

Obtención de un colorante natural a partir de la semilla de aguacate criollo empleando un
proceso secuencial de hidrólisis enzimática y ultrasonido

Karol Dayanna Infante García y Neider Esteban López Santana

Trabajo de Grado para Optar el Título de Profesional en Ingeniería Química

Modalidad de investigación

Directora

Lilia Carolina Rojas Pérez

Doctora en Ingeniería

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

“A mi Nievitas, quien siempre me ha acompañado en cada etapa de mi vida y me ha demostrado que soy más fuerte de lo que me imagino, te amo de aquí al cielo mi viejita linda.

A mi mamá, Claudia, por ser mi ejemplo a seguir, por creer en todo momento y por enseñarme que siempre hay cosas hermosas por las cuales luchar. Gracias por formarme con amor y ayudarme a ser mejor persona cada día.

A Mari, la loca, por nunca dejarme sola, por hacerme sentir amada y por llenar mis días con una sonrisa, incluso en los momentos menos esperados.

A mi papá, Tigre, porque cada día busca la manera de que nuestra familia sea feliz y por siempre ser un hombre servicial, dedicado y comprometido con quienes ama.

Finalmente, a ustedes, mi familia, por ser mi apoyo incondicional en este largo camino. Los amo con todo mi corazón, espero este logro también sea de orgullo y felicidad para cada uno de ustedes.”

-Karol Infante-

“Esta tesis la dedico a quién amé tanto y que aún extraño: mi abuelita ‘Conchis’ quién no está en este mundo pero que seguramente en alguna parte de este gran universo está orgullosa de mí, así como me lo decía cuando era niño, jamás olvidaré sus coplas, la dulzura de su voz y sus caricias llenas de amor. Su recuerdo ha sido una fuente de fortaleza en mi camino... Te amo.”

-Neider López-

Agradecimientos

“Agradezco a mi familia, quienes siempre confiaron en mí y me enseñaron que todas las cosas que pasan a lo largo de la vida nos dejan un nuevo aprendizaje, por siempre acompañarme, guiarme y motivarme desde la distancia.

A Esteban, quien día a día se convirtió en una de las mejores amistades, gracias por siempre confiar y apoyarme en todo este largo camino.

A la profesora Carolina Rojas, mi directora de tesis, por su tiempo, dedicación y entrega en el proyecto y en este proceso. Gracias por cada uno de los aprendizajes obtenidos en este largo proceso y por el voto de confianza depositado en este proyecto.

Al docente Luis Javier y al docente Carlos Muvdi, por permitirnos el espacio en los laboratorios para el desarrollo de nuestro proyecto.

A mis amigas, quienes desde la distancia me apoyaron, me motivaron y me sacaron una sonrisa. Gracias por formar parte de esta etapa tan importante en mi vida.

A Dayanna, quien siempre pudo superar cada uno de los obstáculos que aparecían a lo largo del camino, sigue siendo esa mujer apasionada y brillante.”

-Karol Infante-

“Agradezco mucho primeramente a mi familia por darme ánimos y demostrar que las cosas se logran con dedicación, aceptando y aprendiendo de los errores.

A mi directora de tesis Lilia Carolina Rojas por darme la oportunidad de trabajar en diversas áreas que me apasionan mucho.

A mi amiga y compañera de tesis Karol Infante no solo por trabajar conmigo en este trabajo de investigación, sino también por los momentos vividos que más hemos tenido en estos últimos semestres y especialmente en la vida social que aún seguiremos compartiendo.

Al docente Luis Javier López junto con el docente Carlos Muvdi por darnos el acceso al laboratorio para realizar nuestro trabajo de grado.

A todos mis amigos quiénes estuvieron a lo largo de la carrera y aún están en mi vida, los llevo en mi corazón.

Al universo y a la vida por darme momentos buenos y malos que me permiten ser lo que soy hoy en día.”

-Neider López-

Tabla de contenido

Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1. Objetivo general.....	16
1.2. Objetivos específicos	16
2. Estado del arte.....	17
2.1. Potencial de la semilla de aguacate como fuente de colorantes naturales	17
2.2. Extracción asistida por ultrasonido aplicada a matrices vegetales	18
2.3. Tratamiento enzimático como estrategia para mejorar la extracción	19
2.4. Influencia del almidón sobre la transferencia de masa	20
2.5. Caracterización de extractos naturales obtenidos	20
2.6. Influencia de tratamientos combinados sobre la recuperación de compuestos bioactivos	21
3. Metodología	22
3.1. Materia prima.....	22
3.2. Caracterización de la semilla de aguacate	22
3.2.1. Determinación de humedad	22
3.2.2. Determinación del contenido de almidón	22
3.2.3. Determinación del contenido total de polifenoles	24
3.3. Procesos evaluados	24

3.3.1. Preparación de las diferentes concentraciones de almidón en la lechada, mediante el ajuste de sólidos.....	26
3.3.2. Proceso 1: Tratamiento en dos etapas secuenciales: hidrólisis enzimática con la enzima α -amilasa seguido de extracción asistida por ultrasonido	26
3.3.3. Proceso 2: Extracción asistida únicamente por ultrasonido.....	27
3.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico	28
3.3.5. Separación sólido-líquido	30
3.4. Caracterización de los extractos obtenidos	30
3.4.1. Cuantificación de azúcares reductores.....	30
3.4.2. Determinación del contenido total de polifenoles	31
3.4.3. Caracterización colorimétrica	31
3.4.4. Determinación del rendimiento de extracción para cada compuesto co-extraído	32
4. Resultados y análisis de resultados	33
4.1. Caracterización de la materia prima	33
4.2. Comparación del rendimiento global de azúcares reductores, polifenoles y colorante natural para los procesos evaluados	34
4.2.1. Rendimiento de extracción de azúcares reductores	35
4.2.2. Rendimiento de extracción de polifenoles	38
4.2.3 Rendimiento de extracción del colorante natural.....	40
4.2.4 Comparación estadística de los compuestos recuperados entre procesos.....	43

4.3.	Caracterización colorimétrica de los extractos obtenidos.....	44
4.3.1.	Caracterización colorimétrica del proceso 1	44
4.3.2.	Características colorimétricas del proceso 2.....	47
4.3.3.	Comparación colorimétrica entre los procesos 1 y 2	50
Conclusiones		55
Recomendaciones		56
Referencias bibliográficas.....		57
Apéndices.....		61

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de los tratamientos experimentales evaluados para la extracción del colorante natural de la semilla de aguacate.	24
Figura 2. Rendimiento másico global de azúcares reductores según el proceso empleado.	35
Figura 3. Rendimiento másico global de polifenoles según el proceso empleado.	39
Figura 4. Rendimiento másico global del colorante según el proceso empleado.	41
Figura 5. Coordenada L^* de los ensayos 1 al 9 correspondientes al proceso 1.	44
Figura 6. Coordenada a^* de los ensayos 1 al 9 correspondientes al proceso 1.	45
Figura 7. Coordenada b^* de los ensayos 1 al 9 correspondiente al proceso 1.	45
Figura 8. Valor de ΔE entre G y HE para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.	46
Figura 9. Valor de ΔE entre HE y US para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.	46
Figura 10. Valor de ΔE entre G y US para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.	47
Figura 11. Coordenada L^* de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.	48
Figura 12. Coordenada a^* de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.	48
Figura 13. Coordenada b^* de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.	49
Figura 14. Valor de ΔE como diferencia entre la preparación de la mezcla (corriente 5) y la etapa de US (corriente 13) para los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.	49
Figura 15. Diagrama de color CIELab para el proceso 1 (ensayos 1 al 9 de la corriente 13).	50
Figura 16. Diagrama de color CIELab para el proceso 2 (ensayos 10 al 18 de la corriente 13). ..	52
Figura 17. Valor de ΔE para cada grupo experimental (entre los obtenidos por US).	53

Figura 18. <i>Actividad relativa de α-amilasa.</i>	62
Figura 19. <i>Curva patrón DNS.</i>	64
Figura 20. <i>Curva patrón Folin-Ciocalteu.</i>	66

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Diseño experimental.</i>	28
Tabla 2. <i>Matriz experimental del diseño factorial 3x3.</i>	29
Tabla 3. <i>Composición obtenida de la semilla de aguacate criollo.</i>	34
Tabla 4. <i>ANOVA de la extracción de azúcares reductores de cada proceso.</i>	38
Tabla 5. <i>ANOVA de la recuperación de polifenoles de cada proceso.</i>	40
Tabla 6. <i>ANOVA de la extracción de colorante de cada proceso.</i>	42
Tabla 7. <i>ANOVA del rendimiento extraído y recuperado según el compuesto entre los procesos.</i>	43
Tabla 8. <i>Soluciones de azúcares reductores.</i>	63
Tabla 9. <i>Soluciones de ácido gálico.</i>	65

Lista de apéndices

Apéndice A. <i>Buffer solución citrato de sodio y ácido cítrico ajustando a pH 4.6.</i>	61
Apéndice B. <i>Actividad relativa según temperatura y pH de la enzima α-amilasa.</i>	62
Apéndice C. <i>Método analítico DNS.</i>	63
Apéndice D. <i>Método analítico Folin-Ciocalteu.</i>	65

Resumen

Título: Obtención de un colorante natural a partir de la semilla de aguacate criollo empleando un proceso secuencial de hidrólisis enzimática y ultrasonido. *

Autores: Karol Dayanna Infante García, Neider Esteban López Santana. **

Palabras claves: Ultrasonido, colorante natural, α -amilasa, pared celular, almidón, perseorangina, aguacate criollo.

Descripción:

La presente investigación tuvo como objetivo reducir el efecto barrera generado por la fracción de almidón presente en la matriz vegetal de la semilla de aguacate criollo y favorecer la liberación de un colorante natural mediante un proceso de extracción asistido por ultrasonido, precedido por hidrólisis enzimática con α -amilasa. Inicialmente, se caracterizó la materia prima determinando el contenido de humedad, almidón y polifenoles totales. Posteriormente, se evaluaron dos procesos de extracción: (1) un tratamiento secuencial de hidrólisis enzimática y ultrasonido y (2) un tratamiento basado únicamente en ultrasonido como técnica no convencional de separación. Para ambos procesos se empleó un diseño factorial completo 3×3 , considerando como factores la concentración de almidón en la lechada, ajustada mediante la relación sólido:líquido a niveles de 2,0; 2,5 y 3,0 % p/v, y la temperatura de extracción por ultrasonido, establecida en 30, 40 y 50 °C. Los extractos obtenidos fueron caracterizados mediante la cuantificación de azúcares reductores y polifenoles totales, además del análisis colorimétrico CIELab. Los resultados mostraron que la concentración de almidón y la temperatura no ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre las variables evaluadas ($p > 0,05$). El proceso con hidrólisis enzimática presentó rendimientos de colorante entre 62 y 81 % b.s., superiores a los obtenidos mediante ultrasonido (23–35 % b.s.), evidenciándose diferencias significativas entre ambos procesos ($p = 0,001$). Asimismo, la hidrólisis enzimática modificó significativamente la recuperación de azúcares reductores ($p = 0,002$), mientras que no produjo diferencias significativas en la recuperación de polifenoles ($p = 0,49$). La caracterización colorimétrica evidenció tonalidades entre amarillo-anaranjado y rojo-anaranjado, asociadas con la presencia de perseorangina. En conjunto, los resultados demuestran que la combinación de hidrólisis enzimática y ultrasonido constituye una alternativa viable para la obtención de un colorante natural a partir de semilla de aguacate criollo.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora Lilia Carolina Rojas Pérez.

Abstract

Title: Obtaining a natural colorant from criollo avocado seeds using a sequential process of enzymatic hydrolysis and ultrasound. *

Authors: Karol Dayanna Infante García, Neider Esteban López Santana. **

Key words: Ultrasound, natural colorant, α -amylase, cell wall, starch, persorangin, criollo avocado.

Description:

The present study aimed to reduce the barrier effect generated by the starch fraction present in the plant matrix of criollo avocado seeds and promote the release of a natural colorant through an ultrasound-assisted extraction process preceded by enzymatic hydrolysis with α -amylase. Initially, the raw material was characterized by determining its moisture, starch, and total polyphenol contents. Subsequently, two extraction processes were evaluated: (1) a sequential treatment involving enzymatic hydrolysis followed by ultrasound and (2) a treatment based solely on ultrasound as a non-conventional separation technique. For both processes, a 3×3 full factorial design was employed, considering starch concentration in the slurry, adjusted through the solid-to-liquid ratio at levels of 2,0, 2,5, and 3,0% w/v, and ultrasound extraction temperature, set at 30, 40, and 50 °C. The extracts obtained were characterized by quantifying reducing sugars and total polyphenols, along with CIELab colorimetric analysis. The results showed that starch concentration and temperature did not exert a statistically significant effect on the evaluated variables ($p > 0,05$). The enzymatic hydrolysis process yielded colorant recoveries ranging from 62 to 81% d.b., higher than those obtained using ultrasound alone (23–35% d.b.), with significant differences between both processes ($p = 0,001$). Likewise, enzymatic hydrolysis significantly affected reducing sugar recovery ($p = 0,002$), whereas no significant differences were observed in polyphenol recovery ($p = 0,49$). Colorimetric characterization revealed yellow-orange to red-orange hues, associated with the presence of persorangin. Overall, the results demonstrate that the combination of enzymatic hydrolysis and ultrasound constitutes a viable alternative for obtaining a natural colorant from criollo avocado seeds.

* Bachelor Thesis.

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora Lilia Carolina Rojas Pérez.

Introducción

Los colorantes sintéticos a nivel mundial se utilizan como aditivos en productos alimenticios, cosméticos y textiles para darles color, sin embargo, varios reportes e investigaciones mencionan que “los colorantes artificiales están directamente asociados con diversas patologías, como cáncer, alergias alimentarias, problemas gastrointestinales y respiratorios” (Oliveira et al., 2024). Por lo tanto, recientemente organizaciones como el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (HHS: *U.S. Department of Health and Human Services* por sus siglas en inglés) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA: *Food and Drug Administration* por sus siglas en inglés) están tomando medidas de acción y prohibición frente a esa situación con el fin de minimizar este impacto en la salud principalmente con los colorantes rojo cítrico No. 2, Naranja B, FD&C Verde No. 3, entre otros, por medio de la transición a colorantes naturales obtenidos por microorganismos, plantas y minerales (FDA, 2025).

Por ejemplo, a partir de las cáscaras de los cítricos se podrían obtener colorantes como los carotenoides, ya que estos compuestos se encuentran concentrados en alrededor del 70% en la parte externa de la cáscara, esto daría la oportunidad de aprovechar los residuos de esta industria evitando su posterior contaminación. Por otra parte, la semilla de aguacate representa aproximadamente el 13 al 18% del peso total del fruto (Bachiller Soria, 2022) y suele desecharse; sin embargo, en el año 2019, se demostró la presencia de un colorante denominado perseorangina, cuya formación está asociada a procesos de oxidación enzimática y que genera tonalidades amarillo-anaranjadas a rojo-anaranjadas (Hatzakis et al., 2019). Para obtener este colorante se han probado procesos no convencionales como el ultrasonido (Arlene et al., 2015), lo que demuestra el potencial de este tipo de biomasa como materia para la obtención de colorantes naturales.

Además del colorante perseorangina, la semilla de aguacate posee una composición química que incrementa su potencial de aprovechamiento industrial. Estudios recientes han reportado contenidos elevados de carbohidratos, que pueden representar alrededor del 65% de la materia seca, incluyendo azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, perseitol y D-manoheptulosa (Bangar et al., 2022). Estos compuestos pueden favorecer la incorporación de los extractos en matrices alimentarias, sistemas de encapsulación y materiales biodegradables. Adicionalmente, la semilla contiene cantidades significativas de compuestos fenólicos, los cuales presentan reconocida actividad antioxidante y han sido ampliamente estudiados por su potencial aplicación en alimentos funcionales, empaques activos y productos cosméticos (Bangar et al., 2022). Por consiguiente, la obtención de colorantes a partir de esta biomasa podría generar un ingrediente multifuncional, capaz de aportar simultáneamente color natural y compuestos bioactivos de interés tecnológico. Debido a las tonalidades asociadas a la perseorangina (Hatzakis et al., 2019), estos extractos representan una alternativa potencial al uso de colorantes sintéticos empleados para generar colores similares, como Rojo Cítrico No.2 y Naranja B.

Desde el punto de vista químico, la semilla de aguacate presenta una matriz vegetal rica en carbohidratos de reserva, destacando el almidón como una fracción importante. Estudios han reportado contenidos de almidón en semillas de aguacate entre 20 y 30% en base seca, dependiendo de la variedad y origen de la materia prima, con valores reportados de 20,05% para la variedad Lorena y 27,28% para variedad Hass (Delgado-Santillán et al., 2026). Esta fracción podría influir en los fenómenos de transferencia de masa durante la extracción sólido-líquido. Por esta razón, la hidrólisis enzimática con una enzima como la α -amilasa podría favorecer la ruptura del almidón y facilitar la extracción del colorante natural. En este contexto, surge la pregunta de investigación: ¿el uso de la enzima α -amilasa permitirá mejorar la extracción del colorante natural presente en la

semilla de aguacate criollo mediante la reducción del efecto barrera asociado a la fracción de almidón durante la extracción asistida por ultrasonido?

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento enzimático con la enzima α -amilasa seguido de la extracción asistida por ultrasonido sobre la reducción del efecto barrera asociado a la fracción de almidón y la recuperación del colorante natural presente en la semilla de aguacate criollo.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del contenido natural de almidón presente en la semilla de aguacate criollo y de la aplicación de la enzima α -amilasa sobre la disminución del efecto barrera de la fracción amilácea y su influencia en la extracción del colorante natural.
- Comparar el rendimiento de extracción del colorante natural obtenido a partir de la semilla de aguacate criollo entre un proceso de extracción asistida por ultrasonido y un proceso de hidrólisis enzimática con α -amilasa seguida de ultrasonido, considerando la variación de la temperatura en la etapa de extracción.
- Caracterizar la fracción soluble obtenida durante las etapas de hidrólisis enzimática y extracción asistida por ultrasonido, mediante el análisis de las propiedades colorimétricas del colorante extraído y la cuantificación de azúcares reductores y polifenoles co-extraídos.

2. Estado del arte

2.1. Potencial de la semilla de aguacate como fuente de colorantes naturales

La búsqueda de fuentes naturales de colorantes ha incrementado debido a la necesidad de sustituir pigmentos sintéticos por alternativas provenientes de matrices renovables y con menor impacto ambiental. En este contexto, los residuos agroindustriales han adquirido importancia debido a que contienen compuestos bioactivos que pueden ser recuperados y transformados en productos de mayor valor agregado.

La semilla de aguacate (*Persea americana*) representa una biomasa con potencial de aprovechamiento debido a su contenido de compuestos fenólicos, carbohidratos y pigmentos naturales. Aunque generalmente es considerada un residuo agroindustrial, su composición química permite plantear alternativas de valorización mediante procesos de extracción orientados a la recuperación de compuestos de interés.

Dentro de los compuestos asociados a la coloración de la semilla de aguacate se encuentra la perseorangina, identificada por Hatzakis et al., (2019) como el compuesto coloreado más abundante en el extracto de semilla de aguacate. Este pigmento corresponde a un compuesto glicosilado que contiene un grupo benzotropónico y presenta una tonalidad amarillo-anaranjada, asociada con la coloración característica desarrollada por la semilla.

Además de los compuestos responsables de la coloración, la semilla de aguacate presenta una composición química que favorece su aprovechamiento industrial. Se han reportado contenidos de carbohidratos cercanos al 65% de la materia seca, incluyendo glucosa, fructosa, sacarosa, perseitol y D-manoheptulosa. Así mismo, se ha identificado una cantidad significativa de compuestos fenólicos asociados con actividad antioxidante, los cuales pueden incrementar el valor funcional de los extractos obtenidos (Bangar et al., 2022).

2.2. Extracción asistida por ultrasonido aplicada a matrices vegetales

Los procesos convencionales de extracción pueden presentar limitaciones debido a los tiempos prolongados de operación, el consumo elevado de solventes y las restricciones generadas por la estructura celular de la biomasa vegetal. Por esta razón, las tecnologías no convencionales han sido estudiadas como alternativas para aumentar la recuperación de compuestos bioactivos.

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) se basa en la generación de ondas ultrasónicas dentro del medio líquido, produciendo cavitación acústica. Este fenómeno genera la formación y colapso de microburbujas, ocasionando efectos físicos como microcorrientes, turbulencia y fuerzas de cizallamiento que favorecen la ruptura parcial de las estructuras celulares y aumentan la interacción entre el solvente y la matriz vegetal.

El efecto de estas variables fue evaluado en la extracción de compuestos de la semilla de aguacate, donde se encontró que el tratamiento con ultrasonido permitió obtener extractos con capacidad colorante y presencia de compuestos fenólicos. Además, se reportó que las condiciones de temperatura y relación solvente-materia prima influyen sobre las características del extracto obtenido, alcanzando rendimientos cercanos al 23% en base seca bajo las condiciones evaluadas (Arlene et al., 2015).

Estos resultados demuestran que el ultrasonido puede favorecer la transferencia de masa durante la extracción; sin embargo, su eficiencia depende de la accesibilidad del solvente hacia los compuestos retenidos en la matriz vegetal.

La eficiencia del ultrasonido está directamente relacionada con la intensidad del fenómeno de cavitación, el cual favorece la penetración del solvente hacia el interior de la biomasa y acelera la difusión de los compuestos extraíbles. En comparación con los métodos convencionales, esta tecnología permite reducir los tiempos de extracción y el consumo de solventes, manteniendo la

estabilidad de compuestos sensibles al calor, razón por la cual ha sido ampliamente empleada para la recuperación de metabolitos de interés presentes en matrices vegetales (Arlene et al., 2015).

2.3. Tratamiento enzimático como estrategia para mejorar la extracción

La estructura de las matrices vegetales puede limitar la liberación de compuestos de interés debido a la presencia de componentes que dificultan la difusión del solvente hacia el interior celular. Por esta razón, los tratamientos previos mediante enzimas han sido estudiados como una estrategia para modificar selectivamente la composición de la biomasa.

La extracción asistida por enzimas permite aprovechar la capacidad catalítica de diferentes enzimas para degradar componentes específicos de la matriz vegetal, favoreciendo la liberación de compuestos retenidos y mejorando los fenómenos de transferencia de masa. Este tipo de tratamiento ha sido aplicado principalmente sobre frutas, semillas y residuos vegetales debido a su selectividad y bajo impacto sobre compuestos sensibles (Singla & Sit, 2021).

En particular, la α -amilasa tiene como función principal catalizar la hidrólisis de enlaces α -1,4 glucosídicos presentes en el almidón, generando moléculas de menor tamaño como dextrinas y azúcares reductores. Por lo tanto, su aplicación sobre la semilla de aguacate puede modificar la fracción amilácea presente y disminuir la resistencia asociada a esta estructura durante la extracción del colorante.

La eficiencia de la hidrólisis enzimática depende de factores como el pH, la temperatura y la accesibilidad del sustrato. Cuando el almidón es sometido previamente a un proceso de gelatinización, los gránulos aumentan su capacidad de hidratación y su estructura se vuelve susceptible al ataque de la α -amilasa, favoreciendo la ruptura de los enlaces glucosídicos. Esta modificación de la matriz puede facilitar posteriormente la extracción de los compuestos cromóforos mediante tecnologías no convencionales como el ultrasonido (Singla & Sit, 2021).

2.4. Influencia del almidón sobre la transferencia de masa

La transferencia de masa en procesos de extracción sólido-líquido depende de la interacción entre el solvente y la matriz vegetal. Cuando la estructura interna del material presenta componentes capaces de retener los compuestos de interés, la difusión puede verse limitada y disminuir la eficiencia del proceso.

En el caso de la semilla de aguacate, el almidón constituye una fracción importante de carbohidratos presentes. Se han reportado contenidos de almidón de 20,05% en base seca para la semilla de aguacate variedad Lorena y 27,28% para la variedad Hass, demostrando que este polisacárido puede representar una proporción significativa dentro de la composición química de la biomasa (Delgado-Santillán et al., 2026).

Esta fracción puede generar un efecto barrera debido a su organización estructural, reduciendo en contacto entre el solvente y los compuestos cromóforos presentes en la matriz vegetal. Por esta razón, la hidrólisis enzimática mediante la enzima α -amilasa representa una alternativa para modificar esta estructura y facilitar la liberación del colorante natural durante la extracción asistida por ultrasonido.

2.5. Caracterización de extractos naturales obtenidos

La evaluación de procesos de extracción de compuestos naturales requiere analizar tanto la cantidad recuperada como las características del extracto obtenido. En el caso de colorantes naturales, las propiedades cromáticas permiten determinar el efecto de las condiciones de operación sobre la intensidad y estabilidad del color.

Además, debido a la composición química de la semilla de aguacate, durante la extracción puede recuperarse otros compuestos como polifenoles. Estos compuestos han sido relacionados

con actividad antioxidante y representan un valor agregado del extracto obtenido (Bangar et al., 2022).

La cuantificación de azúcares reductores también permite evaluar cambios generados por tratamientos de hidrólisis, debido a que la ruptura del almidón produce moléculas más pequeñas que pueden ser detectadas mediante estos análisis. Por lo tanto, la evaluación conjunta de color, polifenoles y azúcares reductores permite establecer la influencia del tratamiento enzimático y ultrasónico sobre la recuperación del colorante natural.

2.6. Influencia de tratamientos combinados sobre la recuperación de compuestos

bioactivos

La aplicación de una sola tecnología de extracción puede presentar limitaciones debido a la complejidad estructural de las matrices vegetales. Por esta razón, la combinación secuencial de diferentes tratamientos ha sido estudiada como una alternativa para mejorar la recuperación de compuestos de interés, donde cada etapa del proceso contribuye a disminuir las restricciones presentes en la biomasa.

Los tratamientos enzimáticos permiten modificar componentes específicos de la estructura vegetal mediante reacciones de hidrólisis, mientras que tecnologías como el ultrasonido favorecen posteriormente la liberación de los compuestos debido a los efectos físicos generados por la cavitación acústica. Esta combinación permite mejorar la interacción entre la fase líquida y la matriz sólida, favoreciendo los fenómenos de transferencia de masa (Singla & Sit, 2021).

Sin embargo, la eficiencia de estos procesos depende de factores como la composición de la materia prima, tipo de enzima, concentración utilizada, temperatura y tiempo de tratamiento. Por esta razón, resulta necesario evaluar experimentalmente el efecto de cada etapa sobre la recuperación del colorante natural presente en la semilla de aguacate.

3. Metodología

3.1. Materia prima

La materia prima utilizada en esta investigación correspondió a semillas de aguacate criollo que fueron recolectadas, lavadas para remover impurezas y posteriormente almacenadas bajo condiciones de congelación a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el congelador de una nevera Haceb Bottom Mount de 382 L con panel digital (Haceb, Colombia), hasta su uso. Previo a cada ensayo experimental, las semillas fueron descongeladas a temperatura ambiente y sometidas a una reducción de tamaño mediante molienda de cuchillas en licuadora Oster® modelo 4655.

3.2. Caracterización de la semilla de aguacate

3.2.1. Determinación de humedad

El contenido de humedad de la semilla de aguacate fue determinado mediante una termobalanza Precisa XM 60 HR (Precisa Gravimetrics AG, Suiza), operada a 105°C hasta alcanzar peso constante. Los resultados obtenidos permitieron expresar las concentraciones de trabajo en base seca y utilizar las correcciones necesarias para la preparación de las relaciones sólido:líquido empleadas durante el desarrollo experimental.

3.2.2. Determinación del contenido de almidón

El contenido de almidón presente en la semilla de aguacate se determinó mediante la hidrólisis ácida, seguida de la cuantificación de azúcares reductores liberados. Para ello, se emplearon 5 g de semilla de aguacate seca, con un contenido de humedad inferior al 5%, a los cuales se adicionaron 20 mL de ácido clorhídrico al 24,5% y 150 mL de agua en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, se instaló un sistema de reflujo con circulación de agua

fría a 8 °C y la mezcla se calentó durante 2 h sobre una plancha Thermo Scientific™ Cimarec+ ® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) ajustada a 150 °C. Finalizado el tiempo de reacción, la mezcla se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se sometió a filtración al vacío utilizando una bomba Biobase de 30 l (Biobase, China). Finalmente, el filtrado obtenido se neutralizó hasta un pH de 7,0 mediante la adición de pellets de hidróxido de sodio, realizando el seguimiento con un medidor multiparámetro Edge® HI2020 (Hanna Instruments, Rumania). La concentración del almidón fue estimada a partir de la cantidad de azúcares reductores liberados durante el proceso de hidrólisis ácida. Para expresar la cantidad de azúcares liberados como su equivalente de almidón, se empleó un factor de conversión de 0,9. Este factor corresponde a la relación entre la masa molecular de la unidad de glucosa anhidra presente en el almidón (162 g/mol) y la masa molecular de la glucosa libre (180 g/mol), de acuerdo con la relación estequiométrica asociada a la hidrólisis del enlace glucosídico. Por tanto, el factor 0,9 permite convertir la cantidad de glucosa equivalente liberada durante la hidrólisis en la cantidad correspondiente de almidón presente inicialmente en la muestra. El contenido de almidón se calculó mediante la siguiente ecuación 1:

$$\%Almidón = \%Azúcares\ reductores \times 0,9$$

Ecuación 1

Donde %Almidón corresponde al contenido de almidón estimado en la muestra y %Azúcares reductores corresponde a la cantidad de azúcares reductores liberados durante la hidrólisis ácida, expresados como glucosa equivalente.

3.2.3. *Determinación del contenido total de polifenoles*

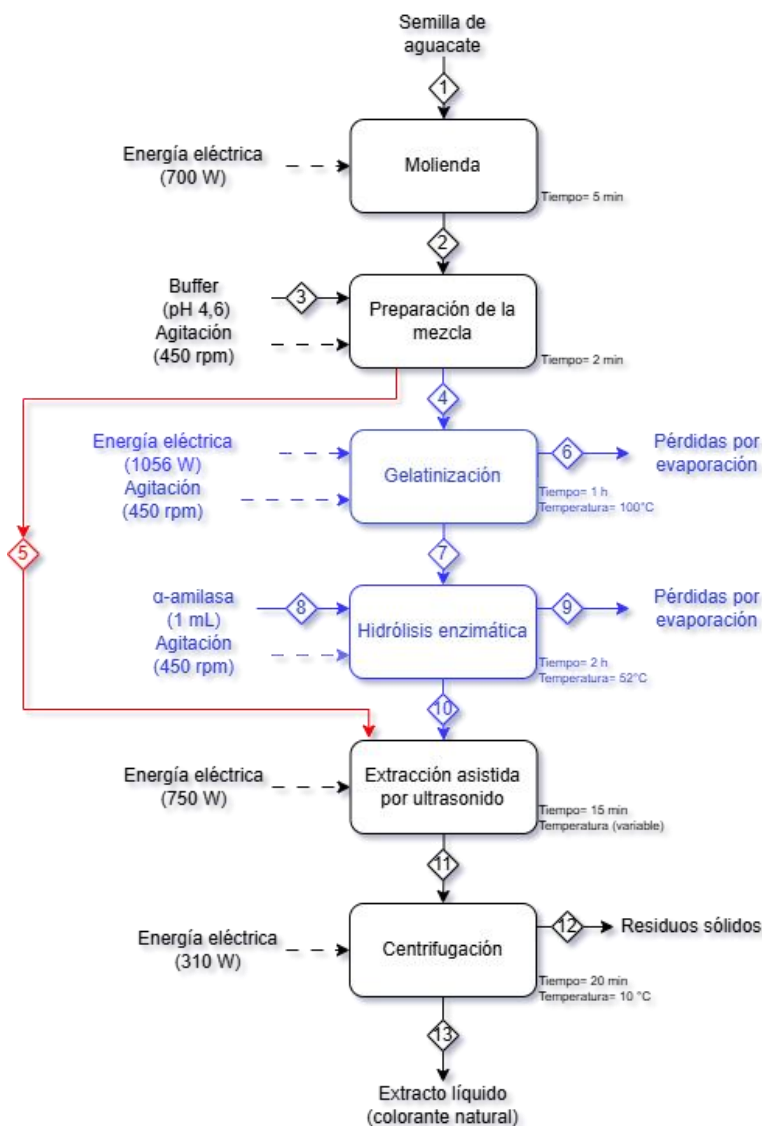
El contenido total de polifenoles fue determinado mediante el método Folin-Ciocalteu, este método consistió en la reducción de los compuestos principales del reactivo original Folin-Ciocalteu por los antioxidantes como polifenoles dentro de una solución de Na_2CO_3 al 7,5 % m/v, preparada disolviendo 7,5 g de carbonato de sodio y completando a 100 mL con agua destilada, provocando un cambio de color de amarillo a azul proporcional según la actividad reductora de los compuestos fenólicos (Pérez et al., 2023). Se utilizó el ácido gálico como patrón de referencia donde la concentración de polifenoles fue calculada a partir de su curva de calibración expresada en mg/L (ver Apéndice D).

3.3. Procesos evaluados

En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo de los tratamientos evaluados para obtener un colorante natural a partir de la extracción no convencional de semilla de aguacate.

Figura 1.

Diagrama de flujo de los tratamientos experimentales evaluados para la extracción del colorante natural de la semilla de aguacate.



Nota: Los bloques y las corrientes representados de color negro son aquellos en donde los procesos 1 y 2 son comunes. Los de color azul representa el proceso 1 y la corriente 5 (color rojo) es el trayecto del proceso 2.

Con el fin de evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la extracción del colorante natural presente en la semilla de aguacate criollo, se plantearon dos tratamientos experimentales: (1) tratamiento secuencial de dos etapas, la primera de ellas correspondiente a la hidrólisis enzimática empleando α -amilasa, seguido de extracción asistida por ultrasonido y (2) tratamiento mediante extracción asistida únicamente por ultrasonido. Debido a que ambos tratamientos comparten las etapas de preparación de la mezcla, extracción ultrasónica y separación sólido-

líquido, estas operaciones se describen de manera conjunta, indicando posteriormente las diferencias correspondientes a cada proceso. Como se evidencia en la Figura 1, el proceso 1 representado de color azul continúa de la etapa de preparación de la mezcla, siguiendo la gelatinización e hidrólisis enzimática mientras que el proceso 2 la corriente de salida 5 (color rojo) desde la etapa de preparación de la mezcla entra en la etapa de extracción asistida por ultrasonido.

3.3.1. Preparación de las diferentes concentraciones de almidón en la lechada, mediante el ajuste de sólidos

La concentración de la lechada que se evaluó en cada ensayo se preparó empleando tres concentraciones de almidón 2%, 2,5% y 3% p/v a partir de ajuste de los sólidos, teniendo en cuenta la composición de almidón característica de la semilla de aguacate criollo determinada según la metodología del numeral 3.2.2. Como líquido se utilizó buffer de citratos, preparados con una solución citrato de sodio (0,1 M) y ácido cítrico (0,1 M) a pH 4,6 (ver Apéndice A). El ajuste de pH se realizó utilizando un medidor multiparámetro Edge® HI2020 (Hanna Instruments, Rumania) previamente calibrado con soluciones buffer estándar. Posteriormente, la lechada obtenida fue sometida a agitación constante de 450 rpm, con el propósito de garantizar la adecuada dispersión de las partículas sólidas dentro del solvente para favorecer el contacto con la matriz vegetal. Estas preparaciones de lechada se emplearon en los posteriores procesos de extracción como muestra de estudio para la determinación de los azúcares reductores, polifenoles totales y colorante natural.

3.3.2. Proceso 1: Tratamiento en dos etapas secuenciales: hidrólisis enzimática con la enzima α -amilasa seguido de extracción asistida por ultrasonido

Con el fin de reducir el efecto barrera generado por la fracción de almidón presente en la matriz celular vegetal de la semilla de aguacate y favorecer los fenómenos de transferencia de

masa para la extracción del colorante natural, se implementó un tratamiento combinado de hidrólisis enzimática y extracción asistida por ultrasonido que consto de tres etapas.

3.3.2.1. Gelatinización (G).

Las mezclas se sometieron a una etapa de gelatinización en una plancha de calentamiento con agitación magnética Thermo Scientific™ Cimax+® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), a una temperatura superior a 74 °C, correspondiente al punto de gelatinización del almidón de la semilla de aguacate criollo reportado por Salazar-Irrazabal et al. (2023). El tratamiento se llevó a cabo durante 1 h en un sistema cerrado y con agitación constante de 450 rpm, con el propósito de favorecer la absorción de agua y el hinchamiento de los gránulos de almidón, así como inducir modificaciones estructurales que incrementaran su accesibilidad a la α -amilasa durante la posterior etapa de hidrólisis enzimática.

3.3.2.2. Hidrólisis enzimática (HE).

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática se trabajó con la enzima comercial α -amilasa en solución acuosa de *Aspergillus oryzae* de marca Sigma-Aldrich. La hidrólisis enzimática se desarrolló durante dos horas, definidas por la evaluación cualitativa del color obtenido con la prueba Lugol (si la muestra presenta una tonalidad amarilla indica que la muestra evaluada contiene una ligera o nula presencia de polisacáridos, si es de tonalidad violeta indica que la muestra contiene polisacáridos), a temperaturas comprendidas entre 50 y 55 °C bajo un pH constante de 4,6 con el fin de estar cerca de las condiciones óptimas de la enzima α -amilasa (pH de 5 y temperatura de 52°C, ver Apéndice B) y agitación de 450 rpm.

3.3.3. Proceso 2: Extracción asistida únicamente por ultrasonido

Con el propósito de evaluar únicamente el efecto del ultrasonido sobre la extracción del colorante natural, se realizaron experimentos sin incorporar las etapas de gelatinización e hidrólisis

enzimática. En este tratamiento, la suspensión preparada a diferentes concentraciones de almidón, como se explicó en el numeral 3.3.1, se sometieron directamente a la etapa de extracción asistida por ultrasonido, permitiendo comparar el comportamiento del proceso sin la modificación previa de la fracción del almidón presente en la matriz vegetal.

3.3.3.1.Extracción asistida por ultrasonido (US).

Las muestras provenientes de ambos tratamientos fueron sometidas a la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido utilizando un equipo VCX-750-110 (Sonics & Materials Inc., Estados Unidos) operado a una amplitud del 50%, frecuencia de 40 kHz y tiempo de procesamiento de 15 minutos.

3.3.4. *Diseño experimental y análisis estadístico*

Se empleó un diseño factorial completo $3^2(3 \times 3)$ para evaluar el efecto de la concentración de almidón en la lechada de semilla de aguacate y la temperatura de extracción sobre el desempeño del proceso. Cada factor se estudió en tres niveles, lo que dio lugar a nueve combinaciones experimentales y permitió analizar tanto sus efectos individuales como su posible interacción sobre las variables de respuesta. Los factores, sus símbolos y los niveles evaluados se presentan en la Tabla 1, mientras que las condiciones correspondientes a cada ensayo experimental se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1.

Diseño experimental.

Factores	Símbolo	Niveles
Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	A	2; 2,5; 3
Temperatura de extracción usada en el ultrasonido (°C)	B	30; 40; 50

Los niveles de la concentración de almidón en la lechada se determinaron a partir de los ensayos preliminares donde se tuvieron en cuenta la viscosidad que a su vez no afectara la agitación constante establecida previamente ya que podría afectar no solamente en los resultados por la baja homogeneidad sino también la mezcla no se oxidara en el fondo del vaso de precipitado por el calor recibido durante la etapa de gelatinización.

Tabla 2.

Matriz experimental del diseño factorial 3x3.

Grupo experimental (misma condición experimental)	Ensayos		Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	Temperatura de extracción usada en el ultrasonido (°C)
	Proceso 1 (G+HE+US)	Proceso 2 (US)		
a	1	10	2	30
b	2	11	2	40
c	3	12	2	50
d	4	13	2,5	30
e	5	14	2,5	40
f	6	15	2,5	50
g	7	16	3	30
h	8	17	3	40
i	9	18	3	50

Cada ensayo fue realizado por duplicado tanto para el proceso mediado por hidrólisis enzimática y ultrasonido como para el proceso mediado únicamente por ultrasonido, obteniéndose en total 36 ensayos experimentales. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA), realizado en Microsoft® Excel® (año 2026), con un nivel de confianza del 95%, con el propósito de determinar la influencia estadística de los factores estudiados sobre las variables de respuesta.

3.3.5. Separación sólido-líquido

Una vez finalizado el tratamiento ultrasónico, el *slurry* (suspensión sólido-líquido) hidrolizado se sometió a una etapa de separación utilizando una centrífuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Megafuge™ 8 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Esta operación permitió separar la fase sólida residual de la fase líquida enriquecida con los compuestos extraídos. Los sobrenadantes obtenidos fueron empleados para la cuantificación de azúcares reductores, polifenoles totales y caracterización colorimétrica del extracto. Adicionalmente, se determinaron los rendimientos de extracción correspondientes a cada tratamiento.

3.4. Caracterización de los extractos obtenidos

3.4.1. Cuantificación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), basado en la reacción de reducción del grupo nitro del DNS por los grupos aldehído y cetona presentes en los azúcares reductores bajo condiciones de calentamiento a 98 °C por diez minutos, generando un cambio de color proporcional a la concentración de azúcares presentes en la muestra. Las lecturas de la absorbancia generadas por los azúcares presentes en las muestras fueron realizadas a 540 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La concentración de azúcares reductores se determinó mediante interpolación en una curva de calibración elaborada con una solución patrón de glucosa. La preparación detallada del reactivo DNS y de la solución patrón se presenta en el Apéndice C.

3.4.2. *Determinación del contenido total de polifenoles*

El contenido total de polifenoles fue determinado mediante el método Folin-Ciocalteu (descrito en el numeral 3.2.3). Las mediciones de absorbancia se realizaron a 760 nm empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer. La preparación de reactivos y soluciones patrón se presenta en el Apéndice D.

3.4.3. *Caracterización colorimétrica*

La caracterización colorimétrica de los extractos obtenidos se realizó sobre los sobrenadantes recuperados después de la etapa de centrifugación. Los parámetros cromáticos fueron determinados mediante el sistema de color CIELab utilizando la aplicación Color Grab versión 3.9.2., tomando como referencia la metodología sugerida por Peng et al. (2019). Para cada muestra se registraron las coordenadas L^* , a^* y b^* , correspondientes a luminosidad, componente verde-rojo y componente azul-amarillo, respectivamente. Estas mediciones fueron empleadas para describir las características visuales del colorante obtenido bajo las diferentes condiciones experimentales y determinar si hay diferencia entre los colores obtenidos en cada proceso mediante la siguiente Ecuación 2:

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_2 - L^*_1)^2 + (a^*_2 - a^*_1)^2 + (b^*_2 - b^*_1)^2}$$

Ecuación 2

Los subíndices de la Ecuación 2 corresponden al número del proceso empleado, por otro lado, si el valor de ΔE era menor que 1,5 no representaba un cambio significativo de color comparado entre los procesos, mientras que si es mayor que 5 existe un cambio observable (Dabas et al., 2011).

3.4.4. *Determinación del rendimiento de extracción para cada compuesto co-extraído*

Con el fin de comparar la recuperación de los compuestos de interés obtenidos mediante los procesos evaluados, se determinó el rendimiento de extracción de azúcares reductores y polifenoles empleando expresiones específicas para cada variable de respuesta.

El rendimiento de recuperación de azúcares reductores se calculó como la relación entre masa de azúcares reductores obtenida en el extracto final (corriente 13) y la masa teórica de azúcares reductores aportada por la fracción de almidón presente en la materia prima utilizada en cada ensayo. De esta manera, el rendimiento expresa el porcentaje de azúcares reductores recuperados con respecto al potencial de conversión del almidón presente en la semilla de aguacate. La expresión empleada para el cálculo del rendimiento de extracción se presenta en la Ecuación 3.

$$\% \text{Rendimiento}_{\text{azúcares}} = \frac{\text{masa de azúcares recuperada en la corriente 13}}{\text{masa teórica de azúcares reductores calculada a partir del contenido de almidón}} * 100$$

Ecuación 3

Por su parte, el rendimiento de recuperación de polifenoles se expresó en base seca inicial, relacionando la masa de polifenoles recuperada en la corriente 13 con la masa seca inicial de la materia prima. La expresión utilizada para este cálculo se presenta en la Ecuación 4.

$$\% \text{Rendimiento}_{\text{polifenoles}} = \frac{\text{masa de polifenoles recuperada en la corriente 13}}{\text{masa seca inicial de la materia prima}} * 100$$

Ecuación 4

Con el fin de comparar la recuperación global del colorante entre los procesos evaluados, el rendimiento de extracción se calculó a partir de la diferencia entre la masa de los sólidos solubles secos obtenidos después de la extracción asistida por ultrasonido, corregidos por la masa de azúcares reductores cuantificada en dicho extracto (numerador), con respecto a la masa seca inicial

de semilla utilizada en cada ensayo (denominador). La expresión empleada se presenta en la Ecuación 5.

$$\% \text{ Rendimiento}_{\text{colorante}} = \frac{\text{masa soluble US} - \text{masa de azúcares reductores US}}{\text{masa seca inicial de la materia prima}} * 100$$

Ecuación 5

La masa obtenida de cada compuesto fue determinada mediante los respectivos métodos analíticos descrito en los numerales 3.4.1 y 3.4.2. Así que, los rendimientos obtenidos fueron empleados para comparar el desempeño de los procesos evaluados y analizar la influencia de las variables experimentales sobre la recuperación de los compuestos de interés.

4. Resultados y análisis de resultados

4.1. Caracterización de la materia prima

En la Tabla 3 se muestra la caracterización realizada a la semilla de aguacate criollo que se utilizó como materia prima en esta investigación determinando el contenido de agua, almidón y polifenoles, ya que los demás parámetros como lignina, hemicelulosa, celulosa, lípidos, cenizas, fibras entre otros no hacen parte del enfoque objetivo planteado en determinar su influencia sobre la extracción del colorante, además el tiempo establecido fue uno de los factores limitantes para ampliar la caracterización. El porcentaje de humedad de la semilla de aguacate criollo se encuentra dentro del rango (57,5-71% en base húmeda) reportado para semillas de aguacate variedad Hass y Lorena de las cuales son de la misma especie (Fufa et al., 2025; King-Loeza et al., 2023; Olaeta et al., 2007).

Tabla 3.*Composición obtenida de la semilla de aguacate criollo.*

Componente	Contenido en base húmeda (%)
Agua	$64,0 \pm 0,1$
Almidón	$8,0 \pm 0,9$
Polifenoles	$2,7 \pm 0,4$
Otros	25,3

El almidón que se determinó en base seca para la semilla de aguacate criollo correspondió a un valor de $22,1 \pm 2,5\%$, el cual se encuentra cercano al reportado para semilla de aguacate variedad Lorena (20,05%) (Delgado-Santillán et al., 2026) pero inferior al reportado para la variedad Hass (27,28%) (Delgado-Santillán et al., 2026) y para las semillas de aguacate residuales de los cultivos de Vietnam, reportados por Thanh et al. (2026) en un rango de 25-30%. La cantidad de polifenoles ($2,7 \pm 0,4\%$) fue ligeramente superior al rango de 0,06-2,3% reportado por King-Loeza et al. (2023). Esta diferencia puede atribuirse a diversos factores, entre ellos la fracción de la semilla analizada, la variedad de aguacate, el método de extracción utilizado y las condiciones agronómicas del cultivo. En este sentido, Bahru et al. (2019) reportaron un contenido de 0,53%, mientras que Rosero et al. (2019) encontraron valores alrededor de 1,82% en base seca para muestras cultivadas en Nariño.

4.2. Comparación del rendimiento global de azúcares reductores, polifenoles y colorante natural para los procesos evaluados

Con el fin de evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la recuperación de los compuestos de interés co-extraídos, a continuación, se compararán los rendimientos globales de recuperación de azúcares reductores y polifenoles obtenidos al finalizar cada uno de los procesos evaluados. Para ello, se consideró el extracto final correspondiente a la corriente 13 (Figura 1), ya

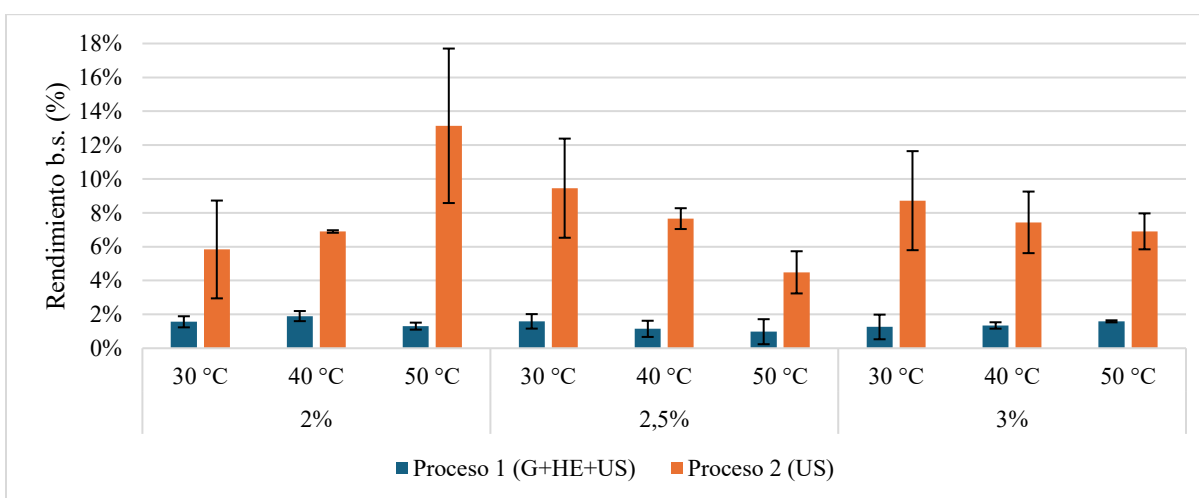
que representa el resultado global de cada tratamiento experimental. Los rendimientos obtenidos para ambas variables de respuesta fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), con el propósito de establecer la influencia de la concentración de almidón en la lechada y de la temperatura de extracción sobre los rendimientos de recuperación, así como la posible interacción entre ambos factores.

4.2.1. Rendimiento de extracción de azúcares reductores

En la Figura 2 se presenta el rendimiento global de extracción de azúcares reductores para ambos procesos, calculados de acuerdo con la Ecuación 3. Los resultados muestran una diferencia marcada entre los dos procesos evaluados.

Figura 2.

Rendimiento másico global de azúcares reductores según el proceso empleado.



Los resultados muestran una diferencia marcada entre los dos procesos evaluados. En todas las combinaciones de concentración de almidón y temperatura, el proceso 2 presentó rendimientos de extracción superiores al proceso 1, lo que indica que las condiciones o etapas adicionales incorporadas en este proceso favorecieron considerablemente la recuperación del compuesto

evaluado. En el proceso 1, los rendimientos permanecieron bajos, aproximadamente entre 1,0 y 1,9 % b.s., y presentaron variaciones relativamente pequeñas entre las condiciones experimentales. Para una concentración de almidón del 2 %, el rendimiento aumentó ligeramente al pasar de 30 a 40 °C y posteriormente disminuyó a 50 °C. Con 2,5 % de almidón se observó una reducción progresiva con el incremento de la temperatura, mientras que con 3 % se presentó una tendencia ligeramente ascendente. Sin embargo, debido a la reducida magnitud de estas diferencias y al solapamiento de las barras de error, no se identifica visualmente un efecto consistente de la temperatura o de la concentración de almidón sobre este proceso.

En contraste, el proceso 2 presentó rendimientos aproximados entre 4,4 y 13,1 % b.s., aunque con un comportamiento dependiente de la combinación de los factores. Para la concentración de 2 %, el rendimiento aumentó con la temperatura, alcanzando el valor máximo de todo el diseño a 50 °C, con aproximadamente 13 % b.s. Por el contrario, cuando se empleó 2,5 % de almidón, el rendimiento disminuyó a medida que aumentó la temperatura, pasando de alrededor de 9,5 % a 30 °C a cerca de 4,4 % a 50 °C. Con 3 % de almidón también se observó una reducción con el incremento de la temperatura, aunque menos pronunciada, con valores aproximados de 8,8, 7,4 y 6,9 % b.s. a 30, 40 y 50 °C, respectivamente. Este cambio en la respuesta de la temperatura según la concentración de almidón sugiere una posible interacción entre ambos factores en el proceso 2. Es decir, el efecto de aumentar la temperatura no fue uniforme: resultó favorable cuando la concentración fue del 2 %, pero desfavorable cuando se trabajó con concentraciones de 2,5 y 3 %. A 30 °C, las mayores recuperaciones se obtuvieron con 2,5 y 3 % de almidón; mientras que a 50 °C la condición más favorable correspondió claramente al 2 %. Las barras de error indican que la variabilidad experimental fue considerable en algunas condiciones del proceso 2, especialmente para 2 %–50 °C, 2,5 %–30 °C y 3 %–30 °C. Por lo tanto, aunque estas condiciones presentaron

rendimientos elevados, su reproducibilidad fue menor. En cambio, la condición de 2 %–40 °C mostró un rendimiento intermedio, cercano al 7 %, pero con una dispersión muy baja, lo que indica una respuesta más uniforme entre las réplicas.

En conjunto, el proceso 2 fue el más eficiente, y la combinación de 2 % de almidón y 50 °C proporcionó el mayor rendimiento promedio. No obstante, debido a su elevada variabilidad, la selección de la mejor condición no debería basarse únicamente en el valor medio. Los mayores rendimientos obtenidos mediante el tratamiento únicamente con ultrasonido podrían atribuirse a la capacidad de la cavitación acústica para alterar la matriz celular de la semilla y favorecer la liberación de azúcares solubles presentes en ella. En contraste, el comportamiento observado en el proceso 1, realizado con hidrólisis enzimática de α -amilasa, podría estar relacionado con la accesibilidad limitada de la enzima hacia los gránulos de almidón, debido a su organización semi-cristalina y a la presencia de almidón resistente reportada para la semilla de aguacate. Asimismo, debido a su mecanismo de acción endo-enzimático, la α -amilasa produce principalmente dextrinas y malto-oligosacáridos, sin convertir completamente el almidón en glucosa, lo que podría reflejarse en una menor concentración aparente de azúcares reductores determinada mediante el método DNS (Singla & Sit, 2021). No obstante, debe considerarse que el método DNS puede presentar interferencias ocasionadas por pigmentos, compuestos fenólicos y otros agentes reductores presentes en los extractos, por lo que los resultados obtenidos representan la capacidad reductora global de la muestra y no exclusivamente los azúcares provenientes de la hidrólisis del almidón.

Con el fin de establecer si las diferencias observadas estuvieron asociadas a las variables de operación evaluadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Como se observa en la Tabla 4, para ambos procesos la concentración de almidón en la lechada y la temperatura de extracción

no presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento global de recuperación de azúcares reductores, debido a que en todos los casos se obtuvieron valores de p superiores a 0,05 y valores de F inferiores al valor crítico establecido. Estos resultados indican que, dentro del intervalo experimental evaluado, las variaciones en la concentración de almidón (2-3 % p/v) y en la temperatura de extracción (30-50 °C) no modificaron significativamente la recuperación de azúcares reductores. En consecuencia, las diferencias observadas en la Figura 2 se atribuyen principalmente al tratamiento aplicado y no a los factores de operación evaluados.

Tabla 4.

ANOVA de la extracción de azúcares reductores de cada proceso.

Factores	Proceso 1		Proceso 2	
	<i>Valor p</i>	F	<i>Valor p</i>	F
Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	0,45	0,99	0,87	0,14
Temperatura de extracción usada en el ultrasonido (°C)	0,74	0,33	0,95	0,05

Nota: Si $p < 0,05$ y/o $F > 6,94$, el factor influye significativamente en los datos del compuesto analizado.

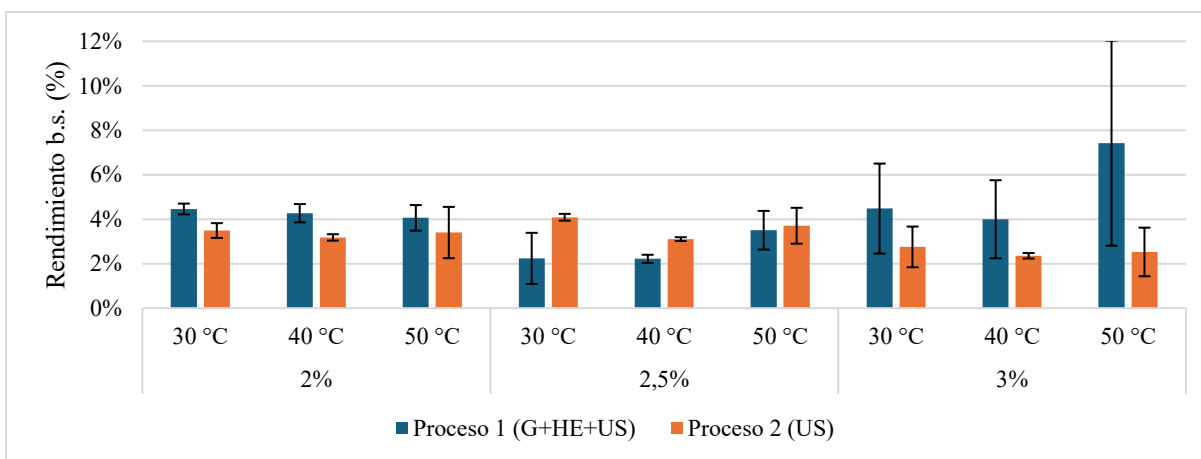
4.2.2. Rendimiento de extracción de polifenoles

En la Figura 3 se presenta el rendimiento global de extracción de polifenoles en ambos procesos bajo las diferentes condiciones experimentales evaluadas. La extracción de polifenoles presentó un comportamiento dependiente de las condiciones de operación y del proceso aplicado. En general, el proceso 1 alcanzó rendimientos superiores al proceso 2, especialmente cuando se emplearon concentraciones de almidón de 2 y 3 %. Para el proceso 1, la mayor recuperación promedio se obtuvo con 3 % de almidón y una temperatura de 50 °C, alcanzando aproximadamente 7,4 % b.s.; sin embargo, esta condición presentó una elevada dispersión experimental, lo que evidencia una baja reproducibilidad. En contraste, los rendimientos del proceso 2 se mantuvieron en un intervalo más estrecho, entre aproximadamente 2,3 y 4,1 % b.s., y su valor máximo se

registró con 2,5 % de almidón a 30 °C. El efecto de la temperatura varió según la concentración de almidón: mientras que con 2 % no se observaron cambios marcados, con 3 % el aumento de la temperatura favoreció la extracción en el proceso 1, pero no en el proceso 2. En algunas condiciones experimentales, particularmente a 2 % p/v y 3 % p/v–50 °C, el proceso con hidrólisis enzimática presentó mayores rendimientos de recuperación de polifenoles que el tratamiento realizado únicamente con ultrasonido. Este comportamiento es parcialmente consistente con lo reportado por Patil et al., (2024), quienes observaron que la combinación de un pretratamiento enzimático con extracción asistida por ultrasonido incrementó la recuperación de compuestos fenólicos con respecto al tratamiento asistido únicamente por ultrasonido. Los autores atribuyen este comportamiento a una mayor desintegración de la estructura de la matriz vegetal y al favorecimiento de la transferencia de masa durante la extracción. No obstante, los resultados del presente estudio indican que este efecto depende de las condiciones de operación evaluadas.

Figura 3.

Rendimiento másico global de polifenoles según el proceso empleado.



Con el fin de establecer si las diferencias observadas estuvieron asociadas a las variables de operación evaluadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5.

ANOVA de la recuperación de polifenoles de cada proceso.

Factores	Proceso 1		Proceso 2	
	Valor p	F	Valor p	F
Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	0,08	5,18	0,005	27,40
Temperatura de extracción usada en el ultrasonido (°C)	0,26	1,90	0,05	6,90

Nota: Si $p < 0,05$ y/o $F > 6,94$, el factor influye significativamente en los datos del compuesto analizado.

Como se observa, en el proceso 1 ninguno de los factores evaluados presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de recuperación de polifenoles ($p > 0,05$), aunque la concentración de almidón mostró una tendencia cercana al nivel de significancia ($p = 0,08$). En contraste, para el proceso 2, la concentración de almidón presentó un efecto estadísticamente significativo sobre la recuperación de polifenoles ($p = 0,005$; $F = 27,40$), mientras que la temperatura de extracción mostró un comportamiento cercano al criterio de significancia establecido ($p = 0,05$; $F = 6,90$). Estos resultados indican que la concentración de almidón ejerció una mayor influencia sobre la recuperación de polifenoles cuando la extracción se realizó únicamente mediante ultrasonido, mientras que en presencia de la hidrólisis enzimática dicho efecto no fue estadísticamente significativo.

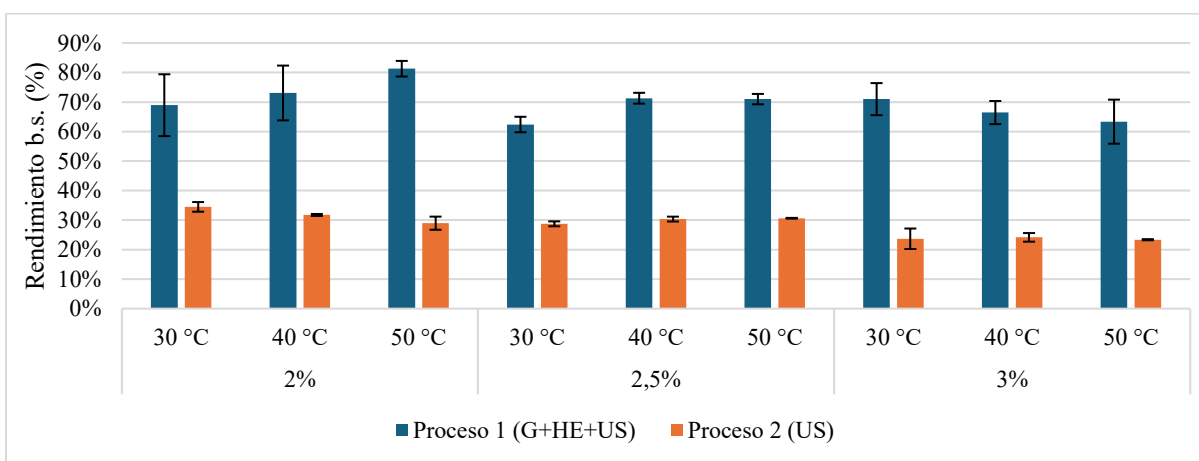
4.2.3 Rendimiento de extracción del colorante natural

En la Figura 4 se presentan el rendimiento global de extracción del colorante obtenido en ambos procesos bajo las diferentes condiciones experimentales evaluadas, calculados según la Ecuación 5.

En términos generales, el proceso 1 presentó mayores rendimientos de extracción del colorante que el proceso 2 para todas las combinaciones de concentración de almidón y temperatura evaluadas. Este comportamiento puede atribuirse, además del efecto de la hidrólisis enzimática sobre la matriz vegetal, al mayor tiempo total de tratamiento empleado en este proceso. Mientras que el proceso 1 comprendió aproximadamente 3 h y 15 min (1 h de gelatinización, 2 h de hidrólisis enzimática y 15 min de ultrasonido), el proceso 2 únicamente estuvo sometido a 15 min de extracción asistida por ultrasonido, lo que pudo limitar la liberación de los compuestos responsables del color.

Figura 4.

Rendimiento másico global del colorante según el proceso empleado.



Como se observa en la Figura 4, el rendimiento del colorante en el proceso 1 varió aproximadamente entre 62 y 81 % b.s., mientras que en el proceso 2 se encontró entre 23 y 35 % b.s., evidenciando una diferencia marcada entre ambos tratamientos. En el proceso 1, el mayor rendimiento se obtuvo con 2 % de almidón y 50 °C, mientras que el menor correspondió a 2,5 % de almidón y 30 °C. Aunque a una concentración de 2 % el incremento de la temperatura favoreció la extracción, esta tendencia no se mantuvo para las demás concentraciones de almidón. En el

proceso 2, el mayor rendimiento se registró con 2 % de almidón y 30 °C, mientras que los menores valores se obtuvieron para las formulaciones de 3 % de almidón. Las barras de error muestran una mayor dispersión en algunas condiciones del proceso 1; sin embargo, la separación entre los valores promedio de ambos procesos evidencia que el tipo de tratamiento fue la principal fuente de variación en la recuperación del colorante. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Patil et al., (2024), quienes observaron que la combinación de un pretratamiento enzimático con extracción asistida por ultrasonido incrementó la recuperación de compuestos fenólicos y pigmentos respecto al tratamiento realizado únicamente con ultrasonido. Los autores atribuyen este efecto a una mayor desintegración de la estructura de la matriz vegetal y a una mejora en la transferencia de masa durante la extracción.

Con el fin de establecer si las diferencias observadas estuvieron asociadas a las variables de operación evaluadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Como se observa en la Tabla 6, para el proceso 1 ni la concentración de almidón en la lechada ni la temperatura de extracción presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento del colorante ($p > 0,05$ y $F < 6,94$). En el proceso 2, la concentración de almidón presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de extracción ($p = 0,01$ y $F = 14,38$), mientras que la temperatura no mostró influencia significativa ($p > 0,05$). Estos resultados indican que, dentro del intervalo experimental evaluado, la recuperación del colorante dependió principalmente del proceso aplicado y, en el caso del proceso 2, también de la concentración de almidón empleada.

Tabla 6.

ANOVA de la extracción de colorante de cada proceso.

Factores	Proceso 1		Proceso 2	
	Valor p	F	Valor p	F
Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	0,33	1,49	0,01	14,38

Temperatura de extracción usada en el ultrasonido (°C)	0,66	0,47	0,69	0,41
---	------	------	------	------

Nota: Si $p < 0,05$ y/o $F > 6,94$, el factor influye significativamente en los datos del compuesto analizado.

4.2.4 Comparación estadística de los compuestos recuperados entre procesos

Con el propósito de establecer si la incorporación de la hidrólisis enzimática produjo diferencias en la recuperación global de los compuestos evaluados, se realizó un análisis de varianza considerando el proceso como uno de los factores de estudio. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7. De acuerdo con la Tabla 7, el factor proceso presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de recuperación de azúcares reductores y colorante, indicando que la incorporación de las etapas de gelatinización e hidrólisis enzimática modificó significativamente la recuperación de estos compuestos. En contraste, para los polifenoles el factor proceso no presentó un efecto estadísticamente significativo, lo que indica que bajo las condiciones experimentales evaluadas, ambos tratamientos presentaron recuperaciones similares. Por otra parte, la concentración de almidón en la lechada no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre la recuperación de ninguno de los compuestos cuando ambos procesos fueron analizados de forma conjunta. En conjunto, los resultados evidencian que la incorporación de la hidrólisis enzimática influyó significativamente en la recuperación global de azúcares reductores y del colorante, mientras que para los polifenoles no se encontraron diferencias estadísticas entre los procesos evaluados.

Tabla 7.

ANOVA del rendimiento extraído y recuperado según el compuesto entre los procesos.

Factores	Compuestos					
	Azúcares reductores		Polifenoles		Colorante	
	<i>Valor p</i>	F	<i>Valor p</i>	F	<i>Valor p</i>	F
Concentración de almidón en la lechada (% p/v)	0,27	2,67	0,83	0,20	0,11	8,35

Proceso	0,002	409,31	0,49	0,69	0,001	714,77
---------	-------	--------	------	------	-------	--------

Nota: Si $p < 0,05$ y/o $F > 19$ (para el contenido de almidón), $F > 18,51$ (para el proceso), el factor influye significativamente en los datos del compuesto analizado.

4.3. Caracterización colorimétrica de los extractos obtenidos

La caracterización colorimétrica mediante las coordenadas CIELab (L^* , a^* y b^*) y la diferencia total de color (ΔE) permitió evaluar los cambios de luminosidad, tonalidad y perceptibilidad visual entre los extractos obtenidos.

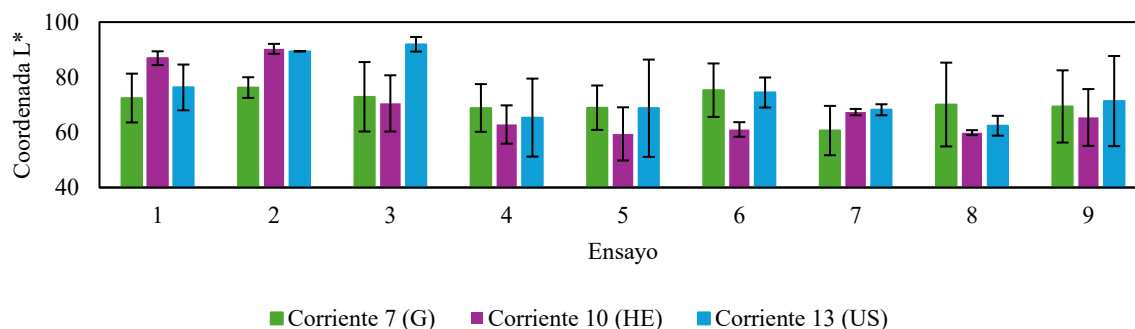
4.3.1. Caracterización colorimétrica del proceso 1

Con el propósito de evaluar la evolución del color durante las etapas de gelatinización, hidrólisis enzimática y extracción asistida por ultrasonido, se determinaron las coordenadas CIELab de las corrientes 7, 10 y 13.

Como se observa en la Figura 5, la coordenada L^* presentó valores comprendidos entre 62 y 92, indicando que los extractos obtenidos durante todo el proceso conservaron una elevada luminosidad. En general, la corriente 13 presentó los mayores valores de L^* , lo que sugiere que el tratamiento completo produjo extractos visualmente más claros respecto a las etapas anteriores.

Figura 5.

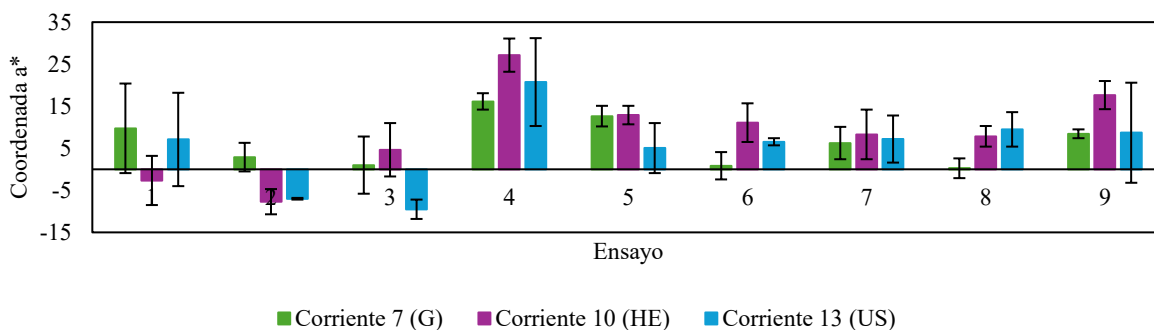
Coordenada L^ de los ensayos 1 al 9 correspondientes al proceso 1.*



La Figura 6 muestra que la coordenada a^* osciló entre -10 y 21. Los extractos obtenidos después de la hidrólisis enzimática (corriente 10) presentaron una mayor tendencia hacia tonalidades rojizas en comparación con la corriente 7, mientras que después del tratamiento ultrasónico (corriente 13) dicha tendencia se mantuvo constante, aunque con menor intensidad en algunos ensayos.

Figura 6.

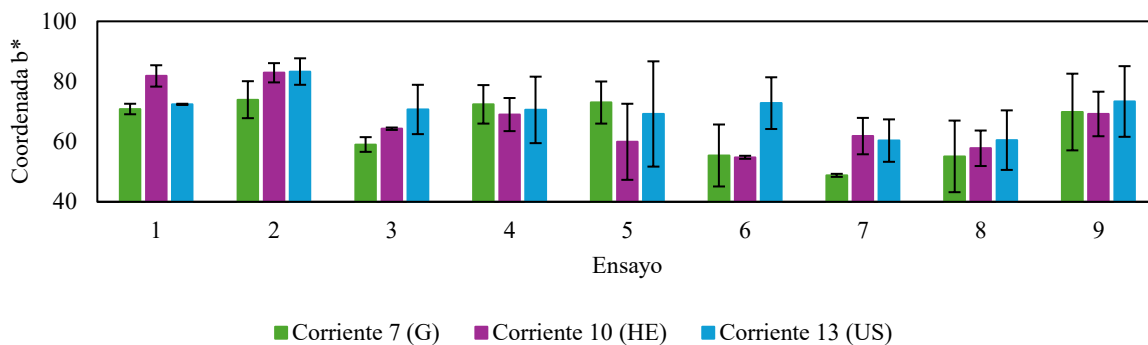
Coordenada a^ de los ensayos 1 al 9 correspondientes al proceso 1.*



En la Figura 7 se presentan valores de la coordenada b^* los cuales oscilaron entre 60 y 84, evidenciando un predominio de tonalidades amarillas durante todo el proceso. De manera general, en la corriente 13, se obtuvieron los mayores valores de b , lo cual indica que la combinación de gelatinización, hidrólisis enzimática y ultrasonido incrementó el color amarillo del extracto final.

Figura 7.

Coordenada b^ de los ensayos 1 al 9 correspondiente al proceso 1.*



Con el fin de establecer si estos cambios cromáticos fueron perceptibles visualmente a partir de los extractos obtenidos, se determinó el valor de ΔE entre las diferentes etapas del proceso. En la Figura 8 se presenta la diferencia de ΔE para la etapa de gelatinización e hidrolisis enzimática, en la Figura 9 la diferencia de ΔE para la etapa de hidrolisis enzimática y ultrasonido y en la Figura 10 la diferencia de ΔE para la etapa de gelatinización y ultrasonido, respectivamente.

Figura 8.

Valor de ΔE entre G y HE para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.

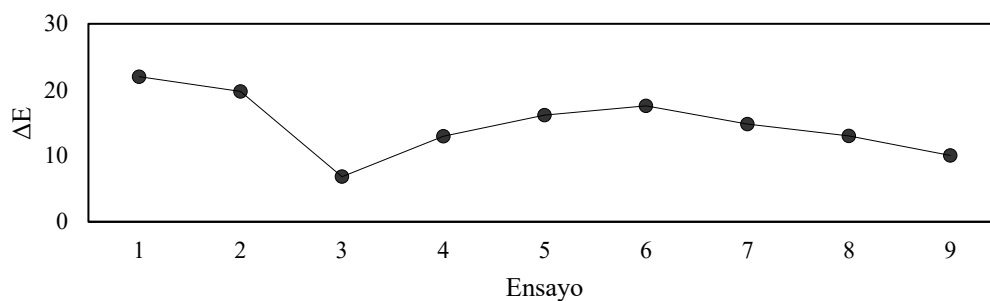
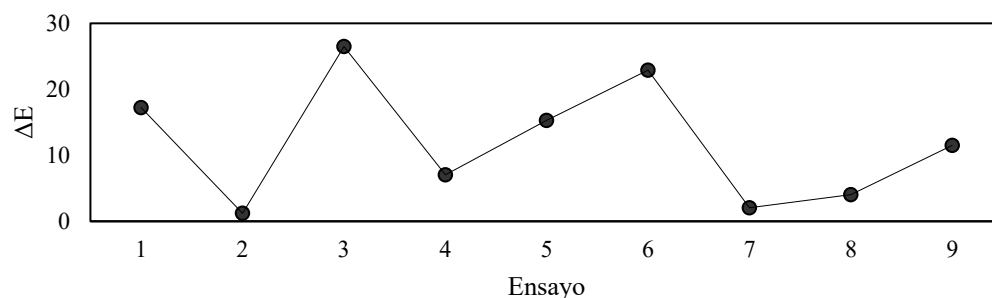


Figura 9.

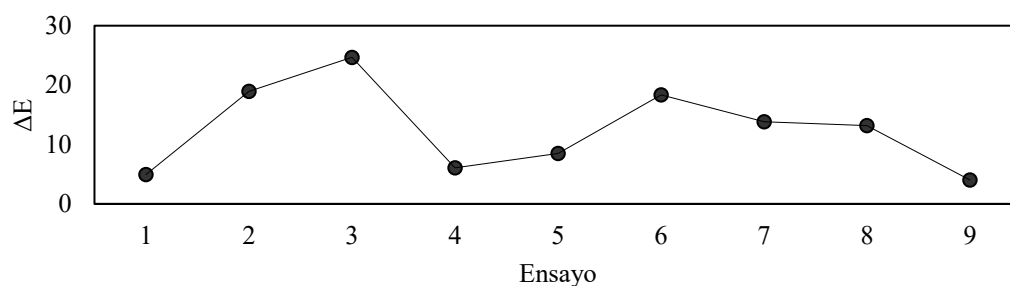
Valor de ΔE entre HE y US para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.



Los valores de ΔE obtenidos muestran que el mayor cambio colorimétrico ocurrió entre la etapa de gelatinización y el extracto final obtenido después del ultrasonido (Figura 10), donde todos los ensayos presentaron valores superiores a 5. De acuerdo con el criterio establecido para el sistema CIELab, estos resultados indican diferencias de color claramente perceptibles por el ojo humano, evidenciando que el tratamiento combinado modificó significativamente las características cromáticas del extracto obtenido entre las distintas etapas del proceso 1.

Figura 10.

Valor de ΔE entre G y US para los ensayos 1 al 9 para el proceso 1.



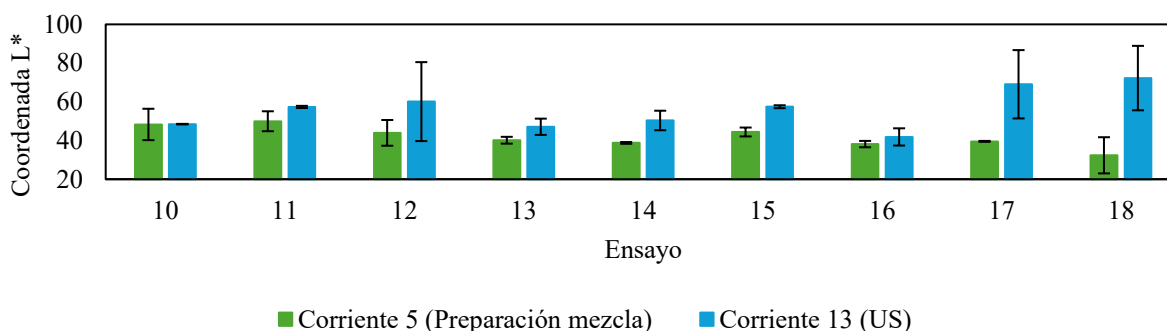
4.3.2. Características colorimétricas del proceso 2

Con el propósito de evaluar el efecto de la extracción asistida únicamente por ultrasonido, se determinaron las coordenadas CIELab correspondientes a las corrientes 5 y 13. Los valores de L^* mostrados en la Figura 11 estuvieron comprendidos entre 41 y 73, indicando extractos con menor luminosidad respecto a los obtenidos mediante el proceso 1. En la mayoría de los

tratamientos, la corriente 13 presentó valores superiores a la corriente 5, sugiriendo que la extracción asistida por ultrasonido produjo extractos ligeramente más claros.

Figura 11.

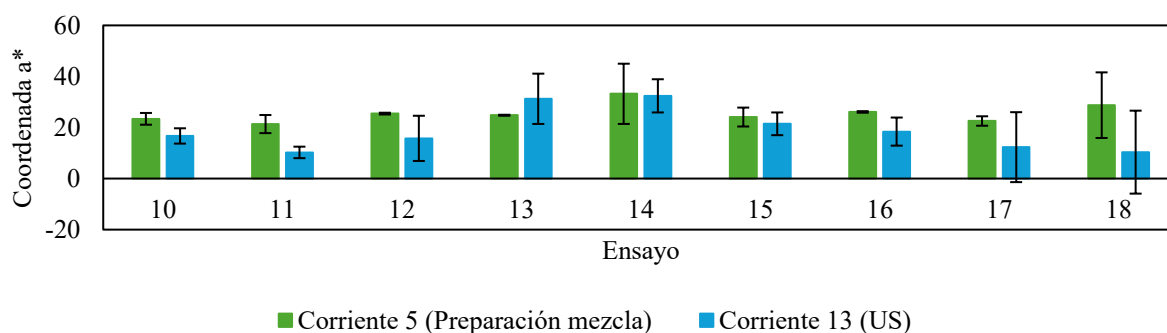
Coordenada L de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.*



Los valores de a^* presentados en la Figura 12 variaron entre 10 y 33, mostrando un predominio de tonalidades rojizas. Después del tratamiento ultrasónico se observó una ligera disminución de esta coordenada en algunos ensayos, indicando una reducción de la intensidad del componente rojo.

Figura 12.

Coordenada a^ de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.*

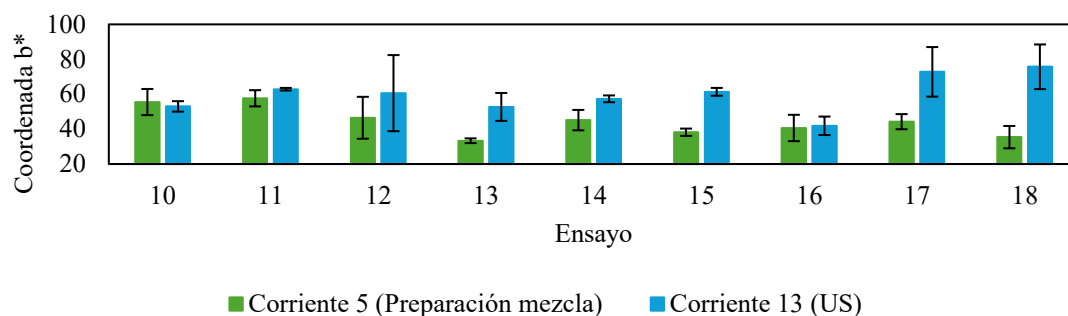


En la Figura 13, la coordenada b^* presentó valores entre 41 y 76, lo que evidencia nuevamente el predominio de la componente amarilla. En la mayoría de los ensayos, el extracto

final mostró valores superiores a los registrados antes de la extracción, indicando una intensificación de esta componente cromática durante el tratamiento.

Figura 13.

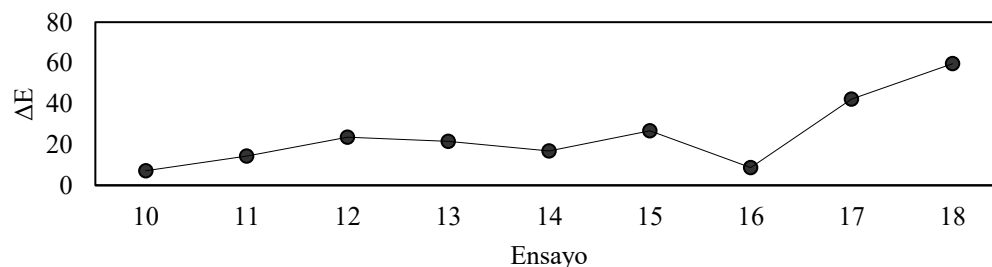
Coordenada b^ de los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.*



Con el fin de determinar si el ultrasonido produjo cambios perceptibles en el color del extracto (Figura 14), se calculó el valor de ΔE entre la preparación de la lechada (corriente 5) y el extracto final (corriente 13). Como se puede observar en la Figura 14, los resultados obtenidos muestran valores de ΔE superiores al umbral de percepción visual, indicando que el tratamiento ultrasónico produjo modificaciones apreciables en el color del extracto con respecto a la suspensión inicial.

Figura 14.

Valor de ΔE como diferencia entre la preparación de la mezcla (corriente 5) y la etapa de US (corriente 13) para los ensayos 10 al 18 correspondientes al proceso 2.

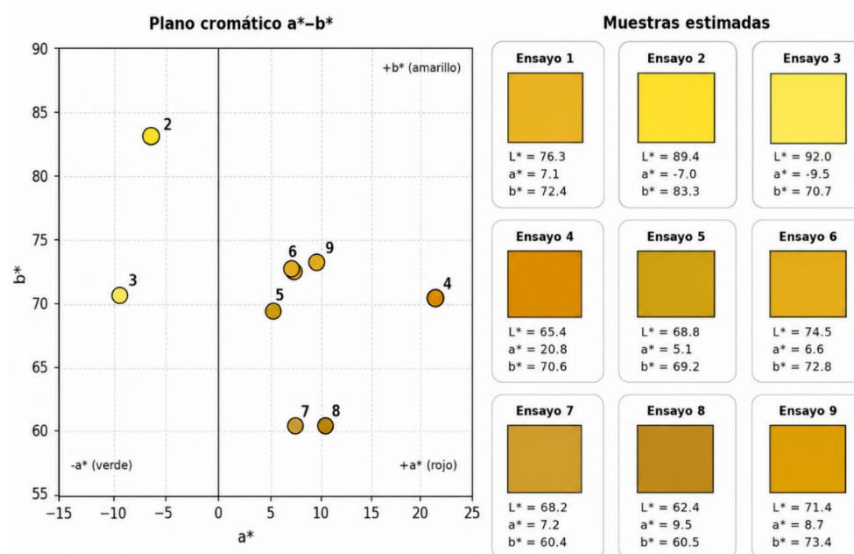


4.3.3. Comparación colorimétrica entre los procesos 1 y 2

Con el propósito de comparar el color final obtenido mediante ambos tratamientos, se analizaron las coordenadas CIELab correspondientes a los extractos finales (corriente 13) en un diagrama de color, la Figura 15 presenta los resultados para los ensayos 1 al 9 correspondientes al proceso 1. De acuerdo con el diagrama de color de la Figura 15, los resultados colorimétricos del proceso 1 evidenciaron un predominio general de tonalidades amarillas, dado que todos los ensayos presentaron valores positivos y relativamente altos de b^* . No obstante, se observaron diferencias importantes en la luminosidad y en la contribución de la componente roja-verde. Los ensayos 2 y 3 registraron los mayores valores de L^* y valores negativos de a^* , por lo que correspondieron a extractos más claros y con una ligera tendencia hacia tonalidades verdosas. En contraste, el ensayo 4 presentó el valor más alto de a^* , lo que indica una mayor contribución de la componente roja y, por tanto, una tonalidad más anaranjada o rojiza. Por su parte, los ensayos 7 y 8 mostraron menores valores de luminosidad y de b^* , asociados con extractos más oscuros y con una menor intensidad de la componente amarilla. Finalmente, los ensayos 1, 5, 6 y 9 exhibieron un comportamiento intermedio, caracterizado por luminosidades moderadas y una marcada presencia de tonalidades amarillas.

Figura 15.

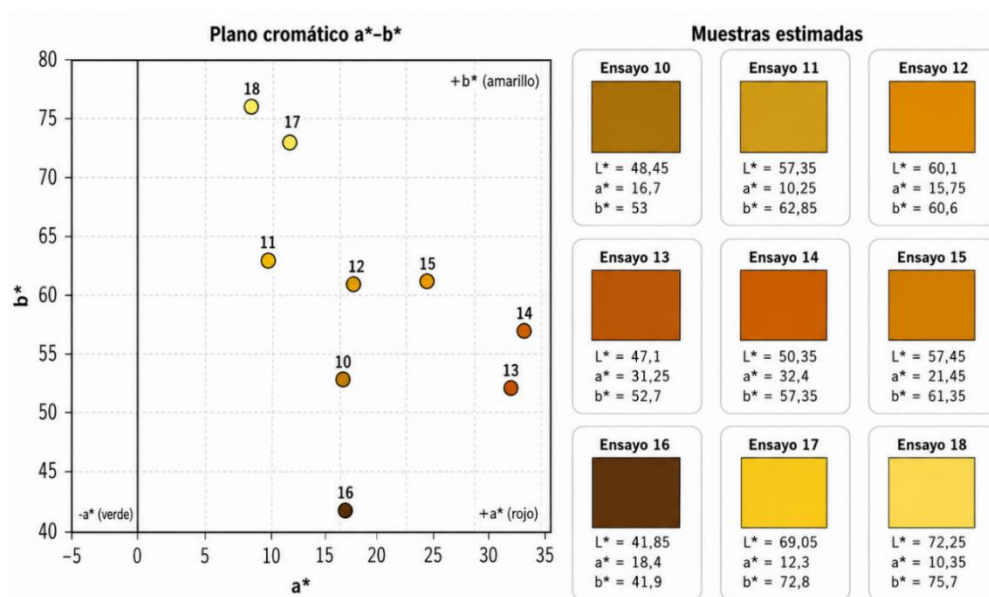
Diagrama de color CIELab para el proceso 1 (ensayos 1 al 9 de la corriente 13).



Por otra parte, en la Figura 16 se presentan los resultados para los ensayos 10 al 18 por duplicado correspondientes al proceso 2. Los ensayos 10 al 18 presentaron diferencias importantes en sus coordenadas CIELab, lo que evidencia la influencia de las condiciones del proceso sobre el color de los extractos. La luminosidad (L^*) varió entre 41,85 y 72,25; los ensayos 17 y 18 fueron los más claros, mientras que el ensayo 16 presentó la menor luminosidad y, por tanto, la tonalidad más oscura. Todos los valores de a^* y b^* fueron positivos, confirmando la presencia de componentes rojas y amarillas en los extractos. Los ensayos 13 y 14 presentaron los mayores valores de a^* , asociados con tonalidades más rojizas o anaranjadas. Por su parte, los ensayos 17 y 18 registraron los mayores valores de b^* , lo que indica un predominio de tonalidades amarillas más claras y brillantes. En general, se identificaron tres comportamientos cromáticos: los ensayos 17 y 18 se caracterizaron por colores claros y amarillos; los ensayos 13 y 14, por tonalidades más rojizas y anaranjadas; y el ensayo 16, por ser el más oscuro y presentar la menor componente amarilla. La variabilidad observada sugiere que las condiciones experimentales influyeron de manera diferenciada sobre las características de color de los extractos.

Figura 16.

Diagrama de color CIELab para el proceso 2 (ensayos 10 al 18 de la corriente 13)..



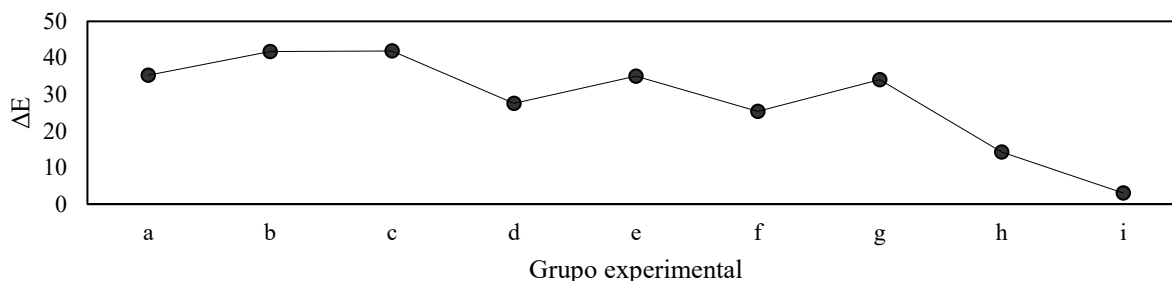
Al comparar ambos procesos, se observa que los extractos obtenidos mediante el proceso 1, correspondiente al pretratamiento enzimático seguido de ultrasonido, presentaron en promedio una mayor luminosidad ($L^* = 74,27$), una menor contribución de la componente roja ($a^* = 5,39$) y un predominio más marcado de la componente amarilla ($b^* = 70,37$). En contraste, los extractos del proceso 2, realizado únicamente mediante ultrasonido, mostraron una menor luminosidad promedio ($L^* = 55,99$), valores más elevados de a^* ($18,76$) y una disminución de b^* ($59,81$), lo que indica la formación de tonalidades más oscuras, rojizas y anaranjadas. Este comportamiento sugiere que la hidrólisis enzimática previa pudo modificar la matriz de la semilla y favorecer la recuperación de compuestos responsables de tonalidades más claras y amarillas, mientras que el tratamiento exclusivamente ultrasónico produjo extractos cromáticamente más intensos y oscuros. No obstante, los ensayos 17 y 18 del proceso 2 presentaron valores de L^* y b^* próximos a los observados en el proceso 1, lo que evidencia que algunas condiciones experimentales permitieron

obtener características colorimétricas similares entre ambos procesos. Los extractos obtenidos mediante ambos procesos presentaron tonalidades amarillo-anaranjadas, compatibles con la coloración reportada para la perseorangina presente en la semilla de aguacate (Hatzakis et al., 2019).

Finalmente, con el fin de establecer si ambos procesos generaron diferencias visualmente perceptibles en el color final del extracto, se calculó el valor de ΔE (Figura 17) entre los grupos experimentales desarrollados bajo las mismas condiciones de concentración de almidón y temperatura de extracción. En la Figura 17, se puede observar una variación amplia de la diferencia total de color, ΔE , entre los grupos experimentales. Los grupos b y c presentaron los valores más altos, cercanos a 42, lo que indica que produjeron los mayores cambios cromáticos respecto a la muestra de referencia. Les siguen los grupos a, e y g, con valores aproximados entre 34 y 36, también asociados con modificaciones de color muy marcadas. Los grupos d y f mostraron valores intermedios, alrededor de 25–28, mientras que en los grupos h e i se observó una disminución considerable de ΔE , con valores cercanos a 14 y 3, respectivamente. En términos generales, la mayoría de los tratamientos generaron diferencias de color fácilmente perceptibles; sin embargo, el grupo i fue el que presentó la menor modificación cromática y, por tanto, el color más próximo al de la referencia.

Figura 17.

Valor de ΔE para cada grupo experimental (entre los obtenidos por US).



El comportamiento no fue progresivo entre los grupos, sino que presentó incrementos y disminuciones, lo que sugiere que las condiciones experimentales ejercieron efectos diferentes sobre el color y que no existe una tendencia lineal entre la secuencia de tratamientos y la magnitud de ΔE . La coloración hacia una tonalidad naranja de gran intensidad, saturada y luminosa desde la semilla de aguacate ocurre por la exposición al oxígeno siendo estable en una reacción dependiente de la oxidasa polifenólica -PPO- (*Poliphenolic Oxidase*, por sus siglas en inglés), la cual es una enzima presente en las bacterias, mamíferos y plantas que son responsables de la producción de pigmentos marrones y amarillo rojizos, donde estas situaciones contribuyen al desarrollo del colorante característico deseable asociado con los alimentos (Hatzakis et al., 2019).

Conclusiones

El proceso 1 (con hidrólisis enzimática) alcanzó rendimientos de recuperación del colorante entre 62 y 81 % b.s., mientras que el proceso 2 (sin hidrólisis enzimática) presentó valores entre 23 y 35 % b.s.. Además, el análisis estadístico confirmó que el tipo de proceso influyó significativamente sobre el rendimiento del colorante ($p = 0,01$), evidenciando que el pretratamiento enzimático favoreció la recuperación del compuesto colorante de interés.

Dentro de los intervalos experimentales evaluados (2,0; 2,5 y 3,0 %p/v de almidón en la lechada y 30; 40 y 50 °C de temperatura en la extracción de ultrasonido), estos factores no ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre la extracción de azúcares reductores ni sobre la recuperación global de polifenoles en el proceso de hidrólisis enzimática.

La caracterización colorimétrica mediante las coordenadas CIELab confirmó que los extractos obtenidos presentaron tonalidades comprendidas entre amarillo-anaranjado y rojo-anaranjado, compatibles con las características cromáticas reportadas para la perseorangina presente en la semilla de aguacate. Asimismo, los valores de ΔE mostrando cambio de color observable significativo entre las distintas etapas de cada proceso y, en la mayoría de los grupos experimentales, evidenciando que la hidrólisis enzimática modificó las propiedades cromáticas del extracto obtenido.

La hidrólisis enzimática promovió la transformación parcial de la fracción amilácea presente en la semilla de aguacate, lo cual se evidenció mediante la cuantificación de azúcares reductores en los extractos obtenidos. Aunque el proceso con α -amilasa modificó significativamente la recuperación de estos compuestos, no se observaron diferencias estadísticas en la recuperación de polifenoles entre ambos tratamientos, indicando que el efecto del tratamiento enzimático fue más evidente sobre la fracción de almidón que sobre los compuestos fenólicos.

Recomendaciones

Se recomienda mejorar el montaje experimental mediante la implementación de un sistema cerrado que permita controlar las pérdidas de la fase líquida menor al 20% por evaporación y traspaso de mezcla durante las etapas de gelatinización, hidrólisis enzimática y extracción asistida por ultrasonido. Esto permitiría mantener constante la relación sólido:líquido del proceso y reducir variaciones asociadas a la evaporación o en la transferencia de muestra, favoreciendo una recuperación más representativa del extracto obtenido. Como resultado, podría evidenciarse una mejora en las variables de respuesta evaluadas, principalmente en el rendimiento de extracción, la intensidad colorimétrica del extracto y la recuperación de compuestos como azúcares reductores y polifenoles.

Para fortalecer la etapa de hidrólisis enzimática, se recomienda determinar previamente la actividad enzimática de la α -amilasa empleada, con el propósito de establecer una relación adecuada entre la cantidad de enzima adicionada y el contenido de almidón presente en la matriz vegetal. Mishra et al., (2024) reportaron que las actividades enzimáticas llegaron hasta 7,50 U/g bajo condiciones óptimas de operación, destacando la importancia de optimizar los parámetros de trabajo para maximizar la hidrólisis del almidón y la liberación de azúcares reductores.

Debido a que el extracto obtenido corresponde a una mezcla de compuestos provenientes de la matriz vegetal, se recomienda realizar una caracterización más amplia de la fracción soluble obtenida. En especial, se debe evaluar los compuestos generados durante la hidrólisis del almidón, como azúcares totales, productos de degradación e incluso oligosacárido, ya que pueden influir en la composición, estabilidad y propiedades del extracto. Esto permite diferenciar el aporte del colorante principal frente a otros compuestos co-extraídos y determinar con mayor precisión la recuperación del colorante natural y sus propiedades.

Referencias bibliográficas

- Arlene, A. A., Prima, K. A., Utama, L., & Anggraini, S. A. (2015). The Preliminary Study of the Dye Extraction from the Avocado Seed Using Ultrasonic Assisted Extraction. *Procedia Chemistry*, 16, 334–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.061>
- Bachiller Soria, L. (2022). *OBTENCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE SEMILLA DE AGUACATE* [Universidad Politécnica de Madrid]. https://oa.upm.es/71743/1/TFM_LAURA_BACHILLER_SORIA.pdf
- Bahru, T., Tadele, Z., & Ajebe, E. (2019). A Review on Avocado Seed: Functionality, Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Chemical Science International Journal*, 27, 1–10. <https://doi.org/10.9734/CSJI/2019/v27i230112>
- Bangar, S. P., Dunno, K., Dhull, S. B., Kumar Siroha, A., Changan, S., Maqsood, S., & Rusu, A. V. (2022). Avocado seed discoveries: Chemical composition, biological properties, and industrial food applications. *Food Chemistry: X*, 16, 100507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100507>
- Dabas, D., Elias, R. J., Lambert, J. D., & Ziegler, G. R. (2011). A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. *Journal of Food Science*, 76(9), C1335–C1341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02415.x>
- Delgado-Santillán, L. Y., Cardenas-Toro, F. P., Quispe-Sanchez, L., Mena-Chacon, L. M., Oblitas-Delgado, R., Vargas, L., & Yoplac, I. (2026). Optimization of starch extraction from three varieties of avocado seeds (*Persea americana* Mill.): Physicochemical characterization and application in bio-based packaging materials. *Journal of Agriculture and Food Research*, 28, 102996. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2026.102996>

FDA. (2025, April 22). *HHS, FDA to Phase Out Petroleum-Based Synthetic Dyes in Nation's Food Supply*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/hhs-fda-phase-out-petroleum-based-synthetic-dyes-nations-food-supply>

Hatzakis, E., Mazzola, E., Shegog, R., Ziegler, G., & Lambert, J. (2019). Perseoragin: A Natural Pigment from Avocado (*Persea americana*) Seed. *Food Chemistry*, 293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.064>

King-Loeza, Y., Ciprián-Macías, D. A., Cardador-Martínez, A., Martín-del-Campo, S. T., Castañeda-Saucedo, Ma. C., & Ramírez-Anaya, J. del P. (2023). Functional composition of avocado (*Persea americana* Mill. Var Hass) pulp, extra virgin oil, and residues is affected by fruit commercial classification. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100573>

Mishra, S. K., Yadav, P., & Gogate, P. R. (2024). Intensification of α -amylase activity using ultrasound and its application for food waste hydrolysis. *Process Biochemistry*, 143, 73–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.04.027>

Olaeta, J. A., Schwartz, M., Undurruga, P., Contreras, S., & y S. Contreras. (2007). *USE OF HASS AVOCADO (Persea americana Mill .) SEED AS A PROCESSED PRODUCT*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:43441265>

Oliveira, Z. B. de, Costa, D. V. S. da, Santos, A. C. da S. dos, Júnior, A. Q. da S., de Lima Silva, A., Santana, R. C. F. de, Costa, I. C. G., Ramos, S. F. de S., Padilla, G., & Silva, S. K. R. da. (2024). Synthetic Colors in Food: A Warning for Children's Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 21(6), 682. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph21060682>

- Patil, N., Yadav, P., & Gogate, P. R. (2024). Ultrasound assisted intensified enzymatic extraction of total phenolic compounds from pomegranate peels. *Separation and Purification Technology*, 350, 127967. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.127967>
- Peng, B., Zhou, J., Xu, J., Fan, M., Ma, Y., Zhou, M., Li, T., & Zhao, S. (2019). A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid–liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food samples. *Microchemical Journal*, 149, 104072. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104072>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- 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). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
- Salazar-Irrazabal, M. D., Ramirez-Tixe, E. E., Velasquez-Barreto, F. F., & Bello-Pérez, L. A. (2023). Avocado seed starch: Effect of the variety on molecular, physicochemical, and digestibility characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 247, 125746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125746>
- Singla, M., & Sit, N. (2021). Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105506. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105506>

Thanh, N. C., Dong, B. P., Duy, N. B. A., & Vy, T. A. (2026). Environmentally friendly booth avocado seed starch-based hydrogel as absorbent with slow release of fertilizers. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-07020-7>

Apéndices

Apéndice A. *Buffer solución citrato de sodio y ácido cítrico ajustando a pH 4.6.*

Reactivos: citrato de sodio anhidro, ácido cítrico anhidro.

Los siguientes pasos se realizaron para obtener 200 mL de buffer 4,6.

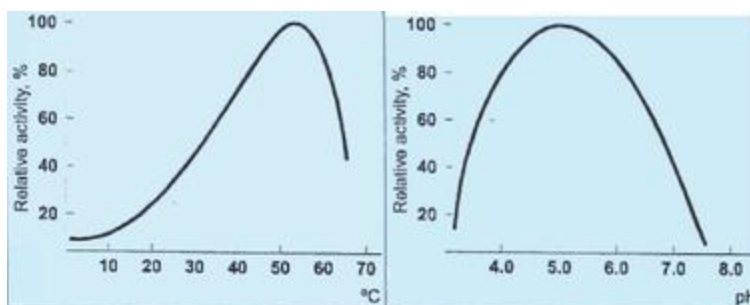
- a) Ácido cítrico 0,1M: en un balón aforado de 250 mL se adicionó 5,25 g de ácido cítrico, se aforó con agua destilada y se agitó muy bien.
- b) Citrato de Sodio 0,1M: en un balón aforado de 250 mL se adicionó 6,45 g de ácido cítrico, se aforó con agua destilada y se agitó muy bien.
- c) En un vaso precipitado de 250 mL se adicionaron 89 mL de solución ácido cítrico 0,1M y 111 mL de solución citrato de sodio 0,1M, se agitó la mezcla y se leyó su pH, en un medidor de pH previamente calibrado, para corroborar su pH ideal que es de 4,6.

Apéndice B. *Actividad relativa según temperatura y pH de la enzima α -amilasa.*

La enzima α -amilasa o *1,4- α -D-Glucan-glucanohidrolase* en inglés, está en solución acuosa del *Aspergillus oryzae* de marca Sigma-Aldrich, cuya actividad es ≥ 800 FAU/g (*Fung. Alpha Amylase Units per grame*, por sus siglas en inglés) y densidad entre 1,10 a 1,30 g/mL.

Figura 18.

Actividad relativa de α -amilasa.



La representación de su actividad enzimática según temperatura y pH del medio, representados en la Figura 18 fue adaptado de “ *α -Amylase from *Aspergillus oryzae**” por Sigma-Aldrich, 2024, Merck. (<https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/sigma/a8220>).

Apéndice C. Método analítico DNS.

Reactivos: NaOH, DNS, sal de Rochelle tetrahidratada, fenol, metabisulfito de sodio.

Este procedimiento se realizó para obtener 100 mL de reactivo DNS, siguiendo los pasos:

- Disolver sobre 80 mL de agua destilada lentamente y agitación constante los siguientes reactivos: 1g NaOH, 1g DNS, 26,850 g de sal de Rochelle tetrahidratada.
- En la campana de extracción, fundir 0,2 g de fenol a 50°C y agregarlo a la mezcla preparada anteriormente manteniendo agitación constante y finalmente agregar 0,05 de metabisulfito de sodio.
- Traspasar a un balón aforado de 100 mL previamente cubierto con papel aluminio para disminuir el efecto de la luz debido a su fotosensibilidad y se aforó con agua destilada.

Es importante conocer la curva de calibración para obtener la concentración de azúcares a partir de la densidad óptica por medio del espectrofotómetro, se realizaron las siguientes soluciones:

- Solución patrón de glucosa (solución I): disolver 100 mg de glucosa en agua destilada y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL.
- Curva de calibración de azúcares reductores: preparar 6 tubos de ensayo, numerarlos y colocar en cada uno una concentración diferente de la solución I de acuerdo con los volúmenes establecidos en la siguiente tabla.

Tabla 8.

Soluciones de azúcares reductores.

Dilución	Blanco	1	2	3	4	5
Volumen solución I (mL)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Volumen de agua (mL)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0
Concentración de glucosa (g/L)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

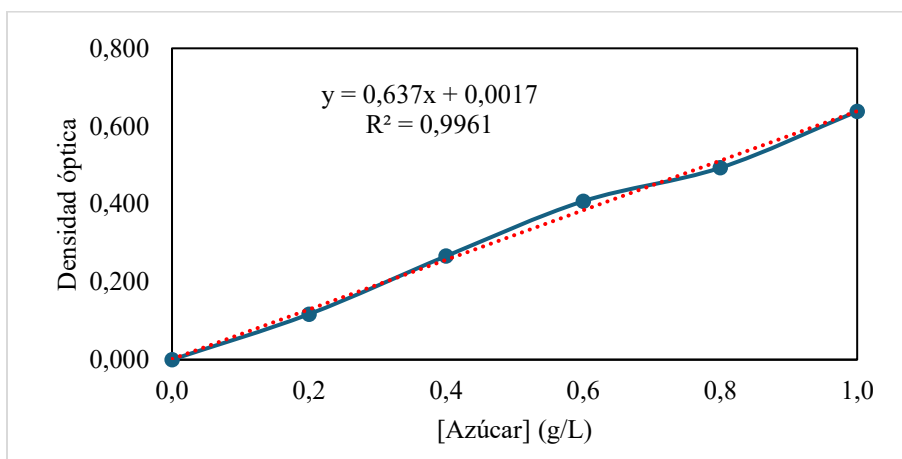
Una vez preparadas, se siguieron los pasos para obtener su densidad óptica así:

- Se adicionaron 0,5 mL de solución DNS a cada tubo de ensayo, se agitó en vortex durante pocos segundos y posteriormente se calentaron los tubos en baño de agua en ebullición durante exactamente 10 minutos, pasado el tiempo se pasaron a un baño de agua-hielo para detener la reacción rápidamente.
- Se adicionaron a cada tubo de ensayo 5 mL de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo por 5 minutos.
- Se leyó la densidad óptica de cada tubo de ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Con los resultados de la densidad óptica de acuerdo con su concentración, se les resta el blanco y esos datos se emplearon para realizar la gráfica (densidad óptica vs. concentración de azúcares (g/L)), con el fin de conocer su regresión lineal donde se especificó que el punto de intersección es de cero.

Figura 19.

Curva patrón DNS.



Apéndice D. Método analítico Folin-Ciocalteu.

Reactivos: reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, metanol, Na_2CO_3 .

Este procedimiento se realizó con el fin de cuantificar la cantidad de polifenoles presentes en las muestras. Se adicionan en un balón aforado de 100 mL, 55,3 mg de ácido gálico en 10 mL de metanol y se aforó con agua destilada. De esta solución se prepararon cinco soluciones para la curva (1, 2, 3, 4 y 5 mL donde en cada uno se adiciona hasta completar 50 mL con agua destilada), en la Tabla 9 se evidencia el valor de concentración de cada muestra.

Tabla 9.

Soluciones de ácido gálico.

Dilución	Blanco	1	2	3	4	5
Volumen solución (mL)	0	1	2	3	4	5
Volumen de agua (mL)	50	49	48	47	46	45
Concentración de ácido gálico (mg/L)	0	11,06	22,12	33,18	44,24	55,30

Los siguientes pasos permitieron conocer su densidad óptica con el fin de realizar la curva de calibración:

- El reactivo Folin-Ciocalteu se diluyó a 1:10.
- Se preparó la solución saturada de Na_2CO_3 mediante el conocimiento de solubilidad según la temperatura del solvente en este caso agua destilada.
- De cada solución de ácido gálico preparada se toma 200 μL , luego 1 mL de la solución Folin diluida y a los 15 segundos se adicionó 800 μL de solución saturada de Na_2CO_3 .
- Se dejaron reposar las muestras por 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Con los resultados de la densidad óptica de acuerdo con su concentración, se les resta el blanco y esos datos son los que se emplearon para realizar la gráfica (densidad óptica vs. concentración de ácido gálico (mg/L)), con el fin de conocer su regresión lineal donde se especificó que el punto de intersección es de cero.

A partir de esa ecuación lineal se puede determinar su concentración de ácido gálico en mg/L a partir de la densidad óptica obtenida en la muestra.

Figura 20.

Curva patrón Folin-Ciocalteu.

