdf](http://search.aocs.org/methods/search_methods_view_method.cfm?method=CE1F_96.pdf)
- Ashton, O. F. O., M. Wong, T. K. McGhie, R. Vather, Y. Wang, C. Requejo-Jackman, P. Ramankutty, and A. B. Woolf. 2006. Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10151-10158.

- Ashworth, V. E. T. M., and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationship among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94: 407-415.
- Bagci, E., L. Bruehl, K. Aitzetmuller, and Y. Altan. 2003. A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Turkish Journal of Botany* 27: 141-147.
- Beerman, C., J. Jelinek, T. Reinecker, A. Hauenschild, G. Boehm, and H. U. Klör. 2003. Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids in Health and Disease* 2: 1-10.
- Bergh, B. 1992. Nutritious value of avocado (pp. 123-135). CA: California Avocado Society Book.
- Bergh, B. O., and N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *Cal Avo Soc Yrbk* 70: 135-146.
- Biale, J. B., and R. E. Young. 1971. The avocado pear. *In*: Hulme A. C. (ed) *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Vol. 2. Academic Press, London, England. pp: 1-63.
- Bora, P. S., N. Narain, R. V. M. Rocha, and M. Q. Paulo. 2001. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (Cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites* 52: 171-174.
- Brondz, I. 2002. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 465: 1-37.
- Campos-Rojas, E., T. Terrazas, and L. López-Mata. 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249-258.
- Carvajal, O., C. Nolasco, M. G. Aguilar, G. M. Santiesteban, P. M. Hayward, and D. M. Barradas. 2014. Effect of dietary intake of avocado oil and olive oil on biochemical markers of liver function in sucrose-fed rats. *BioMed Research International*: 1-14.

- Clandinin, M. T., J. E. Chappell, S. Leong, T. Heim, P. R. Swyer, and G. W. Chance. 1980. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Human Development* 4: 121-129.
- Cruz-Castillo, J. G., O. A. del Ángel-Coronel, J. de la Cruz-Medina, y M. C. Joaquín-Martínez. 2007. Características morfológicas y bioquímicas de frutos de chinene (*Persea schiedeana* Ness.) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13: 141-147.
- Davis, J. D., H. M. Kobayashi, M. T. Clegg, and M. T. Clegg. 1998. Genealogical relationship among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *The American Genetic Association* 89: 319-323.
- Dowhan, W., and M. Bogdanov. 2009. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 78: 515-540.
- Fiedler, J., G. Bufler, and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255.
- Furnier, G. R., M. P. Cummings, and M. T. Clegg. 1990. Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity* 81: 183-188.
- Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, and A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 441-450.
- Galvao, M. S., N. Narain, and N. Nigam. 2014. Influence of different cultivars on oil quality and chemical characteristics of avocado fruit. *Food Science and Technology* 34: 539-546.
- Goffman, P. D. 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in Brassicaceae. *Phytochemistry* 50: 793-798.
- Gutnikov, G. 1995. Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 671: 71-89.
- Hatton Jr, T. T., P. L. Harding, and W. F. Reeder. 1964. Seasonal changes in Florida Avocados. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 72: 349-353.
- Hegsted, D. M., and D. Kritchevsky. 1997. Diet and serum lipid concentration: where are we? *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 1893-1896.

- Heyden, S. 1994. Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet to prevent coronary heart disease via cholesterol reduction. *Annals of Nutrition and Metabolism* 38: 117-122.
- Huang, C. H. 2001. Mixed-chain phospholipids: structures and chain-melting behavior. *Lipids* 36: 1077-1097.
- Jakab, A., K. Heberger, and E. Forgacs. 2002. Comparative analysis of different plant oils by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 976: 255-263.
- Joaquín-Martínez, M. C., J. G. Cruz-Castillo, J. de la Cruz-Medina, O. del Ángel-Coronel. 2007. Ecogeographical distribution and fruit characteristics of *Persea schiedeana* Nees. in los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 403-410.
- Kaiser, C., M. T. Smith, and B.N. Wolstenholme. (1994). Overview of lipids in the avocado fruit, with particular reference to the Natal Midlands. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 15: 78-82.
- Kevers, C., M. Falkowski, J. Tabart, J. Defraigne, J. Dommes, and J. Pincemail. 2007. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8596-8603.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* 5: 536-549.
- Kim, H. K., Saifullah, S. Khan, E. G. Wilson, S. D. Prat Kricun, A. Meissner, S. Goralier, A. M. Deelder, Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2010b. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-bases metabolomics. *Phytochemistry* 71:773-784.
- Knight Jr., R. J. 2002. History, distribution and uses. *In: The avocado, botany, production, and uses*. Eds. Whiley, A. W., B. Schaffer, and B. N. Wolstenholme. Cap 1. CAB International: 1-14.
- Kosinska, A., M. Karamac, I. Estrella, T. Hernández, B. Bartolomé, and G. A. Dykes. 2012. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:4613-4619.

- Kotani, A., T. Fuse, and F. Kusu. 2000. Determination of plasma free fatty acids by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry* 284: 65-69.
- Kotani, S., E. Sakaguchi, S. Warashina, N. Matsukawa, Y. Ishikura, Y. Kiso, M. Sakakibara, T. Yoshimoto, J. Guo, and T. Yamashima. 2006. Dietary supplementation of arachidonic docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neuroscience Research* 56: 159-164.
- Lee, J., N. Koo, and D. Min. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 21-23.
- Lee, S. K., R. E. Young, P. M. Schiffman, y C. W. Coggins. 1983. Maturity studies of avocado fruit based on picking dates and dry weight. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108: 390–394.
- Letawe, C., M. Boone, and G. E. Pierard. 1998. Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. *Clinical and Experimental Dermatology* 23: 56-58.
- Liu, X., P. W. Robinson, M. A. Madore, G. W. Witney, and M. L. Arpaia (1999) ‘Hass’ avocado carbohydrate fluctuation I. Growth and phenology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 671-675.
- Liu, X., J. Sievert, M. L. Arpaia, and M. A. Madore. 2002. Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 108-114.
- López, R., A. Frati M., B. Hernández D., S. Cervantes, M. Hernández, C. Juárez, and S. Morán. 1996. Monounsaturated fatty acid (avocado) rich diet for mild hypercholesterolemia. *Archives of Medical Research* 27: 519-523.
- Loob, K., and C. K. Chow. 2000. *In*: C. K. Chow (Ed.). *Fatty acids in foods and their health implications*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, New York, USA. pp: 241.
- Lu, Q., Y. Zhang, D. Wang, R. Lee, K. Gao, R. Byrns, and D. Heber. 2009. California ‘Hass’ avocado: profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing aereas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10408-10413.



- Martin, S., and R. G. Parton. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 373-378.
- Martínez, N. L., and R. V. Moreno. 1995. Parameters for determining the maturity of avocados. *Industries – Alimentaires et Agricoles* 112: 200-203.
- Mataix, J., and A. Gil. 2002. Lípidos Alimentarios. Libro Blanco de los Omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Instituto Omega. Editorial Puleva. Granada, España. p: 13-33.
- Meer van, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 112-124.
- Metcalf, L. D., A. A. Schmitz, and J. R. Pelka. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipid for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry* 38: 514-515.
- Meyer, M. D., and L. A. Terry. 2008. Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7439-7445.
- Mhameed S, D Sharon, D Kaufman, E Lahav, J Hillel, C Degani, and U Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 279-286.
- Michelsen, B., S. L. Madsen, and P. Gotfredsen. 2001. PUFA. *In: J. Young (Ed.). Guide to Functional Food Ingredients*. Leatherhead Publishing. Surrey, England. pp: 141-195.
- Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *Journal of Lipid Research* 5: 600-608.
- Mulder, C., J. A. Schouten and C. Popp-Snijders. 1983. Determination of free fatty acids: a comparative study of the enzymatic versus the gas chromatographic and the colorimetric method. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 21: 823-827.
- Muzio, G., A. Trombetta, M. Maggiora, G. Martinasso, V. Vasiliou, N. Lassen, and R. A. Canuto 2006. Arachidonic acid suppresses growth of human lung tumor A549 cells through down-regulation of ALDH3A1 expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 40: 1929-1938.

- Ortiz-Moreno, A., L. Dorantes, J. Galíndez, and R. I. Guzmán. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2216-2221.
- Ozdemir, F., and A. Topuz. 2004. Changes in dry matter, oil content, and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry* 86: 79-83.
- Pike, L. J. 2009. The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research* 50: 323-328.
- Platt, A., K. A., J. W. Oross, and W. W. Thompson. 1983. Ultrastructural study of the development of oil cells in the mesocarp of avocado fruit. *Botanical Gazette* 144: 49-55.
- Quehenberger, O., A. M. Armando, and E. A. Dennis. 2011. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811: 648-656.
- Ratohovery, J. V., Y. F. Lozano, and E. M. Gaydou. 1988. Fruit development effect on fatty acid composition of *Persea americana* fruit mesocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 287-293.
- Requejo, C., C. Lund, A. White, M. Wong, T. McGhie, L. Eyres, L. Boyd, and A. Woolf. 2003. Aceite de aguacate por presión en frío - Una novedad saludable. V Congreso Mundial del Aguacate. España. Resumen A-205: 460-461.
- Ruiz, R. A., G. Reglero, and E. Ibañez. 2010. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 305-326.
- Rustan, A. C., and C. A. Drevon. 2005. Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. Ltd. p:1-7.
- Salas, J. J., J. Sánchez, U. S. Ramli, A. Manaf, M. Williams, and J. L. Harwood. 2000. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid Research* 39: 151-180.
- Schnell, R. J., J. S. Brown, C. T. Olano, E. J. Power, and C. A. Krol. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellites markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 881-889.

- Shanta, N., and G. Napolitano. 1992. Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography* 624: 37-51.
- Seppänen, L., T., I. Laakso, and R. Hiltunen. 2002. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta* 465: 39-62.
- Sheppard, A. J., W. D. Hubbard, and A. R. Prosser. 1974. Evaluation of eight extraction methods and their effects upon total fat and gas liquid chromatographic fatty acid composition analyses of food products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 51: 416-418.
- Soares, S. E., J. Mancini F., and R. C. della Modesta. 1992. Sensory detection limits of avocado oil in mixtures with olive oil. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32: 509-516.
- Stillwell, W., and S. R. Wassall. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* 126: 1-27.
- Stubbs, C. D., and A. D. Smith. 1990. Essential fatty acids in membrane: physical properties and function. *Biochemical Society Transactions* 18: 779-781.
- Takenaga, F., K. Matsuyama, S. Abe, Y. Torii, and S. Itoh (2008) Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvested at northern range in Japan. *Journal of Oleo Science* 57: 591-597.
- Téliz, D., y A. Mora. 2007. *El aguacate y su manejo integrado*. 2a ed. Mundi-Prensa. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 300
- Velasco, L., and P. D. Goffman (1999) Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherol in Boraginaceae. *Phytochemistry* 52: 423-426.
- Villa R, J. A., F. J. Molina C., J. F. Ayala Z., G. I. Olivas, and G. A. González A. 2011. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. *Food Research International* 44: 1231-1237.
- Yahia, E. M. 2010. The contribution of fruits and vegetables consumption to human health. *In: L. A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, & G. Gonzalez-Aguilar (Eds.), Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional and stability*. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. pp: 3-52

Zhao, S. 2012. Analysis of fatty acid methyl esters by Agilent 5975T LTM GCMS. Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd. Agilent Technologies, Inc. 6 pp.

## VI. Discusión General

### 6.1. Aspectos Generales

El análisis de la composición química del aguacate ha sido de gran importancia a lo largo del tiempo al ser esta una especie con propiedades sobresalientes y usos diversos entre los consumidores. La gran variabilidad química presente en esta especie es notable. Se han estudiado, principalmente, su contenido de aceite y ácidos grasos (Ozdemir y Topuz, 2004; Ortiz-Moreno *et al.*, 2003; Meyer y Terry, 2008; Bora *et al.*, 2001; entre otros). Otro enfoque han sido los lípidos complejos como los glicolípidos y fosfolípidos (Pacetti *et al.*, 2007); y su contenido y tipo de azúcares, principalmente por las propiedades y características únicas que éstos representan en aguacate como lo son la mannoheptulosa y el perseitol, además de los azúcares comunes glucosa, fructosa y sacarosa (Tesfay *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Meyer and Terry, 2008). Los pigmentos han sido otro objeto de estudio, como por ejemplo los carotenoides, antocianinas y clorofilas (Ashton *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004). Esto es solo una muestra de la gran diversidad química presente en las distintas estructuras vegetales del aguacate, cada una con sus propiedades y funciones en el metabolismo de esta especie. En este estudio se analizó una parte de esa diversidad química, con un estudio metabolómico completo tanto en pulpa como en cáscara.

En general, la composición química varía de acuerdo a las condiciones y distribución geográfica a las que se encuentren expuestas los genotipos (Azevedo *et al.*, 2001). Como se ha visto, la variabilidad genotípica de las razas de aguacate y especies de *Persea* está asociada a las condiciones agroecológicas en las que se desarrollen, dándoles a cada una de ellas sus rasgos característicos (van der Werff, 2002).

Las expresiones finales de los procesos regulatorios celulares en un organismo se observan en la composición química, ya que los metabolitos son los productos finales y es la forma en que una especie responde a ciertos estímulos del ambiente (Fiehn, 2002). Un estudio metabolómico, como este caso, ayuda a conocer a través de la composición química, las diferencias y similitudes encontradas entre genotipos y como se responden ellas de acuerdo a sus diferencias genotípicas y condiciones ambientales a que se encuentren adaptadas. Ayuda a apoyar una clasificación taxonómica (quimiotaxonomía)

que confirme o refute algunas clasificaciones basadas en otros caracteres como lo son los moleculares y morfológicos, principalmente.

Se sabe desde hace tiempo que existen compuestos característicos del aguacate, como los ácidos grasos. Estos en algún momento se han utilizado como criterios de clasificación química en otras especies, por lo que en aguacate, al ser los ácidos grasos los compuestos químicos más abundantes, se pueden utilizar para tal fin.

La quimiotaxonomía y relaciones filogenéticas entre angiospermas ya han sido investigados a través del estudio de ácidos grasos en hojas de 468 especies (Mongrand *et al.*, 1998). Representa una herramienta de interés y ha ayudado a la clasificación de gimnospermas a través de la composición de ácidos grasos de tejidos fotosintéticos (Mongrand *et al.*, 2001). Aitzetmuller *et al.* (1999), Velasco y Goffman (1999) y Goffman *et al.*, (1999) han demostrado el potencial taxonómico de la evaluación de ácidos grasos en semillas en algunas familias de plantas. Los ácidos grasos son importantes tanto como fuente de almacenaje de energía como en las hojas, siendo esenciales en las membranas celulares formando parte de lípidos más complejos, de ahí la importancia de estos compuestos en el aguacate y, prácticamente en todas las especies vegetales. Pueden ser útil para trazar relaciones filogenéticas en aguacate, pues los ácidos grasos son el componente químico más característico de esta especie y sus parientes.

Otras de las características de los ácidos grasos son sus propiedades y aplicaciones en la salud o en el mejoramiento de alguna función del cuerpo (Rustan y Drevon, 2005). El ácido oleico, en aguacate, es el principal ácido graso con estas propiedades, seguido por el ácido linoleico (insaturado y poliinsaturado, respectivamente). Estos compuestos están presentes en las estructuras vegetales analizadas (hoja, pulpa y cáscara), lo que en su momento representa una ventaja más al consumir o utilizar estas estructuras, ya sea en forma de alimento o sus extractos para la preparación de algún remedio. El ácido oleico es el ácido graso más abundante en las razas de aguacate, con ciertas excepciones en la raza antillana y en *P. schiedeana*, en las que el ácido palmítico es el que domina, pero en algunos casos está balanceado con el ácido oleico o linoleico.

La variabilidad de ácidos grasos en pulpa de las diferentes razas y especies afines se presentó en cuanto a la concentración de estos compuestos, sin embargo, entre estructuras vegetales, la variabilidad fue de acuerdo al tipo de ácido graso, aunque igualmente,

compartieron similitudes. En hoja y cáscara de aguacate, aparecieron compuestos como el ácido *cis*-vaccénico y otros de mucha menor concentración como el ácido metil-isoesteárico, que no se encontraron en pulpa, pero que guardan similitudes estructurales con el ácido oleico y el ácido esteárico, respectivamente.

El contenido de ácidos grasos muestra que el ácido palmítico y el ácido linoleico caracterizan a la raza antillana, que en cierta forma es la raza que más está expuesta a condiciones de altas temperaturas y alta radiación solar, mientras que en *P. schiedeana* el ácido linoleico es que mayormente se presentó. La raza mexicana y la guatemalteca, además de *P. nubigena*, se caracterizan por su contenido de ácido oleico, al igual que los híbridos analizados. En cuanto a estructuras vegetales, las hojas se caracterizan por su contenido de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), mientras que en pulpa y cáscara, aunque hay más variabilidad en cuanto a concentración, los ácidos oleico, palmítico y linoleico son los de mayor presencia.

Todos los compuestos mencionados forman parte de la gran diversidad química del aguacate y sus parientes en cualquiera de las estructuras vegetales analizadas. Algunos de sus propiedades son conocidas, sobre todo las de los compuestos más comunes, es decir, ácidos grasos y azúcares. El resto de compuestos hasta ahora no estudiados o poco estudiados se pueden utilizar para obtener el perfil característico de cada una de las razas y especies afines, y así lograr una clasificación con base en su química.

Para este fin, se hizo un estudio metabolómico basado en RMN que analizó cuali-y cuantitativamente todo el contenido químico de la pulpa y la cáscara. Se detectaron aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y compuestos de naturaleza aromática. Las variaciones entre estructuras vegetales se presentaron cualitativa y cuantitativamente, esto último determinado a través de la abundancia de los picos obtenidos.

De acuerdo a información nutrimental, el aguacate, además de su característico contenido de aceite y ácidos grasos, presenta buen contenido de proteína, conformado éste por aminoácidos (Ortega-Tovar, 2003). Se encontraron en ambas estructuras vegetales, mostrándose diversidad en cuanto a este tipo de compuestos. Los aminoácidos valina, alanina, isoleucina, leucina, glutamato, treonina y lisina fueron encontrados tanto en pulpa como en cáscara, variando en su concentración. Los ácidos orgánicos málico y cítrico también estuvieron presentes en ambas estructuras vegetales con sus señales y

desplazamientos químicos característicos. Los azúcares antes mencionados igualmente presentaron ciertas variaciones entre razas y entre estructuras vegetales.

La medición de la diversidad química en las estructuras vegetales mencionadas da pauta para lograr un entendimiento de la clasificación química no solo de aguacate, sino de cualquier especie vegetal, además de ayudar al conocimiento de las virtudes de los genotipos analizados basado en la composición química, es decir, a encontrar compuestos químicos con alguna propiedad o función importante, ya sea nutritiva, medicinal o con aplicación en algún otro campo de estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se logró obtener una clasificación basada en composición química de las razas y especies de *Persea* estudiadas. Tal resultado nos ayudó a comprender y en cierta manera confirmar las diferencias y similitudes de los genotipos de acuerdo a otros caracteres ya evaluados. Fue evidente, por ejemplo, la colocación de la variedad 'Hass' justo entre las razas mexicana y guatemalteca, de las cuáles es derivado genéticamente, con mayor similitud a la primera.

También, es importante destacar las diferencias obtenidas en cuanto a los estudios metabolómicos, es decir, la diferencias entre un estudio metabolómico no dirigido (RMN- $^1\text{H}$ ) y un estudio metabolómico dirigido (CG-EM). Mientras que en el análisis por RMN- $^1\text{H}$  se pudo determinar que la raza antillana y *P. schiedeana* son muy diferentes en cuanto a composición química general, en el análisis de CG-EM (ácidos grasos) se observó que éstos mismos son similares en cuanto a composición de ácidos grasos tanto en pulpa como en cáscara. Al mismo tiempo se pueden destacar ciertas "virtudes químicas" de los genotipos. Por ejemplo, la raza antillana destaca por su contenido de azúcares, los cuáles como se mencionó anteriormente, tienen propiedades medicinales muy importantes. Al final de todo se puede mencionar que un estudio metabolómico es muy eficiente, en sus distintas maneras, para el entendimiento taxonómico.



## 6.2. Conclusiones Generales

El aguacate (en sus diferentes razas) y las especies afines analizadas en este estudio mostraron una gran variedad de compuestos que en algunos casos fueron característicos y distintivos (tanto en hoja, pulpa y cáscara). La diversidad química fue evidente a través de plataformas analíticas eficientes en la detección de compuestos, como lo son la RMN-<sup>1</sup>H y la CG-EM.

Ciertos compuestos fueron característicos de los genotipos analizados, entre los que se pueden mencionar y destacar, la concentración y tipo de azúcares en la raza antillana, los compuestos de naturaleza aromática (específicamente flavonoides) en la raza mexicana y guatemalteca, el ácido linoleico en *P. schiedeana*, el ácido palmítico en la raza antillana, el ácido oleico en la raza mexicana, entre otros.

La composición, interacción y movilización de compuestos en las diferentes estructuras vegetales es un tema interesante por estudiar para lograr un mejor entendimiento de la fisiología de las especies aquí estudiadas. En general, llama la atención el contenido de compuestos en especies del género *Persea* con diversas propiedades y aplicaciones en varios campos de estudio.

## 6.3. Literatura Citada

- Aitzetmuller, K., N.Tsevegsuren, and G. Werner. 1999. Seed oil fatty acid patterns of the *Aconitum*, *Delphinium*, *Helleborus* complex (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 215:37-47.
- Azevedo, N. R., I. F. P. Campos, H. D. Ferreira, T. A. Portes, S. C. Santos, J. C. Seraphin, J. R. Paula, and P. H. Ferri. 2001. Chemical variability in the essential oil of *Hyptissuaveolens*. *Phytochemistry* 57:733-736.
- Ashton, O. B. O., M. Wong, T. K. McGhie, R. Vather, Y. Wang, C. Requejo J., P. Ramankutty, and A. B. Woolf. 2006. Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10151-10158.
- Bora, P. S., N. Narain, R. V. M. Rocha, and M. Q. Paulo. 2001. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (Cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites* 52:171-174.

- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, and L. Willmitzer. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18:1157-1161.
- Kim, H. K., Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* 5:536-549
- Kim, H. K., Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2011. NMR-based metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology*. 29:267-275.
- Lee, J., N. Koo, and D. Min. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:21-23.
- Liu, X., P. W. Robinson, M. A. Madore, G. W. Witney, and M. L. Arpaia. 1999. 'Hass' avocado carbohydrate fluctuation I. Growth and phenology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:671-675.
- Liu, X., J. Sievert, M. L. Arpaia, and M. A. Madore. 2002. Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:108-114.
- Meyer, M. D., and L. A. Terry. 2008. Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7439-7445.
- Mongrand, S., J. J. Bessoule, F. Cabantous, and C. Cassagne. 1998. The C16:3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49:1049-1064.
- Mongrand S., A. Badoc, B. Patouille, C. Lacomblez, M. Chavent, C. Cassagne, and J. J. Bessoule. 2001. Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 58:101-115.
- Pacceti, D., E. Boselli, P. Lucci, and N. G. Frega. 2007. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipid molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A* 1150:241-251.
- Ortega-Tovar, M. A. 2003. Valor nutrimental de la pulpa fresca de aguacate Hass. *Proceedings V World Avocado Congress*. pp:741-748.
- Ortiz-Moreno, A., L. Dorantes, J. Galíndez, and R. I. Guzmán. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical

- properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2216-2221.
- Ozdemir, F., and A. Topuz. 2004. Changes in dry matter, oil content, and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry* 86: 79-83.
- Rustan, A. C., and C. A. Drevon. 2005. Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. Ltd. p:1-7.
- Tesfay, S. Z., I. Bertling, and J. P. Bower. 2012. *D*-mannoheptulose and perseitol in 'Hass' avocado: metabolism in seed and mesocarp tissue. *South African Journal of Botany* 79:159-165.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*. 12: 575-586.
- Goffman, P. D. 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in Brassicaceae. *Phytochemistry* 50:793-798.
- Velasco, L., and P. D. Goffman. 1999. Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherol in Boraginaceae. *Phytochemistry* 52:423-426.