



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE EXTRACTOS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS'

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

PERLA JIMÉNEZ VELÁZQUEZ

Bajo la supervisión de: SALVADOR VALLE GUADARRAMA, DR.



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2019



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
FICHA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE
EXTRACTOS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE
'HASS'**

Tesis realizada por PERLA JIMÉNEZ VELÁZQUEZ bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TENCNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:



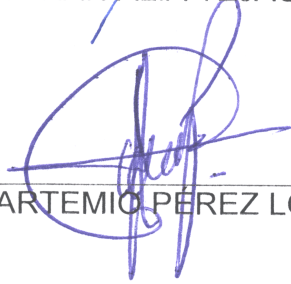
DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESOR:



DR. IRAN ALIA TEJACAL

ASESOR:



DR. ARTEMIO PÉREZ LÓPEZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
2.1 Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.).....	9
2.1.1 Descripción general.....	9
2.1.2 Comportamiento postcosecha.....	11
2.2 Compuestos bioactivos.....	11
2.2.1 Compuestos bioactivos presentes en subproductos de alimentos	12
2.2.2 Compuestos fenólicos y antocianinas	16
2.2.3 Extracción de antocianinas	23
2.3 Método de extracción acuosa en dos fases.....	30
2.3.1 Aplicación de ATPE para la extracción y recuperación de antocianinas.....	32
2.4 Literatura citada	43
3. COMPOSICIÓN PROXIMAL Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE ‘HASS’	52
Resumen.....	52

Abstract	53
3.1 Introducción	54
3.2 Materiales y métodos.....	56
3.2.1 Objeto de estudio	56
3.2.2 Composición proximal	56
3.2.3 Determinación de compuestos bioactivos	57
3.2.4 Variables respuesta.....	57
3.2.5 Análisis de datos	59
3.3 Resultados y Discusión.....	60
3.3.1 Composición proximal	60
3.3.2 Determinación de compuestos bioactivos	61
3.4 Conclusiones	64
3.5 Literatura citada	65
4. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE ‘HASS’ MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES.....	68
Resumen.....	68
Abstract	69
4.1 Introducción	70
4.2 Materiales y métodos.....	73
4.2.1 Diagramas binodales de fases	73
4.2.2 Capacidad de exclusión salina (<i>salting out</i>)	75
4.2.3 Separación de compuestos bioactivos	77
4.2.4 Análisis de datos	81
4.3 Resultados y discusión	83
4.3.1 Potencial de formación de sistemas binodales	83

4.3.2	Diagramas binodales de fases	89
4.3.3	Separación de compuestos bioactivos	91
4.4	Conclusiones	106
4.5	Literatura citada	107
5.	EVALUACIÓN POSTCOSECHA Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE ANTOCIANINAS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS'	113
	Resumen.....	113
	Abstract	114
5.1	Introducción	115
5.2	Materiales y métodos.....	117
5.2.1	Material vegetal	117
5.2.2	Evaluación postcosecha.....	117
5.2.3	Evaluación del potencial pigmentante	120
5.2.4	Análisis de datos	122
5.3	Resultados y discusión	123
5.3.1	Evaluación postcosecha.....	123
5.3.2	Evaluación de potencial pigmentante.....	129
5.4	Conclusiones	133
5.5	Referencias.....	134
	CONCLUSIONES GENERALES.....	137

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química (%) del aguacate.	10
Cuadro 2. Principales compuestos en el aguacate.	10
Cuadro 3. Principales familias de compuestos fenólicos.	17
Cuadro 4. Sustituyentes de las antocianinas.	20
Cuadro 5. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de antocianinas.	41
Cuadro 6. Parámetros fisicoquímicos de la cáscara de aguacate en madurez de consumo y madurez fisiológica de la var. ‘Hass’ (base seca).	60
Cuadro 7. Concentración de compuestos bioactivos en base seca de extractos de cáscara de aguacate en madurez fisiológica y de consumo.	62
Cuadro 8. Características de diagramas de fase correspondientes a los sistemas Na ₃ Cit-Peg4000 y MgSO ₄ -Peg4000.	85
Cuadro 9. Composición de puntos de referencia sobre la línea perpendicular a las líneas de operación e intersecciones con la curva binodal en los diagramas de fase mostrados en las Figuras 4b y 4d.	90
Cuadro 10. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F _{0.05}) con ($\alpha = 0.05$) y valores F correspondientes al análisis de varianza de parámetros de separación de fenoles solubles a partir de epicarpio de frutos de aguacate ‘Hass’ mediante extracción acuosa en dos fases desarrollada en distintas condiciones sobre las líneas principales de operación y afectadas por la longitud de la línea de operación.	91
Cuadro 11. Comparación de medias correspondientes a la relación de volúmenes (V _r), extracción (E), concentración en fase superior (C_{tsp}^t , $\mu\text{g g}^{-1}$), coeficientes de partición (K) entre fases y rendimiento de separación de fenoles solubles totales (TPS), en sistemas de extracción acuosa en dos fases.	94
Cuadro 12. Comparación de medias correspondientes a la concentración de flavonoides (Flav), antocianinas (Anto) y taninos condensables (Tani) en la fase	

superior de extracción acuosa en dos fases basados en dos fuentes de compuestos y en dos sistemas.....	103
Cuadro 13. Comparación de medias correspondientes a la concentración de la actividad antioxidante en la fase superior de extracción acuosa en dos fases basadas en dos sistemas.	105
Cuadro 14. Comparación de medias entre los días de evaluación de las variables fisiológicas del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.	125
Cuadro 15. Comparación de medias entre los días de evaluación de las concentraciones de compuestos bioactivos del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del fruto de aguacate.	9
Figura 2. Estructura química de las antocianinas.	20
Figura 3. Esquema de la recuperación del producto objetivo basado en el concepto ATPE (Phong, Show, Chow, & Ling, 2018).	31
Figura 4. Diagramas binodales de fase de los sistemas Na ₃ Cit-Peg4000 (a y b) y MgSO ₄ -Peg4000 (c y d). Los recuadros a y c muestran información experimental. La notación 1 a 4 y A a H indican condiciones evaluadas en la separación de compuestos bioactivos. Rep indica repetición.	84
Figura 5. Variación de la relación de volúmenes (Vr), concentración de fenoles solubles en fase superior (ctsp) y coeficiente de partición (Ktsp) de fenoles solubles afectados por la variación de composición a lo largo de la línea de operación y por la longitud de ésta en sistemas ATPE formados por Na ₃ Cit-Peg4000 y MgSO ₄ -Peg4000, durante la separación a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass'. Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa al interior de cada línea (Tukey, 0.05).	97
Figura 6. Cambios en firmeza y color del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.	124
Figura 7. Cambios en la composición fitoquímica del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.....	127
Figura 8. Cambios durante la evaluación de potencial pigmentante en luminosidad, ángulo hue y cromaticidad para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na ₃ Cit-Peg4000 basados en "Muestra" a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.....	130

Figura 9. Cambio del pH durante la evaluación de potencial pigmentante para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na3Cit-Peg4000 basados en “Muestra” a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.....	131
Figura 10. Cambio en la concentración de antocianinas durante la evaluación de potencial pigmentante para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na3Cit-Peg4000 basados en “Muestra” a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.	132

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, particularmente al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por permitirme formar parte de su programa de estudios.

Al laboratorio de Atmósferas Modificadas del Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al laboratorio de Productos Naturales de Preparatoria Agrícola, por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por todo el apoyo, la dedicación, la dirección y la confianza brindada durante mi estancia en el posgrado y para que se llevara a cabo esta investigación.

A la Dra. Yolanda Salinas Moreno por su atención y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Artemio Pérez López por la atención brindada en este proyecto de investigación.

Al Dr. Irán Alia Tejacal por su apoyo y asesorías durante mi estancia en la UAEM y para que pudiera realizarse este trabajo.

Al Q.F.B. Adalberto Gómez Cruz por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de parte de la fase experimental de la investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por el apoyo otorgado en este trabajo.

A mi familia por sus consejos y su apoyo incondicional en cada momento del desarrollo de este proyecto.

A Lupita, Araceli, Alejandra, Pili, Leti, Néstor y Daniel por la amistad y el apoyo brindado.

DATOS BIOGRÁFICOS

Perla Jiménez Velázquez nació en el municipio de Texcoco, Estado de México el 17 de agosto de 1992. Realizó sus estudios de educación media superior en el Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2007-2010). Posteriormente ingresó a la licenciatura de Ingeniería Agroindustrial de la misma Universidad del año 2010 al 2014. En el mes de septiembre de 2014 formó parte de un equipo para la realización de encuestas a Fondos de Aseguramiento Agrícola del país. Durante el año 2015 impartió capacitaciones a un grupo de personas con el proyecto “Cocina económica oaxaqueña”, por parte de la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. En el año 2017 ingresó al programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria para realizar sus estudios de Maestría.

RESUMEN GENERAL

COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE EXTRACTOS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS'

El procesamiento del fruto de aguacate 'Hass' (*Persea americana* Mill.) genera subproductos como la semilla y el epicarpio, que contienen compuestos bioactivos que pueden traer beneficios a la salud al ser consumidos. El objetivo general de la investigación fue separar los compuestos bioactivos en el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en estado maduro y evaluar el potencial pigmentante en una matriz alimentaria. Se caracterizó el epicarpio en estado de madurez fisiológica y de consumo mediante análisis proximal, donde se encontró diferencia significativa en las composiciones de los dos estados. Las muestras de epicarpio en madurez de consumo presentaron alto contenido de fenoles solubles, flavonoides y taninos condensables, pero bajo contenido de antocianinas. El epicarpio de los frutos se liofilizó y se molió para servir como material fuente de compuestos bioactivos. Como referencia se usó extracto líquido metanólico que se obtuvo mediante una separación sólido-líquido. Se utilizaron sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE) para separar los compuestos bioactivos, uno basado en polietilenglicol 4000 (Peg4000) y MgSO_4 y el otro en Peg4000 y citrato de sodio (Na_3Cit). El primero presentó mayor potencial de formación de sistemas bifásicos, pero el segundo mostró mayor capacidad de separación de compuestos bioactivos a partir de epicarpio molido liofilizado. La eficiencia de separación de los sistemas que incorporaron directamente muestra liofilizada fue del 89% en relación a los que utilizaron extracto metanólico. Los sistemas ATPE permitieron la separación de compuestos en porcentaje que varió entre 96 y 99%. Sin embargo, en virtud del bajo contenido de antocianinas, el potencial de pigmentación fue bajo. El método de ATPE permitió la separación de compuestos bioactivos de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' mediante una estrategia no térmica.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., compuestos bioactivos, epicarpio, extracción acuosa en dos fases

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Director de Tesis: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

GENERAL ABSTRACT

BIOACTIVE COMPOUNDS AND PIGMENTIG POTENTIAL OF EXTRACTS FROM EPICARP OF HASS AVOCADO FRUIT

The processing of the 'Hass' avocado fruit (*Persea americana* Mill.) generates by-products such as seed and epicarp, which contain bioactive compounds that can bring health benefits when consumed. The general objective of the research was to separate bioactive compounds from the epicarp of 'Hass' avocado fruit at consumption maturity and to evaluate the pigment potential in a food matrix. The epicarp was characterized at physiological and consumption maturity states by proximal analysis, where a significant difference was found between the compositions of the two states. The epicarp samples at consumption maturity had high soluble phenol, flavonoid, and condensable tannin contents, but low anthocyanin content. The epicarp of fruits was lyophilized and ground to serve as a source material for bioactive compounds. As a reference, liquid methanolic extract, which was obtained by solid-liquid separation was used. Two-phase aqueous extraction (ATPE) systems were used to separate the bioactive compounds, one based on polyethylene glycol 4000 (Peg4000) and MgSO_4 and the other on Peg4000 and sodium citrate (Na_3Cit). The first presented greater potential to form biphasic systems, but the second showed greater capacity to separate bioactive compounds from lyophilized ground epicarp. The separation efficiency of the systems that directly incorporated lyophilized sample was 89% in relation to those that used methanolic extract. The ATPE systems allowed the separation of compounds in percentage that had a variation of 96 and 99%. However, due to the low anthocyanin content, the pigmentation potential was low. The ATPE method allowed the separation of bioactive compounds of epicarp from 'Hass' avocado fruits through a non-thermal strategy.

Key words: *Persea americana* Mill. bioactive compounds, aqueous two-phase extraction

Thesis Master Science, Agro-Food Science and Technology Graduate Program, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El gran desarrollo que las agroindustrias han tenido en los últimos años trae como consecuencia la generación de una gran cantidad de desechos. En algunos casos a estos desechos no se les da ningún uso o aprovechamiento, por lo que pasan a ser un agente generador de contaminación. Un caso importante de esta situación está dado por la cáscara de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) que son procesados para la obtención de pulpa y otros subproductos destinados a la fabricación de guacamole, aceites para la industria de los cosméticos, entre otros (Olaetta, 2003; Palou et al., 2000; Woolf et al., 2013). Estas cáscaras contienen compuestos bioactivos con potencial antioxidante (Terasawa, Sakakibara, & Murata, 2006), que son responsables, principalmente, del sistema de defensa de la planta contra diferentes tipos de agentes, tales como la temperatura y la luz (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). El color oscuro del epicarpio del fruto de aguacate 'Hass' es causado por la presencia de antocianinas (Bertling, Tesfay, & Bower, 2007; Cox, McGhie, White, & Woolf, 2004), compuestos pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2006), cuya actividad antioxidante ha sido demostrada ampliamente (Atala, Aspée, Speisky, Lissi, & López-Alarcón, 2013; Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommès, 2009).

Los extractos ricos en antocianinas son atractivos para la industria alimentaria como sustitutos naturales de los colorantes sintéticos (Bueno et al., 2012), debido a que no son tóxicos y son solubles en agua, lo cual favorece su fácil incorporación a los sistemas alimenticios (Pazmiño-Durán, Giusti, Wrolstad, & Glória, 2001). La sustitución de colorantes sintéticos por los naturales se ha dado por varias razones. En primer lugar, se ha encontrado que los colorantes artificiales pueden tener efectos adversos en la salud (Eigenmann & Haenggeli

2007; Swaroop, Dinesh Roy, & Vijayakumar, 2011). Segundo, los pigmentos naturales pueden ser tratados como ingredientes en lugar de como aditivos en la preparación de alimentos (Stintzing, Trichterborn, & Carle, 2006), de acuerdo con las regulaciones de la FDA (Aberoumand, 2011). Tercero, la ingesta de pigmentos naturales puede tener un efecto positivo sobre la salud humana (He & Giusti, 2010; Pangestuti & Kim, 2011). Sin embargo, los pigmentos naturales son generalmente menos estables y tienen un costo más alto que los colorantes artificiales (Wrolstad & Culver, 2012), por lo que su potencial pigmentante debe ser evaluado y deben emprenderse acciones tendientes a favorecer su obtención y que mejoren su estabilidad en el uso eventual como agentes pigmentantes de matrices alimenticias.

La extracción de antocianinas ha sido atendida comúnmente mediante el uso de solventes como metanol o acetona (Abdel-Aal, Akhtar, Rabalski, & Bryan, 2014), ya sea solos o con asistencia de sonicación o aplicación de microondas (Da Porto & Natolino, 2018; Romero-Díez et al., 2019). Asimismo, se han usado técnicas basadas en fluidos en estado supercrítico y fluidos presurizados (Paes, Dotta, Barbero, & Martínez, 2014), e incluso se ha usado la tecnología de campos eléctricos pulsantes (Zhou, Zhao, & Huang, 2015). El uso de solventes orgánicos tiene la ventaja de un bajo costo y una implementación sencilla, pero la desventaja de requerir largos tiempos de extracción, grandes cantidades de solventes y la dificultad de eliminarlos del producto. Las otras opciones pueden reducir el tiempo de extracción, pero requieren un mayor número de variables para ser manejadas o el costo puede incrementarse significativamente (Easmin et al., 2015; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019). Jampani y Raghavarao (2015) emplearon la extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) como método alternativo para la extracción de antocianinas de *Brassica oleracea* L. El método de ATPE se basa en una estrategia de extracción líquido-líquido y se forma con la mezcla de dos polímeros (Sadeghi & Maali, 2016), un polímero y una sal o incluso un solvente orgánico y una sal (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019), que en ciertas concentraciones producen una solución verdadera en una fase, pero en otras mayores, el sistema se separa

en dos fases inmiscibles, entre las cuales se reparten los componentes de la mezcla (Rosa, Ferreira, Azevedo, & Aires-Barros, 2010). El método de extracción acuosa en dos fases está basado en un procedimiento muy simple, tiene alto potencial de escalamiento y, en virtud de la alta concentración de agua en el sistema, se preserva la actividad biológica de los compuestos que se obtienen, lo que incrementa su potencial en la separación de diversas biomoléculas (Seader, Henley, & Roper, 2011).

La importancia del presente trabajo radica en separar los compuestos bioactivos de cáscaras de frutos de aguacate 'Hass' y el posible uso de las antocianinas de éstas como agente pigmentante de una matriz alimenticia, con lo cual se aprovechará un subproducto de la industria de transformación de este fruto, incrementando su valor agregado. Para ello, el trabajo estuvo conformado por cuatro fases. En la primera fase se atendió la caracterización de la composición química de la cáscara de aguacate 'Hass' en estado de madurez fisiológica y de consumo, así como también la determinación de los compuestos fenólicos antocianinas, flavonoides y taninos de la cáscara en los dos estados de madurez empleando para la extracción un disolvente metanólico. En la segunda fase se realizó el estudio de los elementos necesarios para realizar la separación de los compuestos bioactivos mediante el método de extracción acuosa en dos fases, donde se usaron dos sistemas ATPE, basados en una mezcla polímero-sal, en el cual los componentes usados para el primer sistema fueron polietilenglicol 4000 (PEG 4000) y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), y otro sistema basado en la mezcla de PEG 4000 y sulfato de magnesio (MgSO_4). Para cada uno de estos sistemas se construyeron diagramas binodales de fase (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar, & Ramesh, 2011) y se estudiaron las condiciones para emprender la separación de los compuestos bioactivos así como la determinación de la actividad antioxidante. En la tercera fase se realizó el seguimiento de la maduración del fruto de aguacate 'Hass' de verde a púrpura oscuro durante 11 días, midiendo los parámetros de textura y color. En cada día se obtuvieron muestras que fueron congeladas y liofilizadas, lo que constituyó el material para la obtención de los compuestos bioactivos mediante un sistema ATPE. El

propósito de la última fase fue evaluar el potencial pigmentante de las antocianinas extraídas mediante el sistema ATPE en puntos de la línea principal de operación en una matriz alimentaria que fue yogurt durante 10 días.

Conforme a lo planteado anteriormente, en este trabajo de investigación se presentan las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis

- El sistema ATPE empleado maximiza la separación de los compuestos bioactivos.
- La capacidad antioxidante de la cáscara de frutos de aguacate 'Hass' es alta.
- El potencial pigmentante de las antocianinas en una bebida será alto a lo largo del tiempo.

Objetivos

Objetivo general

- Separar compuestos bioactivos de epicarpio o cáscara de frutos de aguacate 'Hass' en estado maduro, evaluar la capacidad antioxidante y el potencial pigmentante de las antocianinas.

Objetivos específicos

- Caracterizar el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en madurez fisiológica y de consumo.
- Separar compuestos bioactivos de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' mediante el método de extracción acuosa en dos fases.
- Determinar la capacidad antioxidante del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en madurez de consumo.

- Evaluar la cinética de cambio del contenido de compuestos bioactivos del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' durante la maduración en postcosecha.
- Evaluar la estabilidad y el potencial pigmentante de antocianinas de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en una matriz alimentaria.

Literatura citada

- Abdel-Aal, E. S. M., Akhtar, H., Rabalski, I., & Bryan, M. (2014). Accelerated, microwave-assisted, and conventional solvent extraction methods affect anthocyanin composition from colored grains. *Journal of Food Science*, 79(2). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12346>
- Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 71–78.
- Atala, E., Aspée, A., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2013). Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.007>
- Bertling, I., Tesfay, S. Z., & Bower, J. P. (2007). Antioxidants in “Hass” avocado. *South African Avocado Growers’ Asociation*, 17–19. Retrieved from http://www.avocadosource.com/journals/saaga/saaga_2007/SAAGA_2007_V30_PGS_17-19_Bertling.pdf
- Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A. M., Fett, R., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 126–151. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314>
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Woolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of “Hass” avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008>
- Da Porto, C., & Natolino, A. (2018). Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chemistry*, 258, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.059>
- Easmin, M. S., Sarker, M. Z. I., Ferdosh, S., Shamsudin, S. H., Yunus, K. Bin, Uddin, M. S., ... Khalil, H. P. S. A. (2015). Bioactive compounds and advanced processing technology: Phaleria macrocarpa (sheff.) Boerl, a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 981–991. <https://doi.org/10.1002/jctb.4603>
- Eigenmann, P., & Haenggeli, C. (2007). Food colourings and preservatives. *The Lancet*, 370(9598), 1524–1525. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61643-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61643-2)
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697–6703. <https://doi.org/10.5897/jmpr11.1404>

- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- Jampani, C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology*, 151, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.030>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Olaetta, J. (2003). Industrialización Del Aguacate: Estado Actual Y Perspectivas Futuras. *Proceedings V World Avocado Congress*, 749–754. Retrieved from http://www.avocadosource.com/WAC5/papers/wac5_p749.pdf
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>
- Palou, E., Hernandez-Salgado, C., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., & Welti-Chanes, J. (2000). High pressure-processed guacamole. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(99\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(99)00002-8)
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Pazmiño-Durán, E. A., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., & Glória, M. B. A. (2001). Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. *Food Chemistry*, 73(3), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00305-8)
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. *Science and Technology*, 1(1), 7–16. <https://doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02>
- Rodríguez-Salazar, N., & Valle-Guadarrama, S. (2019). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Romero-Díez, R., Matos, M., Rodrigues, L., Bronze, M. R., Rodríguez-Rajo, S., Cocero, M. J., & Matias, A. A. (2019). Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chemistry*, 272(April 2018), 258–266.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.016>

- Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2010). Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2296–2305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>
- Sadeghi, R., & Maali, M. (2016). Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymer-polymer aqueous systems. *Polymer*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.11.032>
- Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (2011). *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations*. USA: John Wiley & Sons, Inc. (Third Edit). Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc.
- Stintzing, F. C., Trichterborn, J., & Carle, R. (2006). Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94(2), 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.018>
- Swaroop, V. R., Dinesh Roy, D., & Vijayakumar, T. (2011). *Genotoxicity of Synthetic Food Colorants*. 1, 128–134.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.013>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (Fourth Edi). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.
- Terasawa, N., Sakakibara, M., & Murata, M. (2006). Antioxidative Activity of Avocado Epicarp Hot Water Extract. *Food Science and Technology Research*, 12(1), 55–58. <https://doi.org/10.3136/fstr.12.55>
- Woolf, A. B., Wibisono, R., Farr, J., Hallett, I., Richter, L., Oey, I., ... Requejo-Jackman, C. (2013). Effect of high pressure processing on avocado slices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.011>
- Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 59–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>
- Zhou, Y., Zhao, X., & Huang, H. (2015). Effects of Pulsed Electric Fields on Anthocyanin Extraction Yield of Blueberry Processing By-Products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1898–1904. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12427>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aguacate (*Persea americana* Mill.)

2.1.1 Descripción general

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se cultiva ampliamente en toda América, incluyendo Estados Unidos, México, Guatemala, Colombia y en el viejo continente, en España (Devia Pineda & Saldarriaga, 2012). El fruto de aguacate es una baya que posee un endocarpio delgado y un mesocarpio carnoso y oleaginoso, rodeado del epicarpio, que es de textura rugosa en cultivares como 'Hass' (Barreto, 2014) (Figura 1).

Se utiliza principalmente como complemento de la alimentación, en la preparación de diferentes platos, entre los que se encuentra una amplia variedad de ensaladas, salsas, jugos, etc., debido a su alto valor alimenticio (Devia Pineda & Saldarriaga, 2012) (Cuadro 1).

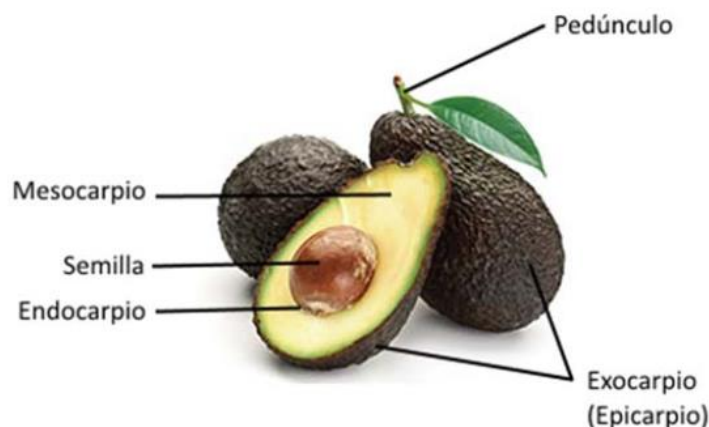


Figura 1. Descripción del fruto de aguacate.

El principal componente del fruto de aguacate es el aceite (70%); sin embargo, también es rico en compuestos fenólicos, como catequina y epicatequina, los cuales se han estudiado por su actividad antioxidante. Los principales compuestos funcionales que se encuentran en las diferentes fracciones del aguacate son compuestos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides y fibras (Cuadro 2). Tanto en muestras secas como en muestras congeladas, la caracterización de la pulpa y la semilla ha demostrado que más del 70% de la actividad antioxidante total y contenido fenólico se encuentra en las semillas (Casas-Godoy & Sandoval-Fabián, 2014).

Cuadro 1. Composición química (%) del aguacate.

Componente	%
Agua	64.5
Proteína	1.7
Grasa	26.4
Hidratos de carbono	5.1
Calorías	264

Fuente: Devia Pineda and Saldarriaga (2012).

Cuadro 2. Principales compuestos en el aguacate.

Fracción de aguacate	Compuestos fenólicos (mg/100 g)	Ácido ascórbico (mg/100 g)	Carotenoides (µg/100 g)	Fibra (mg/100 g)
Semilla	5160 ^a	-	630 ^b	-
Pulpa	490 ^a	9 ^a	590 ^a	5000 ^a
Cáscara	1260 ^a	-	1520 ^b	-

^a Peso seco, ^b Peso húmedo. Fuente: Casas-Godoy and Sandoval-Fabián (2014).

En México, el aguacate es uno de los principales cultivos perennes y ocupa el sexto lugar en cuanto al volumen de producción (FAO, 2012). La producción del aguacate 'Hass' en México supera los 1.3 millones de toneladas. El estado con mayor producción es Michoacán (86%), seguido de Jalisco y Nayarit (Bello-Lara

et al., 2016). La temporada alta de la cosecha de aguacate se encuentra entre los meses de octubre a febrero, la temporada media se da entre marzo y mayo y la temporada baja se presenta en los meses de junio a septiembre (SIAP-SAGARPA, 2007).

2.1.2 Comportamiento postcosecha

El fruto de aguacate 'Hass' exhibe comportamiento climatérico y transita entre madurez fisiológica y madurez de consumo en un periodo aproximado de dos semanas (Valle-Guadarrama, Morales-Cabrera, Peña-Valdivia, et al., 2013). Durante la maduración ocurren varios cambios; entre ellos, la disminución de la clorofila y carotenoides y un aumento en el contenido de antocianinas en la cáscara (cianidina 3-O-glucósido) (Cox, McGhie, White, & Woolf, 2004), lo que da como resultado el cambio de color de la piel verde a púrpura oscuro. Las causas primordiales de la degradación de clorofila son los cambios de pH, principalmente como consecuencia de la fuga de ácidos orgánicos al exterior de la vacuola, así como el desarrollo de procesos oxidativos y la acción de las clorofilasas. Este cambio ha sido utilizado para la clasificación del aguacate según su grado de madurez. Otros cambios son el aumento en la cantidad de ácidos grasos y la disminución de firmeza (Domínguez Rios, 2014).

2.2 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos o metabolitos secundarios de origen vegetal se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes, los cuales se definen como componentes de alimentos que influyen en las actividades fisiológicas o celulares que dan como resultado un efecto beneficioso para la salud. Estos compuestos no son nutrientes, es decir, no son esenciales para la vida (Kris-Etherton et al., 2004; Martínez-Navarrete, del Mar Camacho Vidal, & José Martínez Lahuerta, 2008). Los compuestos bioactivos suelen ocurrir en pequeñas cantidades en los alimentos (Kris-Etherton et al., 2002). Se ha identificado un gran número de estos compuestos que tienen beneficios potencialmente importantes para la salud. Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes, inhibidores de enzimas e inductores, entre otras acciones (Kris-Etherton et al., 2004).

En el reino vegetal, se pueden distinguir cuatro grandes grupos de compuestos bioactivos, entre los que se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son las sustancias nitrogenadas, las azufradas, las terpénicas y, las más ampliamente estudiadas, las fenólicas (Barberán, 2003).

2.2.1 Compuestos bioactivos presentes en subproductos de alimentos

El aprovechamiento de subproductos generados durante la elaboración de alimentos o productos desechados como fuente de compuestos funcionales y su aplicación en otros alimentos es muy deseable como parte de un sistema de gestión de residuos (Kaur, Wani, Singh, & Sogi, 2011). Diversos estudios compositivos de los residuos de procesamiento de frutas sugieren la presencia de una amplia gama de compuestos bioactivos en diferentes fracciones residuales. Estos compuestos bioactivos son esencialmente metabolitos primarios y secundarios de las plantas (Banerjee et al., 2017). Extractos ricos en compuestos bioactivos pueden ser utilizados en una amplia gama de aplicaciones novedosas debido a los efectos probados en la salud al ser consumidos a largo plazo (Banerjee et al., 2017).

Los subproductos como son la piel, semilla y pulpa de frutas y hortalizas se han venido estudiando para su aprovechamiento. A continuación, se mencionarán algunos estudios reportados sobre la determinación de algunos compuestos bioactivos de estos residuos o subproductos.

Chantaro, Devahastin, and Chiewchan (2008) estudiaron la viabilidad del uso de cáscaras de zanahoria como materia prima inicial para producir fibra dietética antioxidante en polvo. Para ello valoraron los efectos del blanqueamiento y el secado al aire caliente (60-80 °C) en la cinética de secado y las propiedades fisicoquímicas de la fibra dietética en polvo. Obtuvieron como resultados que el blanqueamiento tuvo un efecto significativo en el contenido de fibra y composiciones, retención de agua y capacidad de hinchazón de la fibra en polvo. Por el contrario, la temperatura de secado en el rango seleccionado no afectó las propiedades de hidratación. En términos de la actividad antioxidante, la

degradación térmica durante el blanqueamiento y el secado causaron una disminución en el contenido de los compuestos fenólicos y β -caroteno, lo que llevó a la pérdida de actividad antioxidante del producto final.

Al-Sayed and Ahmed (2013) evaluaron las propiedades físicas y químicas de los polvos de la corteza de sandía y cáscara de melón sharlyn y su utilización como sustituto parcial de harina de trigo a niveles de 2.5, 5.0 y 7.5% o grasa a niveles de 5.0, 10 y 15% en la fabricación de pasteles. Las cortezas de sandía tenían mayor humedad, cenizas, grasas, proteínas y carbohidratos 10.61, 13.09, 2.44, 11.17 y 56.00%, respectivamente en comparación con las cáscaras de melón. Por otro lado, las cáscaras de melón sharlyn tenían un mayor contenido de fibra cruda (29.59%) que en las cortezas de sandía (17.28%). La capacidad de absorción de agua (CAA) y la capacidad de absorción de aceite (CAAc) de las cáscaras de melón sharlyn era mayor que la de las cortezas de sandía, siendo 7.7, 7.13 (g agua g⁻¹) y 2.24, 1.65 (g aceite g⁻¹), respectivamente. Las cortezas de sandía mostraron una actividad de barrido de radicales libres significativamente mayor y β -caroteno (39.7 y 96.44%), respectivamente en comparación con las cáscaras de melón sharlyn. Contienen diferentes tipos de compuestos fenólicos, donde el más abundante era ácido 4-hidroxibenzóico (958.3 g g⁻¹ ms), seguido de vainillina (851.8 g g⁻¹ ms), mientras que el compuesto fenólico más bajo era ácido coubárico (8,8 g g⁻¹ ms). Por otro lado, se identificaron cuatro compuestos fenólicos en cáscaras de melón sharlyn, a saber, ácido 4-hidroxibenzoico, vainillina, ácido clorogénico y ácido cumárico. La incorporación de polvos de estos productos en la masa de pasteles en todos los niveles estudiados mejoró el volumen y el volumen específico de los pasteles horneados a superar, los del control. Estos materiales también retardan la ranciedad de los pasteles y la inhibición de los lípidos oxidación y la formación de ácidos grasos libres durante el almacenamiento. La sustitución del 5% de harina y 10% de grasa por cortezas de sandía y cáscaras de melón sharlyn produjeron pasteles aceptables que no eran significativamente diferentes con el control.

Pérez-Nájera, Lugo-Cervantes, Gutiérrez-Lomelí, and Del-Toro-Sánchez (2013) extrajeron y cuantificaron el contenido fenólico de la cáscara de lima, así como su actividad antioxidante. Para ello evaluaron primero el mejor sistema de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides, teniendo como variables: tipo de solvente (metanol, acetona y hexano) y tamaño de partícula (tamiz 20 (T1) y 50 (T2)). La determinación de la actividad antioxidante la realizaron mediante dos métodos ABTS^{•+} y DPPH[•], comparando la efectividad entre ellos. El mejor modelo de extracción de los compuestos fenólicos y flavonoides fue utilizando metanol como solvente y un tamaño de partícula pequeño (300 µm). El valor más alto de actividad antioxidante (91.69%) se obtuvo con el método ABTS^{•+}, en los extractos con metanol y acetona, sin diferencias entre los tamices utilizados. La cáscara de lima tiene 8.79 mg EAG g⁻¹ ms y 14325 mg quercetina g⁻¹ ms. Con los resultados obtenidos determinaron que la utilización de cáscara de lima representa una alternativa para el aprovechamiento de biocompuestos, que son considerados como sustitutos de los antioxidantes sintéticos existentes.

Puertas-Mejía, Villegas-Guzmán, and Alberto Rojano (2013) recuperaron compuestos fenólicos a partir de borra de café colombiano para darle un valor agregado a este residuo. Para ello sometieron el residuo a extracciones sólido-líquido usando diferentes sistemas de solventes. Evaluaron las propiedades *in vitro* usando los métodos ABTS^{•+} y DPPH[•]. Para la caracterización de los principales componentes utilizaron cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Encontraron que todos los extractos obtenidos mostraron buena capacidad antioxidante, con el extracto de etanol:agua como el mejor, seguido del extracto de metanol acidulado. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la fracción en diclorometano del extracto etanol:agua resultó menor que la presentada por la taza de café. Identificaron los ácidos clorogénico, isoclorogénico y feruloilquínico como los principales componentes de la borra de café.

Serna-Jiménez, Torres-Valenzuela, Martínez-Cortínez, and Hernández-Sandoval (2018) establecieron las condiciones para el aprovechamiento de la pulpa de café

que se obtiene de la producción, para lo cual evaluaron la extracción de compuestos bioactivos, empleando agua como solvente en tiempos entre 4 y 8 minutos y temperaturas entre 60 a 90 °C. A cada una de las infusiones obtenidas les midieron el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, empleando los métodos Folin-Ciocalteau, ABTS^{•+} y DPPH[•], respectivamente. Encontraron que las infusiones (extracciones en agua) tienen un alto contenido de polifenoles (356.78 mg L⁻¹) y una elevada capacidad antioxidante (92%, equivalente a 2024.26 µM ET g⁻¹); adicionalmente el tiempo y la temperatura tuvieron un efecto significativo en la extracción de estos compuestos, donde la extracción a 90°C, durante 4.5 minutos generó la mayor capacidad antioxidante. Los resultados encontrados indican que hay potencial para aprovechar la pulpa de café, a través de la extracción de compuestos bioactivos con características funcionales, lo que permite, de esta manera hacer un aprovechamiento más integral de esta materia prima.

Roldán, Sánchez-Moreno, De Ancos, Cano, and Novais (2019) caracterizaron diferentes subproductos (zumo, pasta y bagazo) de dos cultivares de cebolla españoles, 'Figueres' y 'Recas', estabilizados mediante técnicas térmicas (congelación, pasteurización y esterilización) para evaluar su potencial uso en la industria alimentaria como ingredientes alimentarios naturales, fuentes de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antipardeamiento enzimático. Determinaron contenido de fenoles totales, quercetina total, actividad antioxidante (DPPH[•]) y el ensayo de inhibición de la enzima polifenol oxidasa (PPO). Los resultados mostraron que el procesamiento de residuos y excedentes de cebollas del cultivar 'Recas' para obtener pasta como subproducto y la estabilización con un tratamiento suave como la pasteurización mostraron las mejores características para el potencial desarrollo de ingredientes alimentarios antioxidantes. La pasta 'Recas' pasteurizada mostró un contenido moderadamente alto en compuestos bioactivos (fenoles totales, 329.77 ± 83.49 mg equivalentes ácido clorogénico (EAC) 100 g⁻¹ materia seca (ms); y quercetina total, 195.17 ± 7.27 mg 100 g⁻¹ ms). Esta pasta mostró ser un 15.21% y un 72.17% más eficaz como secuestradora de radicales libres que el bagazo y que

el zumo 'Recas' pasteurizado, respectivamente. Además, su capacidad inhibitoria sobre la PPO de aguacate fue mayor (53.49%) que la alcanzada por la pasta 'Figueres' pasteurizada (32.82%).

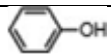
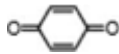
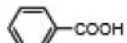
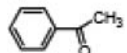
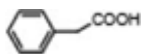
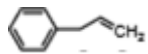
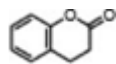
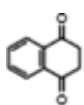
Sumaya-Martínez et al. (2019) evaluaron la actividad antioxidante y la concentración de algunos compuestos bioactivos de los subproductos del despulpado de tres cultivares de mango (Ataulfo, Kent y Keit) en madurez de consumo. Los subproductos obtenidos del despulpado fueron la cáscara, semilla y pulpa adherida a ambos. Realizaron extracciones etanólicas para cada uno de ellos y así determinaron la concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides, mangiferina, ácido ascórbico, carotenoides totales, tocoferoles, actividad antioxidante y actividad quelante. Como resultados, el cultivar Ataulfo presentó la mayor concentración de los compuestos bioactivos: concentración de compuestos fenólicos con 37 mg EAG g⁻¹ de pasta ms; concentración de flavonoides (19.3 mg E. quercetina g⁻¹ de pasta ms); concentración de mangiferina con 5523 µg E mangiferina g⁻¹ de pasta ms; la concentración de ácido ascórbico fue de 0.68 mg E ácido ascórbico g⁻¹ de pasta ms; concentración de carotenoides (494 µg E. β-caroteno g⁻¹ de pasta ms); concentración de tocoferoles con 620 µg E. α-tocoferol g⁻¹ de pasta ms. Para el caso de la actividad antioxidante, en la capacidad de atrapar el radical libre DPPH[•], presentó una actividad antirradical de 244 µmol ET g⁻¹ de pasta ms. Sobre el catión ABTS^{•+} presentó una actividad antirradical de 5.9 mg EVC g⁻¹ de pasta ms. En la reducción del ion Fe (III) a ion Fe (II) mostró una actividad de 64 mg E ácido ascórbico g⁻¹ de pasta ms. Finalmente la actividad quelante fue de 2.9 µmoles EDTA g⁻¹ de pasta ms.

2.2.2 Compuestos fenólicos y antocianinas

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, presentes en plantas y alimentos y bebidas derivados de plantas (Cheynier, 2012). Contribuyen a la calidad organoléptica y nutritiva en términos de aroma, sabor y color (Ferrentino, Asaduzzaman, & Scampicchio, 2016). Muestran una gran diversidad de estructuras, incluyendo moléculas bastante simples (e.g. vainillina, ácido gálico,

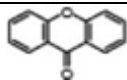
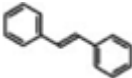
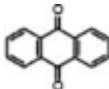
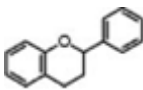
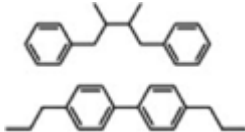
ácido caféico) y polifenoles como los estilbenos, flavonoides y polímeros derivados de estos diversos grupos (Cheynier, 2012). Las principales familias de estos compuestos se pueden observar en el Cuadro 3. Tienen la característica común de poseer al menos un anillo aromático unido a un grupo funcional hidroxilo (Taiz & Zeiger, 2006). Otra característica es que estas sustancias están presentes comúnmente ligadas a otras moléculas, frecuentemente azúcares y proteínas (Reis, 2013). Los compuestos fenólicos forman un grupo químicamente heterogéneo; algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son solubles en agua y otros constituyen polímeros insolubles (Taiz & Zeiger, 2006).

Cuadro 3. Principales familias de compuestos fenólicos.

Número de carbonos	Clases	Estructura base
C ₆	Fenol simple	
	Benzoquinonas	
C ₆ – C ₁	Ácido benzoico	
C ₆ – C ₂	Acetofenonas	
	Ácido fenilacético	
	Ácido cinámico	
C ₆ – C ₃	Fenilpropano	
	Coumarinas	
	Cromonas	
	Naptoquinonas	

Fuente: Garcia-Salas, Morales-Soto, Segura-Carretero, and Fernández-Gutiérrez (2010).

Cuadro 3. Principales familias de compuestos fenólicos (continuación).

Número de carbonos	Clases	Esctructura base
$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas	
$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbencenos	
	Antraquinonas	
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides	
$(C_6 - C_3)_2$	Lignan neolignan	
$(C_6 - C_1)_n$	Taninos hidrolizables	Polímeros heterogeneos compuestos de ácidos fenólicos y azúcares simples
$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas	Polímero aromático altamente reticulado

Fuente: Garcia-Salas et al. (2010).

Las sustancias fenólicas se clasifican en compuestos fenólicos simples y complejos. En los primeros se incluyen a los fenilpropanoides que contienen un sólo anillo bencénico y cadenas laterales de tres carbonos (C_6-C_3) (Özeker, 1999). Los fenilpropanoides son bloques importantes en la construcción de fenólicos más complejos (Taiz & Zeiger, 2006). Un segundo tipo de fenólicos simples lo conforman las fenilpropanoides lactonas que son ésteres cíclicos llamados coumarinas que poseen una estructura (C_6-C_3) y, en tercer lugar, están los derivados del ácido benzoico, que tienen más bien una estructura (C_6-C_1) y que se forman a partir de los fenilpropanoides tras la escisión de un fragmento de la cadena lateral. Muchos compuestos fenólicos simples tienen importantes

roles en la defensa de la planta en contra de insectos herbívoros y hongos. De especial interés es la fototoxicidad de ciertas coumarinas llamadas furanocoumarinas, que son compuestos no tóxicos hasta que se activan a través de la luz, particularmente aquélla del rango ultravioleta (Taiz & Zeiger, 2006).

Entre los compuestos fenólicos complejos está la lignina, que es un componente característico de las paredes celulares secundarias y se forma de numerosas ramificaciones de fenilpropanoides con estructura (C₆-C₃), particularmente integrada por los alcoholes coniferil, coumaril y sinapil. Un segundo grupo de fenólicos complejos es integrado por los flavonoides, que presentan una estructura general (C₆-C₃-C₆), siendo el primero y el tercero anillos aromáticos. Los flavonoides se clasifican en distintos grupos basados principalmente en el grado de oxidación del puente de tres carbonos (C₃). Entre estos grupos resaltan las antocianinas que otorgan el color rojo, púrpura o azul a hojas, flores y frutos. También están los flavonoles que incluyen a la quercetina, kaempferol y miricetina y están presentes en productos como cebolla, cereza, lechuga, arándanos, tomates, manzanas y té verde. También están las flavonas que incluyen la apigenina y la luteolina, presentes en apio y olivas. Asimismo, están las isoflavonas cuyos compuestos característicos son la catequina y la epicatequina, presentes en peras, vino tinto y blanco y en manzana (Gómez-García, 2012).

Los flavonoides están entre los mejores metabolitos secundarios de plantas caracterizados en términos de química, mecanismo de coloración, bioquímica, genética y biología molecular (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008). Las antocianinas son la clase más sobresaliente, debido a la amplia gama de colores resultante de su síntesis (Holton & Cornish, 1995).

Antocianinas

Las antocianinas son derivadas del flavonol, y tienen la estructura básica de ion flavilio, que es la falta de una cetona de oxígeno en la posición 4. La fórmula empírica para el ion flavilio de antocianina es C₁₅H₁₁O⁺ con un peso molecular de

207.24724 g mol⁻¹. Los enlaces conjugados de las antocianinas resultan en los colores rojo, azul y púrpura para las plantas (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017). Por lo tanto, son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de tres carbonos. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Garzón, 2008) (Figura 2) (Cuadro 4).

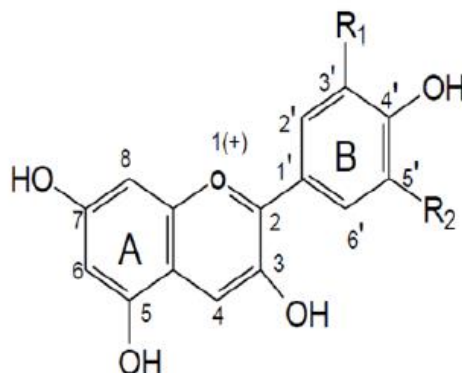


Figura 2. Estructura química de las antocianinas.

Cuadro 4. Sustituyentes de las antocianinas.

Aglicona	Sustitución		λ_{max} (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Fuente: Garzón (2008).

Debido al largo cromóforo de ocho enlaces dobles conjugados que llevan una carga positiva, las antocianinas son intensamente coloreadas bajo condiciones ácidas. La máxima absorción en el rango visible es usualmente entre 465 nm y 550 nm, mientras que la otra banda de absorción máxima cae en el rango UV entre 270 nm y 280 nm (Eder, 2000).

Los grupos hidroxilo en la aglicona pueden ser sustituidos por fracciones de azúcares, que a su vez pueden estar estrechamente vinculadas a otros azúcares a través de enlaces glucosídicos o acilados con ácidos aromáticos o alifáticos orgánicos (ácido cinámico, ácido malónico, ácido acético, entre otros) a través de enlaces éster. Cuando la aglicona (antocianidina) es glucosilada, se conoce como antocianina. Ambas, glicosilación y acilación, afectan las propiedades físicas y químicas de las antocianinas en el sentido de que modifican el tamaño molecular y la polaridad de la molécula. La glicosilación aumenta la solubilidad en agua, mientras que la acilación disminuye la solubilidad en agua (Borkowski, Szymusiak, Gliszczynska-Świgło, & Tyrakowska, 2005).

Color y estabilidad de las antocianinas

El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos (Zapata et al., 2014), además de factores como la temperatura, la luz, iones metálicos, enzimas, oxígeno y antioxidantes (Turturica, Oancea, Rapeanu, & Bahrim, 2015).

Las antocianinas son únicas entre los flavonoides, ya que sus estructuras se someten de forma reversible a transformación dependiente del pH en solución acuosa. Existen cuatro formas principales de antocianinas en equilibrio: el catión flavilio rojo, la base quinoidal azul, la pseudobase carbinol incoloro, y la chalcona incolora (Brouillard & Dubois, 1977). A un pH por debajo de 2, las antocianinas existen predominantemente en la forma de catión flavilio rojo. La hidratación rápida del catión flavilio ocurre en la posición C-2 para generar la pseudobase de carbinol incoloro a valores de pH que van de 3 a 6. Como el color rojo se blanquea en esta transformación, el mecanismo de reacción ha sido ampliamente investigado (He & Giusti, 2010).

Respecto a la temperatura, las antocianinas son menos estables a temperaturas de solución más altas. Tal es el caso de un estudio realizado en uva común, en

donde al aplicarse un tratamiento térmico en un máximo de 35 °C se redujo el total de antocianinas a menos de la mitad de la cantidad en berries con un control a 25 °C (Mori, Goto-Yamamoto, Kitayama, & Hashizume, 2007). A un máximo de 40 °C, el color de las antocianinas cambia de rojo a naranja, aunque el pH de la solución era bajo (West & Mauer, 2013). Por el contrario, el tratamiento térmico de un extracto rico en antocianinas puede no causar una degradación de los pigmentos de antocianinas. Esto se debe a que el extracto comúnmente contiene compuestos fenólicos que son enzimáticamente degradados por polifenol oxidasa (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010).

Antocianinas como pigmento natural

La demanda comercial de pigmentos para colorear alimentos continua incrementando (Cortez, Luna-Vital, Margulis, & Gonzalez de Mejia, 2017). El uso de colorantes naturales y aditivos en el procesamiento de alimentos y bebidas es importante para aumentar la aceptabilidad de estos productos en el consumidor (Khoo et al., 2017). Éstos se pueden utilizar con varios propósitos, incluyendo la estandarización de colores de materias primas, proporcionar identidades de color a alimentos incoloros, y la contabilidad de la pérdida durante el procesamiento o almacenamiento (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017). Los pigmentos de antocianinas son colorantes naturales con baja o ninguna toxicidad. Por lo tanto, de alguna manera son seguros para ser consumidos incluso en dosis más altas en comparación con los colorantes sintéticos (Khoo et al., 2017). Entre sus propiedades se encuentran que son antioxidantes, nutraceuticos y otros beneficios hacia la salud.

El aditivo alimentario E163 es un ejemplo de aditivo comercial derivado de las antocianinas de algunos frutos y sus subproductos como la piel de la uva. Es de color púrpura y se usa principalmente en mermelada, confitería y bebidas. El uso de colorantes a base de antocianinas en una bebida como el yogur mezclado con un poco de jugo de fruta es cada vez más popular (Khoo et al., 2017).

2.2.3 Extracción de antocianinas

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como también en la concentración de antocianinas extraídas. Así, se debe maximizar la recuperación de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos (Zapata et al., 2014).

Para la extracción de antocianinas se encontraron dos procedimientos principales: a) procedimientos que optimizan la extracción para caracterizar e identificar antocianinas, y b) procedimientos que son escalables para ser utilizados en la industria alimentaria. En cuanto al análisis de antocianinas, es necesario tener en cuenta varios parámetros, en particular los disolventes. La característica polar de las moléculas de antocianinas les permite ser extraídos por diferentes solventes polares como acetona, metanol, agua y alcohol. La selección de un solvente adecuado para la extracción es un paso crucial, principalmente porque las antocianinas son moléculas altamente reactivas (Ongkowijoyo, Luna-Vital, & Gonzalez de Mejia, 2018). Otro interesante método de extracción se ha encontrado que es el sistema acuoso en dos fases, el cual consiste en un solvente hidrofílico y una sal inorgánica. Tradicionalmente, los métodos de extracción de antocianinas incluyen el uso de remojo, agitación y extracción asistida por ultrasonido. El creciente interés en el potencial antioxidante de antocianinas conduce a una mayor demanda de un proceso de extracción eficiente: reducción de consumo de solvente, bajo impacto ambiental, alto rendimiento de extracción y tiempos de extracción más cortos (Duan, Jin, Zhao, & Sun, 2015; Garcia-Mendoza et al., 2017). Algunos trabajos de los diferentes métodos de extracción para antocianinas se mencionan a

continuación, comenzando por la extracción con solventes convencionales, posteriormente con fluidos supercríticos y presurizados, finalizando con campos eléctricos pulsantes. Estos métodos también pueden ser asistidos por otras técnicas como lo son el uso de microondas o de ultrasonido.

Extracción por solventes

Barros et al. (2019) evaluaron el efecto de la adición de los ácidos fórmico (88%), acético (99.7%) y ortofosfórico (85%) en el solvente de extracción, que fue una mezcla hidroalcohólica (50 v/v), para ajustar el pH a 1.0, 2.0 y 3.0, en la recuperación de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de la cáscara de jabuticaba. El procedimiento de extracción se realizó en un baño ultrasónico. Los extractos fueron analizados como capacidad antioxidante (ORAC, FRAP), contenido de fenoles totales, contenido monomérico de antocianinas y un análisis cualitativo de fenólicos por cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS). Como resultados obtuvieron que el tipo de solvente (ácido empleado) fue significativo para ORAC y para los ensayos de fenoles totales. El pH aplicado a los extractos fue significativo para FRAP y el contenido fenólico total y la interacción entre el disolvente (ácido empleado) y el pH fue significativo para todos los parámetros, excepto para antocianinas. El tipo de ácido utilizado en el proceso de extracción afectó principalmente a la extracción de antocianinas, ya que los bajos niveles obtenidos de concentración de éstas y los valores de ORAC se encontraron en pH 1.0 con ácido ortofosfórico.

Duan et al. (2015) emplearon una extracción asistida por microondas para extraer las antocianinas de bayberry chino. Utilizaron como disolvente una mezcla de 1% HCl en 95% de etanol. El cromatograma HPLC de los extractos mostró que los componentes estaban ligeramente hidrolizados durante el proceso de extracción. Las condiciones de extracción optimizadas para el contenido total de antocianinas fueron una relación sólido-líquido, temperatura de extracción y tiempo de extracción de 1:50, 80 °C y 15 min, respectivamente. En estas condiciones, el contenido de antocianina fue de 2.95 a 0.08 mg g⁻¹, y el rendimiento de la actividad antioxidante fue de 279.96 a 0.1 µmol g⁻¹ equivalente

de Trolox p.s. Estos resultados indicaron que la extracción asistida por microondas era un método de extracción altamente eficiente con un tiempo de procesamiento reducido. Sin embargo, en algunas condiciones de extracción podría dañar las antocianinas.

Iglesias-Carres et al. (2018) determinaron las mejores condiciones de extracción de polifenoles de uvas rojas enteras, y aplicaron el método de superficie de respuesta para caracterizar y cuantificar la composición de polifenoles de tres uvas diferentes. Las condiciones optimizadas fueron 80 mL g⁻¹, 65% de metanol (1% de ácido fórmico), 72 °C y 100 min bajo agitación de 500 rpm. Además, compararon el metanol y el etanol como disolventes de extracción, en donde el metanol logró tasas de extracción estadísticamente más altas para las antocianinas.

Velasco González de Peredo et al. (2019) evaluaron la eficacia del método asistido por ultrasonido (EAU) para extraer antocianinas y compuestos fenólicos de berries (*Myrtus communis* L.). También evaluaron la influencia de la composición del disolvente, así como el pH, la temperatura, la amplitud del ultrasonido, el ciclo y la relación solvente-muestra en el contenido total de compuestos fenólicos y antocianinas en los extractos obtenidos. Encontraron que la doble interacción de la composición del metanol y el ciclo, la interacción entre la composición y la temperatura del metanol, y la interacción entre el ciclo y la relación solvente-muestra fueron las variables más influyentes en la extracción de compuestos fenólicos totales (92.8% metanol en agua, 0.2 s de ciclo, 60 °C y 10:0.0 mL:g). La composición del metanol y la interacción entre la composición del metanol y el pH fueron las variables más influyentes en la extracción de antocianinas (74.1% de metanol en agua a pH 7).

Vázquez-Espinosa et al. (2019) mediante una extracción asistida por ultrasonido obtuvieron extractos de alta bioactividad a partir de bayas de maqui (*Aristotelia chilensis*). El solvente usado para la extracción fue una mezcla de metanol grado HPLC y agua. Para determinar las condiciones óptimas, las variables de extracción (porcentaje de metanol, pH, temperatura, relación “masa de muestra /

volumen de solvente”, amplitud, y ciclo) fueron analizados por un diseño Box-Behken, junto con el método de superficie de respuesta. El análisis estadístico reveló que la temperatura y el porcentaje de metanol eran las variables más influyentes en la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales, respectivamente.

Extracción por fluidos supercríticos

Batista et al. (2015) realizaron extracciones de acai utilizando CO₂ como fluido supercrítico a densidades de 700, 800 y 900 kg m⁻³ mientras que variaron tres y ocho valores nominales de temperatura y presión, respectivamente. Analizaron los extractos para el contenido total de ácidos grasos y efectos alelopáticos. Además, analizaron la pulpa de baya de acai liofilizada antes y después de la extracción supercrítica de CO₂ para determinar los compuestos fenólicos y el contenido de antocianinas. Respecto al contenido de compuestos fenólicos en las muestras analizadas antes de la extracción fue de 5550 ± 1.03 mg 100 g⁻¹ de muestra. Después de la extracción, este contenido en diferentes condiciones de funcionamiento osciló entre 5457 a 7565 mg 100 g⁻¹ de muestra. Los resultados mostraron un aumento en la concentración de compuestos fenólicos en ocho de nueve muestras. El contenido de antocianinas antes de la extracción fue de 96.58 ± 0.11 mg 100 g⁻¹. Después de la extracción en diferentes condiciones de funcionamiento el contenido osciló entre 96.1 a 137.5 mg 100 g⁻¹ de muestra. Por lo tanto, los resultados mostraron un aumento en la concentración de contenido total de antocianinas en ocho de las nueve muestras. Por lo tanto, establecieron que las muestras obtenidas después de la extracción con CO₂ supercrítico fueron ricas en compuestos fenólicos y antocianinas.

Jiao and Kermanshahi pour (2018) obtuvieron extractos ricos en compuestos de antocianinas a partir de pasta de pulpa de baya haskap utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC CO₂) y agua como co-solvente. Las condiciones de extracción, incluyendo presión, temperatura y cantidad de agua, fueron optimizadas por el diseño de Box-Behnken. El mayor rendimiento total de antocianinas (AT) fue de 52.7% a 45 MPa, 65 °C, 5.4 g de agua a 3.2 g de pasta

de pulpa de baya, 15 min de estática y 20 min de tiempo dinámico. Diferentes combinaciones de agua y etanol como co-solvente no afectaron significativamente el rendimiento de AT. Además, obtuvieron rendimientos similares de extracción de antocianinas en el caso de la pasta de pulpa y el polvo de pupa de baya liofilizada rehidratada, lo que indica que no se requiere pretratamiento de secado por congelación antes de la extracción por scCO₂. Comparado con la extracción convencional, el uso de scCO₂ y agua como co-solvente ofreció una mayor eficiencia de extracción de antocianinas (52.7% frente a 38.3%).

Kazan, Sevimli-Gur, Yesil-Celiktas, and Dunford (2016) estudiaron el efecto de del microondas, solvente presurizado, y técnicas de extracción de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) sobre el contenido de antocianinas de los extractos de agua obtenidos de arándanos enteros secos. Para la extracción con microondas utilizaron tres temperaturas (40, 50, 60 °C), tres potencias (300, 600, 900 W), y tres tiempos de extracción (5, 15, 25 min). Extractos de SC-CO₂ arrastrados con etanol no contenían cantidades detectables de antocianinas. La potencia del microondas no tuvo un efecto significativo en la recuperación de antocianinas. El jugo de arándano que prepararon por homogeneización de frutos frescos seguido de microfiltración tenía el mayor contenido de antocianinas entre los extractos examinados.

Machado, Pereira, Barbero, and Martínez (2017) investigaron la eficiencia de extracción de polifenoles (antocianinas) a partir de residuos de mora, arándano y grumixama utilizando una combinación de extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción de líquido presurizado (ELP). El rendimiento obtenido se comparó con lo logrado por los métodos aislados de ELP y UAE y la extracción convencional Soxhlet. La eficiencia de extracción para antocianinas fue: Soxhlet $\approx$ EAU > EAU + ELP > ELP, usando mezclas hidro-etánolicas como solventes (50 y 70% etanol, v/v) y agua acidificada (pH 2.0 ajustada con ácido cítrico). Indicaron que, aunque Soxhlet logró el mayor rendimiento de antocianinas, fue el método menos selectivo, ya que también extrae carbohidratos, compuestos

hemicelulósicos y lipofílicos, además de que gastó mayor cantidad de disolvente y de tiempo. El método EAU fue el menos agresivo para la recuperación de antocianinas totales e individuales.

Monroy, Rodrigues, Sartoratto, and Cabral (2016) obtuvieron extractos de mazorca de maíz púrpura, grano entero, grano molido y pericarpio mediante la tecnología de fluidos supercríticos en un lecho fijo a 50 °C y 400 bar en un proceso de extracción secuencial utilizando dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) como disolvente en el primer paso, etanol en un segundo paso, y el agua en un tercer paso, con el fin de determinar la composición de los extractos. Las matrices con mayor rendimiento fueron la mazorca de maíz y pericarpio. La extracción acuosa presentó el mejor rendimiento de masa general, mayor rendimiento de los componentes monitoreados analíticamente, y mayor actividad antioxidante, mientras que los extractos de etanol se concentraron más sólo en antocianinas.

Extracción por campos eléctricos pulsantes

Gagneten, Leiva, Salvatori, Schebor, and Olaiz (2019) emplearon campos eléctricos pulsantes (CEP) para mejorar la extracción de compuestos bioactivos de grosella negra. Realizaron un diseño experimental para encontrar las mejores condiciones de CEP utilizando el enfoque de conveniencia y la metodología de superficie de respuesta. Analizaron el efecto de la fuerza del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento sobre el contenido polifenólico total (CFT) y la actividad antioxidante (AA). Encontraron que las condiciones óptimas de tratamiento fueron de 1318 V cm⁻¹ y 315 pulsos, e incrementos de 19, 45 y 6% para CFT, AA y antocianinas monoméricas totales, respectivamente.

Medina-Meza, Boioli, and Barbosa-Cánovas (2016) evaluaron el impacto de los campos eléctricos pulsantes (CEP) en continuo, ultrasonificación (EE.UU.), y métodos combinados aplicados a frambuesa roja (*Rubus strigosus*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) para evaluar sus efectos sobre la calidad nutricional y reología. Observaron una alta recuperación de biocompuestos, con una

extracción significativa ($p < 0.01$) de flavonoides (20%) y antocianinas (30%) en purees de frambuesa y arándano, respectivamente.

Pataro et al. (2017) aplicaron tratamientos de campo eléctrico pulsante (CEP) ($1 - 10 \text{ kJ kg}^{-1}$ a 3 kV cm^{-1}) antes de prensar frutos de arándanos para mejorar el rendimiento y la calidad del jugo expresado, así como la recuperación de antocianinas de subproductos de arándanos (torta prensada) mediante extracción sólido-líquido. Encontraron que una entrada de energía mayor (10 kJ kg^{-1}) fue más favorable para el mayor incremento de contenido de antocianina (55%). Los extractos obtenidos de la torta prensada de arándanos tratados con CEP a 10 kJ kg^{-1} poseían un contenido de antocianina de 75%. Además, realizaron análisis por HPLC y revelaron las principales clases de antocianinas detectadas como glucósidos de delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, sin degradación significativa de antocianinas individuales debido a la aplicación de CEP.

Siddeeg et al. (2019) observaron la influencia del campo eléctrico pulsante (CEP) en la extracción de componentes bioactivos; actividad antioxidante y propiedades fisicoquímicas del extracto de fruta de palma datilera (EFPD) en comparación con el extracto no tratado por CEP. El fruto fue tratado con CEP (frecuencia: 10 Hz, tiempo: 100 s, número de pulso: 30, intensidad de campo eléctrico (ICE): 1, 2 y 3 kV cm^{-1}). Los resultados que obtuvieron muestran que el CEP tiene un impacto positivo en el contenido total de carotenoides, antocianinas, flavonoides y fenólicos al aumentar la ICE. EFPD tratado con CEP exhiben una fuerte actividad antioxidante en comparación con el extracto no tratado, mientras que la conductividad eléctrica, los valores de pH y la acidez titulable no fueron afectadas por el CEP. Encontraron que el tratamiento con CEP puede ayudar a la extracción etanólica de EFPD para mejorar la bioactividad y la actividad antioxidante.

Zhou, Zhao, and Huang (2015) extrajeron antocianinas de subproductos del procesamiento de arándanos (SPA) por campo eléctrico pulsante. Para ello emplearon una metodología de superficie de respuesta para optimizar las condiciones del rendimiento de extracción de antocianinas (REA) de SPA, y

establecieron un modelo matemático de regresión para describir los datos experimentales para REA. Los parámetros optimizados de extracción de antocianinas fueron de disolvente de 60% de etanol (acidificado con ácido clorhídrico 0.1% [v/v]) relación líquido-líquido de 1:6 (mL/mL), número de pulso de 10 ea y fuerza de campo eléctrico de 20 Kv cm⁻¹. La cantidad extraída de antocianinas alcanzó 223.13 mg L⁻¹ de SPA. En comparación con la extracción por ultrasonido, el tratamiento de campo eléctrico pulsante aumentó el REA a una temperatura de extracción más baja y en un tiempo de extracción más corto.

2.3 Método de extracción acuosa en dos fases

Un sistema de extracción acuosa en dos fases (ATPE por sus siglas en inglés) es una técnica que ha demostrado tener potencial para la recuperación primaria de compuestos biológicos (Benavides & Rito-Palomares, 2008). Un sistema ATPE consiste de dos polímeros solubles en agua, un polímero y una sal (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar, & Ramesh, 2011) o un solvente orgánico y una sal (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019), que en cierta combinación de concentraciones producen una mezcla en una sola fase acuosa, pero en otras producen la separación de dos fases inmiscibles, una superior y otra inferior, entre las cuales se reparten las biomoléculas en un proceso de separación (Raja et al., 2011) (Figura 3).

Existen ATPEs polímero –polímero (polietilenglicol (PEG) – dextrano, PEG – polivinil alcohol, etc.), sin embargo, el uso de dichos sistemas está limitado por los costos de algunos polímeros (principalmente dextrano) (Benavides & Rito-Palomares, 2008). El polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular se cuenta entre los polímeros más utilizados y el sulfato de amonio, el citrato de sodio y el sulfato de magnesio entre las sales más usadas (Li & Beitle, 2002; Naganagouda & Mulimani, 2008). Adicionalmente, la mezcla se puede complementar con sales neutras, como el NaCl, que modifican el equilibrio entre las fases formadas y mejoran la separación (Asenjo & Andrews, 2012). En el caso de los compuestos fenólicos, además del tipo de sistema mencionado, también se han usado mezclas basadas en acetona y sulfato de amonio para la extracción (Dang,

Zhang, & Xiu, 2014) y acetona con citrato de sodio (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019).

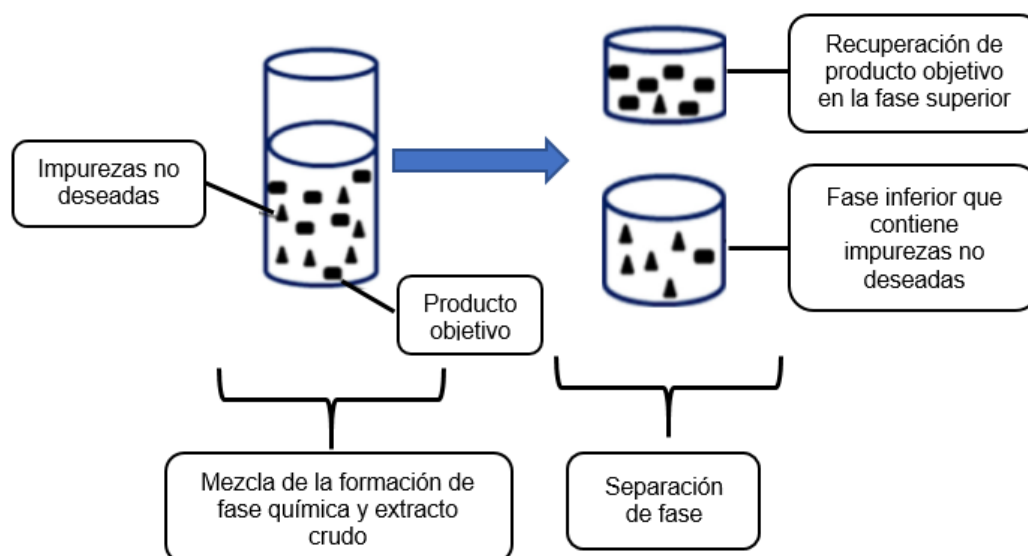


Figura 3. Esquema de la recuperación del producto objetivo basado en el concepto ATPE (Phong, Show, Chow, & Ling, 2018).

Entre las principales ventajas que ofrece esta técnica de recuperación se encuentra: a) su alta eficiencia, b) factibilidad de escalamiento, c) bajos costos de inversión y operación, y d) generalmente permiten la recuperación y purificación de compuestos biológicos en su forma nativa, lo cual es de gran valor, ya que al conservar la estructura se conserva al mismo tiempo la función específica de los mismos (Benavides & Rito-Palomares, 2008).

Los sistemas ATPE han probado ser útiles para separar distintos tipos de biomoléculas entre las cuales están pigmentos como betalaínas (Chandrasekhar, Sonika, Madhusudhan, & Raghavarao, 2015b; Chethana, Nayak, & Raghavarao, 2007; Jampani, Sonika, Madhusudhan, & Raghavarao, 2015), y antocianinas (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015a)

2.3.1 Aplicación de ATPE para la extracción y recuperación de antocianinas

La separación y la determinación de compuestos fenólicos totales e individuales, como es el caso de antocianinas mediante el método de extracción acuosa en dos fases (ATPE) se ha venido estudiando durante los últimos 14 años, obteniendo buenos resultados. Un resumen de ello se muestra en el Cuadro 4.

El etanol (C_2H_5OH) destaca en la mayoría de los sistemas presentados como componente de la fase superior. Esto puede ser debido a la polaridad de las antocianinas, donde éstas tienen mayor afinidad a solventes orgánicos. Sin embargo, otras investigaciones emplearon el uso de polímeros tales como polietilenglicol (PEG) a diferentes pesos moleculares, destacando entre ellos por la obtención de resultados favorables, el PEG 4000. También utilizaron mezclas un tanto no estudiadas como L44 e iones líquidos como el 1-etil-3-metilimidazolium acetato ($[C_2min]OAc$).

En lo que respecta al componente de la fase inferior, en su mayoría utilizaron sales, siendo el sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) la sal más utilizada para la realización de los sistemas. Solo un trabajo aplicó un polímero (dextrano) en la formación de un sistema polímero/polímero. Cada uno de los trabajos resumidos en el Cuadro 4 se detallan a continuación.

Edahiro et al. (2005) investigaron en dos líneas de células de fresa cultivadas (designadas FAW y FAR) que producen antocianinas, el uso de un experimento de partición temporal de células vegetales cultivadas utilizando un ATPS. También investigaron el efecto de iones adicionales en el comportamiento de la partición celular, además de la relación entre el comportamiento de partición de las células en un sistema de dos fases (ATPS) y su metabolismo secundario intracelular. Lo anterior fue con el objetivo de establecer un método de selección rápido y sencillo de células de alto rendimiento para establecer líneas celulares altamente productivas para metabolitos secundarios útiles. La mezcla de ATPS fue de poli(etilenglicol) (4.4% PEG 6000)/dextrano (7% T500). Como resultado de la partición de un solo paso en el ATPS complementado con 0.4 mmol kg^{-1} de

sulfato de litio, mostró que las células FAW cultivadas para 7d bajo irradiación de luz estaban separadas en dos poblaciones celulares con un contenido de antocianina significativamente diferente. Además, el análisis técnico de imágenes celulares microscópicas mostró que las células que acumulan un alto nivel de antocianina fueron particionadas completamente en la fase inferior en un experimento de partición celular de FAW cultivadas 10 d bajo irradiación de luz en el ATPS completado con 1.8 mmol kg^{-1} de buffer de fosfato potasio. Las células FAR por otro lado se ubicaron en la fase superior. Estos resultados indicaron que la partición celular en ATPS incrementó el contenido de antocianina intracelular y que la población de células de fresa cultivadas era heterogénea en términos de las propiedades de la superficie celular. Por lo tanto, con los resultados obtenidos sugieren que la técnica de ATPS fue apropiada como un método a gran escala para seleccionar líneas celulares útiles entre las células de la planta cultivada.

Wu et al. (2011) estudiaron la extracción acuosa en dos fases (ATPE) utilizando una mezcla de etanol/sulfato de amonio y evaluando la identificación y la actividad antioxidante de las antocianinas de moras (*Morus atropurpurea* Roxb.) (MAY). Para obtener las condiciones óptimas de extracción, investigaron los efectos del sulfato de amonio en la partición diferencial de MAY y azúcares en ATPS (a un 30% fijo (p/p) concentración de etanol y una concentración del 10% (p/p) de jugo de mora a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sin ajuste de pH, con diferentes cantidades de sulfato de amonio (concentración final del 12.5% al 20.5% (p/p)). De igual manera estudiaron los ATPS con concentraciones variadas de etanol (concentración final del 20% al 30% (p/p)), bajo otras condiciones constantes, para investigar la influencia de la concentración de etanol en los comportamientos de partición. Otros parámetros que estudiaron con ATPS fueron que la concentración de la muestra se probó de 5% a 20% (p/p), la temperatura en el rango de $25\text{-}50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pH lo probaron en el rango de 1-5. Mediante un diagrama de fase del sistema, determinaron la proporción adecuada de composición de fase. En sus resultados obtuvieron una partición diferencial óptima de antocianinas de moras y azúcares con un sistema (pH 4.5, temperatura = $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) compuesto de 30% (p/p) etanol,

concentración del 20% (p/p) de sulfato de amonio, 10% (p/p) jugo de mora y 40% (p/p) de agua: contenido inicial de azúcares totales fue de $6787.0 \pm 143.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (expresados como equivalentes de glucosa) y antocianinas totales fue de $203.3 \pm 25.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (expresados como equivalentes de cianidina-3-glucósido) D. Al aplicar partición múltiple, determinaron que con un solo paso de ATPE se podía aislar la mayoría de antocianinas, mientras que eliminaba cerca del 90% de los azúcares libres.

Liu, Mu, Sun, Zhang, and Chen (2013), mediante el método ATPE, extrajeron antocianinas de papas moradas dulces utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando una mezcla formada por etanol y sulfato de amonio. Como resultados obtuvieron que las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas fueron: 45:1 (mL g^{-1}) relación líquido-sólido en la fase superior del sistema, 25% (P/P) etanol, 22% (P/P) concentración de sulfato de amonio y pH 3.3; el rendimiento de antocianina y el coeficiente de partición bajo esas óptimas condiciones fueron 90.02% y 19.62, respectivamente.

Wu et al. (2014) emplearon la extracción acuosa en dos fases (ATPE) para la extracción y purificación preliminar de antocianinas en jugo de uva (AU) con el sistema compuesto de etanol + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ mediante un diagrama de fases. Las influencias de factores tales como el tipo y la concentración de sal, la concentración de alcohol y la cantidad de jugo de uva, tiempo de extracción, pH del sistema y temperatura se investigaron para obtener las condiciones óptimas de extracción. Por lo tanto, los resultados óptimos que obtuvieron fueron para la mezcla etanol/ NaH_2PO_4 : fosfato dihidrógeno de sodio (NaH_2PO_4) concentración 28% (p/p), concentración de etanol 25% (p/p), la cantidad de jugo de uva de 1 mL, temperatura 298.15 K, tiempo 1 h y sin ajuste del pH. En lo que respecta a la recuperación relativa y absoluta de AU bajo las condiciones óptimas en la fase superior alcanzó el 99.35% y el 99.26% en un solo paso, respectivamente, mientras que la tasa de eliminación de azúcar alcanzó el 75.08%. Al aplicar el procedimiento multietapa y escalamiento

obtuvieron que las AU podrían permanecer por encima del 90% y eliminar más del 90% de azúcares después de una extracción continua durante dos veces.

Chandrasekhar and Raghavarao (2015a) emplearon la extracción acuosa en dos fases (ATPE) como método alternativo para el procesamiento posterior de antocianinas en col morada (*Brassica oleracea* L.). Optimizaron el efecto de parámetros de proceso como la sal de formación de fase, el peso molecular del polímero de formación de fase, la longitud de la línea de operación y la relación de volumen de fase en la partición diferencial de antocianinas y azúcares en fases opuestas durante ATPE y por último llevaron a cabo ATPE multietapa para la máxima eliminación de azúcares para aumentar la pureza de las antocianinas. Como polímero utilizaron polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares (1000, 4000, 6000, 8000, 20000 Daltons) y las sales fueron fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y sulfato de sodio. Encontraron que el PEG 4000/sulfato de magnesio (14.8%/10.3% p/p) fue el sistema más adecuado. La longitud de la línea de operación del 32.61% y la relación de volumen de 0.73 dieron lugar a la partición máxima de antocianinas a la fase rica en PEG (rendimiento = 98.19%) y azúcares a la fase rica en sal (rendimiento = 73.16%). ATPE multietapa dio lugar a un aumento en la remoción de azúcares (cerca de 96.5%) con un rendimiento del 91.9% de antocianinas.

Chandrasekhar and Raghavarao (2015a) integraron ATPE con procesos de membrana como la destilación de membrana osmótica (DMO) y la ósmosis directa (OD) para la concentración de antocianinas de col morada (*Brassica oleracea* L.). Además, de la comparación de estos procesos integrados con un proceso de membrana integrado (que implica ultrafiltración seguida de OD) y método convencional (evaporación térmica). Para el ATPE utilizaron PEG 4000 (14.8% p/p) y sulfato de magnesio (10.3% p/p) los cuales fueron añadidos al extracto crudo de antocianinas (74.9% p/p) haciendo el peso total del sistema 100% sobre la base de p/p. Llevaron a cabo la separación y analizaron antocianinas y azúcares. También realizaron multietapa de ATPE. Como resultados obtuvieron que la concentración más alta de antocianinas (3123.45 mg L⁻¹) fue con la

integración de ATPE con ósmosis directa, al igual que la estabilidad de las antocianinas (con respecto al pH y la temperatura).

Chandrasekhar and Raghavarao (2015b) estandarizaron el proceso de parámetros tales como la formación de sal en la formación de fase, el peso molecular del polímero de formación de fase, la longitud de la línea de operación y la relación de volumen de fase con el fin de maximizar la partición diferencial de antocianinas y azúcares en fases opuestas durante la extracción acuosa en dos fases (ATPE). También integraron el ATPE con procesos de membrana como destilación de membrana osmótica (DMO) y ósmosis directa (OD) con el fin de concentrar las antocianinas purificadas de jamun. Finalmente compararon estos procesos integrados con un proceso de membrana integrado (ultrafiltración seguida de OD) y un método convencional (evaporación térmica). Para ello emplearon diferentes sales tales como cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro de sodio (NaCl), fosfato de potasio (K_2HPO_4), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sulfato de magnesio (MgSO_4) y sulfato de sodio (NaSO_4). Como polímero utilizaron polietilenglicol (PEG) de diferentes daltons (2000, 4000, 6000 y 8000 Da). De acuerdo a diagramas reportados en la literatura, pesaron cantidades de polímero y sal y lo agregaron al extracto crudo de antocianinas de jamu, haciendo que el peso total del sistema sea 100% p/p. Como resultados encontraron que el PEG 6000/sulfato de magnesio (16.0/10.9% p/p) fue el sistema más adecuado para la partición diferencial efectiva de antocianinas y azúcares. La longitud de la línea de operación del 34.26% y la relación de volumen de 0.76 dieron como resultado la partición máxima de antocianinas en la fase rica en PEG (superior) (rendimiento ~100%) y azúcares en la fase rica en sal (inferior) (rendimiento – 72.9%). El ATPE multietapa resultó en un aumento de la eliminación de azúcares (alrededor del 96.1%) con un rendimiento del 91.9% de antocianinas en la fase rica en PEG. La integración de ATPE con procesos de membrana como DMO y OD dio lugar a un aumento en la concentración de antocianinas de 430.1 mg L^{-1} (7.8 °Brix) a 790.3 mg L^{-1} (21 °Brix) y 2890.3 mg L^{-1} (40 °Brix), respectivamente. En la evaluación de las propiedades de los colorantes confirmaron que las antocianinas extraídas y

concentradas empleando ATPE seguido de procesos de membrana (OD y DMO) son estables.

Lima, Soares, Paltram, Halbwirth, and Bica (2017) presentaron una estrategia para la extracción y purificación consecutiva de antocianinas de orujo de uva utilizando soluciones líquidas iónicas que dependen de la extracción de líquido iónico acuoso y una separación simplificada utilizando ATPS. Optimizaron varios parámetros de la extracción sólido-líquido y ajustaron los modelos para una extracción cinética. Además, encontraron las mejores condiciones operativas para obtener el factor de purificación más alto de antocianinas totales en ATPS, permitiendo su separación de flavonoides contaminantes. Utilizaron como líquido iónico 1-etil-3-metilimidazolium acetato ([C₂min]OAc). Para el sistema ATPS emplearon como sales carbonato de potasio (K₂CO₃) (≥ 98%) y fosfato de potasio (K₃PO₄). Determinaron las curvas binodales mediante el método de punto de turbidez y fueron correlacionadas usando la ecuación de Merchuk. Las condiciones óptimas para la extracción de sólidos/líquidos las obtuvieron utilizando metodología de superficie de respuesta y produjeron hasta 3.58 mg de antocianinas g⁻¹. Durante la formación de ATPS, la partición de antocianinas tuvo preferencia hacia la fase superior (fase rica en líquidos iónicos) y el factor de purificación (PF = 16.2 veces) se obtuvo en la fase inferior y rica en sal utilizando K₂CO₃ (29.41% tm) y [C₂min]OAc (29.28% mt) a 35 °C y presión atmosférica. El proceso de partición es exotérmico, espontáneo y gobernado por fuerzas de entalpía.

Qin et al. (2017) utilizaron un método eficiente de extracción acuosa en dos fases asistido por ultrasonido para la extracción de antocianinas de *Lycium ruthenicum* Murr. Emplearon un sistema de etanol/sulfato de amonio. Las concentraciones apropiadas de sal y alcohol fueron elegidas de acuerdo a un diagrama de fase. Determinaron la composición optimizada del sistema y de la extracción acuosa en dos fases asistida por ultrasonido. Las condiciones óptimas fueron las siguientes: una concentración de sal de 20%, una concentración de etanol de 25%, un tiempo de extracción de 33.7 min, una temperatura de extracción de 25

°C, una relación líquido/sólido de 50:1 p/p, un valor de pH de 3.98 y una potencia de ultrasonido de 600 W. En las condiciones anteriores, el rendimiento de antocianinas alcanzó 4.71 mg g⁻¹ de muestra seca. Para la purificación posterior, utilizaron resina D-101, y la pureza de las antocianinas alcanzó el 25.3%. Como conclusión establecieron que la combinación de ATPE y la extracción con ultrasonido fue un eficiente, ecológico y barato.

Sang et al. (2017) investigaron los comportamientos de partición de varias antocianinas polares en NaH₂PO₄/(NH₄)₂SO₄ etanol en sistema acuoso de dos fases (ATPS) y extrajeron antocianinas de *Nitraria tangutorun* Bobr. y *Lycium ruthenicum* Murr. De acuerdo con el diagrama de fase de NaH₂PO₄/(NH₄)₂SO₄ etanol, ATPS con diferentes concentraciones de sal y etanol se utilizaron para extraer antocianinas de los materiales vegetales a 25 °C durante 30 min. Como resultados obtuvieron que el coeficiente de partición de antocianinas aumentó con un aumento de la hidrofobicidad, y la baja polaridad exhibió una preferencia más alta para la fase superior en NaH₂PO₄/(NH₄)₂SO₄ etanol ATPS. Además, el NaH₂PO₄/(NH₄)₂SO₄ etanol ATPS dio mayor selectividad y rendimiento total de antocianinas que sistema (NH₄)₂SO₄ etanol. La extracción a 65 °C durante 45 min y a 45.5 °C durante 45 min utilizando un 28% de NaH₂PO₄ y 26% de etanol (p/p) llevó a la recuperación de 98.91 ± 0.03% de antocianinas de *N. tangutorun* (3.62 ± 0.05 mg g⁻¹) y 99.84 ± 0.01% de antocianinas de *L. ruthenicum* (13.16 ± 0.29 mg g⁻¹) de materia prima; más de 70% de los azúcares totales se eliminaron en un solo paso.

Tang et al. (2017) utilizaron L44 y NaH₂PO₄ para extraer y separar antocianinas principalmente del jugo de uva. Discutieron los efectos de la concentración de L44 y NaH₂PO₄, la temperatura y el pH en la extracción de antocianinas. En sus resultados muestran que cuando la concentración de L44 aumentó del 15 al 26%, la tasa de extracción de antocianinas (*Y1*) aumentó del 69.5 al 99%. Los coeficientes de distribución de antocianinas (*K1*) aumentaron rápidamente de 3.7 a 74 en la fase superior con el aumento de la concentración de L44. Por lo tanto, la alta concentración de L44 fue beneficiosa para la transferencia de antocianinas

a la fase superior. De igual manera, a medida que incrementó la concentración de NaH_2PO_4 , $Y1$ aumentó levemente del 99 al 99.7%, mientras que $K1$ aumentó de 74 a 541 en la fase superior. En el efecto del pH en el rango entre 1 y 5, $Y1$ y $K1$ aumentaron ligeramente con el valor de pH de 1 a 3 y luego disminuyeron significativamente de 3 a 5. Finalmente, el efecto de la temperatura que fue de 0 a 30 °C, la tasa de extracción de antocianinas aumentó ligeramente con el aumento de la temperatura (98%).

Yin, Jia, Wang, and Wang (2017) extrajeron antocianinas como colorante natural de polvo de papa morada a través de un sistema de dos fases de sulfato de amonio/etanol asistido por ultrasonido. El experimento lo basaron sobre la extracción de un solo factor, por lo que emplearon la metodología del diseño de superficie de respuesta para optimizar el sistema acuoso de dos fases asistido por ultrasonido que extrae a condiciones que incluyen la temperatura de ultrasonido, tiempo de ultrasonido y la dosificación de polvo de papa morada. Como resultados encontraron que el modelo binomial fue muy significativo y se aplicó para ajustarse a los datos experimentales, debido a su mayor coeficiente relacionado. A través de la optimización, una dosis de 1.60 g de polvo de papa morada se dispersó en el baño de ultrasonido a 52.48 °C durante 48.19 min. En el caso de las condiciones de extracción, 191.09 mg L⁻¹ de colorante natural de antocianina se produjo en la fase superior rica de etanol del sistema acoso en dos fases.

Nainegali, Iyyaswami, and Belur (2019) estudiaron la extracción simultánea de los compuestos bioactivos, entre ellos las antocianinas, de la fruta *Garnicia indica* mediante el empleo de agua, agua acidificada y una mezcla acuosa de etanol y propanol como disolventes y posterior enriquecimiento mediante sistemas acuosos de dos fases (ATPS). Encontraron que el 1-propanol acuoso (60% (v/v)) y etanol acuoso (80% (v/v)) fue el disolvente superior para extraer antocianinas en comparación con el agua acidificada y el agua solo como disolventes. El extracto crudo fue sometido a PEG-sal y alcohol-sal a base de extracción acuosa en dos fases (ATPE) para el enriquecimiento simultáneo de antocianinas hacia

la fase inferior. EL ATPS que contenía etanol y sulfato de amonio con TLL de 38.60-43.28% fue el adecuado para enriquecer 86.33% de las antocianinas en la fase inferior.

Cuadro 5. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de antocianinas.

Material vegetal	Sistema ATPE	Compuesto a recuperar	Fase de recuperación	Uso DF	Referencia
Células de fresa cultivadas	PEG ₆₀₀₀ / dextrano T ₅₀₀	Antocianinas de células FAW	Superior	No	Edahiro et al. (2005)
		Antocianinas de células FAR	Inferior		
Moras (<i>Morus atropurpurea</i> Roxb.)	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	Si	X. Wu et al. (2011)
Papas moradas dulces (<i>Ipomoea batatas</i> Lam)	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	No	Liu et al. (2013)
Jugo de uva	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄ , NaH ₂ PO ₄	Antocianinas	Superior	Si	Y. Wu et al. (2014)
Col morada (<i>Brassica oleracea</i> L.)	PEG _{1000, 4000, 6000, 8000, 20000} / Na ₂ SO ₄ , Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , K ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄	Antocianinas	Superior	No	Chandrasekhar and Raghavarao (2015a)

DF: Diagrama de Fase

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 5. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de antocianinas (Continuación).

Material vegetal	Sistema ATPE	Compuesto a recuperar	Fase de recuperación	Uso DF	Referencia
Col morada (<i>Brassica oleracea</i> L.)	PEG ₄₀₀₀ / MgSO ₄	Antocianinas	Superior	No	Chandrasekhar and Raghavarao (2015a)
Jamun	PEG _{2000, 4000, 6000, 8000} / CaCl ₂ .2H ₂ O, NaCl, K ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , NaSO ₄	Antocianinas	Superior	No	Chandrasekhar and Raghavarao (2015b)
Orujo de uva	1-etil-3-metilimidazolium acetato ([C ₂ min]OAc) / K ₂ CO ₃ , K ₃ PO ₄	Antocianinas	Superior	Si	Lima et al. (2017)
<i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	Si	Qin et al. (2017)
<i>Nitraria tangutorun</i> Bobr. y <i>Lycium ruthenicum</i> Murr	C ₂ H ₅ OH / NaH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	Si	Sang et al. (2017)
Jugo de uva	L44 / NaH ₂ PO ₄	Antocianinas	Superior	No	Tang et al. (2017)
Papa morada dulce	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	No	Yin et al. (2017)
<i>Garcinia indica</i>	C ₂ H ₅ OH / (NH ₄) ₂ SO ₄	Antocianinas	Superior	Si	Nainegali et al. (2019)

DF: Diagrama de Fase

Fuente: Elaboración propia

2.4 Literatura citada

- Al-Sayed, H. M. A., & Ahmed, A. R. (2013). Utilization of watermelon rinds and sharlyn melon peels as a natural source of dietary fiber and antioxidants in cake. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), 83-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.01.012>
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, 1238, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., . . . González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10, 41-53.
- Barreto, W. P. (2014). *Actividad antioxidante de los residuos del aguacate Hass (Persea americana Mill. var Hass) sometidos a extracciones clásicas y a fluidos presurizados*. Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Barros, H. D. F. Q., Baseggio, A. M., Angolini, C. F. F., Pastore, G. M., Cazarin, C. B. B., & Marostica-Junior, M. R. (2019). Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International*, 124, 16-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.010>
- Batista, C., Oliveira, M., Araújo, M., Rodrigues, A., S. Botelho, J. R., Filho, A., . . . Carvalho Junior, R. (2015). Supercritical CO₂ extraction of açaí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the

- residual pulp. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107. doi: 10.1016/j.supflu.2015.10.006
- Bello-Lara, J. E., Balois-Morales, R., Sumaya-Martínez, M. T., Juárez-López, P., Jiménez-Ruíz, E. I., Sánchez-Herrera, L. M., & García-Paredes, J. D. (2016). Biopolímeros de mucílago, pectina de nopalitos y quitosano, como recubrimientos en almacenamiento y vida de anaquel de frutos de aguacate 'Hass'. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 2, 43-50.
- Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2008). Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol-sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. *Revista mexicana de ingeniería química*, 7, 99-111.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świgło, A., & Tyrakowska, B. (2005). The effect of 3-O- β -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Research International*, 38, 1031-1037. doi: 10.1016/j.foodres.2005.02.020
- Brouillard, R., & Dubois, J.-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364. doi: 10.1021/ja00447a012
- Casas-Godoy, L., & Sandoval-Fabián, G. C. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Revista digital universitaria UNAM*, 15, 15.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198. doi: 10.1111/1541-4337.12244
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Woolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 287-294. doi: https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008
- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015a). Process integration for purification and concentration of red cabbage (*Brassica oleracea* L.) anthocyanins. *Separation and Purification Technology*, 141, 10-16. doi: https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.11.024
- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015b). Separation and Concentration of Anthocyanins from Jamun: An Integrated Process. *Chemical Engineering Communications*, 202(10), 1368-1379. doi: 10.1080/00986445.2014.935351
- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015a). Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology* 151, 57–65.
- Chandrasekhar, J., Sonika, G., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015b). Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins

- employing aqueous two phase extraction. *Journal of Food Engineering* 144, 156-163.
- Chantaro, P., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2008). Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1987-1994. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.013>
- Chethana, S., Nayak, C. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 679-687. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021>
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11. doi: 10.1007/s11101-012-9242-8
- Dang, Y. Y., Zhang, H., & Xiu, Z. L. (2014). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Journal of Chemical and Technological Biotechnology*, 89, 1576–1581.
- Devia Pineda, J. E., & Saldarriaga, D. F. (2012). Proceso para obtener colorante a partir de la semilla del aguacate. [Aguacate; Colorante natural; Antocianinas; Planta piloto; Proceso]. 2012, 41(137), 8.
- Domínguez Rios, B. (2014). *Proceso de maduración y calidad de fruto de aguacate cv. Carmen Hass*. Maestría, Colegio de Postgraduados Campus Montecillos.
- Duan, W., Jin, S., Zhao, G., & Sun, P. (2015). Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability. *Food Science and Technology*, 35, 524-530.
- Edahiro, J.-i., Yamada, M., Seike, S., Kakigi, Y., Miyanaga, K., Nakamura, M., . . . Seki, M. (2005). Separation of cultured strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two-phase system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 449-454. doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.449>
- Eder, R. (2000). Pigments. In L. Nollet (Ed.), *Food Analysis by HPLC* (pp. 845-880). Monticello, NY: Marcel Dekker.
- FAO. (2012). Producción por región., from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Ferrentino, G., Asaduzzaman, M., & Scampicchio, M. (2016). Current technologies and new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 00-00. doi: 10.1080/10408398.2016.1180589
- Gagneten, M., Leiva, G., Salvatori, D., Schebor, C., & Olaiz, N. (2019). Optimization of Pulsed Electric Field Treatment for the Extraction of Bioactive Compounds from Blackcurrant. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 12(7), 1102-1109. doi: 10.1007/s11947-019-02283-1

- Garcia-Mendoza, M. d. P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8813-8826.
- Garzón, G. A. (2008). LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.
- Gómez-García, R. (2012). Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos. *Cienciaviva*, 31, 2-5.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163-187. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100754
- Holton, T. A., & Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1071.
- Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Sancho-Pardo, L., Bravo, F. I., Mulero, M., Muguerza, B., & Arola-Arnal, A. (2018). Optimized Extraction by Response Surface Methodology Used for the Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Whole Red Grapes (*Vitis vinifera*). *Nutrients*, 10(12), 1931.
- Jampani, C., Sonika, G., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins employing aqueous two phase extraction. *Journal of Food Engineering*, 144, 156-163. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.018>
- Jiao, G., & Kermanshahi pour, A. (2018). Extraction of anthocyanins from haskap berry pulp using supercritical carbon dioxide: Influence of co-solvent composition and pretreatment. *LWT*, 98, 237-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.042>
- Kaur, D., Wani, A. A., Singh, D. P., & Sogi, D. S. (2011). Shelf Life Enhancement of Butter, Ice-Cream, and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties*, 14(6), 1217-1231. doi: 10.1080/10942911003637335
- Kazan, A., Sevimli-Gur, C., Yesil-Celiktas, O., & Dunford, N. T. (2016). Investigating anthocyanin contents and in vitro tumor suppression properties of blueberry extracts prepared by various processes. [journal article]. *European Food Research and Technology*, 242(5), 693-701. doi: 10.1007/s00217-015-2577-9

- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61, 1-21.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., . . . Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00995-0
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., & Etherton, T. D. (2004). BIOACTIVE COMPOUNDS IN NUTRITION AND HEALTH-RESEARCH METHODOLOGIES FOR ESTABLISHING BIOLOGICAL FUNCTION: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 511-538. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073237
- Li, Y., & Beitle, R. R. (2002). Protein purification via aqueous two-phase extraction (ATPE) and immobilized metal affinity chromatography. Effectiveness of salt addition to enhance selectivity and yield of GFPuv. *Biotechnology Progress* 18, 1054-1059.
- Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 451, 68-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006>
- Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Chen, J. (2013). Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry*, 141(3), 3034-3041. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.119>
- Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.060>
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64-68. doi: [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Medina-Meza, I. G., Boioli, P., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Assessment of the Effects of Ultrasonics and Pulsed Electric Fields on Nutritional and Rheological Properties of Raspberry and Blueberry Purees. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 9(3), 520-531. doi: 10.1007/s11947-015-1642-5
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., & Cabral, F. A. (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using

- supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 250-259. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.020>
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of experimental botany*, 58, 1935-1945. doi: 10.1093/jxb/erm055
- Naganagouda, K., & Mulimani, V. H. (2008). Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α-galactosidase. *Process Biochemistry* 43, 1293–1299.
- Nainegali, B. S., Iyyaswami, R., & Belur, P. D. (2019). Simultaneous extraction of four different bioactive compounds from *Garcinia indica* and their enrichment using Aqueous Two-Phase Systems. *Food and Bioprocess Processing*, 114, 185-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.01.002>
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113-126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>
- Özeker, E. (1999). Phenolic compounds and their importance. *ANADOLU Journal of AARI*, 9, 114-124.
- Pataro, G., Bobinaitė, R., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Raudonis, R., Visockis, M., . . . Viškelis, P. (2017). Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), 1595-1605. doi: 10.1007/s11947-017-1928-x
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE LIMA (*Citrus limetta* Risso) Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. [flavonoides; cáscara de lima; actividad antioxidante]. 2013, 15(3), 5. doi: 10.18633/bt.v15i3.153
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 273-281. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>
- Puertas-Mejía, M. A., Villegas-Guzmán, P., & Alberto Rojano, B. (2013). Borra de café colombiano (*Coffea arabica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 469-478.

- Qin, B., Liu, X., Cui, H., Ma, Y., Wang, Z., & Han, J. (2017). Aqueous two-phase assisted by ultrasound for the extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(9), 881-888. doi: 10.1080/10826068.2017.1350980
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules *Science and Technology* 1, 7-16.
- Reis, G. M. L. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In J. A. Morales-González (Ed.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants* (pp. 87-112). USA: InTech.
- Rodríguez-Salazar, N., & Valle-Guadarrama, S. (2019). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology*, 1-12. doi: 10.1080/01496395.2019.1634730
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Cano, M. P., & Novais, J. (2019). SUBPRODUCTOS DE CEBOLLA COMO INGREDIENTES ALIMENTARIOS CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES E INHIBIDORAS DEL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO.
- Sang, J., Dang, K., Ma, Q., Li, B., Huang, Y., & Li, C. (2017). Partition Behaviors of Different Polar Anthocyanins in Aqueous Two-Phase Systems and Extraction of Anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. and *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Analytical Methods*, 11, 980-991. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1071-3>
- Serna-Jiménez, J. A., Torres-Valenzuela, L. S., Martínez-Cortínez, K., & Hernández-Sandoval, M. C. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Revista ION*, 31, 37-42.
- SIAP-SAGARPA. (2007). Aguacate Hass: Descripción. Retrieved 05/05/2017, from http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/aguacate/Descripcion.pdf.
- Siddeeg, A., Manzoor, M., Ahmad, M. H., Ahmad, N., Ahmed, Z., Kashif, M., . . . Ammar, A.-F. (2019). Pulsed Electric Field-Assisted Ethanol Extraction of Date Palm Fruits: Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Physicochemical Properties. *Processes*, 7. doi: 10.3390/pr7090585
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 261-280. doi: 10.1146/annurev-food-030216-025923
- Sumaya-Martínez, M. T., Medina-Carrillo, R., González-Oceguera, E., Jimenez-Ruiz, E., Balois-Morales, R., Sanchez-Herrera, L., & López-Nahuatt, G. (2019). Mango (*mangifera indica* L.) pulping byproducts: antioxidant activity

- and bioactive compounds of three mango cultivars antioxidant activity by-products of mango. 6, 560. doi: 10.15741/revbio.06.01.27
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology* (Fourth edition ed.). Massachusetts, USA. : Sinauer Associates, Inc.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54, 733–749.
- Tang, X., Wang, Y., Han, J., Wang, L., Li, C., & Ni, L. (2017). Separation, purification of anthocyanin and vitis linn polysaccharide from grape juice by the two-step extraction and dialysis: TANG et al. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13344. doi: 10.1111/jfpp.13344
- Turturica, M., Oancea, A.-M., Rapeanu, G., & Bahrim, G. (2015). Anthocyanins: Naturally occurring fruit pigments with functional properties. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI : Food Technology*, 39, 9-24.
- Valle-Guadarrama, S., Morales-Cabrera, M., Peña-Valdivia, C. B., Mora-Rodríguez, B., Alia-Tejacal, I., Corrales-García, J., & Gómez-Cruz, A. (2013). Oxidative/Fermentative Behavior in the Flesh of “Hass” Avocado Fruits Under Natural and Controlled Atmosphere Conditions. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 272-282. doi: 10.1007/s11947-011-0747-8
- Vázquez-Espinosa, M., V. González de Peredo, A., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., F. Barbero, G., & Espada-Bellido, E. (2019). Assessment of Ultrasound Assisted Extraction as an Alternative Method for the Extraction of Anthocyanins and Total Phenolic Compounds from Maqui Berries (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Agronomy*, 9(3), 148.
- Velasco González de Peredo, A., Vázquez Espinosa, M., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Amores, A., Palma, M., . . . Jiménez Cantizano, A. (2019). Alternative Ultrasound-Assisted Method for the Extraction of the Bioactive Compounds Present in Myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules*, 24, 882. doi: 10.3390/molecules24050882
- West, M. E., & Mauer, L. J. (2013). Color and Chemical Stability of a Variety of Anthocyanins and Ascorbic Acid in Solution and Powder Forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4169-4179. doi: 10.1021/jf400608b
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, 129(2), 443-453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>
- Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y., & Ni, L. (2014). Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 124, 170-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.025>

- Yin, Y., Jia, J., Wang, T., & Wang, C. (2017). Optimization of natural anthocyanin efficient extracting from purple sweet potato for silk fabric dyeing. *Journal of Cleaner Production*, 149, 673-679. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.134>
- Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente, G., & Cárcel, J. A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, docencia y tecnología*, 49, 166-192. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162014000200008&lng=es&tlng=es
- Zhou, Y., Zhao, X., & Huang, H. (2015). Effects of Pulsed Electric Fields on Anthocyanin Extraction Yield of Blueberry Processing By-Products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39. doi: 10.1111/jfpp.12427

3. COMPOSICIÓN PROXIMAL Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE ‘HASS’

Resumen

La investigación acerca de la composición química de la cáscara de aguacate (*Persea americana* Mill.) ‘Hass’ es importante para saber si puede ser empleada como un ingrediente alimenticio funcional. La cáscara de este fruto manifiesta fitoquímicos de importancia, los cuales pueden ser aprovechados para la utilización en matrices alimentarias. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la cáscara de aguacate ‘Hass’ en madurez fisiológica (CMF) y de consumo (CMC), así como la determinación de los componentes bioactivos. Se llevó a cabo la caracterización proximal en las dos muestras en donde se determinaron contenido de humedad, cenizas, fibra cruda, extracto etéreo y proteína cruda. Para la caracterización de los compuestos bioactivos se realizaron determinaciones de fenoles solubles totales, antocianinas, flavonoides y proantocianidinas en los dos estados de madurez. Se encontró diferencia significativa en cada una de las composiciones, tanto de la caracterización proximal como de los compuestos bioactivos en los dos estados de madurez. La CMF manifestó el mayor contenido de extracto etéreo y la CMC fue de proteína. Los compuestos bioactivos incrementaron con la maduración del fruto, presentando mayor contenido de FST, seguido de flavonoides, proantocianidinas y antocianinas.

Palabras clave: Análisis proximal, cáscara, compuestos bioactivos, madurez

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapino.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Director de Tesis: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

PROXIMAL COMPOSITION AND DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF EPICARP OF 'HASS' AVOCADO FRUITS

Abstract

Research about the chemical composition of the peel of avocado (*Persea americana* Mill.) 'Hass' is important to know if it can be used as a functional food ingredient. The peel of this fruit manifests phytochemicals of importance, which can be exploited to the use in food matrix. The objective of this research was to characterize the 'Hass' avocado peel in physiological and consumption maturity, as well as the determination of bioactive compounds. Proximal characterization of the peel was carried out in the two samples where content of moisture, ash, raw fiber, ethereal extract, and crude protein were determined. For the characterization of bioactive compounds determinations of total soluble phenols, anthocyanins, flavonoids and proanthocyanidins in the two maturity states were made. Significant difference was found in each of the compositions of both proximal characterization and bioactive compounds in the two maturity states. The CMF manifested the highest ethereal extract content and in CMC the main component was protein. Bioactive compounds increased with fruit ripening, presenting higher FST content, followed by flavonoids, proanthocyanidins, and anthocyanins.

Keywords: Proximal analysis, bioactive compounds, maturity, *Persea americana* Mill.

Thesis Master Science, Agro-Food Science and Technology Graduate Program, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

3.1 Introducción

La especie *Persea americana* Mill es reconocida tanto por su alto valor nutritivo como por sus usos medicinales (Yasir, Das, & Kharya, 2010). La composición de esta especie está caracterizada por diferentes grupos de metabolitos, los cuales se pueden dividir en alcanoides (también denominados "acetogeninas alifáticas"), diversos derivados que contienen anillo de furano, glicósidos terpenoides, flavonoides y cumarinas (Yasir et al., 2010). En el 2014 la producción mundial de aguacate fue de 5 millones de toneladas y México fue el mayor productor con 1.5 millones de toneladas (FAO, 2017)

Una gran cantidad de subproductos es generada diariamente por la industria en el procesamiento de alimentos, debido a la producción de jugos, jaleas, dulces y frutas frescas. Se estima que las frutas procesadas enteras pueden generar subproductos que comprenden aproximadamente el 30-90% de estos frutos, incluyendo piel, semillas y pulpa. En la industria de la fruta fresca, los subproductos son principalmente cáscaras y semillas de diferentes formas y tamaños (Ayala-Zavala et al., 2011). Los residuos de frutas y vegetales son fuentes ricas en fitoquímicos y han sido estudiados para la extracción de compuestos fenólicos, fibras dietéticas y otros compuestos bioactivos (Galanakis, 2012). En la mayoría de las frutas y vegetales, sólo se consume la carne o la pulpa, pero los estudios han revelado que cantidades significativas de fitoquímicos y nutrientes esenciales están presentes en las semillas, cáscaras y otros componentes de frutas y verduras que no se consumen comúnmente (Rudra, Nishad, Jakhar, & Kaur, 2015).

Generalmente, la cáscara y semilla del fruto de aguacate 'Hass' no se utiliza, por lo que estos residuos pueden ser empleados para el desarrollo de ingredientes funcionales debido a que contienen polifenoles, carotenoides y clorofilas, que son responsables de la actividad antioxidante (Rodríguez-Carpena, Morcuende, Andrade, Kylli, & Estévez, 2011).

La familia principal de compuestos fenólicos que se encuentran en las cáscaras y las semillas de aguacate son los derivados de (epi) catequina (Melgar et al., 2018). Los flavonoides son uno de los metabolitos secundarios con más amplia distribución en el reino vegetal (Chil-Núñez, Molina-Bertrán, Ortiz-Zamora, Dutok, & Souto, 2019), por lo tanto, pertenecen a la segunda familia principal de compuestos fenólicos encontrados en las muestras de cáscaras de aguacate, principalmente derivados de quercetina (Melgar et al., 2018).

El contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes reportados en cáscara son altos, pero se puede aumentar con el uso de tecnologías avanzadas, teniendo en cuenta varios parámetros, como la estabilidad, degradación y actividad biológica de los compuestos extraídos (Padilla-Camberos, Martínez-Velázquez, Flores-Fernández, & Villanueva-Rodríguez, 2013; Rodríguez-Carpena et al., 2011). En tal contexto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en estado de madurez fisiológica y en madurez de consumo, así como determinar los principales fitoquímicos presentes en los dos estados de madurez.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Objeto de estudio

Se adquirieron frutos de aguacate en madurez fisiológica y de consumo en el mercado local del lugar de experimentación. Para la determinación de los compuestos bioactivos se lavaron los frutos con agua destilada, se les retiró la cáscara, la cual se sometió a secado a temperatura ambiente (20 °C) y en oscuridad por 15 días hasta peso constante. Pasado el tiempo se molió por separado en equipo Nutribullet® (USA) y se almacenaron las muestras en frascos oscuros y en desecador hasta su análisis. Para la realización del análisis proximal, sólo se procedió a lavar los aguacates con agua destilada, se les retiró la cáscara y se secaron a temperatura ambiente hasta que no presentaran restos de agua.

3.2.2 Composición proximal

El análisis proximal se llevó a cabo bajo las normas A.O.A.C. (2003) utilizando como muestra la cáscara en estado de madurez fisiológica (CMF) y cáscara en estado de madurez de consumo (CMC).

El contenido de humedad fue determinado por diferencia de peso húmedo y peso seco en una balanza analítica (Ohaus, USA) al someter las muestras a un tratamiento térmico en horno de secado a 90 °C durante 6 h. El contenido de cenizas se determinó mediante el quemado y la posterior calcinación en mufla (Thermo Scientific Modelo F30430CM, USA) a 600 °C durante 2 h. Para la determinación de lípidos se utilizó la muestra de las dos cáscaras ya secas (muestras obtenidas en la determinación del contenido de humedad) y se sometieron a una extracción en equipo Soxhlet. La muestra que quedó de la determinación de lípidos fue utilizada para la determinación de fibra cruda, la cual se llevó a cabo bajo dos digestiones: ácida y alcalina y posterior calcinación en mufla (especificaciones). El contenido de proteína se determinó por calefacción en microKjeldahl, seguida de una destilación en destilador automático y titulación del destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

3.2.3 Determinación de compuestos bioactivos

Preparación de extractos

Se prepararon dos extractos con cada una de las muestras de cáscara de aguacate 'Hass' usando como disolvente una solución de metanol: ácido acético: agua (10:1:9, v/v/v). El primer extracto correspondió a la cáscara en madurez fisiológica (CMF) y el segundo extracto a la cáscara madurez de consumo (CMC). Para obtener el extracto de la CMF, se utilizaron 2.5 g de muestra seca y se homogeneizó con 10 mL del disolvente en un equipo Ultra Turrax (modelo T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), operado a 10000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a centrifugación el homogeneizado a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se filtró en papel Whatman No. 4. Los residuos de la primera extracción se sometieron a una segunda extracción bajo las condiciones antes descritas. Los volúmenes obtenidos de las dos extracciones se juntaron y enrasaron a 20 mL con el disolvente. Para el extracto con CMC se utilizaron 0.2 g y se llevó a cabo el procedimiento anterior. Los extractos obtenidos fueron almacenados a 4.5 °C hasta la determinación de fenoles solubles totales, flavonoides y taninos. Todo este procedimiento se hizo por triplicado. Para la determinación de antocianinas, se llevaron a cabo cuatro extractos con CMF y CMC: dos extractos de CMF para pH 1 y pH 4.5 y los otros dos extractos de CMC con los mismos pH's anteriores. Estos extractos consistieron en adicionar 10 mL de cada uno de los buffers a 2.5 g de CMF y a 0.5 g de CMC. Se procedió a realizar el mismo procedimiento de extracción descrito anteriormente. Se realizaron tres repeticiones.

3.2.4 Variables respuesta

Determinación de fenoles solubles totales

El contenido de fenoles solubles totales se determinó para cada uno de los extractos por medio del método de Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton & Rossi, 1965). Para ello, 250 µL de FC reaccionaron con 100 µL de muestra en tubos de ensayo durante 6 min. Después, la mezcla se neutralizó con 1.25 mL de una

solución de Na_2CO_3 19% y el volumen se ajustó a 3.0 mL con agua destilada. Las mezclas se agitaron en vórtex y se colocaron en oscuridad durante 90 min para lograr la estabilización. Se aplicó centrifugación (equipo Hermle Z200, Labortechnik, Alemania) a $15.6\times g$ durante 10 min para eliminar turbidez y se determinó absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA) a 760 nm. Las determinaciones se apoyaron en una curva de calibración estándar de ácido gálico y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g^{-1}) en donde la curva de calibración fue de un rango de concentración de 0.0006 a 0.0053 mg mL^{-1} .

Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se cuantificaron mediante lo descrito por Kubola and Siriamornpun (2011) a una absorbancia de 510 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA) apoyándose de una curva estándar de calibración con 3000 ppm de (+)-catequina. Se hicieron las diluciones necesarias para cada tratamiento de extracto con agua destilada o desionizada, según sea el caso. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de esa dilución y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Después, se adicionaron 0.15 mL de NaNO_2 al 5% y se dejó reposar la muestra durante 6 min en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 0.15 mL de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar 6 min nuevamente en oscuridad. A continuación, se adicionaron 2 mL de NaOH al 4% y 0.2 mL de agua destilada para aforar a 5 mL. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra (mg EPC g^{-1}). El intervalo de la concentración de la curva de calibración de catequina fue de 0.006 a 0.048 mg mL^{-1} .

Determinación de proantocianidinas

Las concentraciones de proantocianidinas se determinaron por el método descrito por Price, Van Scoyoc, and Butler (1978) con algunas modificaciones. Se midió a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA), en donde las determinaciones de igual manera se apoyaron

en una curva estándar de 3000 ppm de (+)-catequina. Se tomaron 20 μL del extracto, se agregaron 180 μL de metanol y la mezcla se agitó. Luego se agregó 1.2 mL de vainillina (grado analítico, Merck) al 4% p/v en metanol (grado analítico, Merck). Finalmente, se agregaron 600 μL de HCl concentrado y protegido de la luz por 30 min. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra (mg EPC g^{-1}). La curva de calibración tuvo un rango de concentración de 0.002 a 0.035 mg mL^{-1} .

Determinación de antocianinas

El contenido de antocianinas se midió con el método de pH diferencial (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005) a dos diferentes longitudes de onda: 520 nm y 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA). Los resultados fueron expresados en miligramos de cianindina-3-glucósido por gramo de muestra (mg Cyd g^{-1}).

3.2.5 Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los experimentos se llevó a cabo un análisis de varianza acompañado por rutinas de comparación de medias con el estadístico de Tukey (0.05) en forma congruente con un diseño completamente al azar con tres repeticiones mediante el paquete estadístico SAS (versión 9.0).

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Composición proximal

El Cuadro 6 muestra las medias de cada una de las determinaciones porcentuales de las cáscaras en estado de madurez fisiológica (CMF) y de consumo (CMC). En todas las composiciones se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos estados de madurez. El componente mayoritario después de la humedad fue el extracto etéreo en la muestra CMF y de proteína cruda en CMC.

Cuadro 6. Parámetros fisicoquímicos de la cáscara de aguacate en madurez de consumo y madurez fisiológica de la var. 'Hass' (base seca).

Determinaciones (%)	Madurez fisiológica CMF	Madurez de consumo CMC
Humedad	75.70 a ^z ± 0.05	76.31 b ± 0.37
Cenizas	0.59 a ± 0.07	0.88 b ± 0.05
Proteína cruda	7.57 a ± 0.006	8.36 b ± 0.32
Extracto etéreo	9.57 a ± 0.51	4.83 b ± 0.90
Fibra cruda	1.70 a ± 0.11	3.31 b ± 0.68

^zMedias seguidas con la misma letra dentro de filas no son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) ± desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia

Acerca de la composición de la cáscara CMF, Daiuto, Tremocoldi, Alencar, Vieites, and Minarelli (2014) y Vinha, Moreira, and Svp (2013) reportaron un contenido menor de extracto etéreo. En tanto, Bressani, Rodas, and Ruiz (2009) reportaron un contenido cercano al que se obtuvo en este trabajo para el caso de extracto etéreo y respecto al contenido de proteína reportan un porcentaje mayor. En el contenido de fibra cruda, Daiuto et al. (2014) reportaron un contenido de 1.29%, similar a lo obtenido en esta investigación. Sin embargo, Bressani et al. (2009) reportan un mayor porcentaje (54.65%). El porcentaje de ceniza obtenido en la presente investigación fue menor en comparación a lo reportado por los anteriores autores mencionados.

En lo que respecta al porcentaje de humedad de CMC, se obtuvo un valor cercano a lo reportado por Calderón-Oliver et al. (2016). Los porcentajes de los demás parámetros fueron menores a lo que establecieron Rotta et al. (2016). Saavedra et al. (2017) mostraron resultados donde los porcentajes de humedad, y extracto etéreo fueron menores a los que se muestran en el Cuadro 6; mientras que para los porcentajes de proteína, cenizas y fibra cruda fueron mayores.

La composición de los residuos de aguacate varía entre cultivares y a veces varía entre el mismo cultivar, lo cual puede ser debido a factores que influyen en la composición de la fruta durante su desarrollo, incluyendo la región de producción de aguacate, clima, altitud, precipitación, genética, entre otros (Araújo, Rodríguez-Jasso, Ruiz, Pintado, & Aguilar, 2018).

Los subproductos con un bajo valor nutritivo pueden ser aprovechados para la extracción de otros compuestos de interés industrial (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Por tal motivo, la cáscara del fruto de aguacate podría ser aprovechada para la obtención de productos fitoquímicos, al considerar lo antes mencionado.

3.3.2 Determinación de compuestos bioactivos

Al madurar el fruto a un estado que pueda ser consumido, éste presenta características visibles, como lo es el cambio de color de la cáscara o epicarpio; sin embargo, se presentan otras que no se pueden determinar a simple vista, como lo son el incremento de las concentraciones de algunos metabolitos secundarios. Los datos de las concentraciones de los compuestos bioactivos entre los dos estados de madurez de la cáscara de aguacate 'Hass' fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) (Cuadro 7), manifestándose mayor cantidad de éstos en la CMC.

La muestra de CMC, además del contenido de fenoles solubles totales (FST), presentó en mayor cantidad la concentración de proantocianidinas en comparación con los otros fitoquímicos evaluados; para la muestra de CMF lo fue la concentración de flavonoides.

Cuadro 7. Concentración de compuestos bioactivos en base seca de extractos de cáscara de aguacate en madurez fisiológica y de consumo.

Compuesto bioactivo	Madurez fisiológica (CMF)	Madurez de consumo (CMC)
Fenoles solubles totales mg EAG g ⁻¹	7.30 a ^z ± 1.89	85.54 b ± 6.50
Antocianinas mg Cyd g ⁻¹	0.08 a ± 0.003	2.94 b ± 0.02
Flavonoides mg EPC g ⁻¹	3.17 a ± 0.03	29.46 b ± 0.14
Proantocianidinas mg EPC g ⁻¹	1.29 a ± 0.06	40.79 b ± 0.49

^zMedias seguidas con la misma letra dentro de filas no son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) ± desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Vinha et al. (2013) encontraron contenido similar en la CMF a lo mostrado en el presente trabajo respecto a FST; pero menor a la concentración en el trabajo de Daiuto et al. (2014). Para las concentraciones de FST y flavonoides en la CMC fueron mayores a lo reportado por Calderón-Oliver et al. (2016) y Rotta et al. (2016). De igual manera, Tremocoldi et al. (2018), Saavedra et al. (2017) y Salmerón-Ruiz (2014), presentaron cantidades menores de FST; pero la concentración que se muestra en este trabajo de este bioactivo fue menor a lo establecido por Rosero, Cruz, Osorio, and Hurtado (2019) y Trujillo-Mayol, Cespedes-Acuña, Silva, and Alarcon (2019) como también para flavonoides.

El contenido de antocianinas fue similar a lo mostrado por Trujillo-Mayol et al. (2019) cuando emplearon extracción asistida por ultrasonido (EAU) y maceración durante 12 h; al aplicar extracción asistida por microondas (EAM) y una combinación de EAU-EAM la concentración fue un poco mayor a lo que se presenta en el Cuadro 7. El color característico de la cáscara del fruto de aguacate 'Has' y de otros frutos como son los berries, principalmente, es debida a la presencia de antocianinas.

Por lo que respecta a la concentración de taninos, el contenido obtenido por Salmerón-Ruiz (2014) fue menor. La diferencia entre los resultados de este trabajo con algunos ya reportados se debe al uso de otros procesos de extracción como lo es la sonicación, agitación magnética, microondas entre otros, al igual que el empleo de diferentes solventes tal es el caso de la acetona y etanol.

Los residuos de aguacate son ricos en una mezcla compleja de compuestos polifenólicos, como la catequina, así como compuestos poliméricos altos, como proantocianidinas .(Soong & Barlow, 2004). Las propiedades físicas y químicas de los polifenoles y el bajo costo de los residuos de aguacate, hacen de este material una fuente potencial de ingredientes bioactivos para su uso en alimentos, cosméticos y farmacéuticos (Araújo et al., 2018).

3.4 Conclusiones

Las muestras de cáscara en madurez fisiológica (CMF) y de consumo (CMC) presentaron diferencias en la composición de los parámetros físico-químicos, donde la CMF presentó mayor cantidad de extracto etéreo mientras que la CMC fue de proteína cruda. Hubo un incremento en las concentraciones de los compuestos bioactivos en la maduración del estado fisiológico al estado de consumo, destacando entre ellos los fenoles solubles totales (FST) y en menor cantidad las antocianinas.

3.5 Literatura citada

- A.O.A.C. INTERNATIONAL. (2003). Métodos de análisis de la asociación oficial A.O.A.C. INTERNATIONAL. (2003). Métodos de análisis de la asociación oficial de química analítica para determinar humedad, fibra, cenizas, grasa y proteína. Washington, U.S.A., Chapter 32: 1, 2, 5 y 14
- Al-Sayed, H. M. A., & Ahmed, A. R. (2013). Utilization of watermelon rinds and sharlyn melon peels as a natural source of dietary fiber and antioxidants in cake. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), 83-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.01.012>
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., . . . González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bressani, R., Rodas, B., & Ruiz, A. S. (2009). La Composición Química, Capacidad Antioxidativa y Valor Nutritivo de la Semilla de Variedades de Aguacate *Final Report of the Project FODECYT 02-2006*. Guatemala: Universidad del Valle.
- Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 46-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048>
- Daiuto, É. R., Tremocoldi, M. A., Alencar, S. M. d., Vieites, R. L., & Minarelli, P. H. (2014). Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 417-424.
- FAO. (2017). FAOSTAT-CROP (Vol. 2017). FAO.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127(3), 1138-1145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.115>
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruits Juices, Beverages, Natural

Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278.

- Melgar, B., Inês, M., Ciric, A., Soković, M., Garcia-Castello, E., Rodriguez-Lopez, A. D., . . . Ferreira, I. (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 111, 212-218. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.024
- Padilla-Camberos, E., Martínez-Velázquez, M., Flores-Fernández, J. M., & Villanueva-Rodríguez, S. (2013). Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Avocado Seed Extract (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). *The Scientific World Journal*, 2013, 4. doi: 10.1155/2013/245828
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214-1218. doi: 10.1021/jf60219a031
- 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. doi: 10.1021/jf1048832
- Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2019). Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*, 24(17), 3209.
- Rotta, E. M., Rodrigues de Moraes, D., França Biondo, P. B., Jorge dos Santos, V., Matsushita, M., & Vergilio Visentainer, J. (2016). Use of avocado peel (*Persea americana*) in tea formulation: a functional product containing phenolic compounds with antioxidant activity. *Acta Scientiarum. Technology*, 38(1), 23-29.
- Rudra, S. G., Nishad, J., Jakhar, N., & Kaur, C. (2015). Food industry waste: mine of nutraceuticals. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 205-229.
- Saavedra, J., Córdova, A., Navarro, R., Díaz-Calderón, P., Fuentealba, C., Astudillo-Castro, C., . . . Galvez, L. (2017). Industrial avocado waste: Functional compounds preservation by convective drying process. *Journal of Food Engineering*, 198, 81-90. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.018
- Salmerón-Ruiz, M. L. (2014). *Fracción indigestible, bioaccesibilidad in vitro y actividad antioxidante, de compuestos fenólicos de la cáscara de aguacate cv. 'Hass'*. (Maestría), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.

- Soong, Y.-Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411-417. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>
- Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M., Massarioli, A. P., Denny, C., Daiuto, É. R., . . . Alencar, S. M. d. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PLOS ONE*, 13(2), e0192577. doi: 10.1371/journal.pone.0192577
- Trujillo-Mayol, I., Cespedes-Acuña, C. L., Silva, F., & Alarcon, J. (2019). Improvement of the polyphenol extraction from avocado peel by assisted ultrasound and microwaves. *Journal of Food Process Engineering*. doi: 10.1111/jfpe.13197
- Vinha, A., Moreira, J., & Svp, B. (2013). Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *The Journal of Agricultural Science*, 5, 100-109. doi: 10.5539/jas.v5n12p100
- Yasir, M., Das, S., & Kharya, M. D. (2010). The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacognosy reviews*, 4(7), 77-84. doi: 10.4103/0973-7847.65332

4. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS' MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES

Resumen

La industrialización del aguacate 'Hass' genera residuos con el desecho del epicarpio y la semilla, los cuales pueden ser fuente de compuestos bioactivos. El objetivo del trabajo fue separar compuestos bioactivos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' mediante extracción acuosa en dos fases (ATPE), para favorecer un aprovechamiento integral de este recurso fitogenético. Se evaluaron dos sistemas, formados con polietilenglicol 4000 (Peg4000) y citrato de sodio (Na_3Cit) y Peg4000 con sulfato de magnesio (MgSO_4). En ambos se verificó la capacidad de formación de sistemas bifásicos con el estudio de diagramas binodales de fases. Se desarrollaron sistemas ATPE incorporados con epicarpio liofilizado de frutos en madurez de consumo. La recuperación de compuestos fue equivalente a un 89.9% en relación a sistemas que usaron extracto obtenido previamente con metanol. El sistema basado en MgSO_4 presentó mayor potencial de exclusión salina, lo que indicó que se requirieron menores concentraciones de compuestos que cuando se usó Na_3Cit , para conseguir la separación de fases. Sin embargo, la evaluación de separación de compuestos basada en parámetros de relación de volúmenes, coeficientes de partición y rendimientos de separación indicó que con Na_3Cit se tuvo mayor capacidad de recuperación de fenoles solubles, flavonoides, y taninos condensables. Se encontró que el epicarpio de aguacate 'Hass' tiene concentración baja de antocianinas. El uso de sistemas con 24.9-14.5% de Na_3Cit -Peg4000 y de 12.2-15.5% de MgSO_4 -Peg4000, permitió recuperar más de 98% de compuestos bioactivos. El método ATPE mostró utilidad para concentrar compuestos por un procedimiento no térmico.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., compuestos bioactivos, extracción acuosa en dos fases, potencial de exclusión salina.

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Director de Tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

SEPARATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM EPICARP OF 'HASS' AVOCADO FRUITS THROUGH AQUEOUS TWO- PHASE EXTRACTION

Abstract

The industrialization of 'Hass' avocado generates residues with the waste of the epicarp and the seed, which can be a source of bioactive compounds. The objective of the work was to separate bioactive compounds from the epicarp of 'Hass' avocado fruits through aqueous two-phase extraction (ATPE) to favor an integral use of this plant genetic resource. Two systems were evaluated, one formed with polyethylene glycol 4000 (Peg4000) and sodium citrate (Na_3Cit) and the other with Peg4000 and magnesium sulfate (MgSO_4). In both, the capacity of formation of biphasic systems was verified by studying binodal phase diagrams. ATPE systems with lyophilized epicarp from fruits at consumption maturity were developed and the recovery of compounds was equivalent to 89.9% in relation to systems that used extract obtained previously with methanol. The MgSO_4 -based systems showed greater salting-out potential, which indicated that lower concentrations of compounds were required than in systems that used Na_3Cit , to achieve phase separation. However, the evaluation of compound separation based on parameters of volume ratio, partition coefficients, and separation yields indicated that the Na_3Cit -based system had a greater capacity to recover soluble phenols, flavonoids, and condensable tannins. The 'Hass' avocado epicarp was found with low concentration of anthocyanins. With a composition of 24.9-14.5% in the Na_3Cit -Peg4000 system and 12.2-15.5% in the MgSO_4 -Peg4000 system, a recovery greater than 98% of bioactive compounds was achieved. The ATPE method showed utility in concentrating compounds by a non-thermal process.

Key words: *Persea americana* Mill., aqueous two-phase extraction, bioactive compounds, salting-out potential.

Thesis Master Science, Program of Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

4.1 Introducción

La extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) es un procedimiento de extracción líquido-líquido que ha demostrado alto potencial para separar diversos compuestos como proteínas (Asenjo & Andrews, 2012; Domínguez-Puerto, Valle-Guadarrama, Guerra-Ramírez, & Hahn-Schlam, 2018; Kalaivani & Regupathi, 2016), enzimas (Ramakrishnan et al., 2016; Suarez Ruiz, van den Berg, Wijffels, & Eppink, 2018), anticuerpos (Muendges, Stark, Mohammad, Górak, & Zeiner, 2015; Rosa et al., 2009), compuestos fenólicos (de Araújo et al., 2018; Hou, Wei, Ma, Wang, & Yang, 2017; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019) y pigmentos (Ruiz-Ruiz et al., 2019; Vargas-Campos et al., 2018), entre otros.

La extracción acuosa en dos fases se desarrolla a través de la mezcla de dos polímeros como polietilenglicol, dextrano (Rosa, Ferreira, Azevedo, & Aires-Barros, 2010), polivinilpirrolidona (Sadeghi & Maali, 2016), poli (óxido de etileno), poli (óxido de propileno) (da Rocha et al., 2011), un polímero y una sal como fosfato o sulfato, entre otros (Seader, Henley, & Roper, 2011) e incluso un solvente orgánico y una sal (Fu, Song, Yi, & Xie, 2019; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019). En ciertas concentraciones de los componentes, el sistema forma una solución verdadera en una fase, pero a partir de cierta composición, la mezcla se separa en dos fases inmiscibles, entre las cuales se separan los compuestos presentes (Rosa et al., 2010; Sadeghi & Maali, 2016; Seader et al., 2011).

El presente proyecto está enfocado al aprovechamiento de cáscaras de frutos de aguacate 'Hass', que son procesados para la obtención de pulpa y otros subproductos destinados a la fabricación de guacamole y aceites para la industria de los cosméticos, entre otros (Olaetta, 2003; Palou et al., 2000; Woolf et al., 2013). Estas cáscaras constituyen subproductos que se desechan, pero contienen compuestos bioactivos con potencial antioxidante (Terasawa, Sakakibara, & Murata, 2006), lo cual constituye un área de oportunidad para incrementar el valor agregado del fruto de aguacate 'Hass'. El color oscuro del

epicarpio del fruto de aguacate 'Hass' es causado por la presencia de antocianinas (Bertling, Tesfay, & Bower, 2007; Cox, McGhie, White, & Woolf, 2004), compuestos pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2006), cuya actividad antioxidante ha sido demostrada ampliamente (Atala, Aspée, Speisky, Lissi, & López-Alarcón, 2013; Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes, 2009). La extracción de antocianinas a partir de este tipo de productos se justifica en la intención de usar estos compuestos como agentes pigmentantes, en sustitución de colorantes artificiales, que pueden tener efectos adversos en la salud (Eigenmann & Haenggeli, 2007; Swaroop, Dinesh Roy, & Vijayakumar, 2011).

Jampani y Raghavarao (2015) mostraron que el método de extracción acuosa en dos fases puede usarse para la extracción de antocianinas y lo aplicaron para separar estos compuestos a partir de *Brassica oleracea* L. Los autores evaluaron sistemas ATPE basados en polietilenglicol (Peg) de distintos pesos moleculares en mezcla con distintas sales y concluyeron que el mejor sistema fue el que usó Peg 4000 y sulfato de magnesio, por lo cual esta alternativa fue considerada en el presente trabajo para atender la separación de antocianinas a partir de cáscaras de frutos de aguacate 'Hass'. Sin embargo, el sulfato de magnesio es un ingrediente usado en sistemas que inducen crecimiento de hongos (Bankar, Bule, & Singhal, 2009) y, si los extractos están destinados a ser incorporados en matrices alimenticias, deberían explorarse otras alternativas en la elección del componente salino, como lo es el citrato de sodio, que constituye un ingrediente en la preparación de distintos alimentos (Banipal, Kaur, Kaur, & Banipal, 2016).

La separación de compuestos mediante el método de ATPE se basa en un fenómeno de exclusión salina o “*salting out*”, inducido por el aumento de la concentración de la sal en el sistema (Fu et al., 2019). La elección de concentraciones de los componentes del sistema se ha asociado con el análisis de diagramas binodales de fase, en donde se identifican las zonas de composición donde la mezcla forma una solución verdadera en una fase, las zonas donde se forman dos fases inmiscibles y la delimitación de la región factible

de trabajo (Seader et al., 2011). Domínguez-Puerto et al. (2018) y Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama (2019) postularon que en la medida que la región de trabajo presenta mayor área, el sistema tiene mayor capacidad para favorecer la separación de los compuestos a separar. Por otro lado, Gomes et al. (2017) señalaron que la capacidad de separación de un sistema está en función de la capacidad de exclusión salina inducida, lo cual genera una estrategia para comparar y elegir un sistema ATPE para atender una separación particular. A este respecto, Gomes et al. (2017) evaluaron la capacidad de exclusión salina del sulfato de magnesio, pero en combinación con propanol y la mezcla de esta sal con polietilenglicol no ha sido caracterizada con este enfoque y tampoco la mezcla de este polímero con citrato de sodio. En tal sentido, el objetivo del presente trabajo fue separar compuestos bioactivos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en madurez de consumo mediante extracción líquido-líquido, así como caracterizar su potencial antioxidante y caracterizar la capacidad de exclusión salina.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Diagramas binodales de fases

Se prepararon soluciones de polietilenglicol [HO- (CH₂CH₂O) *n*-CH₂OH], poli (etano-1,2-diol) 4000 (Peg4000) (Sigma-Aldrich, Co., Germany), sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O) y citrato de sodio ((Na₃C₃H₅O (COO)₃, Na₃Cit) (J. Bayer, México) en concentración de 40% en los tres casos y agua desionizada como solvente. Se aplicó el método del punto de turbidez (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019; Sadeghi & Maali, 2016) para identificar concentraciones correspondientes a la transición de un sistema monofásico a otro bifásico, llamadas concentraciones binodales. Brevemente, se colocaron 5 g de Peg4000 en un tubo Pyrex® 70-mL con tapa y se agregó gota a gota solución de MgSO₄ o Na₃Cit hasta obtener una apariencia turbia. Luego, se agregó agua hasta obtener transparencia total en la mezcla, se repitió la adición de sal hasta turbidez y así sucesivamente, con registro preciso del peso después de cada adición de material con balanza analítica (Ohaus, USA), con resolución de 0.0001 g. Para cada etapa de adición de masa se aplicó un balance de materia con el procedimiento descrito por Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama (2019), a través de las Ecuaciones (1) y (2), donde $x_{S,i}$ y $y_{P,i}$ son concentraciones de sal (S; Na₃Cit o MgSO₄) y Peg4000 (P) obtenidos a partir de la mezcla *i*; ($x_{S,i-1}$, $y_{P,i-1}$) y ($x_{S,0}$, $y_{P,0}$) son concentraciones de sal y Peg4000 en la mezcla previa *i-1*, y en las soluciones originales (0), respectivamente; m_{i-1} y m_i son masas totales obtenidas en las mezclas *i* e *i-1*; w_P , w_S , y w_H son cantidades adicionadas de Peg4000, sal y agua, en la mezcla *i*. En el caso del sulfato de magnesio, las concentraciones fueron corregidas por medio de su multiplicación por un factor de 0.4883, en virtud de que el reactivo usado era heptahidratado.

$$x_{S,i} (\%) = \frac{(x_{S,i-1} / 100)(m_{i-1}) + (x_{S,0} / 100)(w_S)}{m_{i-1} + w_S + w_P + w_H} \times 100 \quad (1)$$

$$y_{P,i} (\%) = \frac{(y_{P,i-1} / 100)(m_{i-1}) + (y_{P,0} / 100)(w_P)}{m_{i-1} + w_S + w_P + w_H} \times 100 \quad (2)$$

Los datos correspondientes a la condición de turbidez se reconocieron como las concentraciones binodales o de transición de estado monofásico a estado bifásico ($x_{S,i}^{bin}$ y $y_{P,i}^{bin}$). Estos datos binodales se sometieron a rutinas de regresión para ajustarlos al modelo representado por la Ecuación (3) (Merchuk, Andrews, & Asenjo, 1998), donde los parámetros k_1 (%), k_2 (%^{-0.5}) y k_3 (%⁻³) son constantes de regresión.

$$y_P^{bin} = k_1 \exp(k_2 (x_S^{bin})^{0.5} - k_3 (x_S^{bin})^3) \quad (3)$$

Se aplicó el procedimiento descrito por Domínguez-Puerto et al. (2018) y Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama (2019) para construir diagramas binodales para las mezclas Na₃Cit-Peg4000 y MgSO₄-Peg4000. En cada caso se identificaron las condiciones de equilibrio de mayor concentración de Peg4000 y sal y fueron denotadas por los puntos A(x_S^{min} , y_P^{max}) y B(x_S^{max} , y_P^{min}). Estos puntos se usaron para construir la línea principal de operación de cada uno de los diagramas mediante el uso de la Ecuación (4), donde k_4 es la pendiente de la recta.

$$y_P = k_4 (x_S - x_S^{min}) + y_P^{max} \quad (4)$$

Se identificó el punto crítico (c) de los diagramas, el cual es definido como la condición a la cual una línea de operación paralela a la principal tendrá longitud cero (Domínguez-Puerto et al., 2018). Para ello, se derivó la Ecuación (3) y el resultado se igualó con la pendiente k_4 , en la forma mostrada por la Ecuación (5), a partir de la cual se obtuvo la concentración de sal (Na₃Cit o MgSO₄) correspondiente al punto C (x_S^C) y a través de la sustitución en la Ecuación (3) se obtuvo la concentración de Peg4000 para el mismo punto (y_P^C).

$$\frac{dy_p^{bin}}{dx_s^{bin}} = \frac{d \left[k_1 \exp \left(k_2 (x_s^C)^{0.5} - k_3 (x_s^C)^3 \right) \right]}{dx_s^{bin}} = k_4 \quad (5)$$

A partir del punto C de cada diagrama se trazaron perpendiculares a la línea principal de operación con pendiente $(-1/k_4)$ y sobre ellas se identificaron cuatro puntos equidistantes, denotados como E, F, G, H. También se identificó la intersección de esta perpendicular con la línea principal de operación y se denotó como D. A través de los puntos E, F, G y H se trazaron líneas paralelas a la línea principal de operación, que constituyeron líneas secundarias de operación. Por medio del software Excell[®] (Microsoft Co., USA) se determinaron las intersecciones, superior (t) e inferior (b), de cada una de las líneas de operación con la curva binodal. Los valores correspondientes se rotularon como $(x_s^t$ y $y_p^t)$ para la región superior y $(x_s^b$ y $y_p^b)$ para la región inferior. Con base en el teorema de Pitágoras y los puntos de intersección se determinó la longitud de cada una de las líneas de operación (da Rocha et al., 2011). La curva binodal (Ecuación 3) y la línea principal de operación (Ecuación 4) se sometieron a evaluación de área bajo la curva, mediante el procedimiento de integración de Simpson de 1/3 (Burden & Faires, 2010). El área bajo la curva binodal (A_{ub}) se restó del área bajo la línea principal de operación (A_{utl}) y con ello se obtuvo el área de trabajo (A_w) del diagrama binodal de fases ($A_w = A_{utl} - A_{ub}$). Los datos de A_{ub} y A_w se sometieron a análisis de varianza y rutinas de comparación de medias con el estadístico de Tukey, con nivel de significancia de 0.05.

4.2.2 Capacidad de exclusión salina (*salting out*)

Para evaluar la habilidad de exclusión salina de los sistemas se utilizó la Ecuación (6) (Gomes et al., 2017; Guan, Lilley, & Treffry, 1993), basada en geometría estadística, que correlaciona los datos binodales en formato de molalidad, donde V_{213}^* (g mol^{-1}) representa el volumen excluido efectivo (EEV), f_{213} (adimensional) es la fracción sin llenar del volumen disponible efectivo después de la incorporación de la sal en el sistema, que incluye el efecto de la forma geométrica

relativa, el tamaño y la interacción de moléculas diferentes. Asimismo, M_P y M_S son los pesos moleculares (g mol^{-1}) del Peg4000 y la sal, respectivamente.

$$\ln \left(V_{213}^* \frac{x_S^{bin}}{M_S} + f_{213} \right) + \left(V_{213}^* \frac{y_P^{bin}}{M_P} \right) = 0 \quad (6)$$

La Ecuación (6) se reescribió en la forma de la Ecuación (7), donde z , w , k_5 , k_6 y k_7 tienen el significado dado en la Ecuación (8).

$$w = -k_5 + k_6 \exp(k_7 z) \quad (7)$$

$$z = \frac{y_P^{bin}}{M_P}; \quad w = \frac{x_S^{bin}}{M_S}; \quad k_5 = \frac{f_{213}}{V_{213}^*}; \quad k_6 = \frac{1}{V_{213}^*}; \quad k_7 = V_{213}^* \quad (8)$$

Los pares de datos binodales ($x_{S,i}^{bin}$ y $y_{P,i}^{bin}$) se sometieron a rutinas de regresión con el programa Sigma Plot (SPSS, 2000), que utiliza el algoritmo Marquardt-Levenberg para encontrar los valores de las constantes de regresión k_5 , k_6 y k_7 que mejor ajustan los datos a la Ecuación (7). Las rutinas de regresión se ensayaron con estrategias de eliminación secuencial de datos de la región inferior a partir del punto B, hasta encontrar significancia estadística ($p \leq 0.05$) en las tres constantes (k_5 , k_6 y k_7). A partir de la constante de regresión k_7 se obtuvo el volumen excluido efectivo (V_{213}^* ; EEV) y, posteriormente, a partir de la constante de regresión k_6 se obtuvo el valor de f_{213} . Para confirmar la habilidad de exclusión salina, los valores de intersección de las líneas de operación (x_S^t , y_P^t , x_S^b y y_P^b) se ajustaron a la ecuación modificada de Setschenow (Ecuación 9; (Gomes et al., 2017; Guan et al., 1993), donde k_9 es el coeficiente de exclusión salina (coeficiente *salting-out*) y k_8 es una constante relacionada con el coeficiente de actividad, ambos adimensionales. Para ello, la Ecuación (9) se reescribió en la forma de la Ecuación (10), donde la constante k_{10} tuvo el significado dado en la misma Ecuación (10) y de la cual se determinó el valor de k_8 .

$$\ln\left(\frac{y_P^t}{y_P^b}\right) = k_8 + k_9 (x_S^b - x_S^t) \quad (9)$$

$$\frac{y_P^t}{y_P^b} = k_{10} \exp\left[k_9 (x_S^b - x_S^t)\right]; \quad k_{10} = \exp(k_8) \quad (10)$$

4.2.3 Separación de compuestos bioactivos

Material vegetal

Se usaron frutos de aguacate ‘Hass’ en madurez de consumo desarrollados en la región de Tetela del Volcán, México (18° 53' 35" N, 98° 43' 47" O; 2231 msnm). Los frutos tuvieron firmeza en la pulpa de 0.83 (± 0.17) N y ángulo en epicarpio definido en términos de luminosidad de 26.22% ($\pm 1.04\%$), cromaticidad de 2.39 (± 1.06) y ángulo de matiz de 52.84° ($\pm 7.50^\circ$). El epicarpio de los frutos se retiró de la pulpa, se sometió a liofilización, se molió y constituyó el material vegetal fuente para la obtención de compuestos fenólicos en general y antocianinas en particular.

Sistemas de extracción acuosa en dos fases

Se prepararon mezclas de 20 g de polietilenglicol 4000 (Peg4000) y citrato trisódico (Na₃Cit) o sulfato de magnesio (MgSO₄) para cuatro condiciones identificadas a lo largo de la línea de operación principal de los diagramas de fase y para cuatro condiciones E, F, G y H sobre la perpendicular que une el punto crítico C y la línea de operación principal. En cada mezcla se adicionaron 0.5 g de cáscara liofilizada y molida. El sistema se sometió a homogeneización en equipo Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) durante 5 min a 10000 rpm. Al término, la mezcla se sometió a agitación en un equipo Vortemp 56 durante 10 min a 10000 rpm. Pasado el tiempo se dejó en reposo durante 12 h para permitir la formación de sistemas bifásicos. Los sistemas formados constituyeron tratamientos de separación basados en “Muestra”.

Para comparar la eficacia del método para la separación de compuestos bioactivos, muestras de 0.2 g de material liofilizado se sometieron a extracción sólido-líquido mediante un disolvente metanólico acidificado con ácido acético en una relación 10:1:1 (v/v/v). Las muestras se sometieron también a homogeneización durante 15 min a 10000 rpm y se centrifugaron a $2200 \times g$ durante 10 minutos (Hettich Zentrifugen, Alemania). Se recuperó el sobrenadante y el residuo se sometió a una segunda extracción similar. Los sobrenadantes se agruparon, se filtraron (papel Whatman no. 4) y se concentraron a 40°C en un evaporador rotativo (Laborata 4010, Alemania), para eliminar el metanol. La fase líquida obtenida se usó como disolvente de polietilenglicol 4000 (Peg4000) y citrato trisódico (Na_3Cit) o sulfato de magnesio (MgSO_4) en las mismas cantidades que se usaron antes. Al igual que antes, las mezclas se dejaron en reposo durante 12 h para permitir la formación de sistemas bifásicos, los cuales constituyeron tratamientos de separación basadas en “Extracto”.

Las fases de los dos grupos de sistemas, basados en Extracto y Muestra, se separaron por decantación y se determinó la partición de volúmenes (V_r) con la Ecuación (11), donde V_t y V_b son los volúmenes de las fases superior (t) e inferior (b), respectivamente. Luego, cada fase se sometió a evaluación de contenido de fenoles solubles totales (tsp) para realizar una evaluación del potencial de separación de los sistemas ATPE basados en Muestra en relación con los sistemas basados en Extracto, para lo cual se determinó el coeficiente de partición (K_{tsp}) y el rendimiento de separación en la fase superior (Y_{tsp}^t), en la forma mostrada también por la Ecuación (11), donde c se refiere a concentración y los subíndices hacen referencia a las fases superior (t), inferior (b) y a la mezcla original (0), que tuvo volumen V_0 .

$$V_r = \frac{V_t}{V_b}; \quad K_{tsp} = \frac{c_{tsp}^t}{c_{tsp}^b}; \quad Y_{tsp}^t = \frac{c_{tsp}^t V_t}{c_{tsp}^0 V_0} \times 100 \quad (11)$$

En adición, las fases superiores de todos los tratamientos se sometieron a evaluación de concentración de flavonoides (c_{Flav}^{sup}), antocianinas (c_{Anto}^{sup}) y taninos condensables (c_{Tani}^{sup}).

Evaluación de composiciones

Fenoles solubles totales

El contenido de fenoles solubles totales (FST) se determinó con el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton & Rossi, 1965), donde 250 μ L de FC reaccionaron con 100 μ L de muestra en tubos de ensayo durante 6 min. Después, la mezcla se neutralizó con 1.25 mL de una solución de Na_2CO_3 19% y el volumen se ajustó a 3.0 mL con agua destilada. Las mezclas se agitaron en vórtex y se colocaron en oscuridad durante 90 min para lograr la estabilización. Se aplicó centrifugación (equipo Hermle Z200, Labortechnik, Alemania) a 13000 $\times$ g durante 10 min para eliminar turbidez y se determinó absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA) a 760 nm. La determinación se apoyó con una curva estándar de ácido gálico y el contenido de FST se expresó como μ g equivalentes de ácido gálico por mililitro (μ g EAG mL^{-1}).

Flavonoides

Para cuantificar flavonoides totales se utilizó una curva de calibración con 3000 ppm de (+)-catequina. Se hicieron las diluciones necesarias para cada tratamiento de extracto con agua destilada o desionizada, según sea el caso. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de esa dilución y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Después, se adicionaron 0.15 mL de NaNO_2 al 5% y se dejó reposar la muestra durante 6 min en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 0.15 mL de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar 6 min nuevamente en oscuridad. A continuación, se adicionaron 2 mL de NaOH al 4% y 0.2 mL de agua destilada para aforar a 5 mL. Finalmente, las muestras se leyeron a 510 nm en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA). Los resultados fueron expresados en μ g de catequina mL^{-1} (μ g EPC mL^{-1}).

Antocianinas

Para medir la concentración de antocianinas, se utilizó un estándar de cianidina clorada. Se construyó una curva de calibración, la cual fue de 5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Después, se procedió a medir la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA), a 535 nm. Los resultados fueron reportados en μg de cianidina clorada mL^{-1} ($\mu\text{g CC mL}^{-1}$).

Taninos condensables

Para determinar contenido de taninos condensables o proantocianidinas se utilizó el método descrito por Price et al., (1978) con algunas modificaciones. Se tomaron 20 μL del extracto, se agregaron 180 μL de metanol y la mezcla se agitó. Luego se agregó 1.2 mL de vainillina (grado analítico, Merck) al 4% p/v en metanol (grado analítico, Merck). Finalmente, se agregaron 600 μL de HCl concentrado y protegido de la luz por 30 min. Se midió absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó una curva de calibración con (+)-catequina (EPC) de 2 a 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El contenido se expresó en μg equivalentes de catequina por mL^{-1} ($\mu\text{g EPC mL}^{-1}$).

Ensayo ABTS

Se usó el ensayo ABTS descrito por (Re et al., 1999) adaptado a microplacas para determinar la capacidad antioxidante de los tratamientos de separación basados en “Muestra”. Para ello se procedió a realizar la disolución del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ empleando disoluciones de ABTS (7.4 mM) y persulfato de sodio (2.6 mM); se mezclaron volúmenes iguales de las disoluciones y se permitió reposo a temperatura ambiente durante 16 horas en oscuridad. Posteriormente se diluyeron 600 μL de la mezcla y se aforaron con metanol puro para encontrar una absorbancia entre 0.7 y 1.2. En los pozos de la microplaca se mezclaron 20 μL de la disolución estándar de Trolox (curva patrón) o de la muestra problema y 180 μL de disolución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Como blanco se añadieron 200 μL de la disolución $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Se dejó reaccionar durante 10 min a oscuridad y finalmente se leyó a una absorbancia de 734 un lector de microplacas (Synergy 2 Microplate

reader, Biotek International, Software Gen5). Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por mililitro de muestra ($\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$). La curva que se obtuvo se utilizó para determinar la capacidad antioxidante de las muestras, en donde el intervalo fue de 50 a 600 μM .

Ensayo FRAP

El ensayo FRAP (Benzie & Strain, 1996) se usó para determinar la actividad antioxidante en tratamientos de separación basados en “Muestra” adaptado a microplacas. Se prepararon tres disoluciones: buffer de acetatos (4.624 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 182 mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) con concentración de 300 mM y pH de 3.6; disolución de 10 mM 2, 4, 6 Tripiridil-s triazina (TPTZ) para lo cual se pesaron 31.23 g en 10 mL de HCl 40 mM; disolución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20Mm (Iron (III) clorado hexahidratado) en donde se pesaron 54.03 g que se añadieron a 10 mL de H_2O destilada. A continuación, se mezclaron 10 mL de buffer de acetatos, 1 mL de solución TPTZ Y 1 mL de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para formar la disolución FRAP. En los pozos de una microplaca se mezclaron 20 μL las disoluciones de Trolox (curva patrón) o de la muestra problema, 180 μL de la disolución FRAP y 60 μL de H_2O destilada. Se dejó reaccionar por 10 minutos a oscuridad y finalmente se tomó lectura de absorbancia en un lector de microplacas (Synergy 2 Microplate reader, Biotek International, Software Gen5) a 595 nm. Los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox por mililitro de muestra ($\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$). La curva que se obtuvo se utilizó para determinar la capacidad antioxidante de las muestras, en donde el intervalo fue de 50 a 600 μM .

4.2.4 Análisis de datos

Los datos se analizaron, primero, para comparar el potencial del método de ATPE basado en muestra liofilizada incorporada a los sistemas (basados en Muestra), en relación con la estrategia de la obtención previa de un extracto y el uso de éste como disolvente en los sistemas de separación (basados en Extracto). El experimento consistió así en un arreglo factorial 2×4 , alojado en un diseño completamente al azar, donde un factor de variación fue el material de origen de

compuestos (Extracto o Muestra) y el otro el sistema ATPE utilizado, con dos niveles ($\text{Na}_3\text{Cit-Peg4000}$ y $\text{MgSO}_4\text{-Peg4000}$). Posteriormente, el análisis se centró en la estrategia basada en Muestra y se condujeron evaluaciones congruentes con arreglos factoriales alojados en diseños completamente al azar que tuvieron como factores de variación al sistema ATPE ($\text{Na}_3\text{Cit-Peg4000}$ y $\text{MgSO}_4\text{-Peg4000}$) y a la posición a lo largo de la línea principal de operación o a la longitud de ésta y las líneas secundarias. Los datos de relación de volúmenes, coeficientes de partición y rendimiento de separación se sometieron a análisis de varianza y a rutinas de comparación de medias de tratamiento con la prueba de Tukey, con nivel de significancia de 0.05. Todas las evaluaciones se condujeron por triplicado. Todo el análisis se realizó con el programa SAS (SAS Institute, 1999).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Potencial de formación de sistemas binodales

El método del punto de turbidez (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019; Sadeghi & Maali, 2016) permitió verificar que las mezclas de polietilenglicol 4000 (Peg4000) con citrato de sodio (Na_3Cit) o sulfato de magnesio (MgSO_4) pueden formar sistemas bifásicos a partir de ciertas concentraciones mínimas.

Las Figuras 4a y 4c muestran los datos binodales determinados experimentalmente, los cuales delimitan, hacia la izquierda y abajo, la región de concentraciones donde las mezclas forman una solución verdadera en una sola fase y, hacia la derecha y arriba, la región donde el sistema forma dos fases líquidas inmiscibles. Con esta base, los sistemas (MgSO_4 -Peg4000) y (NaCit -Peg4000) tienen potencial para ser usados en procedimientos de separación de compuestos con la técnica de extracción acuosa en dos fases (Seader et al., 2011). Los datos binodales de los dos sistemas se ajustaron bien a la Ecuación (3) (Merchuk et al., 1998) (Figuras 4a y 4c), con coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0.99. Las constantes de regresión k_1 (%), k_2 ($\%^{-0.5}$) y k_3 ($\%^{-3}$) tuvieron valores de 81.44, -0.46 y 0.0003 en el sistema Na_3Cit -Peg4000 y de 69.09, -0.60 y 0.001 en el sistema MgSO_4 -Peg4000, respectivamente, con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los valores correspondientes (Cuadro 8). Los valores de las tres constantes fueron del mismo orden de magnitud que las reportadas por otros autores para otros sistemas basados en polietilenglicol (Domínguez-Puerto et al., 2018; Ghaffari, Shahrouzi, Tow, & Khoshfetrat, 2019; González-Amado, Rodil, Arce, Soto, & Rodríguez, 2016). Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama (2019) reportaron los valores de 79.87, -0.43 y 0.0002 para la mezcla de citrato de sodio con polietilenglicol 2000, lo que sugiere que la diferencia en peso molecular del Peg no afectó significativamente el límite de la región bifásica.

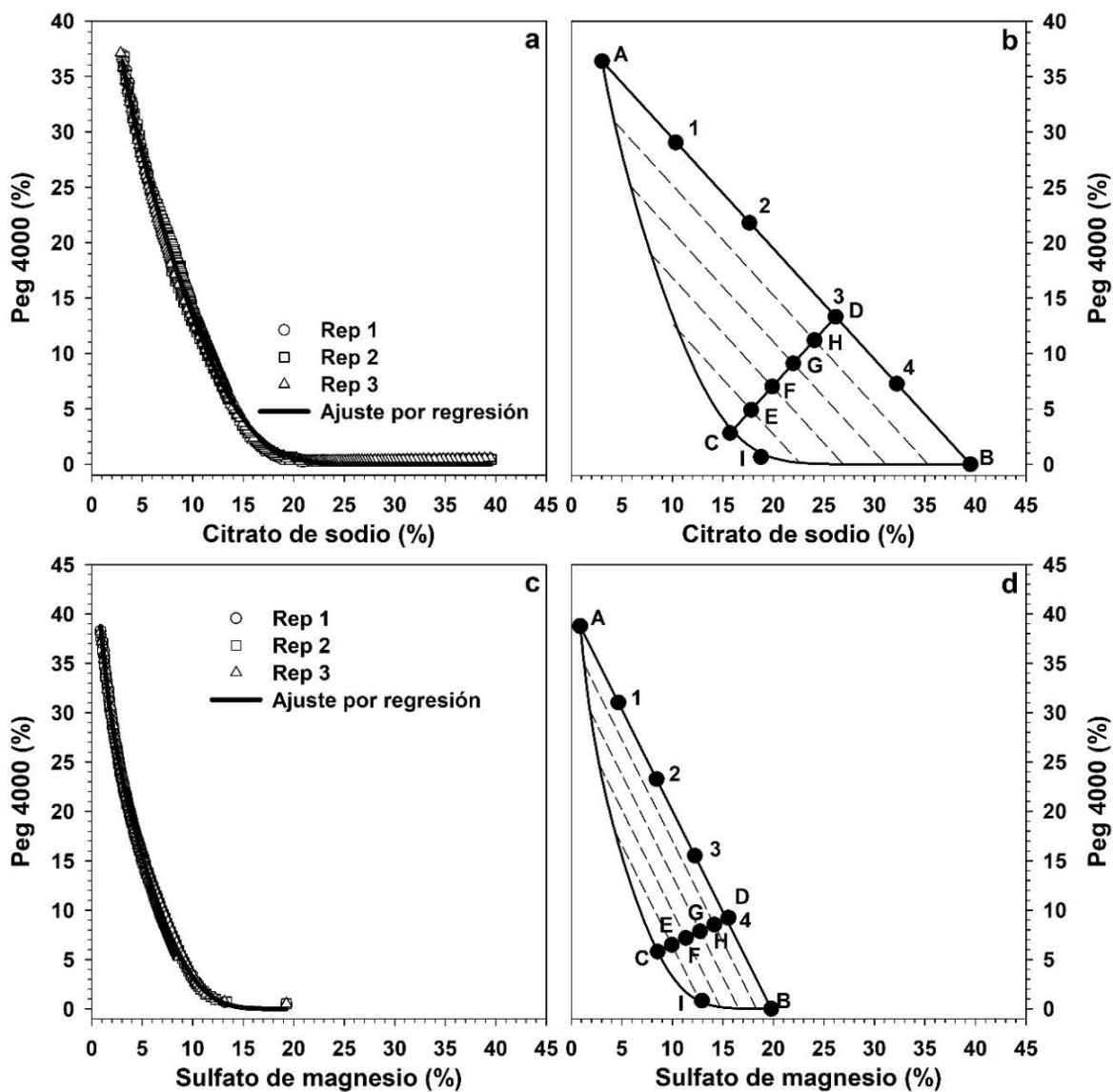


Figura 4. Diagramas binodales de fase de los sistemas Na₃Cit-Peg4000 (a y b) y MgSO₄-Peg4000 (c y d). Los recuadros a y c muestran información experimental. La notación 1 a 4 y A a H indican condiciones evaluadas en la separación de compuestos bioactivos. Rep indica repetición.

Cuadro 8. Características de diagramas de fase correspondientes a los sistemas Na₃Cit-Peg4000 y MgSO₄-Peg4000.

Sistema	Na ₃ Cit-Peg4000	MgSO ₄ -Peg4000	CV (%)	HSD
<u>Ecuación (3) (Merchuk et al. (1998))</u>				
k_1 (%)	81.44 a ^z (3.7002)	69.09 b (0.54)	6.04	10.38
k_2 (% ^{-0.5})	-0.46 a (0.03)	-0.60 b (0.008)	6.04	0.07
k_3 (% ⁻³)	0.0004 b (1.9×10 ⁻⁵)	0.001 a (4.19×10 ⁻⁵)	7.57	0.0001
$r^2_{Merchuk}$	0.99 a (0.0003)	0.99 a (0.0003)	0.06	0.0013
<u>Ecuación (7) (Guan et al., 1993; Gomez et al., 2017)</u>				
V_{213} (g mol ⁻¹)	172.15 b (4.57)	216.31 a (3.03)	3.46	15.23
f_{213} (adim)	0.36 b (0.08)	0.96 a (0.06)	18.19	0.27
$r^2_{Ec.7}$	0.99 a (0.002)	0.99 a (0.0005)	0.21	0.005
<u>Ecuaciones (9 y 10) (Guan et al., 1993; Gomez et al., 2017)</u>				
k_8 (adim)	-5.53	-6.3379	--,--	--,--
k_9 (adim)	74.76	89.4859	--,--	--,--
$r^2_{Ec.10}$	0.99	0.9921	--,--	--,--
<u>Área bajo la curva</u>				
A_{ub} (% ²)	217.19 a (2.16)	151.51 b (0.58)	1.48	6.20
A_w (% ²)	457.96 a (6.29)	205.06 b (0.30)	2.33	17.48
S_{TL}	-0.98 (0.004)	-2.05 (0.002)	--,--	--,--

Adim: adimensional; k_1 , k_2 , k_3 , k_5 , k_8 y k_9 son constantes de regresión; r^2 es coeficiente de determinación; V_{213} es volumen efectivo excluido por concentración salina; f_{213} es un parámetro asociado con el coeficiente de actividad; A_{ub} es área bajo la curva binodal, A_w es área bajo la línea principal de operación; S_{TL} es pendiente de la línea principal de operación; CV es coeficiente de variación, HSD es diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). ^zLetras diferentes indican diferencia significativa. Los valores entre paréntesis son errores estándar.

La representación de datos binodales ha sido motivo de estudio en diversos trabajos. En virtud del fenómeno de equilibrio líquido-líquido que ocurre con la formación de sistemas bifásicos, se han aplicado criterios basados en la energía libre de Gibbs de exceso, que consideran interacciones de corto, intermedio o largo rango entre iones (Bakhshi & Mobalegholeslam, 2017; Pirdashti, Movagharnejad, Mobalegholeslam, & Pirdashti, 2016). Al respecto, se han aplicado modelos termodinámicos como el UNIQUAC (Bordón, Farias, Igarashi-Mafra, & Mafra, 2018; Gomes et al., 2017; Pirdashti et al., 2016), el NRTL (Gebreyohannes, Neely, & Gasem, 2014) (Zafarani-Moattar, Shekaari, & Jafari, 2019; Zafarani-Moattar, et al., 2019) y el Chen-NRTL (Jimenez, Galleguillos, & Claros, 2016). Sin embargo, en virtud del objetivo del presente trabajo se optó por el ajuste de los datos a la ecuación de Merchuk (Merchuk et al., 1998), que constituye una alternativa experimental y el alto valor del coeficiente de determinación obtenido sugirió que tal modelo representó en forma adecuada la información obtenida sobre la localización de la curva binodal de los sistemas Na_3Cit -Peg4000 y MgSO_4 -Peg4000.

La formación de un sistema bifásico se asocia con una reducción de la energía libre de Gibbs y ocurre por una segregación derivada de una interacción más favorable entre componentes similares, polímero-polímero o sal-sal (da Rocha et al., 2011). En la medida que se incrementa la concentración de sal, ya sea Na_3Cit o MgSO_4 la interacción de iones en solución con el agua se incrementa y ello causa una reducción en la interacción de las cadenas de polímero con el disolvente, lo que se traduce en una disminución de la solubilidad. A este fenómeno se le conoce como un efecto de exclusión salina o *salting-out*, y es lo que causa la formación de dos fases inmiscibles (Sadeghi & Jahani, 2012).

La capacidad de exclusión salina o capacidad *salting-out* de un sistema ha sido explicada a partir de la propuesta de Guan et al. (1993), con base en el concepto de que, macroscópicamente, cualquier especie molecular en una solución se distribuye aleatoriamente y cualquier composición del sistema sobre la curva binodal es una solución geoméricamente saturada de un soluto en la presencia

de otro (Wang, Wang, Han, Hu, & Yan, 2010). Guan et al. (1993), explicaron que la capacidad de exclusión salina de un sistema puede describirse por medio de un volumen excluido efectivo (VEE), que para una mezcla ternaria formada, como en el presente trabajo, por polietilenglicol (componente 1), una sal (Na_3Cit o MgSO_4 ; componente 2) y agua (componente 3), significa el espacio mínimo, denotado como V_{213} , donde un componente del tipo 1 aceptará la presencia o interacción con un componente del tipo 2, lo que refleja la compatibilidad de los componentes en el mismo sistema acuoso (componente 3) (Wang et al., 2010). Cuanto mayor es el valor de VEE (V_{213}), el sistema presenta mayor capacidad de exclusión salina, lo que significa que se requiere menor concentración de los componentes para formar un sistema bifásico (Ghaffari et al., 2019; Gomes et al., 2017). En el presente trabajo, el sistema formado por MgSO_4 -Peg4000 presentó valor significativamente mayor ($p \leq 0.05$) de V_{213} (216.3 g mol^{-1}) que el formado por Na_3Cit -Peg4000 (172.1 g mol^{-1}), lo que indicó mayor capacidad de exclusión salina del primero en relación con el segundo, con lo cual se requieren mayores concentraciones de citrato de sodio que de sulfato de magnesio para formar un sistema bifásico, y ello se manifiesta por un desplazamiento mayor hacia la izquierda de la curva binodal de MgSO_4 -Peg4000 (Ghaffari et al., 2019).

Gomez et al. (2017) sugirieron que a medida que el valor del volumen excluido efectivo se incrementa el área de la región bifásica es mayor. Sin embargo, este hecho no fue encontrado en el presente trabajo, pues los mayores valores de área de la región bifásica, definida en el presente trabajo como área de trabajo (A_w), se encontraron en el sistema basado en Na_3Cit y los menores en el sistema que usó MgSO_4 . (Cuadro 8). Al respecto, la región bifásica está delimitada por la línea principal de operación y el punto extremo (B; Figuras 4b y 4d) está determinado por el estado binodal de mayor concentración salina, lo cual depende de la solubilidad de la sal utilizada. En virtud de que el Na_3Cit es más soluble en agua que el MgSO_4 , puede esperarse mayor área de región bifásica en el caso de la sal de sodio. Por otro lado, la mayor capacidad de exclusión salina del sistema con MgSO_4 se correlacionó con menores valores de área bajo

la curva binodal, y ello es congruente con un desplazamiento de la misma hacia la izquierda.

Los valores de la fracción de volumen no ocupado (f_{213}) fueron mayores en el sistema con sulfato de magnesio (0.96) que en el sistema con citrato de sodio (0.36) (Cuadro 8). El valor de f_{213} se ha asociado con un coeficiente de actividad y depende de la forma geométrica relativa, del tamaño y de la interacción entre moléculas distintas. En la medida que la interacción entre moléculas aumenta el valor de f_{213} se hace despreciable (Wang et al., 2010), lo cual no ocurrió en el presente trabajo y esta situación indicó presencia de interacción entre moléculas de polietilenglicol y citrato de sodio o sulfato de magnesio, siendo mayor en este último caso. Los valores de V_{213} y f_{213} se obtuvieron mediante rutinas de regresión que ajustaron los datos binodales a la Ecuación (7). Sin embargo, el uso de todo el rango de datos binodales en el ajuste causó valores de coeficientes de determinación (r^2) bajos, donde la significancia estadística de la constante k_5 era menor a 95% (datos no mostrados). El efecto de exclusión salina ocurre con la contribución de ambos componentes (Peg y sal). A medida que disminuye la concentración de Peg se incrementa la cantidad necesaria de sal para generar el sistema bifásico y viceversa, de forma que en ambas fases se mantienen condiciones de saturación (Guan et al., 1993). En algún momento, el rol del polímero sobre el efecto de exclusión salina se minimiza y a partir de allí la curva binodal muestra independencia de la concentración del polímero. Es decir, que a partir de esa condición el efecto de exclusión salina o *salting-out* queda a cargo sólo de la sal. En el presente trabajo, las rutinas de regresión se ensayaron con estrategias de eliminación secuencial de datos binodales de la región inferior a partir del punto B (Figuras 4b y 4d), hasta encontrar significancia estadística ($p \leq 0.05$) en las tres constantes, k_5 , k_6 y k_7 , de la Ecuación (7), lo cual ocurrió a partir de la condición ($18.77 \pm 0.034\%$, $0.66 \pm 0.024\%$) en el sistema Na_3Cit -Peg4000 y en la condición (12.93 ± 0.033 , $0.82 \pm 0.104\%$) en el sistema MgSO_4 -Peg4000, las cuales están identificadas por el punto I en las Figuras 4b y 4d, respectivamente.

4.3.2 Diagramas binodales de fases

Con base en las constantes de regresión k_1 , k_2 y k_3 asociadas a la Ecuación (3) se realizó la representación ajustada de los datos binodales de cada sistema (Figuras 4b y 4d). Los estados de mayor concentración de polímero y mayor concentración de sal se localizaron en las condiciones A(3.0460, 36.3748%) y B(39.52, $9.75 \times 10^{-10}\%$) en el sistema Na_3Cit -Peg4000 y en las condiciones A(0.87, 38.76%) y B(19.80, $6.65 \times 10^{-4}\%$) en el sistema MgSO_4 -Peg4000, respectivamente. Sobre los diagramas se trazó la línea principal de operación de cada sistema con pendiente (S_{TL}) de -0.98 y -2.05 en los sistemas con Na_3Cit y MgSO_4 , respectivamente (Cuadro 8). Con esta información y el uso de las Ecuaciones (3) y (5) se localizó el punto crítico en la condición C(15.72, 2.81%) para el caso Na_3Cit -Peg4000 y en la condición C(8.54, 5.80%) en el caso MgSO_4 -Peg4000, lo que confirmó que se requieren menos concentraciones de sal en el segundo caso, en relación al primero, para formar un sistema bifásico. Con objeto de evaluar el efecto de la reducción de polímero y el aumento de sal en la mezcla, sobre la línea principal de operación de cada sistema se identificaron cuatro condiciones rotuladas con los puntos 1, 2, 3 y 4, que correspondieron a las concentraciones 1(3.05, 36.37%), 2(10.34, 29.05%), 3(24.94, 14.53%) y 4(32.22, 7.26%) en el sistema Na_3Cit -Peg2000 y 1(4.66, 31.01%), 2(8.44, 23.26%), 3(12.23, 15.51%) y 4(16.01, 7.75%) en el sistema MgSO_4 -Peg4000. Asimismo, con objeto de evaluar el efecto de la longitud de la línea de operación (T_{LL}) se identificaron cinco condiciones a lo largo de una línea perpendicular a la línea principal, que partió del punto crítico en cada sistema, las cuales se rotularon como E, F, G, H y D, siendo esta última la intersección de la línea principal de operación y su perpendicular. El Cuadro 9 muestra las concentraciones de sal y polímero correspondientes a cada uno de estos estados. A través de cada punto sobre la línea perpendicular se trazaron líneas secundarias, cuya longitud varió en el rango de 17.67 a 51.52% en el sistema con Na_3Cit y de 19.26 a 43.14% en el sistema con MgSO_4 (Cuadro 9). La composición de las intersecciones de cada línea con la curva binodal se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Composición de puntos de referencia sobre la línea perpendicular a las líneas de operación e intersecciones con la curva binodal en los diagramas de fase mostrados en las Figuras 4b y 4d.

Referencia	Composición		Fase superior		Fase inferior		T_{LL} (%)
	global						
	x_S (%)	y_P (%)	x_S^t (%)	y_P^t (%)	x_S^b (%)	y_P^b (%)	
<u>Sistema Na₃Cit-Peg4000</u>							
A-D-B	26.16	13.30	3.05	36.37	39.52	9.75×10^{-10}	51.51
H	24.07	11.20	4.21	30.98	35.32	6.20×10^{-07}	43.91
G	21.98	9.10	5.74	25.23	31.13	3.65×10^{-05}	35.79
F	19.90	7.006	7.67	19.18	26.93	3.08×10^{-03}	27.18
E	17.81	4.91	10.12	12.56	22.65	0.09	17.67
<u>Sistema MgSO₄-Peg4000</u>							
A-D-B	15.56	9.22	0.87	38.76	19.80	0.00066	43.14
H	14.15	8.53	1.27	34.93	18.32	0.0046	38.86
G	12.75	7.85	1.85	30.18	16.57	0.03	33.55
F	11.35	7.16	2.75	24.78	14.76	0.17	27.38
E	9.95	6.48	4.29	18.07	12.74	0.75	19.27

T_{LL} indica las longitudes de las líneas de operación (%).

Los datos de intersección de las líneas de operación se ajustaron bien a la Ecuación (10), con coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0.99 en ambos sistemas. El coeficiente de exclusión salina o coeficiente de *salting-out*, denotado como k_9 , fue mayor en el sistema MgSO₄-Peg4000 (89.49) que en el sistema Na₃Cit-Peg4000 (74.76) (Cuadro 8), lo que confirmó que el sulfato de magnesio tuvo mayor capacidad de exclusión salina que el citrato de sodio. Gomez et al. (2017) reportaron valores de coeficiente de exclusión salina para sales de magnesio y de sodio en el rango de 11 a 13 para MgSO₄, pero en mezcla con 2-propanol. También Rico-Castro, González-Amado, Soto, & Rodríguez (2017) reportaron valores del coeficiente de exclusión salina en el rango de 5 a 8 para sales de sodio, utilizando poli (etilenglicol-ran-propilenglicol) monobutil éter como

componente polimérico, lo que sugiere que la mezcla con Peg4000 puede causar mayor efecto de exclusión salina.

4.3.3 Separación de compuestos bioactivos

Sistemas generales de separación

Se prepararon sistemas ATPE para separar compuestos bioactivos a partir de cáscara de aguacate 'Hass'. Los sistemas se basaron en dos materiales fuente (Extracto metanólico y Muestra liofilizada) y dos sistemas ATPE (Na_3Cit -Peg4000 y MgSO_4 -Peg4000). La comparación general de sistemas se apoyó en la separación de fenoles solubles (f_{st}), cuya presencia en las mezclas, dada por la masa total de estos compuestos (E_{tsf} , μg), se afectó de manera significativa ($p \leq 0.05$) por el origen de compuestos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($F_{0.05}$) con ($\alpha = 0.05$) y valores F correspondientes al análisis de varianza de parámetros de separación de fenoles solubles a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' mediante extracción acuosa en dos fases desarrollada en distintas condiciones sobre las líneas principales de operación y afectadas por la longitud de la línea de operación.

Var	Factor de variación						Error	VC
	A	S	PL	A×S	A×PL	S×PL		
df	1	1	3	1	3	3	35	--,--
$F_{0.05}$	4.12	4.12	2.87	4.12	2.87	2.87	--,--	--,--
<u>Parámetros generales de separación</u>								
E_{TSP}	7.33*	5.24*	23.32*	20.10*	7.83*	12.38*	--,--	13.61
<u>Parámetros de separación afectados por la posición sobre la línea de operación</u>								
Vr	9.95*	5.30*	608.93*	7.57*	3.31*	2.03ns	--,--	16.57
K_{TSP}	0.32ns	7.66*	165.19*	5.05*	4.34*	8.51*	--,--	13.19
C_{tsp}^{sup}	1.60ns	61.60*	229.20*	7.17*	9.89*	4.35*	--,--	11.14
Y_{tsp}^t	9.75*	16.92*	82.02*	1.32ns	5.57*	13.69*	--,--	0.53

Cuadro 10. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F0.05) con ($\alpha = 0.05$) y valores F correspondientes al análisis de varianza de parámetros de separación de fenoles solubles a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' mediante extracción acuosa en dos fases desarrollada en distintas condiciones sobre las líneas principales de operación y afectadas por la longitud de la línea de operación (Continuación).

Var	Factor de variación						Error	VC
	A	S	PL	A×S	A×PL	S×PL		
C_{Flav}^{sup}	78.27*	346.22*	55.59*	79.14*	9.51*	9.64	--.--	21.97
C_{Tani}^{sup}	4.73*	9.36*	95.94*	8.23*	3.37*	7.67*	--.--	32.73
Parámetros de separación afectados por la longitud de la línea de operación								
Vr	1.92ns	364.27*	9.31*	20.55*	15.73*	3.37*	--.--	12.53
K _{tsp}	111.15*	207.04*	39.13*	219.64*	0.91ns	30.47*	--.--	15.99
C_{TSP}^{sup}	38.51*	67.32*	4.10*	24.58	3.62*	2.38ns	--.--	25.78
Y_{tsp}^t	14.00*	7.78*	11.40*	12.05*	9.40*	10.59*	--.--	14.07
C_{Flav}^{sup}	238.20*	802.10*	0.55ns	295.60*	1.69ns	0.80ns	--.--	15.61
C_{Anto}^{sup}	577.83*	758.91*	3.99*	1020.5*	16.74*	8.35*	--.--	8.26
C_{Tani}^{sup}	2.16ns	154.44*	40.36*	37.83*	5.97*	1.90ns	--.--	10.87

Var: Variable; A: factor de variación dado por el origen de compuestos bioactivos (extracto o muestra); S: factor de variación dado por el sistema ATPE (Na₃Cit-Peg4000 o MgSO₄-Peg4000); PL: factor de variación dado por la condición o punto en el diagrama de fases (puntos sobre la línea principal o puntos sobre la perpendicular); A×S, A×PL, S×PL: interacciones entre factores de variación; df: grados de libertad; VC: coeficiente de variación (%); Vr: relación de volúmenes; K: coeficiente de partición; Y: rendimiento de separación; TSP: fenoles solubles totales; Flav: flavonoides; Anto: antocianinas; Tani: taninos condensables. El símbolo * indica que al menos un nivel dentro del factor de variación produjo un efecto diferente al resto ($\alpha=0.05$). El símbolo ns indica que no hubo diferencia significativa entre los niveles al interior del factor de variación ($\alpha=0.05$).

Relación de volúmenes

La relación de volúmenes (Vr) se afectó por el sistema ATPE utilizado, por la condición elegida sobre la línea de operación y por la longitud de ésta ($p \leq 0.05$). En el caso del efecto del origen de los compuestos, éste fue significativo sólo cuando la condición varió a lo largo de la línea de operación, pero no hubo efecto

por la longitud de la misma ($p > 0.05$), aunque las interacciones entre los tres factores de variación fueron significativas, tanto cuando se evaluó la condición sobre la línea de operación, como cuando se analizó el efecto de la longitud de ella (Cuadro 10). El análisis estadístico de efectos mayores mostró que la relación de volúmenes fue mayor en el sistema que partió de un extracto metanólico (1.96) que en el basado en muestra liofilizada (1.68). En cuanto al sistema ATPE utilizado, el mayor valor se encontró cuando se usó MgSO_4 en mezcla con Peg4000 (1.92), en relación al que usó Na_3Cit (1.72) (Cuadro 11).

Los sistemas que usaron Extracto como disolvente de los componentes tuvieron mayor presencia de fenoles solubles que los que incorporaron directamente muestra liofilizada, lo cual era un resultado esperado, por la doble extracción de las muestras tratadas con metanol 80%, de donde se obtuvo el material fuente de los primeros. Sin embargo, la extracción conseguida en los sistemas basados en Muestra liofilizada se consideró aceptablemente alta, pues fue equivalente al 89.9% del contenido de los sistemas basados en Extracto.

El uso de solventes orgánicos es una vertiente que ha ganado aceptación en los sistemas ATPE (Hou et al., 2017; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019; Xavier, Freire, Vidal-Tato, & González-Álvarez, 2015), pues es más sencilla la recuperación de los compuestos bioactivos de interés por vaporización del solvente (Gomes et al., 2017), y la mayor presencia de fenoles solubles en los sistemas basados en los tratamientos con Extracto sugiere que la separación de estos compuestos podría mejorarse con sistemas que extrajeran directamente las sustancias sin utilizar un acondicionamiento previo.

Cuadro 11. Comparación de medias correspondientes a la relación de volúmenes (V_r), extracción (E), concentración en fase superior (C_{tsp}^t , $\mu\text{g g}^{-1}$), coeficientes de partición (K) entre fases y rendimiento de separación de fenoles solubles totales (TPS), en sistemas de extracción acuosa en dos fases.

Fuente de variación	E_{tsp} (μg)	V_r	K_{tsp}	C_{tsp}^t (%)	Y_{tsp}^t (%)
<u>Efecto del origen de compuestos (A)</u>					
Extracto	16485.1 a ^z	1.96 a	84.17 a	2467.15 a	98.47 a
	(801.2)	(0.42)	(9.15)	(286.25)	(0.21)
Muestra	14818.6 b	1.6817 b	86.01 a	2569.43 a	97.10 b
	(964.2)	(0.37)	(7.02)	(192.30)	(0.37)
HSD	1249.2	0.1766	6.5809	164.41	0.31
<u>Efecto del sistema ATPE (S)</u>					
Na ₃ Cit-Peg4000	16356.2 a	1.72 b	89.58 a	2836.09 a	97.92 b
	(1075.9)	(0.41)	(6.64)	(222.82)	(0.38)
MgSO ₄ -Peg4000	14947.6 b	1.92 a	80.61 b	2200.49 b	98.55 a
	(656.7)	(0.38)	(9.33)	(246.40)	(0.17)
HSD	1249.2	0.18	6.58	164.41	0.31
<u>Efecto de la longitud de la línea de operación (TLL)</u>					
A-D-B	0.53 a	12853.9 a	83.18 a	2238.94 ab	96.87 a
	(0.04)	(2431.8)	(12.93)	(275.15)	(0.84)
H	0.53 a	9365.8 b	73.72 a	2055.69 ab	95.78 a
	(0.05)	(1046.0)	(12.57)	(244.08)	(0.67)
G	0.52 a	10990.4 ab	75.05 a	2433.61 ab	96.10 a
	(0.05)	(1063.9)	(11.85)	(283.70)	(0.46)
F	0.50 a	11481.2 a	58.18 b	2558.70 a	94.65 a
	(0.05)	(1064.7)	(10.16)	(294.88)	(0.68)
E	0.41 b	12629.2 a	37.23 c	1835.06 b	71.03 b
	(0.08)	(1547.8)	(8.93)	(477.83)	(12.38)
HSD	0.07	2113.4	10.75	630.29	13.85
<u>Posición sobre la línea de operación (PTL)</u>					
1	4.93 a	17669.2 a	42.34 d	1294.81 d	99.49 a
	(0.20)	(1121.5)	(1.46)	(97.50)	(0.04)

Cuadro 11. Comparación de medias correspondientes a la relación de volúmenes (V_r), extracción (E), concentración en fase superior (C_{tsp}^t , $\mu\text{g g}^{-1}$), coeficientes de partición (K) entre fases y rendimiento de separación de fenoles solubles totales (TPS), en sistemas de extracción acuosa en dos fases (Continuación).

Fuente de variación	E_{tsp} (μg)	V_r	K_{tsp}	C_{tsp}^t (%)	Y_{tsp}^t (%)
2	1.53 b (0.08)	18203.3 a (903.0)	66.25 c (1.68)	1938.35 c (125.14)	98.99 a (0.04)
3	0.60 c (0.05)	15021.6 b (900.7)	92.14 b (3.30)	2695.40 b (192.54)	98.10 b (0.10)
4	0.22 d (0.02)	11713.5 c (1237.8)	139.64 a (6.63)	4144.61 a (161.39)	96.35 c (0.49)
HSD	0.33	2346.9	12.36	308.87	0.58

Na₃Cit-Peg4000 y MgSO₄-Peg4000: Sistemas ATPE formados con citrato de sodio y sulfato de magnesio con polietilenglicol 4000; ADB, E, F, G y H: puntos de referencia sobre líneas de operación principal y secundarias; los puntos 1, 2, 3 y 4 localizan mezclas sobre la línea de operación principal. HSD: diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05); ²Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 0.05). Se muestra entre paréntesis el error estándar.

De acuerdo con otros trabajos (Hou et al., 2017; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019; Xavier et al., 2015), compuestos como los fenoles solubles exhiben tendencia a migrar hacia la fase superior formada principalmente por un polímero como polietilenglicol o un solvente como acetona o etanol. En la medida que la fase superior sea más pequeña, ese tipo de compuestos quedarán en mayor concentración, por lo que la estrategia basada en muestra liofilizada y el sistema que utiliza citrato de sodio permitirá obtener mayor concentración de los compuestos de interés en la fase superior.

La interacción entre el factor correspondiente al material de origen y la composición del sistema ATPE fue significativa ($p \leq 0.05$; Cuadro 10), lo cual ocurrió porque en la región superior de la línea de operación se produjeron diferencias entre mezclas, pero a medida que aumentó la concentración de sal y disminuyó la de Peg4000 los valores de V_r tendieron a un valor similar (Figura 5a). A medida que se utilizó una condición con mayor concentración de sal y menor de Peg4000 el volumen de la fase superior de los sistemas se redujo y el

de la fase inferior se incrementó, de forma que en la región alta de los diagramas de fase (Figuras 4b y 4d) la fase superior fue en promedio 4.9 veces mayor que la inferior, pero a medida que se redujo el componente polimérico la relación de volúmenes (V_r) alcanzó valores menores a la unidad y disminuyó a valores de 0.22 en la región baja de los diagramas (Cuadro 11). Con ello, el incremento de sal y reducción de Peg4000 puede causar un incremento de la concentración de los compuestos que migren hacia la fase superior de los sistemas de separación. Por otro lado, el análisis del efecto de la longitud de la línea de operación ($T_{LL}, \%$) mostró que a medida que se elige una condición más alejada del punto crítico (Figuras 4b y 4d) la relación de volúmenes (V_r) se incrementa en forma logarítmica de acuerdo con un modelo [$V_r = -1.2288 + 1.7594 \times (1 - \exp(-0.1448 \times T_{LL}))$; $r^2 = 0.9997$], aunque, en virtud de que los puntos comparados se localizan a aproximadamente la misma posición relativa de las líneas de operación, la variación de la relación de volúmenes fue en realidad pequeña (Figura 5b).

Coeficiente de partición de fenoles solubles

La partición de fenoles solubles entre las dos fases de los sistemas ATPE, representada por un coeficiente K_{tsp} (adimensional), no se afectó por el origen de los compuestos ($p \leq 0.05$; Cuadro 10), de manera que, en promedio, los valores encontrados variaron entre 84 y 86, sin diferencia significativa entre los manejos basados en Extracto y Muestra liofilizada (Cuadro 11). Este resultado es significativo, pues sugiere que la separación de compuestos fenólicos en la fase superior de los sistemas basados en muestra liofilizada fue similar a la que puede lograrse con un manejo basado en Extracto, que constituyó la referencia a alcanzar.

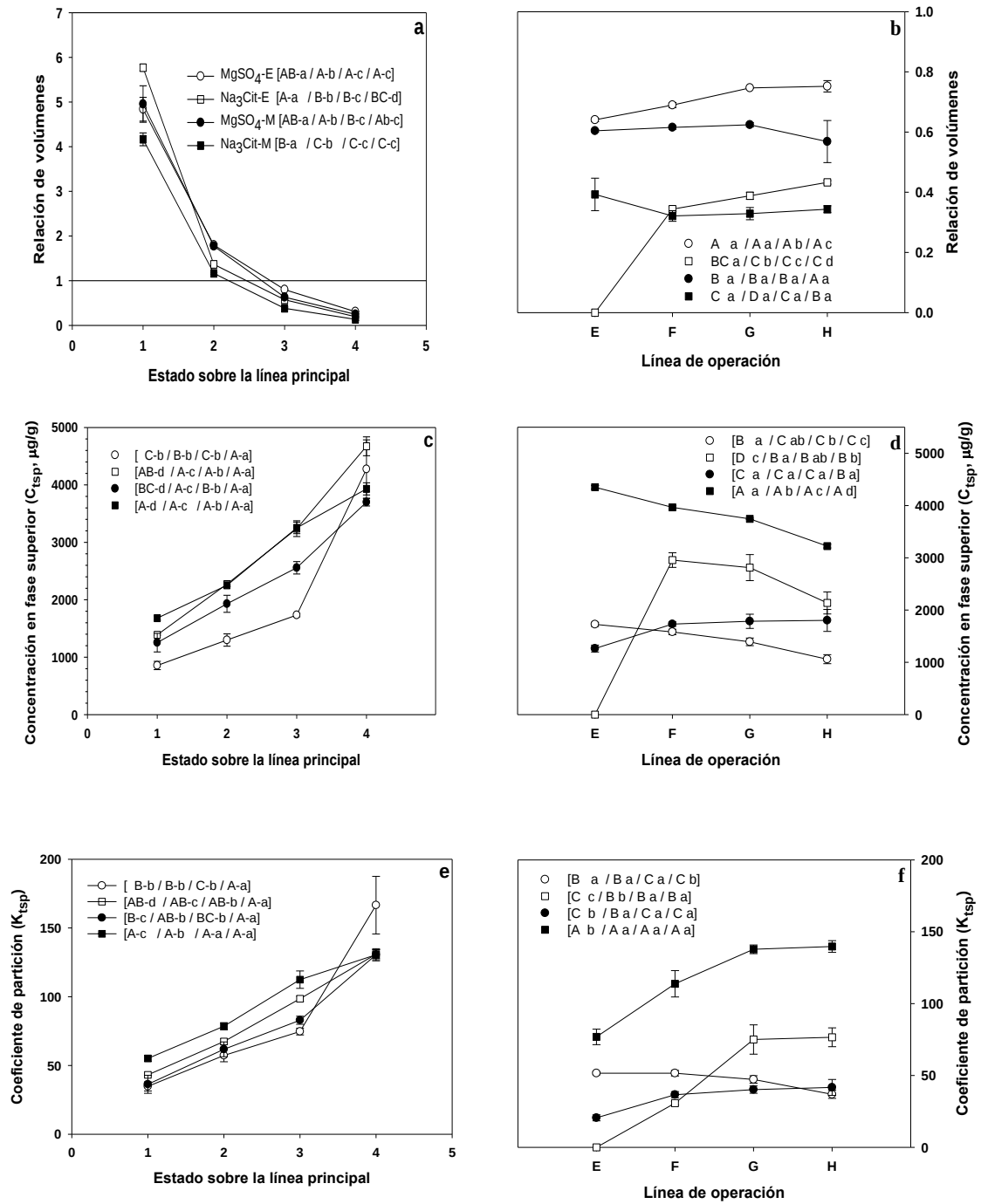


Figura 5. Variación de la relación de volúmenes (V_r), concentración de fenoles solubles en fase superior (C_{tsp}) y coeficiente de partición (K_{tsp}) de fenoles solubles afectados por la variación de composición a lo largo de la línea de operación y por la longitud de ésta en sistemas ATPE formados por Na_3Cit -Peg4000 y MgSO_4 -Peg4000, durante la separación a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass'. Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa

en cada condición. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa al interior de cada línea (Tukey, 0.05).

La sal utilizada en los sistemas (Na_3Cit o MgSO_4) afectó de manera significativa la partición de fenoles solubles entre las fases, con valores que mostraron que la concentración de la fase superior fue de 80 a 89 veces mayor que la de la fase inferior. El caso basado en Na_3Cit favoreció mayor migración de compuestos hacia la fase superior, lo cual se expresó con mayores valores del coeficiente de partición en relación con los sistemas basados en MgSO_4 . (Cuadro 11). De igual manera, la condición a lo largo de la línea de operación causó modificación del coeficiente de partición (Cuadro 10). A medida que se incrementó la concentración de sal y se redujo la del polímero en la mezcla, el coeficiente de partición se incrementó de forma significativa al pasar de valores de 42.3 en la región alta del diagrama de fases a 139.6 en la región baja. Las interacciones entre los factores de origen de compuestos (A), tipo de sal (S) y posición sobre la línea de operación fueron significativas ($p \leq 0.05$; Cuadro 10). Al respecto, el coeficiente de partición fue estadísticamente similar en los diferentes puntos evaluados entre los sistemas manejados con Extracto y Muestra liofilizada en las mezclas que usaron Na_3Cit , pero esta situación se mantuvo en el caso de las mezclas con MgSO_4 sólo en las condiciones 1, 2 y 3 de la línea principal de operación, pero en la condición 4 el comportamiento basado en MgSO_4 se incrementó significativamente, aunque con variabilidad alta de resultados. Si bien los tratamientos con Na_3Cit basados en Extracto y Muestra y el tratamiento con MgSO_4 basado en Muestra tendieron a un valor similar alrededor de 130, el caso con Extracto- MgSO_4 varió a valores de 167 (Figura 5e).

Por otro lado, K_{tsp} se afectó significativamente ($p \leq 0.05$) por la longitud de las líneas de operación (Cuadro 10) y a medida que éstas fueron más largas se incrementó el coeficiente de partición, desde valores cercanos a 37 en la región cercana al punto crítico, hasta valores entre 73 y 83 en las líneas de mayor extensión (Cuadro 11). El efecto de la longitud de la línea de operación se desarrolló en interacción significativa con el tipo de sal utilizado (Cuadro 10). En tanto que los sistemas que usaron Na_3Cit mostraron incremento de K_{tsp} a medida

que se incrementó la longitud de líneas, en el caso con MgSO_4 los valores se mantuvieron aproximadamente constantes (Figura 5f). Con base en el comportamiento en función de la condición a lo largo de la línea de operación principal y en función de la longitud de ésta, el sistema con mayor coeficiente de partición fue el que utilizó la Muestra liofilizada y la mezcla de Na_3Cit -Peg4000. A partir de allí, el siguiente mejor sistema fue el que usó la composición de Na_3Cit -Peg4000, pero con Extracto y los sistemas con menores valores de K_{tsp} fueron los que usaron MgSO_4 -Peg4000. Asimismo, los valores mayores de K_{tsp} ocurrieron en las condiciones correspondiente a los puntos 3 y 4, que tuvieron las mayores concentraciones de sal y menores de polímero y los mayores valores de K_{tsp} se obtuvieron en dos líneas de mayor longitud (Figuras 5e y 5f).

Concentración de fenoles solubles en fase superior de sistemas ATPE

Los valores de coeficiente de partición (K_{tsp}) confirmaron que los fenoles solubles mostraron fuerte tendencia a acumularse en la fase superior de los sistemas ATPE evaluados, lo que indica que las concentraciones en esa fase fueron significativamente mayores que las de la fase inferior. Por ello, el análisis se centró en el efecto de los distintos factores sobre la presencia de estos compuestos en la fase superior polimérica.

El origen de los compuestos fenólicos (Extracto o Muestra) no afectó la concentración de éstos en la fase superior ($p > 0.05$), pero sí lo hizo el tipo de sal, la composición a lo largo de la línea de operación y la longitud de ésta. En adición, las distintas interacciones entre factores de variación fueron significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 10).

Entre las dos sales utilizadas, la de Na_3Cit causó mayor concentración de fenoles solubles ($2836.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en relación con MgSO_4 ($2200.82 \mu\text{g mL}^{-1}$). En forma congruente con el coeficiente de partición, a medida que se incrementó la concentración de sal y se redujo la de Peg4000 la concentración de fenoles solubles se incrementó, de forma que, derivado de la reducción de la relación de volúmenes, la concentración de estos compuestos en las condiciones 3 y 4 de la

línea principal de operación alcanzó valores de 2695.4 y hasta 4144.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 5e). (Domínguez-Puerto et al., 2018; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2019) argumentaron que la técnica de ATPE constituye una herramienta no energética de concentración de compuestos y ello ha sido confirmado con los resultados del presente trabajo, donde se obtuvo un incremento muy significativo de fenoles solubles a medida que la evaluación se desplazó en forma descendente por la línea de operación. Sin embargo, a medida que se incrementó la longitud de las líneas de operación, la concentración mostró tendencia a la disminución en los sistemas basados en Na_3Cit , en tanto que en los sistemas basados en MgSO_4 la composición de fenoles solubles en la fase superior no se afectó de manera significativa (Figura 5d).

Rendimiento de separación de fenoles solubles

La recuperación de fenoles solubles en la fase superior (Y_{tsp}^t) de los sistemas resultó afectada tanto por el origen de compuestos, por el tipo de sal, por la longitud de las líneas de operación y la posición sobre la línea principal ($p \leq 0.05$). Entre las interacciones entre factores de variación, todas fueron significativas ($p \leq 0.05$), excepto la correspondiente a $A \times S$ ($p > 0.05$) (Cuadro 10). Los sistemas basados en Muestra liofilizada permitieron rendimiento de recuperación de 98.00%.

Si bien el análisis estadístico reportó diferencia significativa con respecto al manejo con Extracto, el contraste fue en realidad pequeño pues en este caso la recuperación fue de 98-47%. Entre las sales, los valores de Y_{tsp}^t fueron de 97.92 y 98.55% para Na_3Cit -Peg4000 y MgSO_4 , respectivamente, y la diferencia también se consideró sin efecto práctico real. En cuanto a la condición evaluada sobre la línea de operación principal, la región alta del diagrama permitió el mayor rendimiento de separación (99.10%) y a medida que se incrementó la concentración de sal y se redujo la concentración de polímero, el valor disminuyó a valores cercanos a 98% en el punto 3, pero bajó hasta 96.35% en el punto 4. Por otro lado, el incremento de la longitud de la línea de operación favoreció la

obtención de mayores rendimientos de recuperación de fenoles solubles. En tal sentido y considerando el comportamiento de las variables de coeficiente de partición y concentración en la fase superior, la mejor condición para la recuperación de fenoles solubles fue el punto 3 de los diagramas (Figuras 4b y 4d).

Flavonoides, antocianinas y taninos condensables

La fase superior de los sistemas ATPE desarrollados se evaluaron también en términos de su composición de flavonoides, antocianinas y proantocianidinas. En los tres casos se identificó un efecto significativo ($p \leq 0.05$) del origen de compuestos (Extracto o Muestra), por el tipo de sal (Na_3Cit o MgSO_4) y por la condición a lo largo de la línea de operación (puntos 1, 2, 3 o 4; Figuras 4b y 4d). Sin embargo, la longitud de la línea de operación no afectó el contenido de flavonoides, pero sí el de antocianinas y taninos condensables (Cuadro 10). El contenido de flavonoides y de taninos condensables resultó significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en los sistemas manejados con Extracto, en tanto que el contenido de antocianinas fue mayor en los sistemas manejados con Muestra liofilizada (Cuadro 12). En cuanto a la sal utilizada no se identificó una tendencia clara, pues los flavonoides se encontraron en mayor concentración en los sistemas basados en MgSO_4 , en tanto que las antocianinas y los taninos condensables estuvieron presentes en mayor concentración en los sistemas con Na_3Cit . Por otro lado, en forma congruente con el comportamiento encontrado para los fenoles solubles totales, a medida que se eligió una condición con mayor concentración de sal y menor de Peg4000, la concentración de estos compuestos aumentó, de forma que en la condición 1 de la línea principal de operación se tuvieron las menores concentraciones, en tanto que en el punto 4 ocurrieron los mayores valores.

Entre los planteamientos iniciales del presente trabajo estaba el propósito de aprovechar las antocianinas del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' como material pigmentante de matrices alimenticias. Sin embargo, el contenido hallado de estos compuestos fue en realidad muy bajo. Para verificar esta situación se

seleccionaron muestras identificadas con mayor concentración de antocianinas y, asimismo, muestras en el rango de concentración más bajo. En ambos conjuntos de muestras se realizó una dilución 1:15 con metanol y se obtuvo un barrido de 700 a 200 nm. El espectro mostró una concentración muy elevada (mayor a 4 de absorbancia) en alrededor de 280 nm. Ambas muestras (1 y 2) presentaron espectros similares. El pH de las muestras se redujo con HCl a valores entre 0 – 1 y el color de las muestras cambió a un tono ligeramente rosado, con valores de absorbancia entre 0.06 y 0.08 en longitud de onda de 530, indicando una concentración muy baja de antocianinas, pero muy alta en otro tipo de compuestos que absorben luz en el rango ultravioleta.

No obstante, aunque los extractos obtenidos a partir de la fase superior de los sistemas ATPE resultaron con concentración baja de antocianinas, las concentraciones de flavonoides en general resultaron con valores altos y también las correspondientes a taninos condensables. Al respecto, el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' se ha probado con resultados satisfactorios como agente antimicrobiano tras su incorporación en recubrimientos biopoliméricos (Vargas-Torrico, 2019), lo cual pudo deberse al alto contenido de taninos condensables. Por otro lado, con base en el comportamiento encontrado para relación de volúmenes, coeficiente de partición de fenoles solubles y la concentración de estos compuestos, junto con la de flavonoides y taninos condensables, las mejores condiciones para la separación de compuestos bioactivos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' corresponden a los puntos 3 y 4 localizados sobre la línea principal de operación. Si bien la condición del punto 4 de los sistemas maximiza la concentración de compuestos es el punto 3 el que permite un rendimiento de recuperación de los mismos con valores mayores a 98%, pues la condición cuatro causa una reducción de este parámetro a valores cercanos a 96%.

Cuadro 12. Comparación de medias correspondientes a la concentración de flavonoides (Flav), antocianinas (Anto) y taninos condensables (Tani) en la fase superior de extracción acuosa en dos fases basados en dos fuentes de compuestos y en dos sistemas.

Fuente de variación	C_{Flav}^{sup}	C_{Anto}^{sup}	C_{Tani}^{sup}
<u>Efecto del origen de compuestos (A)</u>			
Extracto	1957.11 a ^z (349.91)	21.67 b (3.35)	1566.55 a (328.29)
Muestra	1099.61 b (131.86)	28.87 a (4.36)	1274.71 b (196.19)
HSD	196.78	3.80	272.46
<u>Efecto del sistema ATPE (S)</u>			
Na ₃ Cit-Peg4000	626.59 b (84.25)	27.24 a (4.45)	1625.94 a (336.70)
MgSO ₄ -Peg4000	2430.13 a (279.28)	23.30 b (3.35)	1215.31 b (176.31)
HSD	196.78	3.80	272.46
<u>Efecto de la longitud de la línea de operación (TLL)</u>			
A-D-B	1925.46 a (456.32)	30.49 a (4.61)	1718.28 b (215.56)
H	1855.69 a (515.41)	30.61 a (6.64)	1460.95 c (141.82)
G	1905.38 a (508.76)	28.47 a (5.34)	2011.90 b (217.42)
F	1755.02 a (483.54)	28.52 a (4.76)	2106.12 ab (139.12)
E	2049.58 a (528.58)	30.70 a (6.52)	2280.64 a (357.25)
HSD	338.10	2.80	243.28)
<u>Posición sobre la línea de operación (PTL)</u>			
1	846.90 c (187.02)	10.28 c (0.60)	365.25 c (25.39)

Cuadro 12. Comparación de medias correspondientes a la concentración de flavonoides (Flav), antocianinas (Anto) y taninos condensables (Tani) en la fase superior de extracción acuosa en dos fases basados en dos fuentes de compuestos y dos en dos sistemas (Cotinuación).

Fuente de variación	C_{Flav}^{sup}	C_{Anto}^{sup}	C_{Tani}^{sup}
2	1201.89 bc (297.56)	13.75 c (0.83)	708.30 c (28.48)
3	1538.36 b (358.12)	28.01 b (6.29)	1304.30 b (57.07)
4	2526.28 a (507.27)	49.05 a (2.40)	2304.65 a (378.66)
HSD	369.68	7.13	511.88

Na₃Cit-Peg4000 y MgSO₄-Peg4000: Sistemas ATPE formados con citrato de sodio y sulfato de magnesio con polietilenglicol 4000; ADB, E, F, G y H: puntos de referencia sobre líneas de operación principal y secundarias; los puntos 1, 2, 3 y 4 localizan mezclas sobre la línea de operación principal. HSD: diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). ²Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 0.05). Se muestra entre paréntesis el error estándar.

Actividad antioxidante

La determinación de actividad antioxidante por los métodos de ABTS y FRAP se realizó en los sistemas con Muestra para la fase superior a lo largo de los cuatro puntos ubicados en la línea de operación principal. La actividad antioxidante por el método ABTS se vio afectada por el tipo de sal utilizada en los sistemas, encontrándose mayor concentración al emplear como sal el Na₃Cit ($p < 0.05$); para la determinación con el método de FRAP no se encontraron diferencias entre las dos sales ($p > 0.05$) (Cuadro 13). Aunque MgSO₄ presentó mayor exclusión salina (Cuadro 8), se concentraron en mayor media al igual que los otros compuestos bioactivos determinados en la sal Na₃Cit (Cuadro 12).

Al analizar los puntos a lo largo de la línea principal de operación, se encontró que no hubo diferencia significativa entre ellos para la determinación con el método ABTS ($p > 0.05$), sin embargo, numéricamente el punto 1 manifestó mayor presencia de actividad antioxidante (56.16 $\mu\text{mol ET mL}^{-1}$). Caso contrario

a lo establecido con el método FRAP, donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$), existiendo la mayor concentración en el punto 3 ($22.52 \mu\text{mol ET mL}^{-1}$).

Cuadro 13. Comparación de medias correspondientes a la concentración de la actividad antioxidante en la fase superior de extracción acuosa en dos fases basadas en dos sistemas.

Fuente de variación	ABTS ($\mu\text{mol ET mL}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET mL}^{-1}$)
<u>Efecto del sistema ATPE (S)</u>		
Na ₃ Cit-Peg4000	57.45 a ^z (4.85)	20.04 a (1.11)
MgSO ₄ -Peg4000	40.19 b (2.52)	17.98 a (0.99)
HSD	8.06	2.3
<u>Posición sobre la línea de operación (PTL)</u>		
1	56.16 a (6.9)	17.6 bc (0.42)
2	42.25 a (2.87)	15.45 c (0.26)
3	48.97 a (7.43)	22.52 a (1.87)
4	47.92 a (7.61)	20.48 ab (3.42)
HSD	15.38	4.4

Na₃Cit-Peg4000 y MgSO₄-Peg4000: Sistemas ATPE formados con citrato de sodio y sulfato de magnesio con polietilenglicol 4000; los puntos 1, 2, 3 y 4 localizan mezclas sobre la línea de operación principal. HSD: diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). ^zLetras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 0.05). Se muestra entre paréntesis el error estándar.

El fundamento de los métodos es distinto, donde el método FRAP se basa en una transferencia de electrones (Le Grandois, Guffond, Hamon, Marchioni & Werner, 2017), mientras que el del método ABTS es en la eliminación de radicales libres (Rosales-Castro et al., 2014), es por ello la diferencia en las concentraciones obtenidas en la presente investigación entre los dos métodos, encontrándose mayores concentración con el método ABTS.

4.4 Conclusiones

El método de extracción acuosa en dos fases basado en mezclas de Na_3Cit -Peg4000 y MgSO_4 mostró potencial para separar compuestos bioactivos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass'. El uso de muestra liofilizada incorporada directamente como fuente de compuestos permite una alta recuperación de éstos en relación al uso de un extracto obtenido previamente con metanol. El potencial de exclusión salina del sistema basado en MgSO_4 fue mayor que el sistema basado en Na_3Cit , lo que significa que con el primero se requieren menos concentraciones de compuestos para formar sistemas bifásicos que con el segundo. Sin embargo, el sistema basado en Na_3Cit permitió la recuperación de mayores cantidades de compuestos bioactivos que el segundo. A medida que se incrementó la concentración de sal y se redujo la de polietilenglicol 4000 se redujo la relación de volúmenes, se incrementó el coeficiente de partición de compuestos y se incrementó la concentración de estos en la fase superior. El uso de la técnica de ATPE constituyó una herramienta con potencial alto de recuperación de compuestos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Has' y realizar su concentración por medios no térmicos.

4.5 Literatura citada

- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, 1238(September 2011), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>
- Atala, E., Aspée, A., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2013). Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.007>
- Bakhshi, H., & Mobalegholeslam, P. (2017). Fluid Phase Equilibria Phase equilibria calculations of electrolyte solutions containing water- polymer- salt using a new thermodynamic model , applicable in aqueous two phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 434, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.11.033>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Banipal, T. S., Kaur, H., Kaur, A., & Banipal, P. K. (2016). Effect of tartarate and citrate based food additives on the micellar properties of sodium dodecylsulfate for prospective use as food emulsifier. *Food Chemistry*, 190, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.130>
- Bankar, S. B., Bule, M. V., & Singhal, R. S. (2009). Optimization of *Aspergillus niger* Fermentation for the Production of Glucose Oxidase. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 344–352. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0050-x>
- Bertling, I., Tesfay, S. Z., & Bower, J. P. (2007). Antioxidants in “Hass” avocado. *South African Avocado Growers’ Asociation*, 17–19. Retrieved from http://www.avocadosource.com/journals/saaga/saaga_2007/SAAGA_2007_V30_PGS_17-19_Bertling.pdf
- Bordón, S. F. H., Farias, F. O., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2018). Fluid Phase Equilibria Measurement and correlation of aqueous two-phase systems of polyvinylpyrrolidone (PVP) and manganese sulfate : Effects of molecular weight and temperature. *Fluid Phase Equilibria*, 472, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.05.021>
- Burden, R. L., & Faires, J. D. (2010). *Numerical Analysis* (9th.). Boston, USA: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Woolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of “Hass” avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008>
- da Rocha, P. P., Barbosa, M. A., Rodrigues, D. L. L., Moreira, M. C. R., & Mendes, S. L. H. Hespanhol, D. S. M. C. (2011). Fluid Phase Equilibria Phase diagram

- and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H₂O and PPO + organic salts + H₂O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 305, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.02.013>
- de Araújo, P. C. E., Dantas, P. V. F., da Costa, N. C., de Sá, L. A. L., Nóbrega, A. H., de Santana, S. D. F., ... dos Santos, E. S. (2018). Enhancing the recovery and concentration of polyphenols from camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) by aqueous two-phase flotation and scale-up process. *Separation Science and Technology*, 53(13), 2126–2135. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1442865>
- Domínguez-Puerto, R., Valle-Guadarrama, S., Guerra-Ramírez, D., & Hahn-Schlam, F. (2018). Purification and concentration of cheese whey proteins through aqueous two phase extraction. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 452–459. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1420100>
- Eigenmann, P., & Haenggeli, C. (2007). Food colourings and preservatives. *The Lancet*, 370(9598), 1524–1525. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61643-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61643-2)
- Fu, C., Song, W., Yi, C., & Xie, S. (2019). Fluid Phase Equilibria Creating efficient novel aqueous two-phase systems: Salting-out effect and high solubility of salt. *Fluid Phase Equilibria*, 490, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.03.002>
- Gebreyohannes, S., Neely, B. J., & Gasem, K. A. M. (2014). Fluid Phase Equilibria One-parameter modified nonrandom two-liquid (NRTL) activity coefficient model. *Fluid Phase Equilibria*, 379, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.07.027>
- Ghaffari, S., Shahrouzi, J. R., Tow, F., & Khoshfetrat, A. B. (2019). Fluid Phase Equilibria Partitioning of cefazolin in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium salts (citrate, tartrate, and sulphate). *Fluid Phase Equilibria*, 488, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.01.010>
- Gomes, J., Ferreira, S., Reinert, O., Gandol, R., Ayra, L., Santos, V., ... Bonomo, F. (2017). Fluid Phase Equilibria Evaluation of salting-out effect in the liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄ / MgSO₄ at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 450, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.001>
- González-Amado, M., Rodil, E., Arce, A., Soto, A., & Rodríguez, O. (2016). Fluid Phase Equilibria The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000) and (sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems. *Fluid Phase Equilibria*, 428, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.06.019>
- Guan, Y., Lilley, T. H., & Treffry, T. E. (1993). A New Excluded Volume Theory and Its Application to the. *Macromolecules*, 26, 3971–3979. <https://doi.org/10.1021/ma00067a037>
- Hou, B. J., Wei, Y. Q., Ma, F., Wang, X. N., & Yang, S. Z. (2017). Chelatometric

- salting-out extraction and characteristics of flavonoids from *Folium nelumbinis* based on an ethanol/K₂HPO₄ system. *Separation and Purification Technology*, 53, 717–724. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1397023>
- Jampani, C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology*, 151, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.030>
- Jimenez, Y. P., Galleguillos, H. R., & Claros, M. (2016). Fluid phase equilibria Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by NaNO₃+ Poly (ethylene glycol) + H₂O. *Fluid Phase Equilibria*, 421, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.04.011>
- Kalaivani, S., & Regupathi, I. (2016). Continuous aqueous two-phase extraction of α - lactalbumin from whey in conventional rotating disc contactor. *Separation Science and Technology*, 51(14), 2411–2419. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1202278>
- Lee, J., Robert, W. D., & 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. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Le Grandois, J., Guffond, D., Hamon, E., Marchioni, E., & Werner, D. (2017). Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components. *Food Chemistry*, 223, 62-71.
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B*, 711, 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X)
- Muendges, J., Stark, I., Mohammad, S., Górak, A., & Zeiner, T. (2015). Fluid Phase Equilibria Single stage aqueous two-phase extraction for monoclonal antibody purification from cell supernatant. *Fluid Phase Equilibria*, 385, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.10.034>
- Olaetta, J. (2003). Industrialización Del Aguacate: Estado Actual Y Perspectivas Futuras. *Proceedings V World Avocado Congress*, 749–754. Retrieved from http://www.avocadosource.com/WAC5/papers/wac5_p749.pdf
- Palou, E., Hernandez-Salgado, C., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., & Welti-Chanes, J. (2000). High pressure-processed guacamole. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(99\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(99)00002-8)
- Pirdashti, M., Movagharnejad, K., Mobalegholeslam, P., & Pirdashti, H. (2016). Fluid Phase Equilibria Liquid-liquid equilibrium of poly (ethylene glycol) 4000 þ sodium sulfate þ urea / guanidine hydrochloride aqueous two-phase systems

- at different pH: Experimental results and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, 427, 460–475. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.07.032>
- Price, M. L., Scoyoc, S. Van, & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214–1218. <https://doi.org/10.1021/jf60219a031>
- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P. M., & Narayan, B. (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.005>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rico-Castro, X., González-Amado, M., Soto, A., & Rodríguez, O. (2017). Aqueous two-phase systems with thermo-sensitive EOPO co-polymer (UCON) and sulfate salts: Effect of temperature and cation. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 108, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.01.009>
- Rodríguez-Salazar, N., & Valle-Guadarrama, S. (2019). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Aires-barros, M. R., & Bäcker, W. (2009). *Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: A multi-stage approach*. 139, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.01.001>
- Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2010). Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2296–2305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R., Bae, Y. S., Kim, J., Morré, J., & Karchesy, J. (2014). Characterization and Antioxidant Properties of the Condensed Tannins from Alaska Cedar Inner Bark. *Records of Natural Products*, 8, 217–227.
- Ruiz-Ruiz, F., López-Guajardo, E., Vázquez-Villegas, P., Angel-Chong, M. E., Nigam, K. D. P., Willson, R. C., & Rito-Palomares, M. (2019). Chemical Engineering & Processing: Process Intensi fication Continuous aqueous two-phase extraction of microalgal C-phycocyanin using a coiled fl ow inverter. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 142, 107554. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107554>

- Sadeghi, R., & Jahani, F. (2012). Salting-in and salting-Out of water-soluble polymers in aqueous salt solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, 5234–5241. <https://doi.org/10.1021/jp300665b>
- Sadeghi, R., & Maali, M. (2016). Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymer-polymer aqueous systems. *Polymer*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.11.032>
- SAS Institute, I. (1999). *SAS/STAT® User's Guide, Version 8*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (2011). *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations*. USA: John Wiley & Sons, Inc. (Third Edit). Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc.
- Singleton, V. L. ., & Rossi, J. J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- SPSS, I. (2000). *Sigma Plot 2000 User's Guide*. Chicago, USA: SPSS Inc.
- Suarez Ruiz, C. A., van den Berg, C., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2018). Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 196, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.001>
- Swaroop, V. R., Dinesh Roy, D., & Vijayakumar, T. (2011). *Genotoxicity of Synthetic Food Colorants*. 1, 128–134.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.013>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (Fourth Edi). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.
- Terasawa, N., Sakakibara, M., & Murata, M. (2006). Antioxidative Activity of Avocado Epicarp Hot Water Extract. *Food Science and Technology Research*, 12(1), 55–58. <https://doi.org/10.3136/fstr.12.55>
- Vargas-Campos, L., Valle-Guadarrama, S., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., Lobato-Calleros, C., & Calvo-López, A. D. (2018). Encapsulation and pigmenting potential of betalains of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2436–2445. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3161-7>
- Vargas-Torrico, F. (2019). *Diseño y aplicación de bio-recubrimientos con antifúngicos naturales para extender la vida postcosecha de fresa (Fragaria x ananassa)*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias en Tecnología Avanzada. Ciudad de México, México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional.

- Wang, Y., Wang, J., Han, J., Hu, S., & Yan, Y. (2010). Liquid – liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts. *Central European Journal of Chemistry*, 8(4), 886–891. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0053-8>
- Woolf, A. B., Wibisono, R., Farr, J., Hallett, I., Richter, L., Oey, I., ... Requejo-Jackman, C. (2013). Effect of high pressure processing on avocado slices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.011>
- Xavier, L., Freire, M. S., Vidal-Tato, I., & González-Álvarez, J. (2015). Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from eucalyptus wood. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 17(2), 345–354. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000032>
- Zafarani-Moattar, M. T., Shekaari, H., & Jafari, P. (2019). Thermodynamic study of aqueous two-phase systems containing biocompatible cholinium aminoate ionic-liquids and polyethylene glycol di-methyl ether 250 and their performances for bovine serum albumin separation. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 130, 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.10.001>

5. EVALUACIÓN POSTCOSECHA Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE ANTOCIANINAS DE EPICARPIO DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS'

Resumen

El fruto de aguacate 'Hass' se consume en fresco o se le procesa para obtener distintos productos. En esta segunda alternativa se generan residuos, como el epicarpio, que contienen diversos compuestos bioactivos que pueden ser recuperados, lo que puede incrementar el valor agregado de este recurso fitogenético. Los objetivos del trabajo fueron evaluar la variación de compuestos bioactivos en epicarpio de aguacate a lo largo de la maduración del fruto; separar compuestos bioactivos del epicarpio de frutos de aguacate en distintos estados a lo largo de la maduración y evaluar el potencial pigmentante de antocianinas separadas de epicarpio de frutos de aguacate. Se aplicó el método de extracción acuosa en dos fases para conducir la separación de fenoles solubles, flavonoides, antocianinas y taninos condensables de epicarpio de frutos de aguacate en distintos estados de maduración. El contenido de fenoles solubles, flavonoides, antocianinas y taninos condensables se modifica en el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' durante la maduración del fruto en el periodo postcosecha, alcanzando valores máximos entre 8 y 10 d posteriores al corte en una condición térmica ambiental. La extracción acuosa en dos fases es un procedimiento útil para separar compuestos bioactivos de epicarpio de aguacate 'Hass' obtenido de distintos estados de madurez del fruto. Los extractos de epicarpio de aguacate 'Hass' pueden utilizarse como agente pigmentante de matrices alimenticias, aunque por el bajo contenido de antocianinas hallado se obtienen coloraciones localizadas entre el rojo y el amarillo.

Palabras clave: *Persea americana*, compuestos bioactivos, extracción acuosa en dos fases, potencial pigmentante.

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Director de Tesis: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

POSTHARVEST EVALUATION AND PIGMENTING POTENTIAL OF ANTHOCYANINS OF 'HASS' AVOCADO FRUITS EPICARP

Abstract

The 'Hass' avocado fruit is consumed fresh or processed to obtain different products. In the second alternative waste is generated, such as the epicarp, which contain several bioactive compounds that can be recovered, which can increase the added value of this plant genetic resource. The objectives of the work were to evaluate the variation of bioactive compounds in avocado epicarp throughout the ripening of the fruit; to separate bioactive compounds from the epicarp of avocado fruits in different states throughout ripening, and to evaluate the pigment potential of anthocyanins separated from the epicarp of avocado fruits. The two-phase aqueous extraction method was applied to carried out the separation of soluble phenols, flavonoids, anthocyanins, and condensable tannins from epicarp of avocado fruit in different maturity stages. The content of soluble phenols, flavonoids, anthocyanins, and condensable tannins is modified in the epicarp of 'Hass' avocado fruits during fruit ripening in the post-harvest period, reaching maximum values between 8 and 10 d after harvest at environmental thermal condition. The aqueous two-phase extraction is a useful procedure to separate bioactive compounds from de Hass 'avocado at different stages of fruit maturity. The 'Hass' avocado epicarp extracts can be used as a food matrix pigmenting agent, although, due to the low anthocyanin content found, tonalities located between red and yellow are obtained.

Key words: *Persea americana*, aqueous two-phase extraction, bioactive compounds, pigmenting potential.

Thesis Master Science, Agro-Food Science and Technology Graduate Program, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Perla Jiménez Velázquez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

5.1 Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un fruto climatérico caracterizado por un aumento en la tasa de respiración y la producción de etileno a partir de la maduración (Awad & Young, 1979). Es conocido por su alto contenido nutricional y los beneficios que confiere a la salud, que se deben esencialmente a la fuente de nutrientes solubles en grasa o fitoquímicos (Alvarez, Moreno & Ochoa, 2012). La principal forma de consumo del aguacate es en fresco. Sin embargo, una parte de la producción se procesa para elaborar otro tipo de productos como guacamole y aceites para la industria de los cosméticos, entre otros (Olaetta, 2003; Palou et al., 2000; Woolf et al., 2013). Durante el procesamiento se generan residuos, como la cáscara y la semilla, que contienen compuestos bioactivos (Terasawa, Sakakibara, & Murata, 2006), que pueden ser recuperados y conseguir con ello un incremento del valor agregado de este recurso fitogenético.

Jiménez-Velázquez (2019) (presente trabajo) demostró que mediante la técnica de extracción acuosa en dos fases se pueden recuperar compuestos fenólicos en general y flavonoides, antocianinas y taninos condensables, en particular, que pueden ser incorporados en otras matrices alimenticias para incrementar su potencial nutracéutico.

La antocianinas son los compuestos que imparten el color oscuro que adquieren los frutos en su madurez de consumo y su actividad antioxidante está bien demostrada (Atala, Aspée, Speisky, Lissi, & López-Alarcón, 2013; Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommès, 2009). Actualmente, existe fuerte interés por sustituir colorantes artificiales por los efectos adversos que generan en la salud (Eigenmann & Haenggeli, 2007; Swaroop, Dinesh Roy, & Vijayakumar, 2011) y Stintzing, Trichterborn, and Carle (2006) demostraron que estos compuestos pueden ser utilizados como pigmentos naturales. El fruto de aguacate 'Hass' exhibe comportamiento climatérico y transita entre madurez fisiológica y madurez de consumo en un periodo aproximado de dos semanas (Valle-Guadarrama, Morales-Cabrera, Peña-Valdivia, et al., 2013). Durante la

maduración ocurren varios cambios; entre ellos, la disminución de la clorofila y carotenoides y el aumento mencionado del contenido de antocianinas en la cáscara, que han sido tipificadas, principalmente como cianidina 3-O-glucósido (Cox, McGhie, White, & Woolf, 2004).

El uso de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' se ha probado con resultados satisfactorios como agente antimicrobiano tras su incorporación en recubrimientos biopoliméricos (Vargas-Torrico, 2019). Al respecto, Jiménez-Velázquez (2019) (presente trabajo) demostró que el epicarpio de frutos de aguacate en madurez de consumo es rico en taninos condensables, lo cual pudo causar el efecto antimicrobiano descrito. Si bien es evidente, incluso visualmente, que el contenido de antocianinas en el epicarpio se modifica a lo largo de la maduración del aguacate, no se ha evaluado la variación de otros compuestos como los flavonoides y los taninos condensables durante este proceso, lo cual puede ser de utilidad si se propone el aprovechamiento de los residuos de la transformación del fruto. En tal contexto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar la variación de compuestos bioactivos en epicarpio de aguacate a lo largo de la maduración del fruto; separar compuestos bioactivos del epicarpio de frutos de aguacate en distintos estados a lo largo de la maduración y evaluar el potencial pigmentante de antocianinas separadas de epicarpio de frutos de aguacate.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Material vegetal

Se cosecharon frutos de aguacate 'Hass' en madurez fisiológica desarrollados en la región de Tetela del Volcán, México (18° 53' 35" N, 98° 43' 47" O; 2231 msnm), los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los frutos cosechados tuvieron un peso de 187.76 ($\pm$ 30.89) g.

5.2.2 Evaluación postcosecha

Desarrollo experimental

Los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) con una humedad relativa de 40 ($\pm$ 1)% durante 10 d, en los cuales se midió diariamente la firmeza y el color de la cáscara de los frutos. Después de haber medido las variables fisiológicas, se sustrajo de cada fruto el epicarpio y se almacenó en bolsas de plástico resellables, las cuales fueron identificadas por cada día en el que se realizaron las mediciones y se mantuvieron en congelación hasta la obtención de extractos para la determinación de las variables químicas.

Variables fisiológicas

Firmeza

La firmeza se midió en dos lados de la parte ecuatorial de cada fruto con un dispositivo de prueba de tracción y compresión (SM-100N-168, Ametek and Chatillon, Florida, USA) con una sonda cónica que tenía un diámetro en la base de 3.4 mm y una longitud desde la base del cono hasta el ápice de 5 mm. Se usó una rutina de medida de fuerza de compresión con una velocidad de ensayo de 5 mm s⁻¹ y distancia de deformación de 5 mm. Se realizaron mediciones por triplicado y los resultados fueron expresados en Newton (N)

Color

Se midió el color en el epicarpio del fruto en tres puntos a lo largo de la zona ecuatorial con un espectrofotómetro (X-rite mod. 3690®, USA). Se realizaron las mediciones por triplicado en cada día y se registraron los valores directamente de luminosidad (L^*), ángulo de tono o matiz (H^*) y cromaticidad (C^*) (Solorzano-Morán et al., 2015).

Variables químicas

Obtención de extractos

Para la determinación de las variables químicas en el epicarpio de aguacate 'Hass', se empleó el material obtenido de la fase de evaluación postcosecha para la realización de los extractos a evaluar de maduración fisiológica a maduración de consumo. Se seleccionaron muestras sólo de 8 d. Se llevaron a cabo sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE) para cada día, en donde se utilizaron, de acuerdo con datos experimentales obtenidos en el capítulo anterior, las condiciones del punto 3 de la línea de operación principal de una mezcla de 20 g de polietilenglicol 4000 (Peg4000) y citrato trisódico (Na_3Cit) (12.23, 15.51% respectivamente). En cada mezcla se adicionaron 0.5 g de cáscara ya liofilizada y molida. El sistema se sometió a homogeneización en equipo Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) durante 5 min a 10000 rpm. Al término, la mezcla se sometió a agitación en un equipo Vortemp 56 durante 10 min a 10000 rpm. Pasado el tiempo se dejó en reposo durante 12 h para permitir la formación de sistemas bifásicos. Finalmente se separaron las fases, en donde se llevaron a cabo las determinaciones en la fase superior de cada extracto.

Fenoles solubles totales

El contenido de fenoles solubles totales (FST) se determinó con el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton & Rossi, 1965), donde 250 μL de FC reaccionaron con 100 μL de muestra en tubos de ensayo durante 6 min. Después, la mezcla se neutralizó con 1.25 mL de una solución de Na_2CO_3 19% y el volumen

se ajustó a 3.0 mL con agua destilada. Las mezclas se agitaron en vórtex y se colocaron en oscuridad durante 90 min para lograr la estabilización. Se aplicó centrifugación (equipo Hermle Z200, Labortechnik, Alemania) a $13000\times g$ durante 10 min para eliminar turbidez y se determinó absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (DR 500 UV-vis HACH, USA) a 760 nm. La determinación se apoyó con una curva estándar de ácido gálico y el contenido de FST se expresó como μg equivalentes de ácido gálico por mililitro (μg EAG mL^{-1}).

Flavonoides

Para cuantificar flavonoides totales se utilizó una curva de calibración con 3000 ppm de (+)-catequina (Kubola & Siriamornpun, 2011). Se hicieron las diluciones necesarias para cada tratamiento de extracto con agua destilada o desionizada, según fue el caso. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de esa dilución y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Después, se adicionaron 0.15 mL de $NaNO_2$ al 5% y se dejó reposar la muestra durante 6 min en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 0.15 mL de $AlCl_3$ al 10% y se dejó reposar 6 min nuevamente en oscuridad. A continuación, se adicionaron 2 mL de $NaOH$ al 4% y 0.2 mL de agua destilada para aforar a 5 mL. Finalmente, las muestras se leyeron a 510 nm en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA). Los resultados fueron expresados en μg de catequina mL^{-1} (μg EPC mL^{-1}).

Antocianinas

Para medir la concentración de antocianinas, se utilizó un estándar de cianidina clorada. Se construyó una curva de calibración, la cual fue de 5 a 30 μg mL^{-1} . Después, se procedió a medir la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA), a 535 nm. Los resultados fueron reportados en μg de cianidina clorada mL^{-1} (μg CC mL^{-1}).

Taninos condensables

Para determinar contenido de taninos condensables o proantocianidinas se utilizó el método descrito por Price et al. (1978) con algunas modificaciones. Se tomaron

20 μL del extracto, se agregaron 180 μL de metanol y la mezcla se agitó. Luego se agregó 1.2 mL de vainillina (grado analítico, Merck) al 4% p/v en metanol (grado analítico, Merck). Finalmente, se agregaron 600 μL de HCl concentrado y protegido de la luz por 30 min. Se midió absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó una curva de calibración con (+)-catequina (EPC) de 2 a 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El contenido se expresó en μg equivalentes de catequina por mL^{-1} ($\mu\text{g EPC mL}^{-1}$).

5.2.3 Evaluación del potencial pigmentante

Matriz alimentaria

Para la evaluación del potencial pigmentante de las antocianinas separadas de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' se utilizó yogur como matriz alimentaria modelo, el cual fue elaborado con leche de vaca de pastoreo y el cultivo láctico que se usó contiene las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Staphylococcus thermophilus*. Las condiciones del yogur empleado tuvieron un pH inicial de 4.17 (± 0.06), luminosidad de 0.84 (± 0.05), cromaticidad de (3.93 ± 0.06) y ángulo de matiz de $52.43 (\pm 8.94^\circ)$.

Extractos

Los extractos que se utilizaron en la pigmentación del yogur se seleccionaron de acuerdo con los resultados previos referentes a la concentración de antocianinas en los tratamientos basados en "Muestra" obtenidos en el capítulo anterior, por lo tanto, estos extractos correspondieron a las condiciones de los puntos 3(12.23, 15.51%) y 4(16.01, 7.75%) de la línea de operación principal de la extracción acuosa en dos fases con la mezcla de polietilenglicol 4000 (Peg4000) y citrato trisódico (Na_3Cit). Se procedió a realizar la extracción con muestra liofilizada y triturada de cáscara en madurez de consumo de tal manera que se obtuvo cantidad suficiente de extracto para elaborar la curva de coloración y la pigmentación de la matriz.

Curva de pigmentación

Se construyó una curva de pigmentación para cuantificar la cantidad de pigmento a utilizar de los extractos correspondientes a los puntos 3 y 4. En 15 g de yogur se agregó cierta cantidad de cada extracto hasta alcanzar coloración constante. Se registró el peso al ir agregando la cantidad de extracto en una balanza analítica (Ohaus, USA) y se evaluaron los parámetros de color L^* , a^* y b^* con un colorímetro HunterLab (MiniScan XE® Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA, USA). Estos parámetros se reportaron como luminosidad (L^*), ángulo de tono o matiz ($H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$) y cromaticidad ($C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$) (McGuire, 1992). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Pigmentación de matriz alimentaria

Con base a la curva de coloración de cada extracto, se agregó la cantidad identificada a 15 g de yogur colocados a condiciones conservativas (C) y deteriorativas (D) de acuerdo con la temperatura (4.5 y 24 °C, respectivamente). Durante 10 d se midieron las siguientes variables.

Color

Se evaluaron los parámetros de color L^* , a^* y b^* con un colorímetro HunterLab (MiniScan XE® Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA, USA) en cada tratamiento. Estos parámetros se reportaron como luminosidad (L^*), ángulo de tono o matiz ($H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$) y cromaticidad ($C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$) (McGuire, 1992). Las mediciones se realizaron por triplicado.

pH

Se midió el pH a cada tratamiento con un potenciómetro (ConduTronic modelo pH120, Micro precisión calibration Inc. EUA). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Antocianinas

Para medir la concentración de antocianinas, se utilizó un estándar de cianidina clorada. Se construyó una curva de calibración, la cual fue de 5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Después, se procedió a medir la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA), a 535 nm. Los resultados fueron reportados en μg de cianidina clorada mL^{-1} ($\mu\text{g CC mL}^{-1}$).

5.2.4 Análisis de datos

Mediante un diseño completamente al azar fueron analizados los datos de evaluación postcosecha. Para la evaluación pigmentante, en primer lugar, los datos se sometieron a regresión para evaluar el tipo de cinética de degradación (primer o segundo orden). Finalmente se condujeron evaluaciones congruentes con arreglos factoriales alojados en diseños completamente al azar que tuvieron como factores de variación los días de evaluación de pigmentación, la temperatura (4.5 y 24 °C) y el tipo de extracto (punto 3 y punto 4). Los datos se sometieron a análisis de varianza y a rutinas de comparación de medias de tratamiento con la prueba de Tukey, con nivel de significancia de 0.05. Todas las evaluaciones se condujeron por triplicado. Todo el análisis se realizó con el programa SAS (SAS Institute, 1999).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Evaluación postcosecha

Firmeza

El tiempo tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en la firmeza de los frutos de aguacate 'Hass'. En la comparación de medias, se encontró diferencia significativa en el día seis respecto a los siguientes días (Cuadro 14). Los frutos iniciaron con una resistencia de penetración de $39.27 (\pm 2.08)$ N. Posteriormente fue bajando paulatinamente hasta llegar al día seis, en donde a partir del siguiente día hubo una descendencia rápida (1.10 ± 0.04 N) (Figura 6a). El cambio gradual de firmeza que va de más a menos se da a medida en que el fruto de aguacate madura de madurez fisiológica a madurez de consumo, siguiendo un comportamiento de cinética tipo sigmoidal. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Valle-Guadarrama, Morales-Cabrera, Peña, et al. (2013) a una temperatura de 20 ± 1 °C en donde registraron una firmeza inicial similar a lo que se obtuvo en esta investigación. Sierra, Londoño, Gómez, Herrera, and Castellanos (2019) mostraron también una tendencia sigmoidal a una temperatura de 21 °C, pero con una firmeza inicial mayor (143.13 ± 6.61 N).

La disminución de la firmeza de la fruta está relacionada a la hidrólisis de los compuestos pépticos presentes en la pared celular, por acción enzimática, y por la pérdida de capacidad de retención de agua en la membrana de la célula vegetal. Con el incremento de la temperatura, el proceso de degradación de los compuestos estructurales se convierte en una mayor aceleración de la disminución de la firmeza de un fruto (Defilippi, Ejsmentewicz, Covarrubias, Gudenschwager, & Campos-Vargas, 2018; Ochoa-Ascencio, Hertog, & Nicolaï, 2009).

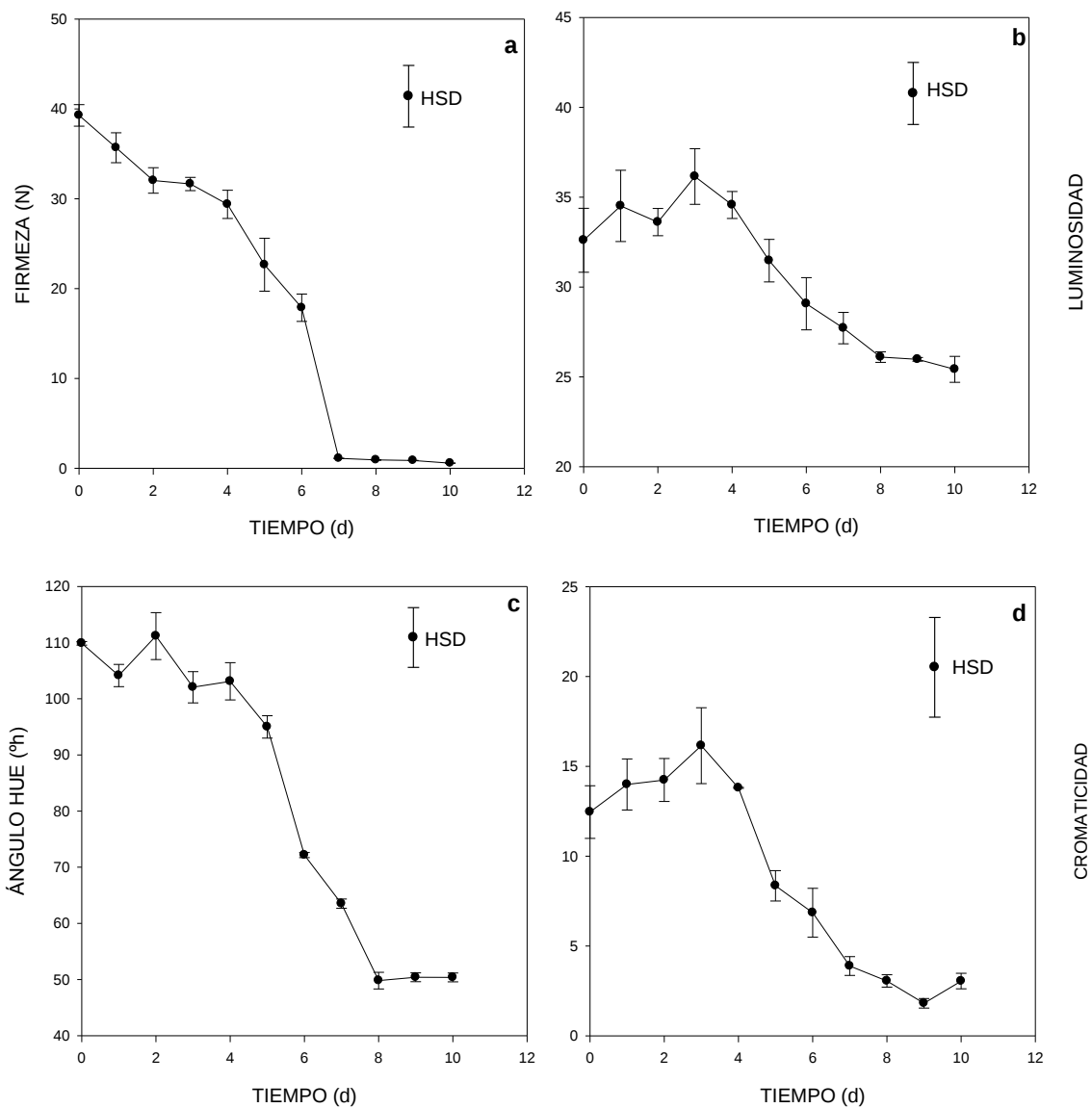


Figura 6. Cambios en firmeza y color del epicarpio de frutos de aguacate ‘Hass’ a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.

Cuadro 14. Comparación de medias entre los días de evaluación de las variables fisiológicas del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.

Fuente de variación	Firmeza (N)	Luminosidad L*	Ángulo de matiz H*	Cromaticidad C*
<u>Día postcosecha</u>				
Cero	39.27 a ^z (± 1.20)	32.6 b (± 1.02)	109.87 a (± 0.33)	12.45 ab (± 1.47)
1	35.68 ab (± 1.67)	34.51 ab (± 1.14)	104.13 ab (± 1.98)	13.99 a (± 1.42)
2	32.03 b (± 1.43)	33.61 ab (± 0.44)	111.67 a (± 4.18)	14.24 a (± 1.19)
3	31.64 b (± 0.74)	36.15 a (± 0.90)	102.05 ab (± 2.78)	16.15 a (± 2.11)
4	29.38 bc (± 1.57)	34.57 ab (± 0.43)	103.10 ab (± 3.31)	13.8 ab (± 0.03)
5	22.65 cd (± 2.94)	31.47 bc (± 0.68)	94.99 b (± 1.99)	8.35 c (± 0.84)
6	17.87 d (± 1.52)	29.07 cd (± 0.84)	72.17 c (± 0.45)	6.85 cd (± 1.36)
7	1.10 e (± 0.02)	27.71 de (± 0.50)	63.52 c (± 0.82)	3.88 cd (± 0.52)
8	0.92e (± 0.03)	26.10 de (± 0.17)	49.81 d (± 1.48)	3.05 cd (± 0.34)
9	0.87 e (± 0.01)	25.97 de (± 0.06)	50.40 d (± 0.78)	1.81 d (± 0.26)
10	0.56 e (± 0.01)	25.42 e (± 0.42)	50.37 d (± 0.79)	3.05 cd (± 0.43)
HSD	6.86	3.46	10.62	5.55

^zLetras iguales al interior de cada variable fisiológica indican que no se registró diferencia significativa (Tukey, 0.05). Se muestra también entre paréntesis el error estándar.

Color

El color del epicarpio fue medido en términos de luminosidad (L^*), ángulo de matiz (H^*) y cromaticidad. En las tres determinaciones hubo un comportamiento significativo ($p < 0.05$) marcado por la disminución de los parámetros a lo largo del tiempo de almacenamiento (Figuras 6b, c, d); en la comparación de medias también se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las tres variables estudiadas (Cuadro 14). En general los valores de L^* , C^* y H^* indicaron que los frutos de aguacate tuvieron un color más oscuro con menos intensidad de color. En el caso de la luminosidad comenzó con un valor de 32 (± 1.02) llegando al término de la evaluación con un valor de 25.42 (± 0.42). Para la cromaticidad fue de 12.45 (± 1.47) hasta 3.05 (± 0.43), y finalmente el ángulo de matiz comenzó en 109.87(± 0.33) terminando en 50.37(± 0.79). Lo anterior puede traducirse en un decremento de la clorofila y a una mayor síntesis de pigmentos, como las antocianinas, a medida que avanza el tiempo de postcosecha (Nambi, Thangavel, Shahir, & Chandrasekar, 2016). Los valores fueron semejantes a los que reportaron Salcedo, Quiñones, Melgarejo, Hernández, and Fernández-Trujillo (2018) a una temperatura de almacenamiento de 10 °C durante 20 d y Sierra et al. (2019) durante 20 d de almacenamiento a una temperatura de 21 °C. Por otra parte Arpaia, Collin, Sievert, and Obenland (2018) mostraron valores finales de almacenamiento por 11 d de 28.29, 5.45 y 67.20 de L^* , C^* y H^* , respectivamente a una temperatura de 25 °C.

Variables químicas

A lo largo del tiempo de maduración postcosecha del aguacate ‘Hass’ existen cambios en la composición química del epicarpio, como es el caso de los fitoquímicos tales como fenoles solubles totales (fst), flavonoides (flav), antocianinas (anto), y proantocianidinas o taninos (tani). Los resultados obtenidos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) para estas cuatro variables evaluadas de 8 d seleccionados durante la maduración postcosecha.

En la Figura 7 se observa un incremento de los fitoquímicos a partir del día seis, encontrando un máximo en el día ocho, a excepción de las antocianinas, cuyo máximo contenido ocurrió en el día 10. Los compuestos bioactivo que se manifestaron en mayor concentración fueron las proantocianidinas o taninos condensables, seguidas de los fenoles solubles totales, los flavonoides y finalmente las antocianinas. En las comparaciones de medias (Cuadro 15) se encontró diferencia significativa entre los días de evaluación.

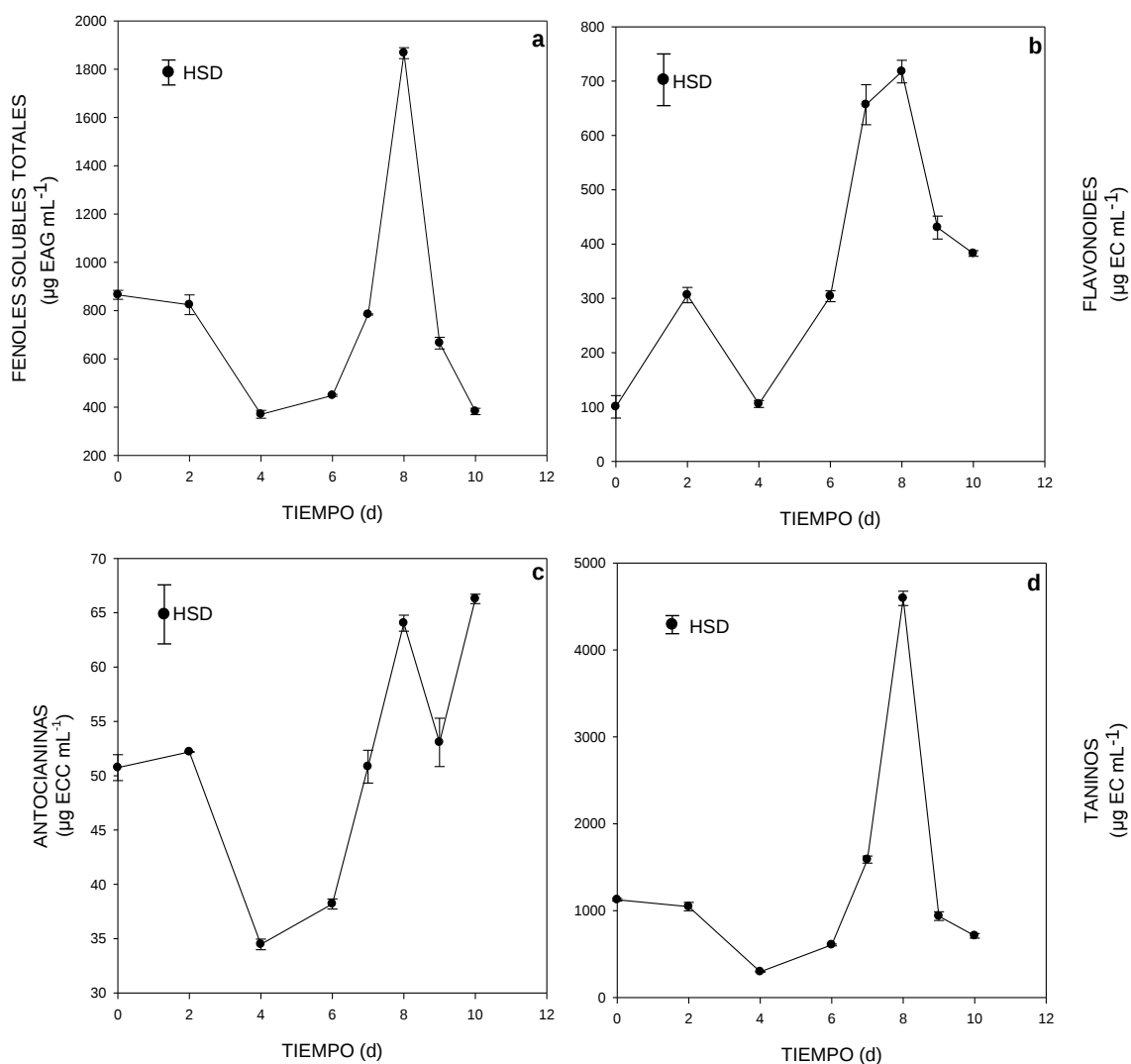


Figura 7. Cambios en la composición fitoquímica del epicarpio de frutos de aguacate ‘Hass’ a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.

El contenido de compuestos fenólicos está influenciado por varios factores, en el que se incluye la etapa de maduración (Siddiqui et al., 2013). También depende principalmente de la biosíntesis de fitoquímicos durante el crecimiento de las plantas y sus cambios durante la madurez fisiológica. Otros aspectos importantes que influyen son las condiciones de almacenamiento del producto, como son el tiempo, la temperatura y la luz, ya que esto influye en la retención de fitoquímicos (Tiwari & Cummins, 2013).

Cuadro 15. Comparación de medias entre los días de evaluación de las concentraciones de compuestos bioactivos del epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' a lo largo del tiempo de maduración postcosecha.

Fuente de variación	C_{TSP}^{sup}	C_{Flav}^{sup}	C_{Anto}^{sup}	C_{Tani}^{sup}
<u>Día de evaluación</u>				
Cero	865.12 b ^z (18.34)	100.32 d (20.79)	50.74 b (1.19)	1124.38 c (14.28)
2	823.88 b (40.89)	306.08 c (14.12)	52.19 b (0.03)	1045.47 c (48.21)
4	370.25 d (16.35)	105.52 d (6.44)	34.47 c (0.49)	296.35 e (4.71)
6	448.53 d (4.37)	303.92 c (10.06)	38.19 c (0.46)	604.95 d (10.8)
7	783.64 b (2.47)	656.72 a (36.8)	50.83 b (1.51)	1587.28 b (40.8)
8	1866.45 a (22.62)	717.61 a (20.78)	64.04 a (0.74)	4592.7 a (82.5)
9	665.29 c (24.31)	430.41 b (21.06)	53.07 b (2.22)	935.92 c (50.15)
10	381.97 d (13.27)	382.71 bc (5.22)	66.27 a (0.44)	709.78 d (25.83)
HSD	103.57	95.302	5.43	207.09

^zLetras iguales al interior de cada variable química indican que no se registró diferencia significativa (Tukey, 0.05). Se muestra también entre paréntesis el error estándar.

5.3.2 Evaluación de potencial pigmentante

Curva de pigmentación

Se construyeron dos curvas de pigmentación para encontrar la cantidad a adicionar a la matriz alimentaria (yogur). Se encontró que 4 g de cada punto de extracto evaluado fue la cantidad necesaria para pigmentar el yogur, ya que, al agregarse más cantidad, no había modificación en el ángulo de tono (77.05 ± 2.29).

Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color en yogur

Se analizó el cambio de coloración en términos de luminosidad (L^*), ángulo hue ($^{\circ}h$) y cromaticidad (C^*) que otorgaron los extractos de los puntos 3 y 4 a dos temperaturas (conservativa, C y deteriorativa, D) en las muestras de yogur, encontrándose diferencia significativa en las tres variables estudiadas ($p < 0.05$) (Figura 8).

En el caso de la luminosidad se encontró diferencia significativa entre las interacciones ($p < 0.05$), en donde el punto 3 a temperatura D tuvo una caída más rápida llegando a 64.57. Las otras tres condiciones se mantuvieron por arriba de 70. El valor de esta variable fue alto debido al color del yogur, el cual tuvo un valor de L^* cercano a 100. En la variable del ángulo hue, los dos puntos estudiados a las 2 temperaturas tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$). En el punto 3 a temperatura C y el punto 4 a temperatura D, aumentó al paso del tiempo de evaluación el $^{\circ}h$, mientras que en los otros dos puntos hubo una disminución. Con respecto a la cromaticidad, el punto 3 y 4 a temperatura C, siguieron la misma tendencia hacia una disminución rápida de esta variable; sin embargo, estos dos puntos a temperaturas D no tuvieron diferencia significativa ($p > 0.05$). Los valores de C^* tuvieron una tendencia hacia la coordenada a^* , la cual abarca el color rojo, indicando que la matriz coloreada manifestó tonos en ese color.

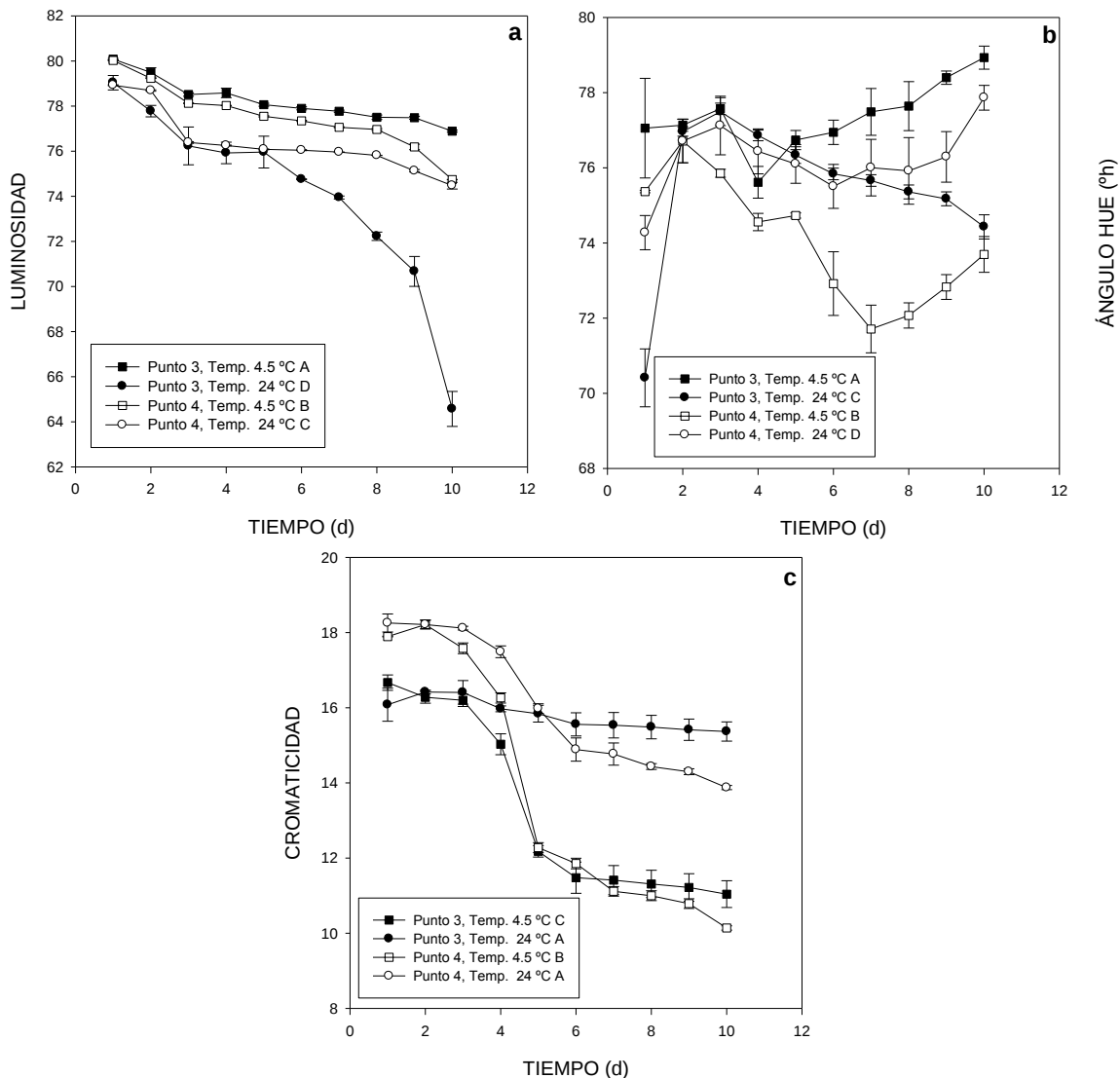


Figura 8. Cambios durante la evaluación de potencial pigmentante en luminosidad, ángulo hue y cromaticidad para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na3Cit-Peg4000 basados en “Muestra” a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.

Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el pH del yogur.

En el efecto del pH sobre el yogur hubo diferencia significativa entre los puntos a las dos condiciones ($p < 0.05$) (Figura 9), en donde el pH del yogur aumentó durante el periodo de almacenamiento de las muestras. El punto 3 a temperatura

D fue el que manifestó mayor aumento de esta variable determinada (3.75). La acidez se encuentra muy relacionada con el pH, en donde al existir un aumento de la primera da como resultado la postacidificación de productos, en donde continúa la fermentación por bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento con la producción de ácido láctico (Aportela-Palacios, Sosa-Morales & Vélez-Ruiz, 2005).

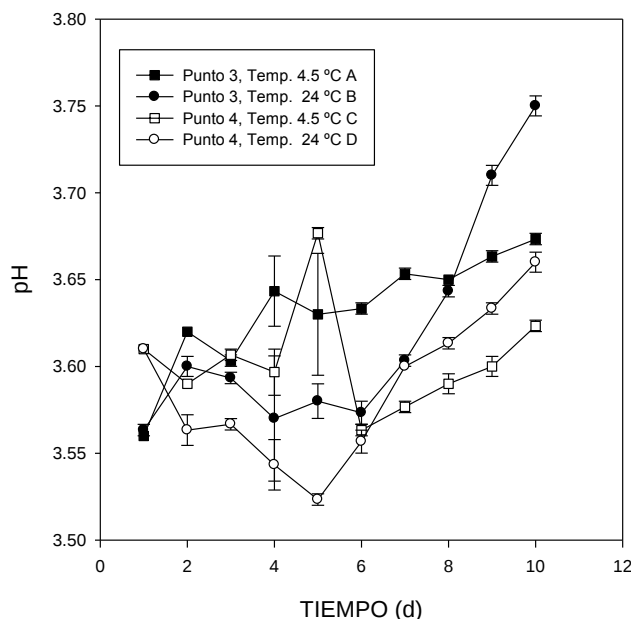


Figura 9. Cambio del pH durante la evaluación de potencial pigmentante para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na3Cit-Peg4000 basados en “Muestra” a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.

Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de antocianinas del yogur.

La concentración de antocianinas presentes en yogur exhibió una diferencia significativa entre puntos y condiciones ($p < 0.05$). Por otra parte, estas concentraciones fueron bajas, iniciando con valores un poco arriba de 8 $\mu\text{g ECC mL}^{-1}$. El punto 4 a temperatura C se mantuvo por arriba de los demás durante el tiempo de almacenamiento. La concentración de este metabolito, particularmente el del epicarpio de aguacate, está fuertemente influenciado por el cambio de pH,

en donde la degradación comienza a observarse a pH's por arriba de 3, además de que la concentración inicial de antocianinas en la cáscara fue baja.

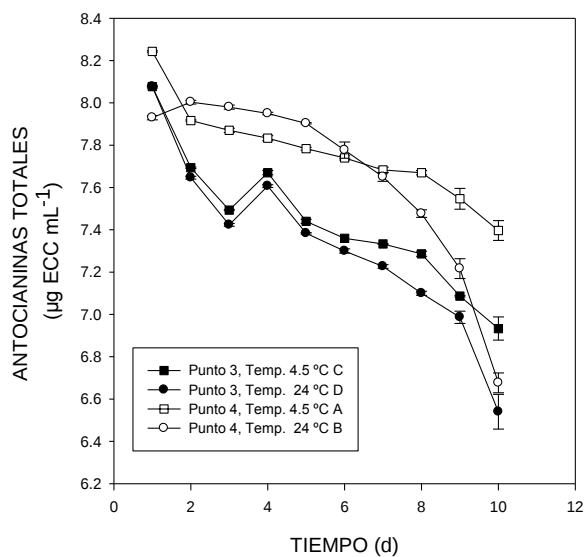


Figura 10. Cambio en la concentración de antocianinas durante la evaluación de potencial pigmentante para las mezclas de los puntos 3 y 4 formados por Na3Cit-Peg4000 basados en “Muestra” a temperatura conservativa (4.5 °C) y deteriorativa (24 °C). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa en cada condición.

5.4 Conclusiones

El contenido de fenoles solubles, flavonoides, antocianinas y taninos condensables se modifica en el epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' durante la maduración del fruto en el periodo postcosecha, alcanzando valores máximos entre 8 y 10 d posteriores al corte en una condición térmica ambiental. La extracción acuosa en dos fases es un procedimiento útil para separar compuestos bioactivos de epicarpio de aguacate 'Hass' obtenido de distintos estados de madurez del fruto. Los extractos de epicarpio de aguacate 'Hass' pueden utilizarse como agente pigmentante de matrices alimenticias, aunque por el bajo contenido de antocianinas hallado se obtienen coloraciones localizadas entre el rojo y el amarillo.

5.5 Referencias

- Awad, M. and R.E. Young. (1979). Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill., cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiology*, 64, 306-308.
- Aportela-Palacios, A., Sosa-Morales, M. E., & Vélez-Ruiz, J. F. (2005). Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. *Journal of Texture Studies*, 36(3), 333–349.
- Atala, E., Aspée, A., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2013). Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.007>
- Arpaia, M. L., Collin, S., Sievert, J., & Obenland, D. (2018). 'Hass' avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 76-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.015>
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Woolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 287-294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008>
- Defilippi, B. G., Ejsmentewicz, T., Covarrubias, M. P., Gudenschwager, O., & Campos-Vargas, R. (2018). Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of "Hass" avocados (*Persea americana* Mill.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 142-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.018>
- Eigenmann, P., & Haenggeli, C. (2007). Food colourings and preservatives. *The Lancet*, 370(9598), 1524–1525. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61643-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61643-2)
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127(3), 1138-1145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.115>
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. 27(12), 1254. doi: 10.21273/hortsci.27.12.1254
- Nambi, V. E., Thangavel, K., Shahir, S., & Chandrasekar, V. (2016). Color Kinetics During Ripening of Indian Mangoes. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2147-2155. doi: 10.1080/10942912.2015.1089281
- Ochoa-Ascencio, S., Hertog, M. L. A. T. M., & Nicolai, B. M. (2009). Modelling the transient effect of 1-MCP on 'Hass' avocado softening: A Mexican comparative study. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 62-72. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.06.002>.

- Olaetta, J. (2003). Industrialización Del Aguacate: Estado Actual Y Perspectivas Futuras. *Proceedings V World Avocado Congress*, 749–754. Retrieved from http://www.avocadosource.com/WAC5/papers/wac5_p749.pdf.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214-1218. doi: 10.1021/jf60219a031
- Salcedo, R., Quiñones, Y., Melgarejo, L. M., Hernández, M., & Fernández-Trujillo, J. P. (2018). Variation in the fatty acid profile and quality of ‘Hass’ avocados preserved during cold storage. *Acta Horticulturae*, 1007-1010. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1194.143
- Sierra, N. M., Londoño, A., Gómez, J. M., Herrera, A. O., & Castellanos, D. A. (2019). Evaluation and modeling of changes in shelf life, firmness and color of ‘Hass’ avocado depending on storage temperature. *Food Science and Technology International*, 25(5), 370-384. doi: 10.1177/1082013219826825
- Singleton, V. L. ., & Rossi, J. J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Solorzano-Morán, S., Alia Tejacal, I., Rivera-Cabrera, F., Lopez-Martinez, V., Pérez-Flores, L., Pelayo-Zaldívar, C., . . . Jiménez-Hernández, J. (2015). Quality attributes and functional compounds of Mexican plum (*Spondias purpurea* L.) fruit ecotypes. *Fruits*, 70. doi: 10.1051/fruits/2015027
- Swaroop, V. R., Dinesh Roy, D., & Vijayakumar, T. (2011). Genotoxicity of Synthetic Food Colorants. 1, 128–134.
- Stintzing, F. C., Trichterborn, J., Carle, R. (2006). Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94, 296–309. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.018
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommès, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.013>
- Terasawa, N., Sakakibara, M., & Murata, M. (2006). Antioxidative Activity of Avocado Epicarp Hot Water Extract. *Food Science and Technology Research*, 12(1), 55–58. <https://doi.org/10.3136/fstr.12.55>
- Tiwari, U., & Cummins, E. (2013). Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, 50(2), 497-506. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.007>
- Valle-Guadarrama, S., Morales-Cabrera, M., Peña-Valdivia, C. B., Mora-Rodríguez,

B., Alia-Tejacal, I., Corrales-García, J., & Gómez-Cruz, A. (2013). Oxidative/Fermentative Behavior in the Flesh of “Hass” Avocado Fruits Under Natural and Controlled Atmosphere Conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 272-282. doi: 10.1007/s11947-011-0747-8

Vargas-Torrico, F. (2019). Diseño y aplicación de bio-recubrimientos con antifúngicos naturales para extender la vida postcosecha de fresa (*Fragaria* x *ananassa*). Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias en Tecnología Avanzada. Ciudad de México, México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional.

CONCLUSIONES GENERALES

La cáscara de aguacate 'Hass' mostró ser un subproducto aprovechable para la obtención de compuestos bioactivos, esto al manifestar un alto contenido de fenoles solubles totales, flavonoides y taninos. Para el caso de las antocianinas, la concentración fue baja en comparación con otros subproductos de diversos frutos.

Al separar los compuestos bioactivos mediante el método de extracción acuosa en dos fases (ATPE), se encontró que la mezcla de polietilenglicol 4000 (Peg4000) y Na_3Cit al incorporarse Muestra, recuperó con mayores concentraciones a éstos, mientras que en caso contrario con la incorporación de Extracto como disolvente, la mezcla realizada utilizando la sal MgSO_4 presentó la mayor recuperación, además de manifestar el mayor potencial de exclusión salina. El punto 1 de la línea principal de operación presentó la mayor capacidad antioxidante mediante el método ABTS y el punto 3 manifestó la mayor capacidad por el método FRAP. El uso de la técnica de ATPE constituyó una herramienta con potencial alto de recuperación de compuestos a partir de epicarpio de frutos de aguacate 'Has' y realizar su concentración por medios no térmicos.

Durante los 11 días de almacenamiento postcosecha a temperatura ambiente del fruto de aguacate 'Hass' presentó en su textura una cinética tipo sigmoideal y con un color más oscuro pero con menos intensidad. Además de presentar la mayor concentración de compuestos bioactivos en los días 8 y 10 de la maduración postcosecha.

Los extractos de epicarpio de frutos de aguacate 'Hass' en estado de madurez de consumo tienen un uso potencial para colorear matrices alimentarias, sin embargo la coloración de las antocianinas en el yogur tendió entre el rojo y el amarillo en la evaluación.