Compuestos Fenólicos obtenidos del subproducto de *Persea americana* Mill. para la reducción de Materia Orgánica del efluente de una industria de curtido de *Tayassu pecari*

Phenolic compounds obtained from the by-product of *Persea americana* Mill. for the reduction of organic matter in the effluent of a tanning industry of *Tayassu pecari*

DOI: 10.46932/sfjdv2n5-062

Received in: Oct 1st, 2021

Accepted in: Dec 30th, 2021

Carmen Sonia Moreno Roque

Doctora en Ciencias y Tecnologías Medioambientales

Universidad Nacional de San Agustín

Cayetano Arenas 143 Parque Industrial Arequipa Perú

Correo electrónico: cmoreno@agorinca.com y / cmoreno@unsa.edu.pe

Teresa Cano de Terrones

Doctora en Química

Universidad Nacional de San Agustín

Av. Independencia s/n cercado Arequipa Perú

Correo electrónico: dcanof@unsa.edu.pe

RESUMEN

Se evaluó la acción de los compuestos fenólicos para la remoción de materia orgánica en efluentes de una curtiembre. El estudio se llevó a cabo utilizando aguas residuales, generadas durante el curtido de la piel de *Tayassu pecari* (huangana) de una curtiembre ubicada en el Parque Industrial de Arequipa-Perú. Para los experimentos se utilizó los extractos liofilizados obtenidos, de las semillas de *Persea americana* c. v. Zutano (palta).

Las semillas, se obtuvieron de frutos maduros de (*Persea americana* Mill.) c. v., Zutano (materia seca de 27 %), extraídas con metanol al 70 %, etanol al 70 % acetona al 70 % y agua; en proporción de 1:4 y empleando temperaturas de 25 °C y 45 °C. Fueron concentrados a presiones reducidas, liofilizados y almacenados a 4 °C, hasta su aplicación. Todas las extracciones se realizaron por triplicado. El contenido fenólico total, fue determinado por el método de Folin Ciocalteu. Los mayores valores corresponden al extracto acetónico y acuoso liofilizado con un contenido fenólico total de 291,53 ±11,54 mg EAG/g y de 284,76±86,17mg EAG/g respectivamente.

El material liofilizado del extracto acuoso redujo el contenido de materia orgánica en un 56,7% y el acetónico, en 56,9% expresado como mg de O₂/L (Demanda Química de oxígeno DQO) en las condiciones ensayadas, siendo el pH y el tipo de extracto significativos estadísticamente en el tratamiento experimental.

Las condiciones óptimas para la reducción de materia orgánica, dadas por el modelo ajustado permiten estimar porcentajes de remoción de 53,4 % y 60,9 % para cuando se aplique el extracto acuoso y acetónico respectivamente.

Los resultados ponen de manifiesto, el uso potencial de los extractos fenólicos presentes en las semillas de palta (aguacate), para ser empleadas con éxito en el tratamiento de efluentes con elevado contenido de

materia orgánica, siendo el extracto acuoso, el que presenta mayores ventajas debido a la baja dosis empleado y al pH.

Palabras clave: Efluente, compuestos fenólicos, *Tayassu pecari*, *Persea americana* Mill, semillas, materia orgánica

ABSTRACT

The action of phenolic compounds for the removal of organic matter in tannery effluents was evaluated. The study was carried out using wastewater generated during the tanning of the skin of *Tayassu pecari* (huangana) from a tannery located in the Industrial Park of Arequipa-Peru. Freeze-dried extracts obtained from the seeds of *Persea americana* c. v. Zutano (avocado) were used for the experiments.

The seeds were obtained from ripe fruits of (*Persea americana* Mill.) c. v., Zutano (27 % dry matter), extracted with 70 % methanol, 70 % ethanol, 70 % acetone and water; in a ratio of 1:4 and using temperatures of 25 °C and 45 °C. They were concentrated at reduced pressures, lyophilized and stored at 4 °C, until their application. All extractions were performed in triplicate. The total phenolic content was determined by the Folin Ciocalteu method. The highest values correspond to the acetone and lyophilized aqueous extract with a total phenolic content of

291.53 ±11.54 mg AGE/g and 284.76±86.17 mg AGE/g respectively.

The lyophilized aqueous extract material reduced the organic matter content by 56.7% and the acetone content by 56.9% expressed as mg O₂/L (Chemical Oxygen Demand COD) under the tested conditions, with pH and type of extract being statistically significant in the experimental treatment.

The optimal conditions for organic matter reduction, given by the adjusted model, allow estimating removal percentages of 53.4 % and 60.9 % for when the aqueous and acetonc extracts are applied, respectively.

The results show the potential use of phenolic extracts present in avocado seeds to be successfully used in the treatment of effluents with high organic matter content, being the aqueous extract the one that presents the greatest advantages due to the low dose used and the pH.

Key words: Effluent, phenolic compounds, *Tayassu pecari*, *Persea americana* Mill, seeds, organic matter.

1 INTRODUCCIÓN

La producción de *Persea americana* Mill c. v., Zutano (palta o aguacate) genera una cantidad importante de semillas, un subproducto que representa el 30% del peso del fruto, donde sustancias bioactivas como los denominados “polifenoles”, permanecen en estos residuos (Segovia-Gómez F., et al, 2014). Lo anterior, ha impulsado continuamente el perfeccionamiento e implementación de nuevas técnicas o métodos para la obtención (Li G., et al 2020; Fiorito S., et al 2019) y el aprovechamiento de dichos remanentes, en otras aplicaciones industriales o para la obtención de ingredientes funcionales.

Las semillas son buenas fuentes de compuestos fenólicos, con actividades asociadas a la capacidad antioxidante, (Melgar B., et al, 2018) atrapadora de radicales libres, acción biocida, bactericida y por la reacción que tienen algunos polifenoles con las proteínas salivales, ricas en prolina, (Quijada-Morin N, et al 2016).

La presencia de al menos un grupo hidroxilo libre, en estos compuestos y la capacidad de enlazamiento con proteínas y posterior agregación en unidades grandes con tendencia a precipitar, han sido estudiadas para diferentes tipos de proteínas alimentarias como la ovoalbúmina, α -lactoalbúmina y proteínas de la leche β -caseína, β -lactoalbúmina. Por lo que la interacción con restos de proteína degradada presentes en los líquidos del proceso de purga o rendido son posibles

En la revisión realizada, el impacto de la adición de extractos de palta en el tratamiento de efluentes, sobre todo en matrices de aguas residuales reales, falta ser informado.

2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Los ensayos químicos, las pruebas de extracción y el estudio de interacción del agua residual con compuestos fenólicos, se realizaron en el laboratorio fisicoquímico del Área de control de calidad de Agroinca Productos Peruanos de Exportación y en los laboratorios de Química Orgánica y de Productos Naturales de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. El perfil de compuestos fenólicos se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Agraria de la Molina Lima-Perú.

2.1 Reactivos y muestras

Los reactivos de la mejor calidad posible

2.2 Muestra de semillas palta maduras

(*Persea americana*, variedad Zutano) fueron cultivadas en el fundo Agroinca, ubicado en la carretera Panamericana Sur km 990 Distrito de La Joya -Arequipa, a 16°41'47" de Latitud Sur y 71°51'53" de Longitud Oeste a una altura de 1308 m.s.n.m. La especie fue identificada en el *Herbarium Arequipense* (HUSA), de la Universidad Nacional de San Agustín. Los frutos fueron almacenados hasta alcanzar la madurez de consumo.

2.3 Muestra de Agua Residual

El agua residual se obtuvo de una curtiembre ubicada en el Parque Industrial de Arequipa-Perú, donde se procesa principalmente pieles secas y exóticas provenientes de la huangana y sajino (*Tayassu pecari*). La muestra fue recolectada en la etapa ribera purga, directamente del fulón en un envase de polietileno de 20 L de capacidad. Fue llevada de inmediato al laboratorio para realizar las pruebas y estabilizar una fracción destinada para el análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

2.4 Obtención y Preparación de las Semillas *c. v. Zutano*.

Los frutos cosechados con madurez fisiológica, fueron conservados hasta su etapa de senectud, 45 días después, en un depósito provisto de una malla anti insectos.

Las semillas fueron separadas del fruto con cuidado, con un corte transversal, lavadas y colocadas un molino de cuchillas para ser trituradas y almacenadas en refrigeración a 8°C.

Figura 1. Fruto, semilla y cotiledón de *Persea americana* Mill *c. v. Zutano*

2.5 Obtención de los Extractos

Se colocaron 10 g semillas trituradas con 40 mL de solución extractiva, en una proporción 1:4 (metanol, etanol y acetona mezclados con agua destilada en una relación de 70:30), en frascos de vidrio. Se agitaron por un minuto en un vortex y fueron llevados a estufa a la temperatura de extracción de 25 °C, el mismo proceso se repitió para las pruebas de extracción realizadas a 45 °C. Luego de las 24 horas fueron retirados y la fracción líquida fue separada por decantación y el residual fue re extraído dos veces más en iguales condiciones. La fracción líquida obtenida de las tres extracciones fue filtrada, aforada, guardada en refrigeración y protegidas de la luz, una fracción destinada a la determinación de compuestos fenólicos totales y el resto destinado a liofilización.

Los extractos liofilizados fueron obtenidos, previa concentración a presión reducida empleando un evaporador rotatorio IKA, la temperatura empleada fue de 60 °C en todos los casos. Los extractos concentrados, fueron entonces deshidratados en un liofilizador LABCONCO.

El contenido fenólico total fue determinado empleando el método de Folin Ciocalteau en los 24 extractos (datos no publicados) y en los 24 liofilizados. El ácido gálico fue usado como estándar, la curva se preparó con las concentraciones de 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L.

2.6 Diseño Experimental

Los tratamientos fueron ordenados de acuerdo a un diseño de bloques completamente aleatorizado, donde se consideró la influencia de tres factores, tipo de extracto, pH y dosis. La variable respuesta

experimental de los tratamientos fue medida y el resultado expresado como la cantidad de $\text{mg O}_2/\text{L}$.

Para el experimento, se usó vasos de precipitados donde primero se colocó un volumen determinado de efluente a pH regulado y luego se adicionó la dosis correspondiente del extracto liofilizado. La medición de la Demanda Química de Oxígeno se realizó en los sobrenadantes luego del tratamiento del efluente y fueron conservados con ácido sulfúrico y en refrigeración, hasta su análisis.

Para evaluar, la capacidad de los extractos fenólicos liofilizados, en la reducción de materia orgánica, se comparó la demanda química de oxígeno (DQO) del agua residual sin tratamiento, el valor de DQO inicial, con el DQO obtenido en los sobrenadantes

3 RESULTADOS

3.1 Preparación del Material Vegetal: Semillas

Las pepas, semillas, carozo o también denominado hueso se obtuvieron a partir de frutos con un contenido de materia seca de 26,93 %, indicador de su estado de madurez. Las semillas representan un porcentaje considerable en relación al peso del fruto en el c. v., Zutano, en el lote muestreado, el valor fue de, 31,30 %, casi el doble del reportado para el c. v., Hass de 16 % (Ramos-Jerz, 2007).

Figura 2. Tratamiento del agua residual de curtiembre con extractos liofilizados fenólicos de semilla de Persea americana (palta)

3.2 Compuestos Fenólicos en los extractos liofilizados

Los resultados de la determinación del contenido fenólico total, se informan como la media $\pm$ la desviación estándar (DE) de las tres repeticiones por tipo de extracto liofilizado, empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurión XV

El análisis estadístico descriptivo se detalla en la tabla 1 para los extractos liofilizados

Tabla 1 Análisis estadístico descriptivo para el contenido de compuestos fenólicos en los extractos liofilizado, expresado en (mg EAG/g liofilizado crudo) proveniente de las semillas de *Persea americana* Mill.

	T25MEOH	T25ETOH	T25AC	T25AQ	T45MEOH	T45ETOH	T45AC	T45AQ
Recuento	3	3	3	3	3	3	3	3
Promedio	255,31±57,8	247,31±16,16	291,53±11,54	284,76±86,17	225,01±21,56	200,63±15,17	226,19±94,21	230,46±101,76
Mediana	259,80	250,88	293,78	288,38	226,74	197,52	247,29	245,20
Desviación Estándar	23,2667	6,5035	4,6469	34,6867	8,6808	6,1074	37,9228	40,9656
Coeficiente de Variación	9,11%	2,63%	1,59%	12,18%	3,86%	3,04%	16,77%	17,78%
Mínimo	230,13	239,80	286,19	248,41	215,59	196,71	182,41	184,16
Máximo	276,01	251,24	294,63	317,50	232,69	207,67	248,87	262,01
Rango	45,88	11,44	8,44	69,09	17,10	10,96	66,46	77,85
Sesgo Estandarizado	-0,5908	-1,2205	-1,1788	-0,3282	-0,61	1,2006	-1,2224	-0,9969

El análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de LSD Fischer con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Tabla 2 Análisis de varianza para el contenido fenólico en los extractos liofilizados expresado en (mg EAG/g liofilizado crudo) obtenidos de las semillas de *Persea americana* Mill.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	20374,3	7	2910,62	4,62	0,0054
Intra grupos	10074,7	16	629,672		
Total (Corr.)	30449,1	23			

Tabla 3 Comparaciones múltiples para el contenido fenólico en los liofilizado expresado en (mg EAG/g liofilizado crudo) obtenido de las semillas de *Persea americana* Mill por el método de LSD Fisher

Grupos	Casos	Promedio	Grupos Homogéneos
T45ETOH	3	200,63+/-15.17	a
T45MEOH	3	225,01+/-21.56	ab
T45AC	3	226,19+/-94.21	ab
T45AQ	3	230,46+/-101.76	ab
T25ETOH	3	247,31+/-16.16	bc
T25MEOH	3	255,31+/-57.8	bcd
T25AQ	3	284,76+/-86.17	cd
T25AC	3	291,53+/-11.54	e

Letras diferentes implican la existencia de diferencias significativas

3.3 Perfil de Compuestos Fenólicos por HPLC

Se caracterizó el contenido fenólico, en dos extractos liofilizados obtenidos a 25 °C por cromatografía líquida de alta resolución HPLC (*High performance liquid chromatography*). La detección se realizó en la región UV a 280 nm y 320 nm, y la identificación se realizó considerando los tiempos de retención. Los valores reportados son producto de tres determinaciones y siguen el método adaptado de Chirinos R, Huaman M, Betalleluz-Pallarderl I, Pedreschi y Campos D (2011).

Figura 3. Cromatograma a 280 nm extracto acuoso liofilizado (13 picos)

Figura 4. Cromatograma a 320nm extracto acuoso liofilizado (4 picos)

Se identificó, ácido gálico, ácido protocatéquico y catequina; también, derivados de flavanona (hesperitina), derivados de ácido hidroxicinámico cuantificados como, ácido cafeico ácido *p*-cumárico y derivados de flavan-3-ol (catequina), detectados en seis tiempos de retención, en el extracto acuoso liofilizado obtenido a 25 °C,

En el extracto acetónico liofilizado –25 °C, solo se reveló, derivados de flavan-3-ol (catequina), detectados en cuatro tiempos de retención, derivados de flavanona (hesperitina) y derivados de ácido hidroxicinámico cuantificados como, ácido cafeico ácido *p*-cumárico

Figura 5. Cromatograma a 280 nm del extracto acetónico liofilizado

Figura 6. Cromatograma a 320 nm liofilizado del extracto acetónico liofilizado

Se reveló la presencia de tres clases polifenólicas en el extracto acetónico liofilizado, los: derivados de flavan-3-ol (catequina), derivados de flavanona (hesperitina) y ácidos hidroxicinámicos (como ácido cafeíco y ácido *p*-cumárico), resultados que al compararse con el contenido polifenólico de otros extractos acetónicos de semillas de palta, muestran similitud, Rodríguez-Carpena *et al* 2011, informó también, ácidos hidroxicinámicos y procianidinas, en diferente concentración dependiendo del cultivar “Hass” y “Fuerte”. La presencia de catequinas, flavonoles y trazas de ácidos hidroxibenzoicos marcan las diferencias, que pueden asociarse a la variedad en estudio, el método de extracción (EAS extracción acelerada con solvente – acetona al 70 %) y a la técnica de detección, UPLC, (Ultra Performance Liquid Chromatography). Estos autores clasificaron a los compuestos fenólicos detectados, en catequinas, (suma de catequina y epicatequina), ácidos hidroxicinámico (*p*-cumárico, cafeíco, ferúlico y sinápico), ácidos hidroxibenzoicos (*p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vainílico, sirínico y gálico), flavonoles, y procianidinas (suma de dímeros, oligómeros y polímeros).

Extractos metanólicos de semillas de aguacate, también se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento, asociado a un detector de fotodiodos, HPLC-PDA, (High-performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection) revelando once picos principales, (Pahua-Ramos, *et al*, 2012) de ellos, siete compuestos fenólicos, fueron identificados utilizando tiempos de retención de estándares externos y espectros característicos. El ácido protocatéquico fue el principal compuesto fenólico encontrado en harina de semillas de aguacate, ($128,18 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ de DW dried weight); seguido de kaempferide (3,5,7-trihidroxi-2-(4-metoxifenil)cromen-4-ona) con $107,42 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ (DW) y ácido vainílico ($28,67 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ de DW); el ácido clorogénico, el ácido sirínico, la rutina y el kaempferol, están presentes en pequeñas cantidades. Estos resultados pueden complementarse con los reportados por

Kosińska et al 2012, que señalan la presencia de cinco compuestos; el ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 3-*O*-*p*-cumaroilquínico, dos trómeros de procianidina A (I) y (II), y galato de catequina/epicatequina, en extractos metanólicos de semillas liofilizadas de dos variedades Hass y Sheppard, detectados por HPLC-PAD, que corresponden a tres clases polifenólicas: monómeros de flavanol, proantocianidinas, ácidos hidroxycinámicos y glucósidos de flavonol. La técnica de extracción sugiere que algunos compuestos fenólicos son sensibles a tratamientos térmicos prolongados, en el primero son 12 horas a temperatura que oscila alrededor del punto de ebullición del metanol (64,5° C) y en el segundo estudio, el tiempo empleado fue menor, 15 minutos a 60 °C con metanol al 80 %, finalmente las estructuras de los compuestos identificados fueron posteriormente confirmadas sin ambigüedad por ESI-MS (Ionización por electrospray y espectro de masas de iones fragmentados).

Todos estos hallazgos y nuestros resultados proporcionan evidencia importante del tipo de compuestos fenólicos presentes en la semilla de aguacate, indistintamente de la variedad estudiada y de la disponibilidad de patrones y técnicas para su detección. Además, aporta evidencia de los componentes fenólicos presentes en extractos acuosos.

3.4 Reducción de Materia Orgánica en Agua Residual de Curtiembre

Se trabajó con dos extractos liofilizados obtenidos a 25 °C, el acetónico y el acuoso. Se empleó cinco niveles de pH (concentración hidrogeniónica nmol/L) que oscilaron entre un pH de 3,37 y 7,62 (que corresponden a 426, 579, 518 nmol/L y 23,988 nmol/L); y cinco diferentes dosis de “polifenol” en el rango de 66,15 y 433,85 ppm. Se utilizaron 50 mL de efluente, para cada uno de los tratamientos y el compuesto fenólico fue adicionado y disuelto por 30 segundos. Los vasos se decantaron a las 3 horas y el líquido separado se conservó en frío a 8 °C con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, hasta el análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO). La determinación del DQO, se realizó empleando, digestión ácida y una retro valoración de óxido-reducción.

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos. El porcentaje de remoción de materia orgánica se calcula hallando la diferencia entre la concentración inicial en el efluente y la final del sobrenadante luego del tratamiento y se expresan en porcentaje. El valor del DQO inicial, fue de 11752,98 mg O₂/L. Los porcentajes de remoción obtenidos luego de la adición de los compuestos fenólicos a diferentes pH, muestran una disminución del contenido de materia orgánica susceptible a precipitar.

Pardo-Bonanomi A, et al 2014 utilizó quitosano proveniente de los residuos de la industria cangrejera para la disminución de materia orgánica en efluentes de tenería, aplicando una dosis de 1 250 ppm en comparación a las 250 ppm de compuestos fenólicos para conseguir porcentajes de remoción de

49 %, y 57 % respectivamente. La baja concentración usada, está asociada a dos factores el pH del medio y a la selección de un efluente en una etapa específica del proceso de curtido. Los resultados muestran que a pH ácidos de 4,0 a 5,5 el efecto de los compuestos fenólicos, en la disminución del DQO es pronunciado. En ese rango de pH, Quijada-Morín 2016, precipitó una proteína modelo, albúmina de suero bovino (BSA) con un tanino, siendo el pH óptimo informado de 4,9. A un pH alto, los hidroxilos fenólicos son ionizados y las proteínas tienen cargas negativas netas, bajo estas condiciones la precipitación no ocurre porque las proteínas exponen fuerzas repulsivas.

Tabla 4 Diseño Experimental y Respuesta, para la Reducción de Materia Orgánica (M.O.) en agua residual

ORDEN DE EJECUCIÓN	TRATAMIENTO	VARIABLES REALES			EXPERIMENTAL	PORCENTAJE DE REDUCCION DE M.O. (%)
		Extracto	pH	Dosis	DQO mg O ₂ /L	
1	T5	AQ	7	380	7370,51	37,3
2	T6	AQ	5,5	250	5996,01	49,0
3	T20	AC	5,5	66,15	5529,41	53,0
4	T1	AQ	5,5	250	5936,25	49,5
5	T15	AC	4	380	4960,47	57,8
6	T17	AC	5,5	250	5313,72	54,8
7	T21	AC	5,5	433,85	4745,09	59,6
8	T12	AC	5,5	250	5318,72	54,7
9	T22	AC	5,5	250	4764,70	59,5
10	T16	AC	7	380	5647,05	52,0
11	T7	AQ	3,37	250	7051,79	40,0
12	T4	AQ	4	380	6095,61	48,1
13	T10	AQ	5,5	433,85	5956,17	49,3
14	T14	AC	7	120	6509,80	44,6
15	T9	AQ	5,5	66,15	5717,13	51,4
16	T3	AQ	7	120	7091,63	39,7
17	T8	AQ	7,62	250	7470,11	36,4
18	T11	AQ	5,5	250	5856,57	50,2
19	T13	AC	4	120	5418,32	53,9
20	T19	AC	7,62	250	6313,72	46,3
21	T18	AC	3,37	250	5058,82	57,0
22	T2	AQ	4	120	5089,60	56,7
Muestra sin tratamiento					11 752;98	

La principal proteína de la piel y los productos de su degradación, el colágeno y la prolina respectivamente, están presentes en el efluente analizado y constituyen la materia orgánica que tiene afinidad por los compuestos fenólicos. Las proteínas ricas en prolina, son las que presentan mayor afinidad por los taninos, ya que la prolina contiene un nitrógeno amino secundario que convierte al oxígeno adyacente en un buen aceptor del enlace de hidrógeno. (Bacon J.R., 2000), además de su alta movilidad conformacional.

El producto de la interacción entre proteína-compuestos fenólicos da como resultado un complejo insoluble que se separa por decantación, sin embargo, es posible la formación de complejos solubles que permanecen en el sobrenadante del agua residual tratada. (Quijada-Morin N., *et al* 2016). La proteína bajo ciertas condiciones de concentración y pH forman complejos insolubles con los *taninos*, esta tendencia es atribuida a la fuerte atracción del hidrógeno con el oxígeno del grupo carboxilo del péptido con la posible formación de enlaces cruzados entre las cadenas de proteína, lo que induce la precipitación de las proteínas, disminuyendo la disponibilidad de esta y sus aminoácidos con posible inhibición enzimática.

La interacción entre polifenol-proteína es una consecuencia de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos y los grupos carbonilo de los enlaces peptídico de las proteínas (Hofman T. *et al* 2006) sin embargo otros enlaces de hidrógeno también pueden originarse, con otros centros negativos de la proteína.

3.5 Superficie de Respuesta Extracto acuoso EAQ 25 °C

El Análisis de varianza de la Tabla 5, muestra que el factor pH y su efecto cuadrático, son significativos para el contenido de DQO, esto significa que entre los niveles ensayados de pH de 3,37 y 7,72; se encuentra el valor óptimo de pH para obtener la mayor disminución de DQO en el efluente

Tabla 4 Análisis de varianza para DQO ecuación refinada, en extracto acuoso a 25 °C obtenido de semillas de Persea americana Mill

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	1,8707E6	1	1,8707E6	10,65	0,138
B: Dosis	329245.	1	329245.	1,87	0,2133
AA	2,65353E6	1	2,65353E6	15,10	0,0060
Error total	1,22972E6	7	175674.		
Total (corr.)	6,08319E6	10			

La ecuación N°1 muestra el resultado del modelo matemático generado a partir de los datos experimentales obtenidos para el DQO cuando se trata con el extracto liofilizado acuoso obtenido a 25 °C.

$$\text{DQO a } 25^{\circ}\text{C-AQ} = 5853,64 + 483,569 \cdot \text{pH} + 202,869 \cdot \text{Dosis} + 655,18 \cdot \text{pH}^2$$

(Ecuación N°1)

La grafica de superficie de respuesta (Figura 41) evidencia que para que el efluente tratado reduzca el DQO (Demanda Química de Oxígeno), el pH debe estar alrededor de 5,5 y tratar el efluente con bajas dosis del extracto acuoso liofilizado y por ende de compuestos fenólicos presentes.

Figura 7 Superficie de respuesta para valores de DQO obtenidos experimentalmente con extracto acuoso liofilizados de compuestos fenólicos obtenidos a 25 °C de semillas de Persea americana Mill

La tabla 5 muestra, que el contenido de DQO en el efluente puede ser reducido, optimizando la respuesta.

Tabla 5 Optimización de los valores de DQO con extracto acuoso a 25 °C obtenido de semillas de Persea americana Mill.

Factor	Óptimo codificado	Óptimo real	Valor óptimo de DQO
A: pH	-0,369027	4,95	5477,51
B: Dosis	-1,4142	66,15	

3.6 Superficie de Respuesta extracto acetónico EAC 25°C

El análisis de varianza que se muestra en la tabla 6, señala que el pH, la dosis y la interacción, pH*pH son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 6 Análisis de varianza para DQO ecuación refinada, en extracto en acetona a 25 °C obtenido de semillas de Persea americana Mill.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	1,57776E6	1	1,57776E6	30,09	0,0009
B: Dosis	737989.	1	737989.	14,07	0,0072
AA	615080.	1	615080.	11,73	0,0111
Error total	367042.	7	52434.6		
Total (corr.)	3,29787E6	10			

Ecuación refinada, con R^2 ajustado por grados de libertad (g.l.) de 84, 1005 %

La ecuación N°2 refleja el modelo matemático obtenido:

$$\text{DQO a } 25^{\circ}\text{C-AC} = 5186,94 + 444,097 \cdot \text{pH} - 303,726 \cdot \text{Dosis} + 315,438 \cdot \text{pH}^2$$

(Ecuación N°2)

En la figura N°7, se observa que el nivel más alto en la dosis proporciona valores bajos en el DQO. En cuanto al pH se encuentra entre 0 y -0.5 valores codificados.

Figura 7. Superficie de respuesta para valores de DQO obtenidos experimentalmente con extracto en acetona a 25 °C de semillas de Persea americana Mill

La tabla siguiente muestra las variables óptimas para la reducción del DQO

Tabla 7 Optimización de los valores de DQO con extracto en acetona a 25 °C obtenido de semillas de Persea americana Mill.

Factor	Óptimo codificado	Óptimo real	Valor óptimo de DQO
A: pH	-0,703973	4,40	4601,1
B: Dosis	1,4142	433,85	

La ventaja de emplear un extracto acuoso, radica en que se evitara el uso de disolventes orgánicos que implican un proceso adicional para su remoción. Las bajas dosis de compuestos fenólicos solubles a emplear, lo hace atractivo frente a cualquier otro liofilizado, por la presencia de compuestos fenólicos del tipo ácido gálico, ácido protocatéquico y sobre todo a los derivados flavan-3-ol.

Los efluentes líquidos generados por las curtiembres, son difíciles de tratar porque contienen altos niveles de materia orgánica, cromo, sólidos disueltos y sulfuros. Los métodos convencionales del tratamiento de los efluentes de curtiembres tienen un alto costo de capital y de operación y mantenimiento lo cual, junto con las nuevas leyes y estándares ambientales, ha llevado a la industria a buscar nuevos métodos de tratamiento. El porcentaje de remoción de materia orgánica (medida como DQO) empleando esta propuesta reduce los niveles en más del 50% indistintamente del extracto liofilizado, estos valores pueden reducirse aún más empleando las condiciones óptimas encontradas:

4 CONCLUSIONES

De las pruebas realizadas y de la revisión previa podemos concluir:

1. El contenido fenólico total, en los extractos liofilizados fue de $291,53 \pm 11,54$ mg EAG/g y de $284,76 \pm 86,17$ mg EAG/g, en el liofilizado del extracto acetónico y acuoso respectivamente a 25°C . el tipo de disolvente empleado para la extracción no es significativo estadísticamente para el contenido fenólico, cuando se compara la solución acetónica al 70 % con agua. El perfil de compuestos fenólicos de los liofilizados acetónico y acuoso analizados por cromatografía HPLC, señalan diferencias en la composición, siendo las mas resaltantes la presencia de ácido gálico y protocatéquico en el liofilizado de extracto acuoso además de seis derivados de flavan-3-ol que son mayoritarios.
2. El extracto acuoso liofilizado redujo el contenido de materia orgánica, en un 56,7 % evaluada como DQO, con una dosis de 120 ppm a pH 4,0; con el liofilizado acetónico, la reducción en el DQO fue de 59,6%, con una dosis más alta de, 433,85 ppm y aun pH de 5,5. Existen diferencias estadísticamente significativas al emplear diferentes valores de pH y por tipo de extracto liofilizado.
3. Se encontró que las condiciones óptimas para reducir el DQO, a 60,9% con el extracto acetónico a pH 4,4 y una dosis de 433,85 ppm y de 53,4 % a pH 4,65 y 66,15 ppm para el tratamiento con extracto acuoso liofilizado.

REFERENCIAS

- Bacon J. R, Rhodes J.C. (2000) Binding affinity of hidrolizable tannins to paroid saliva and to proline-rich proteins derived from it” J. Agric. Food Chem., 48,838-843
- Dabas D, Shegog R., Ziegler G., and Lambert J., (2013). “Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 19, no. 34, pp. 6133–6140,
- Dabas D, Ryan J. E., Lambert J.D., y Zieg G R. (2011). A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. *Journal Food Science*. Nov 76(9) C1335-41.
- Fiorito S., Ianni F., Preziuso F., Epifano F., Scotti L., Bucciarelli T., Genovese S. (2019). Análisis cuantitativo de UHPLC-UV/Vis de cumarinas hidroxiladas y O-preniladas en extractos de semillas de granada. *Moléculas*. 22 de mayo de 2019; 24 (10): 1963. doi: 10,3390 / moléculas24101963.
- HofmannT, Glabasnia A, SchwarzB, WismanKN, Gangwer KA, y Hagerman AE (2006) Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, Castalagin and Grandinin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Dec 13; 54(25): 9503–9509. DOI:10.1021/jf062272c
- Kosínska A., KaramacM., Estrella I., Hernández T., Bartolome B., and Dykes G. A. (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4613–4619.
- Li G, Chen M, Chen J., Shang Y, Lían X., Wang P., Lei H, Qiang Ma Q. (2020) Chemical composition analysis of pomegranate seeds based on ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with quadrupole Orbitrap high-resolution mass spectrometry. Prepared for Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2020 Aug 5; 187:113357. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113357.
- Melgar B., M. I. Diasa, A., Ciric A., Sokovic M., García-Castello E., Rodriguez-Lopez A., Barrosa L., Ferreira I., (2018). “Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: a rich source of inherent antioxidants,” *Industrial Crops and Products*, vol. 111, pp. 212–218
- Pahua-Ramos ME, Ortiz-Moreno A. Chamorro-Cevallos G, Hernández-Navarro MD, Garduño-Siciliano L, Necoechea-Mondragón H y Hernández-Ortega M. (2012). Hypolipidemic Effect of Avocado (*Persea Americana* Mill) Seed inaHypercholesterolemic Mouse Model. *PlantFoodsfor Human Nutrition*, 67: 10-16. DOI 10.1007/s11130-012-0280-6.
- Pardo-Bonanomi A, Vargas-Vielma L, Mas M, Peña R, Carrasquero-Ferrer S, Martínez-Urdaneta D y Pire-Sierra M. (2014). Uso del quitosano para la remoción de cromo y materia orgánica en efluentes de tenería. *Boletín del Centro de Investigaciones biológicas*. Volumen 48 N° Septiembre-diciembre, pp 175-190
- Quijada-Morín N., Crespo-Expósito C., Rivas-Gonzalo, J. C., I García-Estévez, J. C., Escribano-Bailón M. T. (2016). Effect of the addition of flavan-3-ols on the HPLC-DAD salivary-protein profile. *Food Chemistry*, Sep 15;207:272-8
- Ramos-Jerz MdR. (2007). Phytochemical analysis of avocado seeds (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). Gottingen: Cuvillier

Ramos-Jerz MdR, Villanueva S, Jerz G, Winterhalter P and Deters A.M. (2013) *Persea americana* Mill. Seed: Fractionation, Characterization, and Effects on Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2013:391247

Raymond Chia TW, Dykes GA .(2010). Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Journal Pharmaceutical Biology*. Volume 48, (7): 753-6. DOI10.3109/13880200903273922.

Rodríguez-Carpena J. G., Morcuende D., and Estévez M., (2011). “Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage,” *Meat Science*, vol. 89, no. 2, pp. 166–173.

Segovia-Gómez F., Peiró-Sanchez S., Gallego-Iradi M. G.; Mohd-Azman N. A. y Almajano M. P. (2014). Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants MDPI*, Jun; 3(2): 439-454