

Obtención de aceite de aguacate con alto valor agregado para la industria de alimentos  
usando fluidos supercríticos

Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Innovación Alimentaria y  
Nutrición

Jessica Flórez Arroyave

Asesor

Ana María Restrepo Duque

Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de alimentos

Caldas-Antioquia

2017

## Contenido

|  |    |
|--|----|
| Introducción.....  | 9  |
| Justificación.....   | 11 |
| Objetivos .....  | 14 |
| Objetivo general.....  | 14 |
| Objetivos específicos.....   | 14 |
| Marco teórico .....  | 15 |
| El Aguacate Hass ( <i>Persea americana</i> Mill. cv. Hass).....          | 15 |
| Mercado del aguacate .....   | 16 |
| Composición nutricional del aguacate .....                               | 19 |
| Industrialización del aguacate para obtención de aceite .....            | 22 |
| Técnicas de extracción de aceite .....                                   | 25 |
| Extracción con solventes .....   | 26 |
| Extracción por prensado en frío .....                                    | 27 |
| Tratamiento con microondas.....  | 28 |
| Extracción por enzimas hidrolíticas.....                                 | 29 |
| Extracción subcríticas y supercríticas. ....                             | 29 |
| Metodología .....  | 33 |
| Materiales y reactivos .....   | 33 |
| Preparación de la materia prima para el proceso de extracción.....       | 33 |
| Caracterización de la materia prima previo al proceso de extracción..... | 34 |

|   |    |
|---|----|
| Análisis bromatológicos y microbiológicos .....   | 34 |
| Determinación de $\alpha$ -tocoferol.....   | 35 |
| Determinación del perfil de ácidos grasos .....   | 35 |
| Determinación de la capacidad antioxidante.....   | 36 |
| Extracción por fluidos subcríticos y supercríticos con CO <sub>2</sub> .....                    | 36 |
| Extracción de aceite de aguacate en a escala semi-industrial.....                               | 38 |
| Rendimiento total .....   | 40 |
| Eficiencia de extracción .....  | 40 |
| Caracterización de aceite obtenido a escala semi-industrial .....                               | 41 |
| Estudio de estabilidad del $\alpha$ -tocoferol en el aceite de aguacate.....                    | 41 |
| Temperatura de degradación del $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de<br>aguacate .....   | 41 |
| Degradación del $\alpha$ -tocoferol bajo luz UV presente en el aceite de<br>aguacate .....      | 42 |
| Estudio de color .....  | 42 |
| Estimación de costos de producción .....  | 43 |
| Ficha técnica .....   | 44 |
| Análisis estadístico de resultados.....   | 45 |
| Resultados y análisis.....  | 46 |
| Caracterización de la materia prima previo al proceso de extracción.....                        | 46 |
| Extracción de aceite de aguacate cv Hass .....  | 51 |
| Extracción a escala de laboratorio empleando CO <sub>2</sub> subcrítico y<br>supercrítico ..... | 51 |

|   |    |
|---|----|
| Extracción a escala semi-industrial empleando CO <sub>2</sub> supercrítico .....  | 58 |
| Caracterización de aceite de aguacate extraído por fluidos supercríticos a<br>escala semi-industrial .....  | 59 |
| Caracterización fisicoquímica, perfil de ácidos grasos y análisis<br>microbiológico .....   | 59 |
| Estudio de estabilidad de $\alpha$ -tocoferol en aceite de aguacate .....   | 66 |
| Evolución del color de aceite de aguacate en función de la temperatura<br>y luz UV a cabo de 6 horas y su comparación con aceites comerciales. .... | 73 |
| Estimación de costos .....  | 75 |
| Ficha técnica .....   | 77 |
| Conclusiones .....  | 79 |
| Perspectivas .....  | 81 |
| Referencias .....   | 82 |

## Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Producción de los 5 principales productores.....   | 18 |
| Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de aceite de aguacate y aceite de oliva. ....  | 24 |
| Tabla 3. Algunas patentes desarrolladas sobre extracción de aceites y biocompuestos<br>obtenidos por fsc.....   | 32 |
| Tabla 4. Variables independientes codificadas y naturales usadas para la generación<br>del diseño experimental. ....  | 37 |
| Tabla 5. Combinación de tratamientos para el diseño experimental.....   | 38 |
| Tabla 6. Condiciones experimentales de extracción. ....   | 40 |
| Tabla 7. Estimaciones para el análisis económico de la efsc de aceite de aguacate. ..   | 44 |
| Tabla 8. Caracterización de pulpa de aguacate hass liofilizada en base seca<br>a) análisis bromatológicos. b) perfil de ácidos grasos. c) análisis microbiológicos.                               | 47 |
| Tabla 9. Resultados del plan experimental mostrando el rendimiento y la concentración<br>de $\alpha$ -tocoferol en cada uno de las corridas de extracción.....                                    | 51 |
| Tabla 10. Análisis de varianza (porcentaje de rendimiento y concentración de $\alpha$ -<br>tocoferol).....  | 56 |
| Tabla 11. Rendimiento de aceite de aguacate a escala semi-industrial.....   | 58 |
| Tabla 12. Caracterización de aceite de aguacate extraído por FSC a escala semi-<br>industrial. a) caracterización fisicoquímica. b) perfil de ácidos grasos. c) análisis<br>microbiológicos. .... | 60 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 13. Parámetro cielab de color para aceite de aguacate efsc sometidos a diferentes condiciones de estrés: luz, uv y temperatura (ambiente, 40°C, 100°C y 180°C)..... | 73 |
| Tabla 14. Parámetro cielab de color para aceite de aguacate EFSC vs. Aceite comerciales.....  | 75 |
| Tabla 15. Estimación de costos para la efsc a escala semi-industrial a 20MPa y 60°C.  | 75 |
| Tabla 16. Ficha técnica .....   | 78 |

## Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Porción de producción por región. ....  | 17 |
| Figura 2. Participación departamental en la producción nacional de aguacate.....  | 19 |
| Figura 3. Estructura química: a) tocoferol. b) tocotrienol (elaborada con el programa acid<br>labs 6,0) .....   | 22 |
| Figura 4. Interés por el aceite de aguacate en un período de tiempo determinado. ....   | 25 |
| Figura 5. Diagrama de fases.....  | 30 |
| Figura 6. Esquema del equipo fluidos supercríticos utilizado a escala laboratorio.....  | 37 |
| Figura 7. Superficie de respuesta que muestra el porcentaje de rendimiento y<br>concentración de $\alpha$ -tocoferol bajo la influencia de la temperatura y la presión..... | 56 |
| Figura 8. Superficie de respuesta para la desabilidad de las variables respuesta<br>(rendimiento y contenido de $\alpha$ -tocoferol).....                                   | 57 |
| Figura 9. Degradación del $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de aguacate EFSC en<br>función de temperatura y tiempo.....   | 67 |
| Figura 10. Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate EFSC en<br>función de la temperatura y el tiempo .....  | 69 |
| Figura 11. Degradación del $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de aguacate EFSC<br>sometido a radiación uv en función del tiempo .....                                | 71 |
| Figura 12. Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate EFSC<br>sometido a radiación UV en función del tiempo .....                                       | 72 |

## Resumen

El objetivo del presente trabajo de investigación, fue desarrollar un aceite con alto valor agregado a partir de aguacate Hass, usando la técnica de fluidos supercríticos. El proceso inició con la selección y caracterización de excedentes de cosecha de frutos aguacates Hass (*Persea americana* Mill. cv. "Hass") cultivados en el departamento de Antioquia, continuó con la deshidratación por liofilización, seguido de la selección de las condiciones de extracción (en términos de temperatura y presión) que permitieran optimizar las variables respuesta: porcentaje de rendimiento y concentración de vitamina E (en forma de  $\alpha$ -tocoferol), para el escalado semi-industrial a partir de las condiciones evaluadas a nivel de laboratorio. El aceite extraído por fluidos supercríticos (EFSC) fue caracterizado a través de pruebas físicas, químicas y microbiológicas para garantizar su calidad e inocuidad. Se realizó un estudio de estabilidad, analizando el comportamiento de la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y la capacidad antioxidante del aceite, sometido a calentamiento y radiación UV en función del tiempo. Los resultados encontrados permitieron establecer en el laboratorio, las mejores condiciones de presión y temperatura (20MPa y 60°C, respectivamente) a escalar semi-industrialmente, para la obtención de un aceite de aguacate con un rendimiento de extracción del 21,7%, una concentración de 1,79 mg de  $\alpha$ -tocoferol en 100 gr de aceite y una eficiencia de extracción del 50,52%. Las pruebas de estabilidad realizadas, permitieron concluir que el aceite de aguacate obtenido, es considerado un aceite de mesa para uso gourmet, no apto para procesos de freído.

## Introducción

El reto que enfrenta Colombia en la conquista de mercados internacionales y en la sustitución de importaciones de alto valor, en especial de los aceites y oleorresinas, conlleva a pensar en el aprovechamiento de la biodiversidad y de las condiciones agronómicas en diferentes regiones del país. De allí, que existan políticas públicas que incentiven la investigación, innovación y desarrollo tecnológico para enfrentar este reto.

Una de las matrices vegetales que se ha venido estudiando ampliamente en relación a la obtención de aceites con aplicación para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica ha sido el aguacate en general, reconocido no solo por sus propiedades nutricionales sino también por el potencial del fruto para la obtención de extracto etéreo (Thongchai, 2014, 36).

El aguacate es la cuarta fruta tropical más importante en el mundo y Colombia ocupa el tercer lugar en producción mundial, pero su cadena es poco tecnificada, lo que ha propiciado el aumento no solo en los volúmenes de producción, sino también en las pérdidas poscosecha que se calculan en un 30% de la producción (Márquez, Yepes, & Sanchez, 2014, 33) para los cuales se requiere encontrar alternativas de transformación.

Tradicionalmente el aceite de aguacate, ha sido extraído mediante el uso de diferentes tecnologías: prensado en frío, soxhlet, uso de enzimas hidrolíticas y centrifugación (Acosta, 2011, 27; Costagli et al., 2015, 116). Otra tecnología globalmente usada, pero que su uso y aplicación en Colombia es todavía incipiente, es la extracción por fluidos supercríticos (EFSC), reconocida por ser una tecnología de extracción limpia, con la capacidad para separar extractos con alto valor agregado, en

virtud de una de las características de la tecnología y es la de extraer selectivamente ciertos compuestos bioactivos bajo la combinación de temperatura y presión de un solvente, típicamente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Malekbala et al., 2015, 7).

Algunas aplicaciones comerciales de la EFSC en la industria alimentaria, están relacionadas con la obtención de ingredientes bioactivos como insumos para el desarrollo de productos que contribuyan a mejorar el estado de salud o prevenir riesgos de enfermedades, ya que la tecnología permite obtener fracciones ricas en vitaminas, ácidos grasos insaturados con un alto valor funcional, polifenoles, entre otros, así como el desarrollo de alimentos libres de solventes tóxicos (Solana, Rizza, & Bertucco, 2014, 79-82).

En general, la presente investigación está orientada a la obtención de un extracto rico en vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) mediante EFSC, que se pueda incorporar en diferentes productos alimentarios, de manera segura y eficaz a partir del aguacate Hass.

## **Justificación**

El aguacate Hass es una fruta exótica de gran demanda mundial por sus diversos usos, no solo culinarios sino industriales, gracias a sus características sensoriales, valor nutritivo, especial composición lipídica alcanzando hasta el 70% de su pulpa en base seca (Donetti & Terry, 2014, 6). Esta matriz vegetal es reconocida por el contenido de compuestos esenciales y bioactivos: minerales (potasio, sodio, magnesio), vitaminas (A, C, E , K1, B6), ácido fólico, niacina, riboflavina, luteína/zeaxantina, fitoesteroles, entre otros; compuestos de interés en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Dreher, Davenport, Dreher, & Davenport, 2013, 739).

Las bondades nutricionales atribuidas al fruto de aguacate, contribuyeron al incremento de la siembra de este fruto en Antioquia en los últimos años y además promovieron la formación de cadena productiva priorizada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en Colombia (Ministerio de Agricultura, 2013; Mioriente, 2014).

Así mismo, se evidencian en la cadena debilidades en las condiciones de cultivo, cosecha y poscosecha generando abundantes desechos y pérdidas que pueden deberse a factores como la cosecha inadecuada, deficiente selección, clasificación, almacenamiento y baja calidad externa de los productos, lo que conduce a una producción aislada, poco tecnificada y a grandes pérdidas en las etapas de comercialización (Márquez et al., 2014, 33).

En este sentido, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en asocio con el Consejo Nacional del Aguacate, definieron las principales demandas que se deben

atender en la cadena. Una de ellas, donde ésta investigación cobra importancia es la “validación de procesos y productos de transformación de aguacate”, donde se solicita validar procesos de extracción tanto en pulpa de aguacate, como en subproductos derivados para la producción de aceites comestibles (Siembra, 2015); reto que aún requiere de una profunda dedicación investigativa para el desarrollo de propuestas pertinentes, con alta calidad, que permitan la transferencia tecnológica y estén disponibles, con miras a dinamizar no solo el mercado nacional, sino el internacional.

Por esta razón, es necesario dar una mirada al contexto mundial y proponer opciones, especialmente en el tema de alternativas tecnológicas, que permitan dar valor agregado en relación a la obtención de aceites con características funcionales, para aplicación en alimentos a partir del fruto de aguacate, que a su vez cumplan con estándares de calidad y protejan la salud pública desde el punto de vista de inocuidad y respondan a las necesidades del consumidor actual que demanda una alimentación saludable.

Existen diferentes metodologías para la extracción de aceite, las cuales se estudian constantemente, siempre buscando el mayor rendimiento sin comprometer su calidad. El método soxhlet es utilizado como patrón de referencia frente a otros métodos, ya que este permite extraer mayor cantidad de aceite, pero su gran desventaja es el uso de disolventes orgánicos, cuestionados por su seguridad y toxicidad, debido a la residualidad en el producto final, que afecta no solo la salud sino también el medio ambiente. A lo anterior se suma, los tiempos largos de extracción que requiere dicho proceso (Luque de Castro & Priego, 2010, 2384). El prensado y el centrifugado en frío, son otras de las metodologías comúnmente utilizadas, que

permiten extraer aceite de forma rápida en un tiempo corto, pero sus rendimientos no son tan altos como los de que se logran en la extracción por soxhlet, además una buena parte del aceite se pierde fácilmente en la prensa, cuando se procesan pequeñas cantidades del material vegetal (Dos Santos, Alicieo, Pereira, Ramis, & Mendonza, 2014, 22).

Una de las metodologías globalmente usadas para la extracción selectiva de compuestos orgánicos, es la extracción por fluidos supercríticos, que se caracteriza por ser una tecnología que permite extraer compuestos sensibles al calor, fácilmente oxidables como los ácidos grasos poliinsaturados y por ser una tecnología limpia, libre de residuos tóxicos, no inflamable, de bajo costo, entre otras ventajas (Da Porto, Decorti, & Tubaro, 2012, 402). Dicha tecnología ha sido usada con éxito en extracciones de diferentes compuestos como: extracción de tocoferoles en aceite de canola (Przybylski, Lee, Kim, Lee, & Korea, 2000, 687), extracción de vitamina E de salvado de arroz (Sookwong et al., 2016, 141), extractos ricos en carotenoides a partir de pulpa de melocotón (Espinosa et al., 2014, 2), extracción de licopeno de tomates (Ciurlia, Bleve, & Rescio, 2009, 338), extracción de luteína de repollo y lechuga (Álvarez et al., 2015, 891).

En este sentido, este trabajo de investigación está orientado a la obtención de un aceite con alto valor agregado, a partir de excedentes de cosecha de aguacate Hass cultivado en Antioquia, usando fluidos supercríticos como metodología de extracción, de lo que podría ser un producto final o intermedio de uso potencial, no solo en la industria alimentaria sino también farmacéutica y cosmética.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Obtener aceite con alto valor agregado a partir de aguacate Hass, cultivado en Antioquia usando fluidos supercríticos.

### **Objetivos específicos**

- Definir las especificaciones que debe cumplir la materia prima en relación a condiciones de poscosecha y calidad en la que se debe recibir las materias primas, para iniciar el proceso con base en análisis bromatológicos y microbiológicos.
- Realizar a escala piloto la extracción por fluidos supercríticos de las fracciones de aceite de aguacate rica en vitamina E, utilizando las mejores condiciones encontradas a escala de laboratorio.
- Generar una ficha técnica para el producto obtenido, mostrando datos de interés comercial, como costo de producción, características fisicoquímicas, composición y capacidad antioxidante.

## Marco teórico

### El Aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv. Hass)

El aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) es un fruto polimórfico perteneciente a la familia Laurácea, que aparentemente se originó en una amplia zona geográfica que se extiende desde las tierras altas del este y centro de México a través de Guatemala hasta el Pacífico costa de América Central (Knight, 2013, 1; Ying, Hsun, Chien, Chu, & Ih, 2012, 2909).

Reino: Vegetal

División: *Spermatophyta*

Subdivisión: *Angiospermae*

Clase: *Dicotyledoneae*

Subclase: *Dipétala*

Orden: *Ranales*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana* Miller

El aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv. "Hass") es originario de California, patentado en 1935 por el señor Rudolph Hass, por ser un árbol que producía un fruto de excelente calidad. Actualmente, es el más cultivado a nivel mundial, abarca alrededor del 80% de los aguacates que se consumen en el mundo y genera más de 1

billón de dólares en ganancias anuales en Estados Unidos (Alarcón, Arévalo, Díaz, & Galindo, 2012, 6)

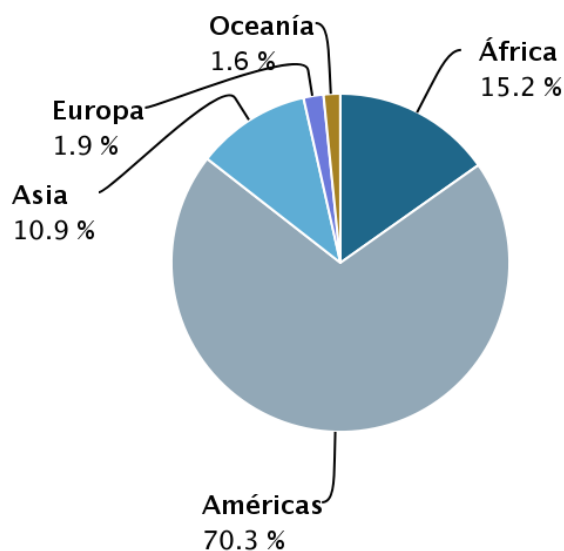
El árbol de aguacate Hass, puede alcanzar hasta los 30 m de altura, sus hojas son pedunculadas, brillantes y verde mate cuando están maduras. La primera floración se presenta alrededor del año y medio y cada árbol puede llegar a producir hasta un millón de flores de color amarillo y verde. Su fruto es una baya polimorfica-ovoide, de tamaño pequeño o mediano, con un peso que va desde 150-400 g aproximadamente y de 8-10 cm de largo, posee una sola semilla, su cáscara es rugosa y presenta un color verde oscuro cuando está en el árbol y cuando está maduro, toma un color púrpura, posee gran cantidad de pulpa carnosa y oleaginosa que puede ser verde o amarilla (Alarcón et al., 2012, 7).

### **Mercado del aguacate**

Por su calidad nutritiva, buen sabor y versatilidad culinaria, el aguacate ha ido ganando importancia dentro de la dieta de numerosos países, incrementando de forma sostenida su producción y comercialización a nivel mundial. Se estima que la producción mundial de aguacate excede los cuatro millones de toneladas por año (Ramírez et al., 2015, 58)

Colombia ocupa el tercer lugar en la producción de aguacate, con aproximadamente 300 mil toneladas anuales, siendo México el que ocupa el primer lugar con más de un millón de toneladas producidas anualmente.

**Figura 1.** Porción de producción por región (promedio 2013-2014).



Fuente: FAOSTAT 2014. Fecha de consulta: 04-09-2016

Los dos principales mercados de aguacate son Estados Unidos y Holanda, seguidos de Francia, Japón, Canadá, Reino Unido, España y Alemania, de los cuales Estados Unidos absorbe aproximadamente el 47% del consumo mundial. En cuanto a exportaciones, se establece que los mayores exportadores de aguacate son México, Chile, Perú y Sudáfrica de acuerdo a porcentaje de participación. Dicha producción incluye todas las variedades, siendo la variedad Hass la que más se produce en México y en Colombia, por ser reconocida como una de las mejores en sabor y composición (Asohofrucol, 2013, 14).

La gran diversidad de suelos y de climas le permite a Colombia lograr un rendimiento que incluso sobrepasa el de México, principal productor y exportador mundial, como lo muestra la tabla 1. Sin embargo, la falta de investigación, tecnología apropiada, subsidio al agricultor y otros factores, han impedido que se superen los

mercados internos para introducirse con fuerza en los mercados internacionales y encontrar con ello una buena fuente de ingreso de divisas al país (Ramírez R et al., 2015, 58). En la actualidad, se están realizando grandes esfuerzos por cambiar este panorama; en el primer trimestre de 2015 se alcanzaron 2.500 toneladas exportadas por un valor de US\$ 4,6 millones a la Unión Europea. Los principales países a los que Colombia exporta sus aguacates son: Holanda, Reino Unido, España y Francia (Ministerio de Agricultura, 2015).

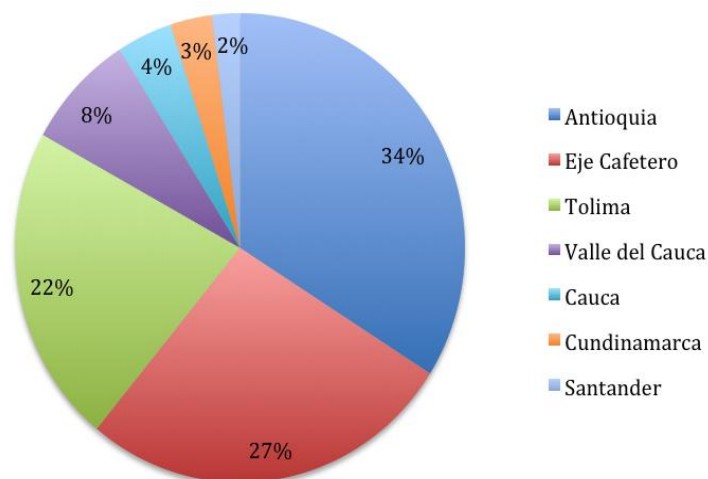
**Tabla 1.** Producción de los 5 principales productores (Promedio 2013-2014).

|          | <b>Región</b>   | <b>Producción</b> |
|----------|-----------------|-------------------|
| <b>1</b> | México          | 1,467,837         |
| <b>2</b> | Rep. Dominicana | 387,546           |
| <b>3</b> | Colombia        | 303,340           |
| <b>4</b> | Perú            | 288,387           |
| <b>5</b> | Indonesia       | 276,311           |

Adaptada de: FAOSTAT 2014. Fecha de consulta: 04-09-2016

En la figura 2 puede verse que Antioquia ocupa el primer lugar en producción con el 34%, con un estimado de 7.174 hectáreas sembradas del producto nacional, es el departamento con mayor rendimiento por hectárea y es pionero en exportación.

**Figura 2.** Participación departamental en la producción nacional de aguacate.



Adaptada de: FINAGRO 2014. Fecha de consulta: 10-05-2016

Aunque las exportaciones realizadas tuvieron a Europa como destino, los cultivadores y empresarios del agro desean conquistar los mercados de Estados Unidos y Canadá. Para lograrlo, y teniendo en cuenta las altas exigencias en calidad que esto representa, el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) está trabajando en conjunto con ellos para firmar los protocolos fitosanitarios que correspondan y lograr los parámetros establecidos por dichos países (Ministerio de Agricultura, 2015).

### **Composición nutricional del aguacate**

El aguacate es un fruto mundialmente valorado y apetecido, tanto por sus valores sensoriales, como su sabor y aroma, y por su alto valor nutricional, por lo que es considerado un alimento funcional, debido a que se ha reconocido como una buena fuente de energía, vitaminas y también con atributos que contribuyen a potencializar la salud, ya que principalmente está compuesto por un alto contenido de ácidos grasos insaturados, representado principalmente por los altos niveles de ácido oleico, un ácido

grasos monoinsaturados estable, bueno para la salud que genera una baja incidencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Reddy, Moodley, & Jonnalagadda, 2012, 529).

También se le han encontrado componentes bioactivos antioxidantes, tales como vitamina E o tocoferoles que actúa como neutralizante de radicales libres. Ha sido reportado como fuente de luteína, contiene carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, folato, vitamina A entre muchos otros, que ayudan a proteger los ojos de enfermedades como cataratas (Dreher et al., 2013, 738).

Otros compuestos encontrados en este fruto son: monoterpenoides, sesquiterpenoides, triterpenoides, flavonoides, alcaloides, esteroides, los carotenoides, y derivados de alcoholes grasos de cadena larga. Numerosas bioactividades, tales como citotoxicidad, antifúngicos, antibacterianos, antivirales, óxido nítrico y la inhibición de la generación de superóxido, antioxidante, anti enfermedad cardiovascular, la inhibición de acetil-CoA carboxilasa, la inhibición de lisil oxidasa, insecticidas, y la supresión de la lesión hepática (Ying et al., 2012, 2904).

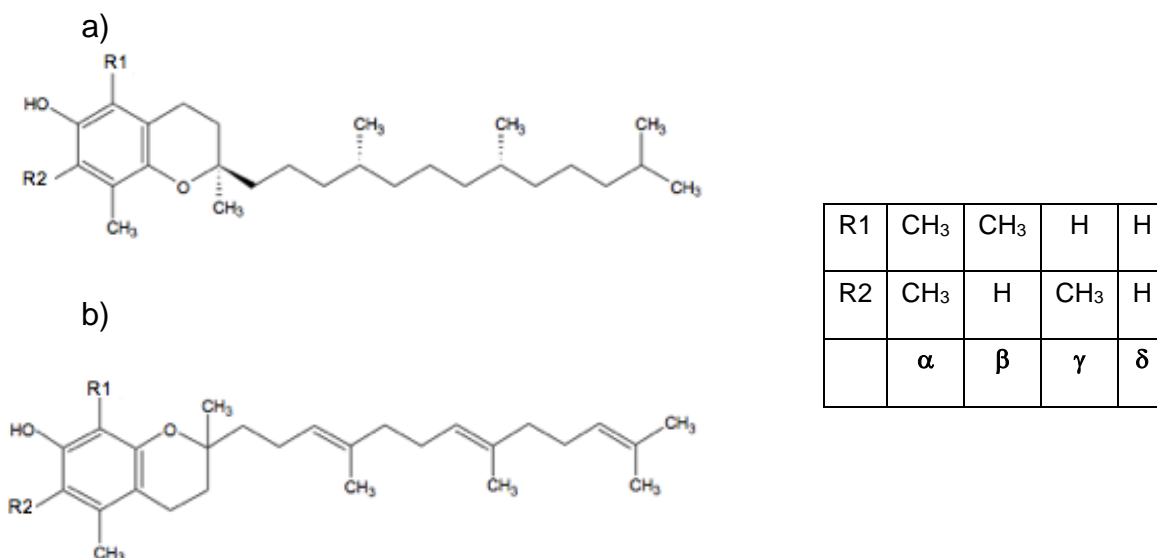
En particular la vitamina E es uno de los compuestos bioactivos que ha llamado la atención de los investigadores y fabricantes de alimentos (Hategekimana, Chamba, Shoemaker, Majeed, & Zhong, 2015, 3), no solo por su valor nutricional sino también por sus propiedades antioxidantes, la cual es importante para la estabilidad de los ácidos grasos insaturados, capaz de estabilizar los radicales libres y romper las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, evitando así la destrucción de los lípidos (Restrepo, 2008, 19; Sabliov et al., 2009, 895 ; Wang et al., 2012, 1). Gracias a sus propiedades antioxidantes, se considera que en sistemas biológicos, una molécula

de vitamina E permite proteger 10.000 moléculas de ácidos grasos insaturados (Londoño, 2012, 139). Proporciona beneficios fisiológicos, como la prevención del daño oxidativo y la peroxidación lipídica en el sistemas nerviosos central y periférico, ayudando en las enfermedades cardiovasculares. La absorción intestinal de  $\alpha$ -tocoferol requiere de la formación de micelas que contienen lípidos de la dieta y la emulsión en presencia de listones biliares, por lo que la biodisponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol se ve afectada por el consumo de alimentos, la digestión de los lípidos y la formación de micelas (Ren, Young, Kim, & Lim, 2016, 589).

La vitamina E es un micronutriente esencial debido a que el organismo no puede sintetizarla y su aporte se realiza a través de la dieta en pequeñas cantidades. La vitamina E se acumula en los organismos fotosintéticos, estructuralmente está compuesto por un anillo de cromanol hidrófilo y una cadena lateral isoprenoide hidrófoba como se muestra en la figura 3 (Sabliov et al., 2009, 895). El término vitamina E es el descriptor genérico utilizado para todos los derivados de tocol y tocotrienol, al menos ocho compuestos se han identificado: cuatro tocotrienoles ( $\alpha, \beta, \gamma$  y  $\delta$ ) y cuatro tocoferoles ( $\alpha, \beta, \gamma$  y  $\delta$ ) (Wang et al., 2012, 8). El  $\alpha$ -tocoferol es la forma con la mayor actividad biológica de los tocoferoles y es la principal forma de uso comercial. Es un compuesto viscoso, de color amarillo pálido, soluble en aceites, grasas y algunos solventes orgánicos. Es altamente susceptible a la autooxidación especialmente en presencia de calor, luz y álcalis (Hategekimana et al., 2015, 199 ; Lampi et al., 2002, 4). Se ha observado que el  $\alpha$ -tocoferol se oxida al someterse a altas temperaturas a través del tiempo en condiciones atmosféricas aumentando así su degradación, pero es estable si no está en presencia de oxígeno (Sabliov et al., 2009, 896).

Existen evidencias científicas de que la vitamina E esta relacionada con la reducción de enfermedades cardiovasculares, prevención de cáncer, mejoramiento del sistema inmune, disminución de enfermedades inflamatorias entre otras (Restrepo, 2008, 19).

**Figura 3.** Estructura química: a) Tocoferol. b) Tocotrienol (elaborada con el programa ACD Labs 6,0)



### Industrialización del aguacate para obtención de aceite

Gracias a sus propiedades tanto químicas como organolépticas, el aguacate permite varias posibilidades de agrotransformación como, pulpas (frescas, refrigeradas o congeladas), bases para productos untables, aguacate en polvo, mitades congeladas, bebidas, helados y obtención de aceite (Olaeta, 2003, 749), utilizado principalmente en la industria cosmética, donde se valora por sus propiedades regeneradoras e hidratantes (Algarra, Sánchez, Esteves, & Jiménez, 2012, 797). En los últimos años se

ha incrementado su producción como aceite extra virgen para fines culinarios, teniendo un gran potencial futuro por sus propiedades (Olaeta, 2003, 752).

En especial, las grasas y los aceites son lípidos que proviene de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimento y constituyen uno de los metabolitos celulares más abundantes, con una gran cantidad de funciones y estructuras (Sims et al., 2014, 1038). Los aceites vegetales son la principal fuente de lípidos comestibles que se consumen en el mundo. Se extraen ya sea desde el endospermo de las semillas oleaginosas o desde el pericarpio de frutos oleaginosos, principalmente de palma, aceite de oliva y últimamente un aceite muy apetecido en el ambiente gourmet, es el aceite de aguacate (Ozdemir & Topuz, 2004, 79). La mayoría de los lípidos pertenecen a una de tres clases principales: glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides (Boudière et al., 2014, 470; García, Coant, Truman, Snider, & Hannun, 2014, 773). Los lípidos son fuente de energía (9.5 Kcal/g), son de gran importancia en las membranas celulares y subcelulares, funcionan como transporte en la absorción de las vitaminas liposolubles, son fuente importante de ácidos grasos que constituyen el mayor interés nutritivo, juegan un papel importante en el soporte de órganos vitales, son fuentes de esteroides esenciales, etc. (FAO, 2013). Es necesario tener en cuenta las dosis diarias recomendadas de ingesta de ácidos grasos, ya que un exceso o falta de estos puede traer grandes problemas de salud, como enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y cáncer (Ascherio, 2002, 10).

Los lípidos son compuestos que contienen de uno a tres ácidos grasos. El aceite de aguacate está constituido por triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos, de los cuales un fruto maduro está constituido en un 85% aproximadamente por triglicéridos.

Generalmente, la fracción de aceite puede alcanzar hasta 70% de la materia seca, que se compone principalmente de ácido oleico (de 50% a 60% del contenido de ácido graso), ácido palmítico y (15-20%), palmitoleico (6-10%), linoleico (11-15%) y ácido linolénico (1%) (Donetti & Terry, 2014, 90; Salgado & Gómez, 2012, 139). El contenido de ácidos grasos de un fruto es afectado por múltiples factores como la variedad, la posición del fruto en el árbol, ubicación dentro del fruto, grado de madurez, prácticas culturales, condiciones ambientales y manejo poscosecha (Romero, 2012, 84).

La pulpa de aguacate Hass reporta mayor contenido de aceite (31,1%) comparada con variedades como Fuerte (30,3%), Gloria (25,5%), Barker (13,9%), Victoria (9,9%), Fortuna (5,9%), por mencionar algunas (Reddy et al., 2012, 532, Joao Shojiro Tango, Cássia Regina Limonta Carvalho, 2004, 19), el cual le confiere propiedades sensoriales y nutritivas especiales, de allí que sea el preferido por los consumidores a nivel mundial. Dicha propiedad ha hecho que la pulpa de aguacate se utilice para producir aceite comercial, el cual compite con el aceite de oliva ya que los dos son extraídos de la pulpa de la fruta y contienen una composición de ácidos grasos semejantes como se muestra en la tabla 2 (Mooz, Gaiano, Shimano, Amancio, & Spoto, 2012, 275).

**Tabla 2.** Perfil de ácidos grasos de aceite de aguacate y aceite de oliva.

| <b>Aceite</b> | <b>% Ácido Palmítico (16:0)</b> | <b>% Ácido Palmitoleico (16:1 ω9)</b> | <b>% Ácido Esteárico (18:0)</b> | <b>% Ácido Oléico (18:1 ω9)</b> | <b>% Ácido Linoléico (18:2 ω9,12)</b> |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Aguacate      | 16-25                           | 4-6                                   | 0,1-1,5                         | 58-68                           | 7-13                                  |
| Oliva         | 11-19                           | 1-3,5                                 | 1,5-3,5                         | 61-71                           | 11-17                                 |

(Tango et al., 2004, 21)

Por su calidad nutritiva, buen sabor y versatilidad culinaria, el aceite de aguacate ha ido ganando importancia dentro de la dieta de algunos países, incrementando de forma sostenida su producción y comercialización a nivel mundial.

En la figura 4 se observa la creciente búsqueda a través de los años, sobre el aceite de aguacate, ubicando a Nueva Zelanda como uno de los países que mas búsquedas hace sobre este aceite. Aproximadamente el 65% de las búsquedas a nivel mundial se hace acerca de los beneficios del aceite de aguacate (google trends).

**Figura 4.** Interés por el aceite de aguacate en un período de tiempo determinado.



Fuente: Google trends. Fecha de consulta: 15-05-2016

### Técnicas de extracción de aceite

Los principales métodos de extracción empleados en la obtención de aceite de aguacate han sido: extracción con solventes y prensado en frío, pero a través del tiempo se han ido desarrollando e investigando varias técnicas de extracción de aceite

de aguacate como la aplicación de enzimas, extracción asistida por microondas, y extracción por fluidos supercríticos.

### **Extracción con solventes**

Este método es conocido como el método clásico, utilizado mundialmente para la extracción de aceites y algunos compuestos en general de diferentes matrices como plantas, sedimentos, suelos, polímeros, bacterias, hongos, algas, etc. Es una técnica continua con la cual se puede aumentar el rendimiento al realizarse varias extracciones simultáneas en paralelo, también es una tecnología sencilla que requiere poco entrenamiento y se puede extraer mayor cantidad de muestra que la mayoría de métodos de extracción utilizados. Sus desventajas en comparación con otras técnicas, son los largos tiempos necesarios para la extracción, las grandes cantidades de solventes (hexano, éter, cloroformo, acetonitrilo, benceno y etanol), que a parte de ser un inconveniente a nivel económico, acarrea peligros ambientales y de salud, ya que algunos solventes son tóxicos para los humanos. Por lo general, el proceso se lleva a cabo en el punto de ebullición del solvente por largo tiempo, lo que puede descomponer compuestos termolábiles. Esta técnica con sus pro y sus contras se ha utilizado como una tecnología comparativa para el mejoramiento y desarrollo de otras técnicas (Gil et al., 2013, 8; Luque & Priego, 2010, 2384).

Cuando se emplea esta técnica de extracción en aceites comestibles se debe aplicar un proceso de purificación mediante el uso de métodos de desgomado, neutralización, blanqueo y desodorización para producir la uniformidad en el aceite de forma física o química, con el fin de separar componentes que no son de interés considerados como impurezas, pero en medio de estos proceso también se pierden

compuestos de interés, es por esto que algunos aceites comerciales se le adicionan compuestos como antioxidantes al final del proceso (Febrianto & Yang, 2011, 317) .

Algunos reportes de la cuantificación de aceite de aguacate usando solventes orgánicos, se mencionan a continuación: Reddy y otros (Reddy et al., 2012, 531) encontraron que la técnica de extracción por solvente fue la más reproducible con un con una extracción del 64.76% de aceite de aguacate Hass al compararla con otras técnicas, sin encontrarse una diferencia significativa en contenido de ácidos grasos monoinsaturados de 61.76% respecto a otros métodos. Por su parte, Dos Santos y otros (Dos Santos et al., 2014, 22) obtuvieron un 57% en la extracción de aceite de aguacate Fuerte liofilizado pero observaron una disminución en la concentración del  $\alpha$ -tocoferol al compararse con otros métodos como el prensado en frío.

### **Extracción por prensado en frío**

Este método es ampliamente utilizado en la extracción de aceite comestible por ser un método libre del uso de solventes, que además confiere mayor calidad al extraerse sin aplicar calor, son considerados aceites especiales y esto se ve reflejado en su precio de venta al ser superior. El aceite extraído por prensado en frío se conserva por mayor tiempo debido a la presencia de antioxidantes y otras moléculas que estabilizan el aceite con respecto a la auto-oxidación, ya que este método aparte de los valiosos ácidos grasos insaturados, permite extraer antioxidantes naturales como tocoferoles y compuestos fenólicos, otra de sus ventajas es que no necesita procesos de refinación (Madawala, Kochhar, & Dutta, 2012, 143; Prescha & Grajzer, 2014, 1291). Esta técnica de extracción toma menos tiempo que la extracción con solvente, pero una de sus desventajas es que su rendimiento de extracción es menor,

porque cantidades del material de extracción se quedan adheridas en algunas partes de la prensa (Dos Santos et al., 2014, 22).

Algunos reportes de la cuantificación de aceite de aguacate usando extracción por prensado en frío, se mencionan a continuación: Dos Santos y otros (Dos Santos et al., 2014, 22) obtuvieron un 32,21% en la extracción de aceite de aguacate Fuerte liofilizado pero observaron una mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol al compararse con otros métodos como la extracción con solvente. Serpa y otros (Serpa et al., 2014, 117) reportaron rendimientos de 55,53 % en la extracción de aceite de aguacate Hass liofilizado, cuyas propiedades determinantes en la calidad del aceite (índice de saponificación, índice de refracción e índice de acidez) cumplía con los rangos establecidos por las Normas Técnicas Colombianas.

### **Tratamiento con microondas**

El tratamiento con microondas es una tecnología de extracción asistida, que se ha desarrollado con el fin de extraer compuestos bioactivos de interés industrial (Chen, Hu, Yao, & Liang, 2016, 586). Esta es una técnica que combina el calentamiento con microondas, destilación seca a presión atmosférica para el aislamiento y la concentración de los aceites esenciales en materiales vegetales frescos (Bayramoglu, Sahin, & Sumnu, 2008, 535). Esta tecnología se caracteriza por el poco uso de solventes, altos rendimientos y corto tiempo extracción, de allí que su estudio, desarrollo y aplicación se haya desarrollado en los últimos años (Farhadpour et al., 2016,5).

Reddy y otros (Reddy, Moodley, & Jonnalagadda, 2012, 533) reportaron el mayor porcentaje de rendimiento en extracción de aceite de aguacate Hass del 69.94%, al compararla con el método soxhlet.

### **Extracción por enzimas hidrolíticas**

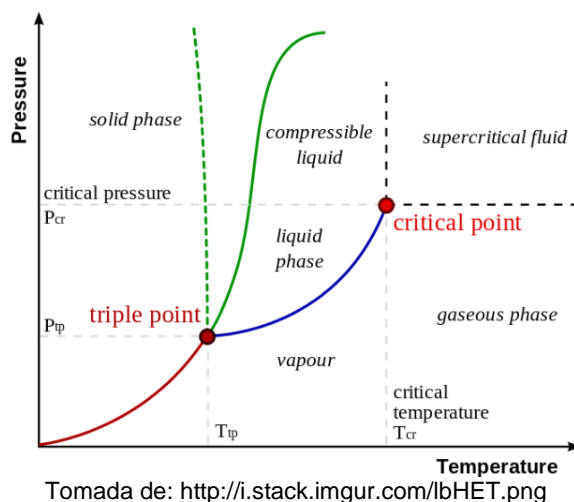
Las enzimas son compuestos proteicos extraídos de las células. Éstas aceleran una determinada reacción de manera selectiva (Buelvas, Patiño, & Cano, 2012, 140). La extracción enzimática de aceite es una tecnología emergente para la industria de grasas y aceites, puede disminuir los costos de inversión y requerimientos de energía, además, permite la recuperación simultánea de aceite y proteína de la mayoría de las semillas oleaginosas (Acosta, 2011, 31).

Buelvas y otros (Buelvas et al., 2012, 144) obtuvieron un rendimiento de extracción de aceite de aguacate del 60%. Acosta (Acosta, 2011, 58) por su parte reportó una obtención de un 80% de aceite de aguacate Hass.

### **Extracción subcríticas y supercríticas.**

Es una de las metodologías globalmente usadas para la extracción selectiva de compuestos orgánicos, se caracteriza por ser una tecnología de extracción limpia, libre de residuos tóxicos (Yen, Chiang, & Sun, 2012, 53).

**Figura 5.** Diagrama de fases.



Como se muestra en la figura 5, cuando un fluido es alterado a una presión y temperatura por encima de su punto crítico se convierte en un fluido supercrítico, en este sistema de extracción, la densidad y viscosidad de los fluidos supercríticos son inferiores a la de los líquidos, pero su difusividad es más alta, similar a la presentada por un gas. La temperatura y la presión afectan el poder de solvatación debido a sus acciones sobre la densidad del solvente. En consecuencia, el poder de solvatación puede ser modificado mediante la manipulación de la presión y de la temperatura. Como regla general, a presión constante y un aumento en la temperatura se reduce la densidad del solvente y su poder de solvatación, mientras que a temperatura constante y un aumento en la presión aumenta el poder de solvatación. Basado en esto, la solubilidad de los solutos en FSC está directamente relacionado con la densidad del solvente (Pereira & Meireles, 2010, 348). El notable interés de la comunidad científica en esta tecnología ha sido impulsado por la gran versatilidad de dióxido de carbono, cuyas propiedades se pueden ajustar con el fin de proporcionar extractos con

composiciones deseadas, mientras que al mismo tiempo es una tecnología limpia (Melo, Silvestre, & Silva, 2014, 116).

Algunas aplicaciones comerciales de la EFSC en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria están relacionadas con la obtención de ingredientes bioactivos como insumos para el desarrollo de productos, que contribuyan a mejorar el estado de salud o prevenir riesgos de enfermedades, ya que la tecnología permite obtener fracciones ricas en vitaminas, ácidos grasos insaturados con un alto valor funcional, polifenoles, entre otros; así como el desarrollo de alimentos libres de solventes tóxicos (Herrero, Cifuentes, & Ibañez, 2006, 137).

Dicha tecnología ha sido usada con éxito en extracciones de diferentes compuestos como: extractos ricos en carotenoides a partir de pulpa de melocotón (Espinosa et al., 2014, 2), extracción de tocoferoles en aceite de canola (Przybylski et al., 2000, 687), extracción de licopeno de tomates (Ciurlia et al., 2009, 2167). Además existen reportes del uso de la tecnología para la obtención de aceite de aguacate (Botha, 2004, 24; Restrepo et al., 2012,151; Reddy, Moodley, & Jonnalagadda, 2012,529). En la tabla 2 se listan algunas patentes desarrolladas sobre extracción de aceites y biocompuestos obtenidos por FSC.

**Tabla 3.** Algunas patentes desarrolladas sobre extracción de aceites y biocompuestos obtenidos por FSC.

| <b>Nombre de la patente</b>   | <b>Dirección Web</b>  |
|---|---|
| Proceso de extracción con fluidos supercríticos de semillas de Kenaf.                                 | <a href="https://www.google.com.co/patents/US8829214">https://www.google.com.co/patents/US8829214</a>   |
| Extracción con CO <sub>2</sub> Supercríticos de lípidos a partir de materiales que contienen lípidos. | <a href="https://www.google.com.co/patents/US4466923">https://www.google.com.co/patents/US4466923</a>   |
| Método de proceso para la extracción de aceite vegetal supercrítico por lixiviación.                  | <a href="https://www.google.com.co/patents/CN103602518A">https://www.google.com.co/patents/CN103602518A</a>   |
| Método de preparación de aceite vegetal.  | <a href="https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN97447380">https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN97447380</a> |
| Proceso de extracción con fluidos supercríticos para la extracción de vitamina E natural concentrada. | <a href="https://www.google.com.co/patents/CN1091106C">https://www.google.com.co/patents/CN1091106C</a>   |

Fuente: Google patents.

Otra metodología estudiada para la extracción de compuestos bioactivos es la extracción subcríticas que se ha utilizado comercialmente. Esta tecnología se caracteriza por tener los mismos beneficios del dióxido de carbono que se obtiene con la extracción supercrítica, con la ventaja adicional de requerir presiones y temperatura reducida, lo que se ve reflejado en los costos y gastos operacionales (Lai et al., 2008, 190). Aunque la solubilidad del soluto bajo estas condiciones puede verse reducida sobre todo en compuestos no volátiles o más polares, pero en algunos casos este comportamiento es preferible, al eliminar un determinado grupo de compuestos fácilmente extraíbles como los aceites esenciales. También se ha demostrado un alto poder disolvente hacia flavonas, ceras y compuestos triterpénicos (Bogdanovic et al., 2016, 3).

## Metodología

### Materiales y reactivos

Los aguacates Hass utilizados en esta investigación fueron excedentes de cosecha, suministrados por una finca productora del Retiro en el oriente de Antioquia (Colombia), ubicada a 2.200 metros sobre el nivel del mar con una temperatura media de 15°C. Estándar de  $\alpha$ -tocoferol (99.9% pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los reactivos utilizados: hexano y acetona (Merck, Darmstadt, Alemania) , metanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania), el CO<sub>2</sub> (99,9% pureza, Cryogas, Medellín, Colombia), RMCD:  $\beta$  ciclodextrina metilada, AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro, Trolox: ácido-6- hidroxí-2,5,7,8- terametilcroman-2- carboxílico y asolecitina de soya (Sigma – Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos).

### Preparación de la materia prima para el proceso de extracción.

Los aguacates Hass se seleccionaron y clasificaron de acuerdo a los parámetros establecidos por la Norma Técnica Colombia 1248. Posteriormente la pulpa de aguacate Hass fue separada de la cáscara y la semilla manualmente, y se analizó su porcentaje de extracto etéreo (AOAC 963.15 y el Manual operativo del equipo de extracción con solvente Velp científica (Serie 148/6) de 6 posiciones), humedad (AOAC 931.04), sólidos solubles (AOAC 942.33) y pH (AOAC 920.168) y los análisis microbiológicos correspondientes a la Norma Técnica Colombiana 5468 (recuento de microorganismos aerobios, recuento de coliformes, recuento de hongos, presencia de E.coli y Salmonella). Seguido de esto la pulpa se sometió a un proceso de deshidratación en un liofilizador de 80 Kg de capacidad donde se sometió a 4 horas de

ultracongelación alcanzando  $-22^{\circ}\text{C}$ , luego de esto se despresurizó el equipo llevándolo a una presión cercana a cero y se inició el proceso de liofilización por 18 horas donde la pasta de aguacate pasó de  $-22^{\circ}\text{C}$  a  $55^{\circ}\text{C}$ . El producto final se obtuvo con aproximadamente 4% de humedad (AOAC 931.04). Las muestras fueron almacenadas en bolsas de polipropileno de alta densidad de 1 Kg de muestra deshidratada en un cuarto oscuro a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 40% hasta el momento del análisis. La pulpa liofilizada, material de partida para el proceso de extracción, fue caracterizada en términos de análisis bromatológicos y microbiológicos tal como se describe a continuación.

## **Caracterización de la materia prima previo al proceso de extracción**

### **Análisis bromatológicos y microbiológicos**

Con el fin de contar con un material liofilizado plenamente caracterizado, en especial por su contenido de compuestos bioactivos, se realizaron los análisis bromatológicos y microbiológicos, por los métodos oficiales de análisis de la AOAC internacional (AOAC, 2007): porcentaje de humedad (AOAC 931.04), cenizas (AOAC 972.15), contenido de grasa (AOAC 963.15 y el Manual operativo del equipo de extracción con solvente Velp científica (Serie 148/6) de 6 posiciones), fibra total (AOAC 920.168), proteína (AOAC 954.01). Se realizaron los siguientes análisis microbiológicos: Mesófilos (NTC 4519); Coliformes totales (NTC4458); Mohos y levaduras (NTC 4132); Salmonella (NTC 4574); E. coli (NTC4458).

De igual manera se realizó el análisis de composición química respecto a el contenido de  $\alpha$ -tocoferol, perfil de ácidos grasos y la capacidad antioxidante, según los métodos reportados en la AOAC y protocolos del Laboratorio de Trazabilidad y

Residualidad de la Corporación Universitaria Lasallista. Todos los análisis se realizaron por triplicado:

### **Determinación de $\alpha$ -tocoferol**

La cuantificación del  $\alpha$ -tocoferol presente en el aguacate liofilizado, se realizó mediante cromatografía líquida HPLC-DAD en un equipo Thermo UltiMate TM 3000 (Dionex, Thermo Scientific, Estados Unidos), usando metanol como fase móvil, una columna RP-18 4.6 mm  $\times$  250 mm (Thermo Scientific, Estados Unidos) como fase estacionaria y un detector UV-Vis a 293 nm. La preparación de la muestra se realizó tomando aproximadamente 250 mg de muestra y adicionando 2,5 mL de metanol grado analítico, se llevó al vórtex por 2 minutos a 3000 rpm, luego de esto las muestras se llevaron a una centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm, por último se tomó el sobrenadante y se llevó a un vial cromatográfico y se inyectó 10  $\mu$ l de la muestra.

### **Determinación del perfil de ácidos grasos**

Los ácidos grasos fueron derivatizados y analizaron por cromatografía de gases acoplado a masas GC/FID (Agilent 7890B, EE.UU ). 1  $\mu$ L de la muestra se inyectó en el equipo operado con una relación de división de 01:30, y la separación se llevó a cabo en una columna capilar ZB5 35 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0,25  $\mu$ m (Zebron-Phenomenex, EE.UU.), utilizando helio como el gas portador. La temperatura del horno se fijó en 130°C y se mantuvo durante 2 min, seguido de un gradiente de temperatura de 10°C / min hasta 200°C, y se mantuvo durante 3 min, seguido de un segundo gradiente de temperatura de 5°C/min hasta 240°C, y se mantuvo durante 3 min. El tercer gradiente de temperatura fue de 12°C/min hasta 300°C y se mantuvo 1 minuto. La temperatura del

inyector se fijo en 290°C, el flujo de gas fue de 1ml/min. La detección se realizó en modo scan con un rango de 45 a 500 amu, con un threshold de 150. La temperatura de la línea de transferencia fue de 300°C, , rango de scan, Temperatura de la fuente MS fue 230°C, y la temperatura del MS Quad fue de 150°C.

### **Determinación de la capacidad antioxidante**

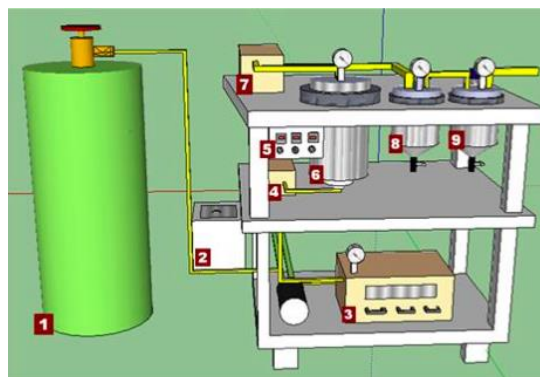
La determinación de la capacidad antioxidante del material vegetal liofilizado, se llevó a cabo mediante un ensayo fluorométrico ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno). Se utilizó una microplaca costar UV de 96 pozos, adicionando 150 µl de fluoresceína a cada pozo, 25 µl de deciclodextrina sólo a los pozos correspondientes al blanco, 25 µl de dilución respectiva de trolox (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM), y 25 µl de las muestras de aceite previamente diluidas en acetona y luego en ciclodextrina. Posteriormente, se pre incubó durante 30 minutos a 37 ° C y un de pH 7,4 en el espectrofluorometro Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Se adicionó también una solución de 25µl de AAPH (2, 2'-azobis (2-amidino-propano) diclorohidrato en tampón fosfato, y se midió la intensidad de fluorescencia cada 2 minutos durante 2 horas. Dicho estudio se realizó por triplicado durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente. Los resultados finales se reportaron como micro moles de equivalentes Trolox por gramo de muestra (µLmolTE/g).

### **Extracción por fluidos subcriticos y supercríticos con CO<sub>2</sub>**

Las extracciones se llevaron a cabo en equipo de fluidos supercríticos a escala laboratorio Thar-P200 (Thar Process, Inc. Pittsburgh, PA, Estados Unidos), equipado

con un tanque extractor de un litro de capacidad, dos separadores de 500 mL cada uno y un software ICM. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

**Figura 6.** Esquema del equipo fluidos supercríticos utilizado a escala laboratorio.



(1) Tanque de CO<sub>2</sub> (2) sistema de enfriamiento (3) bomba (4) precalentador (5) panel de control de calentamiento para el extractor, separador 1 y 2 (6) extractor (7) controlador de presión (8) separador 1 (9) separador 2. (Elaborada por Sara Hincapié integrante del grupo de investigación GRIAL)

Para optimizar las variables se generó un diseño factorial  $2^2$  con réplica al centro, los niveles de las variables de proceso (temperatura y presión), se muestran en la tabla 3. Se precisó este diseño, pues permite optimizar los factores, maximizando la cantidad de información que puede ser obtenida con un menor número de experimentos individuales.

**Tabla 4.** Variables independientes codificadas y naturales usadas para la generación del diseño experimental.

| Variables independientes           | Variable Codificada |   |   | Variable Natural |    |    |
|------------------------------------|---------------------|---|---|------------------|----|----|
| Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) | -1                  | 0 | 1 | 20               | 40 | 60 |
| Presión (MPa)                      | -1                  | 0 | 1 | 20               | 30 | 40 |

El diseño se conformó con una porción factorial conformada por  $2^k=2^2=4$  tratamientos, los que constituyen todas las combinaciones posibles de los niveles de las variables, una porción central, constituida por 2 réplicas conformadas por el punto medio entre el nivel bajo y alto de cada variable de proceso. Por lo anterior, el número de experimentos es  $2^2 + 2$  réplicas al centro para un total de 6 corridas, utilizando como variables respuesta el porcentaje de rendimiento de extracto y el contenido de vitamina E, véase tabla 5.

**Tabla 5.** Combinación de tratamientos para el diseño experimental.

| <b>N° Extracción</b> | <b>Temperatura °C</b> | <b>Presión MPa</b> |
|----------------------|-----------------------|--------------------|
| 1                    | 20                    | 20                 |
| 2                    | 60                    | 20                 |
| 3                    | 40                    | 30                 |
| 4                    | 40                    | 30                 |
| 5                    | 20                    | 40                 |
| 6                    | 60                    | 40                 |

Se empleó el programa Statgraphics versión 16 para el análisis de los datos. Para optimizar la variable respuesta se utilizó la metodología de la pendiente ascendente, técnica de optimización que tiene como objetivo encontrar el y/o los puntos que maximizan o minimizan la ecuación de superficie de respuesta.

### **Extracción de aceite de aguacate en a escala semi-industrial**

Una vez encontrada las mejores condiciones de extracción, se escaló el proceso en un equipo semi-industrial fabricado en China por la empresa Guangzhou Weiya Economic Training Co Ltda, equipado con dos extractores de 12 L de capacidad cada uno, aptos para funcionar en serie o simultáneos y dos separadores de 6 L cada uno.

Aunque se han propuesto diferentes métodos de escalado de extracción por

fluidos supercríticos: solubilidad como límite para la extracción, difusividad como límite para la extracción, solubilidad y difusividad limitantes de la extracción, relación con números adimensionales, relación de flujos etc, no se ha llegado a un parámetro unificado debido a que un proceso de extracción mediante un fluido en estado supercrítico, depende notablemente del material a extraer, haciendo que la solubilidad, difusividad y otras variables geométricas, sean específicamente el parámetro adecuado de escalado para cada proceso (Prado et al., 2012, 249). Se espera que para lograr un proceso de escalado apropiado, inicialmente se seleccionen las mejores condiciones, la selección de tiempos de extracción preferiblemente desde el rendimiento vs. curvas de tiempo, y el modelado de las mismas curvas.

Para el proceso de escalado, se eligió un criterio de relación de flujos (S/F) propuesto por Prado y otros (Prado, Prado, & Meireles, 2011, 232) en un escalado de la extracción de semillas de uva obteniendo en un escala 17 veces mayor. Paula y otros (Paula et al., 2016, 220) también trabajaron este criterio en el proceso de escalado EFSC para residuos de clavos de olor y para caña de azúcar, logrando una escala 15 veces mayor. Este método consiste en mantener igual la relación entre el flujo del solvente (S) y el flujo del material (F) a extraer, para mantener esta relación se puede variar en el equipo piloto el tiempo de extracción o el flujo del solvente.

*Ecuación 1*

$$\frac{\text{Flujo del solvente extractor (S)}}{\text{Flujo del material a extraer (F)}}$$

**Tabla 6.** Condiciones experimentales de extracción.

| <b>Condición</b>                | <b>Extracción<br/>laboratorio</b> | <b>Extracción semi-<br/>industrial</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| Temperatura de extracción (°C)  | 60                                | 60                                     |
| Presión extracción (MPa)        | 20                                | 20                                     |
| Flujo de CO <sub>2</sub> (Kg/h) | 8,4                               | 70                                     |
| Masa de materia prima (kg)      | 0,14                              | 2,35                                   |
| Tiempo (minutos)                | 90                                | 181,29                                 |

**Rendimiento total**

Este rendimiento se calculó teniendo en cuenta la masa del material vegetal utilizado en cada extracción y la masa total del aceite obtenido.

*Ecuación 2*

$$\% \text{ Rendimiento total} = \frac{\text{Masa del aceite obtenido (g)}}{\text{Masa del material vegetal (g)}} * 100$$

**Eficiencia de extracción**

Esta eficiencia se calculó para el aceite obtenido en el proceso de escalado semi-industrial, teniendo en cuenta la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en aguacate liofilizado y en el aceite obtenido.

*Ecuación 3*

$$\% \text{ Eficiencia de extracción} = \frac{\text{Cantidad de } \alpha\text{-tocoferol (mg)}}{\text{Cantidad de } \alpha\text{-tocoferol en aguacate liofilizado (mg)}} * 100$$

## **Caracterización de aceite obtenido a escala semi-industrial**

La calidad del aceite extraído se realizó por los métodos oficiales de la American Oil Chemists Society (A.O.C.S, 2013): índice de saponificación (A.O.C.S. Cd 3-25); índice de yodo (A.O.C.S. Cd 1-25); índice de peróxido (A.O.C.S. Cd 8–53); índice de acidez (A.O.C.S. Ca 5a–40); gravedad específica (A.O.A.S. Cc 10a-25), punto de humo (A.O.C.S. Cc 9a-48) e índice de refracción el cual fue determinado por un refractómetro digital HI 96801 (Hanna Instruments, Alemania).

Se caracterizó el aceite de aguacate EFSC en cuanto a contenido de  $\alpha$ -tocoferol, perfil de ácidos grasos y la capacidad antioxidante, según los métodos anteriormente reportados en las páginas 37, 38 y 39, de acuerdo a la caracterización del material vegetal liofilizado.

Se caracterizó microbiológicamente el aceite de aguacate EFSC mediante los métodos: Mesófilos (NTC 4519); Coliformes totales (NTC4458); Mohos y levaduras (NTC 4132); Salmonella (NTC 4574); E. coli (NTC4458).

## **Estudio de estabilidad del $\alpha$ -tocoferol en el aceite de aguacate**

### **Temperatura de degradación del $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de aguacate**

Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología realizada por Sabliov y otros (Sabliov 2009, 896), bajo 3 condiciones de temperaturas 40°C, 100°C y 180°C y presión atmosférica. Se tomaron aproximadamente 20 g de aceite de aguacate extraído por FSC en recipientes de vidrio ámbar y se mantuvieron en un horno (Memmert GmbH). El proceso se realizó durante 6 horas, tomando aproximadamente 2 mL de

muestra cada hora. Se almacenó la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol, análisis de la capacidad antioxidante ORAC y análisis de color. Los análisis fueron realizados por duplicado.

### **Degradación del $\alpha$ -tocoferol bajo luz UV presente en el aceite de aguacate**

Muestras del aceite obtenido por FSC se distribuyeron en viales transparentes con tapa. El estudio de degradación se realizó sometiendo las muestras a radiación de lámpara UV con una longitud de onda de 365 nm, puesta a una altura de 20 cm de la muestra y con un tiempo de exposición de 6 horas, tomando muestras periódicamente desde el minuto 15 hasta los 360 minutos. Se almacenó la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol, análisis de la capacidad antioxidante y el análisis de color (Sabliov 2009, 397). Este análisis se realizó por duplicado.

### **Estudio de color**

El color de los aceites analizados se determinó con un NANOCOLOR UV / VIS Machery – Nagel usando una celda de cuarzo de 50 mm, para comparar el aceite de aguacate EFSC con aceites comerciales (Oliva, soja, mezclas, aguacate, maní,). Así mismo se realizó el análisis de color a las muestras correspondientes al estudio de estabilidad (temperatura y degradación UV) del  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de aguacate al finalizar las 6 horas del análisis. Para llevar a cabo el estudio se hizo una dilución de 1 mL de aceite de aguacate extraído por FSC aforado a 20 mL de acetona. Los parámetros de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  fueron registrados en el software CIELAB, donde  $L^*$  indica luminosidad,  $a^*$  indica cromaticidad de verde (-) a rojo (+), y  $b^*$  indica la cromaticidad de azul (-) a amarillo (+). Este análisis se realizó por duplicado.

## Estimación de costos de producción

Los costos de producción de un aceite de aguacate rico en vitamina E extraído por FSC a escala semi-industrial fueron calculados empleando la metodología presentada por Rosa y Meireles (Rosa & Meireles, 2005, 236). Los costos estimados para el análisis se presentan en la tabla 6.

### *Ecuación 4*

$$\text{COM} = 0.304\text{FCI} + 2.73 \text{COL} + 1.23(\text{CUT} + \text{CWT} + \text{CRM})$$

Dónde:

COM: costo de producción (US \$/ año)

FCI: fracción de la inversión inicial (US \$/ año)

COL: los costos laborales (US \$/ año)

CUT: costo de servicios públicos (US \$/ año)

CWT: costo de tratamiento de residuos (US \$/ año)

CRM: costo de materia prima (US \$/ año)

**Tabla 7.** Estimaciones para el análisis económico de la EFSC de aceite de aguacate.

|                |  |
|----------------|--|
| <b>General</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Periodo de trabajo: 24 h por día</li> <li>• Turno por operario: 12 h</li> <li>• Tiempo requerido por extracción: 181 minutos</li> <li>• Gasto de energía por extracción: 33,3 kWh</li> <li>• Condiciones de operación: 60°C y 20 MPa</li> <li>• Costo CO<sub>2</sub> para 24 horas de trabajo: US 97,6</li> <li>• Capacidad de aguacate liofilizado: 2,5 Kg por extracción</li> </ul> |
| <b>FCI</b>     | Se estimo un valor para el equipo es de U\$ 271000, con el cual se calculó el valor asociado al costo FCI. Dato presentado por Rocha y otros (Rocha, Novelo, & Ruiz, 2013) para un equipo de 12 L.   |
| <b>COL</b>     | Costo hora de trabajo: US 2/h  |
| <b>CUT</b>     | Costo de energía US 0.146 /kWh   |
| <b>CWT</b>     | Se consideró que los residuos de aguacate liofilizado pueden ser llevado a compostaje o utilizados en otros procesos de aprovechamiento, lo cual no genera costos.   |
| <b>CRM</b>     | Costo de aguacate liofilizado: US 2 /Kg  |

### Ficha técnica

La información resumida y de importancia comercial del aceite extraído por FSC a escala semi-industrial, se presenta en una ficha técnica en donde se presentan resultados de la composición química, características fisicoquímicas, microbiológicas, color, estabilidad del aceite a diferentes temperaturas, estabilidad a radiación UV y costos de producción. La ficha técnica fue elaborada siguiendo el formato del

laboratorio de Trazabilidad y Residualidad de la Corporación Universitaria Lasallista.

### **Análisis estadístico de resultados**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion 16 (Statpoint Technologies, Inc. Estados Unidos) y Graph Prad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. Estados Unidos). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con el fin de realizar el test de diferencias significativas, posteriormente los resultados se sometieron al pos-test de Tukey. Los valores se consideraron significativas para un valor  $P < 0,05$ .

## Resultados y análisis

### Caracterización de la materia prima previo al proceso de extracción

La caracterización de los aguacates se enmarca dentro de los parámetros estudiados en investigaciones previas realizadas al interior del Grupo de Investigación en Alimentos (GRIAL) de la Corporación Universitaria Lasallista, donde la materia prima utilizada para la extracción de ésta investigación, fue previamente analizada encontrando que los aguacates seleccionados cumplieron con lo establecido por la Norma Técnica Colombiana 1248, que especifica los requisitos mínimos de calidad, un estado de madurez fisiológica óptimo, clasificación de los aguacates en la categoría II con defectos en la forma, el color, en la epidermis y quemaduras de sol sin exceder los 6 cm<sup>2</sup> (límite permitido), peso mínimo permitido (123-125 g). La pulpa de aguacate fresca presentó un porcentaje de extracto etéreo de aproximadamente 17% en base húmeda, una humedad del 71%, aproximadamente 14,94 °Brix y un pH de 2,36. Los análisis microbiológicos realizados a la pulpa de aguacate fresca, estuvieron dentro de los límites permitidos por la norma NTC 5468, recuento de microorganismos aerobios (mesófilos < 10<sup>2</sup> UFC/g), recuento de coliformes (< 3 NMP/g), recuento de hongos (3 UFC/g) y por último se observó ausencia de E. coli y Salmonella (Restrepo et al., 2012, 155).

Los aguacates seleccionados fueron convertidos en puré y llevados a un proceso de deshidratación por liofilización tal como se mencionó en el apartado de la metodología. Los resultados de la caracterización bromatológica, perfil de ácidos grasos y análisis microbiológicos de la pulpa liofilizada se muestran a continuación:

**Tabla 8.** Caracterización de pulpa de aguacate Hass liofilizada en base seca  
a) Análisis bromatológicos. b) Perfil de ácidos grasos. c) análisis microbiológicos.

| <b>a) Análisis bromatológicos</b>                       |                                  |                                     |
|---|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Parámetro</b>  | <b>Aguacate Hass liofilizado</b> |                                     |
| Humedad %   | 3,21 ± 0,01                      |                                     |
| Extracto etéreo %                                       | 67,05 ± 0,65                     |                                     |
| Fibra total %   | 11,64 ± 0,60                     |                                     |
| Cenizas %   | 8,46 ± 0,27                      |                                     |
| Proteína %  | 5,34 ± 0,03                      |                                     |
| Capacidad antioxidante ORAC (μmol TE/g de aceite)       | 342,91 ± 0,01                    |                                     |
| Vitamina E (mg/100g)                                    | 0,25 ± 0,004                     |                                     |
| <b>b) Perfil ácidos grasos</b>                          |                                  |                                     |
| <b>Compuesto</b>  | <b>Aguacate Hass liofilizado</b> |                                     |
| Ácido palmitoleico %                                    | 10,35                            |                                     |
| Ácido palmítico %                                       | 26,93                            |                                     |
| Ácido linoleico %                                       | 1,64                             |                                     |
| Ácido oleico %  | 44,05                            |                                     |
| Ácido eláidico %  | 15,60                            |                                     |
| Ácido esteárico %                                       | 1,43                             |                                     |
| Σ saturados %   | 28,36                            |                                     |
| Σ monoinsaturados %                                     | 70,00                            |                                     |
| Σ poliinsaturados %                                     | 1,64                             |                                     |
| Relación Saturados/insaturados                          | 0.40                             |                                     |
| <b>c) Análisis microbiológico</b>                       |                                  |                                     |
| <b>Parámetro</b>  | <b>Aguacate Hass Liofilizado</b> | <b>Límites permisibles NTC 2107</b> |
| Recuento de microorganismos aerobios, mesófilos (UFC/g) | 0                                | 10 x 10 <sup>5</sup>                |
| Recuento de coliformes (NMP/g)                          | 0                                | 10 x 10 <sup>4</sup>                |
| Recuento de hongos (UFC/g)                              | 0                                | 10 x 10 <sup>4</sup>                |
| Aislamiento de Salmonella                               | Ausente                          | Ausente                             |
| Aislamiento de E. coli NMP/g                            | Ausente                          | Ausente                             |

El componente diferenciador y mayoritario en los aguacates con madurez fisiológica y comercial, es el porcentaje en extracto etéreo, pues este factor es determinante en su calidad, ya que la composición lipídica rica en sustancias bioactivas, es responsable de sus propiedades organolépticas y del valor nutritivo (Dreher et al., 2013, 739). Para esta investigación el porcentaje de extracto etéreo de la

pulpa liofilizada fue de 67,05 (0,65), valor que representa todas o algunas de las sustancias que se listan a continuación: ácido oleico monoinsaturado, ácido palmítico saturado, palmitoleico insaturado, linoleico poliinsaturado y ácido linolénico (Donetti & Terry, 2014, 90). También puede formar parte de la materia grasa, la vitamina E o tocoferoles, ampliamente conocido por sus propiedades antioxidantes, gracias a la capacidad de neutralizar radicales libres (Quiñones, Meza, Osorio, & Gallardo, 2013, 149). Así mismo pueden hacer parte del extracto etéreo carotenoides, xantofilas (luteína) y clorofila (Castañeda et al., 2015, 425). Otros componentes de naturaleza lipídica que posiblemente estén presentes en la pulpa del aguacate, son mezcla de lípidos de alta calidad: ácidos grasos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9, a los cuales se les atribuye diferentes actividades biológicas sobre el sistema cardiovascular (Ortiz, Dorantes, Galíndez, & Guzmán, 2003, 2216). A medida que madura el fruto el porcentaje de humedad disminuye, mientras aumenta el porcentaje de extracto etéreo.

Los resultados del análisis bromatológico presentados en la tabla 8-a para la pulpa de aguacate liofilizada en términos de humedad, extracto etéreo y cenizas (3,21% (0,01), 67,05% (0,65) y 8,46% (0,27) respectivamente, son similares a los reportados por Serpa y otros (Serpa et al., 2014, 117) (1,94%, 69,03% y 6,86% respectivamente), para aguacates Hass liofilizados en Antioquia. También reportaron contenidos de fibra inferior (5,31%) a los encontrados en esta investigación (11,64%) y un contenido de proteína mayor (11,7%) a los encontrados en esta investigación (5,34%) (Serpa et al., 2014, 117). Por su parte, Montoya y otros (Montoya, Martínez & Rodiles, 2012, 4) reportaron un contenido de humedad, extracto etéreo, cenizas, y proteína similares a las encontradas en esta investigación con valores de 0,1%, 60,4%,

7,1% y 3,9%. Las variaciones y similitudes pueden deberse a las condiciones agroclimáticas, de poscosecha y almacenamiento del material vegetal, así como por múltiples factores como el clima, la altura, la época de cosecha, el tratamiento poscosecha entre otros factores de interés agronómico, que afectan la composición química y nutricional del fruto (Donetti & Terry, 2014, 91). El contenido de agua se vuelve un parámetro determinante, no solo para la calidad microbiológica sino también para el proceso de extracción por fluidos subcríticos y supercríticos, ya que en la mayoría de los casos, el agua que contiene la matriz vegetal compite con el soluto para interactuar con el solvente, disminuyendo así el rendimiento en el proceso, debido a esto se recomienda un porcentaje de agua entre 4 % y 14 % (Pereira & Meireles, 2010, 347). Por otra parte, Thaer y compañía (Taher et al., 2014, 62) compararon el efecto del material liofilizado y sin liofilizar en la extracción de lípidos en microalgas por FSC, encontrando que la liofilización del material vegetal genera mayor rendimiento de extracción.

El análisis de perfil de ácidos grasos que se observa en la tabla 8-b, muestra que el principal grupo de componentes fueron los ácidos grasos monoinsaturados (70%), cuyo componente principal fue el ácido oleico (44.05%), seguido en orden decreciente por el ácido palmítico (26.93%), elaídico (15.60%), palmitoleico (10.35%) ,linoleico (1.64%) y por último el esteárico (1.43%). Romero (Romero, 2012, 100) encontró principalmente ácidos grasos insaturados (69,7%) y seguido de un 33,2% de ácidos grasos saturados, identificando 11 ácidos grasos en la pulpa de aguacate, seis de tipo insaturado (ácido oleico, linoleico, palmitoleico, vaccénico,  $\alpha$ -linolénico, elaídico y gondoico) y cinco de tipo saturado (ácido palmítico, esteárico, araquídico y mirístico),

encontrando que ácidos grasos de mayor proporción en la pulpa de aguacate fueron los ácidos oleico, seguido del palmítico, linoleico, palmitoleico y alfa-linolénico. Contenidos similares fueron reportados también por Meyer y Terry (Meyer & Terry, 2010, 1206), donde tanto en aguacates frescos en el día cero y al día 21 de estar almacenado a 5°C, se encontró principalmente alto contenido de ácido oleico seguido del palmítico, palmitoleico y linolénico. También se observa la presencia de ácido elaídico, éste es un ácido graso insaturado trans que se deriva principalmente a partir de la hidrogenación de aceites vegetales, también se encuentran naturalmente en vacas y ovejas (Sanadgol et al., 2010). Estos tienen punto de fusión más alto que su contraparte el ácido oleico. Junto con el ácido linolelaídico, el ácido elaídico son los predominantes industrialmente como una alternativa a los ácidos grasos saturados debido a su estabilidad para la manipulación y almacenamiento. El ácido elaídico ha sido reportado en aguacate Lorena, Mendez y Hass (Campos, SantaCruz, Florez, & Rodríguez, 2011, 4; Romero, 2012, 102).

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos que se observan en la tabla 8-c, no se reportan recuento de mesófilos, coliformes y hongos y no se observa presencia de Salmonella y E. coli, se pueden atribuir al método de deshidratación utilizado, ya que la humedad del aguacate liofilizado fue del 3,21% (0,01), aspecto que demuestra que el contenido de agua disponible para el crecimiento de microorganismos es limitado, favoreciendo las condiciones de materia prima inocua para el proceso de extracción de aceite (Dos Santos et al., 2014, 20). Los valores encontrados, cumplen con los límites establecidos por la normativa vigente (NTC 2107). Al tener poca presencia de agua líquida y bajas temperaturas de proceso, se

protege la estructura del aguacate al igual que sus componentes antioxidantes, evitando así la degradación de compuestos bioactivos termolábiles, como es el caso de la vitamina E. También se pueden atribuir estos resultados a las propiedades antimicrobianas que se le confieren al aguacate (Rodríguez, Morcuende, Andrade, Kylli, & Estévez, 2011, 5625).

### Extracción de aceite de aguacate cv Hass

#### Extracción a escala de laboratorio empleando CO<sub>2</sub> subcrítico y supercrítico

La temperatura y la presión son las condiciones que afectan estos procesos al influir en el comportamiento y en las propiedades que adquiere el solvente (CO<sub>2</sub>) de una manera compleja, debido a su efecto combinado sobre la densidad del solvente y la presión de vapor del soluto (Pereira & Meireles, 2010, 343).

**Tabla 9.** Resultados del plan experimental mostrando el rendimiento y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cada uno de las corridas de extracción.

| N° Extracción | Temperatura (°C) | Presión (MPa) | Rendimiento total (%) | Concentración de $\alpha$ -tocoferol (mg/100 g de aceite) |
|---------------|------------------|---------------|-----------------------|---|
| 1             | 20               | 20            | 4,28                  | 0,00 $\pm$ 0,002  |
| 2             | 60               | 20            | 2,04                  | 0,36 $\pm$ 0,002  |
| 3             | 40               | 30            | 20,17                 | 0,30 $\pm$ 0  |
| 4             | 40               | 30            | 20,16                 | 0,28 $\pm$ 0,0003   |
| 5             | 20               | 40            | 14,83                 | 0,12 $\pm$ 0,0002   |
| 6             | 60               | 40            | 39,21                 | 0,29 $\pm$ 0,002  |

De la tabla 9, se puede analizar el porcentaje de recuperación del aceite y el efecto significativo que tuvo la presión por sí misma en las condiciones subcríticas 1 y 5. Se puede observar un incremento en el rendimiento cuando la presión aumenta, esto

tiene sentido ya que se sabe que la presión incrementa la densidad de los fluidos y en algunos casos también puede aumentar la solubilidad (Polania, 2014, 22). El mismo comportamiento se observa en las condiciones supercríticas 2, 3, 4 y 6 donde se obtuvo un mayor rendimiento conforme aumentó la presión, correspondiendo el mayor rendimiento (39,21%) a la presión más alta.

Así mismo, la presión de vapor del soluto es influenciada por la temperatura, ya que un aumento de ella, aumenta la solubilidad, pero al mismo tiempo también puede tener un efecto contrario en ella al afectar la densidad del solvente (Álvarez et al., 2015, 896). De las condiciones de extracción 1 y 2 (20°C y 20 MPa; 60°C y 20 MPa, respectivamente), se observa que al mantener la presión constante y aumentar la temperatura, disminuye el rendimiento de extracción de 4,28% a 2,04%; pero por otro lado surte un efecto contrario, como se muestra en la tabla 8 para las condiciones 5 y 6 (20°C y 40 MPa; 60°C y 40 MPa, respectivamente), donde nuevamente se conserva una presión constante y se aumenta la temperatura, encontrándose para este caso, que el rendimiento de extracción aumenta de un 14,83% a 39,21%. Si se analizan las condiciones 1 y 5 (20°C y 20 MPa; 20°C y 40 MPa, respectivamente) y las condiciones 2 y 6 (60°C y 20 MPa; 60°C y 40 MPa, respectivamente), se observa el mismo comportamiento en ambos casos, donde se conservan las mismas condiciones de temperatura y se aumenta la presión, lo que trae como resultado, un incremento del rendimiento de extracción (4,28% a 14,83% y 2,04% a 39,21%, respectivamente). Este último comportamiento puede verse influenciado en este caso por la densidad del solvente, que aumenta conforme sube la presión reflejándose así en el rendimiento de extracción. El rendimiento de extracción más alto se encontró en la condición 6 (60°C y

40 MPa), esto puede ser explicado por la presión de cruce descrita Solana y otros (Solana et al., 2014, 10) en la cual sugieren que para una presión superior a 25 MPa, el efecto dominante que influye en el rendimiento, es la presión de vapor en lugar de la densidad, al relacionar el hecho de que a presiones más bajas el aumento esperado en la fugacidad de aceite con el aumento de la temperatura, es superada por la disminución de la densidad del CO<sub>2</sub> y por lo tanto disminuye su poder de solvatación (Pereira & Meireles, 2010, 347; Solana, Rizza, & Bertucco, 2014, 10). Resultados similares reportan que el rendimiento de extracción de aceite a partir hojas de olivo aumentó considerablemente con el incremento de la presión (Lucas, De, & Rinco, 2002, 76). Para la extracción de aceite de semilla de uva, se demostró también que la presión influye significativamente en el rendimiento de extracción (Passos, Silva, Da Silva, Coimbra, & Silva, 2010, 152).

Otro fenómeno evidenciado en los resultados de la extracción a escala de laboratorio, hace referencia a la influencia de la temperatura (tabla 9), para las condiciones 1 y 2 se tienen condiciones isobáricas, pero en los dos casos las condiciones de temperatura y presión no corresponden a las de un fluido supercrítico, aquí se observa una disminución en el rendimiento de extracción. En este mismo sentido, un análisis para las extracciones 5 y 6 muestran un comportamiento contrario al que debería ocurrir a condiciones isobáricas, donde la densidad del FSC se sabe que es inversamente proporcional a la temperatura, aspecto que no debería favorecer el porcentaje de rendimiento, pero que en la práctica muestra resultados diferentes. Esto podría explicarse por el contenido de ácidos grasos presentes en el material vegetal (tabla 8-c), ya que contienen mayoritariamente ácidos grasos insaturados cuyos

puntos de fusión son relativamente bajos (oleico: 13°C, palmitoleico: 1°C, linoleico: 5°C y elaídico 46°C) y los puntos de fusión de los ácidos grasos saturados están alrededor de 60°C (palmítico: 63°C y esteárico: 69°C), por lo que al aumentar la temperatura en este caso, aporta fluidez al aceite y esto se ve reflejado en el porcentaje de recuperación tan alto al conferirle mayor solubilidad al material vegetal, dado que en las grasas y aceites, los ácidos grasos que los componen, pasan de estado sólido a líquido gracias al aumento de la temperatura (Polania, 2014, 60).

El efecto que tiene la presión, es un factor determinante ya que al analizar la extracción 2 (20 MPa y 60°C), que corresponde a la temperatura más alta, pero a la presión más baja, se logra ver que en efecto se extrae aceite ya que la temperatura confiere solubilidad a los ácidos grasos al volverlos líquidos, pero debido a la presión, el CO<sub>2</sub> tiene una densidad mas baja que impide que se incremente la solubilidad.

En la tabla 9 se encontró que para el comportamiento de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, la temperatura tuvo un efecto significativo. Al analizar la condición 1 y 2 (20°C y 20 MPa; 60°C y 20 MPa, respectivamente) y las condiciones 5 y 6 (20°C y 40 MPa; 60°C y 40 MPa, respectivamente), se obtuvo que al aumentar la temperatura en los dos casos, se incrementó el contenido de  $\alpha$ -tocoferol, encontrándose valores superiores en las condiciones supercríticas 2 y 6 y en las condiciones medias 3 y 4. El mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol (0,36 mg /100 g de aceite), se encontró en la condición a la que corresponde la temperatura más alta 60°C y la presión más baja 20 MPa. Lo anterior cobra sentido si se tiene presente que la variación de la difusividad de un FSC con la temperatura y la presión aumenta con la primera y disminuye con la segunda. La difusividad de los solutos de un fluidos supercrítico es similar a la que presenta un gas,

es decir, la velocidad de transporte de las moléculas de soluto en un fluido supercrítico es alta, lo que hace que los procesos de transporte de masa desde el interior de la matriz de la muestra hacia el exterior de la misma sean rápidos (Polania, 2014, 23). Del mismo modo, un aumento de la temperatura puede elevar la presión de vapor de la Vitamina E en forma de  $\alpha$ -tocoferol, logrando como resultado una mayor concentración de éste soluto. El incremento de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol con la temperatura, es explicado por Nyam y otros (Nyam et al., 2010, 1278), quienes encontraron que las condiciones de temperatura y presión donde se obtuvo la mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol de semilla de Jamaica, fue a 80°C y 20 MPa respectivamente, por otro lado, Gracia y otros (Gracia et al., 2011, 74) encontraron que al aumentar la temperatura, disminuyó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, extraído de cáscara residual de oliva; en este caso se demostró que tanto la temperatura y la presión son estadísticamente significativas para la extracción de  $\alpha$ -tocoferol .

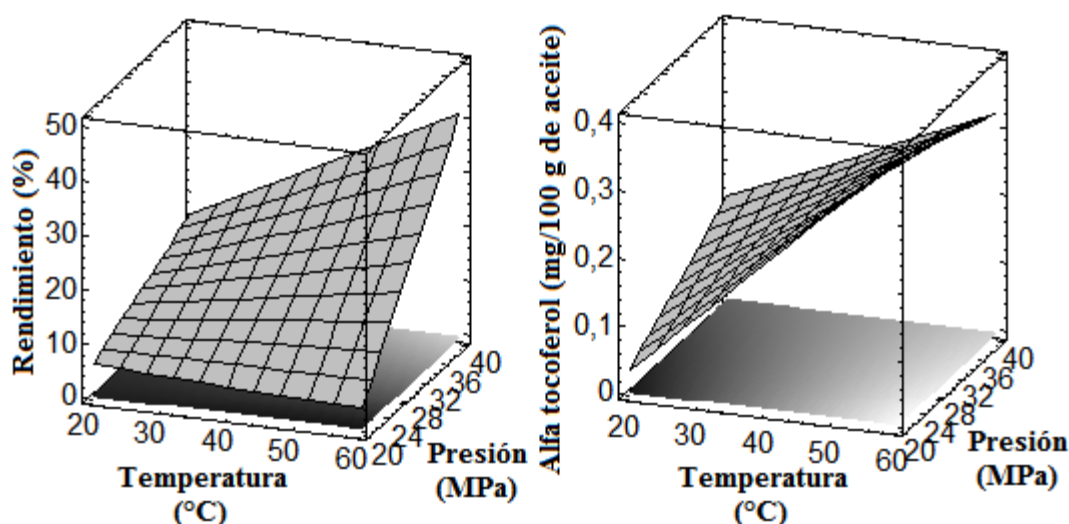
A presiones mayores de 20 MPa, la densidad del CO<sub>2</sub> tanto para las condiciones subcríticas como supercríticas generó densidades altas y al aumentar la temperatura, la capacidad disolvente disminuyó, este comportamiento lo definen Pereira y Meireles (Pereira & Meireles, 2010, 348) como la retrogradación o comportamiento retrógrado.

**Tabla 10.** Análisis de varianza (porcentaje de rendimiento y concentración de  $\alpha$ -tocoferol).

| Respuesta                            | Fuente         | S.C      | Gl | C.M       | Razón-F | Valor-P |
|--------------------------------------|----------------|----------|----|-----------|---------|---------|
| <b>Rendimiento</b>                   | A: Temperatura | 122,545  | 1  | 122,545   | 7,14    | 0,1162  |
|                                      | B: Presión     | 569,3    | 1  | 569,3     | 33,16   | 0,0289  |
|                                      | AB             | 177,156  | 1  | 177,156   | 10,32   | 0,0848  |
|                                      | Error total    | 34,3409  | 2  | 17,1704   |         |         |
|                                      | Total (corr.)  | 903,341  | 5  |           |         |         |
| <b><math>\alpha</math>-tocoferol</b> | A: Temperatura | 0,070225 | 1  | 0,070225  | 10,91   | 0,0407  |
|                                      | B: Presión     | 0,000625 | 1  | 0,000625  | 0,10    | 0,7848  |
|                                      | AB             | 0,009025 | 1  | 0,009025  | 1,40    | 0,3580  |
|                                      | Error total    | 0,012875 | 2  | 0,0064375 |         |         |
|                                      | Total (corr.)  | 0,09275  | 5  |           |         |         |

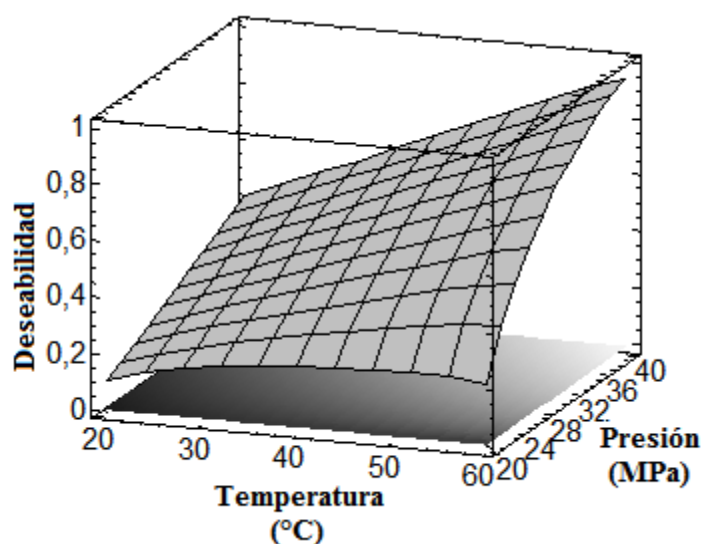
Mediante el análisis de varianza se pudo observar en las dos variables respuestas presentan diferencias significativas en uno de los factores evaluados. La presión es significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al rendimiento y para el  $\alpha$ -tocoferol se encontró que la temperatura era significativa ( $p < 0,05$ ). Las interacciones no presentaron diferencias significativas como se muestra en la tabla 10.

**Figura 7.** Superficie de respuesta que muestra el porcentaje de rendimiento y concentración de  $\alpha$ -tocoferol bajo la influencia de la temperatura y la presión.



Con la metodología de la pendiente ascendente se obtuvieron los valores de los factores que optimizan cada una de las variables respuestas (porcentaje de rendimiento total y concentración de  $\alpha$ -tocoferol). El máximo en rendimiento se presenta cuando se combina 60°C de temperatura con 40 MPa de presión y el valor que se obtiene es 39,21%. El máximo en  $\alpha$ -tocoferol se obtiene cuando se combina 60°C de temperatura con 20 MPa de presión y el valor que se obtiene es 0,36 (mg/100 g de aceite). La superficie de respuesta para cada una de las variables dependientes estudiadas, se presenta en la figura 7.

**Figura 8.** Superficie de respuesta para la desabilidad de las variables respuesta (rendimiento y contenido de  $\alpha$ -tocoferol)



Fue necesario encontrar un equilibrio entre el máximo de rendimiento y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol para el proceso. La combinación de tratamientos que generan el comportamiento antes descrito es 60°C con 40 MPa, con esta combinación de tratamientos se encuentra el punto donde el rendimiento y la concentración de  $\alpha$ -

tocoferol son máximos. La superficie que presenta este comportamiento es la que se muestra en la figura 8.

### **Extracción a escala semi-industrial empleando CO<sub>2</sub> supercrítico**

Se escaló la condición número 2 (60°C – 20 MPa), donde el tiempo de extracción a nivel de laboratorio (90 minutos) fue casi duplicado al aplicar el criterio de relación de flujos en la extracción semi-industrial (181,284 minutos), obteniendo un rendimiento de extracción en cuanto porcentaje de aceite extraído de un 21,7%, siendo 19% más que el obtenido a escala de laboratorio y una eficiencia del proceso en la extracción de alfa tocoferol en el aceite del 50,52%. Estos resultados pueden deberse a que el flujo del solvente en el proceso semi-industrial fue mucho mayor (70 Kg/h) que en la escala de laboratorio (8,4 Kg/h) (tabla 6), por lo general un flujo de solvente alto aumenta la capacidad de extracción (Pereira & Meireles, 2010, 343). Otro de los factores que pudo influir para que tanto el rendimiento como la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el aceite fueran mayores a escala semi-industrial, es la diferencia en las capacidades de ambos equipos: extractor de 1 L y un diámetro de 0,0762 m (equipo de laboratorio), comparado con dos extractores de 6 L de capacidad cada uno y un diámetro de 0,1320 m (equipo semi-industrial).

**Tabla 11.** Rendimiento de aceite de aguacate a escala semi-industrial

| <b>Característica</b>                                | <b>Resultado</b> |
|--|------------------|
| Rendimiento de aceite (%)                            | 21,7             |
| Concentración de alfa tocoferol (mg/100 g de aceite) | 1,79             |
| Eficiencia de extracción (%)                         | 50,52            |

## **Caracterización de aceite de aguacate extraído por fluidos supercríticos a escala semi-industrial**

### **Caracterización fisicoquímica, perfil de ácidos grasos y análisis microbiológico**

La caracterización fisicoquímica del extracto final presentado en la tabla 12, muestra los valores medios de las pruebas de calidad del aceite (EFSC), donde los valores de índice de acidez, índice de peróxido, índice de saponificación, índice de yodo, índice refracción y densidad, se encuentran entre los valores permitidos para la Norma Mexicana para aceite de aguacate y similares a los permitidos por la NTC 258 para aceite de oliva, indicando así, la calidad del aceite de aguacate extraído por fluidos supercríticos.

**Tabla 12.** Caracterización de aceite de aguacate extraído por FSC a escala semi-industrial. a) Caracterización fisicoquímica. b) Perfil de ácidos grasos. c) Análisis microbiológicos.

| <b>a) Caracterización fisicoquímica</b>                 |   |                            |
|---|---|----------------------------|
| <b>Propiedad</b>  | <b>Valor</b>                                    | <b>Límites permisibles</b> |
| Índice de saponificación (mgKOH/g)                      | 198,28 ± 1,02                                   | 177-198                    |
| Índice de yodo (cgl <sub>2</sub> /kg)                   | 87,13 ± 0,64                                    | 85-90                      |
| Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg)             | 4,79 ± 0,98                                     | Máximo 10                  |
| Índice de acidez ( % ácido oleico)                      | 1,46 ± 0,26                                     | Máximo 1,5                 |
| Índice de refracción a 25°C                             | 1,47 ± 0,01                                     | -                          |
| Densidad (g/mL)   | 0,94 ± 0,09                                     | -                          |
| Punto de humo (°C)                                      | 100 ± 0,00                                      | -                          |
| <b>b) Perfil ácidos grasos</b>                          |   |                            |
| <b>Compuesto</b>  | <b>Aceite de aguacate Hass</b>                  |                            |
| Ácido palmitoleico %                                    | 13,33   |                            |
| Ácido palmítico %                                       | 26,59   |                            |
| Ácido linoleico %                                       | 3,75  |                            |
| Ácido oleico %  | 44,20   |                            |
| Ácido elaídico %  | 11,24   |                            |
| Ácido esteárico %                                       | 0,90  |                            |
| ∑ saturados   | 27,49   |                            |
| ∑ monoinsaturados %                                     | 68,76   |                            |
| ∑ poliinsaturados %                                     | 3,75  |                            |
| Relación Saturados/insaturados                          | 0,38  |                            |
| <b>c) Análisis microbiológico</b>                       |   |                            |
| <b>Parámetro</b>  | <b>Aceite de aguacate Hass extraído por FSC</b> | <b>Límite permisible</b>   |
| Recuento de microorganismos aerobios, mesófilos (UFC/g) | 0   | 10 x 10 <sup>5</sup>       |
| Recuento de coliformes (NMP/g)                          | 0   | 10 x 10 <sup>4</sup>       |
| Recuento de hongos (UFC/g)                              | 0   | 10 x 10 <sup>4</sup>       |
| Aislamiento de Salmonella                               | Ausente   | Ausente                    |
| Aislamiento de E. coli NMP/g                            | Ausente   | Ausente                    |

En la tabla 12-a se observa que el valor de índice de saponificación, está en el límite superior permisible. Evaluar esta propiedad permite obtener una estimación de la duración media de la cadena de ácidos grasos, ya que los aceites están formados por

triglicéridos principalmente y cada triglicérido necesita 3 moléculas de KOH para saponificarse; este valor da la medida del peso molecular promedio de los triglicéridos, ya que si estos contienen ácidos grasos de bajo peso molecular, el número de moléculas presentes en 1 g de muestra será mayor que si los ácidos grasos son de alto peso molecular (Restrepo et al., 2012, 158). Al comparar los resultados obtenidos en ésta investigación con los reportados en la literatura, se encuentra que Bora y otros (Bora, Narain, Rocha & Queiroz, 2001, 172) reportaron un valor de 178,3 (mg KOH/g) para aceite de aguacate variedad fuerte cultivado en Brasil. Jiménez y otros (Jiménez, Aguilar, Zambrano & Kolar, 2001, 91) encontraron valores de 262 (mg KOH/g) para aceite de aguacate deshidratado por microondas y un valor de 217 (mg KOH/g) para aceite de aguacate comercial. Existen también reportes de índices de saponificación que oscilan entre 175-226 mg KOH/g para aceite de aguacate obtenido a partir de la aplicación de 3 metodologías diferentes de extracción, donde una de ellas involucró la aplicación de CO<sub>2</sub> supercrítico, encontrando un valor de 226.18 mg KOH/g de aceite extraído, superior al valor encontrado en esta investigación (Restrepo et al., 2012, 158).

El valor de índice de yodo obtenido en el aceite de aguacate EFSC fue de 87,132 cgl<sub>2</sub>/kg, el índice de yodo es directamente proporcional al grado de insaturaciones, cuanto más alto sea el índice de yodo, mayor es el grado de insaturaciones. El valor del índice de yodo del aceite de aguacate EFSC se puede ver reflejado en la relación de saturados/insaturados (0,38) en la tabla 12-b. El índice de yodo también tiene relación con los puntos de fusión de los ácidos grasos, ya que valores bajos de yodo (menos insaturaciones), indica que son extracto sólidos a temperatura ambiente y por el contrario valores altos de yodo (más insaturaciones),

indica extractos líquidos a temperatura ambiente (Hanady Abdallah, 2007, 31). También se debe tener en cuenta que a mayor presencia de ácidos grasos insaturados, hay mayor vulnerabilidad a reacciones oxidativas (De Souza, Carregari, Silva, Jorge, & Telis, 2015, 394). Jiménez y otros (Jiménez, Aguilar, Zambrano, & Kolar, 2001, 91), reportaron valores similares (87,76  $\text{cgl}_2/\text{kg}$ ) para aceite de aguacate deshidratado por microondas y un valor de 83,35 ( $\text{cgl}_2/\text{kg}$ ) para aceite de aguacate comercial. Restrepo y otros (Restrepo et al., 2012, 157), reportaron los valores de índice de yodo para aceite de aguacate extraído por fluidos supercríticos, prensado en frío y soxhlet de 90,18; 77,85, y 78,44  $\text{cgl}_2/\text{g}$ , lo que indicó una mayor proporción de insaturaciones en el aceite extraído por fluidos supercríticos.

En la tabla 12-a, se observa que el índice de peróxido fue de 4,795 ( $\text{meqO}_2/\text{kg}$ ), un valor inferior al reportado en la literatura, si se compara con los resultados obtenidos para aceite de aguacate obtenido, usando diferentes metodologías de extracción, tal como se lista a continuación: 24,06 ( $\text{meq O}_2/\text{kg}$ ) para aceite de aguacate deshidratado por microondas y 38,10 ( $\text{meq O}_2/\text{kg}$ ) para aceite de aguacate comercial (Jiménez et al., 2001, 91); 31,66  $\text{meq O}_2/\text{kg}$ , 22,86  $\text{meq O}_2/\text{kg}$  y 16,87  $\text{meq O}_2/\text{kg}$  para aceite de aguacate extraído con hexano, prensado en frío y fluidos supercríticos respectivamente. El valor de índice de peróxido obtenido en esta investigación fue similar al reportado por Castañeda y otros (Castañeda et al., 2015, 424), donde los índices de peróxido para el aceite de aguacate extraído por el método de centrifugación y solvente de los aguacates Hass y Criollo fue de  $5.2600 \pm 0.13535 \text{ meqO}_2/\text{kg}$  y de  $3.6667 \pm 0.2139 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ , respectivamente. El valor obtenido en esta investigación puede ser un indicativo de que en el aceite extraído, los peróxidos, se encuentran en

pequeñas cantidades, resultado favorable ya que dichos compuestos, son los principales productos de degradación primaria de la auto-oxidación, causante de la aparición de olores y sabores indeseables por formación de aldehídos, alcoholes y cetonas causadas por los hidroperóxidos y peróxidos (De Souza et al., 2015, 393). Lo anterior puede explicarse por el principio de operación del proceso de deshidratación de la pulpa de aguacate, que usó la liofilización para retirar agua, hasta lograr una humedad en la pulpa de 3,21%. Así mismo, el valor de índice de peróxido calculado, puede ser un indicador de que la temperatura usada en el proceso de escalado semi-industrial para la extracción por fluidos supercríticos, no causó productos de degradación oxidativa en gran proporción. Restrepo y otros (Restrepo et al., 2012, 157), reportaron los valores de índice de peróxido para aceite de aguacate extraído por fluidos supercríticos, prensado en frío y soxhlet de 16,87; 22,86, y 31,66 meq O<sub>2</sub>/ Kg, lo que indicó una mayor índice de oxidación superando los límites permitidos.

El análisis del índice de acidez se encuentra entre los límites permisibles con un valor de 1,463. Este valor puede deberse a que la materia prima fue previamente liofilizada evitando así el incremento de temperatura y debido a las condiciones de extracción aceite, evitando el incremento de su acidez. Jiménez y otros (Jiménez et al., 2001, 91) reportaron valores de 1.13 para aceite de aguacate deshidratado por microondas y un valor de 2.98 para aceite de aguacate comercial. El índice de acidez para el aceite de aguacate EFSC a escala semi-industrial, se encuentra dentro de los límites permitidos según la Norma Mexicana que permite un valor mínimo de 1,5 y máximo de 0,1 para aceite de aguacate. Los valores reportados en la literatura oscilan en un rango entre: 0.332 - 4.63% de ácido oleico. El valor más bajo corresponde al

análisis realizado al aceite de aguacate liofilizado, obtenido por prensado en frío (Serpa et al., 2014, 120) y el valor más alto corresponde al aceite de aguacate que fue expuesto a secado solar y posteriormente extraído por prensado en frío (Restrepo et al., 2012, 158). Dentro de éste rango se encuentra el aceite de aguacate liofilizado extraído por fluidos supercríticos a 40°C y 25 MPa con un índice de acidez de 0.48% de ácido oleico (Restrepo et. al, 2012, 158). De lo anterior se interpreta que mientras menor sea el valor de índice de acidez, mejor es la calidad del aceite ya que ésta es una medida de los ácidos grasos libres que contiene la muestra el cual puede promover procesos de autoxidación.

El índice de refracción del aceite a 25°C fue de 1,47, este es un indicador de la pureza del mismo. Está estrechamente relacionado con el grado de saturación y con la relación cis/trans de los dobles enlaces (Serpa et al., 2014, 120), por tanto este índice se ve alterado por la oxidación de los ácidos grasos. Jiménez y otros (Jiménez et al., 2001, 91) reportaron valores iguales a 1.47 para aceite de aguacate deshidratado por microondas y un valor de 1,47 para aceite de aguacate comercial.

El punto de humo, es una característica térmica de los aceites que está relacionada con la estabilidad al calor de los ácidos grasos (Castañeda et al., 2015, 424). El valor encontrado en ésta investigación (100°C) puede deberse a que el aceite de aguacate EFSC contienen en mayor proporción ácidos grasos insaturados cuyo punto de fusión es bajo, indicando así que es un aceite no apto para frituras. Lo anterior le confiere propiedades de un aceite de mesa, que permite proteger el  $\alpha$ -tocoferol, conocido por ser termolábil (Berasategi, Barriuso, Ansorena, & Astiasarán, 2012, 445). Ikhuoria y otros (Ikhuoria & Maliki, 2007, 951), reportaron un valor menor para aceite de

aguacate extraído con cloroformo 10,50°C, mientras que Castañeda y otros (Castañeda et al., 2015, 424) reportaron el punto de humo de aceite de aguacate Hass extraído por prensado en frío de 255°C.

El análisis de perfil de ácidos grasos que se observa en la tabla 12-b, muestra que el principal grupo de componentes fueron los ácidos grasos monoinsaturados (68,76%), cuyo componente principal fue el ácido oleico (44,20%), seguido en orden decreciente por el ácido palmítico (26,59%), palmitoleico (13,33%) eláidico (11,24%), linoleico (3,75%) y por último el esteárico (0,90%). Reddy y otros (Reddy et al., 2012, 534), analizaron el contenido de ácidos grasos en aceite de aguacate Hass extraído por diferentes métodos, encontrando en todos los casos, que los ácidos grasos monoinsaturados constituyen la mayor cantidad con 54-65%, donde el componente principal mediante el método de FSC fue el ácido oleico (41,57%) seguido del palmitoleico (13,08%), resultados que se asemejan a los encontrados en la presente investigación (44,20% y 13,33% respectivamente); Reddy y compañía también encontraron que según el método de extracción, se extraen ciertos componentes en mayor o menor medida. Encontró por ejemplo ácido mirístico en las extracciones por soxhlet, ultraturax y FSC y el ácido esteárico solo se detectó en el método donde se aplicó EFSC.

Con respecto al perfil de ácidos grasos presente en la materia prima para la extracción (Pulpa de aguacate liofilizada), se encontró una disminución cercana al 3% en el contenido de ácidos grasos saturados, también se encontró una disminución aproximada del 1,77% respecto al contenido de ácidos monoinsaturados inicial, pero

se obtuvo un aumento (3,75%) en cuanto al contenido de ácidos grasos poliinsaturados inicial (1,64%).

Cabe resaltar que el perfil de ácidos grasos puede verse afectado por otros factores, como condiciones agroclimáticas, madurez, posición en el fruto del árbol entre otros. Romero (Romero, 2012, 101) determinó el contenido de ácidos grasos en aguacate variedad Lorena en el departamento del Tolima durante la etapa de crecimiento, encontrando que la concentración y presencia de los ácidos grasos insaturados presentes en la pulpa de aguacate, se modificó conforme el fruto iba logrando su madurez y que por el contrario, la concentración de los ácidos grasos saturados presentó una acumulación constante durante las fases finales del desarrollo del fruto.

Los resultados microbiológicos que se observan en la tabla 12-c, se pueden atribuir a las condiciones de procesamiento del material vegetal de partida y al método de extracción utilizado, que demuestran que el aceite extraído por fluidos supercríticos, tiene las condiciones de microbiológicas adecuadas que lo harían apto para el consumo humano.

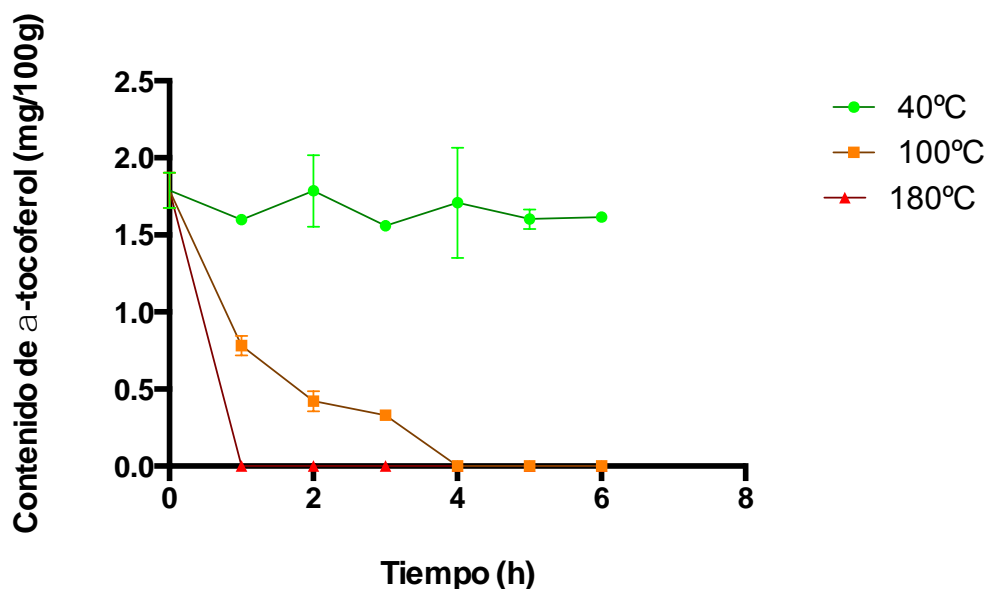
### **Estudio de estabilidad de $\alpha$ -tocoferol en aceite de aguacate**

El estudio de estabilidad del  $\alpha$ -tocoferol en aceite de aguacate se llevó a cabo analizando el efecto de la temperatura y la luz UV sobre el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y su capacidad antioxidante a través del tiempo, así como también la evolución del color en términos de las coordenadas del CIELab (L, a\*, b\*) cuando el aceite fue sometido a diferentes temperaturas durante 6 horas.

## Evaluación de la estabilidad del $\alpha$ -tocoferol del aceite de aguacate en función de temperatura y tiempo

En la figura 9 se observa que a medida que va aumentando la temperatura, menor es la concentración del  $\alpha$ -tocoferol en la muestra de aceite, siendo 180°C la temperatura a la cual se obtiene la mayor velocidad de degradación y después de una hora, la degradación total del  $\alpha$ -tocoferol en la muestra.

**Figura 9.** Degradación del  $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de aguacate EFSC en función de temperatura y tiempo



Lo anterior es coherente con lo reportado por Berasategi y otros (Berasategi et al., 2012, 445), quienes observaron la estabilidad de aceite de aguacate comercial prensado en frío mezclado con aceite refinado, encontrando que la  $\alpha$ -tocoferol es sensible al calor, ya que luego de 1 hora a 180°C éste compuesto se degradó por completo.

El análisis ANOVA luego de someter el aceite de aguacate EFSC a 100°C

durante 6 horas, se encuentran diferencias estadísticamente significativas ya que en la primera hora se observa una degradación significativa de la  $\alpha$ -tocoferol cercana al 43% y al cabo de cuatro horas se presenta una degradación total en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. Este resultado concuerda con las pruebas de calidad realizadas al aceite de aguacate, donde a 100°C se detectó el punto de humo, temperatura a la cual se rompen probablemente los enlaces de los ácidos grasos en la muestra, promoviendo así reacciones de degradación como la oxidación y la polimerización, dejando expuestos los ácidos grasos libres en el aceite (Kamal, 2006, 1058).

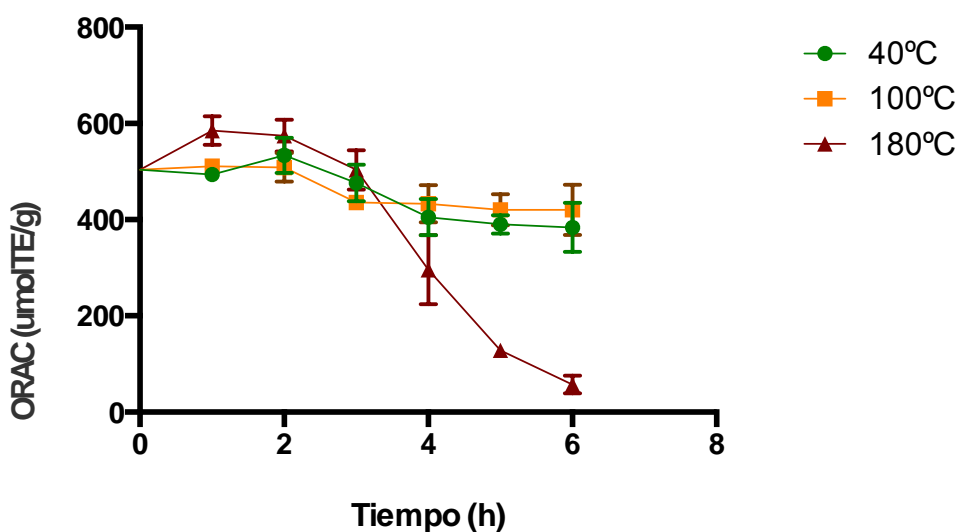
Luego de someter el aceite de aguacate EFSC a 40°C durante 6 horas, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante las 6 horas de tratamiento. En la figura 9 la concentración de  $\alpha$ -tocoferol fue aproximadamente constante, lo que indica la estabilidad del  $\alpha$ -tocoferol a 40°C durante el periodo de tiempo estudiado. Siendo éste, un resultado que podría llevar a pensar en la potencial aplicación del aceite, no para procesos de freído, sino para uso en alta cocina o cocina gourmet (Ikhuoria & Maliki, 2007, 952).

El análisis estadístico permitió observar diferencias significativas entre las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol entre las temperaturas de 40°C – 100°C y entre las temperaturas 40°C – 180°C y entre las temperaturas de 100°C – 180°C no se encontraron diferencias estadísticamente significativa. Dal Bosco y otros (Dal Bosco, Castellini, & Bernardini 2001, 1049) observaron una reducción en el comportamiento en la concentración del  $\alpha$ -tocoferol en carne de conejo, sometida a tres procesos térmicos encontrando reducción del 39%, 14% y 12%, en la carne cocinada (100°C – 8 minutos), asada (200°C – 15 minutos) y frita (175°C – 3 minutos), respectivamente.

## Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate en función de la temperatura y el tiempo.

Así mismo se evaluó el efecto del tiempo y la temperatura sobre la actividad antioxidante (en términos de ORAC) del aceite de aguacate EFSC a escala semi-industrial. Los resultados se muestran en la figura 10.

**Figura 10.** Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate EFSC en función de la temperatura y el tiempo



El aceite de aguacate EFSC presentó una capacidad antioxidante de 503,34  $\mu\text{molTE/g}$ . El efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante no fue estadísticamente diferente entre la temperatura de 40°C y 100°C. Como se podría esperar la mayor temperatura tuvo un efecto significativo en la disminución de la capacidad antioxidante dado que esta, es la que más afecta el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el aceite. Sin embargo en el aceite el  $\alpha$ -tocoferol no es la única sustancia responsable de otorgarle las propiedades antioxidantes, los ácidos grasos tienen la

capacidad de reaccionar con agentes oxidantes como el AAPH, esto se da entre el H de los carbonos insaturados y el agente oxidante, el radical formado se puede estabilizar por resonancia en la cadena de enlaces dobles conjugados. Esta reacción puede proteger la fluoresceína que es la molécula que se analiza por el método ORAC. Esta reacción entre el oxidante y los ácidos grasos, puede evitar una disminución en la concentración de la fluoresceína, de acuerdo a lo observado en las temperaturas de 40°C y 100°C. Sin embargo la temperatura de 180°C si tuvo un efecto significativo en la disminución de la capacidad antioxidante del aceite, disminuyendo desde 500  $\mu\text{mol TE/g}$  a 55  $\mu\text{mol TE/g}$  en el aceite (una reducción del 89%). Esto se puede deber a que a esta temperatura se da una oxidación de los ácidos grasos del aceite e incluso formación de radicales libres de los mismo, lo que disminuye de manera drástica las propiedades antioxidantes del aceite, sin contar que a esta temperatura se presenta degradación total del  $\alpha$ -tocoferol.

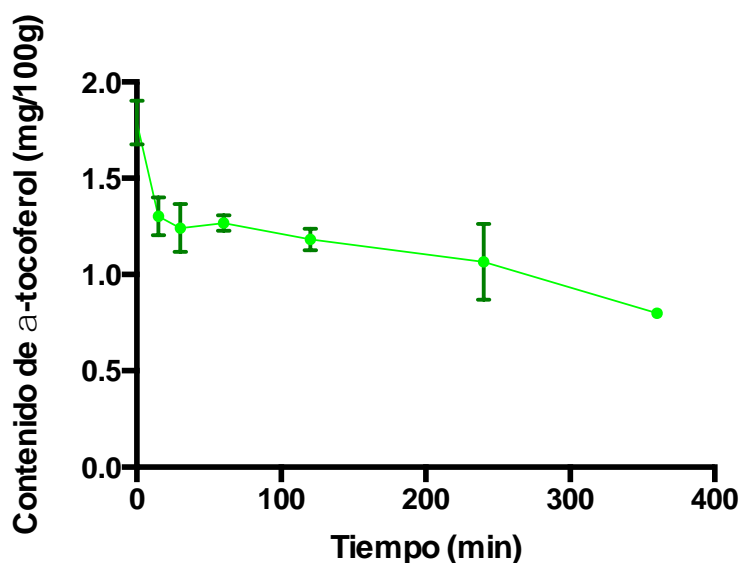
Estos comportamiento puede deberse a que la oxidación del aceite no sólo depende del grado de instauraciones, sino también a los compuestos antioxidantes presentes en la fracción insaponificable como tocoferoles, fitosteroles y carotenoides (Berasategi et al., 2012, 443; Botha, 2004, 26; Souza, Marques, Gomes, & Narain, 2015, 200) y de la calidad del mismo.

Cabe resaltar que la capacidad antioxidante del aceite puede verse afectado por otros factores, como el material vegetal usado como materia prima, Villa y otros (Villa-Rodríguez et al., 2011, 1235) reportaron valores similares para de frutos entre 8 y 12 días de maduración a 15°C (500  $\mu\text{mol TE/g}$  peso fresco aproximadamente) de igual manera reportaron un valor mayor a las 4 días de maduración (893.02  $\mu\text{mol TE/g}$  peso

fresco).

### Evaluación de la estabilidad del $\alpha$ -tocoferol en aceite de aguacate en función de tiempo y rayos UV

**Figura 11.** Degradación del  $\alpha$ -tocoferol presente en el aceite de aguacate EFSC sometido a radiación UV en función del tiempo

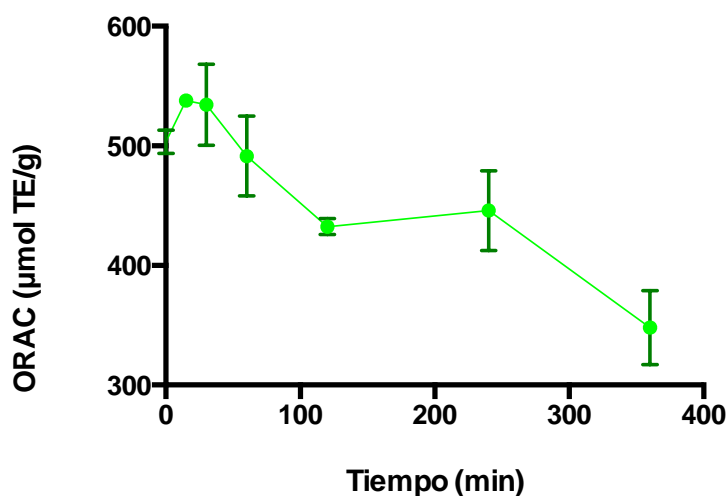


En este caso, se presentaron diferencias estadísticamente significativas al cabo de 120 minutos de exposición a luz UV como se muestra en la figura 11, esto puede deberse a que el  $\alpha$ -tocoferol es susceptible a la autooxidación en presencia la luz (Lampi et al., 2002, 4). La radiación adicionalmente, genera un aumento en la temperatura del aceite lo que puede contribuir a su disminución. El efecto en la disminución del contenido de  $\alpha$ -tocoferol fue menor para la radiación UV que para las temperaturas, esto puede deberse a que el aceite al no estar expuesto al oxígeno, no se generan reacciones de oxidación importante y los compuestos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol se degradan más lentamente, protegiendo más los ácidos grasos

insaturados presentes en el aceite susceptible a la oxidación. Resultado similar encontró Sabliov y otros (Sabliov et al., 2009, 900), al exponer  $\alpha$ -tocoferol libre a radiación UV, encontrando un nivel muy bajo de degradación de este compuesto.

### Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate en función de tiempo y rayos UV

**Figura 12.** Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate EFSC sometido a radiación UV en función del tiempo



En cuanto a la capacidad antioxidante del aceite de aguacate EFSC expuesto a radiación UV y en función del tiempo (figura 12). Las muestras analizadas presentaron una capacidad antioxidante máxima de 500  $\mu\text{mol TE/g}$  aproximadamente, disminuyendo hasta un valor de 320  $\mu\text{mol TE/g}$ , indicando que la capacidad antioxidante presentó diferencias estadísticamente significativa al estar expuesto a la luz UV por 360 minutos.

Esto puede deberse a que el aceite puede sufrir reacciones de oxidación importantes por la radiación UV y los compuestos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol

también son susceptibles a la fotodegradación, lo que disminuye la capacidad antioxidante del aceite (Lampi et al., 2002, 21). Se debe resaltar que el efecto de la radiación es menos drástico que el que tiene la temperatura.

### **Evolución del color de aceite de aguacate en función de la temperatura y luz UV a cabo de 6 horas y su comparación con aceites comerciales.**

**Tabla 13.** Parámetro CIELab de color para aceite de aguacate EFSC sometidos a diferentes condiciones de estrés: luz, UV y temperatura (ambiente, 40°C, 100°C y 180°C).

| <b>Aceite</b> | <b>L</b> | <b>a*</b> | <b>b*</b> |
|---------------|----------|-----------|-----------|
| FSC           | 98,9     | -12,7     | 35        |
| FSC 40°C      | 96,3     | -11,8     | 37,2      |
| FSC 100°C     | 94,8     | -11,2     | 39,6      |
| FSC 180°C     | 74,5     | 12,6      | 92,7      |
| Luz UV        | 98,7     | -12,2     | 35,6      |

Como se observa en la tabla 13, la luminosidad del aceite de aguacate se reduce luego de someterse a diferentes condiciones de temperatura durante 6 horas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas. El parámetro a\* (- verde, + rojo) presentó diferencias estadísticamente significativas, encontrando que el aceite sin someterse a proceso de calentamiento mostró una tonalidad más verde y a medida que incrementa la temperatura, va tomando tonalidad más rojas. El parámetro b\* (- azul, +amarillo), nuevamente presentó diferencias significativas, se encontró que el aceite calentado a 180°C mostró tonalidades mucho más amarillas que el aceite que no se sometió a proceso de calentamiento. Estos valores pueden deberse a que los pigmentos responsables del color en el aceite de aguacate son los carotenoides, luteína y clorofila presentes en el aguacate y el contenido de ácidos grasos insaturados, que al exponerse a la temperatura y al oxígeno, sus moléculas sufren un

proceso de peroxidación, generando así colores y olores propios de la oxidación (Castañeda et al., 2015, 425). En cuanto a la comparación de color del aceite irradiado con luz UV no se presentaron diferencias significativas en ningún parámetro de luminosidad y color.

Cuando se realizó éste mismo análisis para aceites comerciales (tabla 14) y se comparó con el aceite extraído por FSC a escala semi-industrial, se encontró que el valor L de aceite de aguacate EFSC vs los demás aceites comerciales mostró valores similares excepto con el aceite de oliva, quien presentó una luminosidad más opaca , los valores de  $a^*$  presentaron un valor similar a los demás aceites comerciales, una vez mas exceptuando el aceite de oliva quien presenta tonos más rojizos. Para los valores de  $b^*$  se presentó un tono amarillo bajo parecido a las mezclas de aceites comerciales y muy inferior al valor obtenido para el aceite de oliva. Estos valores pueden deberse a que los pigmentos responsables del color en el aceite de aguacate son los carotenoides, luteína y clorofila presentes en el aguacate, la cantidad de estos biocompuestos dependen una vez mas de las condiciones agroclimáticas y tratamientos poscosecha a los que fueron sometidos los frutos (Castañeda et al., 2015, 425; Donetti & Terry, 2014, 91). Se debe considerar que los valores presentados para el aceite de aguacate EFSC presentaron valores similares a los aceites comerciales.

Esta comparación es importante ya que desde el punto de vista comercial, el color es el parámetro que primero puede atraer la atención, es aquí donde el aceite EFSC cobra importancia ya que es semejante a aceites que fueron sometidos a

procesos fisicoquímicos como: la refinación química, blanqueo, desodorización, entre otros.

**Tabla 14.** Parámetro CIELab de color para aceite de aguacate EFSC vs. aceite comerciales.

| <b>Aceite</b>                 | <b>L</b> | <b>a</b> | <b>b</b> |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Aguacate FSC                  | 98,9     | -12,7    | 35       |
| Aguacate comercial EUA*       | 82,7     | -11,6    | 65,5     |
| Aguacate comercial Colombiano | 38,3     | 7,6      | 65,1     |
| Canola                        | 98,6     | -14,7    | 48,2     |
| Girasol                       | 99,2     | -10,4    | 27,1     |
| Maní                          | 99,6     | -5,4     | 13,05    |
| Mezcla 1                      | 99,2     | -11,0    | 34,15    |
| Mezcla 2                      | 98,7     | -11,05   | 34,15    |
| Oliva                         | 62,5     | 6,1      | 104,15   |
| Soja                          | 97,4     | -10,2    | 43,1     |

\*Aceite importado de Estados Unidos

### Estimación de costos

La estimación de costos se realizó para la extracción a escala semi-industrial a condiciones de 60°C, 20 MPa, flujo de CO<sub>2</sub> de 70 kg/h y 6.600 kg/año de aguacate Hass liofilizado.

La tabla 15 muestra los costos presentados en fracciones, COM-costo de producción, FRI- Inversión inicial, COL-Costos laborales, CUT- Costo de servicios en función del tiempo y de las fracciones de extracción (Paula et al., 2016).

**Tabla 15.** Estimación de costos para la EFSC a escala semi-industrial a 20MPa y 60°C.

| <b>FRI</b><br><b>(US/año)</b> | <b>COL</b><br><b>(US/año)</b> | <b>CUT</b><br><b>(US/año)</b> | <b>CRM</b><br><b>(US/año)</b> | <b>COM</b><br><b>(US/año)</b> | <b>CU*</b><br><b>(US/L)</b> |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 271000                        | 15840                         | 12835                         | 45408                         | 197266                        | 259                         |

\*Costo unitario CU



Se estima que la fracción de inversión inicial es constante en el tiempo, dado que se relaciona únicamente con la inversión inicial en equipos. Con relación a la mano de obra y los servicios públicos, estos dependen sólo de la capacidad de producción y del equipo. Para la fracción de los costos para materia prima, puede variar en el año, se hace el estimado con el costo actual por kilogramo de aguacate Hass.

En el mercado Colombiano un litro de aceite de aguacate extra virgen para uso en alimentos cuesta alrededor de US 15. Se estima además que para este trabajo se requiere 8,9 Kg de aguacate Hass liofilizado para 1 litro de aceite de aguacate rico en vitamina E con un contenido de 1,30 mg de  $\alpha$ -tocoferol por 100 g de aceite y tiene un costo de producción de US 259,9 /L. Acosta (Acosta Moreno, 2011, 71) en su tesis de grado "Evaluación y escalamiento del proceso de extracción de aceite de aguacate utilizando tratamiento enzimático", determinó un costo de \$12,958 pesos colombianos por una botella de 750 ml de aceite de aguacate, de igual manera reportó el valor para el 2011 de aceite de aguacate extra virgen en Colombia, Chile, México y España con valores de \$25,300; \$24,700; \$25,300 y \$26,100 respectivamente. Si se compara el valor obtenido en este trabajo de investigación con valores reportados por métodos de extracción convencionales, este, está muy por encima del extraído de manera convencional. Esto puede obedecer a lo selectivo de la tecnología que lo hace apto para otros usos más específicos, los cuales podrían estar orientados a la industria cosmética y farmacéutica.

**Ficha técnica**

A continuación se presenta en la tabla 16, la ficha técnica del aceite de aguacate Hass extraído por fluidos supercríticos con información de interés comercial.

Tabla 16. Ficha técnica

|  <p style="text-align: center;">CORPORACIÓN UNIVERSITARIA LASALLISTA<br/>GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS</p> |  |        |
|---|--|--------|
| NOMBRE PRODUCTO:  | DEL Aceite de aguacate Hass rico en $\alpha$ -tocoferol extraído por FSC |        |
| CODIGO  |  |        |
| VERSIÓN   | 001  |        |
| PROTOTIPO   | DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO   |        |
|   | Rendimiento (%)  | 21,70  |
|   | Eficiencia de extracción del $\alpha$ -tocoferol (%)                     | 50,52  |
|   | Índice de acidez (% ácido oleico)  | 1,46   |
|   | Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg)                              | 4,79   |
|   | Índice de saponificación ( mg KOH/g )                                    | 198,28 |
|   | Índice de yodo (cgl <sub>2</sub> /g)                                     | 87,13  |
|   | Índice de refracción a 25°C  | 1,47   |
|   | Densidad (g/mL)  | 0,94   |
|   | Punto de humo (°C)   | 100    |
|   | Temperatura de estabilidad del $\alpha$ -tocoferol (°C)                  | 40     |
|   | Contenido de $\alpha$ -tocoferol (mg/100g de aceite)                     | 1,79   |
|   | Capacidad Antioxidante (amol TE/g de aceite)                             | 503,34 |
|   | Color L  | 98,9   |
|   | a*   | -12,7  |
|   | b*   | 35     |
|   | $\Sigma$ saturados   | 27,49  |
|   | $\Sigma$ monoinsaturados   | 68,76  |
|   | $\Sigma$ poliinsaturados   | 3,75   |
|   | Relación Saturados/insaturados   | 0,38   |
|   | Costo estimado de producción (US/L)                                      | 259,9  |
|   | Material vegetal: Aguacate Hass  |        |
|   | Procedencia: Oriente Antioqueño  |        |
|   | Fecha de procesamiento: Febrero de 2016                                  |        |
| ELABORÓ   | Jessica Flórez Arroyave  |        |
| REVISÓ  | Ana María Restrepo Duque   |        |

## Conclusiones

La caracterización de la materia prima previo al proceso de extracción (donde la humedad fue de 3,21%, el extracto etéreo de 67,05% y la concentración de vitamina E de 0.25 mg/100g), posiblemente la liofilización por su principio de operación al utilizar temperaturas apropiadas, protegió los compuestos bioactivos presentes, y evitó la degradación de compuestos termolábiles como la vitamina E, mejorando las propiedades microbiológicas (halladas también para el material vegetal fresco), condiciones que convirtieron a esta materia prima, en un material apto para el inicio del proceso de extracción.

El diseño de experimentos llevado a cabo a nivel de laboratorio permitió establecer las mejores condiciones de presión y temperaturas (20MPa y 60°C respectivamente) a escalar en el equipo semi-industrial, encontrando un flujo de 8,4 Kg CO<sub>2</sub>/h y 90 minutos, para la extracción de aceite de aguacate Hass rico en vitamina E, a partir de remanentes de cosecha, obteniendo 2,04% de rendimiento y 0,36 mg de  $\alpha$ -tocoferol en 100 gr de aceite. La temperatura fue el único parámetro que presentó influencia significativa sobre el la concentración del  $\alpha$ -tocoferol en el aceite.

Se determinó el criterio de relación de flujos para llevar a cabo el proceso de escalado de las mejores condiciones encontradas a escala de laboratorio, definiendo un flujo de 70 Kg CO<sub>2</sub>/h y 181,29 minutos, en el cual se obtuvo un rendimiento de extracción del 21,7 %, una concentración de 1,79 mg de  $\alpha$ -tocoferol en 100 gr de aceite y una eficiencia de extracción del 50,52 %.

Los resultados obtenidos para el aceite de aguacate extraído por FSC a escala

semi-industrial en relación a las pruebas de calidad, lo hacen apto para ser clasificado como un aceite de mesa para uso gourmet, no apto para procesos de freído, ya que el estudio de estabilidad permitió identificar que cuando éste es calentado a 100 °C por 6 horas, su concentración de  $\alpha$ -tocoferol comienza a disminuir constantemente hasta degradarse por completo a cabo de 2 horas; en cambio a 40 °C se mantiene constante, indicando una estabilidad del  $\alpha$ -tocoferol a ésta temperatura.

El color del aceite de aguacate obtenido por FSC es similar a los aceites de mayor oferta en Colombia como las mezclas, canola y girasol. Este parámetro tiene relevancia ya que los aceites comerciales son sometidos a procesos de refinación química, blanqueo, desodorización entre otros, para conferirles características deseables, mientras que el producto obtenido por FSC no se sometió a ningún tratamiento.

Mediante el análisis de estimación costo de producción, se determinó que para extraer un litro de aceite de aguacate Hass rico en vitamina E en Antioquia cuesta US 259,9 /L.

Lo cual supera por mucho el precio de aceites en el mercado para uso alimentario. Por lo cual el proceso no es viable para uso alimentario, sin embargo este tipo de aceite podría ser viable para la industria cosmética y farmacéutica en la cual, los aceites ricos en componentes bioactivos tiene un costo posiblemente competente.

## **Perspectivas**

Desarrollar una cinética de extracción, para determinar tiempo, presión, temperatura y flujo, optimizando así el proceso de extracción.

Aumentar la capacidad de CO<sub>2</sub> recirculado repartiendo entre los separadores y los extractores, permitiendo así llevar hasta un 90% de recirculación del CO<sub>2</sub> y garantizar una disminución de la cantidad de CO<sub>2</sub> consumida que se da en cada fase, si se hace de flujo continuo.

Podría contemplarse para trabajos futuros la estimación de costo de producción a escala industrial, en el que se incluya la adquisición de una planta de producción de CO<sub>2</sub> ya que el costo de la extracción por fluidos supercríticos, incrementa considerablemente cuando el CO<sub>2</sub> es comprado en pipetas comerciales.

## Referencias

- Acosta, M. C. (2011). Evaluación y escalamiento del proceso de extracción de aceite de aguacate utilizando tratamiento enzimático [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- Alarcón, J. J., Arévalo, E., Díaz, A. L., & Galindo, J. R. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill). Recuperado de <http://www.ica.gov.co/getattachment/4b5b9b6f-ecfc-46e1-b9ca-b35cc1cefee2/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Aguacate.aspx>
- Algarra, M., Sánchez, C., Esteves, J. C. G., & Jiménez, J. (2012). Fatty acid and cholesterol content of manchego type cheese prepared with incorporated avocado oil. *International Journal of Food Properties*, 796–808. <http://doi.org/10.1080/10942912.2010.503358>
- Álvarez, M. V., Hincapié, S., Saavedra, N., Alzate, L. M., Muñoz, A. M., Cartagena, C. J., & Londoño-Londoño, J. (2015). Exploring feasible sources for lutein production: food by-products and supercritical fluid extraction, a reasonable combination. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 891–897. <http://doi.org/10.1007/s11101-015-9434-0>.
- Association of Official Analytical Chemists A.O.A.C. (1990). Official Methods of analysis. 26th Ed. Washington, D. C.
- American Oil Chemists Society A.O.C.S. Official Method (2013). Free Fatty Acids. Sampling and analysis of commercial fats and oils. [Ca 5a – 40].
- American Oil Chemists Society A.O.C.S. Official Method (2013). Iodine Value. Sampling and analysis of commercial fats and oils. [Cd 1-25].
- American Oil Chemists Society A.O.C.S. Official Method (2013). Peroxide Value. Sampling and analysis of commercial fats and oil. [Cd 8 – 53].
- American Oil Chemists Society A.O.C.S. Official Method (2013). Saponification Value. Sampling and analysis of commercial fats and oils. [Cc 10a-25].
- American Oil Chemists Society A.O.C.S. Official Method (2013). Smoke, Flash, and Fire Points. Sampling and analysis of commercial fats and oils. [Cc 10a-25].
- Serpa, A., Echeverri, A., Lezcano, M., Vélez, L., Ríos, A. (2014). Extracción de aceite de aguacate variedad “Hass” (*Persea americana* Mill ) liofilizado por prensado en frío. *Revista Investigaciones Aplicadas*, 8(2), 113–123.

- Ascherio, A. (2002). Epidemiologic Studies on Dietary Fats and Coronary Heart Disease. *The American Journal Of Medicine*, 9343(02), 9–12.
- Asohofrucol. (2013). Plan de Negocios de Aguacate Índice. Asociacion Hortofruticula de Colombia. Recuperado de <https://www.ptp.com.co/documentos/PLAN%20DE%20NEGOCIO%20AGUACATE%20131211.pdf>
- Bayramoglu, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 535–540. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.015>
- Berasategi, I., Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2012). Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. *Food Chemistry*, 132(1), 439–446. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.018>
- Bogdanovic, A., Tadic, V., Arsic, I., Milovanovic, S., Petrovic, S., & Skala, D. (2016). Supercritical and high pressure subcritical fluid extraction from Lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.008>
- Botha, B. M. (2004). Supercritical fluid extraction of avocado oil. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 27, 24-27
- Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Maréchal, E. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(4), 470–80. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.007>
- Buelvas Salgado, G. A., Patiño Gómez, J. H., & Cano Salazar, J. A. (2012). Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass (persea americana mill) utilizando tratamiento enzimático. *Revista Lasallista de Investigacion*, 9(2), 138–150.
- Campos, R. ., SantaCruz, U. ., Florez, M. J. ., & Rodríguez Perez, J. E. (2011). Dinámica de la acumulación de acidos grasos en aguacate (Persea americana Mill.) selección “Méndez.” Memorias VII World Avocado Congress, 1–8. Recuperado de <http://worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/EduardoCampos1440-1500.pdf>
- Castañeda, A., López Varela, P., Guel Silva, G., Ramos Cassellis, E., Ariza Ortega, A., Carrera Martínez, C. D., & Portillo-Reyes, R. (2015). Caracterización oxidativa de aceite de aguacate hass y aceites de aguacate criollo ( P . Americana Mill . Var . Drymifolia ). VIII Congreso Mundial de La Palta 2015.
- Chen, Q., Hu, Z., Yao, F. Y. D., & Liang, H. (2016). Study of two-stage microwave

- extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 538–545. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.019>
- Ciurlia, L., Bleve, M., & Rescio, L. (2009). Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 338–344. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.03.003>
- Costagli, G & Betti, M. (2015). Avocado oil extraction processes: method for cold-presses high-quality edible oil production versus traditional production. *Journal of Agricultural Engineering*, XLV (467), 115–122. <http://doi.org/10.4081/jae.2015.467>
- Da Porto, C., Decorti, D., & Tubaro, F. (2012). Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 401–404. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.015>
- Dal Bosco, A., Castellini, C & Bernardini, M. (2001). Nutritional Quality of Rabbit Meat as Affected. *Journal of Food S*, 66(7), 1047 – 1050.
- De Souza, J., Carregari Polachini, T., Silva Dias, L., Neuza, J., & Telis Romero, J. (2015). Physicochemical and rheological characterization of avocado oils. *Ciênc. Agrotec*, 39(4), 390–400.
- Donetti, M., & Terry, L. a. (2014). Biochemical markers defining growing area and ripening stage of imported avocado fruit cv. Hass. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), 90–98. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.011>
- Dos Santos, M. A. Z., Alicieo, T. V. R., Pereira, C. M. P., Ramis-Ramos, G., & Mendonça, C. R. B. (2014). Profile of bioactive compounds in avocado pulp oil: Influence of the drying processes and extraction methods. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 19–27. <http://doi.org/10.1007/s11746-013-2289-x>
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Food Science and Nutrition*, 53(7), 738-750. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.556759>
- Espinosa, F. a., Martinez, J., & Martinez, H. (2014). Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 93, 2–6. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.05.010>
- Farhadpour, M., Hashempour, H., Talebpour, Z., A-Bagheri, N., Shushtarian, M. S., Gruber, C. W., & Ghassempour, A. (2016). Microwave-assisted extraction of cyclotides from *Viola ignobilis*. *Analytical Biochemistry*, 497, 83–89. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2015.12.001>

- Febrianto, N. A., & Yang, T. A. (2011). Producing high quality edible oil by using eco-friendly technology: A review. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4), 317–326.
- García, M., Coant, N., Truman, J.-P., Snider, A. J., & Hannun, Y. (2014). Sphingolipids in colon cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(5), 773–82. <http://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.09.007>
- Gracia, I., Rodríguez, J. F., De Lucas, A., Fernandez-Ronco, M. P., & García, M. T. (2011). Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> process for the concentration of tocopherol, carotenoids and chlorophylls from residual olive husk. *Journal of Supercritical Fluids*, 59, 72–77. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.05.019>
- Hanady Abdallah, M. M. A. (2007). Effect of antioxidants on shelflife of edible oils.[Tesis de maestría] University of Khartoum, Khartoum, Sudán.
- Hategekimana, J., Chamba, M. V. M., Shoemaker, C. F., Majeed, H., & Zhong, F. (2015). Vitamin E nanoemulsions by emulsion phase inversion: Effect of environmental stress and long-term storage on stability and degradation in different carrier oil types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483, 70–80. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.020>
- Herrero, M., Cifuentes, a, & Ibanez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (1994). Productos Agrícolas. Aguacate. Bogotá: ICONTEC. (NTC 1248)
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2007). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos. Bogotá: ICONTEC (NTC 4458).
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2007). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C. Bogotá: ICONTEC (NTC 4519).
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2007). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. método horizontal para la detección de salmonella. Bogotá: ICONTEC. (NTC 4574)
- Ikhuoria, E., & Maliki, M. (2007). Characterization of avocado pear (*Persea americana*) and African pear (*Dacryodes edulis*) extracts. *African Journal of Biotechnology*,

6(4), 950–952.

- Jiménez, M. E., Aguilar, M. del R., Zambrano, M. de la L., & Kolar, E. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 45(2), 89–92.
- Joao Shojiro Tango, Cássia Regina Limonta Carvalho, N. B. S. (2004). Caracterização Física E Química De Frutos De Abacate Visando a Seu Potencial Para Extração De Óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1), 17–23. <http://doi.org/10.1590/S0100-29452004000100007>
- Gil, Joana., Villa, J., Ayala, F, Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E., & González, G. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Kamal-Eldin, A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(12), 1051–1061. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200600090>
- Knight, R. J. (2013). History, Distribution and Uses. In A. Schaffer, University of Florida, USA, B N Wolstenholme, University of KwaZulu-Natal, South Africa, A W Whiley, Sunshine Horticultural Services (Ed.), *The Avocado: Botany, Production and Uses* (pp. 1–14).
- Lai, L. L., Soheili, K. C., & Artz, W. E. (2008). Deacidification of soybean oil using membrane processing and subcritical carbon dioxide. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(2), 189–196. <http://doi.org/10.1007/s11746-007-1182-x>
- Lampi, A. M., Kamal Eldin, A., & Piironen, V. (2002). Tocopherols and Tocotrienols from Oil and Cereal Grains. In *Functional Foods. Biochemical and Processing Aspects* (pp. 2–29).
- Londoño, J. L. (2012). Antioxidants: biological relevance and methods to measure their activity. In *Development and Transversatility. Lasallista Research and Science*. (pp.129-162)
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography*, 1217(16), 2383–2389. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Márquez, C., Yepes, D., & Sanchez, L. (2014). Changes physical-chemical of avocado (*Persea americana* Mill. cv. “Hass”) In postharvest for two municipalities of Antioquia. *Temas Agrarios* 19(1), 32–47.

- Melo, M. M. R. De, Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2014). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of vegetable matrices : Applications , trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115–176. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>
- Meyer, M. D., & Terry, L. A. (2010). Fatty acid and sugar composition of avocado, cv. Hass, in response to treatment with an ethylene scavenger or 1-methylcyclopropene to extend storage life. *Food Chemistry*, 121(4), 1203–1210. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.005>
- Ministerio de Agricultura. (2015). Exportaciones colombianas de aguacate Hass triunfan en Europa. Recuperado de <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Exportaciones-aguacate-triunfan-en-Europa.aspx>
- Mi oriente. (2014). Oriente una región próspera para el aguacate. Recuperado de <http://www.mioriente.com/secciones/medio-ambiente/oriente-una-region-prospera-para-el-aguacate.html>
- Montoya González, M., Martínez Flores, H. E., & Rodiles Lopez, J. O. (2012). Estudio de la composición química , perfil de ácidos grasos y efecto hipocolesterolémico e hipolipidémico de un aguacate liofilizado. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica.
- Mooz, E. D., Gaiano, N. M., Shimano, M. Y. H., Amancio, R. D., & Spoto, M. H. F. (2012). Physical and chemical characterization of the pulp of different varieties of avocado targeting oil extraction potential. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 32(2), 274–280. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000055>
- NORMA MEXICANA (2008). Aceites y grasas. aceite de aguacate - especificaciones (NMX-F-052- SCFI-2008).
- Nyam, K. L., Tan, C. P., Karim, R., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2010). Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO<sub>2</sub>). *Food Chemistry*, 119(3), 1278–1283. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.007>
- Olaeta, J. A. (2003). Industrialización del aguacate: estado actual y perspectivas futuras . *Proceedings V World Avocado Congress*.
- Ortiz Moreno, A., Dorantes, L., Galínndez, J., & Guzmán, R. I. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2216–2221. <http://doi.org/10.1021/jf0207934>

- Ozdemir, F., & Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, 86(1), 79–83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.012>
- P. Madawala, S. R., Kochhar, S. P., & Dutta, P. C. (2012). Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas Y Aceites*, 63(2), 143–151. <http://doi.org/10.3989/gya.083811>
- Paula, J. T., Aguiar, A. C., Sousa, I. M. O., Magalhães, P. M., Foglio, M. A., & Cabral, F. A. (2016). Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 219–225. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.013>
- Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340–372. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Polania Barreto, W. (2014). Actividad antioxidante de los residuos del aguacate Hass ( *Persea americana* Mill. var Hass) sometidos a extracciones clásicas y a fluidos presurizados. [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Prado, J., Dalmolin, I., Carareto, N., Basso, R., Meireles, A., Oliveira, J., Batista, E & Meireles, M (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 249–257. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007>
- Prado, J., Prado, G., & Meireles, M. (2011). Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. *Journal of Supercritical Fluids*, 56(3), 231–237. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.10.036>
- Prescha, A., & Grajzer, M. (2014). The Antioxidant Activity and Oxidative Stability of Cold-Pressed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 91, 1291–1301. <http://doi.org/10.1007/s11746-014-2479-1>
- Przybylski, R., Lee, Y., & Kim, I. (2000). Oxidative Stability of Canola Oils Extracted with Supercritical Carbon Dioxide. *LWT - Food Science and Technology*. 31,687–693.
- Quiñones, N., Meza, O., Osorio, G., & Gallardo, T. (2013). Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Food Research International*, 51(1), 148–154. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.037>
- Ramírez R, S., Arias M, J. D., Bedoya, J. C., Rueda L, E. A., Sánchez, C. Y., & Granada G, S. D. (2015). Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens in vitro Metabolitos producidos por microorganismos

antagonistas son capaces de inhibir in vitro los principales patógenos del aguacate. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 58–63. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n1.48241>

- Reddy, M., Moodley, R., & Jonnalagadda, S. B. (2012a). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana* Mill.) oil effect of extraction methods. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(6), 529–37. <http://doi.org/10.1080/03601234.2012.665669>
- Reddy, M., Moodley, R., & Jonnalagadda, S. B. (2012b). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana* Mill.) oil--effect of extraction methods. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(1), 529–37. <http://doi.org/10.1080/03601234.2012.665669>
- Ren, C., Young, E., Kim, J., & Lim, S. (2016). Enhancing dispersion stability of alpha-tocopherol in aqueous media using maize starch and ultrasonication. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 589–594. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.001>
- Restrepo Duque, A. M. (2008). Nuevas perspectivas de consumo de frutas uchuva (*Physalis peruviana* L.) y fresa (*Fragaria vesca* L.) minimamente procesadas fortificadas con vitamina E. [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Restrepo D, A. M., Londoño Londoño, J., González Álvarez, D., Benavides Paz, Y., & Cardona Salazar, B. L. (2012). Comparación del aceite de aguacate variedad Hass cultivado en Colombia , obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad. *Revista Lasallista de Investigación*, 9, 151–161.
- Rodríguez Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M.-J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5625–5635. <http://doi.org/10.1021/jf1048832>
- Romero Sánchez, M. A. (2012). Comportamiento fisiológico del aguacate (*Persea americana* mill.) Variedad Lorena en la zona de Mariquita, Tolima. [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- Rosa, P. T. V., & Meireles, M. A. A. (2005). Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 235–240. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.064>

- S.P., B., Narain, N., & Rocha R.V.M., P. M. Q. (2001). Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas Y Aceites*, 52(3-4), 171–174. <http://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.353>
- Sabliov, C. M., Fronczek, C., Astete, C. E., Khachatryan, M., Khachatryan, L., & Leonardi, C. (2009). Effects of Temperature and UV Light on Degradation of Alpha Tocopherol in Free and Dissolved. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 895–902. <http://doi.org/10.1007/s11746-009-1411-6>
- Salgado, B., & Gómez, P. (2012). Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass ( *Persea americana* Mill ) utilizando tratamiento enzimático. *Revista Lasallista de Investigacion*, 9(2), 138-150
- Sanadgol, N., Mostafaie, A., Bahrami, G., Mansouri, K., Ghanbari, F., & Bidmeshkipour, A. (2010). Elaidic acid sustains LPS and TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 and VCAM-I expression on human bone marrow endothelial cells (HBMEC). *Clinical Biochemistry*, 43(12), 968–972. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.04.066>
- Siembra (2015). Validación de procesos y productos de transformación de aguacate. Recuperado de <http://www.siembra.gov.co/>
- Sims, K. H., Tytler, E. M., Tipton, J., Hill, K. L., Burgess, S. W., & Shaw, W. A. (2014). Avanti lipid tools: Connecting lipids, technology, and cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(8), 1038–1048. <http://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.05.008>
- Solana, M., Rizza, C. S., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311–318. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>
- Sookwong, P., Suttiarporn, P., Boontakham, P., Seekhow, P., Wangtueai, S., & Mahatheeranont, S. (2016). Simultaneous quantification of vitamin E,  $\gamma$ -oryzanols and xanthophylls from rice bran essences extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, 211, 140–147. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.001>
- Souza, D. S., Marques, L. G., Gomes, E. de B., & Narain, N. (2015). Lyophilization of Avocado ( *Persea americana* Mill.): Effect of Freezing and Lyophilization Pressure on Antioxidant Activity, Texture, and Browning of Pulp. *Drying Technology*, 33(2), 194–204. <http://doi.org/10.1080/07373937.2014.943766>
- Sovová, H. (2012). Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *Journal of Supercritical Fluids*, 66, 73–79. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.11.004>

- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., Farid, M., & Tariq, S. (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 86, 57–66. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.020>
- Thongchai, W. (2014). Determination of retinol and alpha-tocopherol in avocado nanoemulsion with monolithic column. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 36–43.
- Villa-Rodríguez, J. a., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. a. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of “Hass” avocado. *Food Research International*, 44(5), 1231–1237. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- Wang, X., Zhang, C., Li, L., Fritsche, S., Endrigkeit, J., Zhang, W., Meng, J. (2012). Unraveling the Genetic Basis of Seed Tocopherol Content and Composition in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plos One*, 7(11), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050038>
- Yen, H. W., Chiang, W. C., & Sun, C. H. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(1), 53–57. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.07.010>
- Ying Chen, L., Hsun Shuo, C., Chien Fang, P., Chu Hung, L., & Ih Sheng, C. (2012). Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. *Food Chemistry*, 135(4), 2904–2909. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.073>