



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Área temática: Biotecnología Alimentaria

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y DE FRACCIONES
OBTENIDAS POR CARBONIZACIÓN HIDROTÉRMICA PROCEDENTES
DEL EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.
cultivar Hass) SOBRE MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO
CELULAR CUTÁNEO**

Tesis que presenta:

QFB MIGUEL AVALOS VIVEROS

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Directora de Tesis:

DC Martha Estrella García Pérez

Morelia, Michoacán, mayo de 2022

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DR. LUIS FELIPE MENDOZA CUENCA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Evaluación del extracto etanólico y de fracciones obtenidas por carbonización hidrotérmica procedentes del epicarpio de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) sobre marcadores de envejecimiento celular cutáneo" presentado por el QFB. MIGUEL AVALOS VIVEROS con Número de Matrícula **0936007X**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 06 de mayo de 2022

COMITÉ SINODAL



Dra. Martha Estrella García Pérez
Directora de Tesis



Dr. Alain Raimundo Rodríguez Orozco
Vocal 1

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores
Presidente

Dr. Rafael Salgado Garciglia
Vocal 2



Dra. María Carmen Bartolomé Camacho
Vocal 3

La presente investigación se realizó en la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (QFB-UMSNH) bajo la asesoría de la DC Martha-Estrella García-Pérez. Además, se contó con la colaboración del Centro de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo del Instituto Politécnico Nacional (CIEMAD-IPN) así como del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB-UMSNH).

DEDICATORIA

A mi Familia:

MA BELEN VIVEROS-LOPEZ

MARIA GUADALUPE AVALOS-VIVEROS

RAFAEL AVALOS-LOPEZ

RICARDO CHÁVEZ-NÚÑEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento proporcionado para desarrollar la presente Investigación.

A mi asesora la DC Martha Estrella García-Pérez experta en la extracción y estudio de moléculas bioactivas a partir de matrices vegetales por métodos convencionales y por termoconversión; agradezco su apoyo incondicional, sus conocimientos y su asesoría durante el desarrollo de la presente Investigación.

Al DC Héctor E. Martínez-Flores director de la Facultad de Químico Farmacobiología y Titular del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA-QFB-UMSNH), agradezco su asesoría y apoyo para realizar esta investigación.

Al DC Emmanuel Pérez-Calix curador del herbario *Graciela Calderón y Jerzy Rzedowski* en el Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío (IEB-INECOL), gracias por su apoyo y asesoría en el análisis botánico y registro del aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) colectado y utilizado para desarrollar la presente Investigación.

A mi comité sinodal conformado por la DC María del Carmen Bartolomé-Camacho, el DC Rafael Salgado-Garciglia, el DC Alain R. Rodríguez-Orozco y el DC Héctor E. Martínez-Flores. Este proyecto ha sido posible realizarlo gracias a sus conocimientos, asesoría, apoyo y comentarios que en conjunto enriquecieron aún más esta investigación.

Al DC Víctor F. Santes-Hernández director del Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD-IPN) y al DC Carlos E. Santolalla-Vargas por su apoyo y asesoría en el manejo del reactor para realizar la carbonización hidrotérmica así como al DC Enelio Torres-García investigador en el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) por su apoyo y asesoría en análisis FTIR.

Al DC Joel E. López-Meza y a la DC Alejandra Ochoa-Zarzosa adscritos en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB-UMSNH), por su apoyo y

asesoría en las pruebas para determinar la inhibición de la actividad de las diferentes enzimas implicadas en el proceso del envejecimiento celular cutáneo.

A todos mis amigos del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB-UMSNH) y presentes en los centros de investigación mencionados, así como a todas las personas que he tenido el honor de conocer y convivir; muchas gracias por apoyarme durante las diversas horas de investigación, estudio y trabajo.

ÍNDICE

Sección	Página
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Anatomía y fisiología de la piel.....	3
2.2. Datos epidemiológicos sobre el envejecimiento	6
2.2.1. Teorías que explican el envejecimiento celular	7
2.2.2. Fisiopatología del envejecimiento celular cutáneo	8
2.2.3. Marcadores del envejecimiento celular cutáneo.....	11
2.2.4. Compuestos utilizados para atenuar el envejecimiento cutáneo	16
2.3. Propiedades estructurales de las matrices vegetales.....	17
2.4. Los polifenoles	19
2.5. Características del aguacatero (<i>Persea americana</i> Mill.).....	21
2.5.1. Producción, exportación y consumo de aguacate	21
2.5.2. Propiedades nutricionales de la pulpa de aguacate	22
2.5.3. Propiedades farmacológicas de extractos de aguacate	23
2.6. Métodos de obtención de moléculas bioactivas	30
2.6.1. Métodos de extracción convencional	30
2.6.2. Termoconversión de la biomasa	31

3. ANTECEDENTES DIRECTOS	38
4. JUSTIFICACIÓN	39
5. HIPÓTESIS	40
6. OBJETIVOS	41
6.1. Objetivo general	41
6.2. Objetivos específicos	41
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
8. METODOLOGÍA.....	43
8.1. Colecta de frutos de aguacate y análisis botánico	43
8.2. Obtención de las cáscaras del aguacate	43
8.2.1. Determinación del porcentaje en humedad	43
8.3. Obtención del extracto etanólico	44
8.4. Carbonización Hidrotérmica	45
8.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier	45
8.6. Caracterización química de las fracciones	46
8.6.1. Determinación de fenoles totales	46
8.6.2. Determinación de ácidos hidroxicinámicos totales	46
8.6.3. Determinación de proantocianidinas totales	46
8.6.4. Determinación de flavonoides totales.....	47
8.7. Análisis de la actividad antioxidante	47
8.7.1. Peróxido de Hidrógeno	48
8.7.2. Anión superóxido	48
8.7.3. Radical peroxilo	48
8.7.4. Radical hidroxilo.....	49
8.7.5. Radical óxido nítrico.....	49
8.8. Análisis de la inhibición de la actividad enzimática	49
8.8.1. Enzima tirosinasa.....	50
8.8.2. Enzima elastasa.....	50

8.8.3. Enzima colagenasa.....	50
8.8.4. Enzima hialuronidasa.....	50
8.9. Análisis estadístico.....	51
9. RESULTADOS.....	52
9.1. Colecta de frutos de aguacate y análisis botánico.....	52
9.2. Porcentaje en humedad.....	53
9.3. Condiciones de reacción de la carbonización hidrotérmica.....	53
9.4. Porcentaje de rendimiento.....	54
9.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.....	54
9.5.1. Extracto etanólico de la cáscara de aguacate.....	54
9.5.2. Bioaceite ligero procedente de la carbonización hidrotérmica.....	56
9.5.3. Bioaceite pesado procedente de la carbonización hidrotérmica.....	57
9.6. Caracterización química del extracto etanólico y de los bioaceites.....	59
9.7. Actividad antioxidante del extracto etanólico y de los bioaceites.....	61
9.7.1. Correlación de Spearman: actividad antioxidante y contenido de fenoles..	63
9.8. Inhibición de la actividad enzimática.....	64
9.8.1. Correlación de Spearman: inhibición enzimática y polifenoles.....	65
10. DISCUSIÓN.....	67
11. CONCLUSIONES.....	78
12. REFERENCIAS.....	80

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Población mundial \geq 65 años	6
2. Actividad antioxidante de extractos de epicarpio de aguacate	25
3. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate por diferentes métodos de análisis químico	29
4. Concentración de compuestos fenólicos en la cáscara de aguacate.....	30
5. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate sometida a tratamiento hidrotérmico analizados por UHPLC-TOF-MS.....	36
6. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la fracción líquida de la cáscara de aguacate sometida a tratamiento hidrotérmico a diferentes temperaturas.....	37
7. Análisis botánico	53
8. Condiciones de la HTC	53
9. Porcentaje de rendimiento	54
10. FTIR del EEPA.....	55
11. FTIR del bioaceite ligero	57
12. FTIR del bioaceite pesado.....	58
13. Correlación de Spearman	63
14. Correlación de Spearman	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura anatómica de la piel	4
2. Hipótesis que explican el envejecimiento celular cutáneo	7
3. Envejecimiento celular cutáneo	9
4. Estrés oxidativo y envejecimiento celular cutáneo	10
5. Comparación de piel foto-envejecida y foto-protegida mediante análisis Northern, tinción inmunohistoquímica y microscopía de barrido láser confocal	15
6. Componentes de la pared celular de recursos lignocelulósicos	18
7. Metabolitos secundarios	20
8. Producción de aguacate Hass en México	22
9. Métodos de termoconversión	32
10. Carbonización hidrotérmica	33
11. Reacciones químicas que tienen lugar durante la carbonización hidrotérmica ...	34
12. Diagrama de flujo	42
13. Localización geográfica de la colecta de aguacate	52
14. FTIR del EEPA	55
15. FTIR del bioaceite ligero	56
16. FTIR del bioaceite pesado	58
17. Caracterización química	59
18. Actividad antioxidante	62
19. Inhibición de la actividad enzimática	64

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL	Bioaceite ligero.
BAP	Bioaceite pesado.
EC₅₀	Concentración inhibitoria del 50% (antioxidante).
EEPA	Extracto etanólico de la cáscara de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill. cultivar Hass).
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
HTC	Carbonización hidrotérmica.
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50% (enzimática).

RESUMEN

El envejecimiento cutáneo es un proceso que puede acelerarse por el estrés oxidativo derivado de la exposición prolongada a los rayos del sol, estimulando la actividad de las enzimas tirosinasa, elastasa, hialuronidasa y colagenasa, involucradas en la degradación de la matriz extracelular dérmica. El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una fruta valorada por su sabor y propiedades nutricionales, su consumo genera subproductos como el epicarpio (cáscara) con una utilización limitada, con el potencial de contener moléculas polifenólicas bioactivas, útiles para desarrollar nuevos productos cosmecéuticos anti-envejecimiento. La obtención de polifenoles puede realizarse por métodos de extracción convencional como la maceración, obteniéndose un extracto y una biomasa residual, generalmente desechada que puede aprovecharse para obtener moléculas bioactivas, utilizando métodos de termoconversión como la carbonización hidrotérmica (HTC). El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición química, actividad antioxidante e inhibición enzimática del extracto etanólico (EEPA) de la cáscara de aguacate obtenido por maceración, así como de los bioaceites ligeros (BAL) y pesados (BAP) obtenidos por HTC. Todas las fracciones fueron analizadas por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), la concentración de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y la inhibición enzimática se determinó por medio de espectrofotometría. Los resultados FTIR indican una gran diversidad de grupos funcionales en el EEPA y los BAP. Los BAL presentaron una mayor concentración en ácidos hidroxicinámicos, fenoles y flavonoides mientras que el EEPA en proantocianidinas. La actividad antioxidante fue mayor en el EEPA frente al óxido nítrico y el radical peroxilo, mientras que los BALs resultaron más antioxidantes frente al anión superóxido y al radical hidroxilo. La actividad de los BAPs para inhibir la tirosinasa y elastasa fue superior al de otras fracciones. En conclusión, el uso combinado de la extracción convencional y la HTC maximiza el número de fracciones bioactivas a partir de la cáscara de aguacate representando una solución para el aprovechamiento racional de este subproducto alimenticio.

Palabras clave: *actividad antioxidante, cáscara de aguacate, envejecimiento celular cutáneo, fenoles, inhibición enzimática.*

ABSTRACT

Skin aging is a process that can be accelerated by oxidative stress resulting from prolonged exposure to sunlight; stimulating the activity of tyrosinase, elastase, collagenase, and hyaluronidase enzymes involved in the degradation of the dermal extracellular matrix. Avocado (*Persea americana* Mill.) is a fruit valued for its flavor and nutritional properties; its consumption generates by-products such as the epicarp (peel) with limited utilization, from which bioactive polyphenolic molecules could be obtained to develop new anti-aging cosmeceutical products. Polyphenols can be obtained by conventional extraction methods such as maceration, resulting in an extract and residual biomass that is generally discarded, but bioactive molecules could still be obtained using thermo-conversion methods such as hydrothermal carbonization (HTC). The present investigation aims to determine the chemical composition, antioxidant activity, and enzymatic inhibition of the ethanolic extract (EEPA) from avocado peel obtained by maceration, as well as of the light (BAL) and heavy (BAP) bio-oils obtained by HTC. All fractions were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The concentration of phenolic compounds, antioxidant capacity, and enzymatic inhibition were determined by spectrophotometry. FTIR results indicate a high diversity of functional groups in EEPA and BAPs. BALs had the highest concentration of hydroxycinnamic acids, phenols, and flavonoids while EEPA exhibited the highest proanthocyanidin concentration. Antioxidant activity was greater in EEPA against nitric oxide and peroxy radical, while BALs were more antioxidant against superoxide anion and hydroxyl radical. The activity of BAPs to inhibit tyrosinase and elastase was higher than those of the other fractions. In conclusion, the combined use of conventional extraction and HTC maximizes the number of bioactive fractions from avocado peel representing a solution for the rational utilization of this food by-product.

Key words: *antioxidant activity, avocado peel, enzyme inhibition, phenols, skin aging.*

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento celular cutáneo es un proceso natural, acelerado principalmente por factores exógenos como la exposición a los rayos ultravioleta del sol con el consecuente incremento de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Este proceso puede ser atenuado reestableciendo la capacidad antioxidante de la piel (1,2) y contrarrestando la acción de las enzimas implicadas en la hiperpigmentación, flacidez y degradación de los componentes propios de la matriz extracelular dérmica.

El aguacatero (*Persea americana* Mill.) es una planta perteneciente a la familia Lauraceae. Este árbol tropical es originario de México, América Central y América del Sur, pero actualmente se cultiva en todo el mundo. Su fruto denominado aguacate, es sumamente valorado por sus propiedades organolépticas y nutricionales, además, se ha descrito que los extractos obtenidos a partir de sus hojas, epicarpio (cáscara) y semilla, presentan actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana por lo que continúan siendo utilizados en la medicina tradicional (3–5).

Uno de los subproductos generados por el consumo del aguacate es la cáscara, la que en nuestros días es considerada un desecho, aunque estudios sugieren que la misma es rica en moléculas bioactivas (principalmente compuestos fenólicos), los que por sus propiedades antioxidantes podrían ser aprovechados en el desarrollo de nuevos productos cosmeceúticos anti-envejecimiento. La forma tradicional para la obtención de estas moléculas es la extracción con disolventes, lo que genera una biomasa residual extraída generalmente considerada como un desecho. Sin embargo, a partir de ella aún se pueden obtener compuestos bioactivos. Una manera de aprovechar integralmente esta biomasa residual extraída y conseguir altas concentraciones de compuestos bioactivos, sería el empleo de métodos no convencionales de termoconversión como la carbonización hidrotérmica para obtener principalmente compuestos polifenólicos los cuales también podrían aplicarse en productos cosmeceúticos anti-envejecimiento (1,2).

Hasta el presente las propiedades anti-envejecimiento de los extractos polares y de los bioaceites obtenidos a partir de la termoconversión de la biomasa residual extraída procedente de la cáscara de aguacate son desconocidas, lo que limita su utilización en

el desarrollo de productos cosmecéuticos de alto valor agregado. Por lo tanto, el objetivo general de la presente investigación fue determinar el efecto del extracto etanólico procedente del epicarpio de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica a partir de la biomasa residual extraída sobre marcadores del envejecimiento celular cutáneo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Anatomía y fisiología de la piel

La piel es uno de los órganos más importantes para los seres humanos debido a que reviste a todo el cuerpo proporcionándole soporte y protección para el funcionamiento adecuado de los demás órganos internos. Además, presenta un papel importante en la comunicación no verbal por lo que el cuidado y la estética de la piel resultan fundamentales para el bienestar de las personas (6,7).

La piel corresponde a la sexta parte del peso corporal total, abarca un área de superficie de aproximadamente 2 m^2 , un grosor de 0.3 mm a varios centímetros y un peso de 4 Kg en un adulto promedio. Este órgano constituye la primera línea de defensa entre el cuerpo y el medio externo cumpliendo múltiples funciones: protección contra los rayos ultravioleta (UV) originados por el sol, traumatismos mecánicos, xenobióticos y contra microorganismos patógenos. Además, mantiene un equilibrio hidroelectrolítico adecuado, participa en la regulación de la temperatura corporal, en la percepción sensitiva, en la vigilancia inmunológica y en la síntesis de la vitamina D(6,8).

La piel está constituida por tres capas superpuestas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (**Figura 1**) (9). La capa más superficial de la piel es la epidermis, la cual se encuentra constituida por cinco estratos; córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal (7). El espesor de la epidermis varía de 0.1 a 1.5 mm dependiendo de la zona del cuerpo, siendo más delgada a nivel de los párpados y más gruesa en las manos y en los pies (10).

Los queratinocitos son las células más abundantes de la epidermis, estas células por medio de su proliferación, diferenciación y migración dan origen a los demás estratos epidérmicos; en los seres humanos este proceso requiere por lo menos 14 días. La epidermis, aunque crece de manera constante, mantiene el mismo espesor debido al proceso de descamación que dura alrededor de 14 días. Cuando el ciclo de proliferación o descamación aumentan se considera patológico (i.e. psoriasis, cáncer de piel), afectando la homeostasis cutánea (10). Los queratinocitos también participan en la síntesis de una proteína protectora denominada queratina así como moléculas

solubles como citocinas de esta manera, regulan la actividad de las células adyacentes(11).

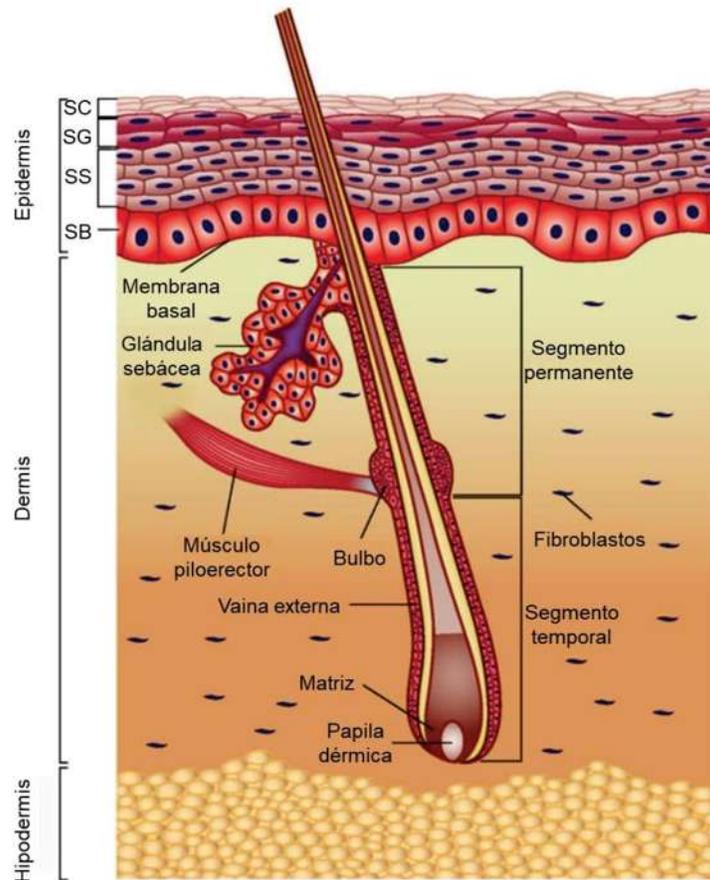


Figura 1. Estructura anatómica de la piel. En la imagen se pueden apreciar las tres capas que constituyen la estructura cutánea: epidermis, dermis e hipodermis. Las principales células que forman los diferentes estratos de la epidermis son los queratinocitos. En la dermis se encuentran localizados los fibroblastos, células encargadas de la síntesis de colágeno y elastina. Finalmente, en la hipodermis hay una predominancia de células adiposas. SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum. (9).

Otras células que revisten importancia para la piel son los melanocitos los cuales se encuentran localizados en el estrato basal de la epidermis. Estas células controlan la pigmentación de la piel por medio de la síntesis y distribución del pigmento de la melanina hacia los queratinocitos (12). En los melanocitos, la melanina se encuentra localizada en unas estructuras especializadas llamadas melanosomas; la síntesis de melanina comienza a partir de la tirosina que es convertida a DOPA-quinona y finalmente se convierte en melanina. El pigmento de la melanina está constituido por

eumelanina (de color negro a marrón) y feomelanina (de color rojo a amarillo), este pigmento funciona como un agente protector contra los rayos UV del sol (7,13).

Las células de Merkel son mecanorreceptores localizados en el estrato basal de la epidermis, representan menos del 5% de la cantidad de células epidérmicas sin embargo, su participación en el sistema neuroinmunocutáneo es importante; presentan funciones neuroendocrinas, nociceptivas y también participan en la respuesta inmunológica (14).

La dermis por su parte se encuentra por debajo de la epidermis, su espesor varía de 2 a 4 mm y es posible distinguir en ella dos capas; la dermis papilar que presenta fibras de colágeno delgadas y la dermis reticular con fibras de colágeno más densas. La dermis se caracteriza por la presencia preponderante de fibroblastos; células especializadas en la síntesis de fibras de colágeno y elastina, proteínas que forman estructuras con una disposición paralela proporcionando soporte, consistencia y elasticidad a este órgano(15).

Los mastocitos son células localizadas cerca de los vasos sanguíneos presentes en la dermis, ante un estímulo de daño desencadenan un proceso inflamatorio por medio de la liberación de histamina, citocinas y quimiocinas (10). La dermis también está constituida por numerosos vasos sanguíneos, corpúsculos (i.e. Paccini, Ruffini y Meissner) así como por abundantes terminaciones nerviosas asociadas a la epidermis, dermis y a los folículos pilosos (16). Además, se encuentran los anexos cutáneos que pueden ser de dos tipos: los glandulares (i.e. glándulas sebáceas, apocrinas y ecrinas) y los córneos (i.e. folículos pilosos y uñas) (17,18).

La hipodermis es la capa más profunda de la piel, contiene numerosos adipocitos; células encargadas de la síntesis y liberación de adipocinas (i.e. leptina, adiponectina), citocinas (i.e. TNF- α , IL-6) y otras proteínas capaces de regular procesos metabólicos así como la respuesta inflamatoria además, los adipocitos también sirven como reserva de grasa (19,20). La hipodermis dispone igualmente de numerosos vasos sanguíneos que aportan sangre a las capas más superficiales de la estructura cutánea (21).

2.2. Datos epidemiológicos sobre el envejecimiento

La esperanza de vida a nivel mundial incrementó de 1960 al 2015 de 53 años a 72 años (22), con ello también se espera una mayor prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas. Datos epidemiológicos estiman que en el 2015 el 11% de la población mundial era igual o mayor a 65 años, se espera que para el 2030 aumente a un 15% y para el 2050 a un 19% (Tabla 1) (23).

Tabla 1. Población mundial ≥ 65 años. En la tabla se indican el número estimado de personas de 65 años o más en diferentes regiones del mundo y su porcentaje con respecto a la población total.

Región	Población en millones			Porcentaje del total de la población		
	2015	2030	2050	2015	2030	2050
África	40.6	70.3	150.5	3.5	4.4	6.7
Asia	341.4	587.3	975.3	7.9	12.1	18.8
Europa	129.6	169.1	196.8	17.4	22.8	27.8
Latinoamérica y Caribe	47.0	82.5	139.2	7.6	11.8	18.6
Norte américa	53.9	82.4	94.6	15.1	20.7	21.4
Oceanía	4.6	7.0	9.5	12.5	16.2	19.5

Fuente: (23).

La población adulta en México aumentó considerablemente de 1990 al 2020; la cantidad de personas entre 30 y 59 años incrementó de un 26% a un 38% y las personas de 60 años o más aumentaron de un 6% a un 12%. En contraste, la cantidad de jóvenes disminuyó de un 29% a un 25% y la cantidad de niños paso de un 38% a un 25%. De acuerdo a estas cifras podemos observar un proceso de envejecimiento demográfico (24).

El envejecimiento es un proceso natural que sigue diferentes trayectorias en órganos, tejidos y células; conforme avanza el tiempo se lleva a cabo la pérdida de la integridad fisiológica y el deterioro de las funciones hasta culminar en la muerte (25,26). Si bien los signos de envejecimiento de los órganos internos pueden ser enmascarados, en la piel se va haciendo evidente el impacto del tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento (2), siendo la ritidosis (arrugas) uno de los principales signos que comienza a manifestarse a partir de los 30 años de edad (27). Existen varias hipótesis que explican cómo se lleva a cabo el proceso de envejecimiento, las principales se describen a continuación.

2.2.1. Teorías que explican el envejecimiento celular

Una de las hipótesis que explica el proceso de envejecimiento celular es debido al daño acumulado en el ADN además, los procesos de mantenimiento y reparación con el tiempo se van haciendo ineficientes (28). La exposición prolongada a la radiación UV es uno de los principales factores para el desarrollo del envejecimiento celular cutáneo y el cáncer. Lo anterior debido a que la radiación UV aumenta la producción de ERO, daño en el ADN e inmunosupresión cutánea (**Figura 2**) (29).

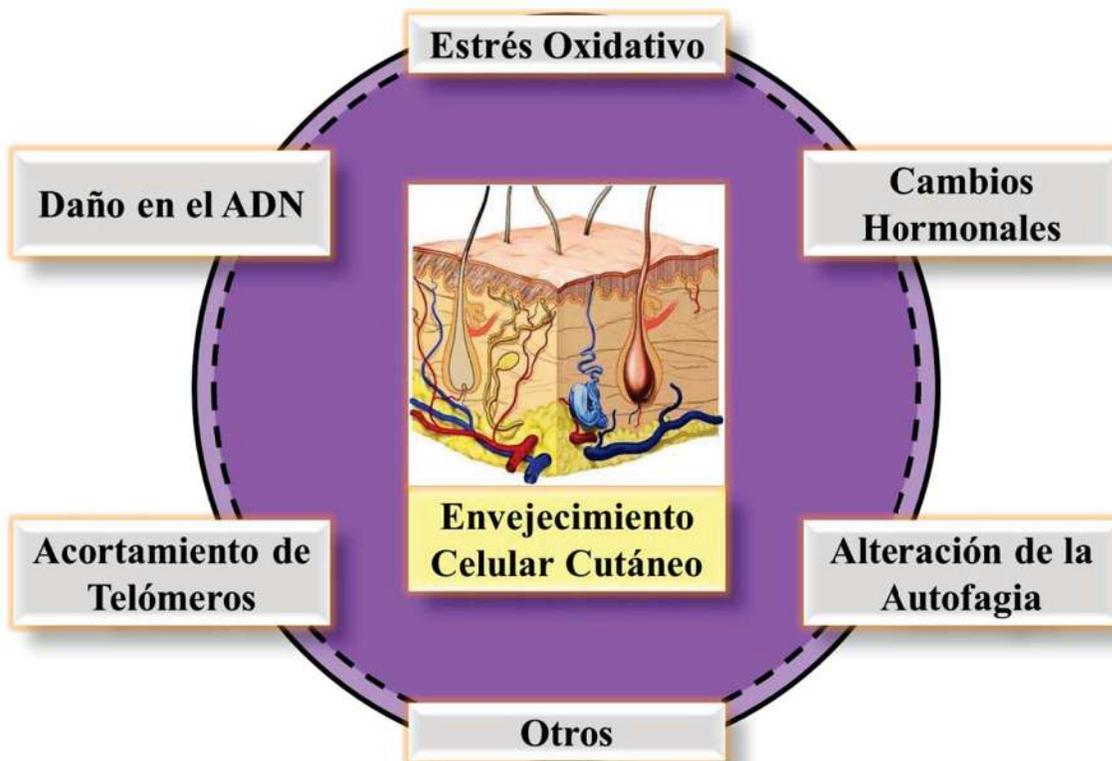


Figura 2. Hipótesis que explican el envejecimiento celular cutáneo. En la imagen se muestran las principales hipótesis que explican el proceso de envejecimiento celular de la piel. Debemos destacar que la exposición prolongada a los rayos ultravioleta del sol genera un aumento del estrés acelerando considerablemente el proceso de envejecimiento en la piel (30,31).

Una de las teorías que explican la causa del proceso de envejecimiento celular es por el acortamiento de telómeros, lo que conlleva al fin de la proliferación y a la senescencia de las células (32). Aunque estas células no tienen la capacidad de dividirse, aún presentan un metabolismo activo y la capacidad de liberar señales de daño denominadas como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (33). En la piel (SSASP), estas señales ocasionan una respuesta inmunológica de tipo inflamatoria que

favorece el daño en la estructura cutánea debido al aumento en la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) (34).

Además de los cambios genéticos propios de las células, los factores ambientales modifican la expresión de genes; en estos cambios denominados epigenéticos, los estímulos ambientales disminuyen la metilación del ADN favoreciendo la expresión de genes y el desarrollo de procesos patológicos (35). Otra teoría que podría explicar el envejecimiento celular es el daño acumulado que se genera debido a las imperfecciones propias de las estructuras celulares; las biomoléculas y las funciones celulares no son perfectas teniendo como consecuencia la formación y acumulación de subproductos que producirán daño y desequilibrio en la homeostasis celular (36).

2.2.2. Fisiopatología del envejecimiento celular cutáneo

El envejecimiento celular cutáneo, es un proceso biológico influenciado por la combinación de factores endógenos o intrínsecos (i.e. genética, procesos metabólicos, hormonas) y exógenos o intrínsecos (i.e. exposición crónica a la luz, contaminación, xenobióticos). Estos factores conducen a alteraciones estructurales y fisiológicas acumulativas y a cambios progresivos en los estratos cutáneos, así como a las transformaciones en la apariencia de la piel, especialmente en las áreas expuestas al sol (37). A diferencia de la piel envejecida naturalmente que es delgada, atrófica, finamente arrugada y seca, la piel fotoenvejecida muestra una epidermis más gruesa, decoloración moteada, arrugas profundas, laxitud, opacidad y aspereza. La pérdida gradual de la elasticidad de la piel conduce al fenómeno de flacidez. La desaceleración de la tasa de renovación epidérmica y el alargamiento del ciclo celular coincide con la cicatrización más lenta de heridas y una descamación menos efectiva en adultos mayores (2) (**Figura 3**).

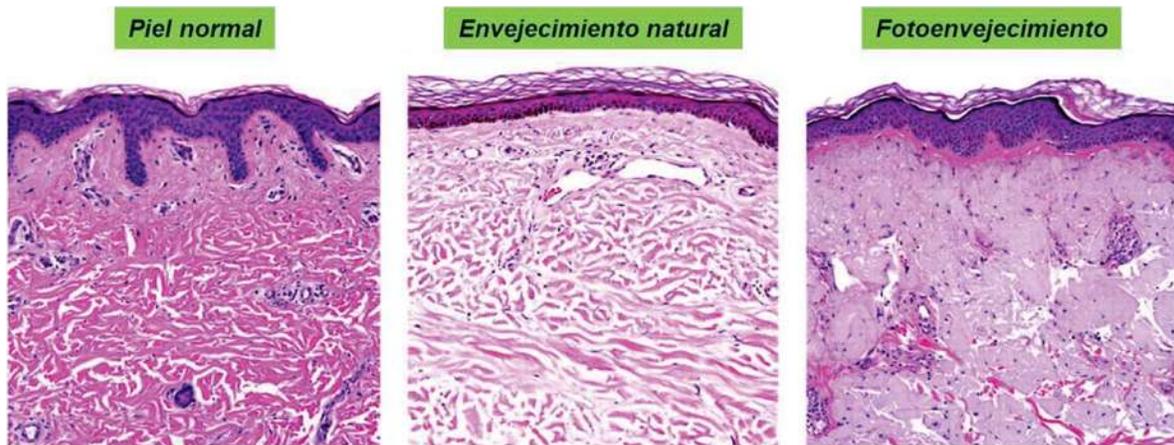


Figura 3. Envejecimiento celular cutáneo. En la imagen se pueden apreciar secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina correspondientes a una piel normal, a una piel envejecida de manera natural y una piel fotoenvejecida. Nótese en la piel fotoenvejecida la presencia de arrugas más profundas, un mayor engrosamiento de la epidermis así como una mayor deposición de colágeno y elastina en la dermis (38).

La exposición prolongada a los rayos UV procedentes del sol genera un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 4) (39). Estas especies pueden proceder de la cadena de transporte de electrones, peroxisomas, retículo endoplásmico así como de reacciones enzimáticas y de Fenton (40). Además, la UV puede ocasionar daño en el ADN mitocondrial ($_{mt}$ ADN) lo que conlleva a un aumento en la formación de ROS y una reducción en la producción de ATP por lo que se afectan los procesos celulares de reparación (41).

En condiciones celulares normales, los receptores tirosina quinasa (RTK) localizados en la membrana celular, se encuentran inhibidos por fosfatasas (RPTP). Sin embargo, las ROS generan la fosforilación de RTK desencadenando la activación de vías de señalización intracelular; como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), para la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína (AP)-1 (40,42). En condiciones homeostáticas NF- κ B se encuentra ligado a su inhibidor κ B (I κ B) en el citoplasma de la célula. Sin embargo, los rayos UV y las ROS promueven la ubiquitinación de I κ B desencadenando la translocación de NF- κ B al núcleo para la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias y MMP-1, esta última enzima comienza a degradar el colágeno de la estructura dérmica (42).

La radiación UV además de causar estrés oxidativo y daño en las células epidérmicas, ocasiona una oxidación en los lípidos de las células que son reconocidos por el sistema de complemento generando un proceso inflamatorio, la infiltración de macrófagos. Los macrófagos comienzan a remover los restos celulares y generan la liberación de citocinas proinflamatorias, ROS y MMPs generando daño en la unión dermis-epidermis (40). La proteólisis de las proteínas de en la matriz extracelular cutánea genera la liberación de péptidos crípticos (matricinas y elastocinas) capaces de aumentar la síntesis y liberación de MMP así como de favorecer el microambiente proinflamatorio debido al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos (43,44).

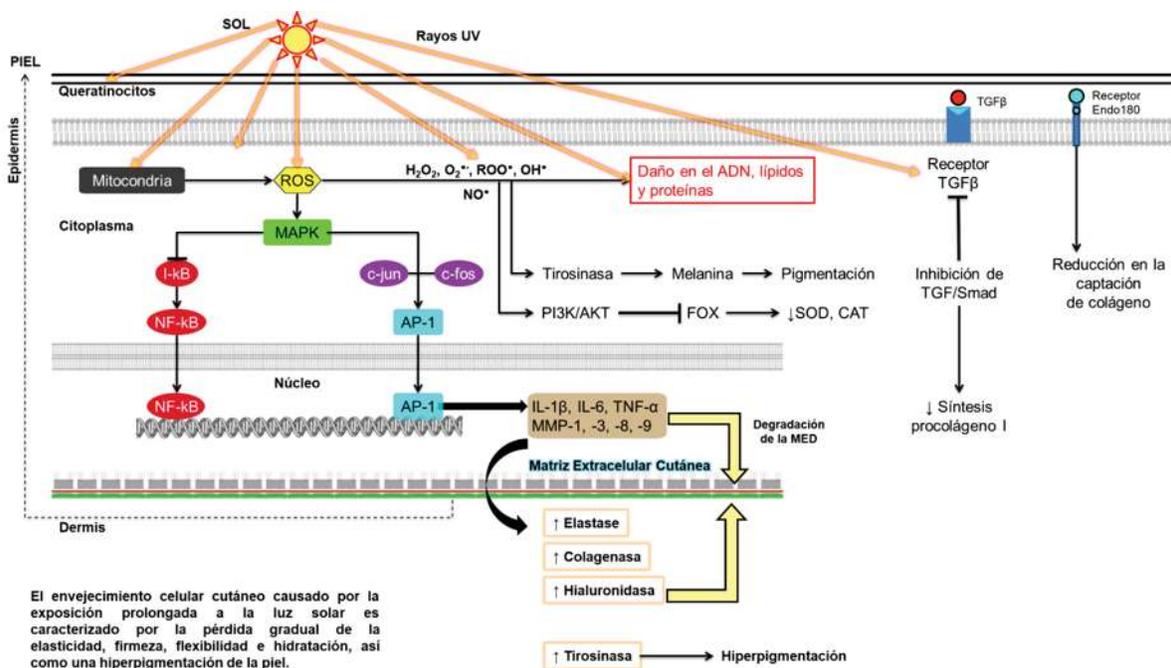


Figura 4. Estrés oxidativo y envejecimiento celular cutáneo. Después de la exposición a los rayos ultravioleta del sol se genera un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno capaces de dañar el material genético, los lípidos y las proteínas de la célula, así como de activar vías de señalización intracelular para la síntesis y liberación de citocinas y metaloproteinasas ocasionando la degradación de la matriz extracelular cutánea. *OH, radical hidroxilo; ADN, ácido desoxirribonucleico; AKT, proteína quinasa B; AP-1, proteína activadora 1; CAT, catalasa; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; I-kB, proteína inhibidora B; IL-1β, interleucina 1β; IL-6, interleucina 6; MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; MED, matriz extracelular dérmica; MMP, metaloproteinasas de matriz; NF-kB, factor nuclear kB; NO*, óxido nítrico; O₂*, anión superóxido; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa; Proteínas c-jun, c-fos, smad y FOX; ROO*, radical peróxido; ROS, especies reactivas de oxígeno; SOD, superóxido dismutasa; TGF-β, factor de crecimiento transformante β; TNF-α, factor de necrosis tumoral α; UV, ultravioleta (45–52).

2.2.3. Marcadores del envejecimiento celular cutáneo

Algunos cambios estructurales pueden apreciarse en la piel envejecida, muchos de ellos exteriormente observados en la flacidez, deshidratación, manchas, arrugas y falta de firmeza, se relacionan con la síntesis y degradación del colágeno, el ácido hialurónico, la elastina y la melanina considerados marcadores de este proceso (53).

La dermis contiene predominantemente colágeno tipo I ($85\% \pm 90\%$) con cantidades menores de colágeno tipo III ($10\% \pm 15\%$). Los fibroblastos dérmicos sintetizan las cadenas de polipéptidos individuales de colágeno de los tipos I y III como moléculas precursoras llamadas procolágeno (54). El colágeno tipo VII, por su parte es sintetizado principalmente de la matriz extracelular, ya que es un colágeno de fibrillas de anclaje, al que se unen el colágeno tipo I y tipo III, proporcionando estabilidad a la membrana basal. El colágeno y la elastina de la piel alcanzan su punto máximo alrededor de los 30 años (55), sin embargo en pieles envejecidas se ha observado una cantidad reducida de colágeno tipo VII, lo que contribuye a la formación de arrugas al debilitar el enlace entre la dermis y la epidermis (56). La distribución escasa y la disminución del contenido de colágeno en la piel fotoenvejecida pueden deberse a una mayor degradación del colágeno por parte de las colagenasas y otras proteasas, independientemente de la producción endógena de esta proteína (57,58).

En la piel envejecida, el colágeno tiene una estructura irregular y desorganizada, además, se observa una proporción aumentada de colágeno III/colágeno I debido a una pérdida de colágeno I (57,58). La presencia de especies reactivas de oxígeno durante el envejecimiento cutáneo se relaciona estrechamente con la disminución del colágeno I al inducir al factor de transcripción c-Jun a través de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), conduciendo a la sobreexpresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP)-1, MMP-3 y MMP-9 y consecuentemente inhibiendo la expresión de procolágeno I, una molécula precursora del colágeno I (59).

El ácido hialurónico constituye un marcador importante del envejecimiento. Se considera que esta molécula es el compuesto predominante de la matriz extracelular cutánea, fundamentalmente presente a nivel de las capas espinosa y granulosa

epidérmicas, y a nivel intracelular en la capa basal y en la dermis con una capacidad única para unir y retener moléculas de agua (60). La hidratación de la piel depende críticamente del agua unida al HA en la dermis y en la epidermis viable, mientras que el mantenimiento de la hidratación depende esencialmente del estrato granuloso (60). El HA tiene una tasa de recambio dinámica. Se considera que posee una vida media de 3 a 5 min en la sangre, menos de un día en la piel y de 1 a 3 semanas en el cartílago (61). El HA se degrada en fragmentos de tamaño variable por las hialuronidasas (HYAL) encargadas de hidrolizar enlaces hexosaminídicos β (1–4) entre residuos de N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico del ácido hialurónico. En humanos, hasta ahora se han identificado seis HYAL: HYAL-1, -2, -3, -4, PH-20 y HYALP1. La HYAL-1 es la hialuronidasa mayoritaria en el suero (62).

El cambio histoquímico más dramático observado en la piel envejecida es la marcada desaparición del ácido hialurónico epidérmico, mientras que este compuesto todavía está presente en la dermis (63). Se desconocen las razones exactas de este cambio en la homeostasis del AH con el envejecimiento. También se ha reportado una reducción progresiva del tamaño de los polímeros de HA en la piel como resultado del envejecimiento (64). De esta manera, la epidermis pierde la principal molécula responsable de unir y retener las moléculas de agua, lo que resulta en la pérdida de humectación de la piel. Teniendo en cuenta que el ácido hialurónico es degradado por las hialuronidasas y que estas enzimas son un factor clave que controla la renovación del ácido hialurónico en la piel humana, se considera que la inhibición de la actividad de la hialuronidasa retarda la destrucción del ácido hialurónico y conduce a la retención de la humedad de la piel, aspecto que mejora la apariencia de la piel envejecida (65).

El ácido hialurónico también se puede degradar de forma no enzimática por un mecanismo dependiente de la concentración de radicales libres en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, tioles, iones ferrosos o cuprosos y del oxígeno molecular (66). Por lo tanto, se ha sugerido el uso de los agentes antioxidantes para retrasar la degradación del AH catalizada por radicales libres y de esta forma mantener la integridad del AH dérmico y sus propiedades humectantes (67).

La elastina es una proteína crítica de la piel consistente en tropoelastina reticulada (68). La elastina se combina con las microfibrillas para formar fibras elásticas que proporcionan flexibilidad a la piel. Las fibras elásticas se encuentran en dermis y constituyen aproximadamente del 2% al 4% del peso seco libre de grasa de la dermis en la piel de los adultos (69). La elastina tiene una tasa de renovación muy baja. De hecho, en la piel, la vida media general de la elastina es similar a la vida humana, por lo que, al sufrir años de repetidos insultos mecánicos y ambientales, es muy poco probable que sean reemplazada de manera apreciable por nuevos procesos de síntesis (70). La tropoelastina, el bloque estructural principal de la elastina tiene el nivel más alto de expresión durante el desarrollo temprano, pero la expresión disminuye durante la edad adulta (71).

Las enzimas elastolíticas llamadas elastasas, degradan las fibras de elastina las que se incrementan con la exposición al sol y en pieles intrínsecamente envejecidas. Estas disrupciones ocurren de dos formas principales: primero, las fibras elásticas se acortan y fragmentan; y en segundo lugar el daño se acumula sobre las proteínas (72). La exposición crónica al sol interrumpe la arquitectura de la fibra elástica de manera sustancial, lo que resulta en una acumulación de material que contiene elastina debajo de la unión dermoepidérmica, conocida como elastosis solar, lo que lleva a la pérdida de elasticidad de la piel (73). La reducción relacionada con la edad en la producción de elastina y el daño a la elastina tienen un impacto sustancial en la apariencia de la piel, lo que resulta en pieles flácidas y frágiles con apariencia envejecida (70). Teniendo en cuenta que la producción de nueva elastina cesa en la madurez, y la síntesis de tropoelastina obviamente no se repite, una estrategia que se ha sugerido para mejorar la elasticidad de la piel durante el envejecimiento es la inhibición de las elastasas (74).

El color de la piel depende de la melanina, la que está compuesta por biopolímeros polimorfos y multifuncionales, como la eumelanina (dominante en individuos con piel y cabello oscuro), feomelanina (dominante en individuos con cabello rojo), neuromelanina (en cerebro humano) y pigmentos de melanina mixtos que son productos finales de una transformación de L-tirosina (75). La eumelanina es fotoprotectora al dispersar y absorber la luz ultravioleta. Por el contrario, la feomelanina es fotoinestable y fototóxica,

lo que promueve el daño inducido por los rayos UV, incluido el fotoenvejecimiento (76). La piel está compuesta por unidades epidérmicas que son responsables de la producción y distribución de melanina. Estas unidades están compuestas por melanocitos, rodeados de queratinocitos y reguladas por el sistema paracrino. En condiciones fisiológicas, la síntesis de melanina se produce en los melanocitos, gracias a la acción de la enzima tirosinasa, la que provoca la oxidación de la L-tirosina o L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a dopaquinona, iniciando la eu- o feomelanogénesis. Este proceso ocurre en dos etapas: en el paso inicial, la L-tirosina se hidroxila a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). En el segundo paso, la L-DOPA se oxida a la O-quinona correspondiente (77).

La tirosinasa es una glicoproteína que se encuentra en la membrana de los melanosomas. Se localiza en la membrana interna, transmembrana y en el área citoplasmática. Las mutaciones dentro de una secuencia de esta enzima pueden conducir a diferentes enfermedades relacionadas con trastornos de la pigmentación de la piel (75). El contenido de melanina puede incrementarse o bien disminuir con los años, generando trastornos de la pigmentación (78). La piel envejecida muestra un aumento de lesiones de lentigo solar (manchas de la edad), contribuyendo en algunos casos más a la edad percibida que las arrugas. Las manchas de la edad exhiben cambios histológicos importantes a nivel epidérmico, especialmente el alargamiento de crestas epidérmicas además de un número incrementado de melanocitos tirosinasa positivos por longitud de interfase dérmica/epidérmica (79). Esta hiperpigmentación puede estar relacionada con el estrés oxidativo. La luz del sol estimula la producción de melanina para la protección contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta. El papel sustancial del estrés oxidativo en la melanogénesis inducida por UV y el alivio de la melanogénesis inducida por UV mediante la terapia antioxidante indica una asociación entre el estrés oxidativo y la hiperpigmentación inducida por la luz UV (80). La radiación UV puede generar los productos de peroxidación del sebo, conocidos como monohidroperóxidos de escualeno, los que generan hiperpigmentación con mejoría mediante el tratamiento antioxidantes (81).

En la **Figura 5** se muestra una tinción inmunohistoquímica de las fibras de colágeno y elastina de una piel foto-protegida comparada con una piel foto-envejecida (82).

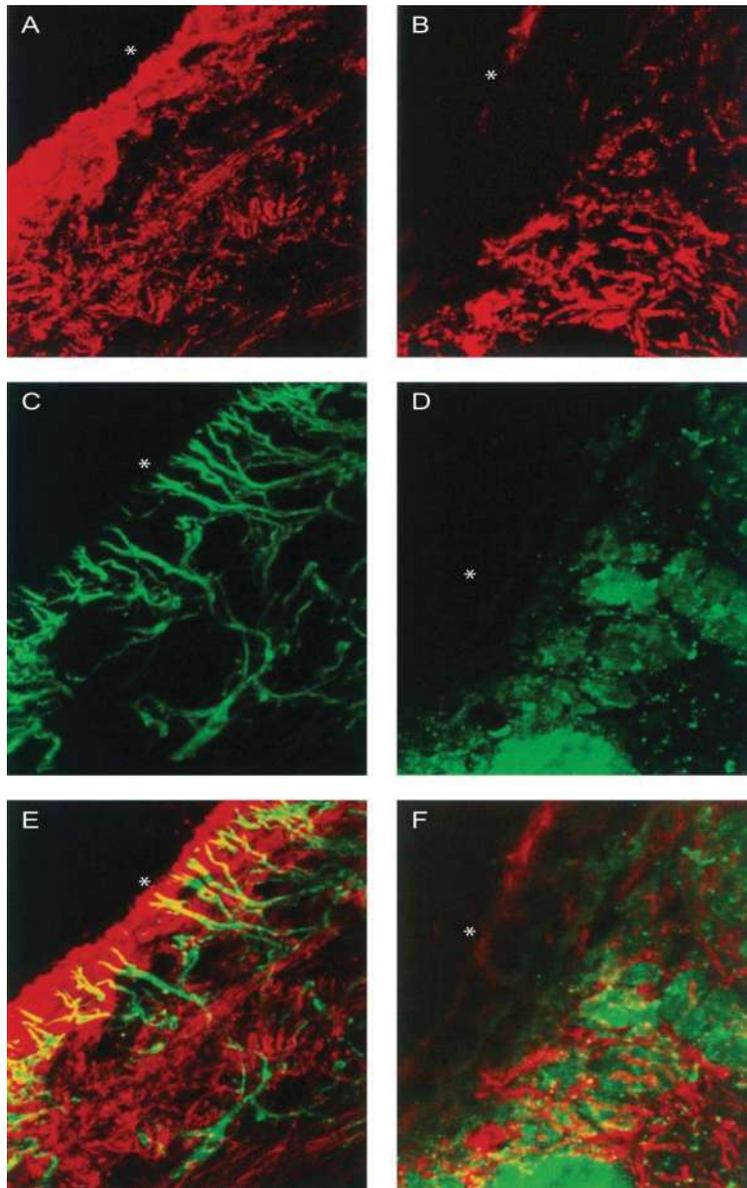


Figura 5. Comparación de piel foto-envejecida y foto-protegida mediante análisis Northern, tinción inmunohistoquímica y microscopía de barrido láser confocal. Tomado de (82). (A) La inmunotinción de colágeno (rojo) revela una densa red de fibras de colágeno dispuestas paralelas a la epidermis que se tiñen brillantemente inmediatamente debajo de la epidermis no teñida. (B) La piel fotoenvejecida del mismo individuo revela una disminución de las fibras de colágeno y una arquitectura deteriorada de las fibras que quedan. (C) La tinción de elastina (verde) de la piel protegida del sol revela una rica red de fibras elásticas perpendiculares a la epidermis en la dermis superficial y paralelas a la epidermis en la dermis más profunda. (D) La tinción con elastina en la piel dañada por el sol del mismo individuo revela la ausencia de las fibras elásticas verticales, así como grandes aglomeraciones de material elastótico solar no funcional. (E) Se superponen inmunotinciones duales para colágeno y elastina para demostrar la interacción del colágeno y las fibras elásticas en la piel protegida contra el sol. (F) Las alteraciones dramáticas del colágeno y las fibras elásticas se observan en la piel fotoenvejecida. La unión dermoepidérmica está marcada por un (*) (82).

2.2.4. Compuestos utilizados para atenuar el envejecimiento cutáneo

Existen numerosas sustancias que se usan para atenuar los signos del envejecimiento, entre estas destacan el uso de protectores solares, retinoides, toxina botulínica, alfa-hidroxiácidos (AHA) y antioxidantes (27).

La vitamina A (retinol) y sus derivados son los agentes más utilizados desde 1940 hasta la actualidad para atenuar el proceso de envejecimiento celular cutáneo. La forma activa de los retinoides es la tretinoína (ácido trans-retinoico); esta molécula con propiedades antioxidantes incrementa la síntesis de colágeno (I, III y VII), disminuye la actividad de las MMPs, favorece la organización de las fibras elásticas y mejora los procesos de cicatrización (83,2). Por consiguiente, su acción tópica reduce significativamente la presencia de arrugas, la laxitud, hiperpigmentación y rojez en la piel fotoenvejecida. El tazaroteno, un retinoide tópico posee efectos similares a la tretinoína. Otros retinoides también utilizados para atenuar el envejecimiento incluyen el retinol y el retinaldehído (84).

El uso de compuestos neuromoduladores como la toxina botulinum tipo A (BTX-A); en la actualidad, constituye uno de los métodos más solicitados y populares en los Estados Unidos para atenuar los signos de envejecimiento (85). Sus efectos benéficos en el rejuvenecimiento facial están mediados por el bloqueo en la liberación de la acetilcolina, lo que genera una paresia química temporal eliminando la contracción muscular que resulta en la formación de arrugas dinámicas ligadas al proceso de envejecimiento (86).

Los antioxidantes son también muy utilizados para atenuar el envejecimiento, destacándose el uso de compuestos sintéticos y de origen natural. La vitamina C y Vitamina E constituyen los antioxidantes sintéticos más empleados. La vitamina C actúa como un cofactor de las hidroxilasas de prolina y lisina que estabilizan la estructura terciaria de la molécula de colágeno, y también promueve la expresión del gen del colágeno (87), mientras que la vitamina E o tocoferol además de su acción antioxidante disminuye la biosíntesis de prostaglandina E2 al prevenir la liberación de ácido araquidónico por la fosfolipasa A2. Esta disminución en la síntesis de prostaglandinas regula la inflamación cutánea que ocurre en los procesos de fotoenvejecimiento (88).

Dentro de los antioxidantes naturales se ha descrito que el tratamiento tópico de las hojas de té verde genera un efecto fotoprotector (29). Las hojas de té verde tienen como principio activo a la epigallocatequina-3-galato (EGCG), este compuesto aumenta la producción de la IL-12, favorece los procesos de reparación, reduce el daño en el ADN y el proceso inflamatorio propio del envejecimiento (41). Otros antioxidantes de origen natural incluyen la cúrcuma, el vino rojo (resveratrol), las uvas (antocianinas), las semillas de uva (proantocianinas) y la grosella espinosa india (galotaninos) que ayudan a la integridad y el tono de la piel (86).

Estructuralmente, los AHA son ácidos orgánicos débiles con uno o más grupos hidroxilo unidos al carbono alfa, que es el primer carbono después del grupo ácido. Los AHA se pueden utilizar para realizar peelings cutáneos con un riesgo mínimo. Los AHA disminuyen la cohesión de los corneocitos inmediatamente por encima de la capa granular al desprender y descamar el estrato córneo. Por lo tanto, las exfoliaciones con AHA han sido populares en la práctica dermatológica durante muchos años. Los AHA se suelen aplicar en forma de exfoliaciones superficiales y de profundidad media, como las que se utilizan para tratar el acné, las cicatrices, el melasma, la hiperpigmentación, las asperezas, las manchas de la edad y la seborrea. Los AHA pueden mejorar la piel arrugada propia de la piel envejecida, aumentando la síntesis de glicosaminoglicanos y engrosando la piel. Debido a estos factores, los AHA son un tratamiento anti-edad muy utilizado (89). El uso de laser ablativo y de radiofrecuencia (90) también se reporta para atenuar los signos del envejecimiento, así como de procedimientos quirúrgicos como la mentoplastia, blefaroplastia, ritidectomía y la rinoplastia (91).

2.3. Propiedades estructurales de las matrices vegetales

La biomasa constituye toda la materia orgánica procedente de matrices vegetales (i.e. plantas, árboles, frutas, algas) así como los subproductos procedentes de ella (i.e. cáscara, semillas, desechos agroalimentarios). La biomasa se encuentra constituida por hemicelulosa, celulosa, lignina y extractivos; su proporción es variable debido a que depende de las características botánicas y de los factores abióticos propios de la planta (92). Mientras que la celulosa, hemicelulosa y lignina se encuentran fuertemente unidas a las paredes celulares de las células vegetales en los recursos lignocelulósicos, y es

imposible extraerlas solamente con el uso de solventes, los extractivos se encuentran en la estructura porosa de las matrices vegetales, por lo que pueden ser fácilmente extraídos con solventes (93) (**Figura 6**).

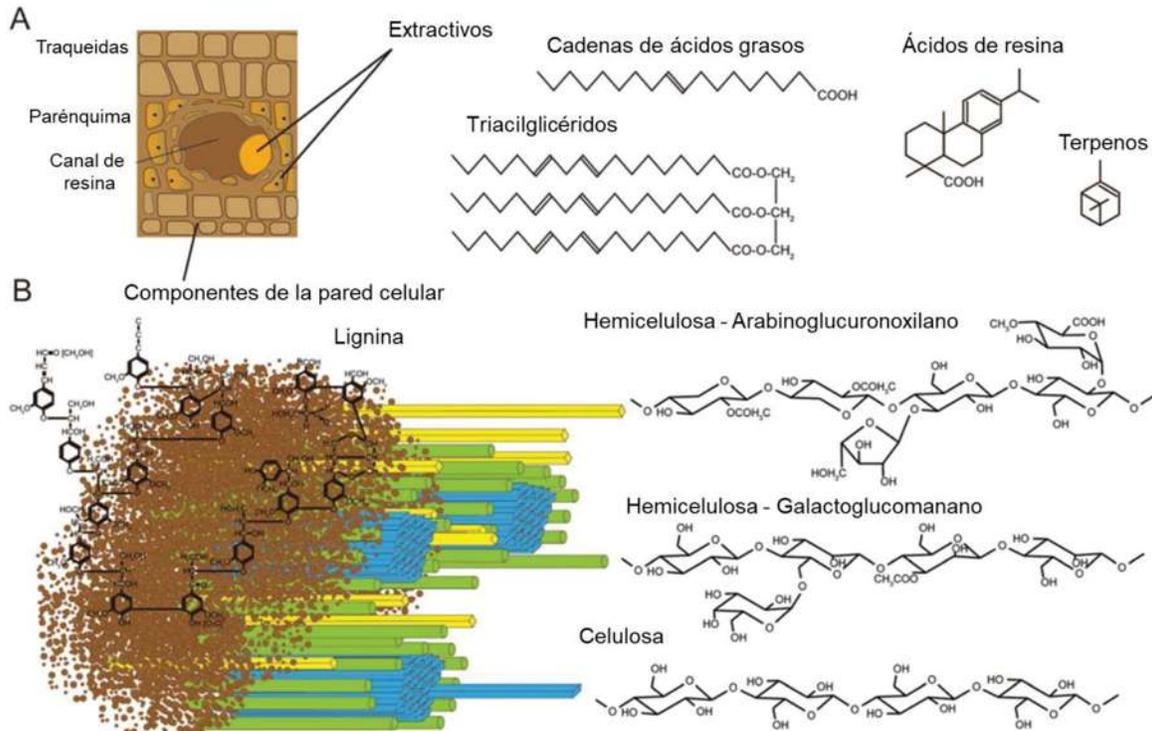


Figura 6. Componentes de la pared celular de recursos lignocelulósicos. Nótese que las principales estructuras de la matriz vegetal comprenden los extractivos, hemicelulosa, celulosa y lignina (94).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido amorfo compuesto por una estructura de xilano y glucomanano con ramificaciones principalmente de D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, D-manopiranososa, L-arabinofuranosa y D-xilopiranososa. La hemicelulosa constituye del 20% al 40% del peso de la biomasa, forma enlaces por puente de hidrógeno con la celulosa, enlaces covalentes con la lignina y cuando se somete a un proceso térmico su degradación comienza de los 220 °C a los 315 °C (95,96).

La celulosa es un polisacárido de cadena larga $(C_6H_{10}O_5)_n$; presenta un alto peso molecular y un alto grado de polimerización, se encuentra formada por unidades de D-glucopiranososa con enlaces β -1,4-glicosídicos. La celulosa representa de un 40% a un 60% de la biomasa, es insoluble en agua y durante su tratamiento térmico comienza su degradación a partir de los 315 °C a los 400 °C (97,95,96).

La lignina es un polímero aromático constituido por unidades de fenilpropano con grupos hidroxilo y metoxilo (alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) unidos por enlaces tipo éter. La lignina es un material amorfo e hidrofóbico, forma parte de la pared celular de las plantas proporcionándoles resistencia y rigidez. La lignina representa de un 10% a un 25% del peso de la biomasa, por su estructura y estabilidad química este polímero es difícil de extraer utilizando métodos convencionales por lo que se requieren temperaturas elevadas que van desde los 160 °C a los 900 °C para su degradación (98,99,96).

Los extractivos comprenden un grupo heterogéneo de sustancias presentes en la biomasa (i.e. proteínas, ácidos grasos, azúcares, fenoles, terpenos, resinas), estos compuestos contribuyen en las características organolépticas propias de la planta y pueden ser extraídos fácilmente por medio de solventes (95). Los fenoles son uno de los tipos de extractivos conocidos como metabolitos secundarios de las plantas que comparten la misma ruta biosintética de las ligninas.

2.4. Los polifenoles

Los metabolitos secundarios son moléculas que pueden ser sintetizados por las plantas y no son indispensables para su crecimiento y desarrollo, sin embargo, son importantes debido a que les proporcionan protección frente a los factores bióticos (i.e. insectos, microorganismos) y abióticos (i.e. rayos UV, temperatura) (100). Dentro de ellos se encuentran los compuestos fenólicos; metabolitos secundarios sintetizados por las plantas a partir de la vía del shikimato, pueden ser encontrados en el tallo, hojas, frutos y derivados como la cáscara y la semilla (100,101).

Estas moléculas tienen como estructura un anillo fenólico con uno o más grupos hidroxilo. Pueden ser clasificados como fenoles simples, ácidos fenólicos que a su vez se subdividen en ácidos benzoicos (i.e. ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido p-hidroxibenzoico) y ácidos hidroxicinámicos (i.e. ácido cafeico, ácido ferúlico, ácidos clorogénicos), flavonoides, estilbenos, lignanos, taninos hidrolizables y condensados (100,101).

Los fenoles simples están representados por una estructura C₆ formada por un anillo aromático y sus derivados. Dentro de este subgrupo se encuentra el pirocatecol, resorcinol y el orcinol. Las estructuras C₆-C₁ constituida por un anillo bencénico al cual se une un átomo de carbono, son características de ácidos fenólicos que se han considerado bioactivos como los ácidos gálico y salicílico (98). Por su parte los ácidos hidroxicinámicos, poseen una estructura C₆-C₃ y han sido reconocidos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, dentro de los que encontramos a los ácidos clorogénico, cafeico, y ferúlico (100–102) (**Figura 7**).

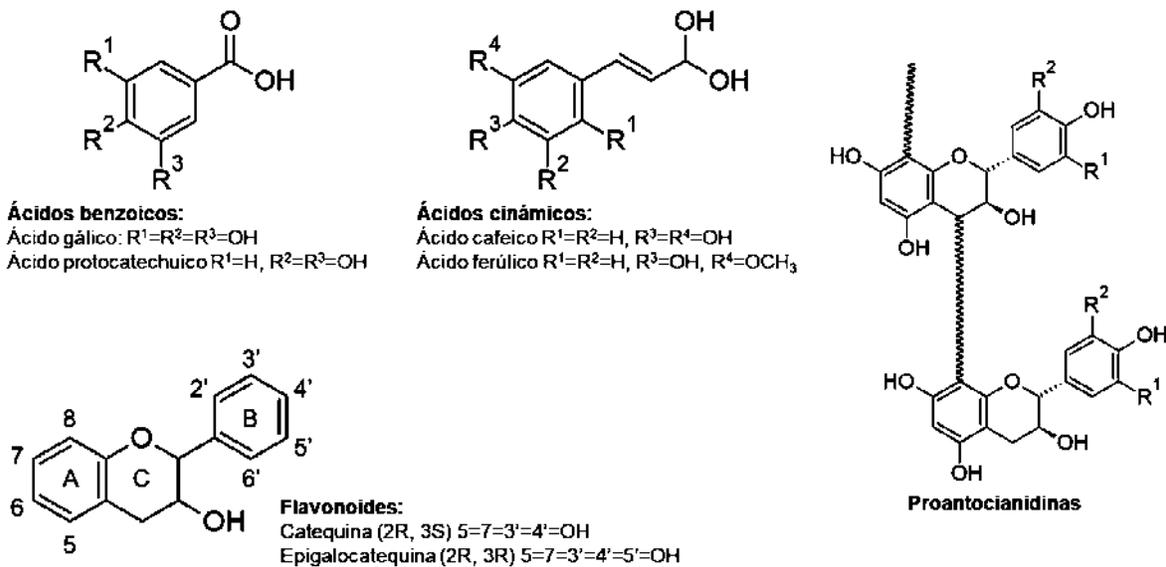


Figura 7. Metabolitos secundarios. Se muestran las estructuras químicas y ejemplos de algunos metabolitos secundarios. Estructuras químicas realizadas en el Software: ACD/ChemSketch (Freeware) 2018.2.5.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que presentan una estructura de 15 carbonos. El esqueleto está constituido por dos anillos de fenilo (anillo A y B) conectados por un puente de tres carbonos (anillo C). Los flavonoides se pueden dividir en varios grupos por ejemplo las antocianinas, flavonas, flavonoles, chalconas, auronas, proantocianidinas entre otros (103).

Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas en forma de oligómeros o polímeros constituidos por unidades de flavan-3-ol y flavan-3,4-diol. Las

proantocianidinas son sintetizadas a partir de la ruta metabólica de los fenilpropanoides y de los flavonoides (104).

2.5. Características del aguacatero (*Persea americana* Mill.)

El aguacatero (*Persea americana* Mill.) es un árbol frutal perteneciente a la familia de las Lauráceas cuyo fruto es denominado como aguacate (105). El género *Persea* originalmente procede de África, teniendo registro de su existencia desde el periodo Cretácico en la región Laurasian y dispersándose después por América del Norte y América del Sur (106). De acuerdo a datos arqueológicos, el aguacate fue domesticado y consumido en varias regiones de Mesoamérica desde hace más de 10,000 años (107). En la actualidad, esta planta es cultivada en todo el mundo y su valor es por la producción de sus frutos, considerados como importantes dentro de la dieta nutricional humana (108).

Actualmente, se han identificado más de 500 cultivares o híbridos de *P. americana*, sin embargo, no todas se comercializan; para ello, es importante considerar la calidad, el tiempo de producción y la conservación de la fruta durante su transporte (109). Botánicamente, se clasifican en tres variedades de interés agronómico: la antillana (*Persea americana* var. *americana* Miller), la guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis* Williams) y la mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* Blake) (110). Los principales cultivares comercializados son híbridos procedentes de estas variedades dentro de las cuales se destaca el cultivar Hass (109).

El aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivar Hass es procedente de La Habra Heights, California (1926), es un híbrido de *Persea americana* variedad guatemalensis (58%) y *Persea americana* variedad mexicana (42%) (107). Actualmente, el aguacate cultivar Hass es el que presenta la mayor producción y demanda en el mercado mundial (109).

2.5.1. Producción, exportación y consumo de aguacate

El aguacate como producto alimenticio se ha logrado posicionar en el Mercado Nacional e Internacional. De las diferentes variedades cultivadas en América Latina y el Caribe, el aguacate Hass es el que presenta una mayor demanda en el mercado; se estima que

el valor total de las exportaciones para este fruto incrementó del 2000 al 2010 de USD 73 millones a USD 672 millones (111), mientras que del 2016 al 2018 alcanzó alrededor de USD 3.5 mil millones (112).

Los principales países encargados de la producción y exportación de este producto son México, Colombia, Chile, Perú, República Dominicana e Indonesia (113,114). México es el país con mayor producción de aguacate, principalmente cultivar Hass, recabando anualmente miles de millones de pesos para la Nación Mexicana (115) (**Figura 8**).

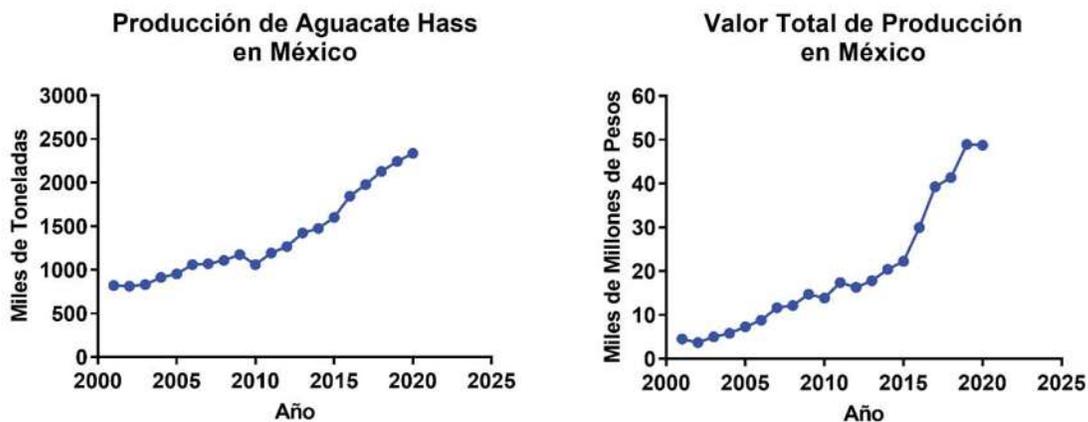


Figura 8. Producción de aguacate Hass en México. En la imagen se presenta la producción total de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) y el valor total de producción obtenido anualmente en México (2001-2020). Datos consultados del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (115).

Cabe destacar que el Estado de Michoacán, México, es el líder mundial en la producción de aguacate, contando con una superficie de cultivo superior a las 103 mil hectáreas distribuidas en 45 municipios (116). Gran parte de toda su producción es exportada principalmente a Estados Unidos, Japón y Canadá, lo que representa ingresos económicos importantes para el sector agrícola de la región (117).

2.5.2. Propiedades nutricionales de la pulpa de aguacate

Actualmente, el aguacate constituye uno de los alimentos principales en la dieta de los mexicanos, además de ser reconocido internacionalmente por la famosa salsa guacamole (118). Sin embargo, no solamente es valorado por sus características organolépticas (sabor, aroma, textura) sino también por su perfil nutricional debido a que presenta numerosos beneficios para la salud de los consumidores (119).

El contenido de nutrientes presentes en la pulpa del aguacate varía dependiendo del grado de maduración y de las condiciones de cultivo. Uno de sus componentes principales es su alto contenido de grasa, característica por la cual el aguacate también es conocido como la “fruta de mantequilla” (120). Del contenido de ácidos grasos totales del aguacate Hass un 71% son ácidos grasos monoinsaturados, un 13% ácidos grasos poliinsaturados y un 16% ácidos grasos saturados; de los cuales predominan el ácido oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) y palmitoleico (C16:0); mientras que se encuentran en menor proporción el ácido esteárico (C18:0), linolénico (C18:3), eicosenoico (C20:1), eicosanoico (C20:0) y mirístico (C14:0) (121).

El aguacate también es una fuente importante de vitaminas (E, C y B6), pigmentos (clorofilas, carotenoides y antocianinas), compuestos fenólicos, enzimas antioxidantes (peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa), esteroides, minerales, azúcares y alcoholes relacionados (azúcar C7, D-manoheptulosa y perseitol) (122–124). La concentración total de proteínas solubles presentes en el aguacate incrementa durante su proceso de maduración alcanzando una concentración de 34.8 mg/g DM (materia seca) (125).

El consumo de aguacate con fines alimenticios genera subproductos tales como las semillas y la cáscara que son generalmente desechados y representan el 13% y el 18% respectivamente de la masa total de un aguacate fresco. A partir de estos subproductos se podrían obtener moléculas bioactivas para ser utilizadas en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, cosmeceúticos y nutracéuticos de alto valor agregado. Además, la utilización de estos subproductos también permitiría reducir su impacto negativo en el medio ambiente (126,5).

2.5.3. Propiedades farmacológicas de extractos de aguacate

El aguacate ha sido utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes afecciones. La infusión de las hojas del aguacate ha sido utilizada como tratamiento para atenuar los procesos inflamatorios, dolor y fiebre (127). Se ha demostrado que el extracto de las hojas presenta actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y antimicótica (128) además, también se emplea como tratamiento para la hipertensión (129). La

pulpa del aguacate contiene una alta concentración de ácidos grasos, vitaminas, proteínas y minerales con actividad cicatrizante así como beneficios para la piel seca o dañada (130). El extracto de la semilla de aguacate es rico en compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, antocianinas y alcaloides, que le confiere propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antimicóticas, antivirales y antineoplásicas (126,131). También se ha descrito que los fenoles presentes en el extracto de la semilla reducen los niveles lipídicos en el plasma; modulan la expresión del receptor de LDL, inhiben la síntesis de lípidos hepáticos, la secreción de lipoproteínas e incrementan la degradación del colesterol por medio de los ácidos biliares (132). Además, los aceites de la semilla se utilizan para tratar erupciones cutáneas (129). La cáscara *in natura* y deshidratada se ha propuesto como infusión dado su alto contenido en fenoles totales y flavonoides, así como su sabor agradable y capacidad antioxidante (133). La cáscara de aguacate inmaduro contiene compuestos antifúngicos (134). El consumo de la cáscara también se ha empleado como vermífuga y para tratar la disentería (129).

3.4.4 Propiedades antioxidantes y anti-envejecimiento de los extractos de cáscara de aguacate

Los extractos de la cáscara a diferencia de la semilla y la pulpa han sido menos estudiados, sin embargo, muestran resultados interesantes. Por ejemplo, las cáscaras del aguacate Hass presentan un alto contenido en polifenoles (12.6 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra) y una remarcable capacidad antioxidante (ORAC, DPPH) incluso superior a la mostrada por la pulpa y las semillas. Además, las cáscaras del aguacate Hass también presentan un alto contenido en proantocianidinas y en pigmentos de clorofila comparativamente al fruto (5).

Por otro lado, los extractos de la cáscara de aguacate debido a su alta capacidad antioxidante también pueden ser utilizados para la producción de alimentos funcionales, además, se ha demostrado que la cáscara de aguacate en conjunto con la nisina (un antibiótico peptídico utilizado como bioconservante) presentan un efecto sinérgico generando una respuesta antioxidante y antimicrobiana por lo que podría considerarse

como un aditivo natural (135,136). En la **Tabla 2** se indican algunos estudios realizados con extractos de la cáscara de aguacate con actividad antioxidante.

Tabla 2. Actividad antioxidante de extractos de epicarpio de aguacate.

Especie	Método empleado	Resultado	Referencia
<i>Persea americana</i> cultivares Hass y Fuerte	Ensayos CUPRAC, ABTS y DPPH de extractos en metanol, acetona y acetato de etilo de cáscaras, pulpa y semillas.	Los ensayos mostraron una mayor capacidad antioxidante del extracto en acetona de las cáscaras de aguacate Cv. Fuerte.	(137)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayos ABTS y HPLC-PDA en aceite prensado de pulpa + cáscaras y aceite de pulpa.	Mayor capacidad antioxidante, contenido de α -tocoferol y β -caroteno en aceite de pulpa + cáscaras secada en microondas.	(138)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayo ORAC en extractos acuosos de cáscaras y semillas.	El extracto de cáscara mostró una mayor capacidad antioxidante que el extracto de semilla.	(135)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayos DPPH y ABTS de extractos etanólicos de cáscara, pulpa y semillas.	Los extractos de cáscara mostraron mayor capacidad antioxidante en el ensayo ABTS y el extracto de semilla mostro mayor capacidad antioxidante en el ensayo DPPH.	(139)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayo FRAP a muestras liofilizadas de hojas, cáscaras, pulpa y semillas.	Los niveles antioxidantes variaron según la época del año, siendo los más altos en la cáscara en noviembre, en las hojas en marzo y en las semillas en junio.	(140)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass y Fuerte	Ensayos ABTS, DPPH y FRAP a extractos etanólicos de cáscaras y semillas.	Los extractos de cáscara mostraron mayor capacidad antioxidante en los ensayos ABTS y FRAP, mientras que los extractos de semillas mostraron mayor capacidad antioxidante en el ensayo DPPH. La variedad Fuerte presento mayor capacidad antioxidante que la Cv. Hass.	(126)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass y Shepard	Ensayos DPPH, ABTS y ORAC de extractos metanólicos de cáscaras y semillas.	Los extractos de cáscara manifestaron una mayor capacidad antioxidante que los extractos de la semilla. La variedad Hass mostró una mayor capacidad antioxidante que la Cv. Shepard.	(136)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayo DPPH de extractos acuosos de cáscara, pulpa y semillas.	El extracto de las semillas mostró mayor capacidad antioxidante que los extractos de la cáscara y pulpa.	(141)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass, Quintal, Margarida y Fortuna	Ensayos ABTS, DPPH y FRAP de extractos etanólicos de cáscara, pulpa y semilla.	El extracto de cáscara indicó la mayor capacidad antioxidante en los tres ensayos, seguido por el extracto de semilla. La variedad Quintal mostró la mayor capacidad antioxidante seguida por la Cv. Hass.	(142)
<i>Persea americana</i>	Ensayo DPPH en extracto	Se encontraron valores antioxidantes en	(143)

Cv. <i>Drymifolia</i>	metanólico de cáscara.	el rango de 53.31–307.33 mmol TE/g.	
<i>Persea americana</i>	Ensayos DPPH y FRAP en extractos de hojas, cáscaras, pulpa y semillas en HCl/metanol.	El extracto de hojas mostro la mayor capacidad antioxidante según el ensayo DPPH, mientras que el extracto de cáscara reveló mayor capacidad antioxidante en el ensayo FRAP.	(144)
<i>Persea americana</i>	Ensayo DPPH en extractos etanólicos de cáscara a diferentes concentraciones.	La actividad antioxidante máxima se encontró bajo los siguientes parámetros: extracción bajo agitación por 20 minutos con 48% de etanol a 70° C y una relación disolvente/sólido (v/p) 20	(145)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass	Ensayo DPPH a extractos de cáscara, pulpa y semilla en acetona	Los extractos de cascara y semilla revelaron una mayor capacidad antioxidante.	(146)
<i>Persea americana</i> Cv. Hass, Slimcado, Simmonds, Loretta, Choquette, Booth 7, Booth 8 y Tonnage	Ensayos DPPH y ORAC a extractos de cáscara, pulpa y semilla en acetona/agua/ácido acético.	Los extractos de cáscara de la variedad Hass revelaron una mayor capacidad antioxidante en el ensayo ORAC, mientras que en el ensayo DPPH los extractos de las semillas de la variedad Simmonds mostraron mayor capacidad antioxidante.	(5)
<i>Persea americana</i> Cv. Bacon	Ensayos DPPH, ABTS y TBA a extractos de cáscara, pulpa y semilla en metanol y n-hexano.	Los extractos metanólicos de la semilla mostraron mejor capacidad antioxidante tanto en el ensayo DPPH como en el ABTS y TBA.	(147)

ABTS, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); CUPRAC, Capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos; Cv, cultivar; DPPH, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FRAP; poder antioxidante férrico reductor; ORAC, capacidad de absorción de radicales de oxígeno; TBA, ácido tiobarbitúrico; TE, equivalentes de Trolox.

Recientemente se demostró la alta capacidad inhibitoria sobre las metaloproteinasas de matriz evidenciada con el extracto de cáscara de aguacate a concentraciones relativamente bajas (150 µg DE/mL) (148). Estas metaloproteinasas son proteasas extracelulares que pueden escindir componentes de la matriz extracelular, incluyendo varios tipos de colágenos, elastina, fibronectina, gelatina, proteoglicanos, etc. La actividad de las metaloproteinasas está relacionada con el envejecimiento prematuro de la piel (149). El extracto de cáscara de aguacate ha demostrado ser eficaz para inhibir la matrilisina (MMP-7), gelatinasa A (MMP-2) y colagenasa 1 (MMP-1). Se ha demostrado que la transcripción de genes (MMP-1) y la expresión de la MMP-1 están incrementadas en el envejecimiento (148).

La elevada capacidad antioxidante de los extractos de la cáscara de aguacate y la presencia importante de compuestos fenólicos (150,151) sugiere que la misma podría

tener aplicaciones para el desarrollo de productos cosmeceúticos y nutracéuticos de alto valor agregado, pero deben desarrollarse nuevas investigaciones que permitan demostrarlo.

3.4.5 Compuestos fenólicos identificados en las cáscaras de aguacate

Los ácidos hidroxicinámicos han sido determinados en el aguacate. Estos compuestos están principalmente asociados a las paredes celulares formando enlaces ésteres, amidas o glucósidos con celulosa, hemicelulosa, arabinosilanos, lignina, pectina, proteínas y otros constituyentes. El ácido cumárico es el principal ácido hidroxicinámico monomérico que se ha reportado en extractos metanólicos de pulpa de aguacate en concentraciones de 27 a 47 $\mu\text{g/g dw}$, seguido del ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido sinápico y ácido trans-cinámico (152).

Los ácidos hidroxicinámicos conjugados presentes en el aguacate son principalmente conjugados con azúcares y ácido quínico. La pulpa de aguacate contiene ácido 5-feruloilquínico (76.2-115.5 $\mu\text{g/g dw}$), seguido del glucósido del ácido p-cumárico (84,4-93,5 $\mu\text{g/g ps}$), el glucósido del ácido ferúlico (19,5-24,4 $\mu\text{g/g ps}$) y el rutinósido del ácido p-cumárico (16,4-35,8 $\mu\text{g/g ps}$), entre otros. En semilla de aguacate, los derivados del ácido cafeico son los principales compuestos fenólicos reportados, incluido el ácido trans-5-O-cafeoil-D-quínico (1630-5740 $\mu\text{g/g dw}$), ácido 1-cafeoilquínico (1123-2438 $\mu\text{g/g dw}$), ácido 4-cafeoilquínico (66,9-103,9 $\mu\text{g/g dw}$), ácido 3-O-cafeoilquínico (53,5-57,5 $\mu\text{g/g dw}$), y un derivado conjugado de ácido cumárico; el ácido 3-O-p-cumaroilquínico (8,1-375,6 $\mu\text{g/g dw}$). En cáscara de aguacate, el ácido 5-O-cafeoilquínico (77.4-81.8 $\mu\text{g/g dw}$) y el ácido clorogénico (1592.4-1989.9 $\mu\text{g/g dw}$) son los compuestos de este grupo mayoritariamente reportados (152).

Las subclases de flavonoides en la fruta del aguacate incluyen agliconas, glucósidos y grupos metilados. Los principales flavonoides específicos informados en la fruta del aguacate incluyen flavan-3-oles (catequina, epicatequina y galato de epicatequina), flavonoles (rutina, isorhamnetina, narirutina y quercetina) y flavanoles (taxifolina). La naringenina también se ha identificado en la cáscara del aguacate, pero no se ha cuantificado (153).

En cuanto a las procianidinas presentes en el aguacate, se han reportado dos tipos de tipos procianidinas de tipo A (1 dímero y 1 trímero) y 7 de tipo B (cuatro dímeros y tres trímeros) en semillas y cáscaras de aguacate (154). Wang et al., (2010) identificaron procianidinas de tipo A y tipo B, a partir de monómeros decaméricos y polímeros, en las semillas (23.7-55.6 mg/g dw) y cáscaras (4.9-38.9 mg/g dw) de 8 cultivares de aguacate (5). Estos autores también reportaron que los aguacates de las variedades 'Simmonds', 'Hass', 'Tonnage' y 'Booth' tenían un alto contenido de procianidinas en las semillas. Estos hallazgos coincidieron con Tremocoldi et al., (2018) quienes reportaron que la cáscara de aguacate 'Hass' contiene una mayor concentración de procianidinas tipo B2 (48.38 mg/g dw) en comparación con las cáscaras de aguacate 'Fuerte' (28.34 mg/g dw) (126). Los dímeros tipo A (0.026 mg/g dw) son un componente menor en comparación con los dímeros tipo B (0.055-0.135 mg/g dw) en la cáscara del aguacate 'Hass' y no se encontraron en el aguacate 'Shepard'. Se encontraron trímeros de tipo A en las semillas de aguacates 'Hass' (0,085 mg/g dw) y 'Shepard' (0,086 mg/g dw) (136). Esto sugiere que el cultivar de aguacate y los componentes morfológicos y anatómicos del fruto afectan significativamente el contenido y grado de polimerización de procianidinas.

En la **Tabla 3** se muestran algunos de los principales compuestos identificados en la cáscara de aguacate mientras que en la **Tabla 4** se indica la concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas y taninos de acuerdo con varios estudios descritos en la literatura.

Tabla 3. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate por diferentes métodos de análisis químico.

HPLC-DAD-ESI-TOF-MS		HPLC-ESI-TOF	
Compuesto	Referencia	Compuesto	Referencia
Ácido 4-hidroxibenzoico	(148)	Ácido quínico	(135)
Ácido Siríngico	(148)	Ácido succínico o ácido metilmalónico	(135)
Tirosol-glucosil-pentosido	(148)	Ácido clorogénico	(135)
Ácido 3-O-cafeoilquínico	(148)	Procianidina (A o B)	(135)
Ácido 4-O-cafeoilquínico	(148)	Epicatequina	(135)
Ácido 5-O-cafeoilquínico	(148)	Quercetina-3-O-arabinosa	(135)
Naringenina	(148)	Ácido abscísico	(135)
Kaempferol	(148)	p-cumaroil-D-glucosa	(135)
Quercetina	(148)		
Quercetina-3-O-arabinósido	(148)		
Quercetina-3-β-glucósido	(148)		
Quercetina glucurónido	(148)		
Quercetina derivado (Isomero 1)	(148)		
Quercetina derivado (Isomero 2)	(148)		
Quercetina-xilosilrhamnosido	(148)		
Quercetina-O-arabinosilglucosido	(148)		
Rutina	(148)		
Quercetina-diglucósido (Isomer 1)	(148)		
Quercetina-diglucósido (Isomer 2)	(148)		
Kaempferol-O-glucosilrhamnosido	(148)		
Luteolina 7-O-(2''-Opentosil) hexosido	(148)		
Multinoside A	(148)		
(+)-Catequina	(148)		
(-)-Epicatequina	(148)		
Dímero A	(148)		
Dímero B	(148)		
Trímero A	(148)		
Trímero B	(148)		

HPLC-ESI-MS	
Compuesto	Referencia
Ácido 5-O-cafeoilquínico	(136)
Procianidina dímero B (I)	(136)
Procianidina dímero A	(136)
Catequina	(136)
Procianidina dímer B (II)	(136)
Quercetina-3,4'-diglucósido	(136)
Quercetina-3-O-rutinosido	(136)
Quercetina-3-O-arabinosil-glucósido	(136)
Quercetina-3-O-galactósido	(136)
Quercetina derivado (II)	(136)

Tabla 4. Concentración de compuestos fenólicos en la cáscara de aguacate.

	Estudios y Resultados	Referencias
	Fenoles (mg GAE/Kg)	
<i>In natura</i>	621.36 ± 34.91	(133)
Deshidratada	10848.27 ± 162.34	(133)
	Flavonoides (mg QE/Kg)	
<i>In natura</i>	536.89 ± 44.89	(133)
Deshidratada	1360.34 ± 188.65	(133)
	Fenoles (mg GAE/g DE)	
Extracción por Ultrasonido	270.4 ± 3.6	(155)
Extracción por Microondas	274.9 ± 2.2	(155)
Ultrasonido y Microondas	281.4 ± 0.2	(155)
Extracción por Maceración	257.2 ± 7.5	(155)
	Flavonoides (mg QE/g DE)	
Extracción por Ultrasonido	54.1 ± 1.6	(155)
Extracción por Microondas	56.0 ± 1.6	(155)
Ultrasonido y Microondas	62.0 ± 0.4	(155)
Extracción por Maceración	57.1 ± 0.9	(155)
	TAC (mg cianidina-3-O-glucósido/g DE)	
Extracción por Ultrasonido	2.3 ± 0.0	(155)
Extracción por Microondas	4.4 ± 0.1	(155)
Ultrasonido y Microondas	4.8 ± 0.1	(155)
Extracción por Maceración	2.7 ± 0.1	(155)
Fenoles (mg GAE/g extracto)	19.7 ± 1	(135)
Flavonoides (mg QE/g extracto)	10.9 ± 1.03	(135)
Taninos (mg GAE/g extracto)	0.04 ± 0.001	(135)
Fenoles (mg CE/g DW)	25.32 ± 0.242	(136)

CE, equivalentes de (+)-catequina; DE, extracto seco; DW, peso seco; GAE, equivalentes de ácido gálico; QE, equivalentes de quercetina; TAC, contenido total de antocianinas.

2.6. Métodos de obtención de moléculas bioactivas

2.6.1. Métodos de extracción convencional

La vía clásica para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos (i.e. fenoles, terpenos, alcaloides) a partir de las plantas se realiza principalmente por métodos de extracción convencional con solventes entre las cuales se destaca la maceración, la extracción con agua caliente, con microondas y el ultrasonido (156,157).

La maceración es una técnica de extracción tradicionalmente utilizada en la obtención de extractos naturales que consiste en utilizar una muestra triturada de partículas

pequeñas de material vegetal en uno o varios solventes. La disminución del tamaño de partícula del material vegetal propicia una buena mezcla con el disolvente. Este proceso se lleva a cabo en un recipiente cerrado y puede o no ir acompañado de agitación que contribuye al aumento del rendimiento de moléculas obtenidas. El disolvente utilizado durante la maceración se denomina menstuo, al final este es separado del residuo sólido que se prensa para recuperar la mayor cantidad posible de solución y se filtra junto con todo el líquido obtenido para separar de las impurezas (158). La maceración es un método de baja eficiencia, donde ésta depende de los parámetros de operación, la naturaleza de la muestra, la química de los compuestos bioactivos de interés, el disolvente elegido y la destreza del operador.

Una vez que la extracción por maceración concluye, queda un residuo que generalmente se deshecha sin utilización. Sin embargo, en esta biomasa residual ya extraída, aún se encuentran polímeros estructurales propios de la matriz vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina) así como moléculas bioactivas que no pueden ser obtenidas por medio de la extracción con solventes y que podrían aprovecharse por medio de métodos no convencionales en el campo de la investigación con productos naturales conocidos como métodos de termoconversión.

2.6.2. Termoconversión de la biomasa

La conversión termoquímica de la biomasa permite la obtención de moléculas bioactivas (**Figura 9**). Entre estos métodos podemos mencionar a la pirólisis; un proceso que, a altas condiciones de presión, temperatura y en una atmósfera libre de oxígeno favorece la degradación de la lignina obteniéndose fenoles de bajo peso molecular (monofenoles y oligofenoles) también conocidos como fenoles pirolíticos los cuales podrían tener actividades biológicas importantes. Recientemente un estudio realizado por nuestro equipo de investigación demostró que los aceites pirolíticos derivados de cortezas de *Amphipterygium adstringens* presentan propiedades antiinflamatorias remarcables sobre una línea celular de queratinocitos epidérmicos humanos (HaCaT) (1,159).

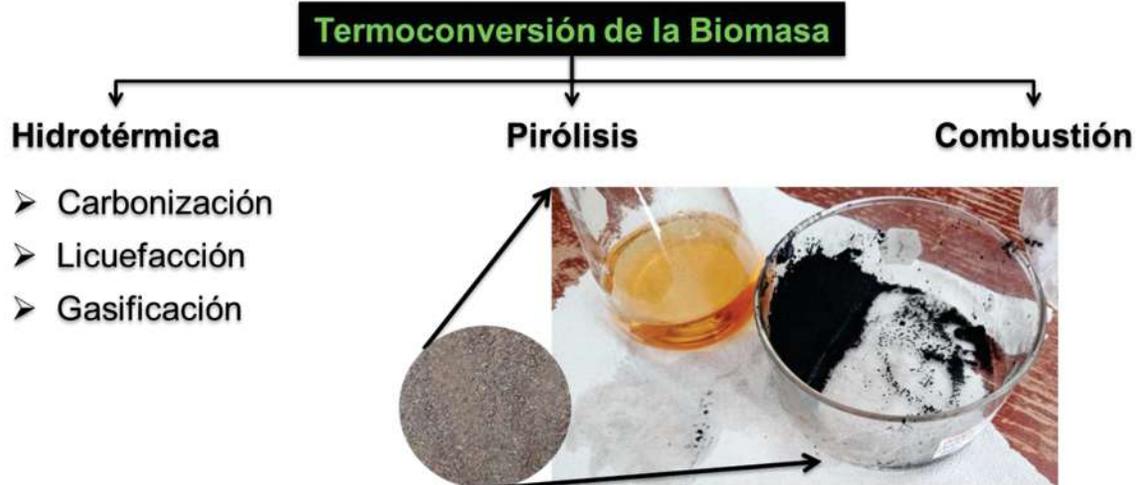


Figura 9. Métodos de termoconversión. En la figura se muestran los principales métodos de termoconversión de la biomasa entre los que debemos destacar a la carbonización hidrotérmica (HTC) un proceso que permite obtener bioaceite y biocarbón a partir del sometimiento de la biomasa a condiciones de temperatura y presión, en una atmósfera libre de oxígeno y utilizando el agua como solvente (Imagen propia).

Otro proceso de conversión termoquímica, que no ha sido suficientemente explorado en términos de obtener moléculas bioactivas es la carbonización hidrotérmica (HTC, hydrothermal carbonization por sus siglas en inglés). Algunas de las ventajas que tiene este proceso es que no ocasiona un impacto negativo en el medio ambiente, requiere una baja cantidad de energía, utiliza el agua como disolvente, un solvente que es aceptable desde el punto de vista toxicológico, no es costoso y además, se podrían obtener las moléculas bioactivas ligadas a la matriz vegetal que no se pudieron obtener por métodos de extracción convencional (95). Las características propias de la HTC se describen a continuación.

2.6.2.1. Carbonización hidrotérmica

La HTC es un proceso de conversión termoquímica en donde la biomasa es colocada en agua y sometida a temperatura y presión durante un intervalo de tiempo. Como resultado de este proceso se obtiene una fracción sólida (biocarbón), una fracción líquida (bioaceite) y una fracción gaseosa (biogás), la proporción de estas fracciones así como su composición química dependerá de las características de la biomasa utilizada así como de las condiciones propias de reacción (95) (**Figura 10**).

La HTC comprende etapas de hidrólisis de la biomasa formando moléculas más pequeñas, deshidratación y condensación o polimerización. Las condiciones de reacción que se emplean en el proceso de HTC incluyen temperaturas entre 180 °C hasta 250-300 °C y tiempos de reacción de varias horas. Las presiones del sistema son autógenas, sin necesidad de introducir presión adicional. Tiempos de reacción muy largos favorecen la formación de productos gaseosos y la cantidad de carbono procedente de HTC se ve disminuida. Por otro lado, la densidad energética del carbono aumenta conforme aumentan las condiciones severas de reacción (160).

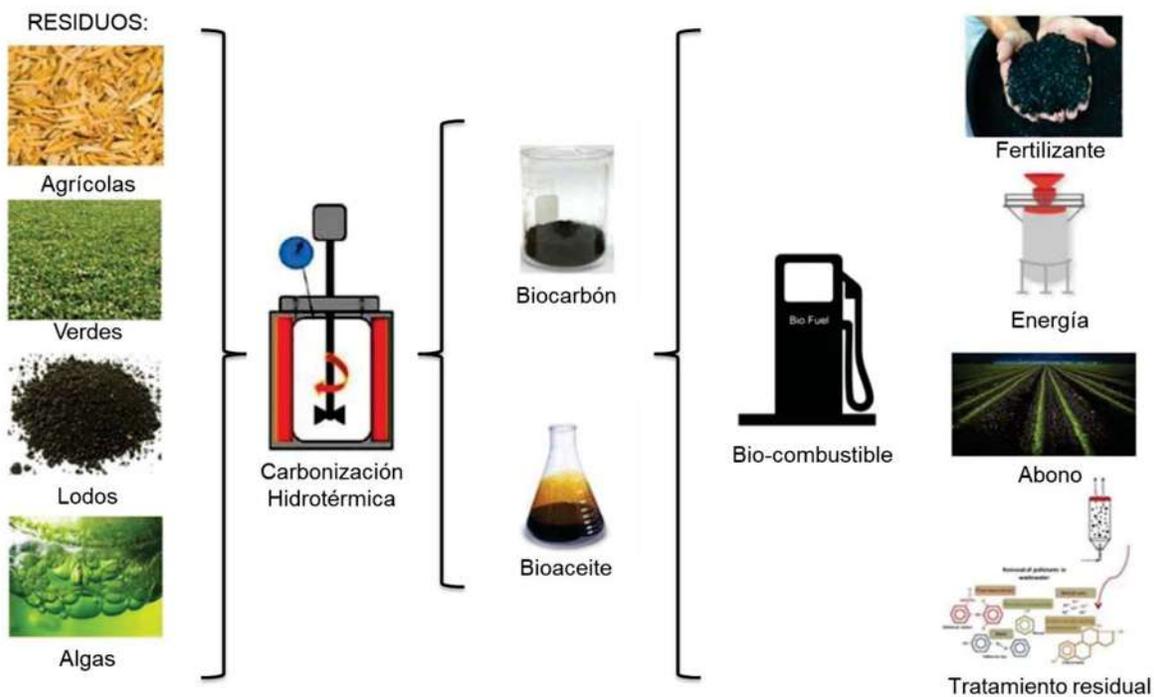


Figura 10. Carbonización hidrotérmica. La carbonización hidrotérmica de la biomasa genera como resultado una fracción sólida denominada biocarbón y una fracción líquida llamada bioaceite. A partir de estas fracciones, se pueden generar productos de alto valor agregado (161).

Comparativamente a la pirólisis; un método de termoconversión ya utilizado por nuestro equipo de investigación para obtener moléculas bioactivas para la psoriasis (1), las reacciones de la HTC resultan energéticamente más favorables debido a que necesitan menor energía de activación que las reacciones de pirólisis. La degradación de la biomasa empieza con una reacción de hidrólisis que es un proceso que requiere una baja energía de activación y se requieren menores temperaturas de reacción. Diferentes reacciones químicas tienen lugar a lo largo de la HTC. Dentro de las diferentes reacciones que se dan a lo largo del proceso se encuentran la hidrólisis,

deshidratación, descarboxilación, condensación, polimerización y aromatización (**Figura 11**). Estas reacciones pueden ser consecutivas pero muchas veces se producen en paralelo (160).

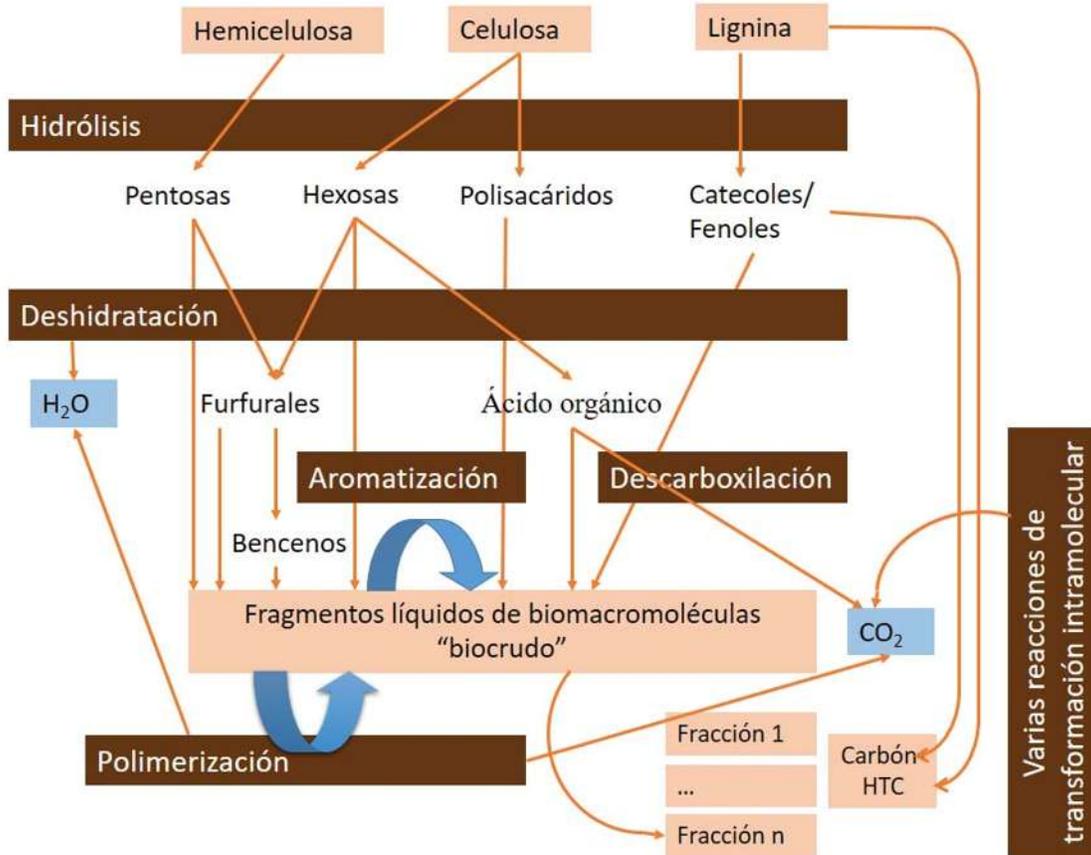


Figura 11. Reacciones químicas que tienen lugar durante la carbonización hidrotérmica (162).

Es importante mencionar que las características fisicoquímicas del agua cambiarán con respecto a la temperatura y la presión (punto crítico del agua = 374 °C y 22.1 MPa) de manera que podemos tener un proceso hidrotérmico con condiciones sub-críticas o supercríticas. Conforme aumente la temperatura del agua, los componentes de la biomasa serán más solubles en ella (95). La descomposición de la biomasa durante su procesamiento hidrotérmico comprende las siguientes etapas: cuando el agua alcanza una temperatura de 100 °C todos los componentes solubles de la biomasa quedan disueltos en ella; a los 150 °C comienza a llevarse a cabo la hidrólisis de los polímeros de hemicelulosa y celulosa a cadenas monoméricas; a los 200 °C las moléculas del agua comienzan a ionizarse formando iones hidronio los cuales catalizan la hidrólisis de

la celulosa formando oligómeros de celulosa y glucosa. Finalmente, a los 300 °C comienza el proceso de formación del bioaceite (95,163).

La glucosa formada durante la HTC se puede isomerizar a fructosa; ambas formas se descomponen a ácido etanoico, 2-hidroxi-propoico, propenoico, 4-oxopentanoico y metanoico; durante este proceso de deshidratación y fragmentación se lleva a cabo la formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) y polifuranos los cuales a través de una deshidratación inter- e intramolecular así como reacciones de condensación aldólica y tautomerismos ceto-enol van a formar partículas con un núcleo hidrofóbico y una hoja hidrofílica que en conjunto formaran el biocarbón. Por otra parte, los principales compuestos fenólicos obtenidos a partir de la degradación de lignina por el procesamiento hidrotérmico son fenoles con grupos metilo y etilo (95,163).

Aunque no se comprenden todas las reacciones químicas de formación de los carbones por HTC se considera que al tener una energía de activación más baja que la mayoría de las otras reacciones, la hidrólisis es la reacción que rige la HTC. Durante esta reacción, los enlaces éster y éter de la hemicelulosa (a $T > 180$ °C), la celulosa (a $T > 200$ °C) y la lignina (a $T > 220$ °C) se descomponen en muchos fragmentos. Las siguientes dos reacciones importantes son la deshidratación y la descarboxilación, que son responsables de reducir las relaciones H/C y O/C. La deshidratación también libera más agua en el medio de reacción. Por descarboxilación, los grupos carboxilo y carbonilo se degradan y liberan CO_2 y CO . Igualmente, la polimerización por condensación tiene un impacto en la formación de los carbones durante la cual participan algunos de los fragmentos altamente reactivos de las reacciones anteriores. En esta reacción se combinan dos moléculas, lo que resulta en la formación simultánea de una molécula más grande y la liberación de una molécula pequeña (generalmente agua). Además, las reacciones de aromatización darán como resultado estructuras de polímeros aromáticos que son estables en condiciones hidrotermales y se consideran los componentes básicos del hidrocarbón obtenido por HTC (164).

En un estudio realizado utilizando la HTC, se emplearon dos muestras representativas de biomasa procedentes del tallo de maíz, considerado un desecho agrícola, y el desecho forestal de *Tamarix ramosissima*. El análisis por GC-MS de la fracción líquida

describió la presencia básicamente de azúcares derivados de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, así como de fenoles provenientes de la degradación de la lignina. Se ha señalado que, durante la carbonización hidrotermal de la biomasa, se produce la despolimerización y repolimerización de la lignina debido al ambiente ácido. Del mismo modo ocurre su desmetoxilación y la elevación de su grado de condensación. Lo anterior contribuye a la formación de compuestos fenólicos. Claramente el tipo de compuesto generado depende de las características estructurales de la biomasa. Por ejemplo, en el caso del tallo de maíz sometido a la HTC se encontró que los principales monómeros fenólicos presentes en la fracción acuosa (aceite ligero) consistían principalmente en ácido 2,6-dimetoxilo, butil-2-metilpropilester-1,2-bencenodicarboxílico y 4-etoxi-2,5-dimetoxibenzaldehído. En contraste, los principales tipos de fenoles en el desecho forestal de *T. remosissima* fueron 2,6-dimetoxifenol, 3-metoxi-1,2-bencenodiol, p-xileno y fenol (165).

En un estudio más reciente, Del Castillo-Llamosas et al., (2021) describen los compuestos presentes en la cáscara de aguacate después de someterla a un tratamiento hidrotérmico (**Tabla 5**), así mismo, los autores indican la actividad antioxidante de diferentes fracciones obtenidas a distintas temperaturas de reacción (**Tabla 6**).

Tabla 5. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate sometida a tratamiento hidrotérmico analizados por UHPLC-TOF-MS.

Ácido gálico	Ácido cafeico
Ácido neoclorogénico	Ácido quínico
Procianidina dímero B	Ácido 4-hidroxibenzoico
Catequina	Ácido benzoico
Epigallocatequina	Quercetina-dihexosa
Ácido clorogénico/Ácido cafeoilquínico	Nudiposide
Epicatequina	Cinchonain
Taxifolin	Quercetina-O-arabinosil-glucósido
Ácido p-Cumárico	Kaempferol-dihexosa/Rutina/Multinoside A
Ácido ferúlico	(±)-Naringenina
Quercetina-hexosa	Quercetina glucurónido
Quercetina	Luteolina 7-O-(2-O-pentosil) hexosido
Kaempferol	Kaempferol-hexosa
Isorhamnetina	Isorhamnetina-hexosa
Ácido sirínico	Kaempferol O-glucosil-rhamnosido

Ácido succínico	Ácido trihidroxioctadecenoico
Ácido vanílico	Ácido hidroxio-oxo-octadecenoico
Ácido dihidrocafeico/Etil protocatecuato	Ácido dihidroxio-octadecenoico
Vainillina	Ácido hidroxio-octadecadienoico
Ácido Gentísico/Ácido protocatecuico	Ácido palmítico

Tomado de (166).

Tabla 6. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la fracción líquida de la cáscara de aguacate sometida a tratamiento hidrotérmico a diferentes temperaturas.

Temperatura	Fenoles ¹	Flavonoides ²	DPPH• ³	ABTS•+ ³	FRAP ³
140 °C	3.13 ± 0.03	6.23 ± 0.01	4.32 ± 0.10	10.14 ± 0.07	3.44 ± 0.04
150 °C	3.48 ± 0.02	6.37 ± 0.08	4.78 ± 0.01	10.80 ± 0.25	3.89 ± 0.04
155 °C	3.73 ± 0.01	7.00 ± 0.04	5.39 ± 0.04	11.84 ± 0.47	3.95 ± 0.05
160 °C	3.73 ± 0.04	6.60 ± 0.03	5.12 ± 0.04	11.92 ± 0.20	3.76 ± 0.04
170 °C	4.06 ± 0.01	7.05 ± 0.02	4.89 ± 0.05	12.00 ± 0.19	4.27 ± 0.03

¹ Gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de cáscara seca (g GAE/100 g).

² Gramos equivalentes de rutina por cada 100 g de cáscara seca (g RE/100 g).

³ Gramos equivalentes de Trolox por cada 100 g de cáscara seca (g TE/100 g).

ABTS•+, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); DPPH•, radical α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo; FRAP; poder antioxidante férrico reductor. Tomado de (166).

3.5.2.2. Bioactividad de fracciones derivadas de la carbonización hidrotérmica

No existen en la literatura muchos estudios que se hayan dedicado a investigar las propiedades bioactivas de bioaceites obtenidos por HTC. En un estudio reciente utilizando residuos de almazara se determinó que el aceite ligero procedente de la HTC era rico en compuestos fenólicos antioxidantes, fundamentalmente en hidroxitirosol y tirosol los que podían ser obtenidos en concentraciones elevadas mediante la HTC (167). Teniendo en cuenta las investigaciones previas consideramos que es muy probable que se obtenga una alta concentración de compuestos fenólicos en los bioaceites provenientes de la HTC de la biomasa residual extraída de cáscaras de aguacate con elevada capacidad antioxidante y propiedades anti-envejecimiento comparables a las del extracto obtenido por extracción convencional, lo que permitiría aprovechar de manera integral la cáscara, ya que ambos procesos (extracción convencional y la HTC) ocurren de manera secuencial.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

El envejecimiento celular cutáneo forma parte de un proceso natural y es acelerado debido a factores exógenos entre los que se destaca la exposición prolongada a los rayos UV del sol generando un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno así como una mayor actividad enzimática que en conjunto con un proceso inflamatorio degradan la matriz extracelular dérmica (48,37,2). Este proceso puede ser atenuado reestableciendo el sistema de defensa antioxidante de la piel e inhibiendo enzimas clave implicadas en la degradación de la matriz extracelular dérmica (elastasa, hialuronidasa, colagenasa). Estudios previos han indicado que los compuestos polifenólicos, omnipresentes en el reino de las plantas, presentan alta capacidad antioxidante, pudiendo inhibir estas enzimas y por consiguiente mitigando los signos del envejecimiento cutáneo (1).

El aguacatero (*Persea americana* Mill.) es un árbol cuyo fruto ha sido valorado por sus características organolépticas, nutricionales farmacológicas y antioxidantes (3). El consumo de esta fruta genera subproductos como la cáscara que son desechados sin embargo, a partir de ella se podrían obtener moléculas bioactivas de naturaleza fenólica (5). Estas moléculas pueden ser obtenidas por métodos de extracción convencional como la maceración teniendo como resultado un extracto concentrado y una biomasa residual que generalmente es desechada. Sin embargo, aún es posible obtener moléculas a partir de esta biomasa utilizando métodos de termoconversión entre los que se destaca la carbonización hidrotérmica (HTC) (1,168,157).

Hasta el momento no existen estudios acerca de la actividad de extractos procedentes de la cáscara de aguacate obtenidos por los métodos descritos capaces de atenuar el proceso de envejecimiento celular cutáneo. Es por ello, que el objetivo de la presente investigación es evaluar la actividad antioxidante y la inhibición de la actividad enzimática de un extracto etanólico proveniente de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) así como las fracciones obtenidas por HTC sobre marcadores del envejecimiento celular cutáneo. Esta estrategia novedosa permite la utilización integral de la biomasa para el desarrollo de nuevos productos cosmeceúticos de alto valor agregado a partir de un subproducto de la industria alimenticia.

4. JUSTIFICACIÓN

Considerando que los extractos polares ni los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica procedentes del epicarpio o cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) han sido caracterizados químicamente ni estudiados para aplicaciones dermatológicas anti-envejecimiento, el presente trabajo de investigación pretende caracterizar y evaluar los efectos del extracto etanólico y de bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica procedentes de la cáscara de aguacate sobre marcadores del envejecimiento celular cutáneo con vistas a proponer futuras aplicaciones de este subproducto de la industria alimenticia para el desarrollo de nuevos productos cosmecéuticos anti-envejecimiento de alto valor agregado. Dado que la carbonización hidrotérmica será realizada después de la extracción convencional; utilizando la biomasa extraída, este método permitirá la utilización integral de la cáscara de aguacate maximizando la obtención de moléculas bioactivas.

5. HIPÓTESIS

El extracto etanólico procedente del epicarpio de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) y los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica a partir de la biomasa residual extraída, presentan efectos inhibitorios en la actividad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como en la actividad de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular dérmica.

6. OBJETIVOS

6.1. *Objetivo general*

Determinar el efecto del extracto etanólico procedente del epicarpio de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica a partir de la biomasa residual extraída sobre marcadores del envejecimiento celular cutáneo.

6.2. *Objetivos específicos*

- a) Determinar la presencia de grupos funcionales y la concentración de fenoles, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides en el extracto etanólico y en los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica.
- b) Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica sobre la captación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno involucradas en el envejecimiento celular cutáneo (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, NO^{\bullet} y ROO^{\bullet}).
- c) Determinar la actividad del extracto etanólico y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica sobre la inhibición de la actividad de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular dérmica (tirosinasa, elastasa, colagenasa e hialuronidasa).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para dar cumplimiento a los objetivos mencionados, se planteó la siguiente estrategia experimental (**Figura 12**); se realizó una colecta de frutos de aguacate y un análisis botánico antes de recuperar la cáscara de los aguacates. Después de procesar y realizar una maceración con la cáscara se obtuvo un extracto etanólico concentrado y una biomasa residual que fue sometida a carbonización hidrotérmica. Finalmente, las fracciones recuperadas durante el proceso se sometieron a un análisis químico, antioxidante y enzimático.

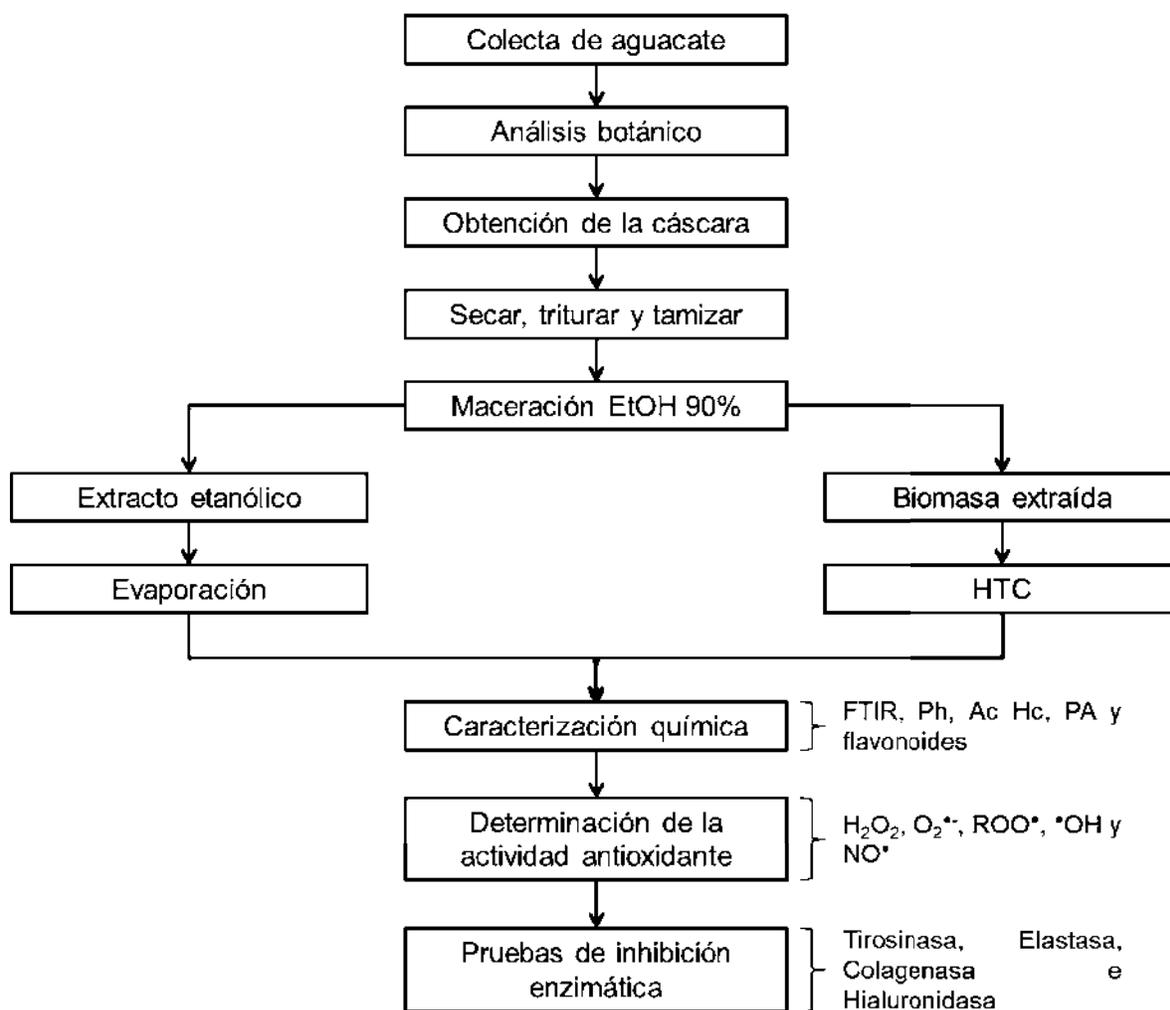


Figura 12. Diagrama de flujo. Indica los principales procesos para desarrollar el presente proyecto de investigación. Ac Hc, ácidos hidroxicinámicos; EtOH, etanol; FTIR, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier; H₂O, agua; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HTC, carbonización hidrotérmica; NO[•], óxido nítrico; O₂^{•-}, anión superóxido; PA, proantocianidinas; Ph, fenoles; ROO[•] radical peróxido; [•]OH, radical hidroxilo.

8. METODOLOGÍA

8.1. *Colecta de frutos de aguacate y análisis botánico*

Para cumplir con los objetivos del presente proyecto, se realizó una colecta de los frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) en una huerta localizada en San Andrés Coru, municipio de Uruapan, Michoacán, México (Latitud: 19.419756°, Longitud: -101.976952°). Todas las muestras fueron colectadas de un solo árbol y conservadas hasta su maduración.

Para el análisis botánico, se colectaron ramas con hojas y flores. Además, se midieron las dimensiones del árbol y del fruto. Las muestras colectadas se llevaron al Instituto de Ecología de Pátzcuaro, Michoacán, México, en donde el Dr. Emmanuel Pérez-Calix realizó la identificación botánica y el registro en la base de datos del herbario del Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío (IEB-INECOL): M. Avalos V. 1 (IEB 266506).

8.2. *Obtención de las cáscaras del aguacate*

Las cáscaras fueron recuperadas cuando los aguacates alcanzaron su estado de maduración óptimo para su consumo (se determinó por el cambio de coloración del epicarpio de verde a negro). Las cáscaras fueron lavadas con agua a 25 °C para retirar la mayor parte de la pulpa, se cortaron en pequeños fragmentos, se colocaron en una estufa de secado a una temperatura de 50 °C durante 48 horas, fueron molidas y tamizadas hasta obtener un tamaño de partícula ≤ 850 μm (156).

8.2.1. *Determinación del porcentaje en humedad*

La determinación del porcentaje en humedad del polvo de las cáscaras de aguacate se realizó con base en lo establecido en la Norma Mexicana 083 (NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios) (169) para ello, se tomó una muestra representativa del polvo por triplicado y se colocó en una estufa a 100 °C \pm 5 °C hasta obtener un peso constante; con una diferencia no mayor al 0.1% entre cada medición.

$$\text{Porcentaje en Humedad} = \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100$$

En donde: P es el peso del recipiente con la muestra húmeda, P_1 es el peso del recipiente con la muestra seca y P_2 es el peso de la muestra (169).

8.3. Obtención del extracto etanólico

Para la obtención del extracto etanólico se utilizaron 15 g del polvo obtenido de las cáscaras de aguacate y se le agregó etanol al 90% [1:10]. La solución se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 48 horas. Después, se recuperó el extracto etanólico por decantación y se conservó en refrigeración mientras que al precipitado se le agregó nuevamente etanol al 90% para realizar una segunda maceración. Finalmente, todo el extracto se filtró con papel Watman[®]96; el extracto etanólico se conservó en botellas ámbar a 4 °C y el residuo sólido (biomasa residual extraída) se colocó en una estufa de secado a 50 °C durante 48 horas, se tamizó a un tamaño de partícula entre 850 y 425 μm , se aseguró que su porcentaje en humedad fuera inferior a un 10% y se conservó para posteriormente realizar carbonización hidrotérmica (156).

A partir del extracto etanólico de las cáscaras de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) se obtuvo un concentrado sólido (EEPA); el etanol fue evaporado en un rotavapor (Science MED RE100-Pro, XZ172AD0000059) a una temperatura de 45 ± 5 °C, una velocidad de rotación de 20 a 55 rpm y un vacío de 45 ± 5 cmHg. Después, se continuó evaporando el agua de la muestra incrementando la temperatura a 55 ± 5 °C. Se consideró el peso inicial (rendimiento real) y final (rendimiento teórico) de la cáscara utilizada para de esta manera determinar el porcentaje de rendimiento del extracto, como se describe en la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100$$

8.4. Carbonización Hidrotérmica

La carbonización hidrotérmica se realizó en el Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD), perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para ello, se empleó un reactor (Marca: Parr 4562, No. de serie: 26449); en el vaso del reactor, se colocaron 10 g de la biomasa residual extraída y 100 mL de agua destilada Millipore. Una vez sellado el reactor, se le inyectó nitrógeno para generar una atmósfera libre de oxígeno y una presión inicial de 75 psi. Se conectó un controlador de temperatura (Marca: Parr 4842, No. de serie: 989) al reactor y una vez que el reactor alcanzó la temperatura indicada (tiempo de permanencia) se encendió el sistema de agitación para dar inicio a la reacción, el tiempo de permanencia en todas las reacciones fue de 15 min. Las tres temperaturas a las que se sometió cada muestra de biomasa fueron de 200 °C, 250 °C y 300 °C, considerándose por lo menos tres replicas por cada condición (168).

Después de cada reacción se recuperaron dos fracciones por filtración: una fracción sólida (biocarbón) y una fracción líquida (bioaceite ligero, BAL). En aras de extraer y caracterizar las moléculas presentes en el biocarbón, así como estudiar su bioactividad, este se resuspendió en acetona [1:25 p/v], se maceró durante 24 horas, se filtró, se destiló y se recuperó el volumen de acetona resultante, lo que generó la formación de una nueva fracción conocida como bioaceite pesado (BAP). Se consideró el peso inicial de la biomasa y el peso del biocarbón obtenido para de esta manera calcular su porcentaje de rendimiento (168).

8.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La determinación de los grupos funcionales presentes en el EEPA y de los bioaceites obtenidos por HTC se realizó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). La determinación se realizó en un espectrofotómetro de FTIR (Marca: PerkinElmer® 2016) considerando un rango de longitud de onda de 4000 a 650 cm^{-1} . El análisis y la presentación gráfica de los resultados se realizó en el Software *OriginPro* (2021) (170–176).

8.6. Caracterización química de las fracciones

Con el fin de determinar la composición química del EEPA, del BAL y del BAP; se determinó el contenido en fenoles, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides por medio de espectrofotometría. Los resultados fueron comparados con el extracto comercial Oligopin[®] (Nutri-Dyn, Maple Plain, MN, USA). Cada una de las muestras se analizó considerando cinco repeticiones en cada una de las determinaciones como se describe a continuación.

8.6.1. Determinación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales se agregaron 250 μ L de Folin-Ciocalteu en agua destilada [1:1], 250 μ L de carbonato de sodio [7.5%] y 250 μ L de la muestra. Las muestras se homogenizaron y se incubaron en un baño de agua a 40 °C durante 30 min. Después de incubar, se les agregó 2.0 mL de agua destilada y finalmente, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (UV/VIS Spectrophotometer, VE-5600UV) a una longitud de onda de 750 nm (A_{750} nm). Los resultados son expresados como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g de muestra) (177).

8.6.2. Determinación de ácidos hidroxicinámicos totales

Para determinar el contenido de ácidos hidroxicinámicos totales se agregaron 500 μ L de la muestra, 1.0 mL de ácido clorhídrico [0.5 M], 1.0 mL del reactivo de Arnow (nitrito de sodio [10%] y molibdato de sodio [10%] en agua destilada), 1.0 mL de hidróxido de sodio [2.125 M] y 1.5 mL de agua destilada. Las muestras se homogenizaron y se midió su absorbancia (A_{525} nm). Los resultados son expresados como equivalentes de ácido clorogénico por gramo de muestra (mg ChAE/g de muestra) (157).

8.6.3. Determinación de proantocianidinas totales

Para determinar el contenido de proantocianidinas totales se utilizaron 650 μ L de la muestra, se agregaron 130 μ L de solución de hierro (sulfato de amonio férrico dodecahidratado [2%] en ácido clorhídrico [2 M]), la mezcla se homogenizo y se le agregaron 3900 μ L de butanol ácido (n-butanol y ácido clorhídrico [95:5]). La mezcla se

homogenizó nuevamente, se cubrió con papel aluminio y se incubó a 95 °C durante 40 min. Después la mezcla se enfrió con hielo durante 10 min, se dejó a temperatura ambiente durante 5 min y finalmente, se determinó su absorbancia (A_{550} nm). Los resultados son expresados como equivalentes de cloruro de cianidina por gramo de muestra (mg CChE/g de muestra) (178).

8.6.4. Determinación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales se agregaron 2.0 mL de la muestra, 2.0 mL de solución cloruro de aluminio [2%], se homogenizó la mezcla y se incubó a 20 °C durante 1 hora. Posteriormente, se homogenizó la mezcla y se determinó su absorbancia (A_{415} nm). Los resultados son expresados como equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg QE/g de muestra) (179).

8.7. Análisis de la actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante del EEPA, del BAL y del BAP, se determinó su concentración necesaria para inhibir en un 50% (EC_{50}) la formación de especies oxidantes de relevancia biológica durante el proceso de envejecimiento cutáneo: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical peroxilo (ROO^{\bullet}), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) por medio de espectrofotometría. Los resultados fueron comparados con el extracto comercial Oligopin[®] y Curcumin; procedente de la *Curcuma longa*, planta ampliamente utilizada en la medicina ayurvédica y en productos cosméticos (180–183). Cada una de las pruebas se realizó por triplicado.

El porcentaje de inhibición para el peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y radical óxido nítrico se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 \left[\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right]$$

En donde: A_0 es la absorbancia de la mezcla sin el extracto, A_1 es la absorbancia de la mezcla con el extracto y A_2 es la absorbancia del extracto (157).

Mientras que el porcentaje de inhibición para el radical peroxilo se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 \left[1 - \frac{A_{e0} - A_{ef}}{A_{c0} - A_{cf}} \right]$$

En dónde: A_{e0} es la absorbancia de la mezcla con el extracto sin 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina)-dihidrocloruro (AAPH), A_{ef} es la absorbancia de la mezcla con el extracto, A_{c0} es la absorbancia del control sin extracto y sin AAPA y A_{cf} es la absorbancia del control sin el extracto (157).

8.7.1. *Peróxido de Hidrógeno*

Para determinar la capacidad para capturar el peróxido de hidrógeno se agregaron 3.4 mL de la muestra a diferentes concentraciones y 600 μ L de H_2O_2 [40 mM], se incubó a temperatura ambiente durante 3 min y después se midió la absorbancia de las muestras (A_{230} nm) (184).

8.7.2. *Anión superóxido*

La capacidad para capturar al anión superóxido se determinó utilizando 1.0 mL de nitroazul de tetrazolio [100 μ M], 1.0 mL de nicotinamida adenina dinucleótido [468 μ M] y 1.0 mL de la muestra a diferentes concentraciones. La reacción se inició agregando 150 μ L de metosulfato de fenazina [60 μ M], se incubó 30 min a 30 °C y se midió su absorbancia (A_{560} nm) (185).

8.7.3. *Radical peroxilo*

La capacidad para capturar el radical peroxilo se evaluó agregando 3.0 mL de rojo de pirogalol [30 μ M], 50 μ L de AAPA [600 mM] y 300 μ L de la muestra a diferentes concentraciones. Después de incubar 2 horas, se determinó la oxidación del rojo de pirogalol (A_{540} nm) (186).

8.7.4. Radical hidroxilo

Para determinar la capacidad para capturar el radical hidroxilo se agregó 1.0 mL de la muestra a diferentes concentraciones, 300 μ L de sulfato ferroso heptahidratado [8 mM] y 250 μ L de H₂O₂ [20 mM]. La reacción se inició agregando 1.0 mL de ácido salicílico [3 mM] y se incubó 30 min a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 450 μ L de agua destilada, se centrifugó 10 min a 3500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia (A_{510} nm) (187).

8.7.5. Radical óxido nítrico

La capacidad para capturar el radical óxido nítrico fue determinada agregando 500 μ L de nitroprusiato de sodio [10 mM], 500 μ L de la muestra a diferentes concentraciones e incubando a 37 °C por 2.5 horas con iluminación normal. Ulteriormente, las muestras se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente protegidas de la luz, se les agregó 1.0 mL del reactivo de Griess, se incubaron 40 min a temperatura ambiente protegidas de la luz y se determinó su absorbancia (A_{548} nm) (57,188).

8.8. Análisis de la inhibición de la actividad enzimática

Para determinar la inhibición de la actividad de las diferentes enzimas del EEPA, BAL y BAP, se determinó la concentración necesaria para inhibir en un 50% (IC_{50}) la actividad de las enzimas implicadas en el proceso del envejecimiento celular cutáneo: tirosinasa, elastasa, colagenasa e hialuronidasa por medio de espectrofotometría. Los resultados fueron comparados con los respectivos inhibidores de referencia para cada enzima y con el extracto comercial Oligopin[®]. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado.

Los datos obtenidos fueron analizados en el Software *GraphPad Prism 7.00* (2016) en donde, los datos fueron normalizados considerando la absorbancia de la enzima sin inhibidor como la mayor actividad de la enzima para finalmente determinar la IC_{50} de cada muestra por medio de una regresión no lineal.

8.8.1. Enzima tirosinasa

Para determinar la capacidad para inhibir la enzima tirosinasa en una microplaca de 96 pozos se agregaron 90 μL de solución PBS (50 mM, pH = 6.5), 110 μL de L-tirosina [2 mM] y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron 70 μL de la muestra a diferentes concentraciones, 30 μL de la enzima tirosinasa (Tyrosinase from mushroom, EC Number: 1.14.18.1) [62 $\mu\text{g}/\text{mL}$], se incubó durante 5 min y se determinó la absorbancia (A_{475} nm) de las muestras cada 2 min durante 20 min en un Varioskan Flash (Thermo Scientific). Como control positivo se utilizó el ácido kójico (57).

8.8.2. Enzima elastasa

Para determinar la capacidad para inhibir la enzima elastasa en una microplaca de 96 pozos se agregaron 30 μL de solución Tris-HCl (0.2 mM, pH = 8.0), 15 μL de enzima elastasa (Elastase from porcine pancreas, EC Number: 3.4.21.36) [7 U/mL], 30 μL de la muestra a diferentes concentraciones y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron 75 μL del sustrato N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilina (SANA) [1.6 mM], se incubó durante 30 min y se determinó la absorbancia (A_{410} nm) de las muestras. Como control positivo se utilizó la EGCG (189,57).

8.8.3. Enzima colagenasa

Para determinar la capacidad para inhibir la enzima colagenasa, en una microplaca de 96 pozos se agregaron 30 μL de solución tricina [0.05 M] (con NaCl [0.40 M], CaCl_2 [0.01 M], pH = 7.5), 15 μL de enzima colagenasa (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, EC Number: 3.4.24.3) [1.1 U/mL], 15 μL de la muestra a diferentes concentraciones y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 30 μL del sustrato N-[3-(2-furil) acriloil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) [1 mM] y se determinó la absorbancia (A_{335} nm) de las muestras cada 2 min hasta 30 min. Como control positivo se utilizó la EGCG (189).

8.8.4. Enzima hialuronidasa

Se agregaron 10 μL de la enzima hialuronidasa (Hyaluronidase from bovine testes, EC Number: 3.2.1.35) [2100 U/mL], 50 μL de la muestra a diferentes concentraciones y se

incubaron 20 min a 37 °C. Después se agregaron 20 µL de CaCl₂ [12.5 mM] y se mantuvo a 37 °C durante 10 min para activar la enzima. Posteriormente, se agregaron 50 µL del sustrato (Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb) [5 mg/mL] y se incubaron a 37 °C durante 40 min para que se llevara a cabo la reacción enzima-sustrato. Después se agregaron 10 µL de NaOH [0.9 M], 20 µL de borato de sodio [0.2 M] a 37 °C durante 3 min. Posteriormente, se agregaron 50 µL de solución P-dimetilaminobenzaldehído (DAMP) (0.25 g de DAMP, 21.88 mL de ácido acético y 3.12 mL de HCl [10 N]), se incubó a 37 °C durante 10 min y se determinó la absorbancia (A_{585} nm) de las muestras cada 2 min hasta 30 min. Como control positivo se utilizó el ácido oleanólico (190,191).

8.9. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en la caracterización química, en la actividad antioxidante y enzimática se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA one-way) seguido de *Tukey's test* ($p < 0.05$). Para determinar el nivel de significación entre el EEPA y la curcumina frente al radical óxido nítrico; se determinó la normalidad de los datos con la prueba de *Shapiro-Wilk*. Igualmente, se comprobó la igualdad de varianza y se realizó la prueba *Student's t-test* ($p < 0.05$).

La relación entre el contenido en fenoles y la actividad antioxidante se determinó por medio del coeficiente de correlación de Spearman. Así mismo, se determinó la relación entre la concentración de fenoles y la inhibición enzimática a través de esta correlación ($p < 0.05$). Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados se realizaron mediante el Software *GraphPad Prism 7.00* (2016).

9. RESULTADOS

9.1. Colecta de frutos de aguacate y análisis botánico

La **Figura 13** muestra la localización geográfica del sitio de colecta de los frutos de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) enclavado en una huerta localizada en San Andrés Coru, municipio de Uruapan, Michoacán.

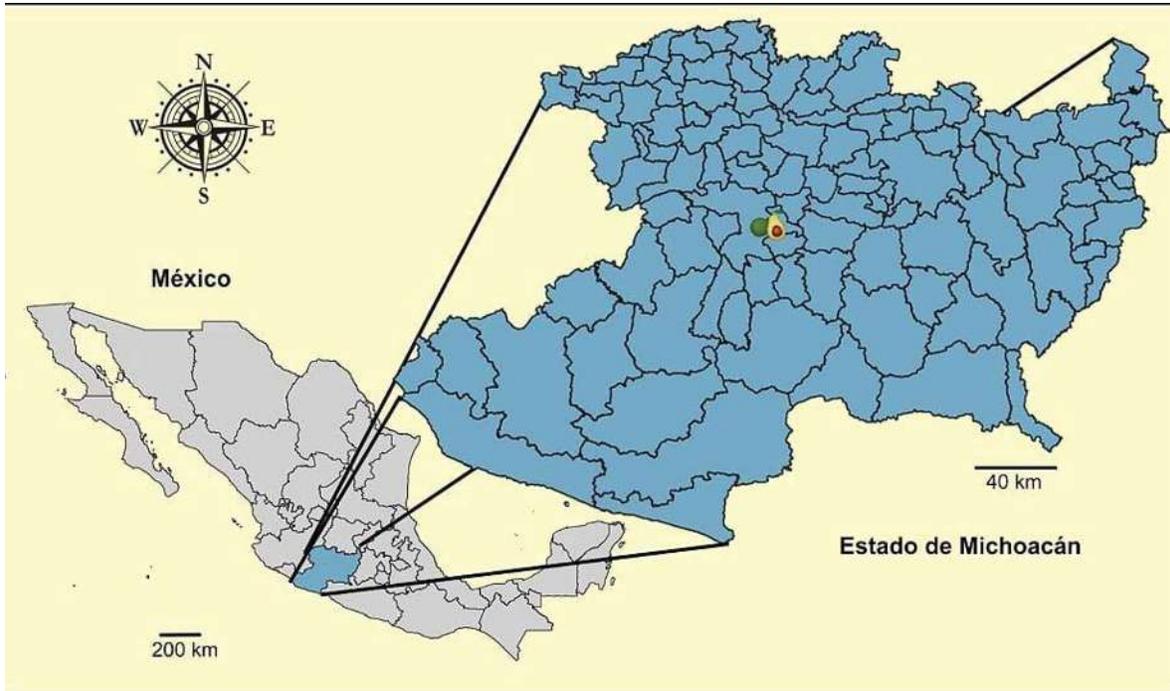


Figura 13. Localización geográfica de la colecta de aguacate. En el mapa se muestra la ubicación de la huerta en donde se colectaron los aguacates (Latitud: 19.419756°. Longitud: 101.976952°). Imagen realizada con el Mapa Digital de México-INEGI.

En la **Tabla 7** se indican las características de las muestras botánicas, identificadas por el Dr. Emmanuel Pérez-Calix. Posteriormente, fueron depositadas en el Herbario del Instituto de Ecología de Pátzcuaro, Michoacán, y registradas en la base de datos del IEB-INECOL: M. Avalos V. 1 (IEB 266506).

En total se colectaron 235 aguacates con un peso promedio de 150.95 ± 26.73 g. El peso fresco de las cáscaras recuperadas en promedio fue de 18.63 ± 3.15 g. Después de colocarlas en la estufa a 50 °C durante 48 horas, las cáscaras perdieron un porcentaje en humedad del $73.15 \pm 0.62\%$, registrándose un peso seco promedio de 5.07 ± 0.23 g.

Tabla 7. Análisis botánico. Describe el análisis botánico realizado del aguacate y su registro en la base de datos del IEB-INECOL.

Nombre:	<i>Persea americana</i> Mill. cultivar Hass	
Familia:	Lauraceae	
Localidad:	San Andrés Coru, municipio de Uruapan	
Latitud:	19.419756°	
Longitud:	101.976952°	
Altitud:	1663 m	
Estado:	Michoacán	
Fecha de colecta:	12 de septiembre de 2020	
Habitad:	Huerta de aguacate	
Colecta:	M. Avalos Viveros, 1	
Observaciones:	Árbol de 5 m con un perímetro basal de 121 cm, flor amarilla, fruto verde, tamaño del fruto 8-10 cm de diámetro. Comestible	

Registro en la base de datos del IEB-INECOL: M. Avalos V. 1 (IEB 266506).

9.2. Porcentaje en humedad

El porcentaje en humedad presente en la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) antes de su procesamiento fue del $7.07 \pm 0.04\%$. Después de obtener el extracto convencional la biomasa residual extraída se recuperó y se secó para realizar HTC, presentando un porcentaje en humedad del $3.23 \pm 0.37\%$.

9.3. Condiciones de reacción de la carbonización hidrotérmica

La velocidad media de calentamiento para llegar al tiempo de permanencia durante la carbonización hidrotérmica a 200 °C, 250 °C y 300 °C así como la presión final autógena del reactor para cada condición de temperatura se indica en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones de la HTC. En la tabla se indica la velocidad de calentamiento y la presión final autógena para cada temperatura de reacción.

Temperatura	Velocidad media de calentamiento	Presión final autógena
200 ± 5 °C	9.41 ± 0.66 °C/min	360 ± 17.32 psi
250 ± 5 °C	6.47 ± 0.10 °C/min	720 ± 20.00 psi
300 ± 5 °C	5.37 ± 0.53 °C/min	1400 ± 28.28 psi

Los valores expresan la media ± la desviación estándar (n = 3). HTC, carbonización hidrotérmica.

9.4. Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento del EEPA y del biocarbón obtenido por HTC; se presentan en la **Tabla 9** además, también se indica el volumen obtenido de bioaceite ligero después de la HTC a diferentes condiciones de reacción.

Tabla 9. Porcentaje de rendimiento. Se indica el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico, el biocarbón y el volumen del aceite ligero como consecuencia de la extracción convencional y la HTC de cáscaras de *Persea americana*.

Condición	% de rendimiento	Vol. de bioaceite ligero
EEPA	7.78 ± 4.02%*	-----
Biocarbón, HTC 200 °C, 360 psi	68.54 ± 0.55%**	58.00 ± 1.00 mL
Biocarbón, HTC 250 °C, 720 psi	55.22 ± 0.21%**	61.67 ± 3.22 mL
Biocarbón, HTC 300 °C, 1400 psi	41.47 ± 1.24%**	74.75 ± 1.26 mL

Los datos indican el promedio ± la desviación estándar. *Rendimiento calculado con relación a la cáscara seca; **Rendimiento calculado con relación a la biomasa residual extraída seca. EEPA, extracto etanólico de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) y HTC, carbonización hidrotérmica.

9.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

9.5.1. Extracto etanólico de la cáscara de aguacate

Los resultados obtenidos por FTIR para el EEPA se muestran en la **Figura 14** y en la **Tabla 10**. De acuerdo al espectro obtenido podemos mencionar la presencia de grupos hidroxilo (-OH, número de onda $\bar{\nu}$ = 2470) el cual puede corresponder a compuestos fenólicos, alcohol y/o agua así como a polímeros (-OH, $\bar{\nu}$ = 3414); dobles enlaces carbono-carbono de anillos aromáticos (HC=CH, $\bar{\nu}$ = 3004); enlaces carbono-hidrogeno de cadenas alifáticas correspondientes a metilo y metileno (-CH₃ y -CH₂, $\bar{\nu}$ = 2970), de hidrocarburos (C-H, $\bar{\nu}$ = 1425), de fragmentos insaturados (C-H, $\bar{\nu}$ = 786) así como vibraciones de estiramiento en enlaces carbono-hidrógeno (C-H, $\bar{\nu}$ = 2926), flexiones simétricas (C-H, $\bar{\nu}$ = 1360) y flexiones fuera del plano (C-H, $\bar{\nu}$ = 902); presencia del grupo carbonilo (C=O, $\bar{\nu}$ = 1712) de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas; éteres y enlaces carbono-carbono en cíclicos (=C-O-C y C-C, $\bar{\nu}$ = 1218) así como grupos hidroxilo presentes en carbonos saturados (-C-OH, $\bar{\nu}$ = 1092).

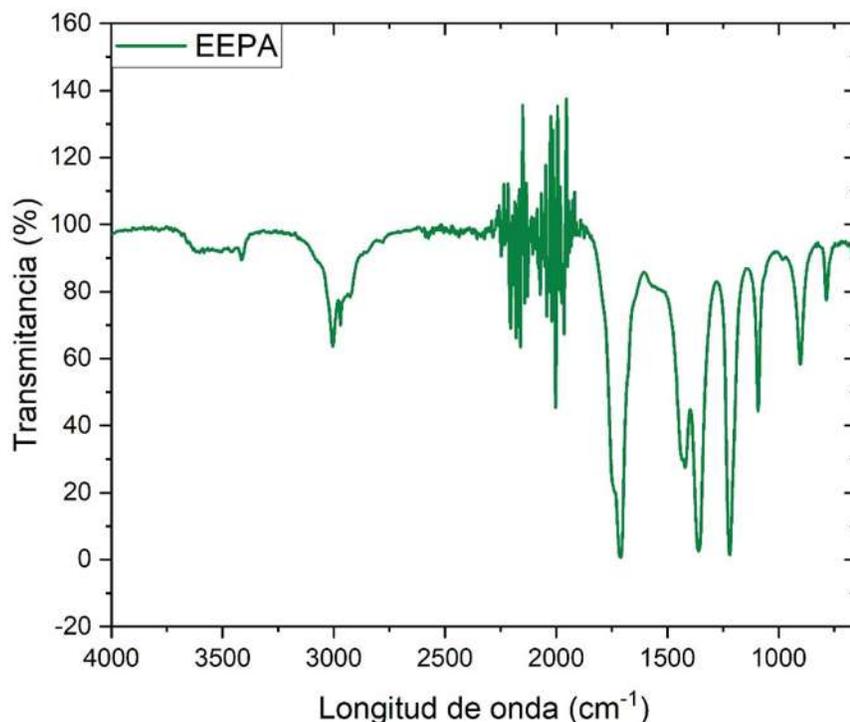


Figura 14. FTIR del EEPA. El gráfico muestra el espectro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del extracto etanólico de la cáscara de aguacate *Persea americana* Mill. cultivar Hass (EEPA).

Tabla 10. FTIR del EEPA. Se muestran los grupos funcionales identificados en el espectro de infrarrojo con transformada de Fourier del extracto etanólico.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Vibración
3440-3500	-OH	Alcohol, fenol y/o agua
3414	-OH	v OH asociación intermolecular (polímero)
3004	HC=CH	v C-H (anillo aromático)
2970	-CH ₂ /-CH ₃	v C-H alifático de grupos CH ₂ y CH ₃
2926	C-H	v C-H de los alifáticos
1712	C=O	v C=O de grupos de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas
1425	C-H	Enlaces C-H de hidrocarburos
1360	δ _s C-H	δ _s C-H (tijereteo) del grupo CH
1218	=C-O-C aromáticos	Éter R-O-R y enlaces C-C en cíclicos
1092	C-O-H	Enlace C-O-H de alcoholes que implica un carbono saturado
902	C-H	δ C-H fuera del plano
786	C-H	Vibraciones δ fuera del plano C-H características de fragmentos insaturados

EEPA, extracto etanólico de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass); vibración s, simétrica; v, alargamiento y δ, flexión.

9.5.2. Bioaceite ligero procedente de la carbonización hidrotérmica

Los resultados obtenidos por FTIR para el bioaceite ligero; fracción líquida obtenida a partir de la biomasa de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) sometida por HTC a diferentes condiciones de temperatura y presión se muestran en la **Figura 15** y en la **Tabla 11**. De acuerdo con los espectros obtenidos podemos mencionar la presencia de grupos hidroxilo (-OH, $\bar{\nu} = 3350$) el cual puede corresponder a compuestos fenólicos, alcohol y/o agua; del grupo carbonilo (C=O, $\bar{\nu} = 1700$) de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas; dobles enlaces carbono-carbono (C=C, $\bar{\nu} = 1635$); enlaces covalentes carbono-hidrógeno (C-H, $\bar{\nu} = 1430$), vibraciones de flexión simétricas del grupo metilo (C-H, $\bar{\nu} = 1370$); éteres aromáticos (Aril-O, $\bar{\nu} = 1240$), vibraciones de estiramiento del oxígeno fenólico (C-O, $\bar{\nu} = 1207$) y grupos hidroxilo presentes en carbonos saturados (C-OH, $\bar{\nu} = 1098$).

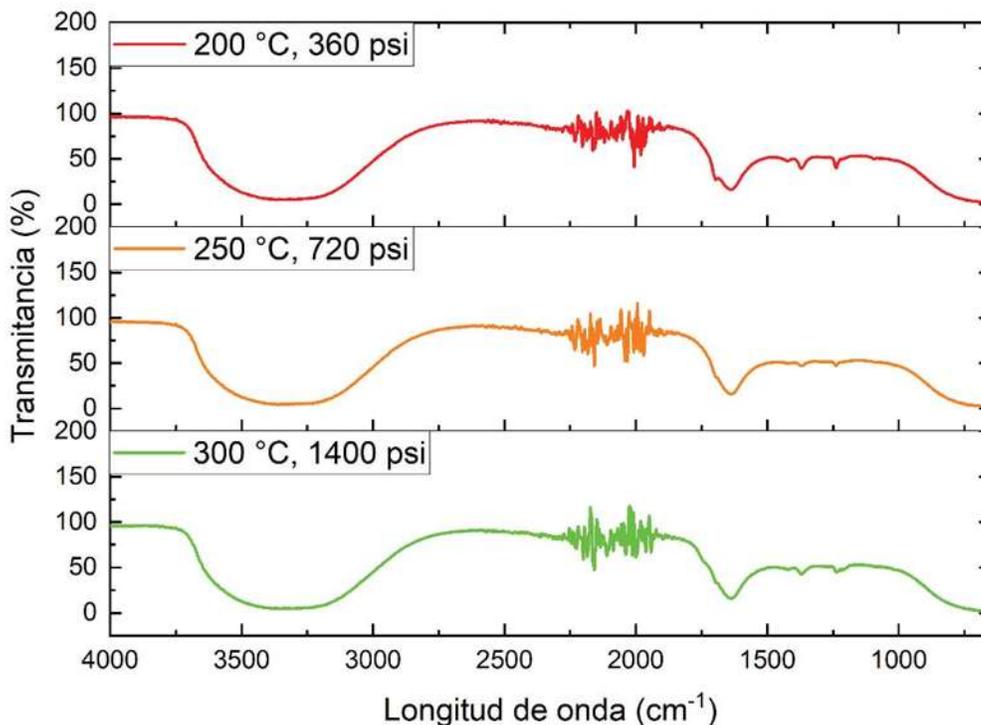


Figura 15. FTIR del bioaceite ligero. Los gráficos muestran los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del bioaceite ligero recuperado de la carbonización hidrotérmica (HTC) de la biomasa de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) sometida a diferentes condiciones de reacción.

Tabla 11. FTIR del bioaceite ligero. Se muestran los grupos funcionales identificados en los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Vibración
3340-3500	-OH	Alcohol, fenol y/o agua
1700	R-CHO	C=O <i>stretching</i>
1630-1645	C=C no conjugada	v C=C
1430	C-H	Enlaces C-H de hidrocarburos
1370-1375	δs C-H	δs C-H (tijereteo) del grupo CH ₃
1240	v C-O	Éteres aromáticos, estiramiento de aril-O
1207	v C-O	Asignado a C-O estirando vibraciones de oxígeno fenólico
1098	C-O-H	Enlace C-O-H de alcoholes que implica un carbono saturado

Vibración s, simétrica; v, alargamiento y δ, flexión.

9.5.3. Bioaceite pesado procedente de la carbonización hidrotérmica

Los resultados obtenidos por FTIR para el bioaceite pesado; fracción obtenida a partir de la maceración en acetona del biocarbón procedente de la biomasa de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) sometida por HTC a diferentes temperatura y presión se muestran en la **Figura 16** y en la **Tabla 12**. De acuerdo con los espectros obtenidos podemos mencionar la presencia de grupos hidroxilo (-OH, $\bar{\nu} = 3514$) el cual puede corresponder a compuestos fenólicos, alcohol y/o agua así como a polímeros (-OH, $\bar{\nu} = 3348$); dobles enlaces carbono-carbono de anillos aromáticos (HC=CH, $\bar{\nu} = 3007$); enlaces carbono-hidrogeno de cadenas alifáticas correspondientes a metilo y metileno (-CH₃ y -CH₂, $\bar{\nu} = 2965$), de hidrocarburos (C-H, $\bar{\nu} = 1428$), de fragmentos insaturados (C-H, $\bar{\nu} = 791$), con flexiones simétricas (C-H, $\bar{\nu} = 1365$) y flexiones fuera del plano (C-H, $\bar{\nu} = 907$); presencia del grupo carbonilo (C=O, $\bar{\nu} = 1710$) de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas; dobles enlaces carbono-carbono no conjugados (C=C, $\bar{\nu} = 1649$); éteres y enlaces carbono-carbono de cíclicos (=C-OH y C-C, $\bar{\nu} = 1223$) así como grupos hidroxilo presentes en carbonos saturados (-C-OH, $\bar{\nu} = 1095$).

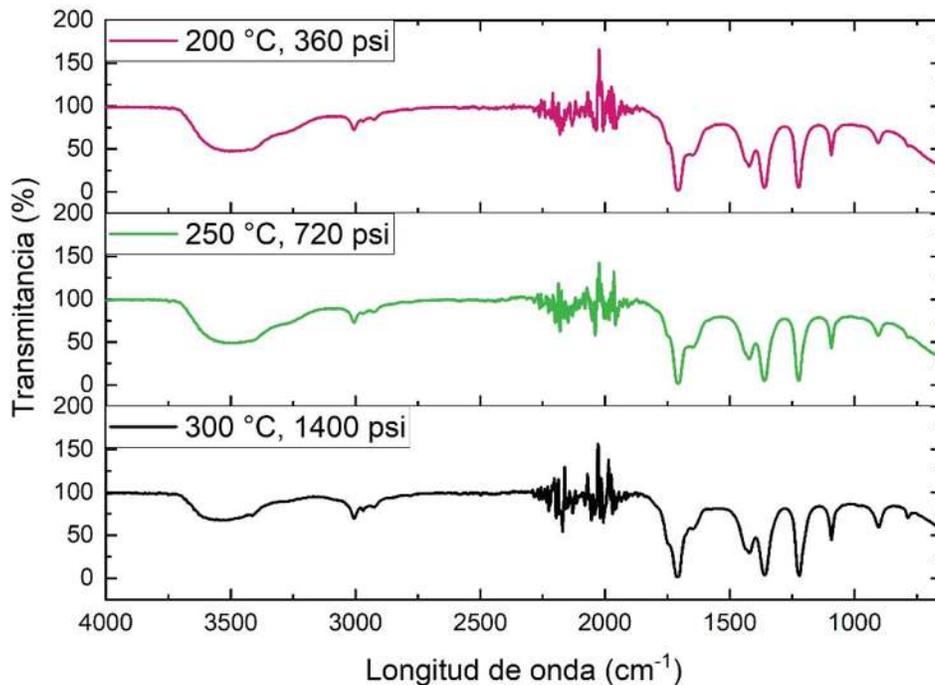


Figura 16. FTIR del bioaceite pesado. Los gráficos muestran los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del bioaceite pesado obtenido a partir de la fracción sólida de la carbonización hidrotérmica (HTC) de la biomasa de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) sometida a diferentes condiciones de reacción.

Tabla 12. FTIR del bioaceite pesado. Se muestran los grupos funcionales identificados en los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Vibración
3498-3530	-OH	Alcohol, fenol y/o agua
3280-3415	-OH	v -OH asociación intermolecular (polímero)
3005-3009	HC=CH	v C-H (anillo aromático)
2960-2975	-CH ₂ /-CH ₃	v C-H alifático de grupos CH ₂ y CH ₃
1710	C=O	v C=O de grupos de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas
1649	C=C no conjugada	v C=C
1425-1430	C-H	Enlaces C-H de hidrocarburos
1360-1370	δs C-H	δs C-H (tijereteo) del grupo CH
1220-1225	=C-O-C aromáticos	Éter R-O-R y enlaces C-C en cíclicos
1090-1100	C-O-H	Enlace C-O-H de alcoholes que implica un carbono saturado
907	C-H	δ C-H fuera del plano
791	C-H	Vibraciones C-H características de fragmentos insaturados

Vibración s, simétrica; v, alargamiento y δ, flexión.

9.6. Caracterización química del extracto etanólico y de los bioaceites

En la **Figura 17** se presentan los resultados obtenidos con relación a la caracterización química del EEPA del BAL y del BAP de acuerdo con su contenido de fenoles, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides respecto al extracto comercial Oligopin[®], obtenido a partir de cortezas del pino marítimo francés *Pinus pinaster*. Se tomó como referencia este extracto ya que es reconocido por su contenido en compuestos fenólicos y ha sido utilizado con éxito como agente anti-envejecimiento (192–197).

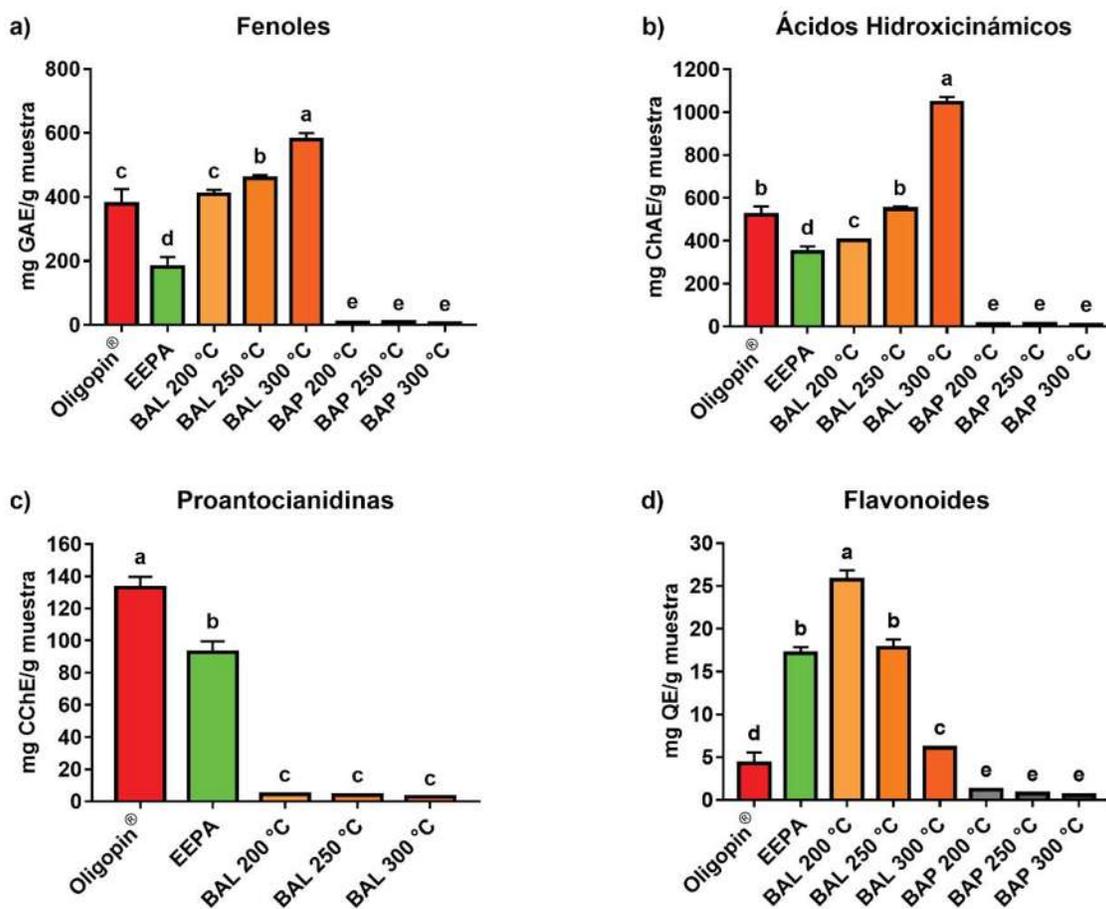


Figura 17. Caracterización química. Los gráficos muestran la composición química general del extracto etanólico obtenido por maceración y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica comparados con el extracto comercial Oligopin[®]. Se grafica el promedio \pm la desviación estándar ($n = 5$). Las diferentes letras (a, b, c, d, e) sobre cada una de las barras indican una diferencia estadísticamente significativa. $p \leq 0.05$ (ANOVA one way followed by Tukey's test). BAL, bioaceite ligero; BAP, bioaceite pesado; CChE, equivalentes de cloruro de cianidina; ChAE, equivalentes de ácido clorogénico; EEPA, extracto etanólico de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass); GAE, equivalentes de ácido gálico; QE, equivalentes de quercetina.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos apreciar que la concentración de fenoles fue significativamente más importante en los bioaceites ligeros, particularmente en los obtenidos a mayor temperatura (250 °C y 300 °C), seguidos del Oligopin[®] y del EEPA mientras que en los bioaceites pesados se constató una menor concentración (**Figura 17a**).

La concentración de ácidos hidroxicinámicos fue significativamente mayor en los bioaceites ligeros obtenidos a 300 °C y 250 °C seguidos del Oligopin[®], el bioaceite ligero obtenido a 200 °C y el EEPA. El contenido de ácidos hidroxicinámicos en el bioaceite pesado obtenido a diferentes condiciones, no presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) y su concentración fue muy inferior al compararla con el extracto comercial Oligopin[®] ($p \leq 0.0001$) y el EEPA ($p \leq 0.0001$) (**Figura 17b**).

La concentración de proantocianidinas fue mayor en el extracto comercial Oligopin[®] seguida del EEPA ($p \leq 0.0001$) y subsecuentemente de los bioaceites ligeros obtenidos a diferentes condiciones de temperatura y presión ($p > 0.05$). En el caso de los bioaceites pesados no se lograron identificar proantocianidinas mediante este método espectrofotométrico (**Figura 17c**).

La concentración de flavonoides se mostró significativamente incrementada en el bioaceite ligero obtenido a 200 °C, seguido por el EEPA, y los bioaceites ligeros obtenidos a 250 °C y 300 °C, así como el Oligopin[®]. La concentración de flavonoides en el BAP obtenido a diferentes condiciones de reacción no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) y su concentración fue muy inferior al compararla con el extracto comercial Oligopin[®] ($p \leq 0.0001$) y el EEPA ($p \leq 0.0001$) (**Figura 17d**).

9.7. *Actividad antioxidante del extracto etanólico y de los bioaceites*

La concentración necesaria para capturar en un 50% radicales de importancia biológica implicados en el proceso de envejecimiento celular cutáneo (EC_{50}) fue utilizada para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras (**Figura 18**). Una menor EC_{50} se consideró indicativo de una mayor capacidad antioxidante. Es importante mencionar que los bioaceites pesados no presentaron actividad para capturar a ninguno de los radicales estudiados.

El extracto comercial Oligopin[®] presentó la mayor actividad antioxidante para capturar al peróxido de hidrógeno al compararlo con el EEPA ($p \leq 0.0001$) y el BAL en todas las condiciones estudiadas ($p \leq 0.0001$). No hubo diferencia significativa entre el EEPA y el BAL 200 °C ($p > 0.05$) (**Figura 18a**).

La actividad antioxidante del extracto comercial Oligopin[®] fue cuatro veces superior a la del EEPA para capturar el anión superóxido ($p \leq 0.0001$), sin embargo, la capacidad del BAL (200 °C, 250 °C y 300 °C) para capturar este radical fue considerablemente superior a la mostrada por el Oligopin[®] ($p \leq 0.0001$) y a la del EEPA ($p \leq 0.0001$) (**Figura 18b**).

El extracto comercial Oligopin[®] mostró una actividad antioxidante dos veces superior para capturar el radical peroxilo al compararlo con el EEPA ($p \leq 0.0001$) y tres veces superior al compararlo con el BAL ($p \leq 0.0001$). El EEPA a diferencia del BAL presentó una mejor actividad frente a este radical ($p \leq 0.0001$). Por otro lado, la actividad del BAL 300 °C y el BAL 250 °C fue mayor al compararla con el BAL 200 °C ($p \leq 0.001$ y $p \leq 0.01$ respectivamente) (**Figura 18c**).

En cuanto a la capacidad de las muestras para capturar al radical hidroxilo destacó la actividad del bioaceite ligero obtenido a 250 °C, seguido del bioaceite ligero a 300 °C, el extracto comercial Oligopin[®] y el EEPA. Por otro lado, la actividad antioxidante del BAL 200 °C para capturar este radical fue menor a la mostrada por el Oligopin[®] y el EEPA ($p \leq 0.001$) (**Figura 18d**).

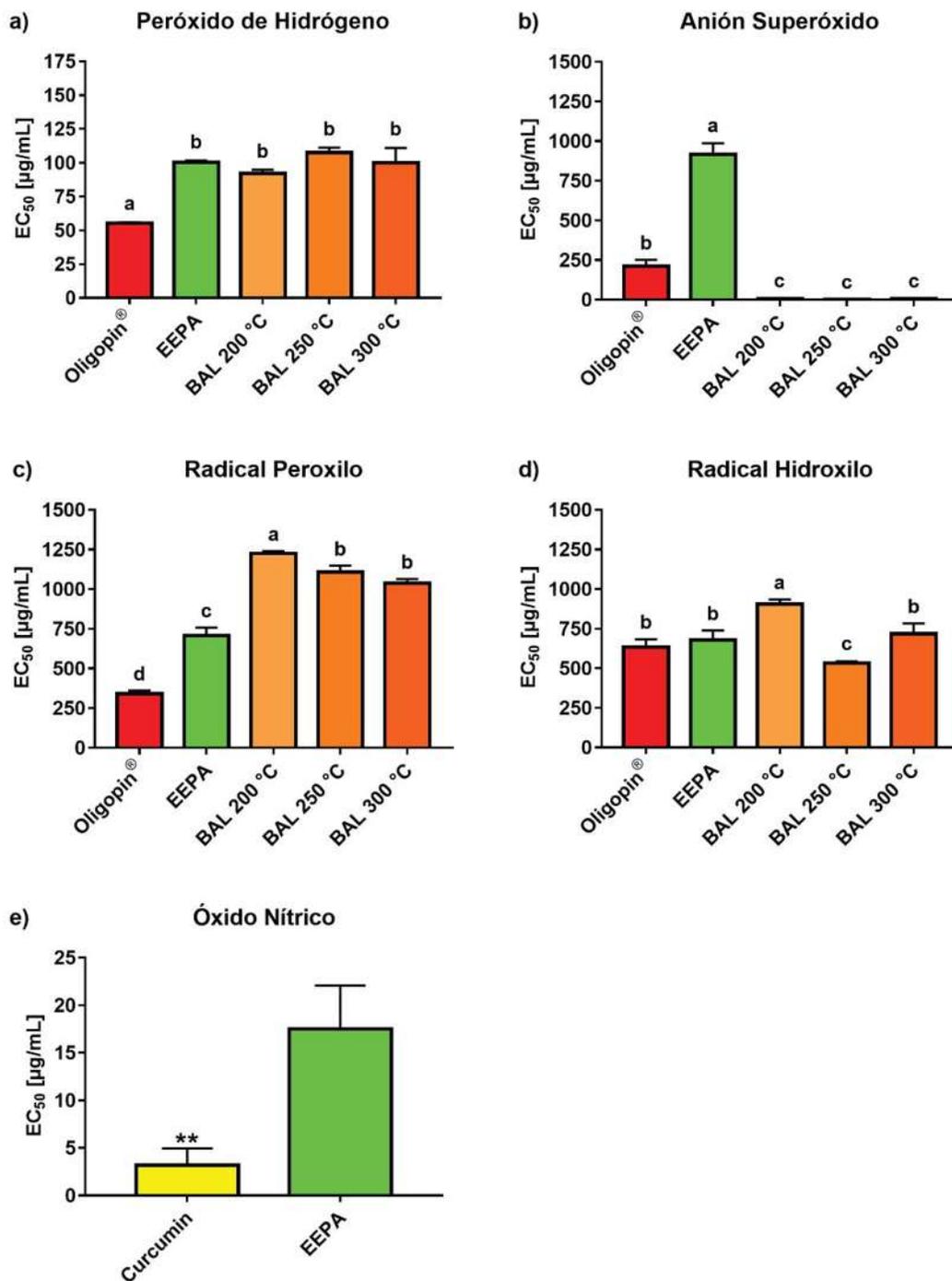


Figura 18. Actividad antioxidante. Los gráficos muestran la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido por maceración y del bioaceite ligero obtenido por carbonización hidrotérmica comparados con el extracto comercial Oligopin® y Curcumin. El bioaceite pesado no presentó actividad antioxidante y el Oligopin® no presentó actividad frente al óxido nítrico ($EC_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$), datos no mostrados. Se grafica el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Las diferentes letras (a, b, c, d, e) sobre cada una de las barras indican una diferencia estadísticamente significativa; $p \leq 0.05$ (ANOVA one way followed by Tukey's test), $**p \leq 0.01$ (Student's t-test). BAL, bioaceite ligero; EC_{50} , concentración inhibitoria del 50%; EEPA, extracto etanólico de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass).

La capacidad de las muestras para captar al óxido nítrico fue inferior a la mostrada frente a otros radicales. De hecho, solo se constató actividad para la curcumina, la que fue cinco veces superior al EEPA para inhibir la actividad del este radical ($p \leq 0.01$). El extracto comercial Oligopin® y el BAL no presentaron buena actividad ($EC_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$. Resultados no mostrados) (**Figura 18e**).

9.7.1. Correlación de Spearman: actividad antioxidante y contenido de fenoles

En un intento por determinar la relación entre la actividad antioxidante de las muestras analizadas frente a radicales de importancia biológica durante el envejecimiento celular cutáneo determinada por la EC_{50} y la concentración de compuestos fenólicos determinados en la caracterización química, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (r) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Correlación de Spearman. Correlación determinada entre los diferentes grupos de fenoles analizados y la capacidad antioxidante.

	H ₂ O ₂	O ₂ ^{•-}	ROO [•]	•OH	NO [•]
Fenoles	0.279	-0.761**	0.454	-0.082	0.500
Ácidos Hidroxicinámicos	0.029	-0.526*	-0.013	-0.229	0.500
Proantocianidinas	-0.527*	0.677**	-0.606*	-0.098	-1.000
Flavonoides	0.289	-0.154	0.754**	0.368	-0.500

En la tabla se indica el coeficiente de correlación de Spearman (r) entre la concentración de compuestos fenólicos ($n = 3$) y la capacidad antioxidante ($n = 3$) de las muestras analizadas. Correlación estadísticamente significativa: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. •OH, radical hidroxilo; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; NO[•], óxido nítrico; O₂^{•-}, anión superóxido; ROO[•], radical peroxilo.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, la capacidad para capturar al peróxido de hidrógeno está relacionada con la concentración de proantocianidinas ($r = -0.527$, $p \leq 0.05$). Esto indica que conforme aumenta la concentración de proantocianidinas se incrementa la capacidad para capturar el peróxido de hidrógeno, representada por una disminución de la EC_{50} .

La capacidad para inhibir la actividad del anión superóxido está fuertemente relacionada con la concentración de fenoles ($r = -0.761$, $p \leq 0.01$), y más débilmente con la presencia de ácidos hidroxicinámicos ($r = -0.526$, $p \leq 0.05$) en las muestras. En cambio, a la luz de los resultados obtenidos puede decirse que un incremento en las proantocianidinas ($r = 0.677$, $p \leq 0.01$) influye negativamente en la capacidad para capturar a este anión, ya que genera un aumento significativo de la EC_{50} . Esto significa

que a una menor concentración de fenoles y ácidos hidroxycinámicos se incrementa la capacidad para capturar el anión superóxido, mientras que una elevada concentración de proantocianidinas sería desfavorable para capturar a este radical.

La capacidad para capturar el radical peroxilo quedó relacionada al contenido de proantocianidinas ($r = -0.606$, $p \leq 0.05$). Sin embargo, el contenido de flavonoides ($r = 0.754$, $p \leq 0.01$) parece impactar negativamente en la capacidad de las muestras para capturar a este radical. En el caso de la capacidad para capturar al radical hidroxilo y al óxido nítrico no se encontraron asociaciones significativas con los grupos de fenoles analizados.

9.8. Inhibición de la actividad enzimática

Con el objetivo de evaluar la inhibición de la actividad enzimática de las muestras se determinó la concentración necesaria de cada una de ellas para inhibir en un 50% la actividad de enzimas implicadas en el proceso del envejecimiento celular cutáneo (IC_{50}). Una menor IC_{50} se consideró como indicativo de una mayor capacidad de inhibición enzimática (**Figura 19**).

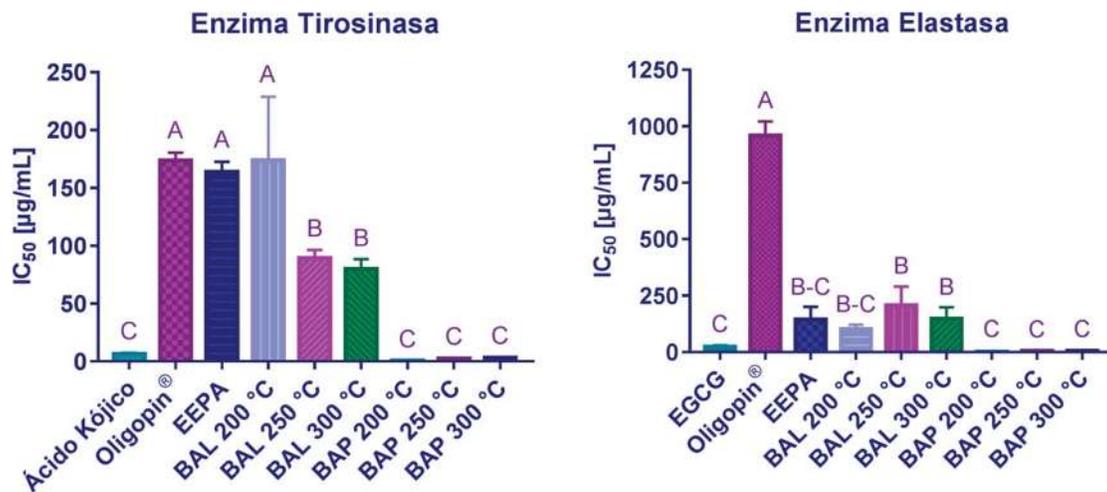


Figura 19. Inhibición de la actividad enzimática. Los gráficos muestran la inhibición de actividad enzimática de las muestras analizadas. Se grafica el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Las diferentes letras (a, b, c) sobre cada una de las barras indican una diferencia estadísticamente significativa. $p \leq 0.05$ (ANOVA one way followed by Tukey's test). BAL, bioaceite ligero; BAP, bioaceite pesado; EEPA, extracto etanólico de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass); EGCG, epigallocatequina galato; IC_{50} , concentración inhibitoria del 50%.

La capacidad de las fracciones procedentes de las cáscara de aguacate para inhibir a la enzima tirosinasa; involucrada en los proceso de hiperpigmentación de la piel, fue mayor en los bioaceites pesados presentando una actividad similar a la mostrada por el ácido kójico ($p > 0.05$); un compuesto ampliamente utilizado en la industria cosmética por sus propiedades despigmentantes. La capacidad del bioaceite ligero obtenido a 300 °C y 250 °C fue superior al compararla con el extracto comercial Oligopin[®] y el EEPA ($p \leq 0.001$). Finalmente, el EEPA, seguido del Oligopin[®] y del BAL 200 °C mostraron una actividad similar para inhibir a la enzima ($p > 0.05$) (**Figura 19a**).

La capacidad de las fracciones para inhibir la actividad de la enzima elastasa; responsable de la degradación de las fibras de elastina presentes en la matriz extracelular dérmica, fue mayor en los bioaceites pesados seguido del BAL obtenido a 200 °C y el EEPA presentando una actividad similar a la EGCG ($p > 0.05$); un compuesto polifenólico utilizado en cosméticos por sus propiedades antioxidantes. La actividad del extracto comercial Oligopin[®] frente a esta enzima fue muy inferior a la de las muestras analizadas ($p \leq 0.0001$) (**Figura 19b**).

Estos resultados sugieren que la actividad del BAP para inhibir a las enzimas tirosinasa y elastasa es muy similar a los inhibidores de referencia; ácido kójico y EGCG respectivamente, mientras que la actividad del extracto comercial Oligopin[®], del EEPA y del BAL para inhibir estas enzimas es inferior. En cuanto a la capacidad de inhibición de las enzimas colagenasa y hialuronidasa, no pudo constatarse ninguna actividad inhibitoria en las fracciones estudiadas por los métodos utilizados.

9.8.1. Correlación de Spearman: inhibición enzimática y polifenoles

En un intento por determinar la relación entre la concentración de compuestos fenólicos determinados en la caracterización química y la inhibición de la actividad enzimática determinada por la IC_{50} de las muestras analizadas, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (r) (**Tabla 14**).

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, la capacidad para inhibir la actividad de la enzima tirosinasa está relacionada con la concentración de fenoles ($r = -0.625$, $p \leq 0.05$) y ácidos hidroxicinámicos ($r = -0.593$, $p \leq 0.05$), lo que implica que en la medida

que se incrementan este tipo de fenoles en las muestras disminuye la IC₅₀ y por lo tanto la actividad de anti-tirosinasa es mayor. Sin embargo, el aumento en la concentración de proantocianidinas ($r = 0.738$, $p \leq 0.01$) influye negativamente en la capacidad para inhibir a esta enzima; debido a que se genera un aumento significativo de la IC₅₀.

Tabla 14. Correlación de Spearman. Correlación determinada entre los diferentes grupos de fenoles analizados y la inhibición de la actividad enzimática.

	Tirosinasa	Elastasa
Fenoles	-0.625*	-0.079
Ácidos Hidroxicinámicos	-0.593*	0.320
Proantocianidinas	0.738**	0.390
Flavonoides	0.271	-0.704**

En la tabla se indica el coeficiente de correlación de Spearman (r) entre la concentración de compuestos fenólicos ($n = 3$) y la inhibición de la actividad enzimática ($n = 3$) de las muestras analizadas. Correlación estadísticamente significativa: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

La capacidad para inhibir la actividad de la enzima elastasa está fuertemente relacionada con la concentración de flavonoides ($r = -0.704$, $p \leq 0.01$). Esto indica que conforme aumenta la concentración de flavonoides se incrementa la capacidad para inhibir a la enzima; representada por la disminución de la IC₅₀.

10. DISCUSIÓN

En el estudio realizado por Rodríguez-Carpena et al., (2011) con aguacate (*Persea americana* cultivar Hass), reportan un peso fresco para el fruto de 310.25 ± 17.44 g y para la cáscara de 34.46 ± 3.73 g, mientras que el porcentaje en humedad en la cáscara que los autores reportan es de $75.96 \pm 1.54\%$. De acuerdo con los resultados obtenidos los aguacates aquí analizados presentaron un menor peso con un porcentaje de humedad similar al reportado por los autores (137).

El porcentaje de rendimiento del EEPA ($7.78 \pm 4.02\%$) fue similar a lo reportado por Trujillo-Mayol y colegas; ellos reportan para el extracto de la cáscara de aguacate variedad Hass obtenido por maceración un porcentaje de rendimiento del $7.8 \pm 0.1\%$ (155). Con relación al biocarbón, también puede apreciarse lo ya descrito en la literatura; una disminución en su porcentaje de rendimiento en la medida que se incrementa la temperatura durante el proceso de HTC; de los $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a los $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ el porcentaje de biocarbón obtenido disminuyó un 13.32% (del $68.54 \pm 0.55\%$ al $55.22 \pm 0.21\%$) y a los $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ disminuyó un 13.75% (del $55.22 \pm 0.21\%$ al $41.47 \pm 1.24\%$). Estos rendimientos son similares a los reportados para el biocarbón obtenido a partir de la biomasa de la caña de azúcar sometida por HTC a las temperaturas de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (198).

La caracterización química realizada por FTIR muestra un perfil diferente en cuanto a las moléculas presentes en el extracto etanólico vs. el aceite ligero y este a su vez muestra diferencias con el aceite pesado. El extracto se presenta con una mayor diversidad de grupos funcionales particularmente aquellos relativos a grupos C=O propios de ácidos carboxílicos, cetonas y/o amidas, enlaces C-H, grupos éter e hidroxilo, seguido del bioaceite pesado quien se presenta con abundancia de grupos carbonilo propio de ácidos carboxílicos, cetonas y amidas, así como grupos éter en compuestos aromáticos y cíclicos, mientras que el aceite ligero es rico en grupos hidroxilo, probablemente fenoles. Otros estudios deben realizarse para verificar la estructura química de las moléculas presentes en cada una de las muestras estudiadas, pero con base a lo mostrado en el FTIR podría pensarse que, dadas las diferencias en

la composición química entre las muestras, también podrán encontrarse diferencias notables en la actividad biológica.

Los resultados obtenidos respecto a la composición química de las muestras analizadas muestran resultados interesantes. Los bioaceites ligeros presentaron un mayor contenido de fenoles totales que el extracto etanólico y los bioaceites pesados. Este contenido fue incluso superior al del extracto comercial Oligopin[®] para los bioaceites obtenidos a 300 °C y 250 °C, apreciándose una tendencia al aumento en la concentración de fenoles en la medida en que se incrementan las condiciones de temperatura y presión durante la carbonización hidrotérmica. Este proceso, aprovecha las singulares propiedades físicas del agua caliente comprimida, que se podría considerar como un solvente verde (199), generándose como consecuencia numerosas reacciones químicas que incluyen hidrólisis, deshidratación, descarboxilación, polimerización, aromatización y condensación (200), siendo la hidrólisis la reacción predominante durante la HTC, debido a que tiene una energía de activación más baja (201). Durante la HTC el agua caliente actúa como disolvente y reactivo. Su constante dieléctrica se reduce a temperaturas más altas, lo que hace que las características de solvatación del agua se acerquen a las de los disolventes orgánicos polares (202), lo que permitiría la obtención de moléculas bioactivas con características intermedias de polaridad. Se ha postulado que, con un incremento en la temperatura de la reacción y el aumento en la presión autogenerada, se incrementa la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina (203).

La celulosa se hidroliza principalmente a glucosa, la glucosa puede formar fructosa a través de la isomerización, que luego se somete a reacciones de deshidratación y fragmentación que conducen a la formación de varios productos solubles, como el 1,2,4-benzanotriol y los aldehídos relacionados con el hidroximetilfurfural (204). La hemicelulosa se hidroliza principalmente a pentosa y algunos oligómeros de xilano y manano, y luego se deshidrata a compuestos de furfural (205,206). La lignina se degrada principalmente a través del enlace éter o la rotura de los enlaces C-C, como el enlace β -O-4 y 5-5, dando como resultado un incremento del contenido de fenoles de tipo guaiacilo, catecol e hidroxifenilo (203). Aunque las temperaturas que usamos

durante la carbonización son moderadas y no permitirían una degradación completa de la lignina dado que es un polímero térmicamente estable, son suficientes para provocar una cierta degradación de esta, particularmente un incremento de estructuras tipo catecol, una vez iniciada la desmetilación (200). La degradación de la lignina durante la termoconversión depende en gran medida de la energía de los diferentes enlaces presentes en su estructura (207). Debido a su baja estabilidad térmica, se ha postulado que los enlaces β -O-4, pueden romperse fácilmente comparativamente a otros presentes en este polímero incluso a temperaturas moderadas (208), lo que generaría un incremento de los fenoles en la fracción acuosa. Además, se ha postulado que durante la HTC la formación de fenoles estaría asociada en primer lugar con la degradación de los carbohidratos, generándose fragmentos moleculares reactivos, seguido de una cascada de reacciones posteriores: formación de olefina/dieno, adición de Diels-Alder y aromatización posterior (209). Además, se conoce que los enlaces peptídicos se hidrolizan rápidamente en los sistemas hidrotermales: los aminoácidos, independientemente de su cadena lateral, se degradan posteriormente en fenoles debido a las reacciones de descarboxilación y desaminación (210). Nuestros resultados coinciden con los reportes anteriores que han demostrado que la extracción hidrotérmica aumenta el contenido fenólico de las hojas de orégano (211), romero (212) y de sandías (213). Además, coinciden con los obtenidos por Becker y colaboradores (2014) los que observaron un aumento en la concentración de 2-metoxifenol en la fase acuosa de varias biomásas (paja de trigo, madera de álamo y madera de pino) sometidas a HTC con el incremento de la temperatura (190 °C, 230 °C, 250 °C y 270 °C) (214).

Melgar y colaboradores (2018) realizaron una determinación de compuestos fenólicos en cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill. variedad Hass) por LC-DAD-ESI/MS obteniendo una concentración de fenoles totales de 227.9 ± 0.4 mg/g de extracto. Cabe resaltar que, de acuerdo a esta investigación, los principales compuestos fenólicos encontrados en mayor proporción en las cáscaras son derivados de la epicatequina (175 mg/g de extracto) y derivados clorogénicos (42.9 mg/g de extracto) (215). Las diferencias con respecto a nuestros resultados podrían explicarse teniendo en cuenta las diferencias en las metodologías utilizadas. El reactivo de Folin, utilizado en la

determinación de fenoles totales consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico. Se reduce, durante la oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. La coloración producida, cuya máxima absorción se sitúa entre 725 y 750 nm, es proporcional a la cantidad de polifenoles presentes en los extractos vegetales. Aunque es un método muy utilizado para estimar el contenido de fenoles de manera general no es, sin embargo, tan exacto como la cromatografía líquida ya que pueden existir interferencias en la muestra que influyan en el resultado como los aminoácidos tirosina y triptófano, incluyendo además azúcares como glucosa y fructosa, ácido ascórbico, ácido tartárico y sulfitos (216). Por otro lado, Kosińska et al., (2012) determinaron una concentración de compuestos fenólicos en cáscaras de aguacate (*Persea americana* Mill. variedad Hass) de 25.32 ± 0.242 mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco ($p \leq 0.05$). Estas variaciones en la concentración podrían ser explicadas por el grado de madurez de la fruta, las condiciones de cultivo y el tiempo de cosecha (136), pero además por diferencias en la metodología utilizada.

En un estudio realizado por Morais et al., (2015) la cáscara de aguacate (*Persea americana*) presentó un contenido de compuestos fenólicos de 1252.31 ± 165.62 mg GAE/100 g de extracto y en flavonoides 139.95 ± 13.19 mg QE/100 g de extracto, que son en sí mismas concentraciones inferiores a las encontradas en nuestro estudio. También se menciona que el extracto presenta ácido cítrico en proporción mayor (304.05 ± 1.42 μ g/100 g de peso seco), seguido de hidrato de catequina (171.02 ± 0.90 μ g/100 g de peso seco) y epicatequina galato (129.79 ± 0.70 μ g/100 g de peso seco) (151). Aunque los autores no mencionan la variedad del aguacate, se esperaría que con diferentes variedades la concentración de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de la cáscara presente diferencias. Además, las modificaciones climáticas y del suelo pueden tener influencia en la concentración de los metabolitos secundarios reportados.

En un estudio realizado por Vinha et al., en el 2013, reportan para la fruta fresca de *Persea americana* cultivar Hass producida en la región de Algarve un contenido de fenoles en la cáscara de 679.0 ± 117.0 mg GAE/100 g, en la pulpa 410.2 ± 69.0 mg GAE/100 g y en la semilla 704.0 ± 130.0 mg GAE/100 g. Mientras que la concentración

de flavonoides presentes en la cáscara, ellos reportan 44.3 ± 3.1 mg/100 g, en la pulpa 21.9 ± 1.0 mg/100 g y en la semilla 47.97 ± 2.69 mg/100 g. De acuerdo a sus resultados podemos decir que la mayor concentración de estos compuestos está presente en la semilla seguida de la cáscara y la pulpa (141). Comparando los resultados de la presente investigación, con los obtenidos por estos autores, se obtuvo una mayor concentración de fenoles y flavonoides a partir del extracto etanólico de la cascara de aguacate. Retomando el estudio de Rodríguez-Carpena y colaboradores (2011), ellos realizaron un estudio en *Persea americana* cultivar Hass obteniendo varios extractos a partir de la cáscara, la pulpa y la semilla con acetato de etilo, acetona y metanol. La mayor concentración de fenoles totales que ellos obtuvieron fue con acetona: ellos reportan una concentración superior en la cáscara (8997 ± 3103 mg GAE/100 g de peso seco) seguido de la semilla (6082 ± 863 mg GAE/100 g de peso seco) y la pulpa (100 ± 21 mg GAE/100 g de peso seco) (137). En este caso, de acuerdo a los resultados, se logró obtener el doble en la concentración de fenoles a partir del extracto etanólico de la cáscara de aguacate cultivar Hass.

La determinación en el contenido de ácidos hidroxicinámicos, se apreció una tendencia similar a la encontrada en los fenoles totales. Los bioaceites ligeros a temperaturas más elevadas presentaron el mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos. En contraste, los flavonoides disminuyeron en estos bioaceites en proporción con la temperatura de reacción. En cuanto al contenido de proantocianidinas, fue muy inferior en los bioaceites comparativamente al extracto etanólico y al Oligopin[®]. Se ha reportado un incremento del contenido de ácido propiónico con la temperatura en varias biomásas (paja de trigo, madera de álamo y madera de pino) sometidas a HTC a diferentes temperaturas 190 °C, 230 °C, 250 °C y 270 °C) (214). La presencia de ácidos hidroxicinámicos particularmente de ácido cinámico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico ha sido reportada en la fracción acuosa obtenida por HTC a 220 °C a partir de residuos sólidos derivados de la producción de aceite de oliva.

Los resultados sugieren que una degradación de los flavonoides y las proantocianidinas (cuya estructura base la constituyen unidades de flavan-3-ol) ocurre durante la HTC, lo que también fue constatado por Poerschman y colaboradores en 2015 para la fracción

acuosa derivada de la HTC de subproductos sólidos de la industria cervecera (198).

Rodríguez-Carpena et al., (2011) por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC), reportan en la cáscara de *Persea americana* cultivar Hass una concentración de ácidos hidroxibenzoicos de 1.3 ± 0.2 mg/100 g de peso seco, en ácidos hidroxicinámicos 328.1 ± 5.8 mg/100 g de peso seco, procianidinas 4183.5 ± 339.0 mg/100 g de peso seco, en flavonoides 129.0 ± 11.0 mg/100 g de peso seco y para catequinas de 228.5 ± 13.5 mg/100 g de peso seco. Los autores reportan una mayor concentración de ácidos hidroxibenzoicos en la pulpa (34.6 ± 1.1 mg/100 g de peso seco), una mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides en la cáscara así como una mayor concentración de procianidinas (4592.0 ± 129.4 mg/100 g de peso seco) y catequinas (237.8 ± 4.2 mg/100 g de peso seco) en la semilla (137). En resumen, tanto en el presente estudio como en otros descritos en la literatura científica, la cáscara se presenta como una fuente valiosa de compuestos fenólicos, en particular de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, lo que amerita un análisis detallado utilizando métodos de análisis químico para identificar el tipo de compuesto presentado.

En cuanto a las concentraciones obtenidas para el extracto comercial Oligopin[®], son similares a las reportadas por García-Pérez y colaboradores (2010). En el caso de fenoles totales, estos autores reportaron una concentración de 572.92 ± 12.07 mg GAE/g, para ácidos hidroxicinámicos 335.49 ± 3.36 mg ChAE/g, mientras que las proantocianidinas y flavonoides los valores obtenidos por los autores fueron de 104.97 ± 9.59 mg CChE/g y 7.43 ± 0.09 mg QE/g respectivamente (157). El Oligopin[®] es el nombre comercial del extracto polar de cortezas de *Pinus pinaster*, conocido como pino marítimo francés. Este extracto se vende con el nombre de Oligopin[®] o Pycnogenol[®] en 70 mercados a nivel mundial y se usa para aplicaciones medicinales como agente antioxidante y en productos de dermocosmética los cuales son ampliamente reconocidos (192–197), se consideró utilizarlo como control positivo en nuestra estrategia experimental.

Con relación al carácter antioxidante, considerando los valores de la EC₅₀ pudo apreciarse que la capacidad para captar diversas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno involucradas en el envejecimiento varió con respecto a las muestras

analizadas. El extracto comercial Oligopin[®] resultó poseer la mayor capacidad para captar al peróxido de hidrógeno y al radical peroxilo, mientras que el EEPA fue la única muestra que pudo captar al óxido nítrico. En cuanto a la capacidad para captar al anión superóxido los bioaceites ligeros (200 °C, 250 °C y 300 °C) resultaron ser los más potentes, mientras que el bioaceite ligero a 250 °C pudo captar más eficazmente al radical hidroxilo. Estas diferencias pueden explicarse por la composición química diversa de las muestras empleadas. La correlación de Spearman arrojó en este sentido datos que merecen ser analizados.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, la capacidad para capturar al peróxido de hidrógeno está relacionada con la concentración de proantocianidinas ($r = -0.527$, $p \leq 0.05$). Se ha postulado que el mecanismo principal por el cual la radiación UV inicia respuestas moleculares que conllevan al envejecimiento en la piel humana es a través de la generación fotoquímica de anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singulete (217). La literatura demuestra que extractos naturales ricos en proantocianidinas como las semillas de uva son buenos captadores de este agente oxidante (218,219), lo que podría explicar que las muestras con mayor cantidad de estos compuestos, notablemente el Oligopin[®] y el EEPA posean la mayor capacidad de captar al peróxido de hidrógeno.

La capacidad para inhibir la actividad del anión superóxido en cambio está fuertemente relacionada con la concentración de fenoles ($r = -0.761$, $p \leq 0.01$), y más débilmente con la presencia de los ácidos hidroxicinámicos ($r = -0.526$, $p \leq 0.05$) en las muestras, mientras que un incremento en las proantocianidinas ($r = 0.677$, $p \leq 0.01$) influye negativamente en la capacidad para captar a este anión. Otros estudios muestran que los fenoles pueden captar eficazmente al anión superóxido por dos mecanismos: la transferencia de protones y de un radical (220), y que muestras con mayores contenidos en fenoles totales y ácidos hidroxicinámicos son generalmente mejores para captar a este anión (156,157,221). En cuanto al efecto deletéreo de las proantocianidinas sobre la captación *in vitro* de este anión, no fue posible encontrar un mecanismo en la literatura, pero es posible que estos efectos se deban a los efectos pro-oxidativos de estas moléculas (222).

La capacidad para capturar el radical peroxilo se relacionó al contenido de proantocianidinas ($r = -0.606$, $p \leq 0.05$). Sin embargo, el contenido de flavonoides ($r = 0.754$, $p \leq 0.01$) parece impactar negativamente en la capacidad de las muestras para captar a este radical. Existe evidencia experimental que indica claramente que las proantocianidinas oligoméricas se caracterizan por una eficiencia de captación del radical peroxilo más fuerte que sus unidades monoméricas (223). Los flavonoides por su parte son compuestos aromáticos hidrofóbicos que se vuelven más solubles en agua por un mayor nivel de hidroxilación. De manera similar, la hidrofobicidad aumenta a medida que aumenta el número de grupos metoxilo. La solubilidad de los flavonoides tiene un impacto en su capacidad de captación de ROS debido a la partición de fases. La posición de los grupos hidroxilo también juega un papel importante en la captación de ROS (224). Se ha postulado que la sustitución de grupos O-metoxi por grupos hidroxilo en la posición 3 del anillo C disminuye significativamente la capacidad de captación de radicales peroxilo por parte de los flavanoles (224). Además, se ha reportado que los flavonoides con un patrón de sustituyentes de tipo fenol en su anillo B, como la apigenina y la naringenina, generan una mayor peroxidación de lípidos y actúan como un pro-oxidante en concentraciones donde otros flavonoides todavía estaban activos como antioxidantes (225).

Por otra parte, Sharififa et al., (2009) mencionan que la actividad antioxidante de los flavonoides va a depender de la conformación estructural que presente la molécula, así como de los grupos hidroxilo libres principalmente en posición 3-OH y 5-OH. Los flavonoides con el grupo 3',4'-catecol presentan mayor actividad antioxidante, en ausencia de esta estructura su actividad se puede compensar con la presencia de un grupo catecol en el anillo A (226). Los compuestos que presentan tres grupos hidroxilo en el anillo B o el O-dihidroxi en el grupo del galloyl presentan una alta actividad antioxidante como es el caso de la EGCG (227).

Otra de las configuraciones principales que favorecen la actividad antioxidante es la presencia del grupo 3',4'-orthodihidroxi en el anillo B y el grupo 4-carbonil en el anillo C. La presencia de dobles enlaces en C2-C3 para una configuración 4-ceto así como la insaturación del anillo C; permiten el movimiento de electrones, la estabilidad y la

actividad de la molécula (226). Por otro lado, la actividad antioxidante de la molécula disminuye por la presencia de compuestos metoxilados, monometilados y con derivados O-dimetilados en el anillo B o en el grupo galloyl (226,227).

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos observar que la actividad antioxidante de los flavonoides frente al radical peroxilo, así como de las proantocianidinas frente al anión superóxido disminuye, esto podría explicarse en parte por la estructura química de las moléculas presentes en cada una de las fracciones. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que nos permitan determinar con exactitud la naturaleza química de las mismas.

Globalmente el EEPA presentó una capacidad moderada para captar al peróxido de hidrógeno, radical peroxilo y anión superóxido mostrando una actividad inferior a la determinada para el extracto comercial Oligopin[®]. Otras investigaciones con extractos de aguacate coinciden con este moderado efecto con relación a la capacidad para captar estos radicales, especialmente para extractos del fruto (228).

En el caso de la capacidad para captar al radical hidroxilo no se encontraron asociaciones significativas con los grupos de fenoles analizados. Es posible que esta actividad esté modulada por otros grupos de fenoles, no determinados en este estudio, notablemente lignanos, neolignanos, cumarinas y estibenos. Llama la atención el efecto antioxidante superior mostrado por el BAL 250 °C comparativamente con otras las otras muestras analizadas sobre este radical. Se ha descrito que los radicales hidroxilo pueden atravesar las membranas celulares y dañar múltiples macromoléculas, como ácido nucleico, lípidos y aminoácidos, y de esta forma inducir daño oxidativo a tejidos como la piel (229,230). No se encontraron estudios que hayan analizado la capacidad de captación del radical hidroxilo por muestras obtenidas por carbonización hidrotérmica. Sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones previas que demuestran la capacidad de extractos de aguacate, particularmente de hojas y fruto para captar a este radical (231,232,228).

El extracto etanólico fue el único, de entre las muestras analizadas, que tuvo capacidad para captar al óxido nítrico. Otros estudios han demostrado que extractos de esta

planta, obtenidos de diferentes tejidos como las hojas presentan capacidad antioxidante para capturar al óxido nítrico (231). El óxido nítrico ejerce un papel complejo en la piel. La producción constitutiva y en bajas concentraciones a nivel cutáneo desempeña un papel en el mantenimiento de la función de barrera y en la determinación de la tasa de flujo sanguíneo en la microvasculatura. Sin embargo, los niveles más altos en la actividad de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), estimulados por la luz ultravioleta (UV) o heridas en la piel, inician otras reacciones más complejas que requieren la orquestación de varios tipos de células que podrían ser beneficiosas en procesos como la cicatrización cutánea. En contraste, el NO liberado después de la irradiación UV juega un papel importante en el inicio de la melanogénesis, el eritema y la inmunosupresión, tres procesos deletéreos para la piel (233). Se ha demostrado que los queratinocitos irradiados con UV liberan suficiente NO para inducir la melanogénesis en co-cultivos de queratinocitos/melanocitos, lo que sugiere que el NO podría actuar como un regulador autocrino y paracrino de la melanogénesis y consecuentemente de la aparición de manchas en la piel (234).

Los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de las muestras para inhibir las enzimas tirosinasa y elastasa, muestran datos sorprendentes, porque los bioaceites pesados presentan una actividad inhibitoria muy superior a las otras muestras analizadas sobre la actividad de las enzimas tirosinasa y elastasa, solo comparables a los controles positivos ácido kójico y EGCG, ampliamente utilizados en la industria cosmética. Estos bioaceites son obtenidos a partir del hidrocarbón que se forma durante la carbonización hidrotérmica. Se ha reportado que el hidrocarbón procedente de la HTC se caracteriza por una mezcla heterogénea de compuestos con diferentes grupos funcionales, donde el tipo de materia prima no influye significativamente en la composición cualitativa de los productos volátiles de su descomposición térmica. Los principales tipos de compuestos identificados en el hidrocarbón obtenido por HTC son hidrocarburos aromáticos, cíclicos y alifáticos, fenol y sus derivados, derivados de furano y otros compuestos oxigenados como ácidos, cetonas, aldehídos, óxidos de carbono. Además, en el hidrocarbón se han detectado derivados del fenol como 2-metoxifenol, 2,6-dimetoxifenol, 4-metoxi-3-metilfenol (235). Estos reportes coinciden con la alta diversidad de grupos funcionales determinados en el FTIR y podrían

relacionarse con los efectos tan significativos reportados sobre la actividad de las enzimas tirosinasa y elastasa.

Investigaciones previas han demostrado que numerosos compuestos fenólicos tales como el resveratrol, la quercetina y el ácido elálgico son excelentes para inhibir la actividad de las enzimas tirosinasa y elastasa (236,237), por consiguiente, en la presente investigación se establecieron las correlaciones entre el contenido de fenoles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y proantocianidinas con el objetivo de encontrar asociaciones estadísticamente significativas.

La acción sobre la enzima tirosinasa se muestra correlacionada con el contenido en fenoles y en ácidos hidroxicinámicos, o sea que un incremento en la concentración de estos compuestos generaría una disminución de la IC_{50} sobre la enzima, mientras que un aumento en el contenido de proantocianidinas no favorecería la actividad inhibitoria sobre la enzima, ya que incrementaría la IC_{50} . Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Chiocchio et al., (2018) los que igualmente encontraron que un mayor contenido de fenoles en los extractos naturales favorece la actividad sobre la enzima tirosinasa, mientras que también reportaron una buena correlación entre el contenido de flavonoides en las muestras y la actividad inhibitoria sobre la elastasa. Además, los autores determinaron una IC_{50} para el ácido kójico similar a la obtenida en este estudio (238). Las proantocianidinas pueden funcionar como inhibidores reversibles y competitivos de la tirosinasa. Sin embargo, su actividad parece depender de su estructura química y grado de polimerización. Un mayor grado de polimerización impactaría en una mayor actividad inhibitoria sobre la enzima (239), mientras que la presencia de grupos hidroxilo sobre el anillo B contribuiría a quelar eficazmente el cobre ubicado en el centro catalítico de la enzima (240). El presente estudio no aporta elementos acerca de la estructura química de las proantocianidinas identificadas en la cáscara de aguacate, por lo que no es posible explicar con precisión la correlación no favorable encontrada entre el contenido de proantocianidinas y la actividad para inhibir a la enzima tirosinasa. Otras investigaciones deben aún realizarse. En lo mejor de nuestro conocimiento, no existen reportes acerca de la actividad anti-envejecimiento de derivados de hidrocarbón obtenidos por HTC lo que amerita una investigación más

exhaustiva acerca de estas las moléculas, así como los mecanismos involucrados en su actividad biológica.

11. CONCLUSIONES

Puede concluirse que el epicarpio (cáscara) de aguacate representa una fuente valiosa de moléculas bioactivas. El uso conjunto de la extracción convencional con HTC permite maximizar la obtención de fracciones derivadas de la cáscara de aguacate con un perfil diferente en términos de su composición química, capacidad antioxidante, así como la inhibición de la actividad de las enzimas tirosinasa y elastasa.

La mayor diversidad de grupos funcionales se encontró en el extracto etanólico y los bioaceites pesados, mientras que los bioaceites ligeros son particularmente ricos en fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides. La capacidad antioxidante fue variada frente a los diferentes radicales probados, siendo mayor para el extracto en el caso de la captación de óxido nítrico y el radical peroxilo comparativamente a los bioaceites ligeros, pero menor en cuanto al anión superóxido y el radical hidroxilo. Aunque los bioaceites pesados mostraron una pobre capacidad antioxidante, presentaron un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de enzimas claves involucradas en el envejecimiento, como la tirosinasa y la elastasa en forma comparable con moléculas que se utilizan en la formulación de medicamentos anti-envejecimiento.

Lo anterior, sugiere que estas fracciones podrían ser utilizadas para tratar problemas distintos involucrados en el envejecimiento celular cutáneo: los bioaceites ligeros y el extracto como antioxidantes y los bioaceites pesados para tratar la hiperpigmentación y la flacidez. Así mismo, el tratamiento termoquímico de biomasa por medio HTC proporciona un método novedoso y eficaz para convertir a la biomasa residual extraída, considerada un desecho, en productos valiosos a ser aprovechados para el desarrollo de nuevos productos cosmeceúticos anti-envejecimiento de alto valor agregado.

Dado que en el presente trabajo no se determinan con exactitud las moléculas responsables del efecto antioxidante y la inhibición de la actividad enzimática, futuros estudios utilizando una estrategia de fraccionamiento bioguiado serían necesarios para

elucidar la naturaleza química de los compuestos involucrados. Otras investigaciones que analicen la capacidad de penetración de estos compuestos podrían ser útiles para predecir la posibilidad de estas moléculas para atravesar el *stratum corneum*, llegar a la epidermis viable y a la dermis para así combatir la hiperpigmentación y flacidez.

12. REFERENCIAS

1. Esquivel-García R, Ayiania M, Abu-Lail N, López-Meza JE, del Río RE, García-Pérez M, et al. Pyrolytic oils from *Amphipterygium adstringens* bark inhibit IL-8 production of IL-17-stimulated HaCaT keratinocytes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. enero de 2020;145:104749.
2. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*. julio de 2012;4(3):308–19.
3. Jimenez P, Garcia P, Quitral V, Vasquez K, Parra-Ruiz C, Reyes-Farias M, et al. Pulp, Leaf, Peel and Seed of Avocado Fruit: A Review of Bioactive Compounds and Healthy Benefits. *Food Reviews International*. el 31 de enero de 2020;1–37.
4. Yahia EM, Woolf AB. Avocado (*Persea americana* Mill.). En: *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* [Internet]. Elsevier; 2011 [citado el 4 de julio de 2020]. p. 125–186e. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978184569734150008X>
5. Wang W, Bostic TR, Gu L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. octubre de 2010;122(4):1193–8.
6. Dwivedi A, Agarwal N, Ray L, Tripathi AK, editores. *Skin Aging & Cancer: Ambient UV-R Exposure* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [citado el 4 de julio de 2020]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-2541-0>
7. Arenas-Guzmán R. *Dermatología: atlas, diagnóstico y tratamiento*. 6a ed. México D.F. [etc.: McGraw-Hill; 2015.
8. Hwa C, Bauer EA, Cohen DE. Skin biology: Systems that enhance drug delivery - skin biology. *Dermatologic Therapy*. septiembre de 2011;24(5):464–70.
9. Wong DJ, Chang HY. Skin tissue engineering. *StemBook*. el 31 de marzo de 2009;1–9.
10. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin: *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. julio de 2011;3(4):203–13.
11. Lazar AJF, Murphy GF. La piel. En: *Patología estructural y funcional*. 8a ed. España: Elsevier; 2010. p. 1165–204.
12. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M. Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on Epidermal/Dermal Cross-Talk. *Ann Dermatol*. 2016;28(3):279.
13. Mohania D, Chandel S, Kumar P, Verma V, Digvijay K, Tripathi D, et al. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. En: Ahmad SI, editor. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado el 7 de enero de 2021]. p. 71–87. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 996). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56017-5_7
14. Abraham J, Mathew S. Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. *Int J Appl Basic Med Res*. marzo de 2019;9(1):9–13.
15. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol*. febrero de 2016;25(2):92–8.
16. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado el

- 15 de febrero de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
17. Fodor L, Dumitrascu D. Skin Anatomy. En: Fodor L, Ullmann Y, editores. *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado el 15 de febrero de 2022]. p. 1–12. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-22829-3_1
 18. Sundberg JP, Booth CJ, Nanney LB, Fleckman P, King LE. Skin and Adnexa. En: *Comparative Anatomy and Histology* [Internet]. Elsevier; 2018 [citado el 16 de febrero de 2022]. p. 511–42. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029008000245>
 19. Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology*. septiembre de 2015;96:124–34.
 20. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. julio de 2015;36(7):461–70.
 21. Rousso JJ, Bassiri-Tehrani M. Skin Anatomy and Physiology. En: *Facial plastic and reconstructive surgery*. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016. p. 1–9.
 22. Peterson L, Ralston M. Aging well in an aging world: The impact of material conditions, culture, and societal disruptions. *Social Science & Medicine*. 2018;220:245–53.
 23. He W, Goodkind D, Kowal P. An Aging World: 2015. 2016 [citado el 6 de febrero de 2022]; Disponible en: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.1.1088.9362>
 24. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a Propósito del Día Mundial de la Población. Datos Nacionales [Internet]. 2021. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_POBLA_C21.pdf
 25. Kanasi E, Ayilavarapu S, Jones J. The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontol 2000*. octubre de 2016;72(1):13–8.
 26. Cefalu CA. Theories and Mechanisms of Aging. *Clinics in Geriatric Medicine*. noviembre de 2011;27(4):491–506.
 27. Datta HS, Mitra SK, Paramesh R, Patwardhan B. Theories and Management of Aging: Modern and Ayurveda Perspectives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:1–6.
 28. Pathath DrAW. Theories of Aging. *Int j Indian psychol*. el 1 de julio de 2017;4(4):15–22.
 29. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. el 26 de marzo de 2014;2014:1–6.
 30. Lee AY. Skin Pigmentation Abnormalities and Their Possible Relationship with Skin Aging. *IJMS*. el 2 de abril de 2021;22(7):3727.
 31. Al-Kaf AGA, Othman AM. A review on needle free injections. *UJPR*. el 15 de mayo de 2017;2(2):1–5.
 32. Shay JW. Telomeres and aging. *Current Opinion in Cell Biology*. junio de 2018;52:1–7.
 33. Wilkinson HN, Hardman MJ. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas*. septiembre de 2017;103:60–4.
 34. Pilkington SM, Bulfone-Paus S, Griffiths CEM, Watson REB. Inflammaging and the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. abril de 2021;141(4):1087–95.

35. Lozada SM, Rueda R. Envejecimiento cutáneo. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 2010;18(1):10–7.
36. Gladyshev VN. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxidants & Redox Signaling*. febrero de 2014;20(4):727–31.
37. Alves R, Castro Esteves T, Trelles MA. Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el envejecimiento cutáneo. *Cir plást iberolatinoam*. marzo de 2013;39(1):89–102.
38. Laga AC, Murphy GF. The Translational Basis of Human Cutaneous Photoaging. *The American Journal of Pathology*. febrero de 2009;174(2):357–60.
39. Lephart ED. Equol's Anti-Aging Effects Protect against Environmental Assaults by Increasing Skin Antioxidant Defense and ECM Proteins While Decreasing Oxidative Stress and Inflammation. *Cosmetics*. marzo de 2018;5(1):16.
40. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. mayo de 2018;27(5):729–38.
41. Baumann L. How to Use Oral and Topical Cosmeceuticals to Prevent and Treat Skin Aging. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. noviembre de 2018;26(4):407–13.
42. Lin, Wu, Hou, Chien, Chang, Wen, et al. Protective Effects of Sesamin Against UVB-Induced Skin Inflammation and Photodamage In Vitro and In Vivo. *Biomolecules*. el 12 de septiembre de 2019;9(9):479.
43. Antonicelli F, Hornebeck W. Matrix Metalloproteinases and Skin Inflammaging. En: *Inflammation, Advancing Age and Nutrition* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado el 29 de enero de 2022]. p. 255–65. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123978035000216>
44. Haque A, Woolery-Lloyd H. Inflammaging in Dermatology: A New Frontier for Research. *JDD*. el 1 de febrero de 2021;20(2):144–9.
45. Ganguly B, Hota M, Pradhan J. Skin Aging: Implications of UV Radiation, Reactive Oxygen Species and Natural Antioxidants. En: Ahmad R, editor. *Biochemistry* [Internet]. IntechOpen; 2022 [citado el 8 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/78654>
46. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*. el 7 de noviembre de 2020;10(11):1525.
47. Jesumani V, Du H, Aslam M, Pei P, Huang N. Potential Use of Seaweed Bioactive Compounds in Skincare—A Review. *Marine Drugs*. el 6 de diciembre de 2019;17(12):688.
48. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich *Spatholobus Suberectus* Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes. *Nutrients*. el 14 de junio de 2019;11(6):1341.
49. Chiu HW, Chen CH, Chen YJ, Hsu YH. Far-infrared suppresses skin photoaging in ultraviolet B-exposed fibroblasts and hairless mice. Wang YJ, editor. *PLoS ONE*. el 16 de marzo de 2017;12(3):e0174042.
50. Garg C, Khurana P, Garg M. Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors. *IJGP*. 2017;11(2):217–32.
51. Chaiprasongsuk A, Onkoksoong T, Pluemsamran T, Limsaengurai S, Panich U. Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA

- through Nrf2-dependent antioxidant responses. *Redox Biology*. agosto de 2016;8:79–90.
52. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*. agosto de 2009;7(2):47–66.
 53. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet*. el 23 de agosto de 2018;9:247.
 54. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G eun, et al. Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. noviembre de 2001;117(5):1218–24.
 55. Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*. noviembre de 2016;31:36–54.
 56. Mortensen JH, Karsdal MA. Chapter 7 - Type VII Collagen. En: Karsdal MA, editor. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* [Internet]. Academic Press; 2016 [citado el 3 de julio de 2020]. p. 57–60. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098479000076>
 57. Royer M, Prado M, García-Pérez ME, Diouf PN, Stevanovic T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition*. octubre de 2013;1(4):158–67.
 58. Uitto J. Understanding Premature Skin Aging. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337(20):1463–5.
 59. Chung JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased Extracellular-Signal-Regulated Kinase and Increased Stress-Activated MAP Kinase Activities in Aged Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. agosto de 2000;115(2):177–82.
 60. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*. julio de 2012;4(3):253–8.
 61. Laurent U, Dahl L, Reed R. Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver. *Exp Physiol*. el 1 de septiembre de 1991;76(5):695–703.
 62. Chichibu K, Matsuura T, Shichijo S, Yokoyama MM. Assay of serum hyaluronic acid in clinical application. *Clinica Chimica Acta*. mayo de 1989;181(3):317–23.
 63. Meyer LJM, Stern R. Age-Dependent Changes of Hyaluronan in Human Skin. *J Invest Dermatol*. 1994;102:358–89.
 64. Longas MO, Russell CS, He XY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydrate Research*. enero de 1987;159(1):127–36.
 65. Chaiyana W, Chansakaow S, Intasai N, Kiattisin K, Lee KH, Lin WC, et al. Chemical Constituents, Antioxidant, Anti-MMPs, and Anti-Hyaluronidase Activities of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Leaf Extracts for Skin Aging and Skin Damage Prevention. *Molecules*. el 21 de abril de 2020;25(8):1923.
 66. Lapcik L, Chabreck JR P, Stasko A. Photodegradation of hyaluronic acid: EPR and size exclusion chromatography study. *Biopolymers*. el 15 de octubre de 1991;31(12):1429–35.
 67. Stern R, Maibach HI. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology*. marzo de 2008;26(2):106–22.

68. Almine JF, Wise SG, Weiss AS. Elastin signaling in wound repair. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. septiembre de 2012;96(3):248–57.
69. Uitto J, Li Q, Urban Z. The complexity of elastic fibre biogenesis in the skin - a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Exp Dermatol*. febrero de 2013;22(2):88–92.
70. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. julio de 2011;69(3):249–56.
71. Vindin H, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin architecture. *Matrix Biology*. noviembre de 2019;84:4–16.
72. Baumann L, Bernstein EF, Weiss AS, Bates D, Humphrey S, Silberberg M, et al. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthetic Surgery Journal Open Forum*. el 1 de septiembre de 2021;3(3):ojab019.
73. Langton AK, Sherratt MJ, Griffiths CEM, Watson REB. Review Article: A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing: Elastic fibres and skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*. octubre de 2010;32(5):330–9.
74. Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an *in vitro* comparative study for anti-aging applications. *Pharmaceutical Biology*. el 1 de septiembre de 2016;54(9):1865–72.
75. Skoczylńska A, Budzisz E, Trznadel-Grodzka E, Rotsztein H. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging. *pdia*. 2017;2:97–103.
76. Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications. *Photochem Photobiol*. mayo de 2018;94(3):409–20.
77. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*. octubre de 2004;84(4):1155–228.
78. Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *British Journal of Dermatology*. septiembre de 1998;139(3):444–52.
79. Tobin DJ. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*. febrero de 2017;26(1):37–46.
80. Onkoksoong T, Jeayeng S, Pongvarin N, Limsaengurai S, Thamsermsang O, Tripatara P, et al. Thai herbal antipyretic 22 formula (APF22) inhibits UVA-mediated melanogenesis through activation of Nrf2-regulated antioxidant defense. *Phytotherapy Research*. agosto de 2018;32(8):1546–54.
81. Mi T, Dong Y, Santhanam U, Huang N. Niacinamide and 12-hydroxystearic acid prevented benzo(a)pyrene and squalene peroxides induced hyperpigmentation in skin equivalent. *Exp Dermatol*. junio de 2019;28(6):742–6.
82. Bernstein EF, Chen YQ, Kopp JB, Fisher L, Brown DB, Hahn PJ, et al. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. febrero de 1996;34(2):209–18.
83. Hubbard BA, Unger JG, Rohrich RJ. Reversal of Skin Aging with Topical Retinoids: Plastic and Reconstructive Surgery. abril de 2014;133(4):481e–90e.
84. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Kortling HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions in Aging*. diciembre de 2006;1(4):327–48.

85. Goldschmidt M, Clemow JB. Neuromodulators (Botox). En: Ferneini EM, Goupil MT, McNulty MA, Niekraś CE, editores. *Applied Head and Neck Anatomy for the Facial Cosmetic Surgeon* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado el 4 de febrero de 2022]. p. 123–9. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-57931-9_15
86. Ramos-e-Silva M, da Silva Carneiro SC. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. *J Cosmet Dermat.* marzo de 2007;6(1):40–50.
87. Pullar J, Carr A, Vissers M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients.* el 12 de agosto de 2017;9(8):866.
88. Nachbar F, Korting HC. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med.* enero de 1995;73(1):7–17.
89. Morreale M, Livrea M. Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of α -tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin homogenates. *TBMB.* septiembre de 1997;42(6):1093–102.
90. Shah AR, Kennedy PM. The Aging Face. *Medical Clinics of North America.* noviembre de 2018;102(6):1041–54.
91. American Society of Plastic Surgeons. 2020 Plastic Surgery Statistics Report. American Society of Plastic Surgeons. 2020;1–26.
92. Bajpai P. Structure of Lignocellulosic Biomass. En: *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2016 [citado el 27 de febrero de 2022]. p. 7–12. (SpringerBriefs in Molecular Science). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-0687-6_2
93. Royer M, Houde R, Viano Y, Stevanovic T. Non-wood Forest Products Based on Extractives - A New Opportunity for the Canadian Forest Industry Part 1: Hardwood Forest Species. *JFR.* el 28 de mayo de 2012;1(3):8.
94. Hori C, Ishida T, Igarashi K, Samejima M, Suzuki H, Master E, et al. Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* Genome, Transcriptome and Secretome Provides Insight into Its Pioneer Colonization Strategies of Wood. *PLOS Genetics.* 2014;10(12):20.
95. Tekin K, Karagöz S, Bektaş S. A review of hydrothermal biomass processing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* diciembre de 2014;40:673–87.
96. Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel.* agosto de 2007;86(12–13):1781–8.
97. Pecha B, Garcia-Perez M. Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass. En: *Bioenergy* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado el 27 de julio de 2021]. p. 413–42. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124079090000262>
98. Stevanovic T, Diouf P, Garcia-Perez M. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *CNF.* el 1 de noviembre de 2009;5(4):264–95.
99. Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology.* junio de 2008;11(3):278–85.
100. Dalbem-Rocha L, Costa-Monteiro M, Junger-Teodoro A. Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids -A Review. *CCO.* el 30 de octubre de 2012;1(2):109–21.
101. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A.* junio de 2003;1000(1–2):657–91.
102. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* febrero de 2005;89(2):191–8.

103. Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res.* septiembre de 2000;113(3):287–99.
104. He F, Pan QH, Shi Y, Duan CQ. Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants. *Molecules.* el 28 de octubre de 2008;13(10):2674–703.
105. Alcaraz ML, Thorp TG, Hormaza JI. Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae.* diciembre de 2013;164:434–9.
106. Scora RW, Bergh B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) Mill. *Lauraceae. Acta Horticulturae.* 1990;275:387–94.
107. Chen H, Morrell PL, Ashworth VETM, de la Cruz M, Clegg MT. Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. *Journal of Heredity.* el 20 de mayo de 2008;100(1):56–65.
108. Galindo-Tovar ME, Arzate-Fernández AM, Ogata-Aguilar N, Landero-Torres I. The Avocado (*Persea Americana*, *Lauraceae*) Crop in Mesoamerica: 10,000 Years of History. *Harvard Papers in Botany.* diciembre de 2007;12(2):325–34.
109. Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruiz HA, Pintado MME, Aguilar CN. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology.* octubre de 2018;80:51–60.
110. Ariza-Ortega JA, López-Valdez F, Coyotl-Huerta J, Ramos-Cassellis ME, Díaz-Reyes J, Martínez-Zavala A. Efecto de diferentes métodos de extracción sobre el perfil de ácidos grasos en el aceite de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass). *Rev Venez Cienc Tecnol Aliment.* 2011;2(2):263–76.
111. FAO O de las NU para la A y la A. Aumenta en un 44% la exportación del aguacate mexicano | Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. 2011 [citado el 26 de junio de 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/508691/>
112. FAO O de las NU para la A y la A. La FAO pronostica fuertes perspectivas de crecimiento para la producción y el comercio mundial de frutas tropicales | FAO [Internet]. 2019 [citado el 26 de junio de 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/1193662/>
113. Cruz-Castellanos PA, Enciso-Ortiz AD, Gómez-Vargas JA. Impacto de la exportación del aguacate hass a países bajos y mercado chino. 2019;16.
114. Arias F, Montoya C, Velásquez O. Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Rev.virtual univ catol norte.* noviembre de 2018;(55):22–35.
115. Gobierno de México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) [Internet]. 2022 [citado el 31 de enero de 2022]. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
116. Rocha-Arroyo JL, Salazar-García S, Bárcenas-Ortega AE, González-Durán IJL. Fenología del aguacate ‘Hass’ en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2011;2(3):303–16.
117. Salazar-García S, Zamora-Cuevas L, Vega-López RJ. Actualización sobre la Industria del Aguacate en Michoacán, México. *California Avocado Society.* 2004;87:45–54.

118. Sangerman-Jarquín DMA, Larqué Saavedra BS, Navarro Bravo A, Schwentesius de Rindermann R. Estudio de mercado de aguacate, guayaba y durazno en el Distrito Federal, México. *Remexca*. el 20 de septiembre de 2018;2(6):925–38.
119. Arackal JJ, Parameshwari DrS. HEALTH BENEFITS AND USES OF AVOCADO. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;6(17):392–9.
120. Hurtado-Fernández E, Fernández-Gutiérrez A, Carrasco-Pancorbo A. Avocado fruit— *Persea americana*. En: *Exotic Fruits* [Internet]. Elsevier; 2018 [citado el 21 de junio de 2020]. p. 37–48. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128031384000010>
121. Carvalho CP, Bernal E. J, Velásquez MA, Cartagena V. JR. Fatty acid content of avocados (*Persea americana* Mill. cv. Hass) in relation to orchard altitude and fruit maturity stage. *Agron colomb*. el 1 de mayo de 2015;33(2):220–7.
122. Tesfay SZ, Bertling I, Bower JP. Anti-oxidant levels in various tissues during the maturation of ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. enero de 2010;85(2):106–12.
123. Ashton OBO, Wong M, McGhie TK, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, et al. Pigments in Avocado Tissue and Oil. *J Agric Food Chem*. diciembre de 2006;54(26):10151–8.
124. Torres LO, Pérez MET, Contreras AA. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Edicions Universitat Barcelona; 2005. 177 p.
125. Blakey RJ, Tesfay SZ, Bertling I, Bower JP. Changes in sugars, total protein, and oil in ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.) fruit during ripening. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. enero de 2012;87(4):381–7.
126. Tremocoldi MA, Rosalen PL, Franchin M, Massarioli AP, Denny C, Daiuto ÉR, et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. Lightfoot DA, editor. *PLoS ONE*. el 14 de febrero de 2018;13(2):e0192577.
127. Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia*. 2002;73(5):375–80.
128. Gomez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Monreal-Cuevas E, et al. Antimicrobial Activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 2008;3(2):188–94.
129. Talabi JY, Osukoya OA, Ajayi OO, Adegoke GO. Nutritional and antinutritional compositions of processed Avocado (*Persea americana* Mill) seeds. 2016;7.
130. Nayak BS, Raju SS, Chalapathi Rao AV. Wound healing activity of *Persea americana* (avocado) fruit: a preclinical study on rats. *Journal of Wound Care*. marzo de 2008;17(3):123–5.
131. Nwaoguikpe RN, Braide W, Ujowundu CO. Biochemical composition and antimicrobial activities of seed extracts of avocado (*Persea americana*). *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2011;3(7):184–90.

132. Pahlua-Ramos ME, Ortiz-Moreno A, Chamorro-Cevallos G, Hernández-Navarro MD, Garduño-Siciliano L, Necochea-Mondragón H, et al. Hypolipidemic Effect of Avocado (*Persea americana* Mill) Seed in a Hypercholesterolemic Mouse Model. *Plant Foods Hum Nutr.* marzo de 2012;67(1):10–6.
133. Rotta EM, Morais DR de, Biondo PBF, Santos VJ dos, Matsushita M, Visentainer JV. Use of avocado peel (*Persea americana*) in tea formulation: a functional product containing phenolic compounds with antioxidant activity. *Acta Sci Technol.* 2016;38(1):23–9.
134. Adikaram NKB, Ewing DF, Karunaratne AM, Wijeratne EMK. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry.* enero de 1992;31(1):93–6.
135. Calderón-Oliver M, Escalona-Buendía HB, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Pedroza-Islas R, Ponce-Alquicira E. Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT - Food Science and Technology.* enero de 2016;65:46–52.
136. Kosińska A, Karamać M, Estrella I, Hernández T, Bartolomé B, Dykes GA. Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *J Agric Food Chem.* el 9 de mayo de 2012;60(18):4613–9.
137. Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *J Agric Food Chem.* el 25 de mayo de 2011;59(10):5625–35.
138. Santana I, Castelo-Branco VN, Guimarães BM, Silva L de O, Peixoto VODS, Cabral LMC, et al. Hass avocado (*Persea americana* Mill.) oil enriched in phenolic compounds and tocopherols by expeller-pressing the unpeeled microwave dried fruit. *Food Chemistry.* el 15 de julio de 2019;286:354–61.
139. Daiuto ÉR, Tremocoldi MA, Alencar SM de, Vieites RL, Minarelli PH. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate “Hass”. *Rev Bras Frutic.* junio de 2014;36:417–24.
140. Bertling I, Tesfay S, Bower JP. Antioxidants in “Hass” avocado. *South African Avocado Growers’ Association Yearbook.* el 1 de enero de 2007;30.
141. Vinha AF, Moreira J, Barreira SVP. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *JAS.* el 14 de noviembre de 2013;5(12):p100.
142. Amado DAV, Helmann GAB, Detoni AM, Carvalho SLC de, Aguiar CM de, Martin CA, et al. Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (*Persea americana* Mill.). *Braz J Food Technol [Internet].* el 1 de abril de 2019 [citado el 13 de marzo de 2022];22. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/bjft/a/D5ZXYLRqrY5K6RX6G8mj8sw/?lang=en>
143. Corrales-García JE, del Rosario García-Mateos M, Martínez-López E, Barrientos-Priego AF, Ybarra-Moncada MC, Ibarra-Estrada E, et al. Anthocyanin and Oil Contents, Fatty Acids Profiles and Antioxidant Activity of Mexican Landrace Avocado Fruits. *Plant Foods Hum Nutr.* el 1 de junio de 2019;74(2):210–5.
144. Oboh G, Adelusi TI, Akinyemi AJ. Inhibitory effect of phenolic extract from leaf and fruit of avocado pear (*Persea americana*) on Fe²⁺ induced lipid peroxidation in rats’ pancreas in vitro. *FUTA Journal of Research in Sciences.* 2013;9(2):276–86.

145. Boyadzhieva S, Georgieva S, Angelov G. Recovery of antioxidant phenolic compounds from avocado peels by solvent extraction. *Bulgarian Chemical Communications*. 2018;50:83–9.
146. Widsten P, Cruz CD, Fletcher GC, Pajak MA, McGhie TK. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. el 19 de noviembre de 2014;62(46):11146–56.
147. Hürkul MM, Sarialtin SY, Köroğlu A, Çoban T. In vitro inhibitory potential of avocado fruits, *Persea americana* (Lauraceae) against oxidation, inflammation and key enzymes linked to skin diseases. *RBT [Internet]*. el 19 de febrero de 2021 [citado el 10 de mayo de 2022];69(2). Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/41494>
148. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Del Pino-García R, Curiel JA, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Functional ingredient from avocado peel: Microwave-assisted extraction, characterization and potential applications for the food industry. *Food Chemistry*. agosto de 2021;352:129300.
149. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. noviembre de 2017;1864(11):2015–25.
150. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. *Food Chemistry*. abril de 2018;245:707–16.
151. Morais DR, Rotta EM, Sargi SC, Schmidt EM, Bonafe EG, Eberlin MN, et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*. noviembre de 2015;77:392–9.
152. López-Cobo A, Gómez-Caravaca AM, Pasini F, Caboni MF, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT*. el 1 de noviembre de 2016;73:505–13.
153. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Quirantes-Piné R, Segura-Carretero A. Optimization of drying process and pressurized liquid extraction for recovery of bioactive compounds from avocado peel by-product. *Electrophoresis*. el 16 de abril de 2018;
154. Rosero JC, Cruz S, Osorio C, Hurtado N. Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*. el 3 de septiembre de 2019;24(17):E3209.
155. Trujillo-Mayol I, Céspedes-Acuña C, Silva FL, Alarcón-Enos J. Improvement of the polyphenol extraction from avocado peel by assisted ultrasound and microwaves. *J Food Process Eng [Internet]*. octubre de 2019 [citado el 2 de agosto de 2021];42(6). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.13197>
156. Valencia-Avilés E, García-Pérez M, Garnica-Romo Ma, Figueroa-Cárdenas J, Meléndez-Herrera E, Salgado-Garciglia R, et al. Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus Laurina*, *Quercus Crassifolia*, and *Quercus Scytophylla* Bark. *Antioxidants*. el 26 de junio de 2018;7(7):81.

157. García-Pérez ME, Royer M, Duque-Fernandez A, Diouf PN, Stevanovic T, Pouliot R. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. octubre de 2010;132(1):251–8.
158. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. agosto de 2013;117(4):426–36.
159. Garcia-Perez M, Wang XS, Shen J, Rhodes MJ, Tian F, Lee WJ, et al. Fast Pyrolysis of Oil Mallee Woody Biomass: Effect of Temperature on the Yield and Quality of Pyrolysis Products. *Ind Eng Chem Res*. marzo de 2008;47(6):1846–54.
160. Ponce-Ballester E. El proceso de carbonización hidrotermal aplicado a la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos [Internet] [Tesis de Máster. Química Sostenible.]. [Valencia, España]: Universitat Politècnica de València; 2012. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/30137>
161. Sharma R, Jasrotia K, Singh N, Ghosh P, srivastava S, Sharma NR, et al. A Comprehensive Review on Hydrothermal Carbonization of Biomass and its Applications. *Chemistry Africa*. marzo de 2020;3(1):1–19.
162. Schlegel M, Ibrahim B, Ortiz-Laurel H, Rössel-Kipping D, Fras J, Kanswohl N, et al. Proceso de carbonización hidrotérmica para incrementar la transportabilidad de la biomasa vegetal. *AP [Internet]*. el 5 de diciembre de 2018 [citado el 24 de marzo de 2022];11(11). Disponible en: <http://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1275>
163. Sevilla M, Fuertes AB. The production of carbon materials by hydrothermal carbonization of cellulose. *Carbon*. agosto de 2009;47(9):2281–9.
164. Arias JG. Tratamientos termoquímicos para valorización energética de residuos biomásicos: viabilidad técnica y comparativa económica [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de León; 2021 [citado el 12 de enero de 2022]. p. 1. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=289201>
165. Xiao LP, Shi ZJ, Xu F, Sun RC. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. agosto de 2012;118:619–23.
166. Del Castillo-Llamas A, Rodríguez-Martínez B, del Río PG, Eibes G, Garrote G, Gullón B. Hydrothermal treatment of avocado peel waste for the simultaneous recovery of oligosaccharides and antioxidant phenolics. *Bioresource Technology*. diciembre de 2021;342(125981):1–10.
167. Gimenez M, Rodríguez M, Montoro L, Sardella F, Rodríguez-Gutierrez G, Monetta P, et al. Two phase olive mill waste valorization. Hydrochar production and phenols extraction by hydrothermal carbonization. *Biomass and Bioenergy*. diciembre de 2020;143:105875.
168. Chen J. Bio-oil production from hydrothermal liquefaction of *Pteris vittata* L.: Effects of operating temperatures and energy recovery. *Bioresource Technology*. octubre de 2018;265:320–7.
169. NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de Humedad en Productos Alimenticios. Foods. Moisture in Food Products Determination. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. 1986;

170. Torres-Garcia E, Brachi P. Non-isothermal pyrolysis of grape marc: Thermal behavior, kinetics and evolved gas analysis. *J Therm Anal Calorim.* enero de 2020;139(2):1463–78.
171. Alhumade H, da Silva JCG, Ahmad MS, Çakman G, Yıldız A, Ceylan S, et al. Investigation of pyrolysis kinetics and thermal behavior of Invasive Reed Canary (*Phalaris arundinacea*) for bioenergy potential. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* junio de 2019;140:385–92.
172. Tu JL, Yuan JJ. Thermal Decomposition Behavior of Hydroxytyrosol (HT) in Nitrogen Atmosphere Based on TG-FTIR Methods. *Molecules.* el 13 de febrero de 2018;23(2):404.
173. Galano A, Aburto J, Sadhukhan J, Torres-García E. A combined theoretical-experimental investigation on the mechanism of lignin pyrolysis: Role of heating rates and residence times. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* noviembre de 2017;128:208–16.
174. Aburto J, Moran M, Galano A, Torres-García E. Non-isothermal pyrolysis of pectin: A thermochemical and kinetic approach. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* marzo de 2015;112:94–104.
175. Quintero K, López L, Lima LD. Espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier - reflectancia total atenuada (IRTF/RTA) aplicada a la caracterización de crudos y su relación con la gravedad API. *Revista de la Facultad de Ingeniería UCV.* 2014;29(2):93–102.
176. Lopez-Velazquez MA, Santes V, Balmaseda J, Torres-Garcia E. Pyrolysis of orange waste: A thermo-kinetic study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* enero de 2013;99:170–7.
177. Scalbert A, Monties B, Janin G. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods'. *J Agric Food Chem.* 1989;37(5):1324–9.
178. Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry.* diciembre de 1985;25(1):223–30.
179. Brighente IMC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology.* enero de 2007;45(2):156–61.
180. Sekar M. Natural products in aging skin. En: *Aging* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado el 12 de enero de 2022]. p. 267–73. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128186985000262>
181. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods.* el 22 de octubre de 2017;6(10):92.
182. Ju HJ, Lee SA, Kim RH, Park BD, Kim GN. Evaluation of Curcuma longa L. Water Extracts as Beauty Food Materials in B16F10 and Human Skin Fibroblasts. *Asian J Beauty Cosmetol.* el 30 de junio de 2017;15(2):214–22.
183. Narayanaswamy R, Ismail IS. Cosmetic potential of Southeast Asian herbs: an overview. *Phytochem Rev.* junio de 2015;14(3):419–28.
184. Ruch RJ, Cheng S jun, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis.* 1989;10(6):1003–8.

185. Nishikimi M, Appaji Rao N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. enero de 1972;46(2):849–54.
186. López-Alarcón C, Lissi E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*. enero de 2006;40(9):979–85.
187. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. enero de 1989;28(4):1057–60.
188. Sreejayan, Rao MNA. Nitric Oxide Scavenging by Curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. enero de 1997;49(1):105–7.
189. Ersoy E, Eroglu Ozkan E, Boga M, Yilmaz MA, Mat A. Anti-aging potential and anti-tyrosinase activity of three *Hypericum* species with focus on phytochemical composition by LC–MS/MS. *Industrial Crops and Products*. diciembre de 2019;141:111735.
190. Castejón N, Thorarinsdottir KA, Einarsdóttir R, Kristbergsson K, Marteinsdóttir G. Exploring the Potential of Icelandic Seaweeds Extracts Produced by Aqueous Pulsed Electric Fields-Assisted Extraction for Cosmetic Applications. *Marine Drugs*. el 25 de noviembre de 2021;19(12):662.
191. Liyanaarachchi GD, Samarasekera JKRR, Mahanama KRR, Hemalal KDP. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial Crops and Products*. enero de 2018;111:597–605.
192. Kanlayavattanakul M, Lourith N. Skin hyperpigmentation treatment using herbs: A review of clinical evidences. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. el 17 de febrero de 2018;20(2):123–31.
193. Machado ECFA, Ambrosano L, Lage R, Abdalla BMZ, Costa A. Nutraceuticals for Healthy Skin Aging. En: *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado el 12 de enero de 2022]. p. 273–81. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012805376800023X>
194. Ayres EL, Costa A, Eberlin S, Clerici SP. Ex vivo study for evaluating the whitening activity of Pycnogenol® after exposure to ultraviolet and infrared radiations, and visible light. *Surgical & Cosmetic Dermatology* [Internet]. 2015 [citado el 12 de enero de 2022];7(4). Disponible en: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/scd1984-8773.201574736>
195. Marini A, Grether-Beck S, Jaenicke T, Weber M, Burki C, Formann P, et al. Pycnogenol® Effects on Skin Elasticity and Hydration Coincide with Increased Gene Expressions of Collagen Type I and Hyaluronic Acid Synthase in Women. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012;25(2):86–92.
196. Athawale R, Salavkar S, Tamanekar R. Antioxidants in skin ageing - Future of dermatology. *Int J Green Pharm*. 2011;5(3):161.
197. Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. el 1 de diciembre de 2003;147(2):137–45.
198. Pruksakit W, Patumsawad S. Hydrothermal Carbonization (HTC) of Sugarcane Stranded: Effect of Operation Condition to Hydrochar Production. *Energy Procedia*. noviembre de 2016;100:223–6.

199. Barbier J, Charon N, Dupassieux N, Loppinet-Serani A, Mahé L, Ponthus J, et al. Hydrothermal conversion of lignin compounds. A detailed study of fragmentation and condensation reaction pathways. *Biomass and Bioenergy*. noviembre de 2012;46:479–91.
200. Wikberg H, Ohra-aho T, Pileidis F, Titirici MM. Structural and Morphological Changes in Kraft Lignin during Hydrothermal Carbonization. *ACS Sustainable Chem Eng*. el 2 de noviembre de 2015;3(11):2737–45.
201. Libra JA, Ro KS, Kammann C, Funke A, Berge ND, Neubauer Y, et al. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels*. enero de 2011;2(1):71–106.
202. Yang Yu, Bowadt Soren, Hawthorne SB, Miller DJ. Subcritical Water Extraction of Polychlorinated Biphenyls from Soil and Sediment. *Anal Chem*. el 15 de diciembre de 1995;67(24):4571–6.
203. Wu Q, Yu S, Hao N, Wells T, Meng X, Li M, et al. Characterization of products from hydrothermal carbonization of pine. *Bioresource Technology*. noviembre de 2017;244:78–83.
204. Aida TM, Sato Y, Watanabe M, Tajima K, Nonaka T, Hattori H, et al. Dehydration of d-glucose in high temperature water at pressures up to 80MPa. *The Journal of Supercritical Fluids*. abril de 2007;40(3):381–8.
205. Falco C, Perez Caballero F, Babonneau F, Gervais C, Laurent G, Titirici MM, et al. Hydrothermal Carbon from Biomass: Structural Differences between Hydrothermal and Pyrolyzed Carbons via ¹³C Solid State NMR. *Langmuir*. el 6 de diciembre de 2011;27(23):14460–71.
206. Baccile N, Laurent G, Babonneau F, Fayon F, Titirici MM, Antonietti M. Structural Characterization of Hydrothermal Carbon Spheres by Advanced Solid-State MAS ¹³C NMR Investigations. *J Phys Chem C*. el 4 de junio de 2009;113(22):9644–54.
207. Faravelli T, Frassoldati A, Migliavacca G, Ranzi E. Detailed kinetic modeling of the thermal degradation of lignins. *Biomass and Bioenergy*. marzo de 2010;34(3):290–301.
208. Gardner DJ, Schultz TP, McGinnis GD. The Pyrolytic Behavior of Selected Lignin Preparations. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. enero de 1985;5(1):85–110.
209. Catallo WJ, Shupe TF, Comeaux JL, Junk T. Transformation of glucose to volatile and semi-volatile products in hydrothermal (HT) systems. *Biomass and Bioenergy*. enero de 2010;34(1):1–13.
210. Biller P, Ross AB. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresource Technology*. enero de 2011;102(1):215–25.
211. Rodríguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M, Señorans FJ, Reglero G, Cifuentes A, et al. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. agosto de 2006;41(5):1560–5.
212. Basile A, Jiménez-Carmona MM, Clifford AA. Extraction of Rosemary by Superheated Water. *J Agric Food Chem*. el 1 de diciembre de 1998;46(12):5205–9.

213. Kim SJ, Matsushita Y, Fukushima K, Aoki D, Yagami S, Yuk HG, et al. Antioxidant activity of a hydrothermal extract from watermelons. *LWT - Food Science and Technology*. noviembre de 2014;59(1):361–8.
214. Becker R, Dorgerloh U, Paulke E, Mumme J, Nehls I. Hydrothermal Carbonization of Biomass: Major Organic Components of the Aqueous Phase. *Chem Eng Technol*. marzo de 2014;37(3):511–8.
215. Melgar B, Dias MI, Ciric A, Sokovic M, Garcia-Castello EM, Rodriguez-Lopez AD, et al. Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*. enero de 2018;111:212–8.
216. Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. noviembre de 2013;104:366–71.
217. Poljšak B, Dahmane R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*. 2012;2012:1–4.
218. He X, Guo X, Ma Z, Li Y, Kang J, Zhang G, et al. Grape seed proanthocyanidins protect PC12 cells from hydrogen peroxide-induced damage via the PI3K/AKT signaling pathway. *Neuroscience Letters*. abril de 2021;750:135793.
219. Bagchi D, Kuszynski C, Balmoori J, Bagchi M, Stohs SJ. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother Res*. diciembre de 1998;12(8):568–71.
220. René A, Abasq ML, Hauchard D, Hapiot P. How Do Phenolic Compounds React toward Superoxide Ion? A Simple Electrochemical Method for Evaluating Antioxidant Capacity. *Anal Chem*. el 15 de octubre de 2010;82(20):8703–10.
221. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources. *J Agric Food Chem*. el 1 de enero de 1996;44(1):37–41.
222. Chu KO, Chan SO, Pang CP, Wang CC. Pro-oxidative and Antioxidative Controls and Signaling Modification of Polyphenolic Phytochemicals: Contribution to Health Promotion and Disease Prevention? *J Agric Food Chem*. el 7 de mayo de 2014;62(18):4026–38.
223. Vanzani P, Rossetto M, Rigo A, Vrhovsek U, Mattivi F, D'Amato E, et al. Major Phytochemicals in Apple Cultivars: Contribution to Peroxyl Radical Trapping Efficiency. *J Agric Food Chem*. el 1 de mayo de 2005;53(9):3377–82.
224. Dugas AJ, Castañeda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure–Activity Relationships. *J Nat Prod*. el 1 de marzo de 2000;63(3):327–31.
225. Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem Res Toxicol*. el 1 de junio de 1999;12(6):521–5.
226. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*. el 15 de febrero de 2009;112(4):885–8.

227. Sano M, Yoshida R, Degawa M, Miyase T, Yoshino K. Determination of Peroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids and Plant Extracts Using an Automatic Potentiometric Titrator. *J Agric Food Chem.* el 1 de mayo de 2003;51(10):2912–6.
228. Nabavi SF, Nabavi SM, N. Setzer W, Nabavi SA, Nabavi SA, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits.* mayo de 2013;68(3):185–93.
229. Panov AV, Dikalov SI. Cardiolipin, Perhydroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Mitochondrial Dysfunctions and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* el 9 de septiembre de 2020;2020:1–14.
230. Chen YX, Liu XY, Xiao Z, Huang YF, Liu B. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. *International Journal of Biological Macromolecules.* octubre de 2016;91:505–9.
231. Srianthie D, Udayangani DN, Chamari H. Antioxidant, Antibacterial and Anti-Inflammatory Potential of the Aqueous Extract of the Raw Leaves of Sri Lankan Variety of *Persea americana* Miller (Avocado). *International Journal of Ayurveda and Pharma Research.* el 2 de abril de 2020;1–11.
232. Kingne-Kingne F, Doungue-Tsafack H, Teboukeu-Boungo G, Mboukap-Ntongme A, Solefack-Nguepi E, Edie-Kinge E, et al. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Young and Mature Mango (*Mangifera indica*) and Avocado (*Persea americana*) Leaves Extracts. *J Food Stab.* el 23 de diciembre de 2018;1(1):14–27.
233. Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide.* junio de 2004;10(4):179–93.
234. Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B Radiation Acts through the Nitric Oxide and cGMP Signal Transduction Pathway to Stimulate Melanogenesis in Human Melanocytes. *Journal of Biological Chemistry.* noviembre de 1996;271(45):28052–6.
235. Magdziarz A, Wilk M, Wądrzyk M. Pyrolysis of hydrochar derived from biomass – Experimental investigation. *Fuel.* mayo de 2020;267:117246.
236. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* el 1 de enero de 2017;32(1):403–25.
237. Wittenauer J, Mäckle S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia.* marzo de 2015;101:179–87.
238. Chiochio I, Mandrone M, Sanna C, Maxia A, Tacchini M, Poli F. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. 2018;8.
239. Chai WM, Shi Y, Feng HL, Xu L, Xiang ZH, Gao YS, et al. Structure Characterization and Anti-tyrosinase Mechanism of Polymeric Proanthocyanidins Fractionated from Kiwifruit Pericarp. *J Agric Food Chem.* el 9 de julio de 2014;62(27):6382–9.
240. Chai WM, Wei MK, Wang R, Deng RG, Zou ZR, Peng YY. Avocado Proanthocyanidins as a Source of Tyrosinase Inhibitors: Structure Characterization, Inhibitory Activity, and Mechanism. *J Agric Food Chem.* el 26 de agosto de 2015;63(33):7381–7.