

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación del uso potencial del colorante extraído de la  
semilla del aguacate (*Persea americana*) como producto  
funcional alimenticio  
Proyecto de Investigación.**

**Ana Carolina Tituaña Puente**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 1 de enero de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación del uso potencial del colorante extraído de la semilla del aguacate  
(Persea americana) como producto funcional alimenticio**

**Ana Carolina Tituaña Puente**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Lourdes Orejuela, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 1 de diciembre de 2018

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Ana Carolina Tituaña Puente

Código: 00106061

Cédula de Identidad: 0603025693

Lugar y fecha: Quito, 1 de diciembre de 2018

## DEDICATORIA

A mis padres, Paulina y Freddy, que siempre me han apoyado en cada paso que doy, disfrutando mis alegrías y sufriendo mis derrotas. Gracias por creer en mí, por apoyarme en todos mis proyectos y por el amor incondicional que siempre me han brindado.

A mi hermana Martina, que con su alegría e inocencia me ha mostrado siempre su apoyo.

A mis abues, que siempre han estado presentes mostrando su inmenso cariño.

A la Universidad San Francisco de Quito por todas las enseñanzas brindadas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por todo el apoyo brindado a lo largo de este camino.

A Lourdes Orejuela, mi tutora, por todas las enseñanzas y apoyo recibido. Principalmente por enseñarme que, si trabajas con pasión, puedes conseguirlo todo.

Al departamento de Química de la Universidad San Francisco de Quito por permitirme trabajar en sus laboratorios.

## RESUMEN

Las biorrefinerías son modelos de desarrollo sustentable que se definen como instalaciones basadas en la conversión biotecnológica y química de la biomasa con el objetivo de valorizarlas de forma rentable y sostenible. La semilla de aguacate es un candidato ideal para la biorrefinería en Ecuador dada la gran producción y consumo del fruto y porque se le han atribuido compuestos interesantes como: ácidos grasos, esteroides, antioxidantes y potasio. Una alternativa para realizar biorrefinería con la semilla de aguacate es la producción de un colorante natural puesto que después de someterla a un proceso de extracción se obtiene un pigmento de color anaranjado. Este extracto coloreado posee un alto contenido de productos bioactivos como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos condensados que están asociados a propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Adicionalmente, este extracto ha mostrado ser capaz de colorear alimentos como lácteos y harinas. La importancia de producir un colorante natural funcional en Ecuador radica en el direccionamiento de la matriz productiva del país hacia la bioeconomía, la priorización del gobierno por el consumo de alimentos saludables y la reducción de importaciones. En el presente estudio se extrajo el colorante natural de la semilla de aguacate de las variedades Fuerte y Hass con 2 solventes distintos: etanol al 70% (EtOH) y glicerol:acetato de sodio (3:1) (Gly: NaOAc) (este último es un NADES Natural Deep eutectic solvent, considerado como “verde”). Los rendimientos medios obtenidos aproximados fueron entre 13-19% con EtOH y entre 84.2-88.6% con Gly: NaOAc, la variedad de la semilla utilizada no tuvo influencia significativa en el rendimiento ni concentración. El alto rendimiento obtenido con el solvente eutéctico se le atribuyó a la posibilidad de usar el extracto sin concentrar ni purificar dada la fuerte intensidad obtenida y la baja toxicidad del Gly: NaOAc. Las concentraciones medias obtenidas aproximadas fueron entre 3980,83-5980,85 ppm para EtOH y 1310,1-2210,7 ppm para NaOAc. El extracto coloreado mostró un pico de absorción máximo en el espectro visible en 480 nm. Se encontró que la formación del color es dependiente del tiempo. La capacidad antioxidante encontrada media aproximada fue de 934,61 (Fuerte) y 736,696 (Hass) con EtOH y 30006,647 (Fuerte) y 1729,039 (Hass) con NaOAc equivalentes reductores de cobre (CRE)/ml. La variedad de la semilla de aguacate tuvo influencia significativa en la capacidad antioxidante probablemente debido a una mayor actividad de la polifenol oxidasa en la variedad Hass lo que provocaría mayor oxidación de los compuestos fenólicos y por ende una reducción de la bioactividad. El color se intensificó al aumentar el pH de 2 a 10, lo que muestra una influencia positiva de la alcalinidad en la concentración del colorante. El color del extracto obtenido presentó alta estabilidad durante 15 días tanto en condiciones de oscuridad como de luz indistintamente de la temperatura y el solvente utilizado. Cuando se adicionó el colorante de la semilla de aguacate a muestras de yogurt, el lácteo cambió su color a naranja amarillento, cuya intensidad fue dependiente de la dosis añadida. Estos resultados sugieren que el colorante de la semilla de aguacate tiene un fuerte potencial para ser un colorante alimenticio, aunque se requieren más estudios.

Palabras clave: biorrefinería, semilla de aguacate, colorante natural, NADES, antioxidante, colorante alimenticio

## ABSTRACT

Biorefineries are models of sustainable development. They are defined as installations based on the biotechnological and chemical conversion of biomass with the objective of valorizing it in a profitable and sustainable manner. The avocado seed is an ideal candidate for biorefinery in Ecuador given the great production and consumption of the fruit, and because they have been attributed interesting compounds such as: fatty acids, steroids, antioxidants and potassium. An alternative to make biorefinery with the avocado seed is the production of a natural dye, since after exposing the seed to an extraction process, an orange pigment is obtained. This colored extract has a high content of bioactive products such as flavonoids, phenolic acids and condensed tannins that are associated with antioxidant and anti-inflammatory properties. Additionally, this extract has been shown to be able to color foods such as dairy and flour. The importance of producing a functional natural colorant in Ecuador lies in the country's objective of changing its production matrix towards the bioeconomy, the government's prioritization for healthy foods consumption and the reduction of imports. In the present study, the natural colorant was extracted from the avocado seed (varieties: Fuerte and Hass) with 2 different solvents: 70% ethanol (EtOH) and glycerol: sodium acetate (3: 1) (Gly: NaOAc) (The last one is a NADES (Natural Deep Eutectic solvents) considered as "green"). The approximate average yields obtained were between 13-19% with EtOH and between 84.2-88.6% with Gly: NaOAc (the variety of seed used had no significant influence in yield or concentration.) The high yield obtained with the eutectic solvent was attributed to the possibility of using the extract without concentrating or purifying given the strong intensity obtained and the low toxicity of Gly: NaOAc. The concentration obtained was 3980.83-5980.85 ppm with EtOH and 1310-2210 ppm with NaOAc. The colored extract showed a maximum absorption peak in the visible spectrum at 480 nm. The color formation was time dependent and that it was probably the result of a catalyzed reaction by the enzyme polyphenol oxidase. The average antioxidant capacity found was approximately 934.61 (Fuerte) and 736.696 (Hass) with EtOH and 3006,647 (Fuerte) and 1729,039 (Hass) with NaOAc copper reducing equivalents (CRE) / ml. The variety of the avocado seed had a significant influence on the antioxidant capacity, probably due to a higher activity of the polyphenol oxidase in the Hass variety, which caused greater oxidation of the phenolic compounds and therefore a reduction of the bioactivity. The color was intensified by increasing the pH from 2 to 10, which shows a positive influence of alkalinity on the dye concentration. The colored extract presented high stability during 15 days in both dark and light conditions, regardless of the temperature or the solvent used. When the colorant of the avocado seed was added to yogurt samples, the dairy changed their color to yellowish orange, whose intensity was dependent on the added dose. These results suggest that the colored avocado seed extract has a strong potential to be a food colorant, although longer studies are necessary.

Key words: biorefinery, avocado seed, natural colorant, NADES, antioxidant, food colorant.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1 Extracción del colorante.....	14
1.2 Actividad Antioxidante.....	16
1.3 Colorantes naturales para uso alimenticio.....	17
1.4 Uso en Yogurt.....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo General.....	21
2.1 Objetivos Específicos.....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIALES.....</b>	<b>24</b>
5.1 Análisis de los aguacates ( <i>Persea americana</i> ) variedad Fuerte y Hass y sus semillas.....	24
5.2 Extracción del colorante.....	24
5.2.1 Extracción con etanol al 70%.....	25
5.2.2 Extracción con Glicerol:acetato de sodio (3:1).....	25
5.3 Rendimiento y concentración.....	25
5.4 Actividad Antioxidante.....	26
5.5 Cinética.....	26
5.6 Efecto del pH en el color.....	26
5.7 Estabilidad.....	27
5.8 Uso del colorante en el yogurt.....	27
<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
6.1 Análisis de los aguacates ( <i>Persea americana</i> ) variedad Fuerte y Hass.....	28
6.1.1 Selección y obtención de los aguacates.....	28
6.1.2 Obtención del porcentaje de representación de la semilla en el fruto.....	29
6.1.3 Obtención del porcentaje de humedad de las semillas.....	29
6.2 Extracción del Colorante, rendimiento y concentración.....	29
6.2.1 Preparación de la semilla.....	30
6.2.2 Extracción con etanol al 70%.....	30
6.2.3 Extracción con glicerol/acetato de sodio (3:1).....	31
6.2.3.1 Preparación del solvente.....	31
6.2.3.2 Extracción con glicerol/acetato de sodio.....	31
6.3 Capacidad Antioxidante Total.....	32
6.3.3 Preparación de reactivos.....	32
6.3.4 Preparación de la muestra.....	32
6.3.5 Preparación de la curva estándar de ácido úrico.....	32
6.3.6 Ensayo.....	32
6.3.7 Cálculo de resultados.....	33
6.4 Cinética.....	33
6.5 Efecto del pH.....	34
6.6 Estabilidad.....	34
6.7 Adición de colorante a yogurt.....	34
6.7.3 Test de preferencia visual.....	34



6.7.4	Medición de absorbancia y propiedades físicas de los yogurts coloreados....	35
6.8	Análisis Estadístico .....	35
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
7.1	Análisis de la materia prima .....	36
7.2	Rendimiento .....	36
7.3	Concentración.....	37
7.4	Actividad Antioxidante .....	38
7.5	Cinética.....	38
7.6	Efecto del pH en el color .....	39
7.7	Estabilidad .....	40
7.8	Aplicación del colorante en yogurt .....	41
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>TABLAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>GRÁFICOS.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Preparación del estándar de ácido úrico .....	69
<b>Tabla 2.</b> Distribución de las muestras para el análisis de estabilidad .....	69
<b>Tabla 3:</b> Conformación de los grupos de yogurts para la evaluación sensorial .....	70
<b>Tabla 4:</b> Características de las semillas y frutos utilizados para el proceso de extracción del colorante junto con el rendimiento del proceso de molienda. ....	70
<b>Tabla 5:</b> Comparación de propiedades físicas antes y después de añadir colorante de semilla de aguacate al yogurt natural. ....	71
<b>Tabla 6:</b> Comparación de propiedades físicas antes y después de añadir colorante vegetal durazno al yogurt natural.....	71

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> : Flujograma del proceso la evaluación física del aguacate y preparación de la semilla .....	72
<b>Gráfico 2</b> : Flujograma del proceso de la extracción del colorante de la semilla de aguacate	73
<b>Gráfico 3</b> : Flujograma del proceso de evaluación del color y uso en alimentos.....	74
<b>Gráfico 4</b> : Rendimiento porcentual (%) de la extracción del colorante de las 2 variedades de semilla con 3 solventes y su respectiva absorbancia a 480 nm. Cada valor representa la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ....	75
<b>Gráfico 5</b> : Gráfica Matriz de rendimiento; Absorbancia 480 nm .....	75
<b>Gráfico 6</b> : Espectro visible de absorción del extracto obtenido de la semilla de aguacate....	76
<b>Gráfico 7</b> : Curva de calibración obtenida para la concentración de extracto coloreado de la semilla de aguacate en PPM .....	76
<b>Gráfico 8</b> : Concentración del extracto obtenido en ppm a partir de las 2 variedades de semilla con los 2 solventes. ....	77
<b>Gráfico 9</b> : Curva de calibración ensayo TAC.....	77
<b>Gráfico 10</b> : Capacidad Antioxidante Total del extracto de semilla de aguacate con 3 diferentes solventes y 2 variedades distintas de aguacate. ....	78
<b>Gráfico 11</b> : Gráfica de Matriz: Capacidad Antioxidante, Absorbancia a 480 nm .....	78
<b>Gráfico 12</b> : Cinética de formación del colorante de la semilla de aguacate con 3 diferentes solventes. ....	79
A: modelo de tendencia curva S, B: modelo de tendencia cuadrática, C: modelos de curva de crecimiento, D: modelo de tendencia lineal. Cada valor representa la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes <b>Gráfico 13</b> : <i>Distintos modelos de tendencias de serie de tiempo probados para la extracción con glicerol:acetato de sodio 3:1. ....</i>	79
<b>Gráfico 14</b> : Distintos modelos de tendencias de serie de tiempo probados para la extracción con etanol al 70%. ....	80
<b>Gráfico 15</b> : Variación de la absorbancia a 480 nm en función al pH del extracto de la semilla de aguacate con 3 solventes distintos. ....	81
<b>Gráfico 16</b> : Análisis de estabilidad en condiciones de oscuridad.....	82
<b>Gráfico 17</b> : Análisis de estabilidad en condiciones de Luz .....	82
<b>Gráfico 18</b> : Preferencia visual de yogurt adicionado con distintas cantidades de colorante extraído de la semilla de aguacate.....	82
<b>Gráfico 19</b> : Preferencia visual de yogurt adicionado con distintas cantidades de colorante vegetal alimenticio de la empresa Tisproquimicos.....	83
<b>Gráfico 20</b> : Preferencia visual de distintas marcas de yogurt sabor durazno.....	84
<b>Gráfico 21</b> : Espectro de absorción de 4 yogurts distintos.....	84

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Imagen 1:</b> Variedades de aguacate utilizadas en la presente investigación. Izquierda: Fuerte, derecha: Hass .....	85
<b>Imagen 2:</b> Extracción del tegumento de la semilla de aguacate.....	85
<b>Imagen 3:</b> Semilla de aguacate molida.....	86
<b>Imagen 4:</b> Semilla licuada con 0.7 volúmenes de agua destilada. Izquierda: 1 minuto de exposición al aire, Derecha: 35 minutos de exposición al aire .....	86
<b>Imagen 5:</b> Extracción del colorante de la semilla de aguacate con sistema de reflujo. Izquierda: extracción con glicerol:acetato de sodio 3:1, Derecha: extracción con etanol al 70% .....	87
<b>Imagen 6:</b> Torta obtenida después de la filtración al vacío del extracto obtenido con etanol al 70% .....	88
<b>Imagen 7: Extracto</b> coloreado sin concentrar. Izquierda: extracción con agua, Medio: extracción con etanol al 70%, Derecha: extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1)..	88
<b>Imagen 8:</b> Extracto de la semilla de aguacate obtenido con agua destilada después de la centrifugación .....	89
<b>Imagen 9:</b> Espectrofotómetro y celdas de cuarzo utilizadas para el análisis UV .....	90
<b>Imagen 10:</b> Cambios visuales en el color del extracto al incubar la semilla licuada por diferentes periodos de tiempo. ....	90

# 1. INTRODUCCIÓN

El aguacate es una fruta de consumo tradicional ecuatoriano, se la usa frecuentemente en la comida típica y tiene gran aceptación en la población. Según datos del INIAP (2008), la producción de aguacate destinada al consumo nacional es de 1 kilogramo anual per cápita aproximadamente. Las principales zonas de producción son Carchi, Loja, Pichincha, Imbabura, Azuay y Tungurahua. Actualmente existe una tendencia al incremento de la superficie cultivada debido a su alta demanda tanto nacional como extranjera. Las variedades principalmente cultivadas son la Fuerte y la Hass, la primera destinada especialmente al consumo nacional mientras que la segunda a la exportación (Viera, Sotomayor, & Viera, 2016). La producción y consumo nacional de aguacate genera gran cantidad de desechos que son considerados indeseables en la industria como la cáscara y la semilla. La semilla del aguacate representa alrededor del 16% del peso del fruto y se le atribuyen compuestos interesantes como: ácidos grasos, esteroides, antioxidantes y potasio. Por estas características se considera a la semilla como un recurso subutilizado siendo un candidato idóneo para la revalorización de subproductos agroindustriales mediante la biorrefinería (Dávila, Rosenberg, Castro, & Cardona, 2017; Tremocoldi et al., 2018; Viera et al., 2016).

Actualmente debido al creciente rechazo del consumidor hacia los productos artificiales, los colorantes naturales han despertado gran expectativa porque además de su agradable apariencia, se le atribuyen propiedades saludables (Eddy, Indo, & Air, 2005). La semilla de aguacate es una potencial materia prima para la extracción de colorante natural, ya que al triturarla en presencia de solventes (agua desionizada, hidróxido de sodio, metanol) se forma un pigmento de color naranja. La formación del color es dependiente de la enzima polifenol

oxidasa (PFO). La intensidad del color tiene una relación directamente proporcional con la concentración de PFO. El extracto coloreado ha mostrado uso potencial en alimentos como lácteos y harinas (Dabas, n.d.; Devian & Saldarriaga, 2015).

### **1.1 Extracción del colorante**

Devia-Pineda & Saldarriaga (2005) reportaron la extracción de colorante de la semilla de aguacate con 6 solventes diferentes. La extracción más eficiente fue con hidróxido de sodio. Rendimientos bajos se reportaron con alcohol etílico, agua y agua acidificada con ácido clorhídrico. No se obtuvo colorante con cloruro de carbono, acetona y éter etílico (Devian & Saldarriaga, 2015). Papadopoulou, Efstathiadou, Patila, Polydera, & Stamatis, (2016) reportaron que el solvente más adecuado para la extracción de colorantes naturales direccionados a la industria alimenticia es el etanol debido a que es considerado como seguro y se obtienen buenas concentraciones del pigmento (comparaciones realizadas con ácido clorhídrico, acetona y metanol) (Papadopoulou, Efstathiadou, Patila, Polydera, & Stamatis, 2016). Díaz-garcía, Castellar, Obón, Obón, & Rivera (2014) realizaron la extracción de un extracto rico en antocianinas para su uso en la industria alimenticia de *Thymus moroderi*. Usaron como solventes metanol, etanol, acetonitrilo y acetona mezclados en diferentes proporciones con ácido clorhídrico. La mejor extracción se registró con metanol/ácido clorhídrico y acetona/ácido clorhídrico; ambos en proporciones 50/50, v/v. Los autores recomendaron el uso de metanol/ácido clorhídrico por estar aprobado para la obtención de antocianinas para colorantes alimenticios (Díaz-garcía, Castellar, Obón, Obón, & Rivera, 2014). Suarez et al. (2016) realizaron la comparación de 2 tipos de solventes para la extracción de colorante de la semilla de aguacate: etanol y éter de petróleo. Además, evaluaron 2 variables adicionales: variedades de aguacate (Hass y Lorena) y estado de la

semilla. Se evidenció un mayor rendimiento con etanol en semillas frescas de la variedad Hass (Suarez et al., 2016). Tremocoldi et al. (2018) reportaron una extracción con alto contenido polifenólico bioactivo tanto de la piel como de la semilla de aguacate (variedades Hass y Fuerte) utilizando como solvente una mezcla de etanol/agua (80/20, v/v) (Tremocoldi et al., 2018).

En los últimos 5 años, se han introducido los solventes verdes denominados NADES (Natural Deep eutectic solvents) para la extracción de productos naturales. Estos solventes están formados por una combinación eutéctica de ácidos y bases de Brønsted o Lewis que contienen diversos cationes y/o aniones. El tipo III de NADES está formado por cloruro de colina y donadores de enlaces de hidrógeno en los que se incluye diversas amidas y polioles (glicerol, fructosa, urea). Este tipo de NADES se ha propuesto como un novedoso método de extracción por su bajo costo, alto rendimiento, simpleza, capacidad de estabilización y principalmente por ser considerado como “solvente verde” por su innata baja toxicidad y presión de vapor (en comparación con la mayoría de los solventes orgánicos) (Dai, Spronsen, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2013; Smith, Abbott, & Ryder, 2014). Dai, Verpoorte, & Choi (2014) reportaron mayor estabilidad de los pigmentos naturales del alazor, *Carthamus tinctoriu*, al ser extraído con NADES (basados en azúcar) en comparación con agua y etanol al 40%. Esta mayor estabilidad se le atribuyó a la disminución del contenido de agua y al incremento de viscosidad. Esta característica los hace prometedores para la extracción de compuestos fenólicos para su aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica (Dai, Verpoorte, & Choi, 2014). Mouratoglou, Malliou, & Makris (2016) utilizaron mezclas eutécticas naturales basadas en glicerol para la extracción de compuestos fenólicos de distintos residuos agroalimentarios. Las mezclas eutécticas probadas en disolución acuosa al 90%, v/v fueron: glicerol-cloruro de colina (3:1), glicerol-acetato de sodio (3:1),

glicerol:tartrato de sodio:agua (5:1:4). Como control se usó agua y etanol acuoso al 60% (v/v). Las mayores eficiencias se obtuvieron con cloruro de glicerol:colina y glicerol:acetato de sodio (Mouratoglou, Malliou, & Makris, 2016). Para la extracción con NADES los autores recomiendan extracción asistida por ultrasonido (Krumreich, Borges, Mendonça, Jansen-Alves, & Zambiasi, 2018; Segovia, Corral-Pérez, & Almajano, 2016; Tesfay, Magwaza, Mbili, & Mditshwa, 2017).

## 1.2 Actividad Antioxidante

Estudios relacionan directamente la concentración de polifenoles de un extracto con su actividad antioxidante (Hurtado-Fernández, Pacchiarotta, Mayboroda, Fernández-Gutiérrez, & Carrasco-Pancorbo, 2014). Pahua-ramos, Ortiz-moreno, Necochea-mondragón, & Hernández-ortega (2012) encontraron una gran cantidad de compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes en la semilla de aguacate. El ácido protocateuico fue el principal compuesto fenólico encontrado con 128.18  $\mu\text{g/g}$  de peso seco de la semilla. El contenido fenólico total fue de  $292.00 \pm 9.81$  mg equivalentes de ácido gálico / g de peso seco de la semilla y la actividad antioxidante fue de 173,3  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox / g peso seco (Pahua-ramos, Ortiz-moreno, Necochea-mondragón, & Hernández-ortega, 2012). Díaz-García et al. (2014) evaluaron la actividad antioxidante del extracto rico de antocianinas de *T. moroderi* que fue de 0.707 mmol equivalente Trolox  $\text{g}^{-1}$  peso seco y lo compararon con colorantes naturales comúnmente utilizados en la industria alimenticia. La actividad antioxidante obtenida fue un 69.5 más alta que el colorante comercial rojo de zanahoria y 39.8 más alto que el colorante de la piel de las uvas (Díaz-garcía et al., 2014). Tremocoldi et al. (2018) evaluaron la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos de la piel y la semilla de aguacate (en dos variedades: Hass y Fuerte). La actividad antioxidante para la



variedad Fuerte semilla fue de 464.9  $\mu\text{mol TE/g}$ ; mientras que para la piel de 420.5  $\mu\text{mol TE/g}$ . Para Hass fue de 310  $\mu\text{mol TE/g}$  para la piel y 410.7  $\mu\text{mol TE/g}$  para la semilla. Los compuestos bioactivos fenólicos encontrados tanto en la piel como en la semilla de las dos variedades fueron: ácido fenólico, catequina, epicatequina, procianidina B1 y B2. Además se encontró que el extracto de la cáscara de Fuerte suprimió la liberación de TNF- $\alpha$  (495.3  $\mu\text{g/ml}$ ) y NO (8.5  $\mu\text{M}$ ) en macrófagos RAW 264.7 activados (Tremocoldi et al., 2018).

### **1.3 Colorantes naturales para uso alimenticio**

Una de las características clave para la aceptación de un producto alimenticio por parte del consumidor es el color, debido a que se lo relaciona con el sabor, el olor y la calidad. Según la definición de Delgado-Vargas (2002) un colorante es aquella sustancia capaz de cambiar el color percibido de un objeto o proporcionar color a un objeto incoloro. Los colorantes tienen estructuras químicas diversas, aunque todas estas sustancias tienen en común que pueden absorber y emitir radiación dentro del espectro visible. Tanto los pigmentos como los tintes son considerados colorantes, diferenciándose entre sí en que los pigmentos necesitan de un vehículo adherente para poder colorear cierto sustrato mientras que los tintes lo colorean directamente (Delgado-Vargas, 2002). Los colorantes alimenticios se caracterizan por poseer un sistema de electrones deslocalizados producido por la presencia de dobles enlaces conjugados, el número de estos dobles enlaces está relacionado con el color reflejado. (Dabas, Shegog, Ziegler, & Lambert, 2013). Actualmente, los colorantes artificiales son los mayormente utilizados por su estabilidad, costo y sencillez de producción. Sin embargo, se estima que en los próximos años se reduzca su uso ya que algunos presentan efectos nocivos para la salud y por la preferencia del consumidor hacia los productos naturales. Un ejemplo de un colorante artificial con efectos nocivos para la salud es la tartrazina que ha mostrado

causar alteraciones bioquímicas en órganos vitales y causar efectos adversos en funciones de aprendizaje, memoria y capacidad reproductiva masculina (Masone & Chanforan, 2015). Los colorantes naturales se definen como aquellos que son sintetizados y/o acumulados por células vivas. Estos están clasificados por el FDA como exentos a certificación por ser considerados generalmente como seguros (exentos a certificación significa que no necesitan cumplir todos los requerimientos de la certificación batch, aunque sí deben ser aprobados por esta agencia antes de que puedan ser usados en alimentos en Estados Unidos) (Dabas et al., 2011; Suarez et al., 2016). En Ecuador, para que un nuevo aditivo alimentario pueda ser comercializado (sin importar su origen) necesita cumplir ciertos requisitos establecidos por el INEN. Estos requisitos se encuentran en el CODEX STAN 192-1995 y establecen que:

Para reconocer un nuevo aditivo alimenticio como adecuado es necesario que haya sido asignada una ingestión diaria admisible (IDA) o que su inocuidad haya quedado establecida, con arreglo a otros criterios, por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y de aquellos a los que el Codex ha atribuido una designación con arreglo al Sistema Internacional de Numeración (SIN) (INEN, s.f).

La semilla de aguacate es un candidato ideal como materia prima para la producción de colorantes naturales debido a que además del agradable color que se produce después de su extracción se ha reportado que posee un alto contenido de productos bioactivos como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos condensados que están asociados a propiedades antioxidantes e inflamatorias (Arlene, Prima, Lutama, & Anggraini, 2015; Bressani, Rodas, & Ruíz, 2006; Tremocoldi et al., 2018). Devia-Pineda & Saldarriaga (2004) reportaron buena estabilidad, suspensión y color del extracto de la semilla de aguacate en productos lácteos y en harinas. Para el uso alimenticio del colorante recomendaron la disolución del extracto en

etanol y posterior filtración; en caso de que se use hidróxido de sodio como solvente de extracción (Devia-Pineda & Saldarriaga, 2005). Dabas, Elias, Lambert, & Ziegler (2011) revelaron el potencial uso del extracto de la semilla de aguacate en jugo y leche al presentar una buena coloración y estabilidad a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 2 meses. Además, evaluó su seguridad de consumo en ratas en las que no hubo ningún efecto adverso en las 2 semanas siguientes de ingesta (Dabas et al., 2011). Díaz-García et al. (2014) proponen a los extractos ricos en antocianinas de *T. moroderi* para su uso en la industria alimenticia como fortificante antioxidante por presentar estabilidad, fuerza de color y actividad antioxidante alta (Díaz-garcía et al., 2014). Muchos autores concuerdan que la principal dificultad para el uso del colorante de la semilla de aguacate en alimentos es su inestabilidad a altas temperaturas. Esta dificultad podría ser superada con el uso de NADES. Actualmente no se ha realizado ningún estudio que pruebe este tipo de solventes en este producto. Sin embargo, se presume su potencialidad por estudios similares. Por ejemplo, el estudio de Dai, Verpoorte, & Choi (2014) reporta una mayor estabilidad térmica de los pigmentos naturales del alazor con el uso de NADES (Dabas, Shegog, Ziegler, & Lambert, 2013; Dai et al., 2014).

#### **1.4 Uso en Yogurt**

El yogurt es una bebida fermentada que cuenta con una alta aceptación por parte de los consumidores por su sabor, valor nutritivo y por ser considerado un alimento funcional (cuando es adicionado con probióticos y/o prebióticos). El yogurt natural se produce al concentrar leche y adicionarla con bacterias lácticas para que se produzca fermentación. Adicionalmente, se producen otras variedades aromatizadas, coloreadas y/o complementadas a través de la incorporación de ingredientes naturales o sintéticos (Coïsson, Travaglia, Piana, Capasso, & Arlorio, 2005). Dentro de los complementos naturales añadidos

se encuentran las pulpas y jugos de frutas ricos en antocianinas que brindan aromas, sabores y colores atractivos brillantes que aumentan la aceptación del consumidor (Aguilera-ortíz, Reza-vargas, Chew Madinaveitia, Valenzuela, & Ramírez Baca, 2012). Salinas et al. (2005) reportaron el uso de colorantes naturales provenientes de *Zea mays* L. en yogurt presentando los cambios de color más significantes en los primeros diez días de almacenamiento seguido por una disminución en la luminosidad y pureza. Sin embargo, esta reducción no fue perceptible a simple vista por lo que se consideró viable la coloración con este tipo de pigmentos (Salinas, Rubio, & Díaz, 2005). Wallace & Giusti (2008) incorporaron antocianinas extraídas de *Berberis boliviana* Lechler a yogurt con diferentes niveles de grasa obteniendo un color intenso y estabilidad fenólicas sin diferencias en la variable utilizada durante los 8 semanas que duró el estudio (Wallace & Giusti, 2008).

Con el fin de proponer un proceso de biorrefinería para la semilla de aguacate se realizó la extracción del colorante anaranjado con 2 solventes distintos: etanol al 70% (EtOH) y glicerol:acetato de sodio (3:1) (Gly: NaOAc). Se evaluó el rendimiento y concentración, así como también la cinética, estabilidad, actividad antioxidante, influencia de pH y el posible uso en yogurt.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Proponer la extracción de un colorante natural con capacidad antioxidante como alternativa para la biorrefinería de la semilla del aguacate (*Persea americana*) variedades Fuerte y Hass.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Evaluar el rendimiento de extracción del colorante con 2 solventes diferentes: etanol 70% y el solvente eutéctico profundo natural (NADES) glicerol/acetato de sodio (3:1).
- Evaluar la cinética de formación del color
- Evaluar el efecto del pH en el color
- Evaluar la estabilidad del colorante en condiciones de luz, oscuridad y a temperaturas de 4 °C y ambiente
- Evaluar la capacidad antioxidante total del colorante obtenido.
- Evaluar el posible uso del colorante obtenido en yogurt.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una tendencia mundial hacia el desarrollo sustentable con el objetivo de suplir las necesidades presentes sin comprometer la estabilidad del futuro. Un modelo de este tipo de desarrollo son las biorrefinerías que se definen como instalaciones basadas en la conversión biotecnológica y química de la biomasa con el objetivo de valorizarlas de forma rentable y sostenible (Kamm & Kamm, 2004). Una industria que genera gran cantidad de biomasa en forma de desechos es la de alimentos produciendo 1.2 billones de toneladas al año. Tradicionalmente el reciclaje de estos se lo ha destinado para alimentos de animales y fertilizantes; sin embargo, se busca alternativas más eficientes que aprovechen los compuestos bioactivos que se pudieran contener (Jin, Yang, Poe, & Huang, 2018).

La importancia de producir un colorante natural funcional en Ecuador radica en el direccionamiento de la matriz productiva del país hacia la bioeconomía, la priorización del gobierno por el consumo de alimentos saludables y la reducción de importaciones. El Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 propone reducir la dependencia económica basada en actividades extractivas reemplazándola por el bioconocimiento y bioeconomía (INABIO, 2017). Según el ARCSA (2017), en el país se prohíbe el uso de aditivos alimentarios que no ofrezcan ventajas o presenten riesgos a la salud del consumidor (ARCSA, 2017). Según el Centro de Comercio Internacional en el 2017 Ecuador importó \$151.234 en colorantes (INTRACEN, 2018). De esta forma; se busca reducir importaciones relacionadas a los colorantes alimenticios con la producción nacional de uno con propiedades antioxidantes proveniente de una fuente biológica desaprovechada.

## 4. ÁREA DE ESTUDIO

Los aguacates (*Persea americana*, variedad Fuerte y Hass) fueron obtenidos en el mercado de Iñaquito de la ciudad de Quito ( $0^{\circ} 10'18,207''$  S;  $78^{\circ}29'1,388''$  O), provincia Pichincha, país Ecuador en los meses de septiembre a octubre del 2018 siguiendo un muestreo no probabilístico, de acuerdo con la conveniencia del estudio. Según entrevistas con los vendedores, el fruto provenía de la localidad de Guayllabamba ( $0^{\circ}3'50,358''$  S;  $78^{\circ}21'0,314$  O), provincia Pichincha, país Ecuador.

La parte experimental se la realizó en los laboratorios del departamento de ingeniería química de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en la ciudad de Quito, provincia Pichincha, país Ecuador.

## 5. MATERIALES

### 5.1 Análisis de los aguacates (*Persea americana*) variedad Fuerte y Hass y sus semillas.

10 aguacates variedad Fuerte

10 aguacates variedad Hass

Balanza analítica HAUS

Estufa MEMMERT

Hipoclorito de sodio al 10%

Cuchillo

Molino PULVEX mini

### 5.2 Extracción del colorante

12.5 gramos de semilla molida Hass para cada extracción

12.5 gramos de semilla molida Fuerte para cada extracción

Licuada Oster

6 balones de fondo redondo de 250 ml

Plancha de calentamiento Thermo Scientific

Termómetro de mercurio

Bomba de pecera

Soporte universal

Teflón

Refrigerante



Agua destilada

### **5.2.1 Extracción con etanol al 70%.**

Alcohol Etílico al 96% marca Tisproquimicos

Agitador magnético

3 kitsatos

3 adaptadores de goma

3 embudos de Büchner

Bomba de vacío Thermo Scientific

Papel filtro Whatman 1: 11  $\mu\text{m}$

Centrifugadora Thermo Scientific

Estufa MEMMERT

### **5.2.2 Extracción con Glicerol:acetato de sodio (3:1).**

Glicerol USP 99.5% marca Tisproquimicos

Acetato de sodio

Papel aluminio

2 botellas ámbar de 1000 ml

## **5.3 Rendimiento y concentración**

4 celdas de Quarzo

Espectrofotómetro Thermo Scientific

Balanza analítica Thermo Scientific

## 5.4 Actividad Antioxidante

OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit Cell Biolabs

4 celdas de Cuarzo

Espectrofotómetro Thermo Scientific

NaOH 1 M

PBS 1 X

Agua destilada

Centrifugadora Thermo Scientific

Micropipeta ajustable de 10  $\mu$ L a 1000  $\mu$ L con puntas

Micropipeta ajustable de 50  $\mu$ L a 300  $\mu$ L con puntas

## 5.5 Cinética

Celdas de Cuarzo

Espectrofotómetro Thermo Scientific

## 5.6 Efecto del pH en el color

Celdas de Cuarzo

Espectrofotómetro Thermo Scientific

PBS 1X

NaOH 1 M

HCl 1 M

Centrifugadora Thermo Scientific

## **5.7 Estabilidad de almacenamiento**

PBS 1 X

Centrifugadora Thermo Scientific

Refrigeradora

8 frascos ámbar

## **5.8 Uso del colorante en el yogurt**

3 litros de yogurt natural marca Toni

1 litro de yogurt sabor durazno marca Toni

500 gramos de colorante vegetal durazno marca Tisproquimicos

1 litro de yogurt Chivería durazno

1 litro de yogurt Kiosko durazno

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Análisis de los aguacates (*Persea americana*) variedad Fuerte y Hass

Tanto la selección de los aguacates como el cálculo de los porcentajes de representación y de humedad de las semillas se los realizó con la metodología propuesta por Segovia et al., 2016 con la modificación de que se utilizó dos variedades distintas (Fuerte y Hass).

#### 6.1.1 Selección y obtención de los aguacates.

Los aguacates fueron adquiridos en el mercado de Ñaquito, ubicado en el norte de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha, país Ecuador ( $0^{\circ} 10' 18,207''$  S;  $78^{\circ} 29' 1,388''$  O), los cuales eran provenientes de la localidad de Guayllabamba ( $0^{\circ} 3' 50,358''$  S;  $78^{\circ} 21' 0,314$  O). La selección de los aguacates se la realizó con un modelo no probabilístico. Los criterios de selección fueron los siguientes:

- Frutos con características morfológicas similares (forma y tamaño) con el objetivo de disminuir las variables que pudieran influir en los resultados (Segovia et al., 2016).
- Frutos en estado de madurez fisiológica debido a que al ser la biorrefinería el objetivo principal de esta investigación se escogió el estado de maduración correspondiente a los aguacates que originan la mayor cantidad de desechos. Los 3 principales orígenes de residuos de aguacate son: consumo directo de la población, elaboración industrial de productos con valor agregado (como el guacamole) y frutos rechazados en el proceso de exportación (por diversas razones como deficiencia de calidad, inadecuada manipulación o

incumplimiento de los índices de contenido de humedad) (Segovia et al., 2016; FAO, 2004). Estas 3 fuentes generan una gran cantidad de desechos en Ecuador debido al gran consumo interno del aguacate (1 kilogramo anual per cápita aproximadamente) y por el alto índice de rechazo de los frutos destinados a exportación (del 20 al 50%) (INIAP, 2008; FAO, 2004). Los residuos producidos en estas fuentes generalmente provienen de aguacates maduros debido a que es la etapa de preferencia para el consumo humano y porque para el cumplimiento de los criterios de exportación es necesario cosechar los frutos en estado de madurez fisiológica, si son recolectados antes es posible que no cumplan con los índices de humedad requeridos (Segovia et al., 2016; FAO, 2004).

#### **6.1.2 Obtención del porcentaje de representación de la semilla en el fruto.**

Primero se pesaron los frutos, después se procedió a extraer las semillas, se las pesó y se obtuvo su porcentaje de representación en el fruto.

#### **6.1.3 Obtención del porcentaje de humedad de las semillas.**

Una vez retiradas las semillas de los frutos se las lavó con hipoclorito de sodio al 10%, se les retiró el tegumento y se las cortó con un cuchillo en pedazos de aproximadamente 0,5 x 0,5 ml. Los pedazos resultantes fueron molidos usando una malla de 0,20 mm. Las semillas molidas fueron colocadas en la estufa a 55 °C, fueron pesadas cada 12 horas hasta obtener un peso constante.

### **6.2 Extracción del Colorante, rendimiento y concentración**

La extracción se la realizó con dos solventes: etanol al 70% (concentración y solvente sugerido por Segovia et al., 2016 por su alto rendimiento) y glicerol/acetato de sodio (3:1),

proporción y solvente sugerida por Mouratoglou et al., 2016 por ser el NADES con mayor rendimiento. La combinación glicerol:colina (3:1) tuvo un rendimiento similar pero el costo fue mayor.

### **6.2.1 Preparación de la semilla**

Para la preparación de la semilla se siguió la metodología propuesta por Dabas et al., 2011 debido a sus buenos resultados. Se extrajeron las semillas de 9 frutos, se las cortó con un cuchillo en pedazos de aproximadamente 0,5 x 0,5 ml, que fueron colocados en el vaso de la licuadora, se añadió 0,7 volúmenes de agua destilada y se procedió a licuar hasta obtener una pasta homogénea. Se esparció esta pasta sobre una tabla de pizarra logrando aproximadamente 1 cm de grosor y se la dejó reposar durante 35 minutos.

### **6.2.2 Extracción con etanol al 70%**

Se utilizó una combinación de las metodologías propuestas por Suarez et al., 2016 y Segovia et al., 2016 debido a los altos rendimientos obtenidos y por practicidad. Después de los 35 minutos de reposo de la pasta, se colocó 12,5 gramos de esta en un balón de fondo redondo de 500 mL donde se agregó 250 mL de etanol al 70%. Se sometió a extracción por reflujo a una temperatura de 70 °C durante 120 minutos. El extracto fue filtrado al vacío. El filtrado se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante obtenido. El sobrenadante se concentró en el rotavapor. El concentrado obtenido se secó a 40°C durante 12 horas para obtener el colorante en polvo. El polvo obtenido fue pesado con el objetivo de medir el rendimiento conseguido. El polvo fue disuelto en 20% de etanol a una concentración de 2 mg/mL, se centrifugó la mezcla a 1000 rpm por 10 minutos, se realizó un barrido en el espectro visible, se observó el pico máximo de absorción y se midió la absorbancia a la longitud máxima encontrada que fue de 480 nm (Suarez et al., 2016; Segovia et al., 2016). La absorbancia máxima a 480 nm es característica de algunas sustancias como: tintes de tipo azo

como el ácido naranja números 52 y 7 (formados por hidrólisis por acción del hidróxido de estroncio), benzoquinonas y astaxantina. El compuesto nitrato de hierro III también tiene una absorbancia máxima en este punto (Dai, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2015; Mouratoglou et al., 2016). Se utilizó la extracción con agua desionizada como control.

### **6.2.3 Extracción con el solvente eutéctico profundo natural (NADES) glicerol/acetato de sodio (3:1)**

#### ***6.2.3.1 Preparación del solvente***

La preparación del solvente se basó en la metodología propuesta por Dai et al., 2014 citado por Mouratoglou et al., 2016. Se mezcló el glicerol con acetato de sodio en una proporción 3:1 a 70 °C con agitación de 700 rpm durante 45 minutos hasta formar un líquido transparente. Se mantuvo el solvente en un recipiente de vidrio sellado en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente hasta que fue usado. Para la extracción se utilizó este solvente en solución acuosa al 90% (v/v) (combinación sugerida por Dai, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2015 por facilitar su aplicación) (Dai, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2015; Mouratoglou et al., 2016).

#### ***6.2.3.2 Extracción con glicerol/acetato de sodio***

Se siguió la misma metodología que la extracción con etanol al 70%, excepto que no se concentró ni secó el extracto, después de la centrifugación se tomó el sobrenadante y se lo pesó con el objetivo de obtener el rendimiento. Luego de pesarlo se lo disolvió en agua destilada a una concentración de 2 mL/mL, se centrifugó la muestra a 1000 rpm por 10 minutos, se realizó un barrido en el espectro visible, se registró el pico máximo de absorción y se midió la absorbancia a la longitud máxima encontrada que fue de 480 nm.

### **6.3 Capacidad Antioxidante Total**

La capacidad antioxidante total se midió con el Kit Cell Biolab's OxiSelect™ TAC basado en la reducción del cobre (II) a cobre (I) por la acción de antioxidantes

#### **6.3.3 Preparación de reactivos**

Los reactivos fueron preparados según las instrucciones del proveedor del kit. Se preparó el buffer de reacción 1 X diluyéndolo en una proporción de 1:1000 en PBS 1 X. Se preparó el reactivo ion cobre 1 X diluyéndolo en una proporción de 1: 100 en agua destilada. Se preparó la solución de detención de la reacción 1 X diluyéndola en una proporción 1: 10 en agua destilada. Todos los reactivos se mezclaron hasta que quedaron homogéneos y fueron almacenados a 4 °C hasta ser utilizados.

#### **6.3.4 Preparación de la muestra**

Se realizó una segunda extracción con los 3 solventes, con la diferencia que en esta ocasión no se secaron los extractos obtenidos con etanol al 70% y con agua destilada. Después de la centrifugación los extractos fueron colocados a 4 °C durante 24 horas. Después de las 24 horas se diluyeron las muestras en PBS en una proporción 2:1.

#### **6.3.5 Preparación de la curva estándar de ácido úrico**

Se preparó el estándar de ácido úrico en NaOH 1 N en una proporción de 10 mg/ml dando como resultado una concentración de 60 mM de ácido úrico. Se agregaron 100 µL del estándar de ácido úrico a 2900 mL de agua destilada con el fin de obtener una solución de ácido úrico 2 mM. A partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas de ácido úrico en agua destilada tal como se detalla en la tabla 1.

#### **6.3.6 Ensayo**



Tanto los estándares de ácido úrico como las muestras fueron analizados por triplicado. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de los estándares de ácido úrico o de las muestras del extracto coloreado a las cubetas del espectrofotómetro, se añadieron 360  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción 1 X a cada cubeta, se mezcló bien y se obtuvo la absorbancia inicial a 490 nm. Para iniciar la reacción se añadieron 100  $\mu\text{L}$  1X de reactivo ion de cobre a cada cubeta, se mezclaron vigorosamente durante 5 minutos. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de detención d la reacción 1 X para terminar la reacción. Se midió nuevamente la absorbancia a 490 nm.

### **6.3.7 Cálculo de resultados**

Se calculó la absorbancia neta restando las lecturas de las absorbancias iniciales de las finales tanto para muestras como para estándares. Se graficó la absorbancia neta vs la concentración de los estándares de ácido úrico para formar la curva estándar. Se calculó la capacidad antioxidante de las muestras comparando los valores netos de OD (densidad óptica) a 490 nm con la curva estándar de ácido úrico. Para determinar los “Equivalentes de Reducción de Cobre en  $\mu\text{M}$ ” (CRE) de las muestras se multiplicó la concentración de equivalentes de ácido úrico (EAU) por 2189  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{++}$  / ácido úrico mM. Los valores obtenidos de CRE fueron proporcionales a la capacidad total de antioxidantes de las muestras.

## **6.4 Cinética**

Se utilizó la metodología propuesta por Dabas et al., 2011. Se realizó nuevamente la extracción del colorante con el procedimiento citado anteriormente con la excepción de que antes de la extracción con reflujo se dejó reposar al aire la pasta obtenida de las semillas durante 0.5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 minutos; además el sobrenadante no se secó. Después de la centrifugación, se tomó el sobrenadante, se lo diluyó en agua destilada en una proporción 2:1 y se registraron las absorbancias a 480 nm (Dabas et al., 2011).

## **6.5 Efecto del pH**

Para empezar, se ajustó las absorbancias de todos los extractos mediante dilución. Una vez que se obtuvo absorbancias similares se prepararon las soluciones de PBS a diferentes pH: 2, 4, 6,7, 9 y 10. Se añadió el extracto coloreado a estas soluciones en proporción 2:1. Se agitaron las muestras y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos. La absorbancia visible fue registrada.

## **6.6 Estabilidad**

Este análisis solo se realizó utilizando la variedad de semilla Fuerte, debido a que presentó una mayor capacidad antioxidante total que la Hass (rendimiento y concentración fueron similares en las 2 variedades). Se utilizó la metodología propuesta por Dabas et al., 2011. El extracto sin secar se transfirió a nuevos tubos que contenían PBS a pH 7.5 en una proporción 2:1, se los selló y se los almacenó en 4 condiciones distintas de temperatura y luminosidad (mirar tabla 2 para conocer las condiciones específicas). Se midió la absorbancia todos los días durante 15 días (Dabas et al., 2011).

## **6.7 Adición de colorante a yogurt**

### **6.7.3 Test de preferencia visual**

El test de preferencia visual se lo realizó a un grupo de 30 personas. Este consistió en que las personas escogieran los 3 yogurts que visualmente sean de su mayor agrado. La condición de elección fue que tenían que escoger solamente 1 yogurt de cada grupo. Fueron en total 3 grupos conformados por 3 yogurts. El detalle de la conformación de los 3 grupos de yogurts se la puede observar en la tabla 3.

#### **6.7.4 Medición de absorbancia y propiedades físicas de los yogurts coloreados**

A los yogurts preferidos del test de preferencia visual y al yogurt natural (usado como control negativo) se les realizó un barrido en el espectro visible registrando los picos máximos encontrados. Se midió la densidad y pH antes y después de agregar tanto el colorante vegetal comercial como el extracto de la semilla de aguacate.

### **6.8 Análisis Estadístico**

Los resultados presentados en esta investigación se muestran como la media de 3 experimentos independientes. En los gráficos se incluyen las barras de error, a menos que se especifique lo contrario. Las diferencias entre medias se calcularon con la prueba Tukey o Dunnett's. Además, en ciertos casos se hizo análisis de varianza y gráficos de matriz. Para todos los análisis estadísticos se usó el software Minitab 18.

## 7. RESULTADOS

El flujograma del proceso general seguido para la obtención de los siguientes resultados se encuentra en los gráficos 1, 2 y 3.

### 7.1 Análisis de la materia prima

Como se observa en la tabla 4 el aguacate variedad Fuerte tiene un tamaño medio mayor ( $206.3 \pm 32.8$ ) que el de variedad Hass ( $167.1 \pm 11.33$  g), esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). El porcentaje ocupado de la semilla en el fruto es estadísticamente igual para las 2 variedades ( $p < 0,05$ ). La variedad cuya semilla presenta un mayor porcentaje de humedad es la Fuerte ( $58 \pm 65$  % vs  $32 \pm 5.6$ %), mientras que con la Hass se obtiene un mayor rendimiento luego del proceso de molienda ( $46 \pm 5.2$  % vs  $59 \pm 4.8$ %) (Las medias fueron obtenidas en base a 10 muestras analizadas de cada variedad sometidas a análisis Tukey con un  $\alpha=0.05$ ).

### 7.2 Rendimiento

Debido a la dificultad de secar el extracto obtenido con glicerol:acetato de sodio (3:1), se decidió medir el rendimiento de este colorante de acuerdo con el volumen obtenido y su concentración alcanzada, proponiendo su uso en alimentos sin la separación de su solvente. Los extractos obtenidos con etanol al 70% y agua destilada sí fueron sometidos al proceso de concentración y secado. El mayor rendimiento se obtuvo con glicerol:acetato de sodio y fue de:  $88.6 \pm 4.36$  % (con la semilla Hass) y  $88.2 \pm 6.2$  % (con la semilla Fuerte) con una absorbancia a 480 nm de  $0,652 \pm 0,03$  OD (con la semilla Hass) y  $0,608 \pm 0,02$  OD (con la semilla Fuerte). El rendimiento más bajo se obtuvo con agua destilada  $8 \pm 0,2$  % (con la semilla

Hass) y  $2,6 \pm 0,19\%$  (con la semilla Fuerte) con una absorbancia a 480 nm de  $0,267 \pm 0,013$  OD (con la semilla Hass) y  $0,223 \pm 0,03$  OD (con la semilla Fuerte). Se obtuvieron rendimientos intermedios con etanol al 70% de:  $19 \pm 1,98 \%$  (con la semilla Hass) y  $13 \pm 1.6 \%$  (con la semilla Fuerte) con una absorbancia a 480 nm de  $0,571 \pm 0,006$  OD (con la semilla Hass) y  $0,534 \pm 0,01$  OD (con la semilla Fuerte). Por análisis MANOVA se obtuvo que tanto el rendimiento como la absorbancia son significativamente diferentes con los diversos tratamientos ( $p < 0,05$ ). En la gráfica 4 y 5 se observa que tanto el rendimiento como la absorbancia son mayores con el solvente glicerol:acetato de sodio (3:1). La gráfica de matriz (gráfico 5) muestra que el extracto obtenido con etanol al 70% aunque presenta buena concentración, su rendimiento es muy bajo.

### 7.3 Concentración

Para obtener la concentración, primero se realizó un barrido en el espectro visible con el uso del espectrofotómetro donde se encontró un pico de absorbancia máxima a 480 nm (gráfico 6). Luego, con este pico de absorbancia se realizó una curva de calibración (gráfico 7) mediante diluciones seriadas del extracto concentrado obtenido con metanol. La ecuación calculada fue  $y = 4E-05x + 0.2211$ . No se muestra la concentración obtenida con agua destilada debido a que sus valores de absorbancia se encontraban muy por debajo de la recta de calibración, lo que no permitió una extrapolación. Como se observa en el gráfico 8 la mayor concentración obtenida ( $6000 \pm 800$  ppm; 0,486 en absorbancia) fue con la variedad Hass y solvente glicerol:acetato de sodio (3:1). Según análisis Dunnett las variedades no influyen significativamente en las concentraciones obtenidas ( $p > 0,05$ ), más si los solventes ( $p < 0,05$ ). Según el análisis de varianza tan solo el 3.05% de variación

de concentración corresponde a la semilla, mientras que el 93.07% corresponde al solvente.

#### **7.4 Actividad Antioxidante**

Se calculó la Capacidad Antioxidante Total en equivalentes reductores de cobre del extracto coloreado de dos variedades de semilla de aguacate con 3 solventes distintos. La ecuación obtenida a partir de la curva de calibración (gráfico 9) para calcular la concentración de ácido úrico fue:  $y = 0.9239x + 0.089$ . Según análisis Tukey tanto la variedad de la semilla como el solvente influyen en la capacidad antioxidante ( $P < 0,05$ ). Según análisis Dunett tanto la extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1) como con etanol al 70% son significativamente distintas que con agua destilada. Como se observa en la gráfico 10 la mayor capacidad antioxidante encontrada fue de aproximadamente 700 equivalentes reductores de cobre/ ml en la muestra extraída con glicerol:acetato de sodio con la variedad Fuerte. La menor capacidad antioxidante encontrada fue de aproximadamente 560 equivalentes reductores de cobre en la muestra extraída con agua destilada con la variedad Hass.

#### **7.5 Cinética**

La evaluación cinética de formación del colorante extraído de la semilla de aguacate se realizó midiendo los cambios de la absorbancia visible a 480 nm. En el gráfico 12 se observa que, independientemente del solvente, se presenta un crecimiento logístico con respecto al tiempo. Para verificar que la tendencia de las curvas es logística se usó el análisis de tendencia de series de tiempo, con el que se calculó también las asíntotas

(gráfico 13 y 14). Además, en el gráfico 12 se muestra la influencia de los diferentes solventes en la cinética de formación del color. Tanto con el uso de glicerol:acetato de sodio (3:1) como con etanol al 70% se observa una aproximación a una asíntota a los 30 minutos que corresponde a una absorbancia a 480 nm de 0.638 y 0.603 respectivamente. A pesar de que ambas curvas presentaron una tendencia igual, difirieron en que la curva correspondiente al uso del solvente etanol al 70% no presentó un aumento significativo de absorbancia entre los 0 y 5 minutos. Mediante ANOVA de un solo factor se determinó que entre los 0 y 2 minutos el solvente utilizado no influye en las absorbancias obtenidas ( $P > 0,05$ ); a partir de este tiempo si lo hace. La tercera curva mostrada en la gráfica 12 corresponde al uso del solvente agua destilada, como control negativo en la comparación, esta curva permanece sin aumento significativo de absorbancia hasta el minuto 25 donde presenta un cambio ligero. Se muestra también las pendientes de las curvas tanto con glicerol:acetato de sodio (3:1) como con etanol al 70%, en la porción donde presentan mayor tasa de crecimiento con su respectiva ecuación, con el fin de demostrar que las 2 exhiben una pendiente muy similar. En la imagen 10 se muestra una fotografía de las distintas muestras incubadas en los diferentes tiempos donde es posible observar que el color es perceptible visualmente desde los 0.5 minutos de incubación.

## **7.6 Efecto del pH en el color**

El análisis del efecto del pH en el extracto de la semilla de aguacate se lo realizó mediante la medición de los cambios en la absorbancia a 480 nm. En la gráfica 15 se observa que tanto el extracto obtenido con agua destilada como con etanol al 70% presentan curvas que prácticamente se sobreponen empezando con una absorbancia de aproximadamente 0,145 a pH 2 y mostrando un incremento progresivo que es lento hasta

llegar a 9, a partir de este valor se presenta una aceleración alcanzado una absorbancia máxima aproximada de 0.81. En el caso del extracto obtenido con glicerol:acetato de sodio (3:1) el incremento es mucho más lento y empieza con una absorbancia de 0,103. En este extracto no se presenta aceleración significativa, alcanzando una absorbancia máxima aproximada de 0,33. En el rango de pH común de los alimentos (de 3 a 7) el aumento progresivo de la absorbancia de los colorantes extraídos con los 3 solventes es lento y estable y no presenta aceleración alguna. En base a los resultados obtenidos en este análisis se concluye que independientemente del solvente utilizado el aumento de pH favorece el incremento de la absorbancia a 480 nm.

## **7.7 Estabilidad de almacenamiento**

Se midió la estabilidad del colorante de la semilla de aguacate variedad Fuerte en base a 2 variables distintas de almacenamiento: temperatura (4°C y temperatura ambiente) y luminosidad (luz y oscuridad). En condiciones de oscuridad (gráfico 16) se observa que todos los extractos fueron estables durante los 15 días, excepto el obtenido con agua destilada y almacenado tanto a 4 ° C como a temperatura ambiente, que presentó un aumento en la absorbancia a partir del día 12. Sin embargo, al realizar un análisis Tukey se determinó que estos incrementos no son estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ). En condiciones de luz (gráfico 17) se observa que los extractos obtenidos con agua destilada (ambas temperaturas de almacenamiento) y con etanol al 70% (almacenado a temperatura ambiente) tuvieron un aumento en la absorbancia a partir del noveno día; siendo el cambio más pronunciado con el agua. Al realizar un análisis Tukey se determinó que el único incremento significativo fue el que presentó el extracto obtenido con agua destilada y almacenado a temperatura ambiente ( $P > 0,05$ ).



## 7.8 Aplicación del colorante en yogurt

Por motivos prácticos la evaluación en yogurt se la realizó únicamente con el colorante extraído con el solvente eutéctico profundo debido a que fue el solvente con el que se obtuvo una mayor estabilidad, concentración y rendimiento. En base a la evaluación de preferencia visual de 30 personas (gráfico 18, 19 y 20) se escogió los siguientes yogurts para el análisis posterior: adicionado con 1 ml de colorante extraído de semilla de aguacate, adicionado con 10 mg de colorante vegetal durazno de la empresa Tisproquimicos y marca Toni sabor durazno. El espectro de absorbancia obtenido con estos 3 yogurts más un control negativo (yogurt natural) se muestra en el gráfico 21. El yogurt natural no presentó ningún pico de absorción. Los picos máximos de absorción para los otros 3 yogurts fueron: 480 nm (para el yogurt adicionado con semilla de aguacate), 425 nm (para el yogurt adicionado con colorante vegetal), 465 y 490 nm (para el yogurt marca Toni sabor durazno). El espectro de absorción obtenido sugiere que el yogurt con una mayor concentración de colorante es el adicionado con el pigmento de la semilla de aguacate, seguido por el yogurt marca Toni. Las tablas 5 y 6 muestran la comparación de 2 características físicas (densidad y pH) en los yogurts naturales antes y después de añadirles el colorante vegetal durazno o el extraído de la semilla de aguacate. Por análisis Tukey solo hubo diferencias significativas en la densidad del yogurt con colorante de semilla de aguacate ( $P > 0,05$ ) (tabla 6).

## 8. DISCUSIÓN

Según Bhattacharyya, & Jha (2012) el porcentaje que ocupa la semilla dentro del fruto del aguacatero varía de acuerdo con la variedad, el clima, la tierra y otras condiciones. Sin embargo, lo más común es que representen del 14 al 27% del peso total (Bhattacharyya & Jha, 2012). Las medias obtenidas en esta investigación se sitúan dentro de este rango:  $16 \pm 2.8$  % para Fuerte y  $15 \pm 1.5$ % para Hass. En el estudio de Mahawan, Tenorio, & Gomez (2015) se calculó el porcentaje de humedad de las semillas de una muestra de 50 aguacates Fuerte y Hass, obteniendo como resultado una media de  $76 \pm 6$ % para los primeros y  $66 \pm 5$ % para los segundos (Mahawan, Tenorio, & Gomez, 2015). Los valores obtenidos en este estudio son similares a estos:  $75 \pm 6.5$  % para Fuerte y  $69 \pm 5.6$ % para Hass. Con respecto al rendimiento obtenido luego del proceso de molienda, el conseguido con la semilla Hass fue superior con aproximadamente el 13% al de Fuerte, principalmente porque la molienda fue más sencilla debido a su menor contenido de humedad.

Suarez et al. (2016) en su estudio consiguieron un rendimiento medio aproximado del 20.0% con una absorbancia media aproximada a 480 nm de 0,48 OD utilizando etanol al 70% y semilla seca variedad Fuerte (Suárez et al., 2016). García (2012) obtuvo rendimientos del 7% con agua destilada, del 10% con etanol (al 35%) y del 14% con NaOH: sulfito de sodio (10:1) (García, 2012). El presente estudio presenta rendimientos y concentraciones similares a las obtenidas en los estudios anteriormente nombrados cuando se utiliza tanto agua como etanol al 70%, sin embargo, muestra un rendimiento muchísimo superior con glicerol:acetato de sodio (88,6%) con concentraciones ligeramente mayores que las conseguidas con etanol al 70% concentrado. Estos resultados son logrados gracias a que no se somete al extracto a

procesos de secado ni concentración. Esto solo es posible debido a la alta concentración obtenida con este solvente y a que sus componentes tienen una toxicidad aguda baja necesitando de una ingestión de al menos 125 mg/kg por hora de glicerol para causar algún efecto adverso mientras que el acetato de sodio se encuentra dentro de la clasificación de ingesta diaria “no limitada” según la FAO/WHO (National Center for Biotechnology Information, n.d.; Younes et al., 2018). El extracto obtenido de la semilla de aguacate, independientemente de la variedad, con el solvente glicerol:acetato de sodio se propone como una alternativa potencial para su uso directo en alimentos.

El pico máximo de absorción a 480 nm observado después del barrido al extracto colorante ha sido evidenciado también por otros autores como Dabas et al. (2011); Santana, Reis, Torres, Cabral, & Freitas (2014) y Suarez et al. (2016). Sin embargo, las concentraciones alcanzadas han sido diversas, por ejemplo: Santana, Reis, Torres, Cabral, & Freitas (2014) encontraron una concentración máxima de 2902 PPM usando etanol al 70%, a una temperatura de 40 ° C y un ratio alimentación:solvente de 1: 9; Dabas et al. (2011) con el uso de metanol consiguieron absorbancias máximas de 0,4 a 480 nm (aproximadamente), a 24 °C usando ultrasonido; Suárez et al. (2016) obtuvieron una absorbancia máxima de 0,415 a 480 nm utilizando semilla de variedad Hass con éter de petróleo (Dabas et al., 2011; Santana, Reis, Torres, Cabral, & Freitas, 2014; Suárez et al., 2016). En esta investigación se obtuvo valores ligeramente más bajos a los de Santana, Reis, Torres, Cabral, & Freitas (2014) al utilizar etanol al 70% (2210 PPM para Hass 1310 PPM para Fuerte); mientras que absorbancias un poco más altas que Dabas et al. (2011) y Suarez et al. (2016). al realizar la extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1) con la variedad Hass (0,460). Es complicado manifestar cuáles son las condiciones que influyen a la variabilidad de la concentración, dado que existen muy pocas

investigaciones direccionadas al diseño de la extracción de este colorante. El estudio de Devian & Saldarriaga (2015) es uno de los pocos que se enfoca en este aspecto (a partir de este se escogió las constantes utilizadas en esta investigación). Estos autores a través de su análisis experimental encontraron que la temperatura de extracción no es un factor fuertemente influyente, mientras que el tiempo y la relación soluto:solvente si lo son (Devian & Saldarriaga, 2015). A esos hallazgos, la presente investigación podría aportar que la variedad de la semilla tiene poca incidencia (al menos en el caso de Hass y Fuerte); mientras que los solventes tienen un fuerte impacto en las concentraciones obtenidas. Las concentraciones superiores obtenidas con el glicerol:acetato de sodio (3:1) comparadas con las conseguidas con el solvente orgánico se deben posiblemente a que el solvente eutéctico presenta un mayor pH (7.4 vs 6.8), una mayor viscosidad (397 mm<sup>2</sup>/s a 40 °C vs 0.5142 mm<sup>2</sup>/s a 50°C) y una polaridad más parecida a la del metanol que el etanol al 70% <sup>1</sup> (Mouratoglou et al., 2016; Rajasingam et al., 2004). Así también, cabe recalcar que a través de los estudios cinéticos (analizados posteriormente), la exposición de la semilla molida al aire antes de la extracción es un factor importante para la obtención de concentraciones mayores.

A pesar de que el ensayo TAC utilizado en la presente investigación tiene muchas ventajas como alta sensibilidad (comparable con la de ensayo ABTS), versatilidad, simpleza y bajo costo, su principal inconveniente es que actualmente existen muy pocas investigaciones que utilicen este ensayo (principalmente porque no tiene mucho tiempo en el mercado) lo que dificulta realizar comparaciones exactas con la bibliografía disponible (Manual, P. OxiSelect™ (TAC) Assay Kit, n.f). En la presente investigación el valor mayor encontrado de

---

<sup>1</sup> Los valores de pH presentados son los obtenidos en la presente investigación. Los valores de viscosidad y polaridad se los obtuvieron a partir de la bibliografía disponible.

capacidad antioxidante para el extracto de semilla de aguacate fue de 3000  $\mu\text{mol}$  equivalentes reductores de cobre/ml mediante ensayo TAC. Autores como: Dabas et al. (2008) encontraron una actividad antioxidante de 201.21 mg TE (equivalentes TROLOX)/g y un  $\text{EC}_{50}$  de 42.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el extracto coloreado de la semilla de aguacate obtenida con metanol mediante ensayo ORAC, mientras que Segovia et al. (2014), con el mismo ensayo, encontraron 158,77 mg TE/g peso seco en los polifenoles extraídos de la misma materia prima (Dabas et al., 2013; Segovia et al., 2016; Weatherby & Sorber, 1931). Hay que tomar en cuenta que TROLOX tiene un aumento de concentración antioxidante mucho más rápido que el ácido úrico y ORAC es más sensible que TAC (Zulueta, Esteve, & Frígola, 2009). Con fines didácticos los valores de  $\text{EC}_{50}$  obtenidos por Dabas (42.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se pueden comparar con los de un alimento considerado como un buen antioxidante como el brócoli que tiene un  $\text{EC}_{50}$  de 229  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Estos valores corresponden a una ingesta mínima por día para poder tener un efecto antioxidante de 3,75 gramos de extracto de semilla de aguacate y 21 gramos de brócoli (en un individuo de 65 kg), lo que indica el gran potencial antioxidante del extracto de la semilla de aguacate (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2002).

Como se observa en la gráfica 6 tanto la variedad de aguacate como el tipo de solvente influyen en la capacidad antioxidante. Li et al. (2018) encontraron que la semilla de la variedad Hass tiene un mayor contenido fenólico que la Fuerte:  $51.6 \pm 1.6$ ,  $31.5 \pm 2.2$  mg GAE/g (Li et al., 2018). Dabas et al. (2013) hallaron que en el extracto coloreado hay un 22.5% menos de contenido fenólico que en el no coloreado (debido a la oxidación), además cita que probablemente los polifenoles sean lo que le dan las propiedades funcionales a la semilla de aguacate (Dabas et al., 2013). La gráfica 7 nos permite observar que hay una relación lineal entre la actividad antioxidante y la concentración, sin embargo, cuando se compara las

variedades de semilla es evidente que mientras más concentración a 480 nm, menor actividad. Según Rodríguez-Carpena et al. (2011) al realizar el análisis de la semilla -no del extracto coloreado- de la variedad Hass encontraron que tiene una menor capacidad antioxidante (141,67 mmol Trolox /g peso húmedo) que la semilla Fuerte (184.42 mmol Trolox /g peso húmedo) lo que le atribuyeron a diferencias en el perfil fenólico de las variedades, este hallazgo fue sorprendente debido a que la variedad Hass presentó una mayor cantidad de procianidinas, usualmente relacionadas directamente con la actividad antioxidante (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Según el abstract del estudio (patente en procesos) de Ziegler et al. (2015) en el extracto incoloro de la semilla de aguacate se encuentran la catequina, epicatequina, procianidina y salidroside. Mientras que, tanto en el extracto incoloro como en el coloreado se encuentran el ácido abscísico y el perseitol (Ziegler et al., 2017). Los resultados de la presente investigación respaldan los hallazgos de Rodríguez-Carpena et al. (2011) debido a que, a pesar de la oxidación de las catequinas, epicatequinas, procianidinas y salidroside para la formación del color -como sugiere Ziegler et al. (2017) y Dabas et al. (2013)-, la variedad Fuerte sigue presentando una mayor actividad antioxidante, posiblemente causada por componentes como el ácido abscísico y el perseitol. Además, se presume que las procianidinas oxidadas aportan fuertemente al color dado que son los polifenoles más abundantes tanto en la variedad Fuerte como en la Hass (Ziegler et al., 2017; Dabas et al., 2016). La mayor capacidad antioxidante encontrada en la extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1) puede deberse a que este solvente es efectivo para la extracción de polifenoles como lo comprobó Mouratoglou et al. (2016) al obtener una mayor cantidad de contenido fenólico con solventes eutécticos que con etanol y agua destilada en los siguientes desechos agro-alimenticios: cáscaras de limón, hojas de olivo, residuos sólidos

de cebolla, orujo de uva roja, filtro de café gastado y salvado de trigo (Mouratoglou et al., 2016).

La evaluación cinética de formación del colorante se la realizó a partir de la observación de la relación directamente proporcional que existe entre la exposición al aire de la semilla de aguacate y la intensidad del color anaranjado formado. Los colorantes naturales generalmente están relacionados con los polifenoles que absorben longitudes de onda entre 400 y 700 nm. Los polifenoles pueden relacionarse con el color de forma directa (colores inherentes) o indirecta (necesitan de la presencia de enzimas, de la acción de otros sustratos, de tratamiento de calor, de procesos de fermentación o de la exposición al oxígeno para que el color sea producido). Los principales polifenoles que presentan coloración inherente son los flavonoides como las antocianinas, las auronas y las chalconas. Mientras que los no flavonoides (como los derivados de ácido fenólico, estilbenos, taninos y ligninas) necesitan de la acción de enzimas o la presencia de otros sustratos para producir color (Delgado-Vargas, 2002). En las investigaciones de Devia & Saldarriaga (2015) y Vargas, López, & Delgado-Vargas (2003) se manifiesta que el colorante extraído de la semilla de aguacate es una antocianina, sin embargo, en la presente investigación se propone que no lo es, debido a diversas características encontradas en este estudio -como el efecto del pH en el color, la estabilidad del colorante en presencia de luz, el aumento de la intensidad al incrementar el tiempo de exposición al oxígeno y el pico de absorción máximo encontrado- que no concuerdan con el comportamiento típico de estos pigmentos (Devian & Saldarriaga, 2015; Vargas, López, & Delgado-vargas, 2003). Según Garzón (2008) y Kirca, Özkan, & Cemeroğlu, (2006) las antocianinas se degradan rápidamente por oxidación con aire observándose un cambio de color hacia el morado (Garzón, 2008; Kirca, Özkan, & Cemeroğlu, 2006) . A partir de la forma

de las curvas obtenidas en el análisis cinético (gráfico 12) se discurre que la formación de color se da por reacciones catalizadas por enzimas y no precisamente por antocianinas, dado que el tiempo de oxidación favorece a la intensidad del color anaranjado. Las principales enzimas involucradas en el pardeamiento por oxidación de compuestos fenólicos en el aguacate son las peroxidasas y la polifenol oxidasa (HersHKovitz, Saguy, & Pesis, 2005). Esta última es la principal enzima involucrada en la producción de color en un gran número de frutas y verduras (Gómez, Sánchez, Iradi, Azman, & Almajano, 2014). Dabas et al. (2012), encontraron que al realizar la extracción del colorante de la semilla de aguacate a temperaturas cercanas a los 100 ° C se obtenían concentraciones muy bajas del mismo, lo que le atribuyeron a la desactivación de las enzimas. Adicionalmente, a este extracto desactivado le incorporaron polifenol oxidasa y peroxidasa exógenas para observar su efecto, encontrando que al agregar la primera se empezaba la formación de color mientras que la segunda no tenía efecto significativo (Dabas et al., 2011). Así mismo, García (2012) encontró que al utilizar semillas de aguacate frescas sin oxidar (menos de 2 minutos de exposición antes de la adición del solvente) con soluciones de sulfito de sodio, se obtenía una fracción colorante blanquecina que la atribuyó al detenimiento de las reacciones enzimáticas (García, 2012). Jiang (2000) obtuvo unas curvas similares a las conseguidas en esta investigación en la cinética de la reacción enzimática de pardeamiento del pericarpio del lichi por la polifenol oxidasa con cambios en la absorbancia a 410 nm y asíntotas a los 10 minutos (Jiang, 2000). A través de la cinética se concluye que la formación del color es dependiente de enzimas, probablemente de la polifenol oxidasa, obteniéndose una mayor concentración a mayor tiempo de exposición al aire hasta los 30 minutos, momento en el cual se detiene el incremento tal como se observa en el Gráfico 12 (el análisis cinético se realizó en un periodo de tiempo de 40 minutos tomando mediciones a los 0.5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 minutos).



La diferencia más notable en la cinética de formación del color entre los solventes utilizados es la presencia de una fase estacionaria en los minutos 0 a 10 cuando se utiliza etanol como solvente (gráfico 12). La extensión de la fase de latencia en una reacción catalizada por enzimas puede ser causada por retrasos en los eventos de polimerización, más no por interferencia en la actividad enzimática (Arias, Gonzalez, Oria, & Lopez-Buesa, 2007). Esto quiere decir que, al utilizar etanol como solvente, este no tiene tan buena afinidad con los productos de la reacción catalizada por la polifenol oxidasa (polifenoles oxidados) como el solvente eutéctico lo que causaría la fase de retardo no presente en la extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1). Las pendientes similares que presentan ambas curvas confirman que la influencia de los solventes no es sobre las enzimas ni su actividad. Mouratoglou et al. (2016) afirman que los disolventes eutécticos utilizados en su investigación, en los que se incluye glicerol:acetato de sodio (3:1), presentaron eficiencias de extracción de polifenoles muy altas que son comparables con las del metanol, solvente preferido en estos casos. Los autores atribuyeron esta alta eficiencia principalmente a la alta viscosidad y capacidad de solubilización del solvente eutéctico lo que podría contribuir a el aumento de la velocidad de reacción (Mouratoglou et al., 2016). A pesar de que no se conoce la naturaleza química del pigmento extraído de la semilla de aguacate se sugiere que posiblemente es de polaridad similar al glicerol:acetato de sodio (3:1), lo que ocasionaría una mayor solubilidad y por ende que su cinética no presente la fase de latencia evidenciada con el etanol al 70%. Sin embargo, este fenómeno también podría ser causado sencillamente por la alta viscosidad del solvente (Mouratoglou et al., 2016). En definitiva, el uso de glicerol:acetato de sodio (3:1) afecta a la cinética de formación a través de la eliminación de

la fase de latencia (lo que disminuiría el tiempo de extracción en hasta 10 minutos) debido a que su polaridad es similar al extracto o por su característica viscosidad alta.

A medida que los valores de pH fueron acrecentándose se incrementó la absorbancia a 480 nm (Gráfico 15), lo que se reflejó visiblemente en el aumento de la intensidad del color (Imagen 11). El incremento sutil de la absorbancia desde pH 2 a 8 (de 0.145 a 0.289 aproximadamente para la extracción con etanol al 70% y agua; y de 0.103 a 0.213 aproximadamente para la extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1)) pudo ser provocado por los iones hidroxilo al favorecer la formación de ciertas especies químicas que aumentaron su intensidad (Ibrahim, Muhammad, & Salleh, 2011). El aumento acelerado de la intensidad presentado a partir de pH 8 en los colorantes extraídos con agua destilada y etanol al 70% (de 0.289 a 0.81) podría estar causado por el rompimiento de enlaces, apertura de anillos o disociaciones (Li et al., 2018). Resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Dabas et al. (2011) quienes extrajeron el colorante de la semilla de aguacate utilizando metanol como solvente, a pH 2 obtuvieron una absorbancia a 480 nm cercana a 0.1 con un aumento estable y lento alcanzando una absorbancia de 0.6 a pH 9. A pH superiores a 9 el incremento de la absorbancia fue acelerado alcanzando un valor de 2.2 a pH 11. Además, en este mismo estudio se comprobó que el aumento registrado de la absorbancia en función del pH no es reversible en condiciones oxigénicas (Dabas et al., 2011). Las absorbancias menores registradas con el extracto obtenido con glicerol:acetato de sodio (3:1) pueden estar causadas por motivos de experimentación, dado que antes de la adición de los buffers para regular el pH, los extractos fueron diluidos hasta presentar una absorbancia similar entre ellos. Sin embargo, debido a que es la primera vez que se utiliza al SEP glicerol:acetato de sodio (3:1) en este tipo de extracción, no se tomó en cuenta que este posee un pH alcalino lo que pudo

interferir en los resultados obtenidos. Es decir que las absorbancias registradas con este solvente tomadas como base para ajustar la concentración pudieron verse influenciadas por el efecto del pH (Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013). A pesar de esto, se puede observar que el incremento de absorbancia en este extracto es mucho menos pronunciado y no presenta puntos de inflexión. Esto es atribuido a 2 razones principales: alta viscosidad del solvente y formación de enlaces del solvente con el soluto. La alta viscosidad de este solvente eutéctico disminuye el movimiento de las moléculas por lo que es posible que el tiempo de reacción en la cual ciertas formas químicas puedan verse favorecidas por el aumento de pH puede ser más lento. Por otro lado, la posible formación de enlaces del solvente con el soluto pudo haber “protegido” a los compuestos que brindan el color de la ruptura o disociación, lo que causaría que el incremento en la absorbancia no sea tan pronunciado (Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013). Estos resultados juntamente con la cinética obtenida fortalecen la teoría de que este colorante, no es una antocianina. El comportamiento de las antocianinas en función del pH es el siguiente: a valores de 3 o menos tienden a presentar colores anaranjados y rojizos, entre 6 y 7 a causa de la deprotonación tienden a dar colores azulados, mientras que a valores más altos se degradan (Ibrahim et al., 2011). Unos de los principales colorantes naturales de la gama del color anaranjado-rojo usados en la industria alimenticia son precisamente las antocianinas, sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es su falta de estabilidad en pH altos; por lo que el colorante de la semilla de aguacate se propone como una alternativa potencial al ser estable en toda la gama de pH de los productos alimenticios (3 a 7) (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005). Dabas et al. (2011) al añadir el colorante de la semilla de aguacate a la leche (pH entre 6.6 y 6.8) obtuvo un producto rosáceo, mientras que en esta investigación al añadirlo al yogurt (pH entre 4.4 y 4.6) se obtuvo un producto anaranjado, lo que muestra que el pH es un factor importante que se tiene que tomar en cuenta al momento

de recomendar su uso en la industria alimenticia (el pH de los alimentos generalmente varía entre 3 y 7, al adicionar el colorante de semilla de aguacate a alimentos con pH cercanos a 7, estos se colorearán en tonos rojizos (en vez de anaranjados), además se requerirá una menor concentración de colorante debido a que los pH mayores favorecen a la intensidad) (Dabas et al., 2011; ).

El color del extracto obtenido presentó alta estabilidad durante 15 días tanto en condiciones de oscuridad como de luz indistintamente de la temperatura y el solvente utilizado, excepto en el caso del extracto obtenido con agua destilada y almacenado con luz y a temperatura ambiente. Las otras 3 extracciones que según las gráficas 5 y 6 presentaron cambios durante el periodo de tiempo medido, aunque estadísticamente no significativos, son: (1) colorante extraído con agua destilada en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente, (2) colorante extraído con agua destilada en condiciones de oscuridad a temperatura 4°C y (3) colorante extraído con etanol al 70% en condiciones de luz a temperatura ambiente. Estos 3 colorantes podría ser candidatos para uso en productos con limitada vida útil. Sin embargo, en base a la tendencia de sus curvas, es probable que en periodos más prolongados de tiempo (>15 días) tiendan a presentar fluctuaciones. Dabas et al. (2011) en el estudio de estabilidad del colorante que extrajeron de la semilla de aguacate utilizando metanol como solvente obtuvieron significativas variaciones en la absorbancia a partir del día 20 al almacenar el extracto a 24 °C y 40 °C (Dabas et al., 2011). A pesar de que se requieren estudios posteriores, los resultados obtenidos en la presente investigación proponen que en periodos más prolongados de tiempo y a distintas condiciones de almacenamiento el colorante extraído con glicerol:acetato de sodio (3:1) tiene la mayor posibilidad de presentar alta estabilidad; además se evidencia que el contenido de agua es un

factor que afecta la estabilidad. Dai, Spronsen, & Witkamp (2013) encontraron que los solventes eutécticos usados en su investigación aportaron gran estabilidad a sus extractos debido a su alta viscosidad (lo que disminuyó el movimiento de moléculas y permitió interacciones moleculares estables), a su componente de azúcar (que permitió uniones a hidrógenos) y a que proporcionaron estabilidad de pH (Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013). Con base en los resultados obtenidos, el colorante de la semilla de aguacate muestra ser potencial para utilizarse en alimentos almacenados tanto a temperatura ambiente como a refrigeración, indistintamente de las condiciones de luz (excepto si se utiliza agua destilada como solvente). En cuanto a la posible presentación comercial del colorante de la semilla de aguacate, con base en los resultados de esta investigación, se recomendaría el uso de sistemas con poca disponibilidad de agua (como el glicerol:acetato de sodio (3:1)), además de explorar la posibilidad de creación de micro emulsiones lo que mejoraría la dispersión en agua. Además, se podría explorar la posibilidad de encapsulación del colorante lo que optimizaría la estabilidad frente a diversas condiciones (Delgado-Vargas, 2002). Se sugiere más estudios de estabilidad con tiempos más prolongados y con más variables de almacenamiento como diferentes pH, temperaturas altas y diferentes contenidos de agua.

Cuando se adicionó el colorante de la semilla de aguacate al yogurt natural, este último cambió su color de blanquecino a naranja amarillento, lo que lo vuelve una alternativa potencial para este tipo de productos. Como se observa en el gráfico 21, el espectro de absorción del yogurt natural no presentó ningún tipo de interferencias lo que hace posible el análisis comparativo entre los 3 tipos de yogurts: comercial marca Toni, natural coloreado con colorante vegetal comercial y natural coloreado con el extracto obtenido en el presente estudio (El-Sheikh & Al-Degs, 2013). Según el análisis de absorbancias máximas, el colorante

comercial vegetal marca Tisproquimicos adicionado al yogurt natural es la tartrazina, mientras que el presente en el yogurt Toni durazno es un betacaroteno, la naturaleza del colorante de la semilla de aguacate no se ha logrado identificar por este método dado que la absorbancia máxima exhibida a 480 nm correspondería al adrenocromo, sin embargo, el comportamiento del colorante tanto cinético como de respuesta a pH no concuerdan con las características de ese compuesto (Oancea & Meltzer, 2014; Tan & Soderstrom, 1989). A pesar de que visualmente los 3 tipos de yogurt analizados presentan un color similar, para la obtención de esta tonalidad fue necesaria una mayor concentración de colorante de semilla de aguacate como se observa en los espectros de absorción. Dabas et al. (2013) en su investigación mostraron que al adicionar el colorante de semilla de aguacate a la leche se volvió de un color rosado (Dabas et al., 2013). Se estima que el color obtenido en esta investigación está relacionado con el pH del yogurt (4.25), lo que sugiere que su uso potencial está direccionado a alimentos con pH bajo para colores anaranjados-amarillentos; y a alimentos con pH alto para tonos más rojizos. Según los resultados de las tablas 5 y 6 el único parámetro que se modificó al añadir el colorante de la semilla de aguacate fue la densidad, aumentando de 0,00104 a 0,00105 g/ml. A pesar de este aumento, la densidad del yogurt natural coloreado con el extracto obtenido en el presente estudio, se encuentra dentro del rango aceptable para este producto que es de 0,001045 a 0,00105 g/ml (Suaste-Franco et al., 2013). Otro factor que se tiene que tomar en cuenta para estimar el uso potencial de este colorante es que no fue posible la eliminación del solvente (glicerol:acetato de sodio 3:1) por métodos tradicionales. Según el National Center for Biotechnology tanto el glicerol como el acetato de sodio no son considerados tóxicos individualmente (National Center for Biotechnology Information, n.d.). Sin embargo, se requieren estudios adicionales de la toxicidad del compuesto formado, así como de su influencia en alimentos para asegurar su

inocuidad. Con referencia a la toxicidad del colorante obtenido, un estudio realizado por Ozolua, Anaka, Okpo, & Idogun (2009) mostró que al administrar el extracto acuoso de la semilla de aguacate en cantidades de 2 a 10 g/kg a 24 ratas durante 2 semanas no se mostraron signos de depresión, retorcimiento, diarrea o agresión. Así también, se examinó la toxicidad sub-crónica en los mismos animales en cantidades de 2.5 g/kg durante 28 días sin observarse cambios significativos en los parámetros hematológicos. Tampoco hubo variaciones significativas en los marcadores plasmáticos de hepatotoxicidad; sin embargo, se sugirió más estudios para garantizar la inocuidad en humanos (Ozolua, Anaka, Okpo, & Idogun, 2009). El análisis de preferencia visual da una idea general de las tonalidades predilectas de los consumidores provocadas por distintas concentraciones de colorantes, sin embargo, no es una medida de comparación de color entre los mismos por lo que se sugiere un análisis colorimétrico usando el método tri-estímulo  $L^*a^*b^*$ , el mismo que es altamente recomendado para estudios de color en alimentos (Mathias-Rettig, & Ah-Hen 2014). Se recomienda también estudios de estabilidad en el yogurt por tiempos prolongados para mirar la influencia del colorante en las propiedades físicas y organolépticas del yogurt; así como un análisis de preferencia visual pareado recomendado para la creación de nuevos productos (Dominguez, 2007).

## 9. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se propuso la extracción de un colorante natural anaranjado como alternativa para la biorrefinería de la semilla de aguacate (*Persea americana*), variedades Fuerte y Hass. Los factores que influyeron significativamente en la extracción fueron el tipo de solvente utilizado, el tiempo de oxidación de la semilla y el pH. El extracto coloreado obtenido utilizando la variedad Fuerte y el solvente glicerol:acetato de sodio (3:1) mostró tener la mayor capacidad antioxidante y fue capaz de colorear un yogurt comercial natural.
- Al realizar la extracción con el glicerol:acetato de sodio (3:1) se obtuvo un rendimiento significativamente superior a todos los reportados en la literatura. Este alto rendimiento se le atribuyó a que el extracto no fue sometido a procesos de concentración ni secado debido a las altas concentraciones presentadas y porque los componentes de este solvente presentan una toxicidad baja lo que permitiría utilizarlo directamente en alimentos sin la necesidad de tener una purificación ni procesamiento.
- Mediante la evaluación de la cinética se concluyó que la formación del color es dependiente de enzimas, probablemente de la polifenol oxidasa, obteniendo una mayor concentración al aumentar el tiempo de exposición de las semillas molidas al aire.
- Se concluyó que el aumento de pH entre 2 y 10 provoca un incremento en la absorbancia a 480 nm, lo que se traduce visualmente a que el colorante proporcione al sustrato en el que se disuelve un color amarillo-anaranjado cuando este último posee un pH entre 2 y 6 y un color rojizo cuando posee pH mayores a 6 .



- Con el ensayo TAC se verificó que tanto la variedad de la semilla como el tipo de solvente utilizados en la extracción influyen significativamente en la capacidad antioxidante total. El extracto que presentó la mayor capacidad antioxidante total fue el obtenido utilizando la variedad Fuerte y el solvente glicerol:acetato de sodio (3:1) con un valor de 700 equivalentes reductores de cobre/ml. Además, se propuso que esta bioactividad viene probablemente de los polifenoles no coloreados.
- A través de la evaluación de estabilidad se concluyó que el colorante de la semilla de aguacate variedad Fuerte, independientemente del solvente utilizado, es estable tanto a temperatura ambiente como a refrigeración indistintamente de las condiciones de luz durante 15 días (no se realizó el estudio de estabilidad con la variedad Hass debido a que la Fuerte presentó una mayor capacidad antioxidante total (rendimiento y concentración fueron similares en las 2 variedades)).
- A través de la evaluación del uso del colorante extraído en el yogurt, se concluyó que el extracto muestra un gran potencial como colorante para lácteos debido al atractivo color que le aportó a este alimento. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el pH es un factor importante en la hora de direccionar el colorante a un producto alimenticio.

## 10. RECOMENDACIONES

- Puesto que la presente investigación se trata de un estudio piloto, se analizó de forma muy general diversos aspectos. Para futuras investigaciones se recomienda profundizar en cada uno de los temas tratados.
- Con el objetivo de optimizar la extracción se recomienda lo siguiente:
  - Estudios direccionados a la optimización mediante la simulación de la operación unitaria de extracción del colorante de aguacate con los diferentes solventes
- Con el objetivo de encontrar otros potenciales usos y mejorar el conocimiento del colorante se recomienda lo siguiente:
  - Caracterización química del extracto de la semilla de aguacate a través de HPLC y espectrofotometría de masas con el objetivo de averiguar su composición de nitrógeno, carbono, oxígeno e hidrógeno (Dabas et al., 2011).
  - Estudios de estabilidad en tiempo más prolongados y probando más variables como por ejemplo diferentes pH, temperaturas altas y diferentes contenidos de agua (Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013).

- Búsqueda de otras propiedades bioactivas como antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas
- 
- (Dabas et al, 2011; Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013).
- Búsqueda de alternativas de uso en otras industrias diferentes a la alimenticia como en la cosmética, farmacéutica o textil
- Análisis de toxicidad del colorante.
- Estudios organolépticos del colorante.
- Cuantificación y caracterización fenólica de la porción colorante e incolora del extracto de la semilla de aguacate.
- Análisis de biodisponibilidad del colorante de la semilla de aguacate.
- Con el objetivo de proponer al colorante extraído de la semilla de aguacate como un producto comercial para colorear yogurt se recomienda lo siguiente:
  - Análisis colorimétrico del yogurt adicionado con el colorante de la semilla de aguacate usando el método tri-estímulo  $L^*a^*b^*$  como el objetivo de estudiar el color direccionado a la percepción visual (Mathias-Rettig, & Ah-Hen 2014).
  - Análisis de la capacidad antioxidante del yogurt adicionado con el colorante de la semilla de aguacate.
  - Análisis de toxicidad del yogurt adicionado con el colorante de la semilla de aguacate.
  - Estudios organolépticos del yogurt adicionado con el colorante extraído de la semilla de aguacate.

- Análisis de preferencia visual pareado del yogurt adicionado con colorante de la semilla de aguacate con el objetivo de analizar la aceptación del consumidor hacia el producto (Dominguez, 2007).
- Medición de la estabilidad del colorante en el yogurt.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera-ortíz, M., Reza-vargas, M. C., Chew Madinaveitia, G. R., Valenzuela, J. A., & Ramírez Baca, P. (2012). Fig Anthocyanins as Plain Yoghurt Colorants. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, 14(1), 18–24. Retrieved from <http://www.biotecnia.uson.mx/resumen.php?revista=19&art=77>
- Arias, E., Gonzalez, J., Oria, R., & Lopez-Buesa, P. (2007). Ascorbic acid and 4-hexylresorcinol effects on pear PPO and PPO catalyzed browning reaction. *Journal of Food Science*, 72(8), C422–C429. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00484.x>
- Arlene, A., Prima, A., Lutama, L., & Anggraini, A. (2015). Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). *Procedia Chemistry*, 16, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.061>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bressani, R., Rodas, B., & Ruíz, A. (2006). *La composición química, capacidad oxidativa y valor nutritivo de la semilla de aguacate*. Universidad del Valle Guatemala.
- Manual, P. OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit, Trial Size (n.f). Cells biolabs. Available online at: <https://www.cellbiolabs.com/>.
- Coisson, J. D., Travaglia, F., Piana, G., Capasso, M., & Arlorio, M. (2005). Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. *Food Research International*, 38(8–9), 893–897. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.009>
- Dabas, D. (2016). Polyphenols as Colorants, *Advances in food technology and nutritional sciences* 1(6). <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-SE-2-101>

- Dabas, D., Elias, R. J., Lambert, J. D., & Ziegler, G. R. (2011). A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant, *76*(9), 1335–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02415.x>
- Dabas, D., Shegog, R., Ziegler, G., & Lambert, J. (2013). Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(34), 6133–6140. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340007>
- Dominguez, M. L. (2007). Guía para la evaluación sensorial de alimentos. *Instituto de Investigación Nutricional–IIN Consultora-AgroSalud*.
- Dai, Y., Spronsen, J. Van, & Witkamp, G. (2013). Analytica Chimica Acta Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Dai, Y., Spronsen, J. Van, Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents.
- Dai, Y., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *FOOD CHEMISTRY*, *159*, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, *187*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>
- Dávila, J. A., Rosenberg, M., Castro, E., & Cardona, C. A. (2017). A model biorefinery for avocado (*Persea americana* mill.) processing. *Bioresource Technology*, *243*, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.063>
- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2002). Natural colorants for food and nutraceutical

uses. CRC press.

Devia-Pineda, J. E., & Saldarriaga, D. F. (2005). Proceso para obtener colorante a partir de semilla del aguacate. *Revista Universidad EAFIT*, 41(137), 36–43.

Devian, J., & Saldarriaga, D. (2015). Pulverización de colorantes naturales por secado por atomización. *Revista Universidad EAFIT*, 41(137), 36–43.

Díaz-garcía, M. C., Castellar, R., Obón, M., Obón, C., & Rivera, D. (2014). Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods, (July). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6821>

Eddy, M. U. K. R., Indo, R. U. B. Y. L. A. L., & Air, M. U. G. N. (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation , Cyclooxygenase Enzymes , and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors, 9268–9273.

El-Sheikh, A. H., & Al-Degs, Y. S. (2013). Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices. *Dyes and Pigments*, 97(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.01.007>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2004). AVOCADO: Post-Harvest Operation. Rome, Italy. Available at: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compendium\\_-\\_Avocado.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Avocado.pdf)

García, E. (2012). Extracción y caracterización fisicoquímica de la fracción colorante de la semilla de aguacate.

Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.*, 13(3), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.04.023>

- Gómez, F., Sánchez, S., Iradi, M., Azman, N., & Almajano, M. (2014). Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants*, 3(2), 439–454. <https://doi.org/10.3390/antiox3020439>
- HersHKovitz, V., Saguy, S. I., & Pesis, E. (2005). Postharvest application of 1-MCP to improve the quality of various avocado cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 37(3), 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.05.003>
- Hurtado-Fernández, E., Pacchiarotta, T., Mayboroda, O. A., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2014). Quantitative characterization of important metabolites of avocado fruit by gas chromatography coupled to different detectors (APCI-TOF MS and FID). *Food Research International*, 62, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.038>
- Ibrahim, U., Muhammad, I., & Salleh, R. (2011). The effect of pH on color behavior of Brassica oleracea anthocyanin. *J. Appl. Sci*, 11(13), 2406–2410.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (n.f). Guía Técnica de cultivos. Manual N° 73. Quito Ecuador, INIAP:2008.
- Jiang, Y. (2000). Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 305–310. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<305::AID-JSFA518>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<305::AID-JSFA518>3.0.CO;2-H)
- Jin, Q., Yang, L., Poe, N., & Huang, H. (2018). Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends in Food Science and Technology*, 74(February), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.014>
- Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kirca, A., Özkan, M., & Cemeroğlu, B. (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various



- fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97(4), 598–605.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.036>
- Krumreich, F. D., Borges, C. D., Mendonça, C. R. B., Jansen-Alves, C., & Zambiasi, R. C. (2018). Bioactive compounds and quality parameters of avocado oil obtained by different processes. *Food Chemistry*, 257(June 2017), 376–381.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.048>
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study, 1269–1278.  
<https://doi.org/10.5555/jaoi.2005.88.5.1269>
- Li, X. Y., Liu, Y. H., Wang, B., Chen, C. Y., Zhang, H. M., & Kang, J. X. (2018). Identification of a sustainable two-plant diet that effectively prevents age-related metabolic syndrome and extends lifespan in aged mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 51, 16–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.09.003>
- Mahawan, M. A., Tenorio, M. F. N., & Gomez, J. A. (2015). Characterization of Flour from Avocado Seed Kernel. *Asia Pacific Journal of Multidisciplinary Research*, 3(4), 34–40.
- Masone, D., & Chanforan, C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational biology and chemistry*, 56, 152-158.
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro sur*, 42(2), 57-66.
- Mouratoglou, E., Malliou, V., & Makris, D. P. (2016). Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste and Biomass Valorization*.

<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9539-8>

National Center for Biotechnology Information. (n.d.). No Title. Retrieved November 26, 2018,

from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/517045>

Oancea, P., & Meltzer, V. (2014). Kinetics of tartrazine photodegradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solution. *Chemical Papers*, 68(1), 105–111. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0426-5>

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Deemer, E. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays ;, (1), 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>

Ozolua, R. I., Anaka, O. N., Okpo, S. O., & Idogun, S. E. (2009). Acute and sub-acute toxicological assessment of the aqueous seed extract of *Persea americana* Mill (Lauraceae) in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(4), 573–578. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.0095>

Pahua-ramos, M. E., Ortiz-moreno, A., Necochea-mondragón, H., & Hernández-ortega, M. (2012). Hypolipidemic Effect of Avocado (*Persea americana* Mill) Seed in a Hypercholesterolemic Mouse Model, 10–16. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0280-6>

Papadopoulou, A. A., Efstathiadou, E., Patila, M., Polydera, A. C., & Stamatis, H. (2016). Deep Eutectic Solvents as Media for Peroxidation Reactions Catalyzed by Heme-Dependent Biocatalysts. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(18), 5145–5151. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04867>

Rajasingam, R., Lioe, L., Pham, Q. T., & Lucien, F. P. (2004). Solubility of carbon dioxide in dimethylsulfoxide and N-methyl-2-pyrrolidone at elevated pressure. *The Journal of*

*Supercritical Fluids*, 31(3), 227-234.

Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011).

*Avocado (Persea americana Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.

Santana, I., Reis, L., Torres, A., Cabral, L., & Freitas, S. (2014). Combination of drying and extraction procedures to obtain oil from Hass avocado (*Persea americana* Mill.) cultivated in Brazil. *European Food Research and Technology*.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201400172>

Segovia, F. J., Corral-Pérez, J. J., & Almajano, M. P. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 85, 213–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.005>

Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (n.f). Norma General del CODEX para los Aditivos Alimentarios. Available online at: <http://www.normalizacion.gob.ec/>

Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082.  
<https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Suárez, D., Marín, O., Dueñas, N., Ortiz, J., Puentes, A., Mejía, A., ... Zuluaga, C. (2016). Evaluation of the extraction conditions of a natural dye from avocado seeds. *Agronomía Colombiana*, 34(1), S241–S243.  
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.57341>

Suaste-Franco, M. P., Solís-Moya, E., Ledesma-Ramírez, L., de la Cruz-Gonzalez, M. L., Grageda-Cabrera, O. A., & Báez-Pérez, A. (2013). Efecto de la densidad y método de siembra en el rendimiento de grano de trigo (*triticum aestivum* L.) en el Bajío, México.

*Agrociencia*, 47(2), 159–170.

Tan, B., & Soderstrom, D. N. (1989). Qualitative aspects of UV-vis spectrophotometry of beta-carotene and lycopene. *Journal of Chemical Education*, 66(3), 258.

<https://doi.org/10.1021/ed066p258>

Tesfay, S. Z., Magwaza, L. S., Mbili, N., & Mditshwa, A. (2017). Carboxyl methylcellulose (CMC) containing moringa plant extracts as new postharvest organic edible coating for Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 226(May), 201–207.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.047>

Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M., Daiuto, R., Augusto, J., Massarioli, P., ... Alencar, S. M. De. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds, 1–12.

Vargas, D., López, O. P., & Delgado-vargas, F. (2003). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. Trends in Food Science & Technology* (Vol. 14).

[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00076-1)

Viera, A., Sotomayor, A., & Viera, W. (2016). Alex Viera, Andrea Sotomayor, William Viera., III.

Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2008). Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73(4).

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00706.x>

Weatherby, L. R. S., & Sorber, D. G. (1931). Chemical Composition of Avocado Seed. *Industrial and Engineering Chemistry*, 23(12), 1421–1423. <https://doi.org/10.1021/ie50264a027>

Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipič, M., ... Lambré, C. (2018). Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA Journal*, 16(1).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>

Ziegler, G. R., Lambert, J. D., Shegog, R. M., Chatzakis, E., & Dabas, D. (2017). "Compounds, Compositions and Methods for Coloring Edible Materials." U.S. Patent Application No. 15/343,810.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

## TABLAS

**Tabla 1.** Preparación del estándar de ácido úrico

Tubo	2 mM Estándar de Ácido úrico (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración de Ácido úrico resultante (mM)
1	500	500	1
2	500 del tubo 1	500	0.5
3	500 del tubo 2	500	0.25
4	500 del tubo 3	500	0.125
5	500 del tubo 4	500	0.0625
6	500 del tubo 5	500	0.03125
7	500 del tubo 6	500	0.0156
8	500 del tubo 7	500	0.0078
9	500 del tubo 8	500	0.0039
10	0	500	0.0

**Tabla 2.** Distribución de las muestras para el análisis de estabilidad

X triplicado	Temperatura (°C)	Exposición
Gly: NaOAc (3:1)	4	Luz
Gly: NaOAc (3:1)	Ambiente	Luz
Gly: NaOAc (3:1)	4	Oscuridad
EtOH (70%)	Ambiente	Oscuridad
EtOH (70%)	4	Luz
EtOH (70%)	Ambiente	Luz

EtOH (70%)	4	Oscuridad
EtOH (70%)	Ambiente	Oscuridad

Glicerol:acetato de sodio: Gly: NaOAc; Etanol: EtOH

**Tabla 3:** Conformación de los grupos de yogurts para la evaluación sensorial

Grupo	Tipo de Yogurt	Colorante añadido
1	50 mL Toni Durazno	N/A
	50 mL Chivería Durazno	N/A
	50 mL Kiosco Durazno	N/A
2	50 ml de Yogurt Natural Toni	7.5 mg de colorante vegetal durazno
	50 mL Yogurt Natural Toni	10 mg de colorante vegetal durazno
	50 mL Yogurt Natural Toni	5 mg de colorante vegetal durazno
3	50 mL Yogurt Natural Toni	5 mL de colorante de la semilla de aguacate
	50 mL Yogurt Natural Toni	10 mL de colorante de la semilla de aguacate
	50 mL Yogurt Natural Toni	15 mL de colorante de la semilla de aguacate

Concentraciones sugeridas por Wallace & Giusti (2008).

**Tabla 4:** Características de las semillas y frutos utilizados para el proceso de extracción del colorante junto con el rendimiento del proceso de molienda.

	<i>Fuerte</i>		<i>Hass</i>	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
<b>Peso del fruto (g)</b>	206,3	32,8	167,1	11,33
<b>% que representa la semilla en el fruto</b>	16	2,8	15	1,5
<b>% de humedad de la semilla</b>	58	6,5	32	5,6
<b>Rendimiento proceso de molienda (%)</b>	46	5,2	59	4,8

La media fue calculada a partir de 10 muestras independientes

**Tabla 5:** Comparación de propiedades físicas antes y después de añadir colorante de semilla de aguacate al yogurt natural.

Colorante semilla de Aguacate	Antes		Después	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
pH	4,24	0,01	4,237	0,021
Densidad (g/ml)	0,0012	0,00001	0,0014	0,0006

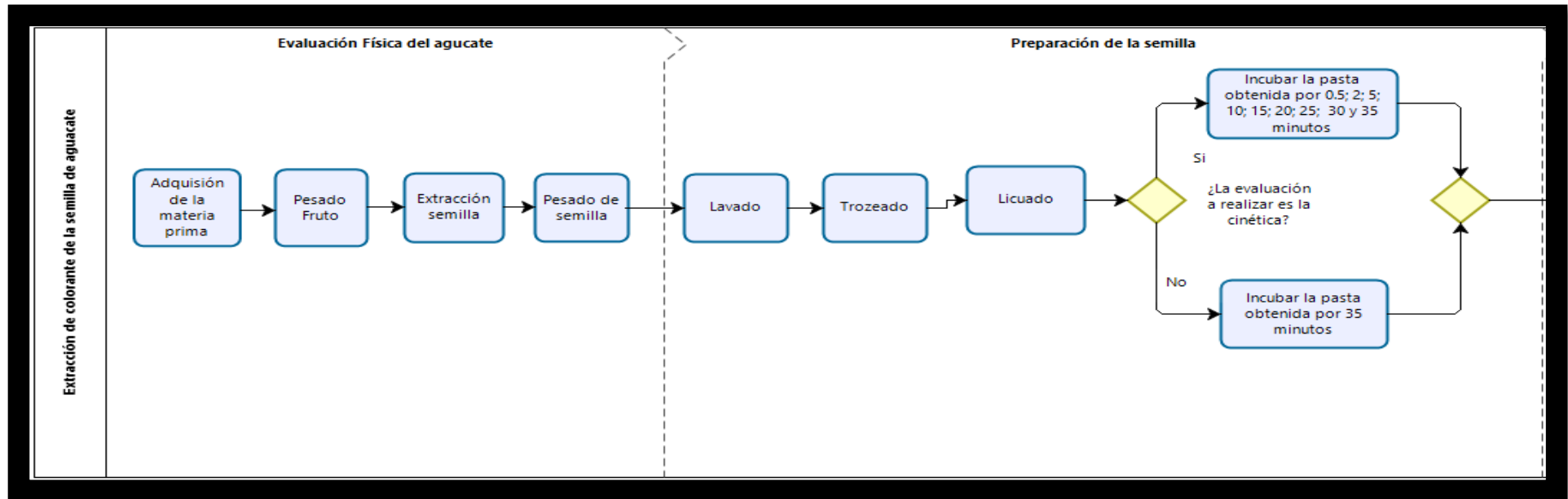
Cada valor representa la media y su SD de tres experimentos independientes

**Tabla 6:** Comparación de propiedades físicas antes y después de añadir colorante vegetal durazno al yogurt natural.

Colorante vegetal durazno	Antes		Después	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
pH	4,253	0,006	4,247	0,006
Densidad (g/ml)	0,00104	5,77E-06	0,00104	1,15E-05

Cada valor representa la media y su SD de tres experimentos independientes

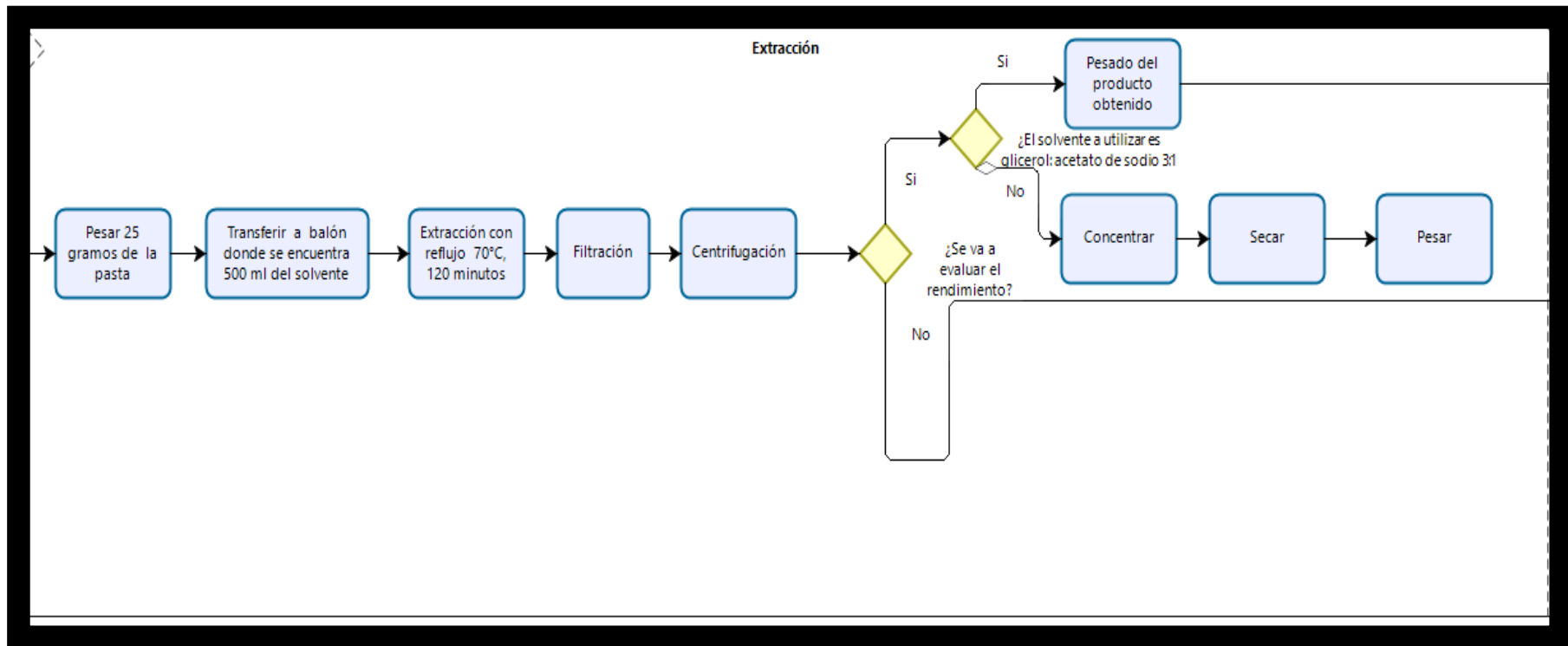
## GRÁFICOS



Nota: gráfico 1, 2 y 3 son procesos contiguos. Se los separó por motivos de presentación.

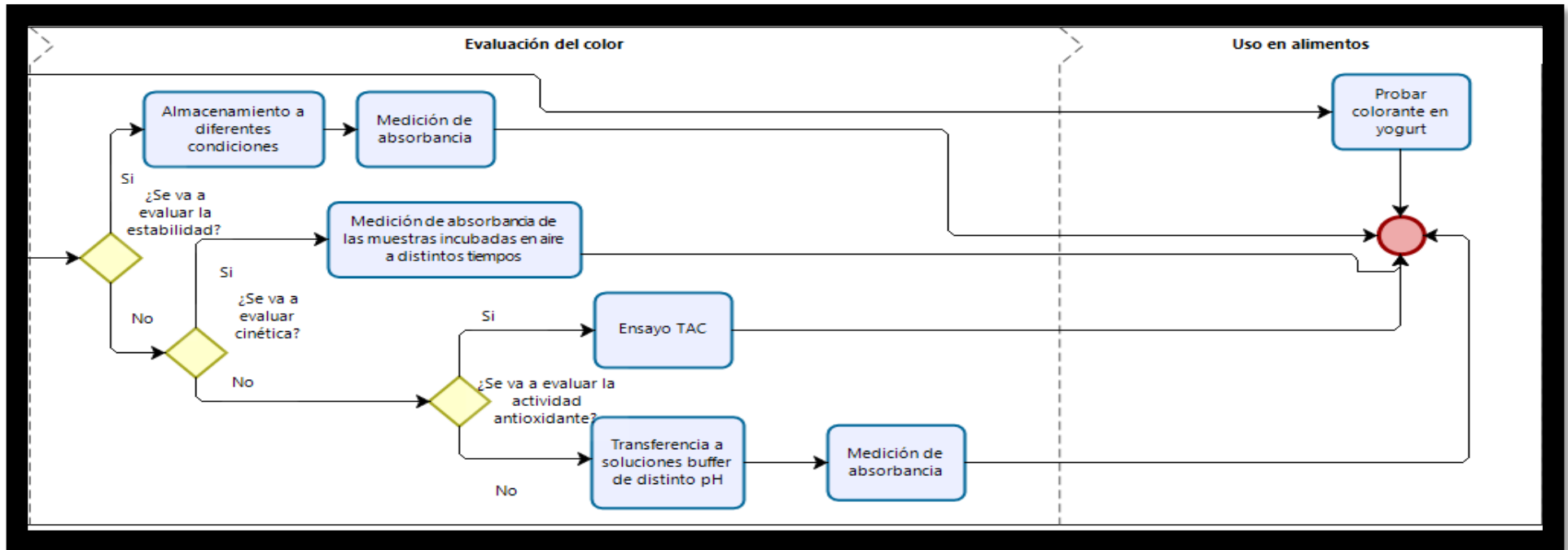
**Gráfico 1** : Flujograma del proceso la evaluación física del aguacate y preparación de la semilla





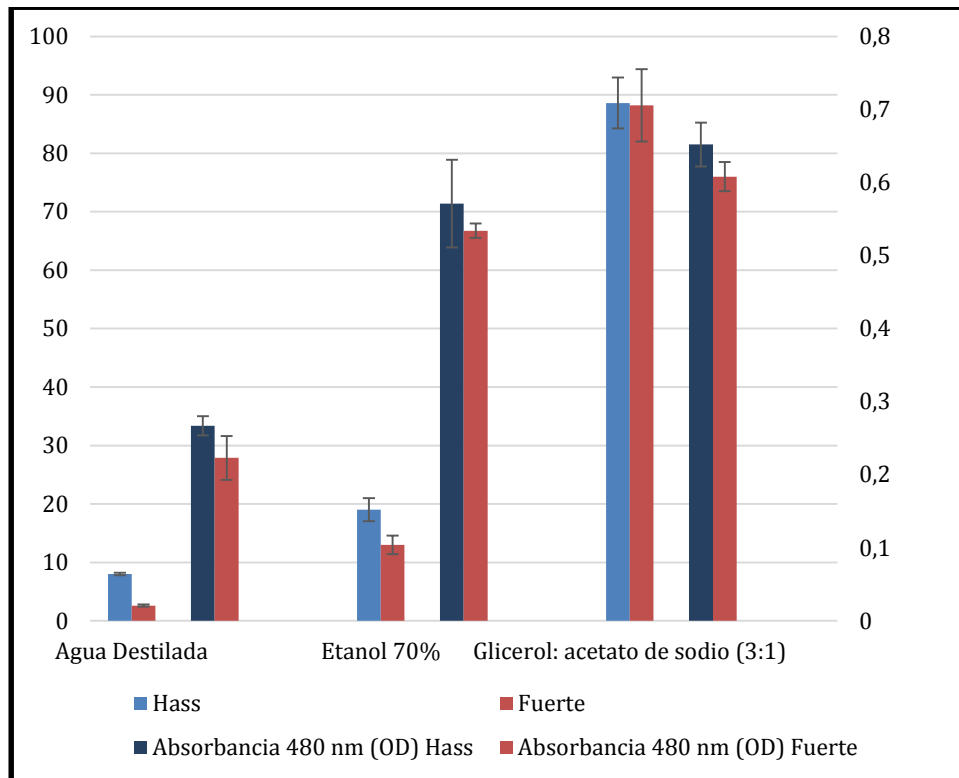
Nota: gráfico 1, 2 y 3 son procesos contiguos. Se los separó por motivos de presentación.

**Gráfico 2:** Flujograma del proceso de la extracción del colorante de la semilla de aguacate

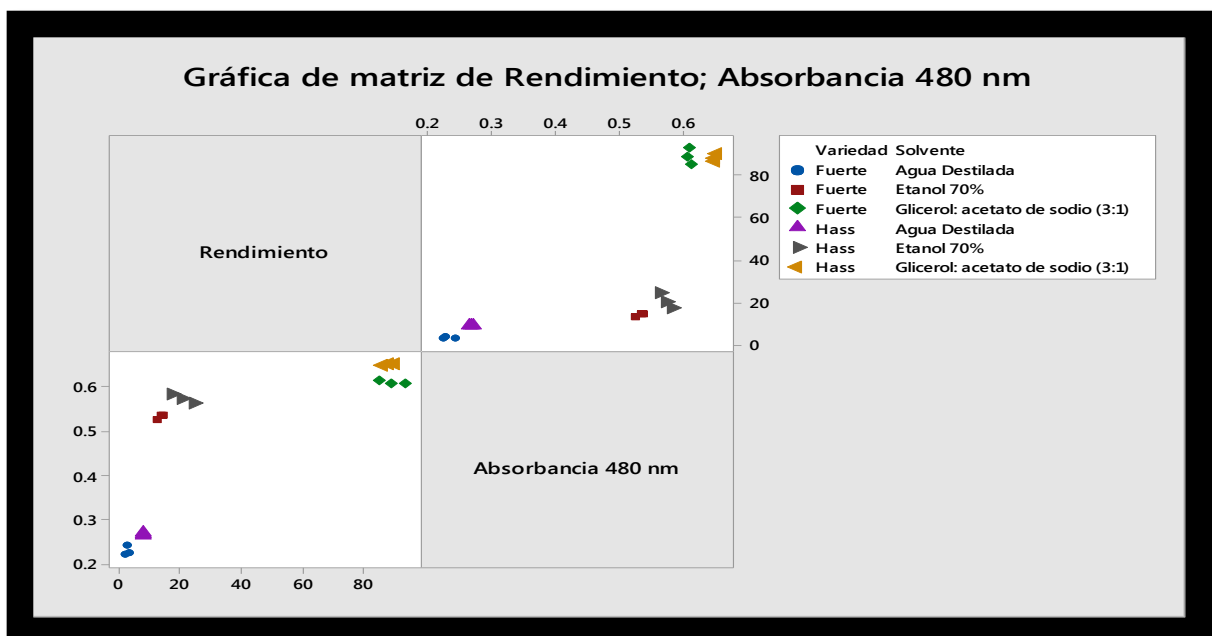


Nota: gráfico 1, 2 y 3 son procesos contiguos. Se los separó por motivos de presentación.

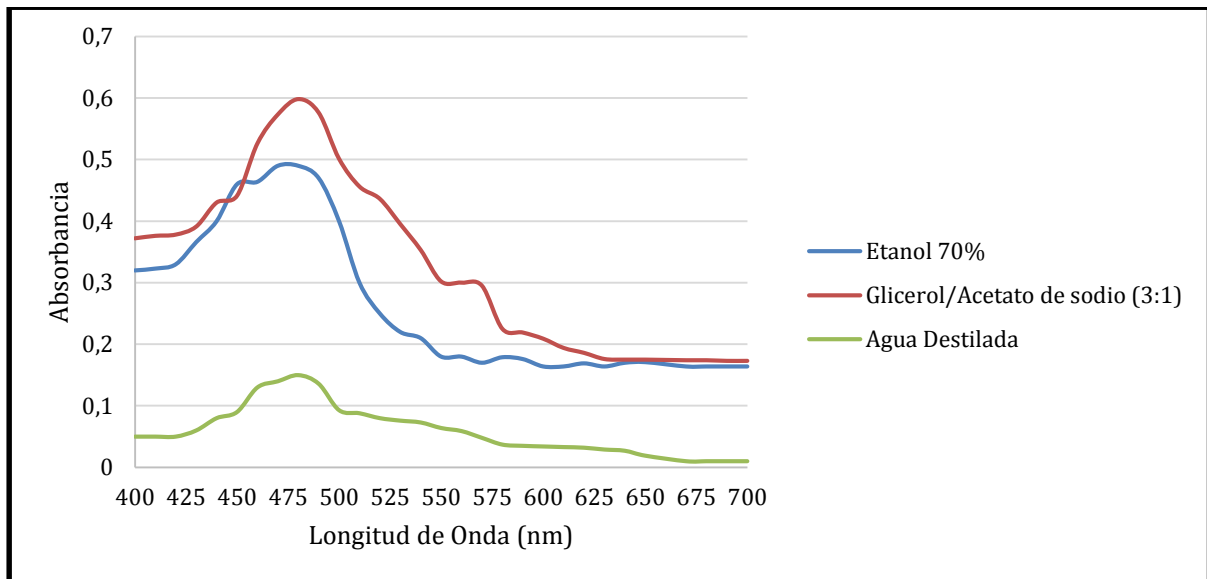
**Gráfico 3:** Flujograma del proceso de evaluación del color y uso en alimentos



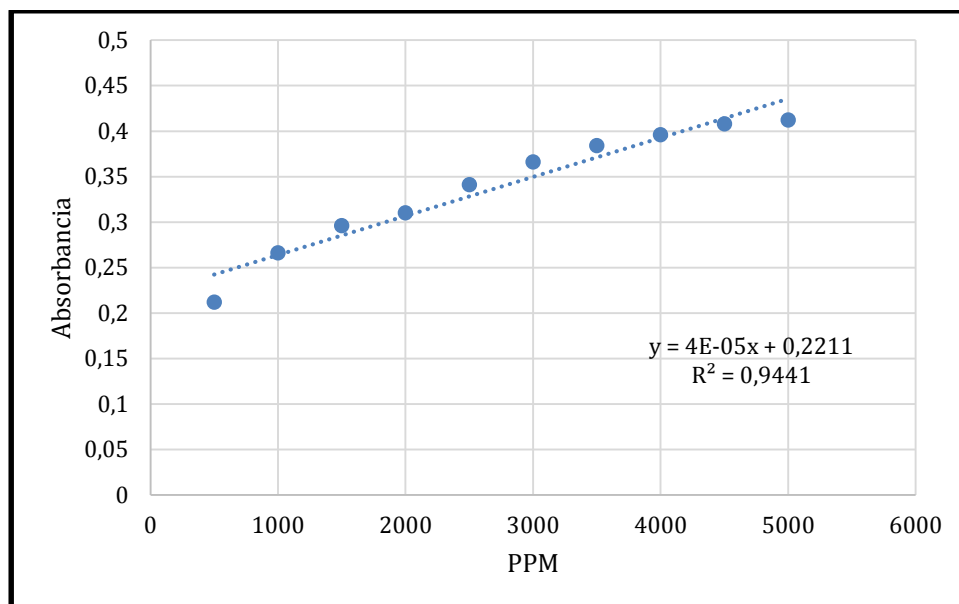
**Gráfico 4:** Rendimiento porcentual (%) de la extracción del colorante de las 2 variedades de semilla con 3 solventes y su respectiva absorbancia a 480 nm. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.



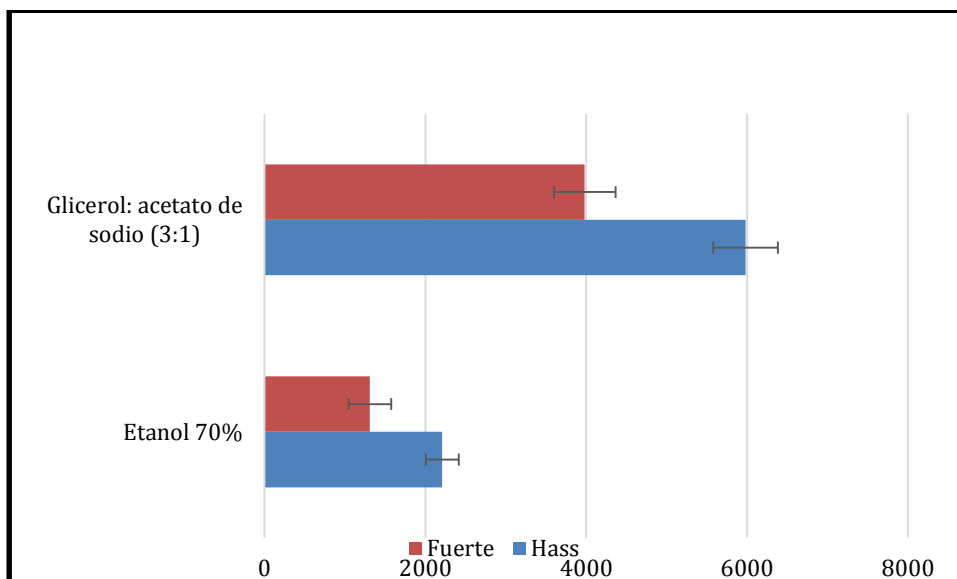
**Gráfico 5:** Gráfica Matriz de rendimiento; Absorbancia 480 nm



**Gráfico 6:** Espectro visible de absorción del extracto obtenido de la semilla de aguacate

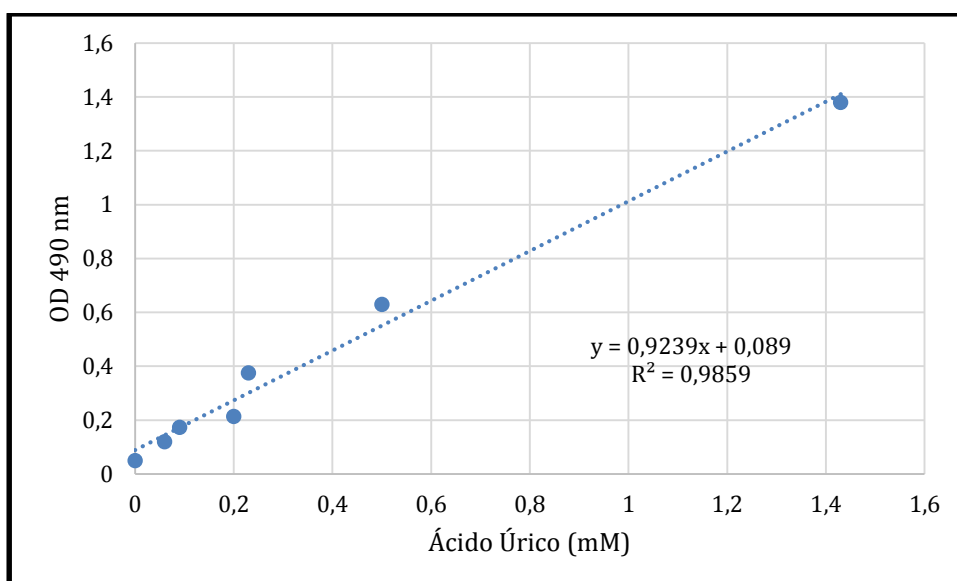


**Gráfico 7:** Curva de calibración obtenida para la concentración de extracto coloreado de la semilla de aguacate en PPM

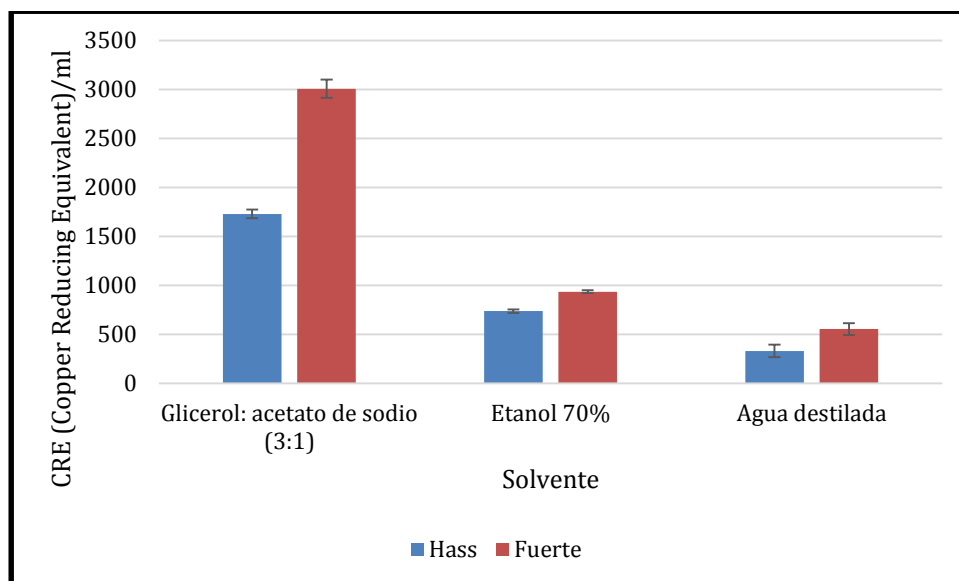


Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Valor ppm obtenido a través de la absorbancia mediante la ecuación:  $y = 4E-05x + 0.2211$  (obtenida de la recta de calibración mostrada en la gráfico 7).

**Gráfico 8:** Concentración del extracto obtenido en ppm a partir de las 2 variedades de semilla con los 2 solventes.

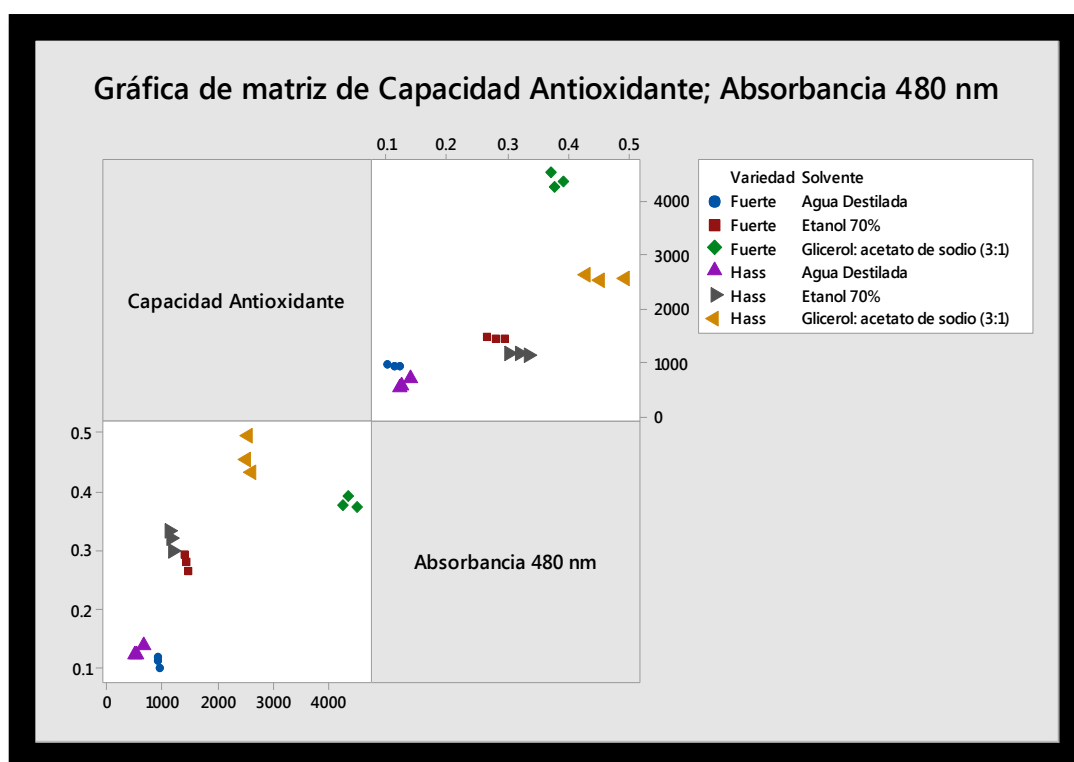


**Gráfico 9:** Curva de calibración ensayo TAC

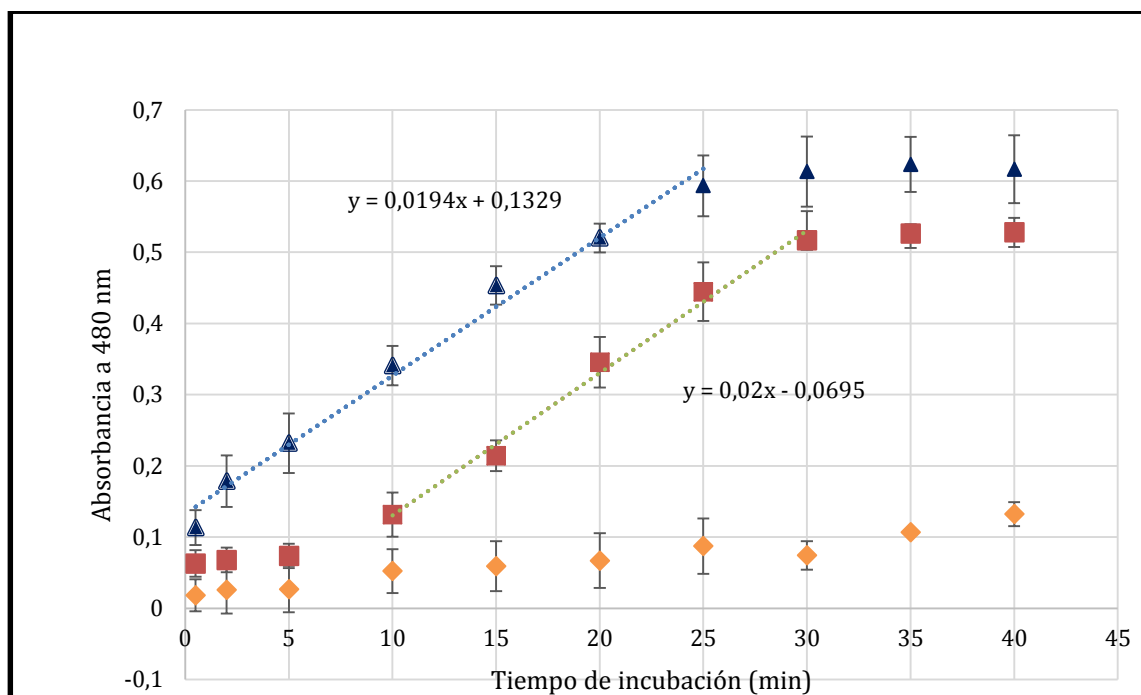


Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes

**Gráfico 10:** Capacidad Antioxidante Total del extracto de semilla de aguacate con 3 diferentes solventes y 2 variedades distintas de aguacate.

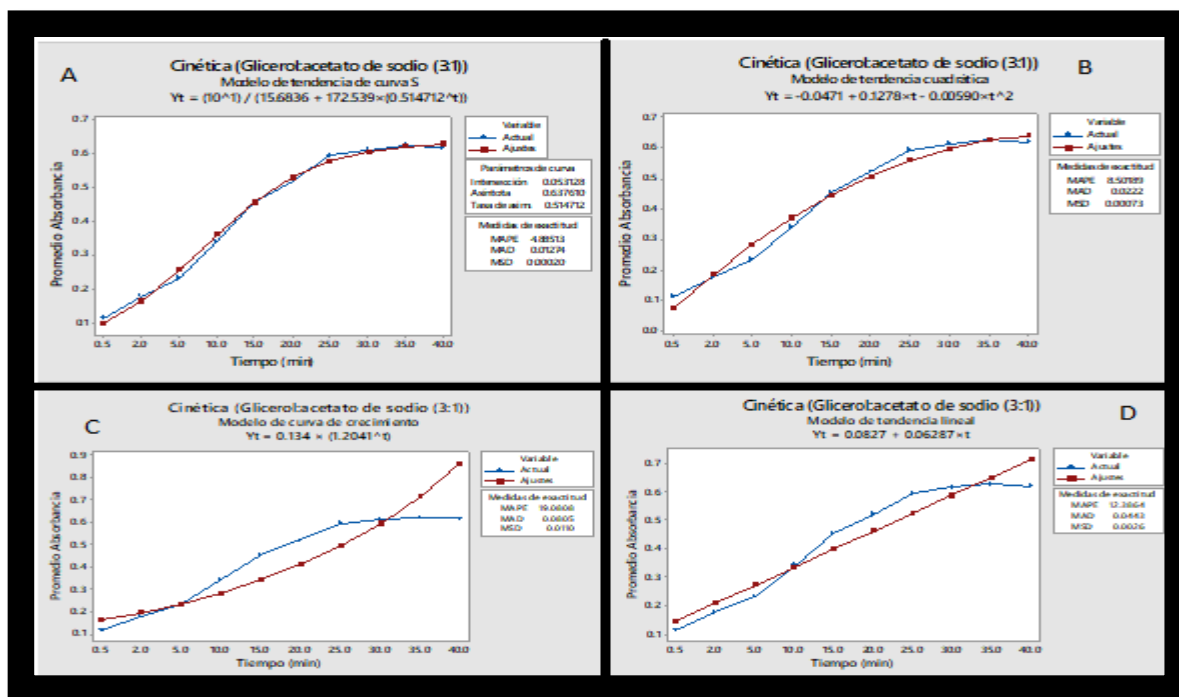


**Gráfico 11:** Gráfica de Matriz: Capacidad Antioxidante, Absorbancia a 480 nm



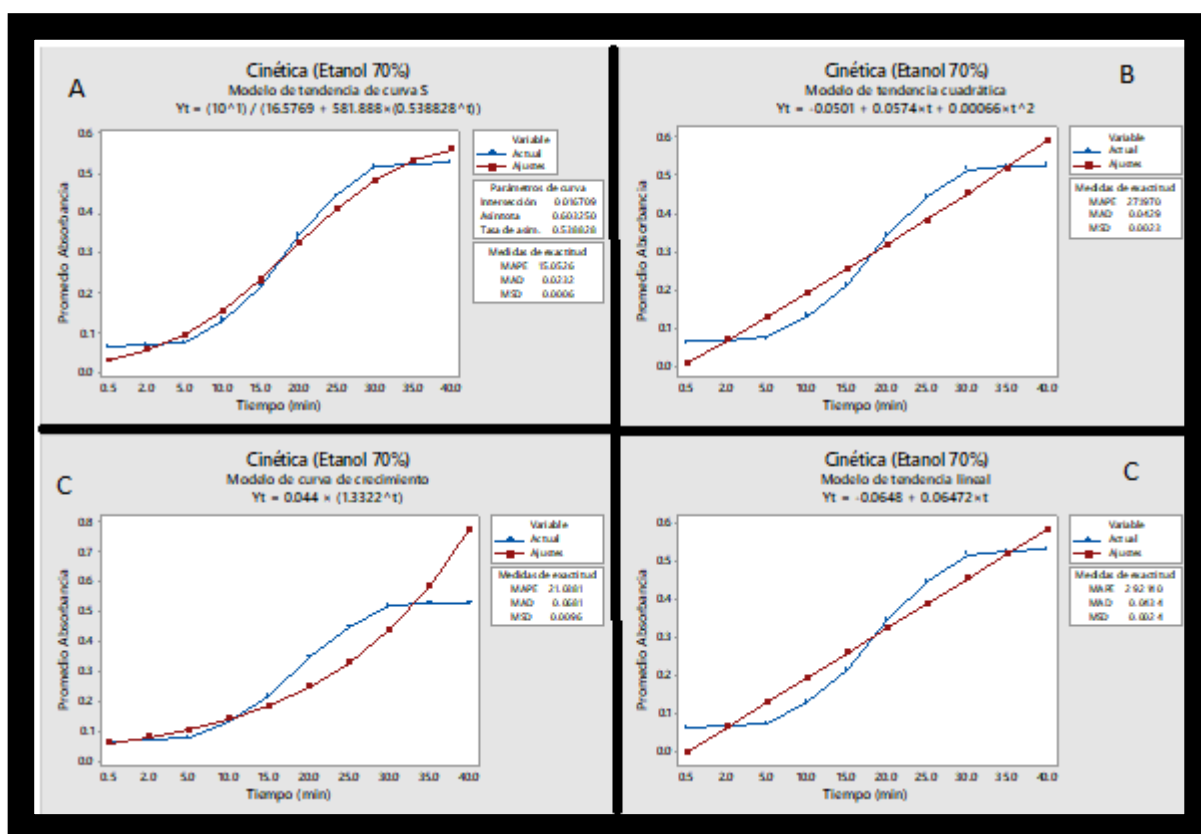
Azul: glicerol:acetato de sodio (3:1); Naranja: etanol (70%); Verde: agua destilada. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes

**Gráfico 12:** Cinética de formación del colorante de la semilla de aguacate con 3 diferentes solventes.



A: modelo de tendencia curva S, B: modelo de tendencia cuadrática, C: modelos de curva de crecimiento, D: modelo de tendencia lineal. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes

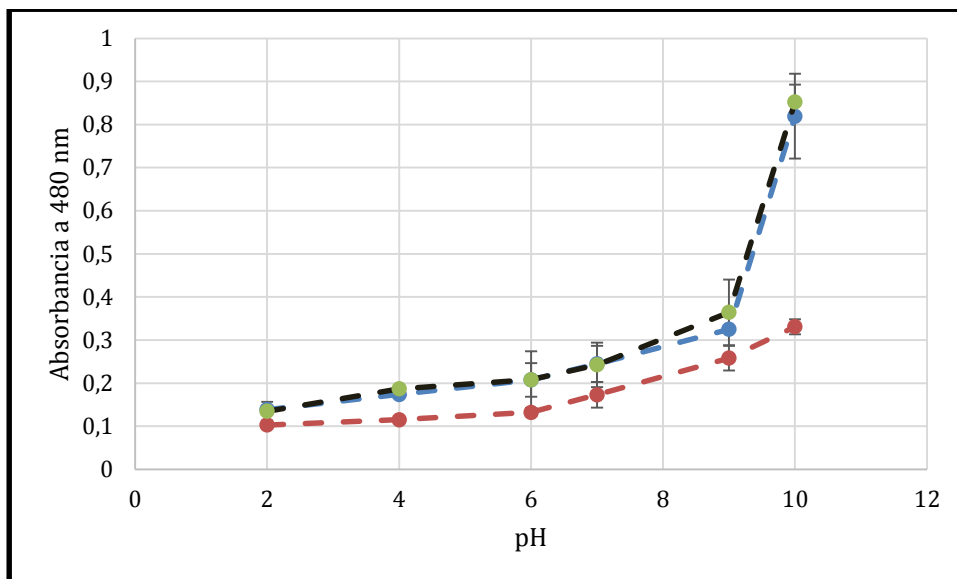
**Gráfico 13:** Distintos modelos de tendencias de serie de tiempo probados para la extracción con glicerol:acetato de sodio 3:1.



A: modelo de tendencia curva S, B: modelo de tendencia cuadrática, C: modelos de curva de crecimiento, D: modelo de tendencia lineal. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

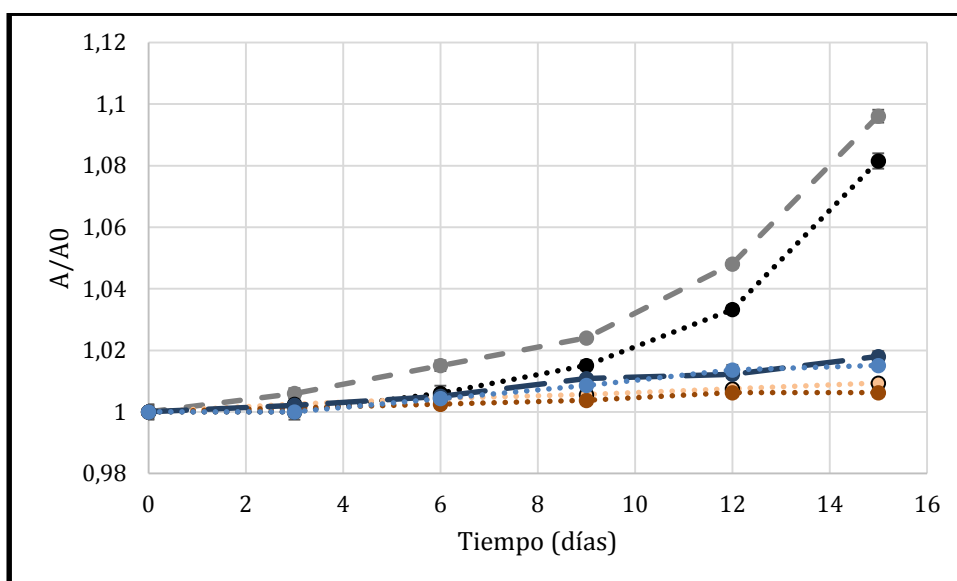
**Gráfico 14:** Distintos modelos de tendencias de serie de tiempo probados para la extracción con etanol al 70%.





Naranja: glicerol:acetato de sodio (3:1), Azul: etanol 70%, Negro: Agua destilada. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. La absorbancia inicial a 480 nm de cada extracto antes de la corrección del pH fue de aproximadamente 0,2

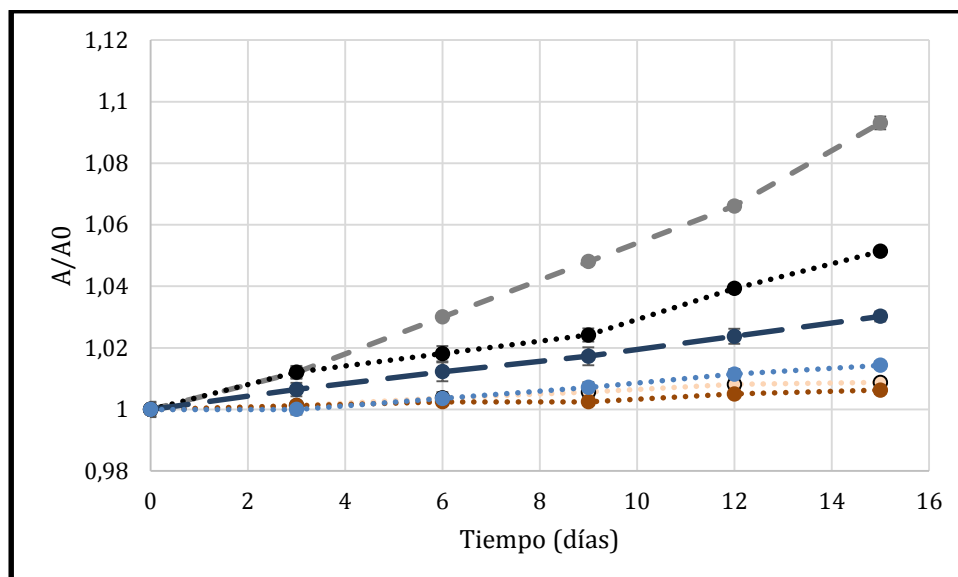
**Gráfico 15:** Variación de la absorbancia a 480 nm en función al pH del extracto de la semilla de aguacate con 3 solventes distintos.



. A: absorbancia obtenida a 480 nm, A0: absorbancia inicial a 480 nm. Gris: agua destilada (solvente), temperatura ambiente; Negro: agua destilada (solvente), 4°C; Azul oscuro: etanol 70% (solvente), temperatura ambiente; Celeste: etanol 70% (solvente), 4°C; Verde claro: glicerol:acetato de sodio (3:1)

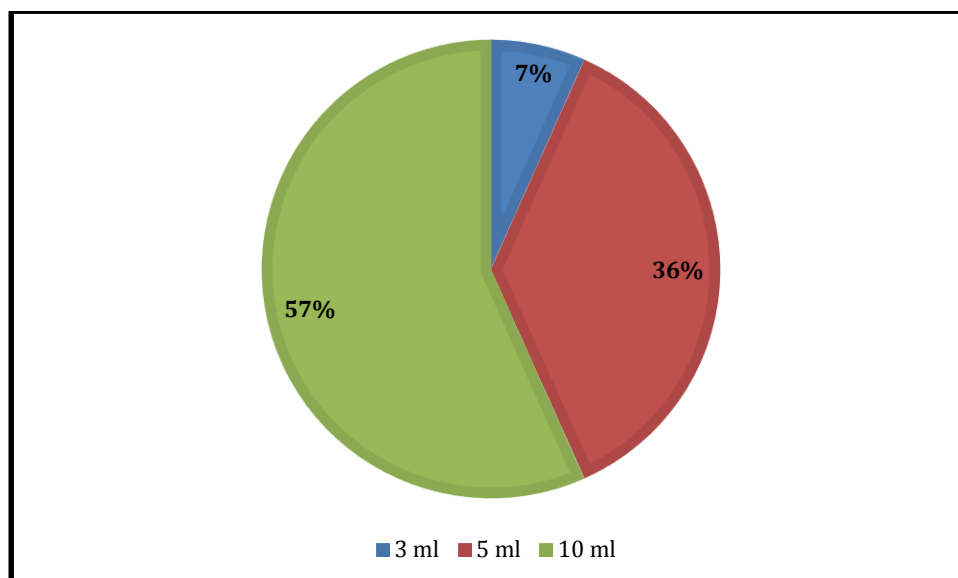
(solvente), temperatura ambiente; Verde oscuro: glicerol:acetato de sodio (3:1) (solvente), 4°C. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

**Gráfico 16:** Análisis de estabilidad en condiciones de oscuridad



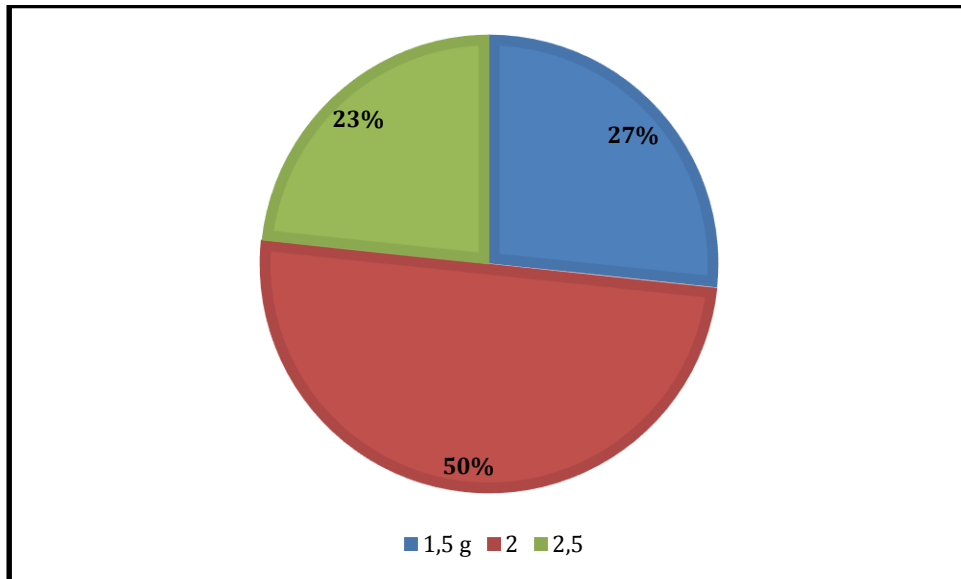
A: absorbancia obtenida a 480 nm, A0: absorbancia inicial a 480 nm. Gris: agua destilada (solvente), temperatura ambiente; Negro: agua deshidrada (solvente), 4°C; Azul oscuro: etanol 70% (solvente), temperatura ambiente; Celeste: etanol 70% (solvente), 4°C; Verde claro: glicerol:acetato de sodio (3:1) (solvente), temperatura ambiente; Verde oscuro: glicerol:acetato de sodio (3:1) (solvente), 4°C. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes

**Gráfico 17:** Análisis de estabilidad en condiciones de Luz

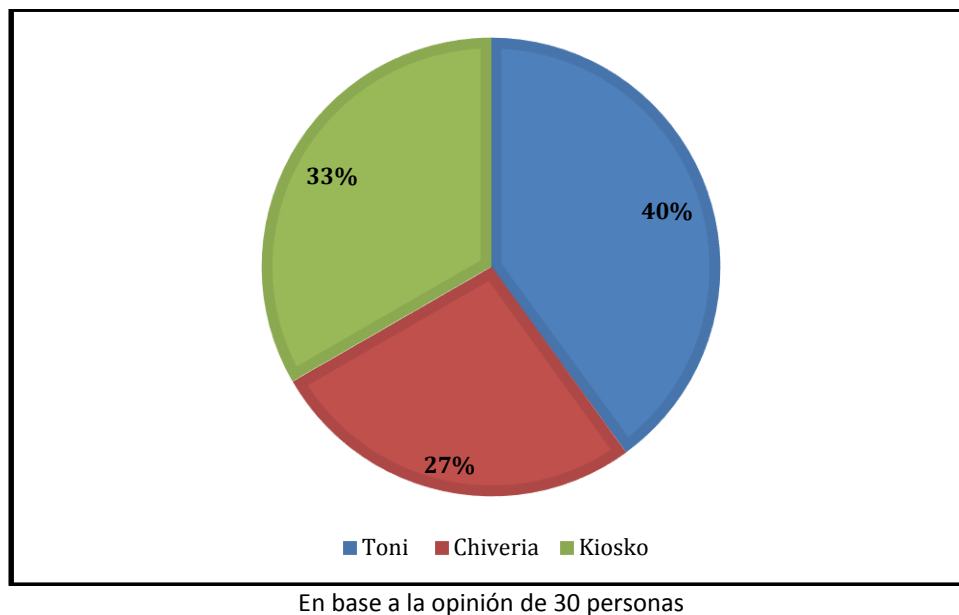


En base a la opinión de 30 personas.

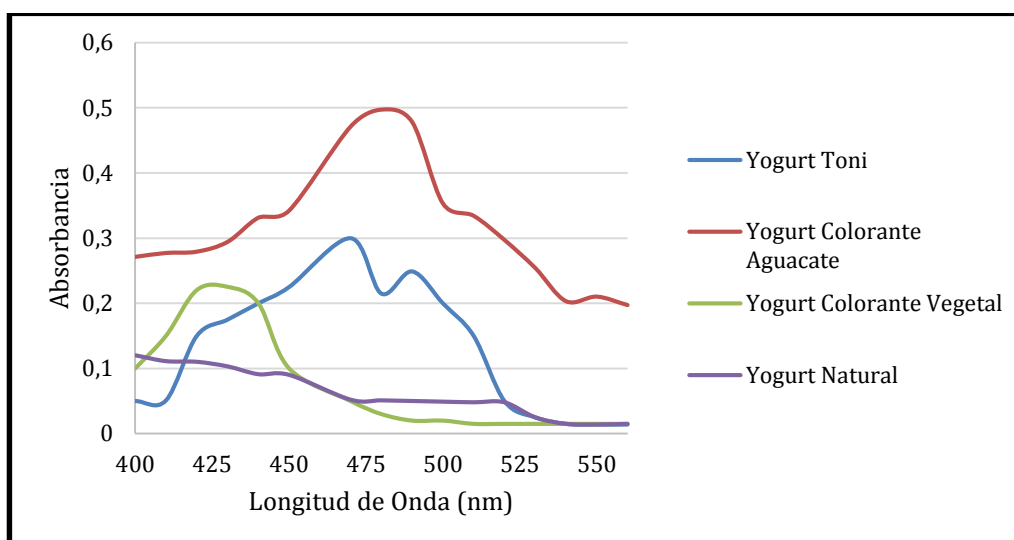
**Gráfico 18:** Preferencia visual de yogurt adicionado con distintas cantidades de colorante extraído de la semilla de aguacate.



**Gráfico 19:** Preferencia visual de yogurt adicionado con distintas cantidades de colorante vegetal alimenticio de la empresa Tisproquimicos.



**Gráfico 20:** Preferencia visual de distintas marcas de yogurt sabor durazno.



El yogurt natural no se encuentra adicionado con ningún tipo de colorante. El yogurt Toni es de sabor durazno y posee colorante adicionado en su composición. La adición de colorante de semilla de aguacate (10 ml) como de colorante vegetal (2 g) se la realizó a un yogurt natural sin colorantes

**Gráfico 21:** Espectro de absorción de 4 yogurts distintos.

## ANEXOS

**Imagen 1:** Variedades de aguacate utilizadas en la presente investigación. Izquierda: Fuerte, derecha: Hass



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 2:** Extracción del tegumento de la semilla de aguacate



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 3:** Semilla de aguacate molida



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 4:** Semilla licuada con 0.7 volúmenes de agua destilada. Izquierda: 1 minuto de exposición al aire, Derecha: 35 minutos de exposición al aire



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 5:** Extracción del colorante de la semilla de aguacate con sistema de reflujo. Izquierda: extracción con glicerol:acetato de sodio 3:1, Derecha: extracción con etanol al 70%



Tomada por: Tituaña, C. (2018).



**Imagen 6:** Torta obtenida después de la filtración al vacío del extracto obtenido con etanol al 70%



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 7:** Extracto coloreado sin concentrar. Izquierda: extracción con agua, Medio: extracción con etanol al 70%, Derecha: extracción con glicerol:acetato de sodio (3:1)



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

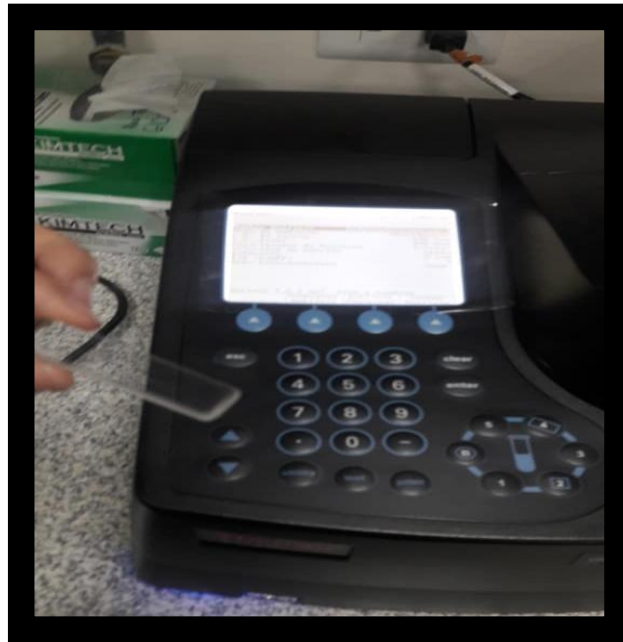


**Imagen 8:** Extracto de la semilla de aguacate obtenido con agua destilada después de la centrifugación



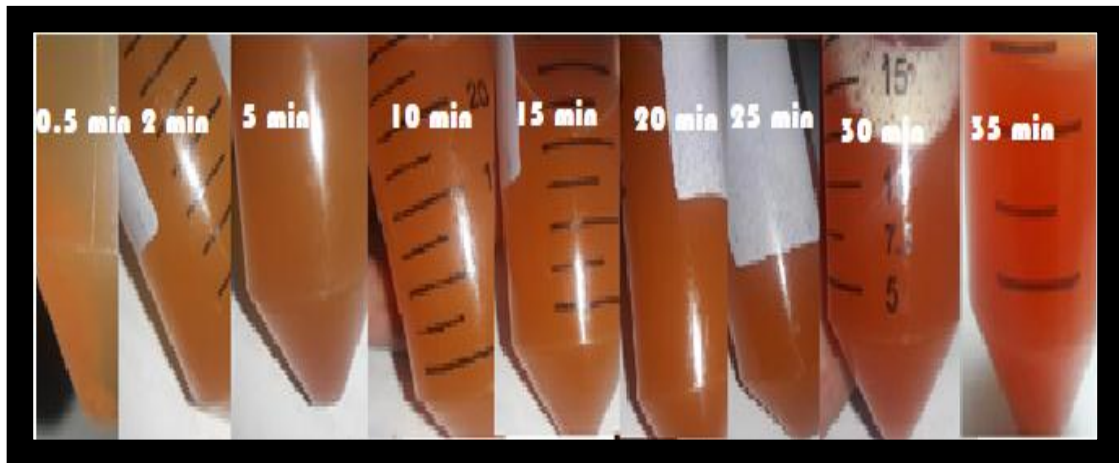
Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 9:** Espectrofotómetro y celdas de cuarzo utilizadas para el análisis UV



Tomada por: Tituaña, C. (2018).

**Imagen 10:** Cambios visuales en el color del extracto al incubar la semilla licuada por diferentes periodos de tiempo.



Tomada por: Tituaña, C. (2018).