

**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE AGUACATE *Persea americana* Y SU ANÁLISIS COMO ANTIOXIDANTE NATURAL**

**JAVIER DARÍO GÓMEZ RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2013**

**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE AGUACATE *Persea americana* Y SU ANÁLISIS COMO ANTIOXIDANTE NATURAL**

**JAVIER DARÍO GÓMEZ RODRÍGUEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Directores**

**Dra. Elena E. Stashenko**

**Dr. Jairo René Martínez**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2013**

## DEDICATORIA

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez por la oportunidad de hacer parte del centro de investigación.

A Danielita, Alexis y Gustavo mis compañeros de carrera, ahora colegas, pero, ante todo, siempre grandes amigos.

A todos mis compañeros de ingeniería química por todos los momentos vividos durante estos años en la escuela.

A mi hermanita Sofi por su apoyo durante toda mi carrera.

A Karen Vannessa por su compañía durante gran parte de mi carrera.

A Mayita y Aleja por su apoyo durante toda esta etapa, sin ellas el desarrollo del proyecto no hubiera sido el mismo.

A Giohanna que con su apoyo en el laboratorio pude culminar la parte experimental del proyecto de grado.

A Silvita, Wendy, Roger, Leonardo, Juan Camilo, Cori, Yuri, Jennifer, Silvia Nathalia, Dianita y Jesica que además de ser compañeros de laboratorio se convirtieron en grandes amigos.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN.....	13
1. MARCO TEÓRICO.....	15
1.1 AGUACATE ( <i>Persea americana</i> ).....	15
1.2 EXPANSIÓN DEL AGUACATE EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER .....	15
1.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y DE ORIGEN NATURAL.....	16
1.7 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, SFE.....	20
1.8 VARIABLES DE EXTRACCIÓN.....	21
1.8.1 Tamaño de partícula.....	21
1.8.2 Humedad.....	21
1.8.3 Temperatura y presión.....	21
1.8.4 Flujo de solvente.....	22
1.8.5 Tiempo de extracción.....	22
2. METODOLOGÍA.....	23
2.1 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO INICIAL DE LA MATERIA PRIMA.....	23
2.2 REDUCCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	23
2.3 PRUEBAS DE SECADO.....	24
2.3.1 Secado al ambiente.....	24
2.3.2 Secado en horno.....	24
2.5 CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	25
2.6 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	25
2.7 ANÁLISIS POR HPLC.....	27
2.8 PREPARACIÓN SUSTANCIAS DE REFERENCIA.....	28
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	29
3.1 RENDIMIENTO.....	29

3.1.1 Análisis de varianza.....	29
3.1.2 Ecuación de regresión.....	30
3.1.3 Validación.....	30
3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	32
3.3 ANÁLISIS POR HPLC .....	36
3.4 ANÁLISIS DE COSTOS .....	36
4. CONCLUSIONES .....	37
5. RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura de un flavonoide	19
<b>Figura 2.</b> Material antes y después del lavado	24
<b>Figura 3.</b> Espectrofotómetro <i>Jenway 6305 (Jenway Ltd., Felsted, Dunmow. U.K)</i>	27
<b>Figura 4.</b> Cromatógrafo <i>Agilent Techonologies 1200</i>	28
<b>Figura 5.</b> Respuesta experimental Vs respuesta calculada con el modelo.	32
<b>Figura 6.</b> Esquema de reacción del ABTS <sup>+</sup> transcurridos 6 minutos	33
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración del Trolox® por el ensayo de decoloración del catión radical ABTS <sup>+</sup> .	34
<b>Figura 8.</b> Comparación de las actividades antioxidantes del extracto de <i>Persea americana</i> y sustancias de referencia	36

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág</b>
<b>Tabla 1</b> , Comparación de las propiedades de los fluidos supercríticos con las de gases y líquidos.	20
<b>Tabla 2</b> , Valores de comparación entre los gases utilizados como fluidos supercríticos.	21
<b>Tabla 3</b> . Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental.	26
<b>Tabla 4</b> . Resultados extracciones	30
<b>Tabla 5</b> . Análisis de varianza para rendimiento.	31
<b>Tabla 6</b> . % de decadencia en la absorbancia.	34
<b>Tabla 7</b> . Capacidad de atrapar radicales en sustancias de referencia	35
<b>Tabla 8</b> . Equivalente en $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto.	36

## RESUMEN

**TITULO:** OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE AGUACATE *Persea americana* Y SU ANÁLISIS COMO ANTIOXIDANTE NATURAL\*.

**AUTOR:** Javier Darío Gómez Rodríguez\*\*.

**PALABRAS CLAVES:** Fluido supercrítico, aguacate, HPLC, ABTS, productos naturales, antioxidantes.

Se llevaron a cabo extracciones empleando CO<sub>2</sub> en estado supercrítico de la semilla de aguacate, *Persea americana*, evaluando el efecto de algunos de sus parámetros de extracción sobre el rendimiento: presión (250 – 400 bar), flujo de CO<sub>2</sub> (40 – 60 g/min) y tiempo de extracción (0,5 – 2 h). Se utilizó un diseño experimental 2<sup>3</sup>, centrado en las caras con triple replica en el punto central, para un total de 17 extracciones. Se determinó que las variables tiempo y flujo presentan una relación directa con el rendimiento mientras que la variable presión presenta una relación indirecta. El mayor rendimiento se encontró a 60 g/min, 2 h, y 250 bar, se realizó un ajuste de los datos obtenidos a un modelo de regresión utilizando un ANOVA para determinar las variables de mayor incidencia en la respuesta. Se realizó un proceso de validación utilizando el método *LOO* para validar y hallar el error de predicción.

Se realizaron graficas de superficie para obtener una respuesta grafica, la capacidad antioxidante se determinó por el método de decoloración del radical ABTS y se comparó con sustancias de referencia como la vitamina E, BHA y el BHT. Mediante HPLC se identificaron como compuestos mayoritarios la naringenina y la pinoembrina de alta capacidad antirradicalaria reportada.

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Elena E. Stashenko. Codirector: Jairo René Martínez.

## ABSTRACT

**TITLE:** OBTAINING THE SEED EXTRACT AVOCADO *Persea americana* AND ANALYSIS AS A NATURAL ANTIOXIDANT.

**AUTHOR:** Javier Darío Gómez Rodríguez\*\*.

**KEYWORDS:** Fluido supercrítico, aguacate, HPLC, ABTS, productos naturales, antioxidantes.

Supercritic CO<sub>2</sub> from Avocado Seed, *Persea Americana* was used to make extractions in order to evaluate the effects on its extraction performance parameters such as the pressure (250-400 bar), the CO<sub>2</sub> flowrate (40-60 g/min) and extraction time (0,5-2h). Central point Triple Replica face centered experimental Design 2<sup>3</sup> was used for making 17 extractions. A proportional relation was found between the variables time and flowrate and the performance percentage while an inversely proportional relation was found between pressure and performance percentage. The highest performance percentage was found at 60 g/min, 2 h and 250 bar, the results were adjusted using a regression model ANOVA in order to determinate which variable have more incidence on the response. LOO method was used as validation process in order to validate the results and calculate the error on the prediction.

Surface graphics were developed in order to obtain a response graphic, also the antioxidant capacity was determinated by the radical decoloration method ABTS and was compared with reference substances such as Vitamin E, BHA and BHT. HPCL was used to indentify prominent compounds such as naringenin and high antiradical capacity reported pinocembrin.

\* Graduation Projecto

\*\* Physicochemical Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Elena E. Stashenko. Codirector: Jairo René Martínez

## INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano está conformado por billones de células, las cuales se enfrentan constantemente a diferentes tipos de amenazas, tales como: la falta de alimento, la infección con virus, entre otras; sin embargo, otra amenaza constante se origina en ciertas especies químicas llamadas radicales libres (RL), las cuales son capaces de dañar las células y el material genético. El cuerpo genera estos radicales, como subproducto de convertir los alimentos en energía, se encuentran en los alimentos y en el aire, y se generan por la acción de la luz solar sobre la piel y los ojos [1].

Los RL tienden a robar los electrones de otras sustancias que se encuentren cerca, hecho que altera a la sustancia perdedora o donadora del electrón en su estructura o función. El cuerpo humano fabrica, por si mismo, gran cantidad de moléculas que aminoran el efecto de estos RL. Sin embargo, esto no es suficiente y en la actualidad existen sustancias antioxidantes con actividad antirradicalaria (AA) de origen sintético como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), los cuales se utilizan en las industrias de cosméticos, alimenticia, farmacológica, entre otras [2].

Sin embargo, el BHA y el BHT pueden llegar a producir reacciones alérgicas en la piel [3]. La *International Agency for Research on Cancer*, IARC, realizó un estudio en ratas y hámsteres administrando BHA en sus dietas, lo que dio como resultado la aparición de células cancerígenas y disfunción hormonal [4]. Con base en esto, los gobiernos de diferentes partes del mundo han impuesto restricciones en su uso, como es el caso de Canadá donde el BHA se considera de “Alto riesgo en la salud humana” y el BHT de “moderado riesgo en la salud humana” [2]; en la Unión Europea, se prohibió el uso de BHA en fragancias y cosméticos, y en el estado de California, en EE.UU., se requiere que los productos que contengan BHA, lleven un sello de peligro notificando al consumidor que este ingrediente puede producir cáncer [2].

Por lo anterior en las últimas décadas se ha incrementado la necesidad de utilizar antioxidantes de origen natural [5], dando lugar a estudios sobre las diferentes formas de extracción de estos, ya que se requieren, libres de solventes, y que su obtención sea económicamente viable.

Recientemente, Proexport, agencia gubernamental encargada de la promoción de exportaciones no tradicionales de Colombia, ha realizado estudios en sectores de la industria: ingredientes naturales para cosméticos y farmacéuticos, mostrando un gran crecimiento en los últimos años y con grandes proyecciones para un corto y mediano plazo [8].

Una de las formas de obtención de los antioxidantes naturales presentes en gran variedad de frutos, semillas, raíces y hojas, es mediante la técnica de extracción con fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés) [6], debido a que el extracto resultante se colecta libre de residuos de solvente, no tiene restricciones medioambientales, ni problemas de regulación en la salud pública. Para el presente trabajo de grado, se utilizó CO<sub>2</sub> como disolvente, aprovechando su bajo costo, no inflamabilidad y la facilidad que presenta para ser eliminado del extracto, con solo llevarlo a condiciones de temperatura y presión ambientales. Además de esto, las condiciones supercríticas del CO<sub>2</sub> se encuentran a temperaturas cercanas a las ambientales, lo que evita una posible degradación térmica de los compuestos termolábiles de interés.

En este trabajo se estudió la combinación de los parámetros de operación de la extracción de la semilla de aguacate, *Persea americana*, utilizando (CO<sub>2</sub>) como disolvente. El material vegetal provino del municipio de El Carmen de Chucurí, el cual está ubicado a 178 km del casco urbano de la ciudad de Bucaramanga, departamento de Santander [7]. Se encontró, además, una ecuación de regresión que relaciona las principales variables que intervienen en el proceso.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 AGUACATE (*Persea americana*)

El aguacate es una especie arbórea polimórfica que, al parecer, se originó en una amplia área geográfica que se extiende desde el este y el altiplano central de México, a través de Guatemala, hasta la costa del Pacífico de América Central.

La evidencia arqueológica indica que este cultivo se ha utilizado y seleccionado en México durante un periodo de 10.000 años. Las semillas que se han encontrado en las bases del valle de Tehuacán, estado de Puebla, demuestran que había una selección progresiva por mayor tamaño de los frutos, como lo indica el aumento del tamaño de las semillas descubiertas posteriormente y, presumiblemente, también para otras cualidades deseadas[9].

El fruto, de consistencia cremosa, tiene un alto contenido de nutrientes y es rico en vitamina E, ácidos grasos esenciales y proteínas que se digieren de manera fácil sin contribuir negativamente en el colesterol. La semilla de aguacate tiene el 70% de los antioxidantes que se encuentran en todo el fruto; contiene flavonol que impide el crecimiento de los tumores, estimula el sistema inmunológico e impide contraer enfermedades debilitantes [29].

### 1.2 EXPANSIÓN DEL AGUACATE EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER

La expansión del cultivo de aguacate en el departamento de Santander, Colombia, se ha llevado a cabo, principalmente, en el municipio de El Carmen de Chucurí, el cual se ubica al suroriente de Bucaramanga, a unos 178 km [7].

Este es un municipio que desde sus inicios, dadas sus condiciones geográficas y climatológicas, ha desarrollado cultivos de cacao, *Theobroma cacao*, convirtiéndose éste en el principal producto de la región [7]. Para optimizar su producción, esta planta debe crecer a la sombra; por ello, se optó por utilizar

árboles de aguacate, ya que estos proporcionan una sombra aceptable, además que se convierten en una nueva fuente de ingreso para los cultivadores.

Por las razones anteriores, los cultivos de aguacate se encuentran dispersos entre los cultivos de cacao, sin una tecnificación aceptable. Lo anterior se convierte en la razón principal, por la cual el cultivador, en el momento de la cosecha de aguacate, presenta grandes pérdidas, a las cuales es necesario añadir aquellos frutos que no cumplen con los estándares exigidos para su comercialización, son desechados y desperdiciados por los mismos agricultores. Según una entrevista realizada, con los cultivadores de la región, la pérdida estimada resulta cercana al 30% del total de la cosecha.

### **1.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y DE ORIGEN NATURAL**

Los antioxidantes son moléculas que, cuando están en baja concentración, en relación con un sustrato oxidable, inhiben la oxidación, que es la reacción química de transferencia de electrones o hidrógenos hacia un agente oxidante. La reacción de oxidación puede producir RL, los cuales inician cambios en las reacciones normales de las células llegando a producir muerte celular. Los principales antioxidantes utilizados actualmente son de origen sintético como es el caso del BHT, procedente de la industria petrolera, y el BHA, ambos con consecuencias negativas para la salud [4]. Los antioxidantes naturales son, en su mayoría, compuestos polifenoles extraídos de plantas o tejido animal, razón por la cual presentan baja toxicidad a los humanos [10], con la desventaja de encontrarse en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, lo que hace necesario el desarrollo y optimización de las técnicas de extracción.

### **1.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA**

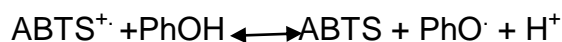
Un método para la evaluación de la actividad antioxidante es mediante un ensayo de decoloración aplicable a antioxidantes lipófilos e hidrófilos, incluyendo flavonoides y carotenoides, basado en la medida de la reacción con radicales,

tales como el 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), ABTS. La unidad de medida o comparativa es el factor Trolox® o TEAC (Trolox® *Equivalent Antioxidant Capacity*).

El ABTS es un compuesto cromóforo de color azul verdoso con un máximo de absorbancia registrado a 432 nm. Una vez generado el radical ABTS<sup>+</sup>, mediante la adición de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), su máximo de absorbancia es en 734 nm [11]. El radical ABTS<sup>+</sup> es más indicado para ensayos de compuestos coloreados por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria [12].

La captura del catión-radical por parte de la sustancia antioxidante se ve reflejada en la disminución en la absorbancia una vez han transcurrido 6 min después de añadir la sustancia antioxidante al catión radical ABTS<sup>+</sup> [11], representado en el **Esquema 1** [13].

**Esquema 1.** Reacción entre el catión-radical ABTS<sup>+</sup> y un antioxidante



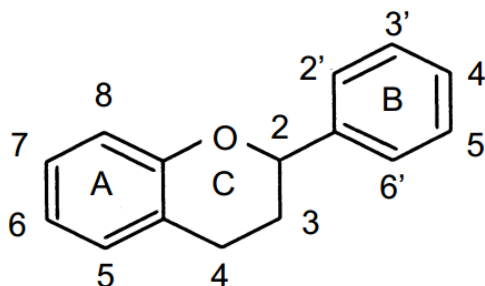
## 1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

La cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC, presenta la ventaja de permitir el análisis de gran variedad de moléculas en particular aquellas con alto peso molecular como los compuestos fenólicos, difíciles de separar o no analizables por cromatografía de gases, convirtiéndose así en una poderosa herramienta en un laboratorio analítico.

Los gradientes de elución se realizan con sistemas binarios de disolventes, tales como: soluciones acuosas acidificadas con ácidos acético, trifluoroacético, perclórico, *o*-fosfórico o fórmico, con un *buffer*, acetato o formiato en agua [14,15].

Los sistemas de detección más empleados son: UV-Vis, detector con arreglo de diodos (DAD) y MS. Los compuestos fenólicos, absorben luz ultravioleta gracias al anillo aromático que contienen [16]. En el caso de los flavonoides se presenta el primer máximo entre 240-285 nm, debido al anillo A y, el segundo máximo, se presenta en el rango de 300-350 nm, debido al anillo C [14].

**Figura 1.** Estructura de un flavonoide.



Fuente: Pérez G. Los flavonoides: antioxidante o prooxidante.

## 1.6 FLUIDOS EN ESTADO SUPERCRÍTICO

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas para la extracción de solutos de matrices sólidas, con el objeto de disminuir el consumo de solvente, mejorar la calidad del extracto, acortar el tiempo de extracción y aumentar el rendimiento; entre estas se encuentra la extracción con fluidos supercríticos [17].

El estado supercrítico, como se muestra en el **ANEXO B**, para un sistema de un componente, es la región en la cual el fluido alcanza una temperatura crítica,  $T_c$ , a partir de la cual ya no puede ser licuado, independiente del aumento de la presión. Si se observa que una muestra, alcanza el punto crítico, el menisco de la interface líquido-gas desaparece y no se presenta distinción entre las dos fases.

Un fluido, en estado supercrítico, logra obtener un alto coeficiente de difusividad y una viscosidad más baja que la de los líquidos (Véase **Tabla 1**), permitiendo así, una mejor penetración en matrices sólidas y el aumento de la solubilidad de los

componentes químicos de interés, durante los procesos de extracción [18]. Entre los disolventes utilizados como fluidos supercríticos se encuentra el CO<sub>2</sub>, que se destaca por su fácil accesibilidad, economía, baja toxicidad, ser inerte químicamente, no ser inflamable y poseer una presión y temperatura críticas relativamente bajas (Véase **Tabla 2**).

El amplio rango de densidades, que pueden adoptar los fluidos en estado supercrítico, se debe a que pequeños cambios en la presión y temperatura producen, como respuesta, grandes cambios en la densidad.

La conductividad térmica es relativamente alta en estado supercrítico, y tiene valores muy grandes en las cercanías al punto crítico porque allí, en principio, la capacidad calorífica tiende a infinito [19].

**Tabla 1.** Comparación de las propiedades de los fluidos supercríticos con las de gases y líquidos.

Propiedad	Gas (T y P estándares)	Fluido	Líquido
Densidad, g/cm <sup>3</sup>	(0,6-2) x 10 <sup>-3</sup>	0,2-0,5	0,6 -2
Coefficiente de difusión, cm <sup>2</sup> /s	(1-4)x10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>	(0,2-2)x10 <sup>-5</sup>
Viscosidad, g cm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	(1-3)x10 <sup>-4</sup>	(1-3)x10 <sup>-4</sup>	(0,2-3)x10 <sup>-2</sup>

Fuente: Principios de Análisis Instrumental, Douglas A. Skoog, Stanley R. Crouch. 2008, P. 857.

**Tabla 2,** Valores de comparación entre los gases utilizados como fluidos supercríticos.

<b>Fluido</b>	<b>Temperatura crítica °C</b>	<b>Presión crítica, atm</b>	<b>Densidad en el punto crítico, g/mL</b>	<b>Densidad a 400 atm, g /mL</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	31,3	72,9	0,47	0,96
<b>N<sub>2</sub>O</b>	36,5	71,7	0,45	0,94
<b>NH<sub>3</sub></b>	132,5	112,5	0,24	0,40
<b>n-</b>	152,0	37,5	0,23	0,50

Fuente: Mathenson Gas Data Book Y CRC Handbook of Chemistry and Physics, M.L. Lee y K.E. Markides. *Science*. 1987, P. 1345

### **1.7 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, SFE**

Los análisis de materiales complejos requieren con frecuencia, como paso previo, la separación del analito, o analitos, de la matriz en que se encuentra la muestra. Dicho proceso es uno de los principales usos de los fluidos supercríticos, ya que es necesario que la separación del analito sea rápida, sencilla y económica. Entre los procesos más comúnmente utilizados, se encuentra la extracción con solventes líquidos, extracción Soxhlet, pero, a menudo, las extracciones con líquidos no poseen las características ideales que ya se mencionaron.

Algunas de las ventajas de SFE son:

- La velocidad de transferencia de masa entre la matriz de una muestra, y un fluido de extracción, está dada por la velocidad de difusión de la especie en el fluido y la viscosidad de este, ambas variables favorables en sistemas SFE.
- La capacidad disolvente de un fluido supercrítico es fácilmente modificable mediante cambios en la presión y en menor medida, de la temperatura [17].

- La mayoría de los fluidos supercríticos son gases a temperatura ambiente, lo que facilita su eliminación del extracto [17, 18, 20].

## **1.8 VARIABLES DE EXTRACCIÓN**

Las variables que controlan el proceso de extracción SFE, pueden ser modificadas con el fin de mejorar la eficacia, selectividad de la extracción, aumentar la velocidad de extracción y el nivel máximo de analito extraído [21].

**1.8.1 Tamaño de partícula.** Un menor tamaño de partícula aumenta el área de transferencia entre la matriz y el solvente, lo que favorece los fenómenos de transferencia de masa y permite mayores rendimientos [21]; lo anterior hace conveniente, para el proceso de extracción, una disminución previa del tamaño de partícula.

**1.8.2 Humedad.** En el momento de la preparación de la matriz, es necesario eliminar el contenido de agua para obtener un extracto libre de humedad. Además, el agua tiene una solubilidad aproximada de 0,3% en CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, lo que puede ser un inconveniente para sustancias apolares, al actuar como una barrera en la transferencia de masa, pero, una ventaja en sustancias polares al favorecer la polaridad del fluido [22].

**1.8.3 Temperatura y presión.** Una propiedad importante de los fluidos supercríticos es que, a diferencia de lo que ocurre con los líquidos, su densidad está estrechamente relacionada con la presión y, en una menor medida, con la temperatura. A una temperatura constante, la densidad de un fluido supercrítico aumenta al aumentar la presión, mientras que, a presión constante, la densidad disminuye al aumentar la temperatura (Ver **ANEXO C**). Esta propiedad, ligada al hecho de que el poder disolvente de un fluido supercrítico es directamente proporcional a su densidad, hace posible que la capacidad de solvatación de un determinado fluido supercrítico sobre un compuesto de interés pueda ser

fácilmente manipulable mediante cambios en la presión y la temperatura [23]. El parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) se puede correlacionar con la presión crítica de un fluido según la **Ecuación 1**:

$$\delta = 1.25 P_C^{\frac{1}{2}} \left( \frac{\rho_{r,g}}{\rho_{r,l}} \right) \quad \text{Ecuación 1.}$$

**Ecuación 1:** Relación entre el parámetro de solubilidad y la presión crítica

Donde:

$P_c$ : Presión crítica del fluido,

$\rho_{rg}$ : Densidad reducida del gas, y

$\rho_{rl}$ : Densidad del líquido.

Se evidencia que un aumento de la densidad provoca un aumento en el parámetro de solubilidad, aunque ello puede significar una disminución en la selectividad del proceso de extracción.

**1.8.4 Flujo de solvente.** Al aplicar flujos altos, se presenta el inconveniente de insaturación del solvente, lo que lleva a un gasto innecesario del fluido, lo que genera un aumento en los costos, además de disminuir los rendimientos en las extracciones. Por el contrario, caudales muy bajos producen una saturación inmediata del solvente, disminuyendo su capacidad de extracción, lo que ocasiona, por consiguiente, la necesidad de mayores tiempos de extracción [21].

**1.8.5 Tiempo de extracción.** Para tiempos de extracción altos, superiores a dos horas, se presenta un aumento poco considerable en el rendimiento de la extracción en semillas oleaginosas [27], lo que no justifica el consumo extra de  $\text{CO}_2$  y energía en equipos.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO INICIAL DE LA MATERIA PRIMA

Las semillas de aguacate fueron recolectadas en la fábrica de empanadas vallunas El Machetazo, de la ciudad de Bucaramanga, Santander. Allí, los frutos son traídos, desde El Carmen de Chucuri, y destinados a la producción de guacamole, dejando las semillas como producto de desecho. Se recolectó el material vegetal, y se sometió a un lavado exhaustivo con el objetivo de eliminar cualquier tipo de contaminación que pudiera llegar a presentar interferencia en los resultados (Véase **Figura 2**).

### 2.2 REDUCCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

Posteriormente, se realizó una reducción de tamaño, dado que, a menor tamaño de partícula, el área de contacto aumenta, favoreciendo la transferencia de masa entre la matriz vegetal y el solvente [21]. La reducción de tamaño se realizó en un picatodo Oster® modelo: 6004, con cuchillas en acero inoxidable, acoplado a una licuadora Osterizer® modelo: 4655 (Ver **ANEXO D**).

**Figura 2.** Material antes y después del lavado. Fotografía tomada por el autor. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: septiembre de 2012.



Fuente: Fotografías tomadas por el autor.

## 2.3 PRUEBAS DE SECADO

Se plantearon dos métodos de secado y se analizaron parámetros de tiempo, calidad del material y costo. Con base en estos criterios se determinó el método a emplear.

**2.3.1 Secado al ambiente.** Se realizó de dos formas, colocando el material vegetal en estado fresco sin modificación alguna, y por otro lado, realizando un picado previo. El procedimiento se llevó a cabo en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, vivero número 2, donde se monitoreó la pérdida de humedad hasta encontrar un peso constante (Ver **Anexo E**). Este método no requiere gastos energéticos, pero produjo un deterioro en la calidad del material. Debido a largos tiempos de secado se observa la aparición de hongos del tipo *Geotrichum sp* (Ver **Anexo F**), los cuales pueden causar infecciones secundarias asociadas con la tuberculosis [24].

**2.3.2 Secado en horno** Se desarrolló primero un secado con una muestra del material previamente triturado, en un horno de bandejas (INDUMEGAS, Bucaramanga, Colombia) para calcular el tiempo de secado, a una temperatura de 40°C, **Anexo E**.

## 2.4 EXTRACCIÓN CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

Se utilizó un equipo de extracción con fluido supercrítico Thar SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), equipado con un portamuestras en acero inoxidable con capacidad para 2 litros. Debido a la reducida cantidad de material vegetal disponible, se cargó el 70% del cilindro con esferas de vidrio, de diámetro aproximado de 1 cm y, el 30% restante, con el material, separados por una malla en acero inoxidable y un filtro de papel de arroz, con el propósito de mantener una densidad de carga constante de 100 gramos/litro para cada uno de los experimentos. El equipo también cuenta con un sistema de separación y colección de los extractos, tipo ciclón, con capacidad para 0,5 L, regulador

automático de presión, bomba de alta presión P-200A (Thar instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), para el CO<sub>2</sub>, y un medidor de flujo Sitrans FC Massflow tipo MASS 6000 (Siemens AG, Berlín, Alemania).

## 2.5 CONDICIONES DE OPERACIÓN

La obtención de extractos a partir de semillas oleaginosas se ha estudiado desde 1980. Estas investigaciones se han llevado a cabo con CO<sub>2</sub> supercrítico, a temperaturas de 40 y 80 °C y presiones desde 50 hasta 600 bar [25].

En la determinación de los parámetros de extracción se tuvieron en cuenta dos factores: las limitaciones de operación del equipo de extracción y las operaciones reportadas para sistemas de extracción de semillas de tipo oleaginosas [25]. Con base en estos límites se tomaron los parámetros mostrados en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental.

<b>Variable</b>	<b>F (g/min)</b>	<b>t (min)</b>	<b>P (bar)</b>
Punto mínimo	40	30	250
Punto medio	50	75	315
Punto máximo	60	120	400

Con el fin de intentar establecer la relación causa-efecto que se presenta entre las variables, flujo (F), presión (P) y tiempo (t), con el rendimiento como variable de respuesta, se planteó un diseño experimental 2<sup>3</sup> más estrella (Ver **Anexo G**), con tres repeticiones en el punto central, con todos los niveles en su valor intermedio, para tener una estimación del error experimental.

## 2.6 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó la medición de la capacidad antirradicalaria de los extractos obtenidos utilizando el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> [11]. Se tomó ABTS (10 mg), se disolvió en agua grado HPLC (5 mL) y posteriormente se agregó persulfato de potasio (2 mg). La solución se dejó reaccionar por 24 horas, a temperatura ambiente, aislada de la luz [26]. Seguidamente se tomó una alícuota

de 45  $\mu$ L y se diluyó en 3 mL de etanol, para lograr una absorbancia de  $0.7 \pm 0.5$  a 734 nm [15, 26].

Para tener una validez en los datos se debe presentar una disminución en la absorbancia de por lo menos un 15% [15], la cual se obtuvo con una concentración de 20% del extracto usando etanol como solvente. Se hicieron mediciones con concentraciones de 20% y 30% y se midió la disminución en la absorbancia seis minutos después de la adición de una alícuota de 30  $\mu$ L de la solución del extracto, a 3 mL de la solución del catión-radical ABTS<sup>+</sup>; los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los valores de la capacidad antioxidante de los extractos se expresaron como  $\mu$ mol Trolox®/ g muestra. Estos valores se calcularon como la relación entre las pendientes de las gráficas de inhibición (%) *versus* la concentración del antioxidante evaluado y el estándar Trolox®.

Los datos fueron obtenidos en un espectrofotómetro *Jenway 6305* (*Jenway Ltd.*, Felsted, Dunmow, U.K.), utilizando celdas desechables de 1 x 1 x 4.5 cm (Veáse **Figura 3**).

**Figura 3.** Espectrofotómetro *Jenway 6305* (*Jenway Ltd.*, Felsted, Dunmow, U.K.). Fotografía tomada por el autor. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: enero de 2012



**Fuente:** Fotografía tomada por el autor.

## 2.7 ANÁLISIS POR HPLC

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector automático y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B (Véase **Figura 4**).

**Figura 4.** Cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, con bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, equipado con inyector automático y acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B. Fotografía tomada por el autor CENIVAM. UIS. Fecha: febrero de 2013.



**Fuente:** Fotografía tomada por el autor.

La separación de los compuestos se realizó en una columna apolar Kinetex C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.5  $\mu$ m). El procesamiento de los datos se realizó a través del software *Agilent Technologies ChemStation*, Versión B.04.02 (SP1).

La fase móvil consistió en ácido acético, al 0.3%, y acetonitrilo. La temperatura de la columna fue de 35°C, con un flujo volumétrico de 1 mL/min, y un volumen de inyección de 10  $\mu$ L. Los cromatogramas se registraron a 210 nm.

La identificación de los compuestos de los extractos, se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención ( $t_r$ ), y los espectros UV-Vis, con los de una mezcla de sustancias de referencia certificadas.

## 2.8 PREPARACIÓN SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

Las sustancias de referencia certificadas catalogadas como antioxidantes fueron: quercetina, apigenina, kaempferol, luteolina, naringenina, pinocembrina, ácidos carnósico, rosmarínico, ursólico, caféico, *p*-cumárico; ácidos fenólicos (vanílico, ferúlico, cinámico, gálico, *p*-hidroxibenzoico); y catequinas (-)-epigallocatequina (EGC), (+-)-catequina (C), (-)-epigallocatequina galato (EGCG), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG).

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Luego del secado y triturado, el tamaño de partícula presentó la siguiente distribución: <0,149 mm (11,2 %), 0,149-0,180 mm (37,8%), 0,180-0,297 mm (36,4%), >0,297 mm (14,6%). Esta distribución de tamaño, donde solo el 14,6% presenta un diámetro superior a 0,297 mm, garantiza un área que favorece los fenómenos de transferencia de masa.

#### 3.1 RENDIMIENTO

**3.1.1 Análisis de varianza.** Los datos de rendimiento obtenido en cada uno de los experimentos del diseño experimental se muestran en la **Tabla 4**. En la **Tabla 5**, se muestra el análisis de varianza, el cual permitió, con base en el valor F umbral, determinar las variables que tuvieron incidencia significativa sobre el modelo, con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 4.** Resultados extracciones

# Experimento	Presión MPa	Flujo Kg/hora	Tiempo Horas	% Rendimiento
1	25,0	2,4	0,50	<b>0,43</b>
2	40,0	2,4	0,50	<b>0,52</b>
3	25,0	3,6	0,50	<b>0,72</b>
4	40,0	3,6	0,50	<b>0,59</b>
5	25,0	2,4	2,00	<b>0,74</b>
6	40,0	2,4	2,00	<b>0,64</b>
7	25,0	3,6	2,00	<b>0,94</b>
8	40,0	3,6	2,00	<b>0,81</b>
9	25,0	3,0	1,25	<b>0,91</b>
10	40,0	3,0	1,25	<b>0,64</b>
11	31,5	2,4	1,25	<b>0,62</b>
12	31,5	3,6	1,25	<b>0,77</b>
13	31,5	3,0	0,50	<b>0,70</b>
14	31,5	3,0	2,00	<b>0,75</b>
15	31,5	3,0	1,25	<b>0,85</b>
16	31,5	3,0	1,25	<b>0,82</b>
17	31,5	3,0	1,25	<b>0,79</b>

**Tabla 5.** Análisis de Varianza para Rendimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-P
<b>A:Flujo</b>	0,0759382	1	0,0759382	13,23	0,0083
<b>B:Presión</b>	0,02916	1	0,02916	5,08	0,0589
<b>C:Tiempo</b>	0,0835173	1	0,0835173	14,55	0,0066
<b>AA</b>	0,0163712	1	0,0163712	2,85	0,1351
<b>AB</b>	0,00757042	1	0,00757042	1,32	0,2886
<b>AC</b>	0,0000125	1	0,0000125	0,00	0,9641
<b>BB</b>	0,00021748	1	0,00021748	0,04	0,8512
<b>BC</b>	0,00369061	1	0,00369061	0,64	0,4491
<b>CC</b>	0,00621653	1	0,00621653	1,08	0,3327
<b>Error total</b>	0,0401907	7	0,00574153		
<b>Total</b>	0,2924	16		<b>Valor F</b> <b>Umbral:</b>	<b>0,733</b>

**3.1.2 Ecuación de regresión.** El modelo obtenido se muestra en la Ecuación 2, donde se determinaron como variables de incidencia: tiempo (t), flujo (F), presión (P), y los efectos: t\*t, F\*F, F\*P.

$$\text{Rendimiento: } .23742 + (1,61902 * F) + (0,0133145 * P) + (0,323184 * t) - (208657 * F^2) - (0,00682389 * F * P) - (0,080207 * t^2) \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$R^2 = 84,9141 \%$$

$$R^2 \text{ ajustada} = 75,8625 \%$$

**3.1.3 Validación.** Se desarrolló una validación cruzada donde se repite y calcula la media aritmética obtenida de las medidas de evaluación, combinando los valores de los coeficientes, escogiendo el de mejor R2adj, obteniendo la **Ecuación 3**.

$$\text{Rendimiento: } -3,174 + (2,305 * F) + (0,013 * P) + (0,180 * t) - (0,015 * t^2) - (0,323 * F^2) - (0,007 * F * P) \quad \text{Ecuación 3}$$

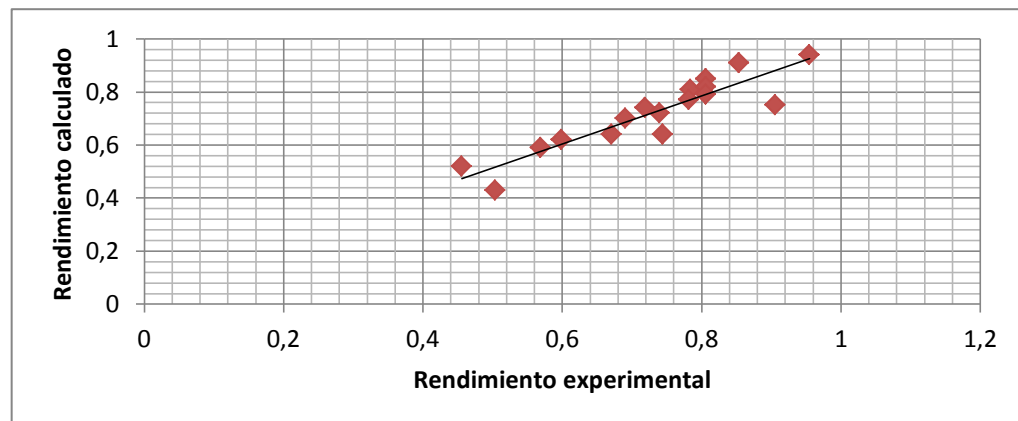
$R^2 = 89,78 \%$

$R^2$  ajustada = 80,84 %

Error de predicción: 0,041

Con la **Ecuación 3**, se realizó una comparación entre el rendimiento calculado con el modelo y el rendimiento experimental (Véase **Figura 5**), y se realizaron unas superficies de respuesta del rendimiento en función de las variables F, P y t (Ver **ANEXO H**), en las cuales se muestra la tendencia lineal, mostrando una buena aproximación del modelo, a los datos experimentales. El experimento que tuvo mejor rendimiento fue el número 7, el cual se realizó a un flujo de 60 g/min, lo que incrementó el contacto con el material vegetal, permitiendo un mayor arrastre del extracto; un tiempo de extracción de 120 min, tiempo suficiente para obtener gran cantidad de extracto, y a una presión de 25 MPa, por lo que se disminuyó la densidad y, por ende, la capacidad solvatante; esto mostró que a presiones bajas dentro del estado supercrítico, se logra la mejor extracción, y a presiones altas, a pesar de tener mayor poder de solvatación, no se obtienen grandes rendimientos,

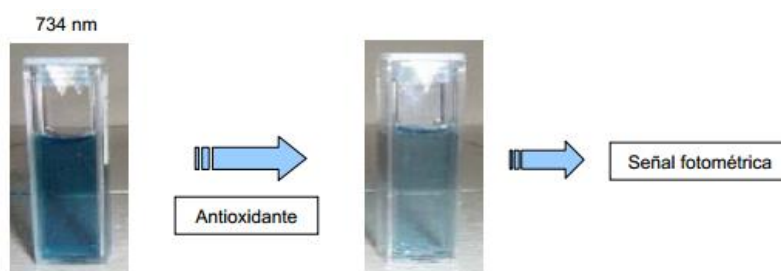
**Figura 5.** Respuesta experimental Vs respuesta calculada con el modelo.



### 3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los extractos de *Persea americana*, se determinó utilizando el método descrito en la sección 2.6, donde se tomó una alícuota de 45  $\mu\text{L}$  de una solución de ABTS (10 mg) y persulfato de potasio (2 mg), disueltos en agua grado HPLC (5 mL), disuelta en 3 mL de etanol. La decadencia en la absorbancia se vio reflejada en un cambio en la coloración después de transcurridos 6 minutos.

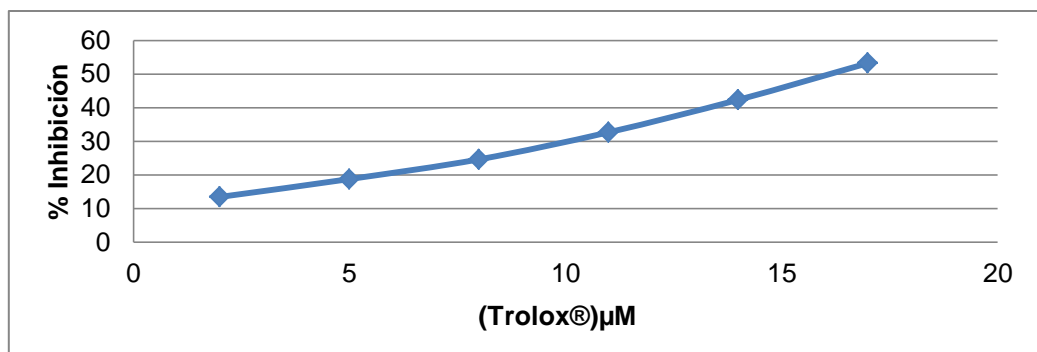
**Figura 6.** Esquema de reacción del ABTS<sup>+</sup> transcurridos 6 minutos.



**Fuente:** Fotografía tomada por el autor

La disminución en la absorbancia, en cada uno de los extractos, se midió por triplicado, y su promedio se encuentra registrado en la **Tabla 6**. Para la realización de la curva de calibración del Trolox®, se tomaron mediciones a diferentes concentraciones; en la **Figura 7** se observa el porcentaje de inhibición de la absorbancia exhibida por el catión-radical ABTS<sup>+</sup>, en presencia del antioxidante Trolox®. El catión-radical residual se cuantificó espectrofotométricamente en un periodo de 6 min, en el que la disminución en la concentración es función del tiempo y se produce por la oxidación del Trolox®, del cual se tomaron concentraciones entre 2-20  $\mu\text{M}$ . La decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> se calculó respecto a la reactividad del Trolox®, permitiendo obtener la curva de calibración. Se realizó una aproximación lineal (Véase **Ecuación 4**), para la que se obtuvo un  $R^2$  de 0,9802.

**Figura 7.** Curva de calibración del Trolox® por el ensayo de decoloración del catión radical ABTS<sup>+</sup>.



**Tabla 6.** % de decadencia en la absorbancia.

Número de extracción	% de decadencia en la absorbancia 20% de extracto en etanol	% de decadencia en la absorbancia 30% de extracto en etanol
1	19,09	27,11
2	22,26	28,24
3	40,07	47,09
4	24,24	26,99
5	12,01	19,43
6	23,10	32,87
7	28,77	31,41
8	26,20	28,41
9	19,64	24,96
10	17,70	25,69
11	22,44	29,58
12	22,23	30,66
13	14,55	21,96
14	17,47	17,79
15	15,92	22,04
16	25,58	32,05
17	25,03	33,15

$$y = 2,645 x + 5,724$$

#### Ecuación 4

Se realizó la comparación de la actividad antirradicalaria de los extractos obtenidos con sustancias de referencia como el BHT, BHA y la vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol), como se refleja en la **Tabla 7**. Cada una de estas sustancias se analizó mediante el método de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>, por triplicado. Posteriormente se hizo una comparación de las actividades antioxidantes, entre las sustancias de referencia y el extracto obtenido (Véase **Figura 8**), donde la extracción número 3 fue la que reportó la mejor capacidad antirradicalaria (Véase **Tabla 8**) y, por ello, se tomó como referencia en la comparación. Lo anterior mostró que, a pesar de no presentar una capacidad antirradicalaria superior a las sustancias de referencia, el extracto presenta valores cercanos, y al ser una sustancia de origen natural, en comparación con el BHA y el BHT, no presenta el inconveniente de ser cancerígeno o de alto riesgo para la salud humana, presentando una ventaja adicional.

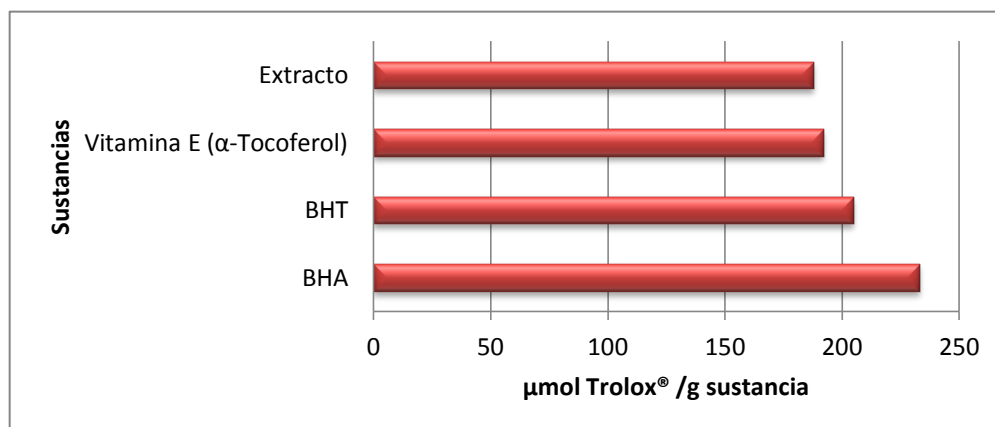
**Tabla 7.** Capacidad de atrapar radicales en sustancias de referencia.

Sustancia	$\mu\text{mol Trolox}^{\circledast} / \text{g sustancia}$
BHA	233 $\pm$ 6
BHT	205 $\pm$ 9
Vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol)	192 $\pm$ 4
Extracto	188

**Tabla 8.**Equivalente en  $\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}$  /g extracto.

Número de extracción	$\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}$ /g extracto, 20%	$\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}$ /g extracto, 30%	Promedio	Varianza	Desviación estándar
1	84,63	83,15	83,89	1,09	1,04
2	100,48	96,92	98,70	6,34	2,52
3	189,53	186,42	187,97	4,84	2,20
4	110,38	106,09	108,23	9,22	3,04
5	49,23	50,89	50,06	1,37	1,17
6	104,68	102,35	103,52	2,71	1,65
7	133,03	130,82	131,92	2,44	1,56
8	120,18	120,82	120,50	0,20	0,45
9	87,38	82,65	85,02	11,17	3,34
10	77,68	78,42	78,05	0,27	0,52
11	101,38	98,05	99,72	5,53	2,35
12	100,33	94,99	97,66	14,27	3,78
13	61,93	65,99	63,96	8,23	2,87
14	76,53	78,75	77,64	2,47	1,57
15	68,78	66,25	67,52	3,19	1,79
16	117,08	122,95	120,02	17,25	4,15
17	114,33	116,62	115,47	2,62	1,62

**Figura 8.** Comparación de las actividades antioxidantes del extracto de *Persea americana* y sustancias de referencia.



### 3.3 ANÁLISIS POR HPLC

Aplicando las metodologías desarrolladas para la obtención y análisis de los extractos mediante HPLC (Véase **Sección 2.7**), y con la colaboración del señor Freys Julio Serrano, Químico, M.Sc., profesional del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS de la UIS, se identificaron compuestos fenólicos presentes en los extractos; se logró identificar naringenina y pinocembrina como compuesto mayoritario en los extractos aislados con fluido supercrítico (Ver **ANEXO I**). La pinocembrina es un compuesto polifenolico que presenta capacidad antirradicalaria [30], a la cual se le atribuye la actividad antioxidante determinada mediante el método ABTS en los extractos obtenidos.

### 3.4 ANÁLISIS DE COSTOS

Los costos y la estimación del precio venta del extracto se presentan en el **ANEXO J**. Para obtener un kilogramo de extracto, es necesario realizar 54 extracciones, donde se utilice la capacidad máxima de carga de material del equipo (Aproximadamente 2 kg). Por lo anterior, se necesitarían 3 extracciones diarias realizadas por personal capacitado. El precio de venta por kg se estimó en 9'729.512 COP.

Lo anterior implica que el costo de venta es elevado, en comparación con antioxidantes de origen sintético, como lo es el BHA, procedente del puerto de Shangai (Aproximadamente 6'000.000 COP) [31]. Sin embargo, lo más importante y que debe destacarse es que el extracto obtenido, dado su origen natural, no presenta complicaciones para la salud humana y no es contaminante.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se determinó que el rendimiento en las extracciones realizadas con fluido supercrítico, utilizando como solvente CO<sub>2</sub>, se encuentra influenciado por las variables: tiempo (t), flujo (F) y presión (P) y sus interacciones: t\*t, F\*F, P\*P, t\*F, t\*P, F\*P, donde el flujo y tiempo presentan una relación positiva con la respuesta de rendimiento del modelo, mientras que la presión presenta una correlación negativa.
- De los diferentes niveles escogidos, durante el desarrollo del diseño experimental, se determinaron, como mejores condiciones de operación, para la obtención de un mayor rendimiento, una presión de 25MPa; un flujo de 3,6 kg/h y un tiempo de 2 horas, obteniendo así un rendimiento de 0,94%, tomando como base, para el cálculo del rendimiento, la cantidad de extracto que es posible recuperar del sifón colector.
- Los compuestos antioxidantes, identificados mediante HPLC, como la pinocebrina y la naringenina, de gran actividad antirradicalaria reportada, son los que dan la propiedad antioxidante a los extractos obtenidos, mediante extracción con fluido supercrítico, de la *Persea americana*.
- Los extractos obtenidos presentaron buena capacidad antirradicalaria, 188 µmol Trolox® /g sustancia, aunque menor a las sustancias de referencia, 233 ± 6 µmol Trolox® /g sustancia en el BHA, 205 ± 9 µmol Trolox® /g sustancia en el BHT, 192 ± 4 µmol Trolox® /g sustancia en la vitamina E, pero los extractos, al no presentar residuos de solvente y ser de origen natural, tienen la ventaja de no presentar inconvenientes en la salud humana, a diferencia de los antioxidantes sintéticos como el BHA y el BHT.

## 5. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis de la capacidad antirradicalaria de los extractos mediante métodos estandarizados, como el método ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, y mediante evaluación *in vivo*, determinar si es posible su implementación en productos alimenticios y cosméticos, para tener un punto de comparación con el método realizado.
- Acoplar un equipo de recirculación de CO<sub>2</sub> para el equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), con el fin de disminuir los costos de extracción.

## BIBLIOGRAFÍA

1. [On-line]: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/antioxidants/>. [Consultado: noviembre 23 de 2012].
2. [On-line]: [http://www.davidsuzuki.org/issues/health/science/toxics/chemicals-in-your-cosmetics---bha-and-bht.](http://www.davidsuzuki.org/issues/health/science/toxics/chemicals-in-your-cosmetics---bha-and-bht/) [Consultado: octubre 15 de 2012].
3. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans vol. 17 (Paris: International Agency for Research on Cancer), vol. 40 (1986).
4. UNEP and OECD, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT) Screening Information Data Set: Initial Assessment Report (Paris: OECD, 2002).
5. CAMPOS, D.; CHIRINOS, R.; PEDRESCHI, R. Extraction, recovery and purification of natural antioxidants from Andean crops. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry*. 2008, 7, pp. 3150-3154.
6. VELASCO, R.; VILLADA, H.; CARRERA, J. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. Universidad del Cauca, departamento de agroindustria, facultad de ciencias agropecuarias. *Información Tecnológica*, 2007, vol. 18(1), pp. 53-65.
7. [On-line]: <http://www.elcarmen-santander.gov.co/index.shtml>. [consultado: febrero 21 de 2012].
8. HOGERVOST R.; JAN- WILLEM KNIPPELS. Fortalecimiento de la capacidad comercial hacia los países EFTA, inteligencia de mercados para Colombia – Alimentos procesados. Edición septiembre 2010

9. BARRIENTOS-PRIEGO, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, L. Historia y genética del aguacate. Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec de Harinas, México. 2002, pp.100-121.
10. AUDDY, B.; FERREIRA, M.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS F.; TRIPATHI, P.; SEAL, T.; MKHERJEE, B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, 82, pp. 131-138.
11. ROBERTA, RE.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 26, pp. 1231-1237.
12. KUSKOSKI, E.; ASUERO, G.; GARCÍA-PARRILLA, M.; TRONCOSO, M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2004, 24, pp. 691-693.
13. CAMPOS, A.N.; LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. 1997, 29, pp. 219-224.
14. MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoides by high performance liquid chromatography: a review, *Journal Agric. Food Chem*. 48, pp. 577-579.

15. PERL, I.M.; FUZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoides. *Journal Chromatography A*. 2005, 1073, pp. 201-207.
16. MARTÍNEZ, A. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, Facultad Química Farmacéutica. Febrero, 2003.
17. ROZZI, N.; R. SINGH. Supercritical fluids and the food industry. *Comprehensive Reviews in food Science and food safety*. 2002, 1, pp.33-44
18. MORILLO O.; FERNÁNDEZ S.; HERNÁNDEZ H.; CASTILLO G.; MARQUINA G. Optimización de los parámetros de extracción de aceite de palma africana utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. *Bioagro*. 2010, 22, pp.89-94.
19. MARTÍNEZ, J. L. Fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. CRC Press, Taylor and Francis Group. 2008, pp. 215-336.
20. DOUGLAS A. SKOOG.; R. JAMES HOLLER. Principios de Análisis Instrumental, sexta edición, pp. 856-860.
21. LUQUE DE CASTRO, M.; VALCÁRCEL, M.; TENA, M. Extracción fluidos supercríticos proceso analítico, S. A., edición en español, pp. 55-57, 85-89.
22. LEHOTAY, S. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, *Journal of Chromatography A*. 1997, 785, pp. 289-312.
23. VALVERDE, A. Extracción con fluidos supercríticos: Principios aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. México 1995. [On-line]: [http://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP-c6/\\$File/RP-c6.pdf](http://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP-c6/$File/RP-c6.pdf) [consultado: noviembre 24 de 2012].

24. [On-line]: [http://www.dehs.umn.edu/iaq\\_fib\\_fg\\_gloss\\_geotrichumsp.htm](http://www.dehs.umn.edu/iaq_fib_fg_gloss_geotrichumsp.htm)  
[consultado: noviembre 24 de 2012].
25. TAYLOR, S.; ELLER, F.; KING, J. A comparison of oil and fat content in oilseeds and ground beef-using supercritical fluid extraction and related analytical techniques. *Food Research International*. 1997, 30, pp. 365-370.
26. DIAZ O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Bucaramanga, 2007, pp. 54-55. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química.
27. LIU, S.; YANG, F.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P.; DENG, P. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2009, 48, pp. 9-14
28. ROZZI, N.; SINGH, R. Supercritical fluids and the food industry. *Food Science and food safety*. 2002,1, pp. 33-44.
29. [On-line]: <http://espanol.omtimes.com/2012/10/13-beneficios-de-comer-semillas-de-aguacate/> [consultado: marzo 18 de 2013]
30. HARBORNE, J.; WILLIAMS, C. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000 v. 52, pp. 481-504.
31. [On-line]: <http://spanish.alibaba.com/product-gs/hot-sale-bha-butyl-hydroxyl-anisole-with-low-price-497853803.html> [Consultado: Abril 26 de 2013]

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
<b>Anexo A.</b> Información aguacate <i>Persea americana</i>	44
<b>Anexo B.</b> Diagrama de Fases CO <sub>2</sub>	45
<b>Anexo C.</b> Densidad del CO <sub>2</sub> en función de la presión y evolución de la solubilidad de la cafeína en CO <sub>2</sub>	46
<b>Anexo D.</b> Reducción del tamaño de partícula	47
<b>Anexo E.</b> Secado del material	48
<b>Anexo F.</b> Análisis microbiológico de las muestras	50
<b>Anexo G.</b> Diseño experimental	51
<b>Anexo H.</b> Graficas de superficie y de contorno	52
<b>Anexo I.</b> Análisis por HPLC	55
<b>Anexo J.</b> Análisis de costos	57

## ANEXO A. INFORMACIÓN AGUCATE *Persea americana*

El aguacate nació hace más de 50 000 años en las laderas volcánicas de Centro América, proliferó cerca de arroyos y ríos, se esparció hacia el sur por los callejones de los Andes hasta alcanzar la selva amazónica. Cuando llegaron los españoles encontraron esta fruta en los montes y en los mercados desde México hasta el Perú.

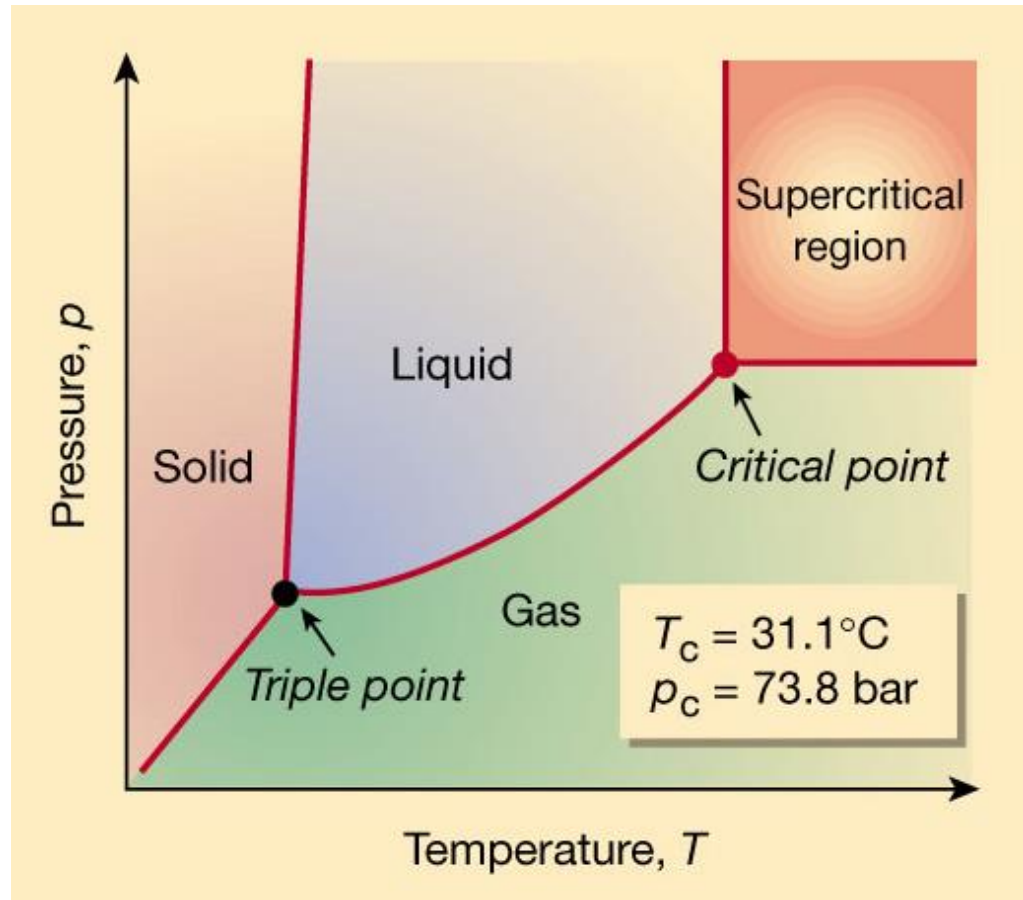


Es un árbol siempre verde, perenne, de no más de 20 metros de altura, con frutos entre 5 y 20 cm de largo, la pulpa contiene: aceites grasos (entre un 4 y 40%, dependiendo de la variedad, localización, clima, nutrientes del suelo etc., pero se reporta un promedio del 16%); campesterol, altas cantidades de  $\beta$ -sitosterol, ácidos grasos (aproximadamente 60% monosaturados, 20% saturados y 20% insaturados) altas cantidades de glutatión, cerca de 2% de proteínas, 6-9% carbohidratos y azúcares; además cuenta con vitamina K y E, ácido fólico, roboflavina, niacina, tiamina, biotina entre otros.

### **La semilla.**

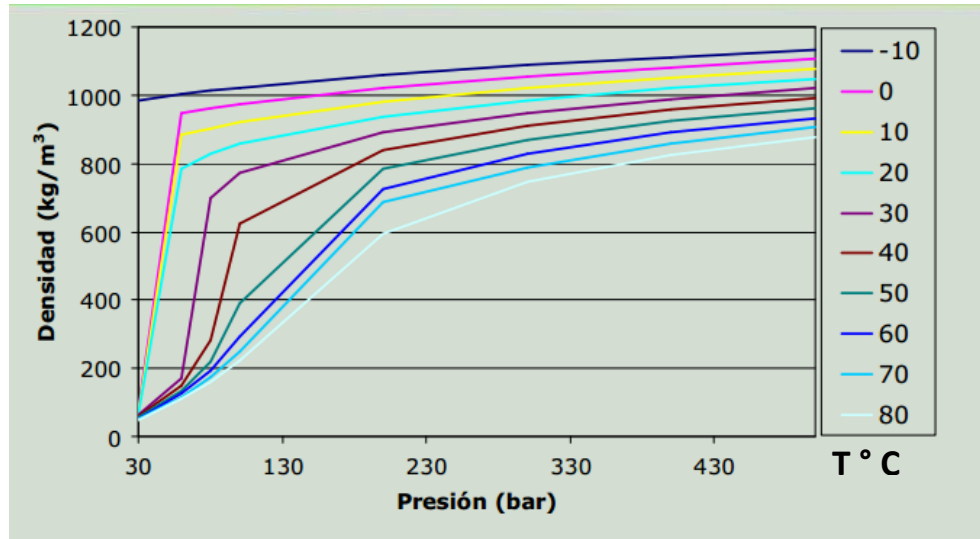
La semilla del aguacate es considerada una semilla oleaginosa dado su alto contenido de aceite además contiene alcoholes polihidricos, azúcares raros (D-monoheptulosa, etc.); *avocatins* (*avocadene*, *avocadyne*, *avocadenone acetate*, *avocadyne acetate*, *avocadenofuran*, *avocadienofuran*, *isoavocadienofuran*); 4,8-biscatechin, compuestos alifáticos oxigenados insaturados y demás proteínas y grasas.

## ANEXO B. DIAGRAMA DE FASES CO<sub>2</sub>

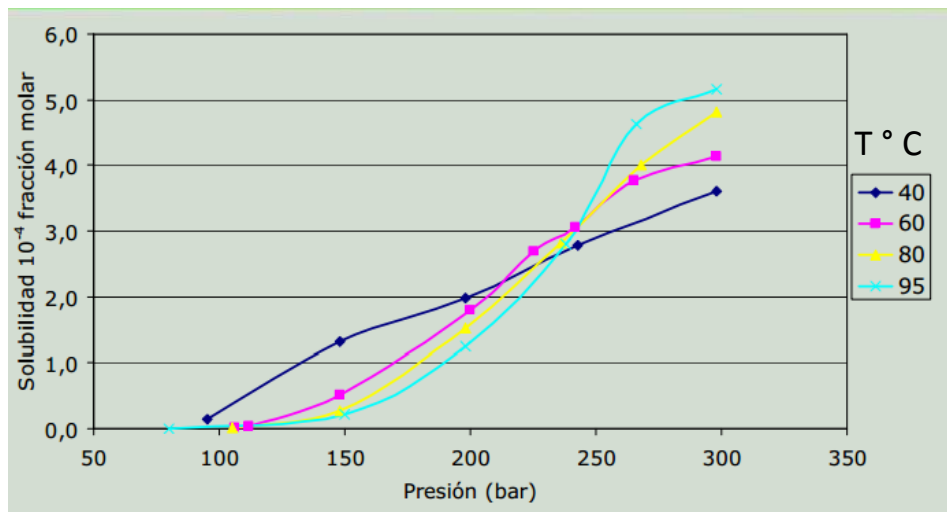


**Figura B.1.** Diagrama de fases CO<sub>2</sub>

**ANEXO C. DENSIDAD DEL CO<sub>2</sub> EN FUNCIÓN DE LA PRESIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LA CAFEINA EN CO<sub>2</sub>.**



**Figura C.1.** Densidad del CO<sub>2</sub> en función de la presión a diferentes temperaturas, adaptada de IDOKI SCF Technologies S.L, Dr. BRUO IÑARRA. [On-line] <http://www.idoki.com>



**Figura C.2.** Evolución de la solubilidad de la cafeína en CO<sub>2</sub> con la presión a distintas temperaturas, adaptada de IDOKI SCF Technologies S.L, Dr. BRUO IÑARRA. [On-line] <http://www.idoki.com>

## ANEXO D. REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

El material después de realizado un lavado exhaustivo es picado manualmente, con el fin de poder introducir el material en un picatodo Oster® modelo 6004.

Posteriormente el material ya triturado es dispuesto en moldes de aluminio para su posterior secado.



**Figura D.1** Material lavado antes de la trituración. Fotografía tomada por el autor  
Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: septiembre de 2012



**Figura D.2** Material después de la trituración. Fotografía tomada por el autor  
Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: septiembre de 2012

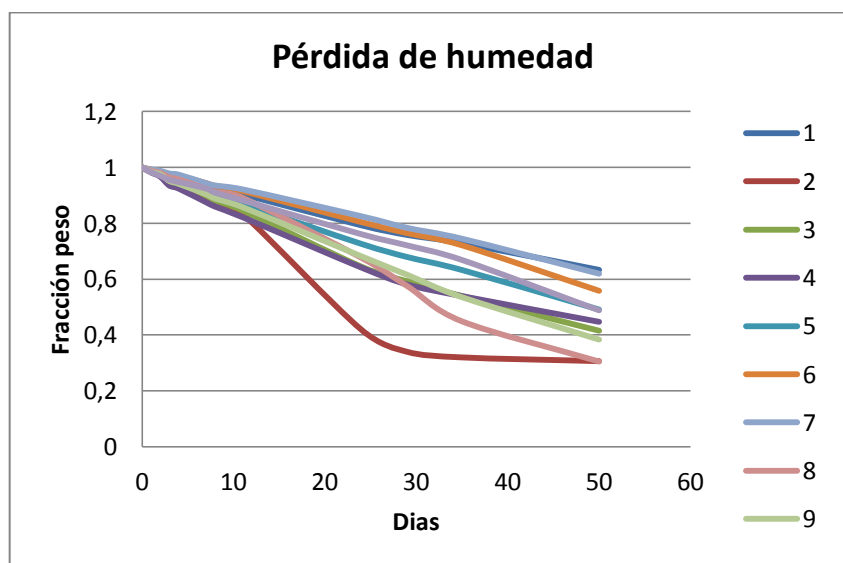
## ANEXO E. SECADO DEL MATERIAL

### Secado al ambiente:

Se realizó una prueba de secado al material vegetal sin modificaciones en condiciones ambientales normales y estables, con 10 diferentes muestras durante 50 días, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla E.1:** Variación del peso en muestras secadas en condiciones ambientales normales y estables durante 50 días.

# muestra	Peso inicial	Peso final
1	57,54	36,44
2	60,43	18,52
3	79,70	33,10
4	63,99	28,62
5	121,74	59,79
6	120,40	67,22
7	130,60	80,91
8	70,00	21,36
9	102,78	39,43
10	123,41	60,29



**Figura E.1:** Reducción del peso en las muestras de material vegetal.

La diferencia entre la fracción del peso en cada muestra se debió a la diferencia de tamaño entre estas.

### **Secado al ambiente, material triturado.**

Se realizó un secado del material triturado, en condiciones ambientales, disponiendo 150 g de material en tres bandejas de aluminio.

**Tabla E.2:** Resultados pérdida de humedad en muestras trituradas secadas al ambiente.

# muestra	Peso inicial	Peso final	% de humedad perdido
1	150	95,25	63,5
2	150	99,45	66,3
3	150	94,02	62,7

### **Secado al horno**

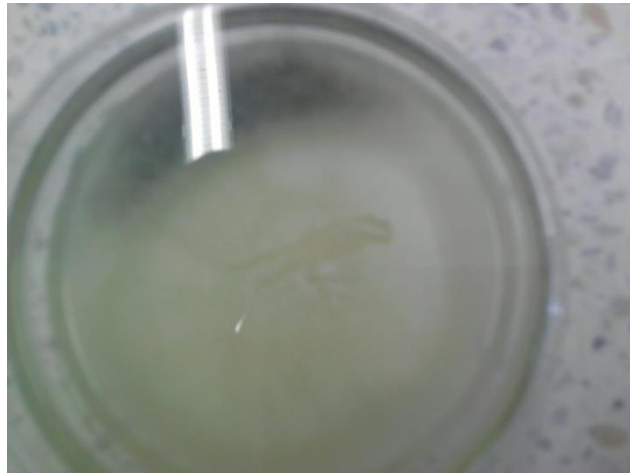
El secado al horno se realizó en un horno de bandejas (INDUMEGAS, Bucaramanga, Colombia) a una temperatura de 40°C, obteniendo como resultado un tiempo de 25 horas para encontrar una estabilización en el peso del material.



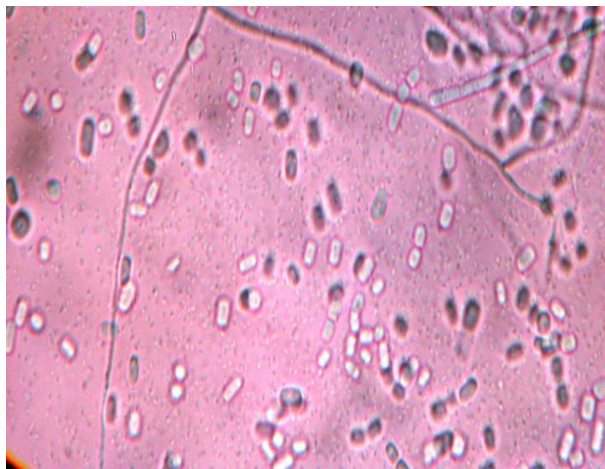
**Figura E.2:** Horno de bandejas (INDUMEGAS, Bucaramanga, Colombia)

## ANEXO F. ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.

Se observó el crecimiento de un hongo en las muestras mientras se realizaba el secado en el ambiente, por eso se procedió a realizar el cultivo de este hongo, **Figura F.1**, para su posterior identificación, **Figura F.2**.



**Figura F.1.** Fotografía cultivo de hongos encontrados. Fotografía tomada por Inés Hernández. Lugar: Laboratorio de microbiología, Facultad de Salud UIS. Fecha: Marzo de 2012



**Figura F.2.** Microfotografía cultivo de hongos encontrados. Fotografía tomada por Inés Hernández. Lugar: Laboratorio de microbiología, Facultad de Salud UIS. Fecha: Marzo de 2012

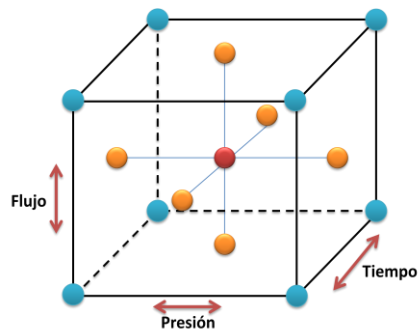
Se pudo observar la presencia de hongos, *Geotrichum sp*, Lo que representa un riesgo para la salud humana.

## ANEXO G. DISEÑO EXPERIMENTAL

**Tabla G.1.** Niveles de las variables en cada experimento.

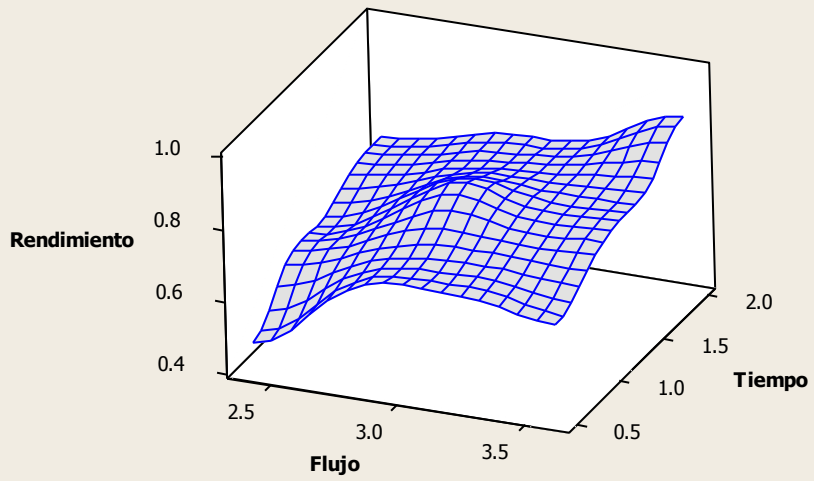
Experimento	Presión	Flujo	Tiempo
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-
9	-	0	0
10	0	-	0
11	0	0	-
12	+	0	0
13	0	+	0
14	0	0	+
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

**Figura G.2.** Representación grafica del diseño de experimentos.

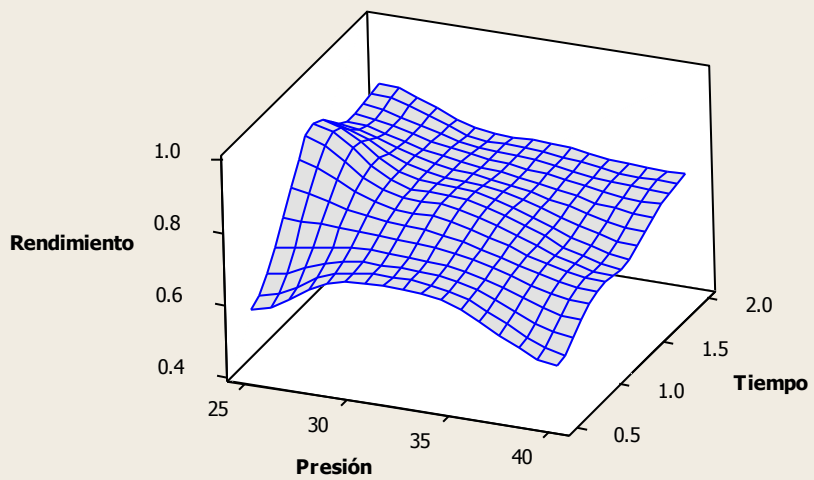


## ANEXO H. GRAFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO

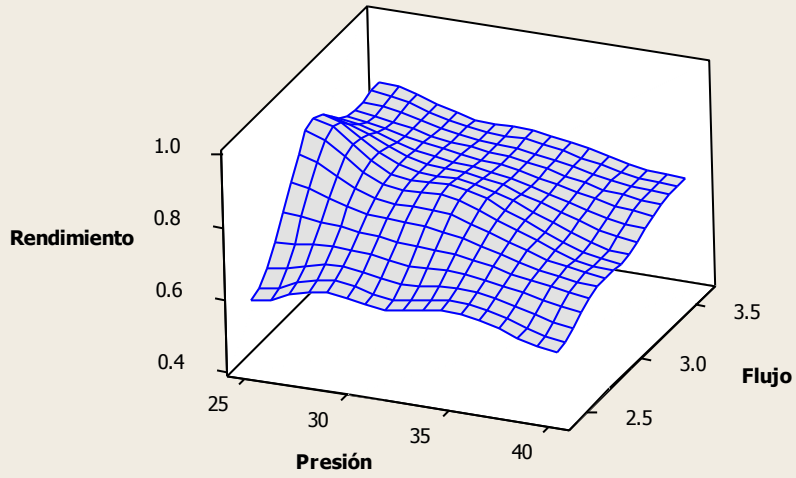
### Gráfica de superficie de Rendimiento vs. Tiempo, Flujo



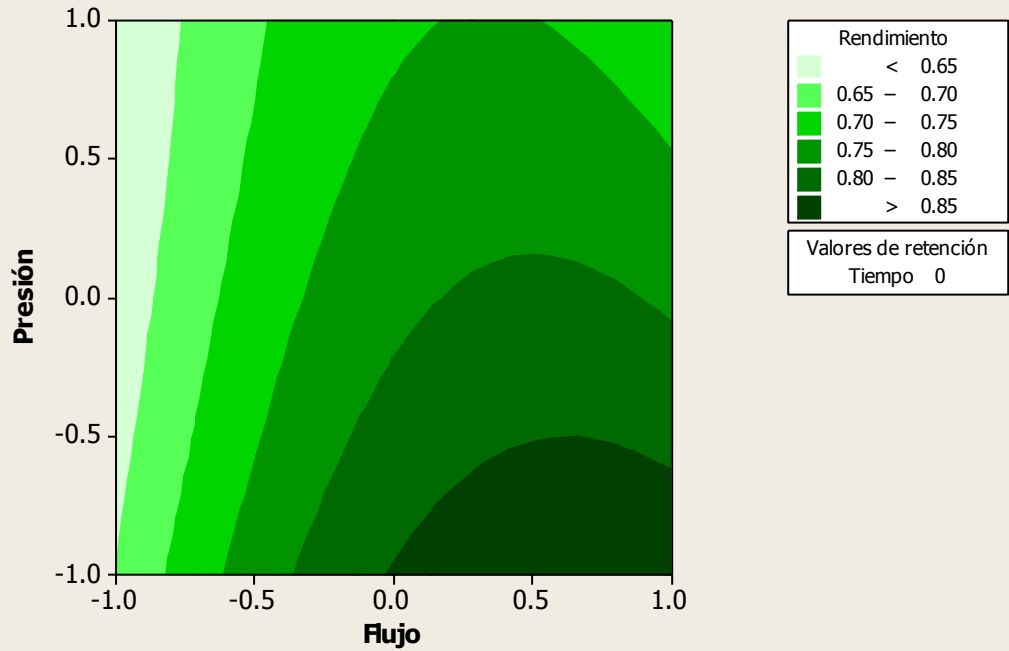
### Gráfica de superficie de Rendimiento vs. Tiempo, Presión



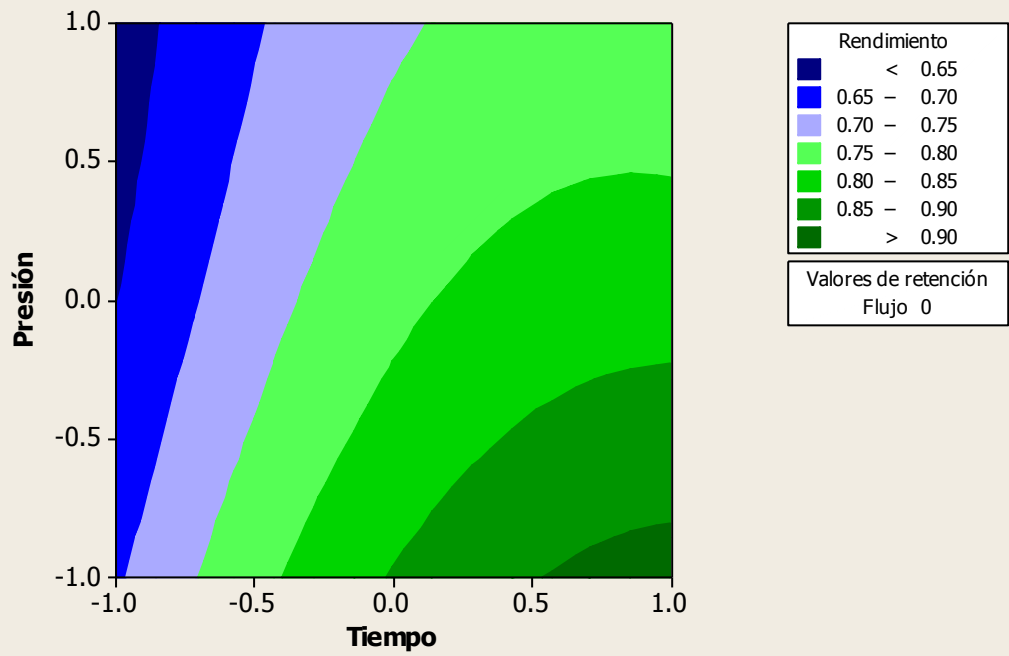
**Gráfica de superficie de Rendimiento vs. Flujo, Presión**



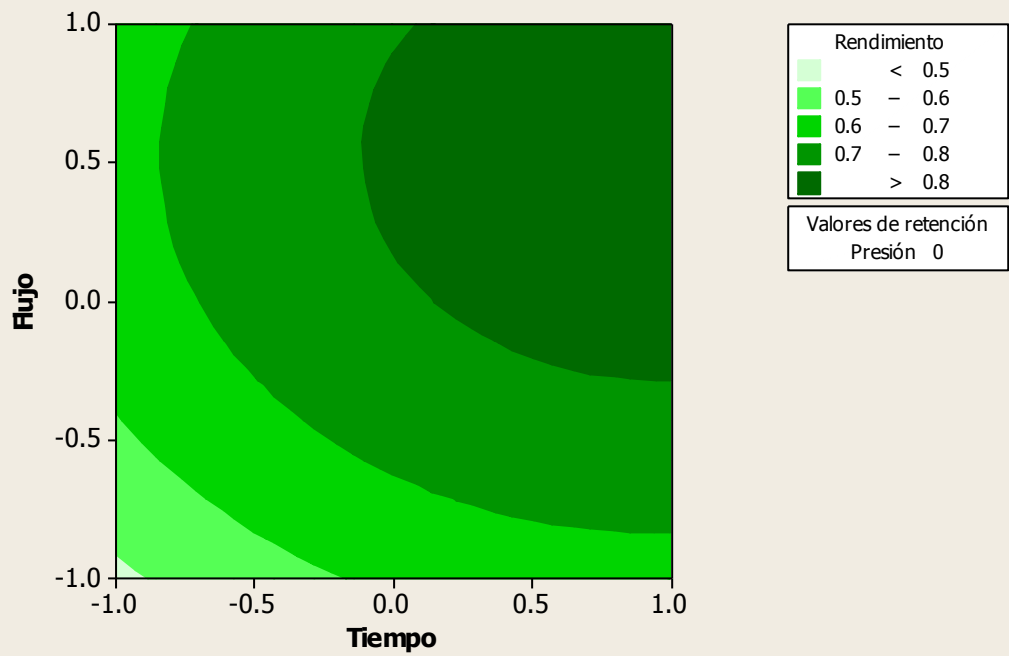
**Gráfica de contorno de Rendimiento vs. Presión, Flujo**



**Gráfica de contorno de Rendimiento vs. Presión, Tiempo**



**Gráfica de contorno de Rendimiento vs. Flujo, Tiempo**

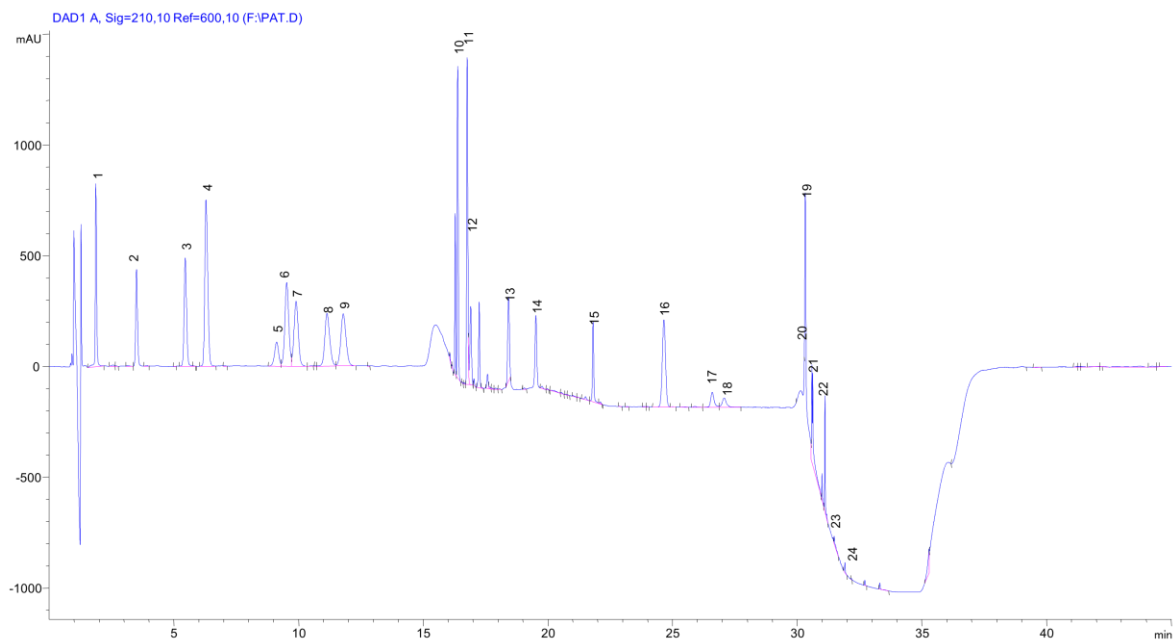


## ANEXO I. ANÁLISIS POR HPLC

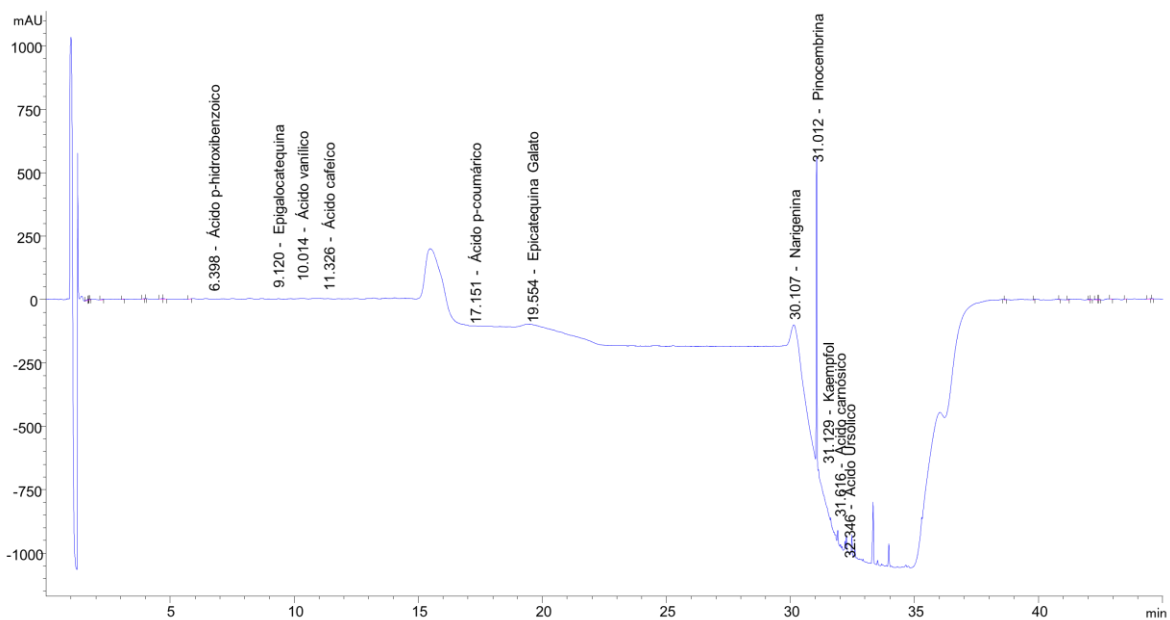
**Tabla I1.** Tiempo de retención promedio del patrón de 24 compuestos antioxidantes

# pico	Analito	Tiempo de retención
1	Ácido gálico	1,88
2	Teobramina	3,46
3	Teofilina	5,45
4	Ácido <i>p</i> -hiddroxibenzoico	6,38
5	(-)-Epigallocatequina	9,05
6	(±)-Catequina	9,60
7	Ácido vanílico	9,99
8	Ácido caféico	11,28
9	Cafeína	11,75
10	(-)-Epicatequina	16,10
11	(-)-Epigallocatequina galato	16,45
12	Ácido <i>p</i> -cumárico	16,66
13	Ácido ferúlico	18,15
14	(-)-Epicatequina galato	19,20
15	Ácido rosmarínico	21,51
16	Ácido <i>trans</i> -cinámico	24,48
17	Quercetina	26,26
18	Luteolina	26,67
19	Naringenina	30,07
20	Apigenina	30,33
21	Kaempferol	30,37
22	Pinocembrina	30,97
23	Ácido carnósico	31,48
24	Ácido ursólico	32,40

**Figura I1.** Perfil cromatográfico de los 24 compuestos antioxidantes.



**Figura I2.** Perfil cromatográfico del extracto de *Persea americana* obtenido por extracción con fluido supercrítico.



## ANEXO J. ANÁLISIS DE COSTOS

**Tabla J1.** Costos fijos para la realización de las extracciones.

<b>Equipo y herramientas</b>	<b>Costo, COP.</b>
Equipo de extracción	190'000.000
Herramientas	50.000
Adecuamiento	3'810.000
<b>Total</b>	<b>193'860.000</b>

**Tabla J2.** Costos y precio venta

<b>Concepto</b>	<b>Costo, COP.</b>
Costos fijos	193'860.000
Costos de extracción/ 1 kg	4'526.127
Salario técnico y auxiliar/ año	31'680.000
Kilogramos producidos por año	20
Mantenimiento anual	1'184.000
Ganancia anual	32'431.708
Ganancia anual + gastos totales/año	194'590'248
<b>Precio venta (kg) aprox</b>	<b>9'729.512</b>